

輝け次代の担い手たち

レット症候群の病態における NF- κ B シグナル伝達系の関与

岸 憲幸

(国立研究開発法人理化学研究所脳科学総合研究センター、マーモセット神経構造研究チーム)

はじめに

レット症候群 (Rett syndrome) という疾患をご存じだろうか。実は何を隠そう、医学を学んだ筆者も恥ずかしながら留学先でこの疾患の研究に携わることになるまでこの疾患の名前も聞いたことがなかった。レット症候群は今から約 50 年前、Andreas Rett 博士によって報告された女兒の神経発達障害である^{1)~4)}。1999 年に原因遺伝子として *Methyl-CpG Binding Protein 2* (*MECP2*) 遺伝子が同定されて以降、基礎研究分野でめざましい進展をとげ、欧米ではその成果をもとに臨床治験も始まっている。本稿では近年の *MECP2* 研究を振り返りつつ、筆者が最近、*Nature Communications* 誌に発表したレット症候群の病態における NF- κ B シグナル伝達系の関与に関する研究について紹介したいと思う⁵⁾。

レット症候群と原因遺伝子 *MECP2*

レット症候群は主に女兒が発症する神経発達障害で、半年から 1 年半の無症状期のあと、重度の知的障害、筋緊張低下、自閉症様の異常行動、目的を持った手の運動機能の消失、特有の手の常同行動の出現、呼吸障害などの多様な症状を呈する^{1)~4)}。罹患率は女兒 1 万人から 1 万 5 千人あたり 1 人で、女兒の知的障害の原因としてはダウン症について 2 番目に多いとされている。1966 年にオーストリアの小児神経科医の Andreas Rett 博士により初めて報告されたが⁶⁾、ドイツ語の学会誌に発表したために、世界的に認知されるように

なったのは 1983 年にスウェーデンの医師 Bengt Hagberg 博士がこの疾患を再発見して以降である⁷⁾。この疾患は女兒に多いことから X 染色体上の遺伝子の変異ではないかと考えられていたが、家族性の発症がほとんど存在しなかったため原因遺伝子の同定までに多くの時間を要した。1999 年について米国ペーラー大学の Huda Zoghbi 博士らが、レット症候群の原因遺伝子として *MECP2* 遺伝子の同定に成功した⁸⁾。典型的なレット症候群患者の実に 95% において *MECP2* 遺伝子の変異が存在することが分かっている。

レット症候群の疾患としての解釈が最近変化してきているのでここで簡単に説明する。アメリカ精神医学会による精神障害の診断と統計マニュアル (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) の第 4 版では、自閉症と同じ広汎性発達障害のカテゴリーに分類され、レット症候群は自閉症の 1 つの疾患と捉えられていた。しかし 2013 年に改定された第 5 版では、広汎性発達障害の後継のカテゴリーである自閉症スペクトラム障害からレット症候群が除外された。改定の過程で様々な議論があったようであるが、レット症候群患者が示す社会性の低下が一時的であることが多く、第 5 版での自閉症スペクトラム障害の主要な診断基準の 1 つである「社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害」という基準に適合しない症例が多いということが大きな理由であったようである。ただ、「レット症候群 ≠ 自閉症」とされた訳ではなく、全てのレット症候群患者を自閉症スペクトラム障害と診断するのは無理があるということであり、レット症候群患者で

