

32. 老化脳と神経疾患に共通した脳機能低下機序の統合的理解と病態改善戦略の創出

九州大学大学院医学研究院 教授 中島 欽一

概要

老齢脳に加え、多くの精神・神経疾患（NPD）脳でも実は、レトロトランスポゾン LINE1（L1）の発現増加と炎症亢進が見られる。また最近、L1 mRNA から逆転写され産生される cDNA が DNA センサーを活性化し、炎症を亢進させる可能性が示唆された。そのため、これらの脳が共通して示す細胞老化や炎症亢進に、L1 cDNA が重要な役割を果たすと考えた。そこで本研究では、L1 の発現と脳内炎症の亢進が共に見られるレット症候群（RTT）モデルマウスを用い、DNA センサー遺伝子欠損や cDNA 合成阻害などにより脳内炎症が改善されるかどうかを調べた。その結果、DNA センサー Toll 様受容体 9（TLR9）が欠損した、あるいは逆転写酵素阻害剤（RTi）を投与した RTT モデルマウスでは、脳内炎症が抑制されることがわかった。またこれに伴い、自閉症様症状の軽減や寿命の延長も観察された。さら、母体免疫活性化モデルマウスにおいても、TLR9 の欠損や RTi の投与により、脳内炎症抑制や自閉症様症状の軽減が見られた。以上のことから、NPD の 1 つ、自閉症様症状には「L1 cDNA→TLR9→炎症→ニューロン機能低下」という一連のプロセスが関与し、このプロセスが同様に作動していると考えられる老化脳や他の NPD においても脳機能改善の標的となり得る可能性が示唆された。

本研究実施にあたり、研究助成金を賜りました三菱財団に厚く御礼申し上げます。

背景および目的

加齢に伴い脳の老化、すなわち脳機能の低下が進行する。この原因として神経細胞（ニューロン）の機能やニューロン新生能力の低下が考えられるが、老化による脳機能低下のメカニズムは不明である。一方で、発達障害を含む多くの精神・神経疾患（NPD）脳でも実は、細胞老化が観察される。さらに、これら老齢脳と NPD 脳では共通して、脳内免疫担当細胞ミクログリア（MG）の活性化（炎症亢進）とレトロトランスポゾン LINE1（L1）の発現亢進が見られる。MG の活性化に関して我々は以前に、変性ニューロンから放出される自己 DNA が DNA センサー Toll 様受容体 9（TLR9）を介して MG 活性化を誘導できることを報告していた¹⁾。この MG 活性化は、炎症性サイトカインの放出を含む細胞老化随伴分泌現象（SASP）を引き起こす。DNA 結合性転写抑制因子 MeCP2 は、自閉スペクトラム症（ASD）様症状も示す広汎性発達障害レット症候群（RTT）の原因因子であるが、我々はその機能が障害されるとレトロトランスポゾン LINE1（L1）の発現が亢進することを見出していた²⁾。L1 遺伝子はその転移のために逆転写酵素をコードしており、自身の mRNA から cDNA を合成できる。さらにこの RTT 患者やモデルマウス脳内では、MG の活性化が亢進していることや³⁾、MECP2 欠損（KO）ニューロンでは老化が促進していることも報告されている⁴⁾。

以上から我々は、老齢脳と NPD 脳では共通して神経機能が低下するメカニズムとして、「神経系細胞における L1 cDNA の産生亢進→TLR9 を介した MG 活性化→SASP 因子等の放出→神経系細胞の機能障害」というプロセス（悪性ポジティブフィードバックループ）が存在するという仮説を立てた。

