

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700426

研究課題名（和文） レット症候群病態におけるNF-κBシグナル関与の解析

研究課題名（英文） Analysis of NF-κB signaling in the pathogenesis of Rett syndrome

研究代表者

岸 憲幸 (KISHI NORIYUKI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30594882

研究成果の概要（和文）：本研究計画においてはPCRアレイを用いて *Mecp2* 欠失マウスの病態におけるNF-κBシグナルの関与に関して解析を行った。NF-κBシグナル関連遺伝子84個を網羅したPCRアレイを用いて、*Mecp2* 欠失脳におけるNF-κBシグナル関連因子の発現変化を解析したところ、*I16* や *Tnf* を含む多数の下流因子が *Mecp2* 欠失大脳新皮質において発現が上昇していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we investigated the involvement of NF-κB signaling in the pathogenesis of *Mecp2*-null mice by PCR array analysis. Using PCR arrays that consisted of 84 NF-κB signaling-related genes, we compared gene expression profiles between wild-type and *Mecp2* ^{-/-} brains. Our study revealed that the downstream genes for NF-κB signaling, including *I16* and *Tnf*, are over-expressed in the *Mecp2*-null cerebral cortex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：統合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳発達障害

1. 研究開始当初の背景

レット症候群(Rett syndrome)は1966年にオーストリアの医師 Andreas Rett によって報告された主に女兒の神経発達障害で、精神発達障害や自閉症様症状を呈する。生後6か月から18か月の無症状期間を経た後、脳の成長の遅れ、自閉症特有の無意味な手の動きや、言語習得の欠如、知能発達遅滞、呼吸異常、てんかんなどの多彩な症状を呈する。近年の医療管理体制の進歩により、呼吸障害などによる死因が減少したが、根本的な治療法は確立されていない。1万から2万人の女兒あたり1人の罹患率で、女兒の精神発達遅滞の原因としてはダウン症候群に次いで二番目に多い原因となっている。

長い間、原因や疾患のメカニズムは不明であったが、1999年にレット症候群患者においてX染色体上の *methyl CpG binding protein 2 (MECP2)* 遺伝子の変異が発見された。その後の解析より、レット症候群患者の95%以上に *MECP2* の変異が検出され、レット症候群と *MECP2* 遺伝子の強い遺伝学的関連が示唆された。*MECP2* が原因遺伝子として同定された後、疾患モデルとして複数の *Mecp2* 変異マウスが作製された。*MeCP2* は様々な組織において発現しているが、興味深いこと *Cre-loxP* システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスの解析より *Mecp2* 変異マウスの表現型は *Mecp2* 遺伝子の中枢神経系での欠損に起因していることが明らかとなり、*MeCP2*

の神経系特異的な機能の解析が精力的に行われている。

2. 研究の目的

研究代表者の現在までの研究により、転写抑制因子である MeCP2 の標的遺伝子の 1 つとして NF- κ B シグナルの構成因子の 1 つである *Irak1* 遺伝子を同定した。本研究計画ではこれらの研究結果を踏まえ、脳における NF- κ B シグナルの異常亢進がどのように *Mecp2* 変異マウスの表現型に関与しているのかを解析するため、PCR アレイを用いて *Mecp2* 変異マウス脳における NF- κ B シグナル関連遺伝子の発現解析を行う。PCR アレイは定量的 PCR 法を利用した遺伝子発現量の定量解析を目的としたアレイで、最適化した PCR 条件で同時に多数の遺伝子群の発現量解析が可能である。

本研究計画では、モデルマウスにおいて病因メカニズムに重要な 8 週齢（個体レベルでの表現型が顕著な時期）で野生型と *Mecp2* 変異マウス脳から RNA を採取し、SABiosciences 社の NF- κ B シグナル関連遺伝子 84 個を網羅した PCR アレイを用いて、NF- κ B シグナル関連遺伝子について野生型と *Mecp2* 変異マウスでの発現差異を解析する。