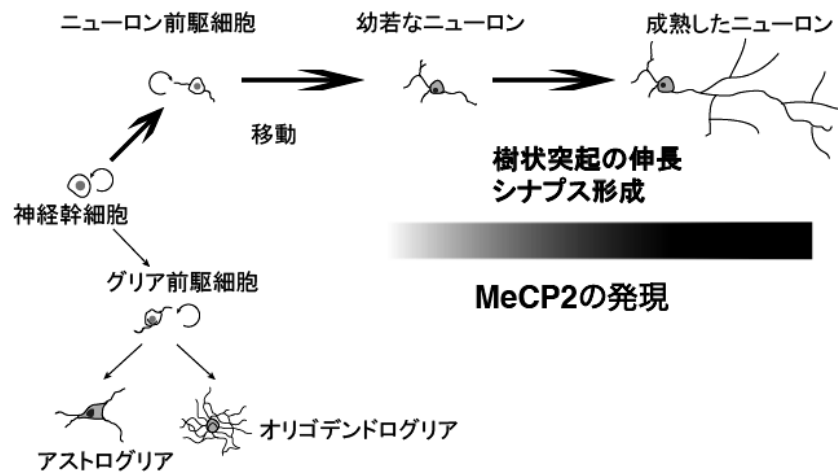


図1 ニューロンの成熟過程における MeCP2 の役割
 MeCP2 はニューロンの成熟と共に発現量が上昇し、ニューロンの成熟過程に関与していると考えられている。(Kishi and Macklis, Mol Cell Neurosci, 2004 より改変)

あっても、診断基準に示される症状があれば自閉症スペクトラム障害として診断されることはあり得る。

MECP2 遺伝子の中枢神経系での機能

前述のように1999年にレット症候群の原因遺伝子として *MECP2* 遺伝子が同定されたが、*MECP2* 遺伝子という遺伝子名からも容易に想像できるように、もともとはゲノム上のメチル化したCG配列に結合するタンパク質として1992年に英国エジンバラ大学の Adrian Bird 博士により同定された⁹⁾。ゲノムのメチル化が転写抑制に関与していることから Gene Silencer として *MECP2* 遺伝子の機能解析が進んだが¹⁰⁾、レット症候群との関連が明らかになって以降は中枢神経系での *MECP2* 遺伝子の機能が盛んに研究されるようになった。2001年には2つの研究グループから *Mecp2* ノックアウトマウスが報告されたが¹¹⁾¹²⁾、筆者がハーバード大学医学部の Jeffrey Macklis 研究室に留学したのはちょうどその時であった。

筆者は神経幹細胞研究を目指して Macklis 研究室に留学したのであるが、レット症候群患者の多くが小頭症の症状を示すこともあり、*MECP2* 遺

伝子が神経幹細胞の増殖・維持に関与しているのではないかと考え研究を開始した。しかしこの仮説は研究を開始してすぐに正しくないことに気づいた。中枢神経系での MeCP2 蛋白の発現を調べると、中枢神経系を構成するニューロン、アストログリア、オリゴデンドロサイトの3つの細胞種のうち、主にニューロンに発現が限局し、更にニューロンへの分化過程においても神経幹細胞やニューロン前駆細胞ではほとんど発現せず、成熟したニューロンで発現量が高かった¹³⁾(図1)。更に Neurosphere 法という神経幹細胞を培養する手法を用いて、MeCP2 が神経幹細胞の増殖能や3つの細胞種への分化能に関わっているか解析したが、野生型と *Mecp2* を欠いた神経幹細胞を比べても差異を検出することはできなかった。最初に立てた仮説が見事に外れるということになったが、幸い Macklis 研究室が脳新皮質発生の研究を行っていたこともあり、モデルマウスの大脳皮質の菲薄化に焦点をあてて研究を続けた。*Mecp2* 変異マウスの大脳皮質6層構造のうち特に第2/3層が顕著に縮小していることを見いだした。この原因が、細胞数の減少によるものなのか、それとも1つ1つの細胞のサイズの縮小によるものなのか解析したところ、錐体ニューロンの細胞体の大き

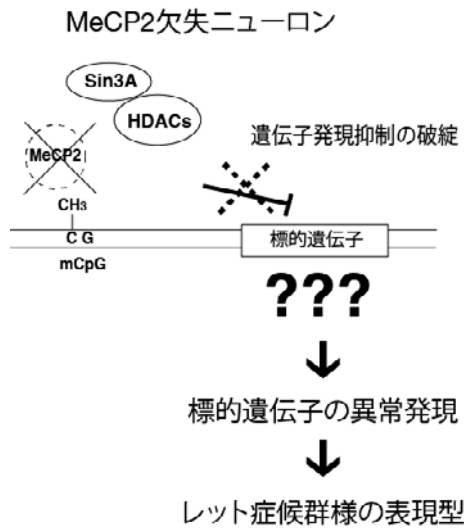


図2 MeCP2欠失ニューロンにおける標的遺伝子の異常発現
転写抑制因子である MeCP2 の欠失によりその標的遺伝子がニューロンにおいて異常発現し、その異常発現がレット症候群を引き起こしていると考えられている。