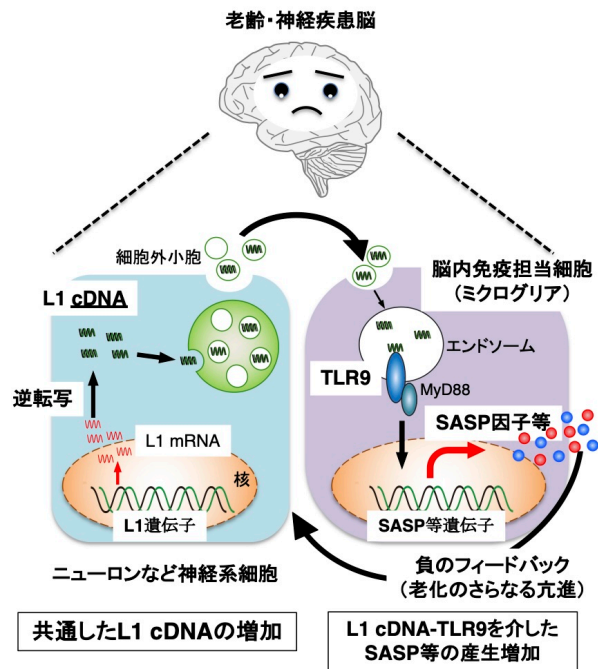


図 1. 本研究において実証すべき仮説.

「神経系細胞における L1 cDNA の産生亢進→TLR9 を介したミクログリア活性化→SASP 因子等の放出→神経系細胞の機能障害」というプロセス (悪性ポジティブフィードバックループ) が存在するという仮説を立てた。

そこで、細胞老化、L1 発現亢進、MG 活性化、ニューロン機能低下のすべてが見られる MeCP2 KO マウスをモデルとして、TLR9 シグナル阻害や cDNA 合成阻害により病態が改善できるかどうかを検討した。

これまでの成果

1. TLR9 シグナル減弱による MG 活性化抑制とスパイン密度減少の改善

これまでの研究から、脳に存在するニューロン、アストロサイト、神経幹細胞 (NSC) と MG で比較した場合、TLR9 は MG で最も高発現することわかっている。そこで MeCP2 ヘテロ KO マウスと TLR9 KO マウスの交配により MeCP2 KO::TLR het 及び MeCP2 KO::TLR9 KO マウスを作製し (図 2A)、MG の活性化とニューロンのシナプス密度への影響を解析した (図 2B, 2C)。