3. 研究の方法

(1) *Mecp2* 変異マウスの取得・繁殖

Mecp2 変異マウスに関しては既に複数の系統が発表されている。そのうち幾つかの系統に関しては Jackson Laboratory より購入することが可能である。本研究計画においては、以前の解析に引き続き、Adrian Bird 研究室にて作製された完全欠失型の *Mecp2* 変異マウスを購入した。この系統は完全欠失型であるのでマウスの表現型が明瞭に観察できる上、遺伝学的バックグラウンドが純粋な C57BL/6 系統になっており、遺伝学的バックグラウンドの混在による PCR アレイ解析への二次的な影響を排除できる。オスの *Mecp2* ヘミ接合体は繁殖能力がないので、メスの *Mecp2* ヘテロ接合体を野生型オスマウスと掛け合わせながら、*Mecp2* 変異マウスのコロニーを拡大、繁殖させていった。

(2) *Mecp2* 変異マウス脳からの RNA 採取と cDNA の作製

本研究計画においては *Mecp2* 変異マウスにおける病因メカニズムに重要な 8 週齢（個体レベルでの表現型が顕著な時期）で野生型と *Mecp2* ヘミ接合体マウス脳から RNA を採取し、cDNA を作製した。生物学的な再現性を高めるため、野生型 3 個体、*Mecp2* ヘミ接合体マウス 3 個体を用いた。

(3) PCR アレイ解析

本研究計画においては SABiosciences 社の NF- κ B シグナル関連遺伝子の PCR アレイを購入した。この PCR アレイには NF- κ B シグナルの上流、下流因子 84 個が網羅されている。8 週齢の野生型 3 個体、*Mecp2* ヘミ接合体マウス 3 個体ずつ、計 6 回の PCR アレイ解析を行い、野生型と *Mecp2* ヘミ接合体マウス脳での NF- κ B シグナル関連遺伝子の発現比較を行った。

4. 研究成果

(1) PCR アレイを用いた *Mecp2* $-/y$ マウス脳における NF- κ B シグナル関連因子の発現変化

研究代表者の以前の研究において、*Mecp2* 変異マウスを Rett 症候群モデルマウスとして用い、病因解明のため転写抑制因子である MeCP2 の標的遺伝子をマイクロアレイ解析から探索を行った。（図 1）。この解析より NF- κ B シグナルの構成因子の 1 つである *Irak1* 遺伝子が *Mecp2* $-/y$ の脳において有意に発現が上昇していることを確認し、更に MeCP2 が *Irak1* 遺伝子のプロモーター制御領域に存在するメチル化 CpG に結合することを確認した。更に機能解析を進め、a) 培養細胞や胎仔脳で *Irak1* を強制発現させるとニューロンの成熟が阻害されること、b) *Mecp2* ヘテロマウスと *Nfkb1* ヘテロマウスを掛け合わせ、*Mecp2*-null マウスでの NF- κ B シグナルを低下させると、ニューロン成熟障害の表現型が部分的に回復すること、c) *Mecp2* $-/y$; *Nfkb1* $+/-$ マウスの寿命は、*Mecp2* $-/y$ マウスに比べ有意に延長するこ