さや樹状突起の伸展の縮小を検出した。樹状突起は他のニューロンからの入力を受けるアンテナであり、その縮小による神経ネットワークの異常がレット症候群の原因の1つであることを示唆することができた¹³⁾¹⁴⁾。

あくまで神経幹細胞研究の一環として始めた研究であったが、神経幹細胞との関連を自ら否定したにも関わらず、レット症候群に対する科学的興味が自然と沸き、研究を継続することになった。MeCP2 蛋白は転写抑制因子であり、MeCP2 が制御する標的遺伝子の中に、その異常発現がレット症候群の症状に直結するものがあると考えられる(図2)。つまり、MeCP2 の欠失によって、抑制されるべき標的遺伝子が過剰発現してしまい、その結果ニューロンが正常に機能しなくなることがレット症候群の元凶と考えられる。よって、MeCP2 が発現を制御する標的遺伝子を探索し、その中でレット症候群の症状と関連するものを見つけてあげることができれば、新しい治療戦略に繋がると考えられた。

筆者が MeCP2 蛋白の標的遺伝子探索を始めようとしたちょうどその時に神経栄養因子 BDNF が MeCP2 の標的遺伝子であるという論文が発表された¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし筆者自身は BDNF が本当にレット症候群の病態に関連する標的遺伝子なのか疑問に思っていた。BDNF といえばニューロンの神経突起の成長を促す因子であり、MeCP2 欠失によって BDNF が過剰発現するならニューロンの樹状突起は伸張するはずであり、筆者が報告した *Mecp2* ^{-/-} マウスでの錐体ニューロンの樹状突起の伸展縮小と矛盾する。この矛盾については、その後の研究により、レット症候群モデルマウス脳組織においては BDNF の発現量は低下しているという結論になっている¹⁷⁾。

BDNF 以外にもレット症候群の病態に関わる標的遺伝子があるはずという信念のもと、筆者らは MeCP2 の標的遺伝子の探索を行った。同じような試みは既に幾つか行われていたが、転写抑制因子の欠損にも関わらず、予想に反して大きな発現量変化を示す遺伝子がないことに気づいた^{18)~20)}。先行研究が脳組織そのものを使って研究していたことに注目し、様々な細胞種が混ざった脳組織から mRNA を回収しても、MeCP2 欠失による標的遺伝子の発現変化が細胞種毎に異なっていると、結果的に遺伝子変化量が相殺されてしまって、本当の変化を捉えられていないのではないかと考えた。

そこで、ニューロンサブタイプ毎に遺伝子解析を行うために Macklis 研究室が開発した逆行性トレーサーによりラベルした細胞を FACS ソーティングで単離する手法を用いて²¹⁾²²⁾、大脳皮質第2/3層の錐体ニューロンを単離し、mRNA を回収した⁵⁾。前述したように大脳皮質第2/3層の錐体ニューロンは *Mecp2* ^{-/-} マウスの大脳皮質において最も影響を受けた層であり、第2/3層の錐体ニューロンの大部分は対側の大脳皮質に投射する Callosal Projection Neuron である。

単離した約2万個の Callosal Projection Neuron より抽出した mRNA を使って、約39000個のプローブを持つマイクロアレイチップで遺伝子発現解析を行った。その結果、*Mecp2* ^{-/-} の Callosal

Projection Neuron において 18 個のプロープの発現が対照群に比べて有意に上昇していることを検出した⁵⁾。

今になって考えてみるとこの時点の判断がその後の研究成果において一番重要な分岐点であった。野生型との違いが大きいものを選ぶべきか、それとも候補遺伝子の機能を考慮してレット症候群との関連を重視すべきか、大いに迷った。最終的に、NF- κ B シグナル伝達系の構成因子である *Interleukin-1 receptor associated kinase 1 (Irak1)* 遺伝子を選んだのであるが、理由として、独立したマイクロアレイのプロープが 3 個とも 3 倍程度の上昇を示しており再現性が高かったことと、それまで知られていた MeCP2 の標的遺伝子と異なり神経系では機能が知られていなかったことがある。MeCP2 の機能が転写抑制とするならば、過剰発現によってレット症候群の病態を引き起こすような重要な標的遺伝子は、正常なニューロンでは発現を抑制されているはずである。つまり、本来神経系では発現すべきでない、神経系以外で機能をもつ遺伝子が、MeCP2 の欠損により異常発現することによってレット症候群が引き起こされると考える方が自然ではなかろうかと漠然と考えていた。ただ当時は、前述のように BDNF のような神経系で機能が知られている遺伝子が MeCP2 の標的遺伝子として報告されていたため、筆者がこの選択が正しかったと確信を持てるようになるのは実験的裏付けが得られるようになってからであった。