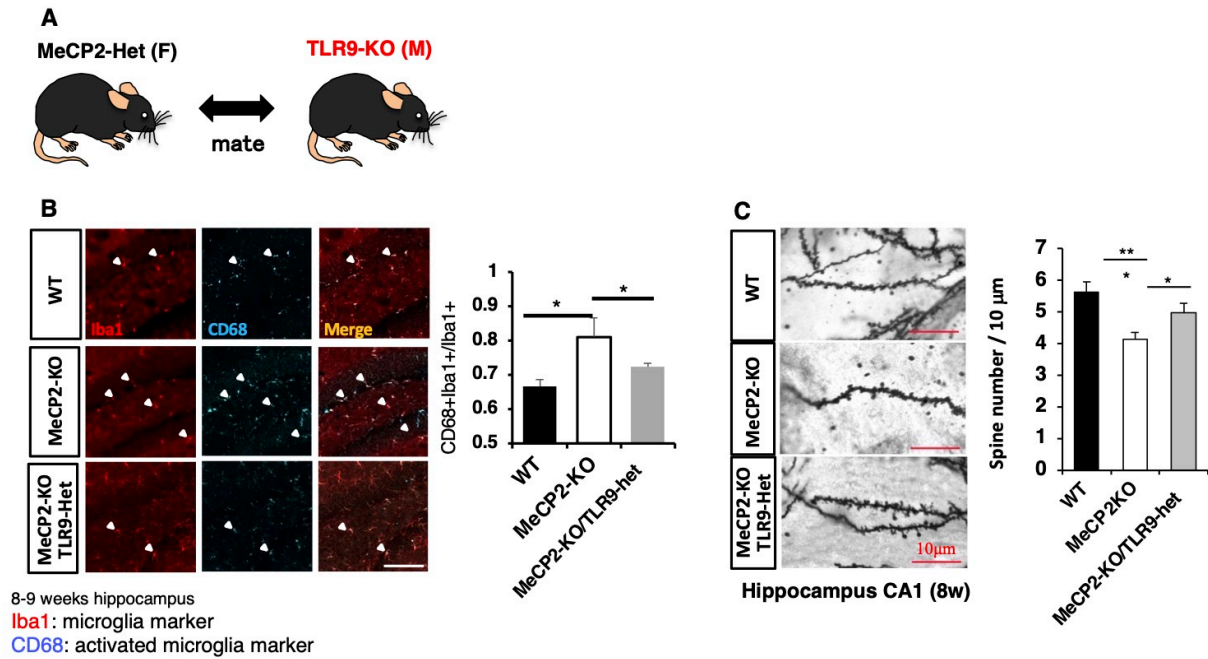


図 2. TLR9 シグナル減弱による RTT 組織学的病態の改善.

A) MeCP2 het (F) と TLR9 KO (M) を交配し、MeCP2 KO::TLR het 及び MeCP2 KO::TLR9 KO マウスを作製した。B) WT, MeCP2 KO 及び MeCP2 KO::TLR het マウスの海馬切片を MG マーカー Iba1 (赤) と貪食性 MG マーカー CD68 (青) で染色し (左)、Iba1 陽性細胞中の CD68 陽性細胞の割合を算出した (右)。C) WT, MeCP2 KO 及び MeCP2 KO::TLR het マウスの海馬 CA1 領域のゴルジ染色像 (左)。この画像に基づき、各マウスのシナプス密度を測定した (右)。

その結果、MeCP2 KO マウス海馬で増加が見られていた Iba1/CD68 共陽性の貪食性 MG の割合が、TLR9 het の背景では減少することがわかった。(図 2B) さらに MeCP2 KO 海馬 CA1 領域で減少が見られていたニューロンのシナプス密度が同じく TLR9 het の背景では改善されることがわかった。これらのことは、DNA を感知する TLR9 のシグナルが減少することにより、RTT 病態が改善されることを示している。

2. TLR9 シグナル減弱による RTT スコアの改善と寿命の延長

前述のように TLR9 シグナルの減弱によって MeCP2 KO マウスにおける MG 活性化の抑制とスパイン密度減少の改善が見られたので、次に、RTT スコアと寿命に及ぼす影響を解析した。

