

2019年度研究助成報告書

2020年 6月 1日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 中嶋 秀行



5. 研究課題 自己内在性リガンドを介したミクログリア活性化に起因する
レット症候群発症機構の解明と治療法の確立

1. 研究期間 2019年 4月 1日 ～ 2020年 3月 31日

2. 研究（経過・成果）の概要

メチル化 DNA 結合性転写抑制因子として発見された *MECP2* の遺伝子変異は、Rett 症候群（RTT）をはじめ、自閉症、統合失調症などを含めた様々な精神疾患・発達障害への関与が示唆されているものの、その発症機序の詳細は不明である。これまで、MeCP2 変異によるニューロンの機能異常が RTT 発症の原因と考えられてきたが、最近グリア細胞の機能異常が RTT 発症の一因である可能性が示唆され始めている。申請者は、ミクログリアで高発現し、細菌・ウイルス由来 DNA を認識することが知られる Toll 様受容体 9（TLR9）の遺伝子欠損マウスと MeCP2 遺伝子欠損マウスを交配して得た TLR9/MeCP2 二重欠損マウスでは、MeCP2 単独欠損マウスと比べ寿命が著しく延長されることを発見した（未発表）。また、MeCP2 欠損細胞では老化が早期に起こること（Ohashi et al. *Stem Cell Rep* 2018）、老化細胞は自己由来の DNA 断片を細胞外へ放出すること（Takahashi et al. *Nat Commun* 2017）などから、MeCP2 欠損細胞から分泌される自己 DNA 断片が TLR9 の内因性リガンドとなり慢性的な炎症を引き起こすことが、RTT 病態発症の原因になり得るという新規メカニズムを着想した。

そこで、本研究ではまず TLR9/MeCP2 二重欠損マウスでのミクログリアの活性化およびシナプス形成について解析を行った。その結果、TLR9/MeCP2 二重欠損マウス脳ではミクログリアの活性化が MeCP2 欠

損マウス脳と比較し減少していることが明らかとなった。また、ゴルジ染色を行いニューロンの突起の長さ及びシナプス形成を評価したところ、MeCP2 欠損マウス脳で減少がみられるニューロンの突起の長さ及びシナプスの数が TLR9/MeCP2 二重欠損マウス脳で改善していることが明らかとなった。

次に TLR9 シグナルはアダプター分子である MyD88 を介して伝達される。そこで、MyD88/MeCP2 ダブル欠損マウスにおいても MeCP2 欠損による表現型が改善されるかどうか検討した。その結果、MyD88/MeCP2 ダブル欠損マウスは MeCP2 欠損マウスと比較し寿命が増加することが明らかとなった。MyD88/MeCP2 ダブル欠損マウスについての他の表現型（ミクログリアの活性化やシナプス形成等）については現在解析中である。

これまでの先行研究により、テトラサイクリン系抗生物質であるミノサイクリンが濃度依存的にミクログリアの活性を抑制することが報告されている (Lee et al. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006)。そこで、MeCP2 欠損マウスにミノサイクリンを投与し、その後の寿命及び RTT 様の表現型を解析した。その結果、ミノサイクリンを投与することで RTT 様表現型が改善することが明らかとなった。また、MeCP2 欠損マウスの寿命については増加傾向が観察されている。

これらの研究と平行し現在は MeCP2 欠損マウス脳を回収し（生後 1 日目、3-4 週齢（症状が出始める時期）、7-8 週齢（症状悪化する時期））、シングルセルトランスクリプトーム解析を行っている。この解析を通して、症状の進行に伴って変化する脳内細胞の挙動を網羅的に解析することで、どのような分子メカニズムにより RTT 様の症状が発症するかについて詳細に明らかにしたいと考えている。

様式 1

助成金収支報告書

2020 年 6 月 1 日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 中嶋 秀行



1. 研究課題名 自己内在性リガンドを介したミクログリア活性化に起因する
レット症候群発症機構の解明と治療法の確立

2. 助成金交付額 980,800 円

3. 費目別使用実績

(単位 円)

項目	金額	備考
試薬 : Neurobasal-A medium x3	25,983	
試薬 : NEBNext Ultra Directional RNA Library Kit	134,469	
試薬 : B-27 supplement	222,000	
試薬 : 抗 MAP2 抗体	58,320	
試薬 : ミノサイクリン塩酸塩 x2	183,800	
試薬 : mTeSR1 x2	65,664	
DNA オリゴ合成	7,559	
消耗品 : シャーレ等	53,005	
マウス購入・維持費	230,000	
合計	980,800	