まず、*Irak1* 遺伝子が本当に MeCP2 によって直接発現を抑制されているのか確認した。実は *Irak1* 遺伝子と *Mecp2* 遺伝子は同じ X 染色体上にあるどころか、遺伝子座が隣り合っていた。そのため、*Mecp2* $-/y$ マウスにおける *Irak1* の発現上昇は、*Mecp2* 遺伝子をノックアウトするためにゲノム操作を行った副産物である可能性があった。その可能性を否定するために、野生型の錐体ニューロンにおいて *Mecp2* を mRNA レベルでノックダウンし、*Mecp2* 遺伝子座のゲノムを改変することなしに、*Irak1* が発現上昇することを示した⁵⁾。更に、*Irak1* 遺伝子のプロモーター領域の CpG 配列のメチル化を確認し、ChIP 法により MeCP2 がプロ

モーター領域に結合することも確認した⁵⁾。ここまでの結果で、MeCP2 が *Irak1* 遺伝子の発現を制御していることは確認できたのだが、*Irak1* の過剰発現がレット症候群様の症状を引き起こすことを示す必要があった。そこで、筆者の先行研究で見いだした *Mecp2* 変異マウスでのニューロンの樹状突起の伸展抑制の表現型を指標として使った。対象にしていたマウス大脳皮質第 2/3 層の錐体ニューロンは胎生 15 日目くらいに側脳室周囲部位で神経幹細胞より分裂して皮質へと移動していく。そこで、胎生 15 日目に子宮壁越しに側脳室に発現ベクターを注入し、電気穿孔法によって側脳室周囲部位に位置する神経幹細胞に導入し、生後 14 日目に発現ベクターが導入された大脳皮質第 2/3 層の錐体ニューロンの樹状突起を解析した。対照群と比べて *Irak1* 遺伝子を過剰発現した錐体ニューロンは顕著に樹状突起の広がりが低下しており、少なくとも *Irak1* の強制発現により *Mecp2* $-/y$ マウスで見られる表現型を再現できることを確認できた⁵⁾。

しかし *Irak1* の過剰発現が *Mecp2* $-/y$ マウスで見られる表現型と似ているだけでは、*Irak1* 過剰発現の効果がたまたま *Mecp2* $-/y$ マウスの表現型に類似していただきの可能性もある。そこで、*Irak1* の過剰発現が神経突起の表現型を引き起こしていることを証明すべく、*Mecp2* $-/y$ マウスで *Irak1* の発現を低下させ、表現型が回復するか試みようとした。しかし前述のように *Mecp2* 遺伝子と *Irak1* 遺伝子は同じ X 染色体上にあるため、*Mecp2* 変異マウスと *Irak1* 変異マウスを掛け合わせても *Irak1* に変異を持つ *Mecp2* ヘミ接合体マウスを得ることができない。そこで、*Irak1* が NF- κ B シグナル伝達系の構成因子であることに注目し、NF- κ B シグナル伝達系において *Irak1* の下流に位置する *Nfkb1* 遺伝子の変異マウスを代わりに使うことにした。*Mecp2* $-/y$; *Nfkb1* $+/-$ マウスを解析したところ、大脳皮質第 2/3 層の錐体ニューロンの樹状突起の表現型が、部分的に回復していた⁵⁾。つまり MeCP2 欠損により亢進している NF- κ B シグナル伝達系がレット症候群モデルマウスのニューロン形態の表現型を引き起こしていることを証明