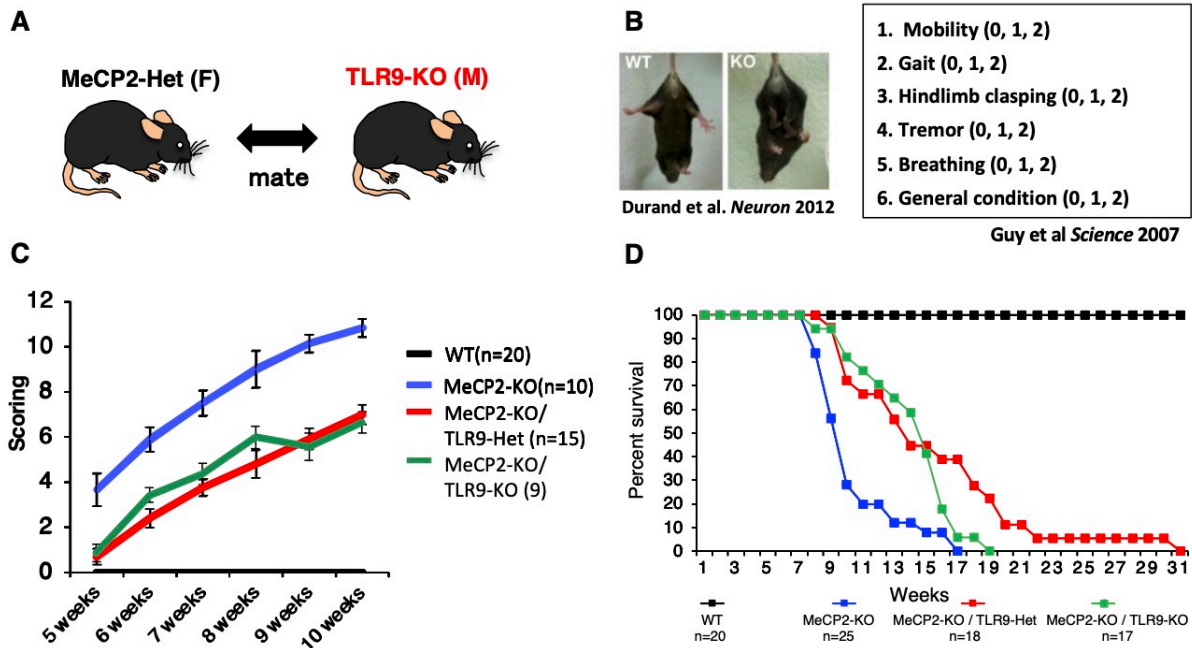


図 3. TLR9 シグナル減弱による臨床的症状の改善.

A) MeCP2 het (F) と TLR9 KO (M) を交配し、MeCP2 KO::TLR het 及び MeCP2 KO::TLR9 KO マウスを作製した。B) マウスの動きや歩行、後肢の抱え込み行動 (左)、震えなどをその重要度に応じて 0, 1, 2 と評価し、その合計を RTT スコアとして算出する。値が高いほど重症であることを示す。C) WT, MeCP2 KO, MeCP2 KO::TLR het 及び MeCP2 KO::TLR KO マウスの RTT スコア。D) WT, MeCP2 KO, MeCP2 KO::TLR het 及び MeCP2 KO::TLR KO マウスの生存率。

RTT スコアはマウスの動きや歩行、後肢の抱え込み行動、震えなどから算出するが、値が高いほど重症であることを示す (図 3B) ^{5,6)}。この RTT スコアの上昇が MeCP2 単独 KO に比べて、TLR9 het や KO の背景では減弱 (遅延) することがわかった (図 3C)。また、これらの遺伝的背景では寿命の延長が見られることがわかった (図 3D)。以上のことは、TLR9 シグナルの減弱により、組織学的病態だけでなく、臨床的症状も改善されることがわかった。

3. 逆転写酵素阻害剤投与による MG 活性化抑制とニューロン形態異常の改善

次に、L1 cDNA の産生減少を目的として逆転写酵素阻害剤 (RTi) を MECP2 KO マウスに投与し、RTT の組織学的病態が改善されるかどうかを調べた。