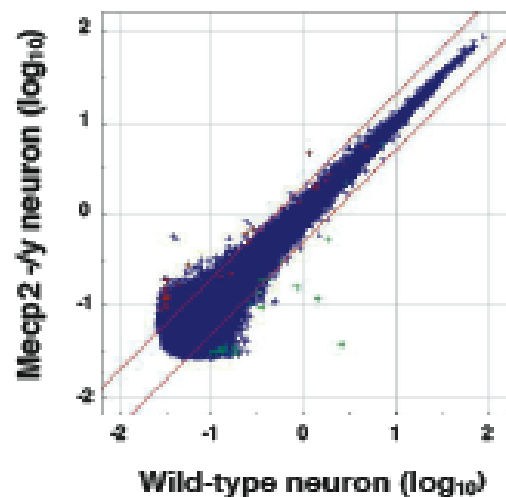


図 1: マイクロアレイによる MeCP2 標的遺伝子の探索

と（図 2）、を明らかにした。これらの結果より、*Mecp2* $-/y$ マウスが示す表現型におい

てNF- κ Bシグナルの亢進が深く関わっていることが強く示唆された。

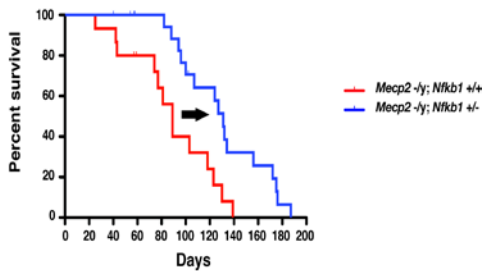


図2：NF- κ Bシグナルの減弱化による *MeCP2* $-/-$ マウスの寿命延長

そこでNF- κ Bシグナルのどの下流因子がこれらの表現型に関与しているのかを確かめるため、NF- κ Bシグナル関連遺伝子の発現解析を行った。8週齢の野生型と *MeCP2*-null マウス脳からRNAを抽出し、NF- κ Bシグナル関連遺伝子84個を網羅したSABiosciences社のPCRアレイを用いてNF- κ Bシグナル関連因子の発現変化を解析した(図3)。図3の赤いドットが示すように84個の関連遺伝子のうち、*I16*や *Tnf*を含む21個の遺伝子が *MeCP2*-null 脳において2倍以上の発現上昇を示した。これらの結果より、*MeCP2* $-/-$ マウス脳においてNF- κ Bシグナルの異常亢進が起きていることを再確認することができた。

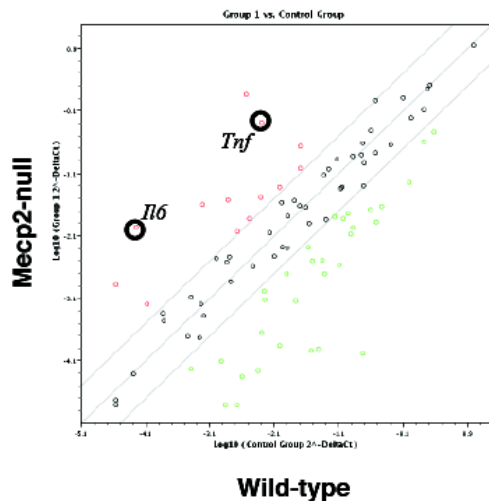


図3：PCRアレイによる発現解析

(2) 定量的PCRによる確認

PCRアレイによりNF- κ Bシグナル関連遺伝子の網羅的な発現解析を行い、いくつかの有力な下流因子の発現上昇を確認できた。そこで次に幾つかの候補遺伝子についてその発現上昇の確認を、個別に設計したPCR

プライマーを用いて定量的PCRにより確認を行った。

*Tnf*はNF- κ Bシグナルの直接の標的遺伝子で、NF- κ Bシグナルの活性化により発現が上昇することが知られている。そこで、マウス *Tnf*を特異的に検出するPCRプライマーを設計し、定量的PCRにて脳の各部位での発現を解析した。PCRアレイで確認していた *MeCP2* $-/-$ 大脳新皮質(cortex)での *Tnf*の発現上昇を確認したほか、線条体(striatum)、小脳(cerebellum)、脳幹(brain stem)でも *Tnf*の発現上昇が確認された。*MeCP2*の欠失により全脳的に *Tnf*の異常な発現上昇が生じていることを明らかにした。