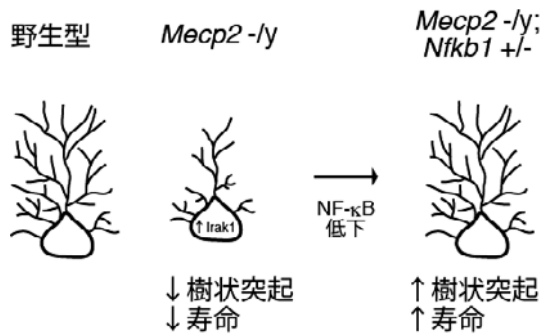


図3 Mecp2 欠失ニューロンにおける NF-κB シグナル伝達系の関与
Mecp2 欠失ニューロンにおいて、NF-κB シグナル伝達系の亢進がレット症候群様の表現型に関与している。異常亢進した NF-κB シグナル伝達系を低下させると表現型が部分的に回復する。

することができた。

更に NF-κB シグナル伝達系の亢進が他の表現型についても関与しているか解析を行った。Mecp2 ヘミ接合体マウスは通常約 90 日で約半数の個体が死亡する。NF-κB シグナル伝達系の亢進がこの致死性にも関与しているのであれば、Nfkb1 遺伝子の変異によってこの致死性を部分的に回復できるはずである。そこで、Mecp2 -/-; Nfkb1 +/- のマウスの寿命を解析したところ寿命が約 140 日まで延びていることを確認した⁵⁾。つまり筆者らが見いだした Mecp2 変異マウス脳での NF-κB シグナル伝達系の亢進は、Mecp2 変異マウスの様々な病態に深く関与していることを示唆しており、レット症候群に対する新たな治療戦略の標的になり得ることを示すことができた (図 3)。

NF-κB シグナル伝達系は、主に免疫系分野で盛んに研究が行われてきた²³⁾。それに比べると神経系での NF-κB シグナル伝達系の役割はまだまだ分からないことが多いが、近年、自閉症患者の剖検脳を使った遺伝子発現解析により、自閉症脳において、NF-κB シグナル伝達系の構成因子を含む多くの免疫関連遺伝子の発現上昇が報告された^{24)~26)}。レット症候群を含む神経発達障害の病態において、免疫系遺伝子の発現異常が病因の根底にあるのであれば、それらを標的とした新たな治療法の開発が期待される。

おわりに

筆者が留学先でレット症候群研究を始めた頃に比べると、レット症候群ならびに MeCP2 に関する知見は飛躍的に増え、その研究成果がレット症候群の臨床治験にまでたどり着いた。地道な基礎研究の成果が疾患に苦しむ患者のために活用されることは嬉しい限りであるが、その一方で、モデルマウスで得られた結果がどの程度までヒトにも適用できるのか試練を迎えている。欧米で既に開始されている IGF1 を使った臨床治験の中間報告を見る限り、期待されていたほど治療効果が出ていないという印象である²⁷⁾。筆者は帰国後、理化学研究所・脳科学総合研究センターの岡野栄之チームリーダーのもと、小型霊長類マーモセットを用いて、新たなレット症候群モデル作製に取り組んでいる²⁸⁾²⁹⁾。よりヒトに近い霊長類モデルを使って前臨床研究を行うことができれば、より見込みが高い治療法に絞って臨床治験を行うことが可能になり、結果として効率的な治療法開発に結びつくのではないかと期待している。