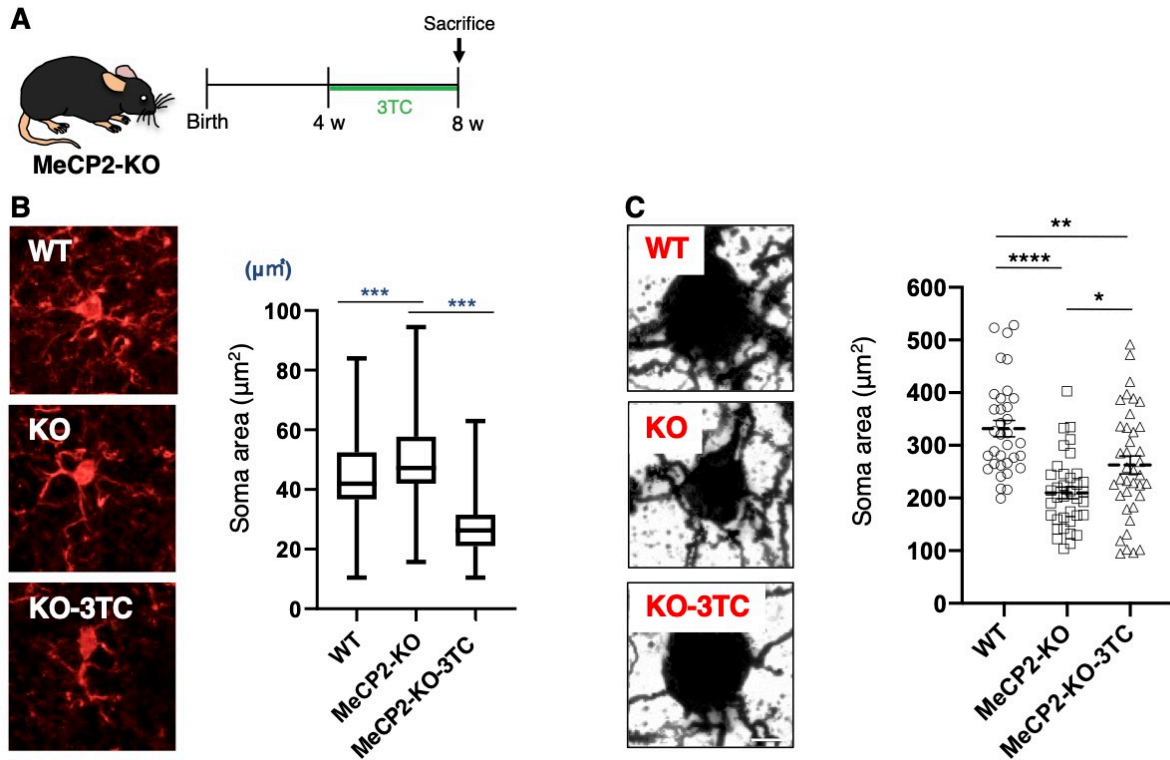


図 4. 逆転写酵素阻害剤投与による RTT 組織学的病態の改善.

A) MeCP2 KO マウスに生後 4 週目から 3TC を飲水投与し 8 週目で観察した。**B)** WT, MeCP2 KO 及び 3TC を投与した MeCP2 KO マウスの海馬切片を MG マーカー Iba1 (赤) で染色し (左)、細胞体サイズを測定した (右)。**C)** WT, MeCP2 KO 及び 3TC を投与した MeCP2 KO マウスの前頭前野領域におけるゴルジ染色像 (左)。この画像に基づき、各マウスのニューロンの細胞体サイズを測定した (右)。

MeCP2 KO マウスに生後 4 週目から RTi (3TC) を飲水投与し、8 週目に海馬のミクログリアの形態を観察したところ、MeCP2 KO と比較して、3TC 投与 MeCP2 KO 海馬ではミクログリアがより非活性化状態の形態を示すことがわかった (図 4B)。さらに、MeCP2 KO のニューロンは通常野生型と比較して細胞体サイズが減少しているが、この減少が 3TC 投与によって改善することがわかった。以上のことは、RTi 投与も TLR9 シグナルを減少させたときと同様に組織学的病態を改善できることを示している。