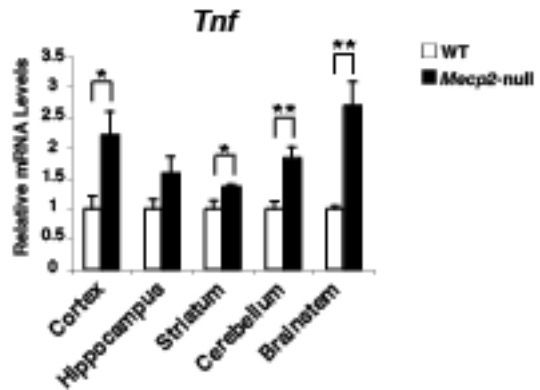


図4：*MeCP2* $-/-$ 脳における *Tnf*の発現上昇

以上の結果より、*MeCP2* $-/-$ マウス脳においては、*MeCP2*による *Irak1* 遺伝子の転写抑制の欠如により、NF- κ Bシグナルが亢進し、*Tnf*を含むNF- κ Bシグナルの下流標的遺伝子の発現量の異常が起きていることが明らかになった。近年、自閉症患者の死後脳を用いたマイクロアレイ解析でNF- κ Bシグナルを含む免疫系関連遺伝子の発現異常が報告されており、Rett症候群を含む自閉症スペクトラム障害における免疫系関連遺伝子の関与が示唆されている。特にRett症候群のモデルマウスにおいて、脳内の免疫を担当しているとされるマイクログリアが表現型の発症において大きな役割を果たしていることが明らかになり、今回の我々の結果との関連性が興味深い。

NF- κ Bシグナルは免疫系で長期にわたって盛んに研究されているシグナル伝達系で、様々な阻害剤が知られている。今回の我々の研究成果は、現在根本的な治療法がないレット症候群に対してNF- κ Bシグナルの阻害剤が新たな治療戦略として使える可能性を示している。

現在、以上の研究成果をまとめた論文を投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

- ① Noriyuki Kishi et al., Identification and analysis of target genes of the Rett syndrome causative gene, *Mecp2*, in the cerebral cortex. 第 90 回日本生理学会大会、2013 年 3 月 27 日、タワーホール船堀 (東京都)
- ② 岸憲幸, 他、レット症候群モデルマーマセットの作製と解析、第 2 回マーマセット研究会、2013 年 2 月 28 日、慶應義塾大学北館 (東京都)
- ③ Noriyuki Kishi, et al., Generation of TSC model marmoset ES cells with TALEN technology. *Neuroscience* 2012、2012 年 10 月 17 日、New Orleans (USA).
- ④ 岸憲幸, 他、人工ヌクレアーゼを用いた自閉症モデルマーマセットの作製、第 2 回ゲノム編集研究会、2012 年 9 月 20 日、岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- ⑤ 岸憲幸, 他、人工ヌクレアーゼ技術の疾患研究への応用、第 1 回ゲノム編集研究会、2012 年 2 月 29 日、広島大学理学部 (広島県)
- ⑥ Noriyuki Kishi, et al., Clarification of the operating principles of the neural circuits governing the human mind and the molecular mechanisms. *Frontiers in Primate Neuroscience Researches*、2012 年 2 月 23 日、東京医科歯科大学 (東京都)
- ⑦ Noriyuki Kishi, et al., Dysregulation of NF-kB signaling is involved in the pathogenesis of a mouse model for Rett syndrome. *Neuroscience* 2011、2011 年 11 月 12 日、Washington DC (USA)
- ⑧ Noriyuki Kishi, et al., Dysregulation of NF-kB signaling is involved in the pathogenesis of a mouse model for Rett syndrome. 32nd Naito Conference、2011 年 10 月 18 日、八ヶ岳ロイヤルホテル (山梨県)

[図書] (計 2 件)

- ① 岸憲幸、秀潤社、細胞工学、31、私の学会聞き歩き「日英の神経科学者の交流」、2012 年、494-496
- ② Noriyuki Kishi, et al., Springer-Verlag, Adult neurogenesis and neuronal subtype specification in the neocortex. In: *Neurogenesis in the Adult Brain II*、2011 年、173-188

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸 憲幸 (KISHI NORIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：30594882

(2) 研究協力者

岡野 栄之 (OKANO HIDEYUKI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：60160694

奥野 弥佐子 (OKUNO MISAKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員

Jeffrey D. Macklis
ハーバード大学・医学部・教授