謝辞

米国留学中にレット症候群の研究について、ご指導頂きましたハーバード大学の Jeffrey D. Macklis 教授及びラボの皆様へ感謝申し上げます。また帰国後もレット症候群の研究を継続する機会を与えて下さいました岡野栄之教授にも心より感謝申し上げます。本稿で紹介した研究内容は、日本学術振興会、International Rett Syndrome Foundation、日本医療研究開発機構「革新的技術による脳機能ネットワークの全容解明プロジェクト」からの研究費により行われました。最後に「輝け次代の担い手たち」の執筆の機会を与えて頂いた出版・広報委員会・委員長の澤本和延先生、日本神経化学会編集部の皆様へこの場を借りて御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kishi N, Macklis JD. Dissecting MECP2 function in the CNS. *J Child Neurol*, 20, 753-759 (2005).
- 2) Chahrouh M, Zoghbi HY. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, 56, 422-437 (2007).
- 3) Hagberg B. Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8, 61-65 (2002).
- 4) Kriaucionis S, Bird A. DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 12 (Suppl. 2), R221-R227 (2003).
- 5) Kishi N, MacDonald JL, Ye J, Molyneaux BJ, Azim E, Macklis JD. Reduction of aberrant NF- κ B signaling ameliorates Rett syndrome phenotype in *Mecp2*-null mice. *Nat Commun*, 7, 10520 (2016).
- 6) Rett A. Über ein zerebral-atrophisches syndrome bei Hyperammonemie. *Wien Med. Wochenschr*, 116, 723-726 (1966).
- 7) Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O. A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol*, 14, 471-479 (1983).
- 8) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 23, 185-188 (1999).
- 9) Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, 12, 69, 905-914 (1992).
- 10) Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, 88, 471-481 (1997).
- 11) Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, 27, 322-326 (2001).
- 12) Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet*, 27, 327-331 (2001).
- 13) Kishi N, Macklis JD. MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol Cell Neurosci*, 27, 306-321 (2004).
- 14) Kishi N, Macklis JD. MeCP2 functions largely cell-autonomously, but also non-cell-autonomously, in neuronal maturation and dendritic arborization of cortical pyramidal neurons. *Exp Neurol*, 222, 51-58 (2010).
- 15) Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME. Depression of BDNF Transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MECP2. *Science*, 302, 885-889 (2003).
- 16) Martinowich K, Hattori D, Wu H, Fouse S, He F, Hu Y, Fan G, Sun YE. DNAmethylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, 302, 890-893 (2003).
- 17) Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R. The disease progression of *Mecp2* mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron*, 49, 341-348 (2006).
- 18) Tudor M, Akbarian S, Chen RZ, Jaenisch R. Transcriptional profiling of a mouse model for Rett syndrome reveals subtle transcriptional changes in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 15536-15541 (2002).
- 19) Nuber UA, Kriaucionis S, Roloff TC, Guy J, Selfridge J, Steinhoff C, Schulz R, Lipkowitz B, Ropers HH, Holmes MC, Bird A. Up-regulation of glucocorticoid-regulated genes in a mouse model of Rett syndrome. *Hum Mol Genet*, 14, 2247-2256 (2005).

- 20) Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T. Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet*, 37, 31-40 (2005).
- 21) Arlotta P, Molyneaux BJ, Chen J, Inoue J, Komiyama R, Macklis JD. Neuronal subtype-specific genes that control corticospinal motor neuron development in vivo. *Neuron*, 45, 207-221 (2005).
- 22) Molyneaux BJ, Arlotta P, Hirata T, Hibi M, Macklis JD. Fezl is required for the birth and specification of corticospinal motor neurons. *Neuron*, 47, 817-831 (2005).
- 23) Hayden MS, Ghosh S. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell*, 132, 344-362 (2008).
- 24) Garbett K, Ebert PJ, Mitchell A, Lintas C, Manzi B, Mirnics K, Persico AM. Immune transcriptome alterations in the temporal cortex of subjects with autism. *Neurobiol Dis*, 30, 303-311 (2008).
- 25) Network and Pathway Analysis Subgroup of Psychiatric Genomics Consortium. Psychiatric genome-wide association study analyses implicate neuronal, immune and histone pathways. *Nat Neurosci*, 18, 199-209 (2015).
- 26) Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnics K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*, 27, 10695-10702 (2007).
- 27) Khwaja OS, Ho E, Barnes KV, O'Leary HM, Pereira LM, Finkelstein Y, Nelson CA, Vogel-Farley V, DeGregorio G, Holm IA, Khatwa U, Kapoor K, Alexander ME, Finnegan DM, Cantwell NG, Walco AC, Rappaport L, Gregas M, Fichorova RN, Shannon MW, Sur M, Kaufmann WE. Safety, pharmacokinetics, and preliminary assessment of efficacy of mecasermin (recombinant human IGF-1) for the treatment of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4596-4601 (2014).
- 28) Kishi N, Sato K, Sasaki E, Okano H. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology. *Develop Growth Differ*, 56, 53-62 (2014).
- 29) Okano H, Sasaki E, Yamamori T, Iriki A, Shimogori T, Yamaguchi Y, Kasai K, Miyawaki A. Brain/MINDS: A Japanese National Brain Project for Marmoset Neuroscience. *Neuron*, 92, 582-590 (2016).