4. 逆転写酵素阻害剤投与による RTT スコアの改善と寿命の延長

続いて、RTi 投与の RTT スコアおよび寿命における効果を検討した。今回は 3TC とは異なる RTi である d4T の投与による効果も調べた。

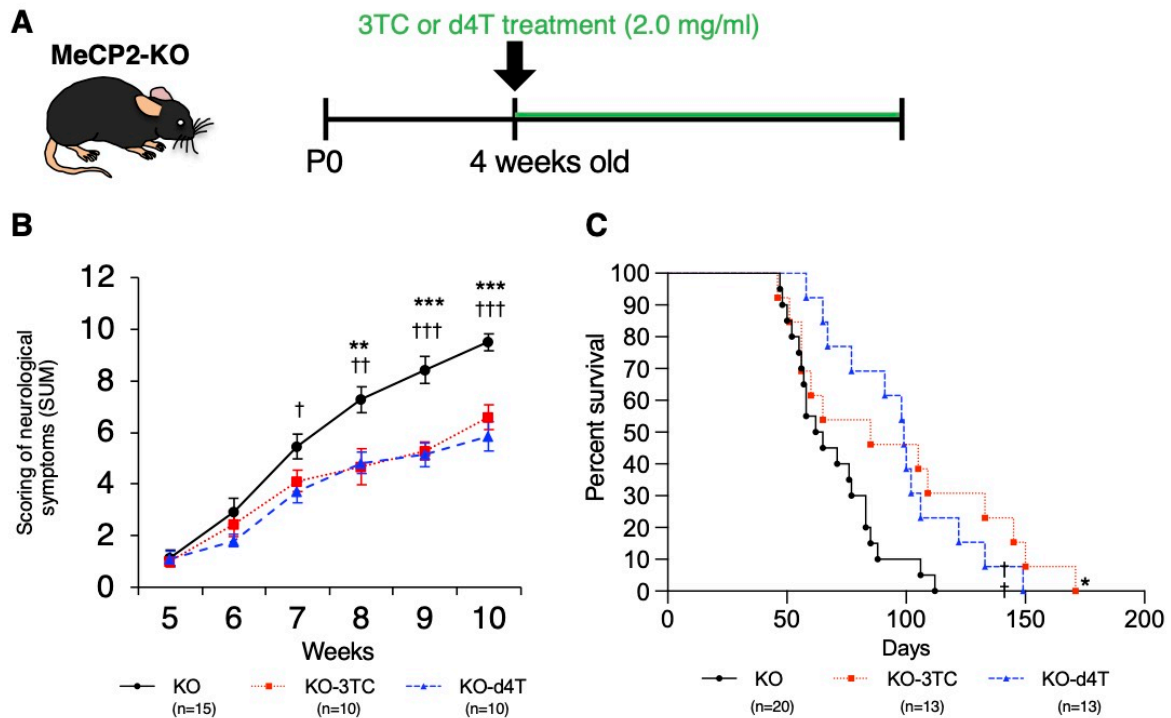


図 5. 逆転写酵素阻害剤投与による臨床的症候の改善.

A) MeCP2 KO マウスに生後 4 週目から 3TC あるいは d4T を飲水投与し RTT スコアと生存率の経時観察を行った。B) MeCP2 KO, MeCP2 KO-3TC 及び MeCP2 KO-d4T マウスの RTT スコア。C) MeCP2 KO, MeCP2 KO-3TC 及び MeCP2 KO-d4T マウスの生存率。

その結果、両逆転写酵素阻害剤とも、MeCP2 KO マウスの RTT スコア改善および寿命延伸効果も持つことがわかった。これらのことは、RTi 投与により、組織学的病態だけでなく、臨床的症候も改善できることを示している。

5. 逆転写酵素阻害剤投与による社会性行動異常の改善

RTT 患者や MeCP2 KO マウスは ASD 様行動異常（社会性異常）を示すことが知られている⁸⁾。そこで、ここでは RTi 投与がこの異常を改善できるかどうかを 3 チャンバーテストによって調べた（図 6）。

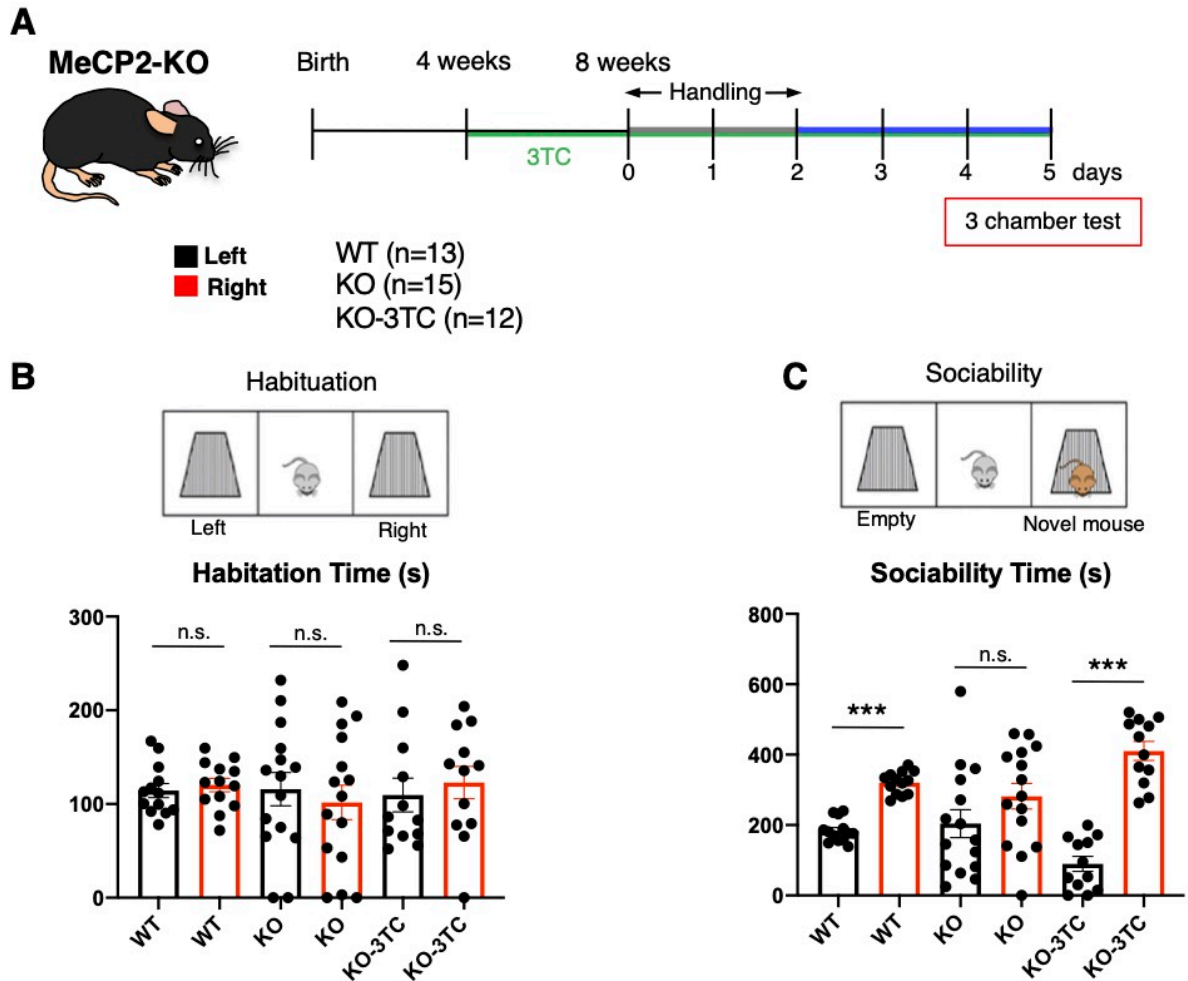


図 6. 逆転写酵素阻害剤投与による社会性行動異常の改善.

- A) MeCP2 KO マウスに生後 4 週目から 3TC あるいは d4T を飲水投与し、3 チャンバーテストを行った。
- B) WT, MeCP2 KO 及び MeCP2 KO-3TC マウスにおいて、左右の両ケージが空の場合には探索行動時間に差は見られなかった。
- C) 右のケージに新規マウスを入れた場合、WT マウスはマウスの入ったケージを探索する時間が長くなるのに対し、MeCP2 KO マウスではその時間に有意な差が見られなくなった (社会性の低下)。しかし、3TC の投与によってこの低下した社会性が改善された。

その結果、MeCP2 KO マウスで見られた社会性異常行動が 3TC の投与により改善されることがわかった (図 6C)。

6. 逆転写酵素投与による母体免疫活性化により誘導された MG 活性化の抑制

前述の結果から、MeCP2 の欠損による種々の病態は、cDNA 産生亢進→TLR9 活性化→MG 活性化を介したものであることがわかった。そこでこのプロセスが他の ASD モデルマウスにも共通したものであるかどうかを調べるために、母体免疫活性化 (MIA) によって作製した ASD モデルマウスを利用した (図 7A)。

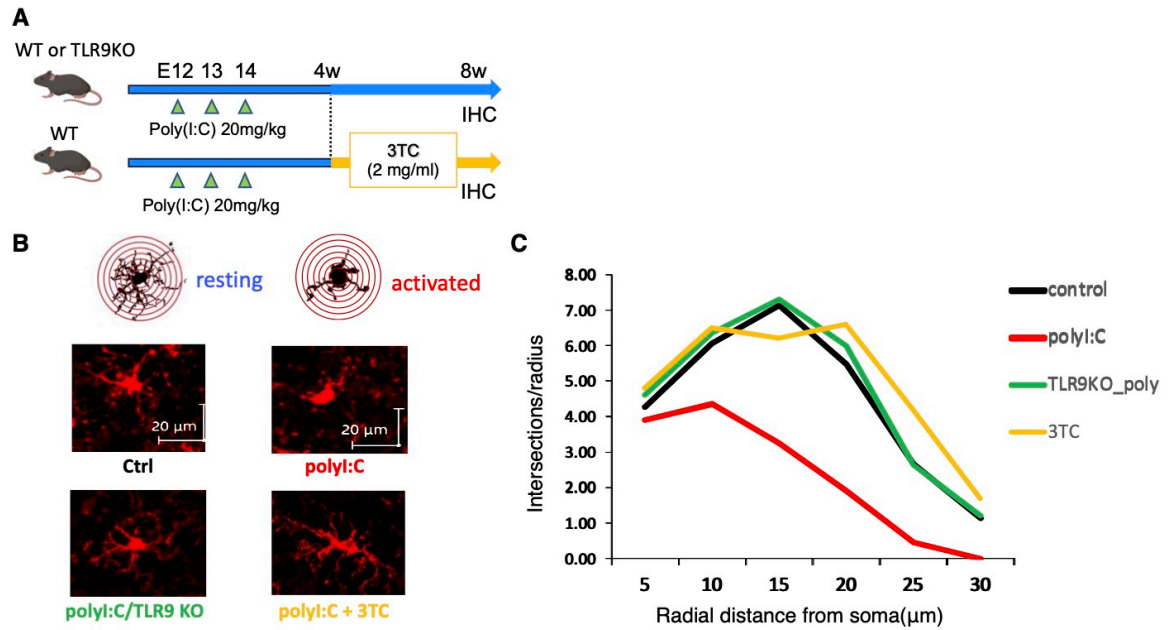


図 7. 母体免疫活性化誘導性 MG 活性化に対する TLR9 欠損及び逆転写酵素阻害剤の効果.

A) WT あるいは TLR9 KO 妊娠マウスに polyI:C を投与 (E12, 13, 14 の 3 回)、MIA を誘導後、WT マウスの一部には 3TC を飲水投与した。B), C) これらのマウス脳内 MG の Iba1 (赤) 染色像と Sholl analysis の結果。

母体ウイルス感染を模して、野生型 (WT) 及び TLR KO マウスに polyI:C を、妊娠 (E) 12、13、14 日に 1 回/日で 3 回投与し、生後 8 週目で MG の形態からその活性化を評価したところ、TLR9 KO や 3TC 投与群では MG の活性化が抑制されることがわかった (図 7B, 7C)。

7. 逆転写酵素投与による母体免疫活性化により誘導された ASD 様症状の改善

同様に polyI:C 投与された MIA マウスに対して、3 チャンバーテストにより社会性を調べた (図 8)。

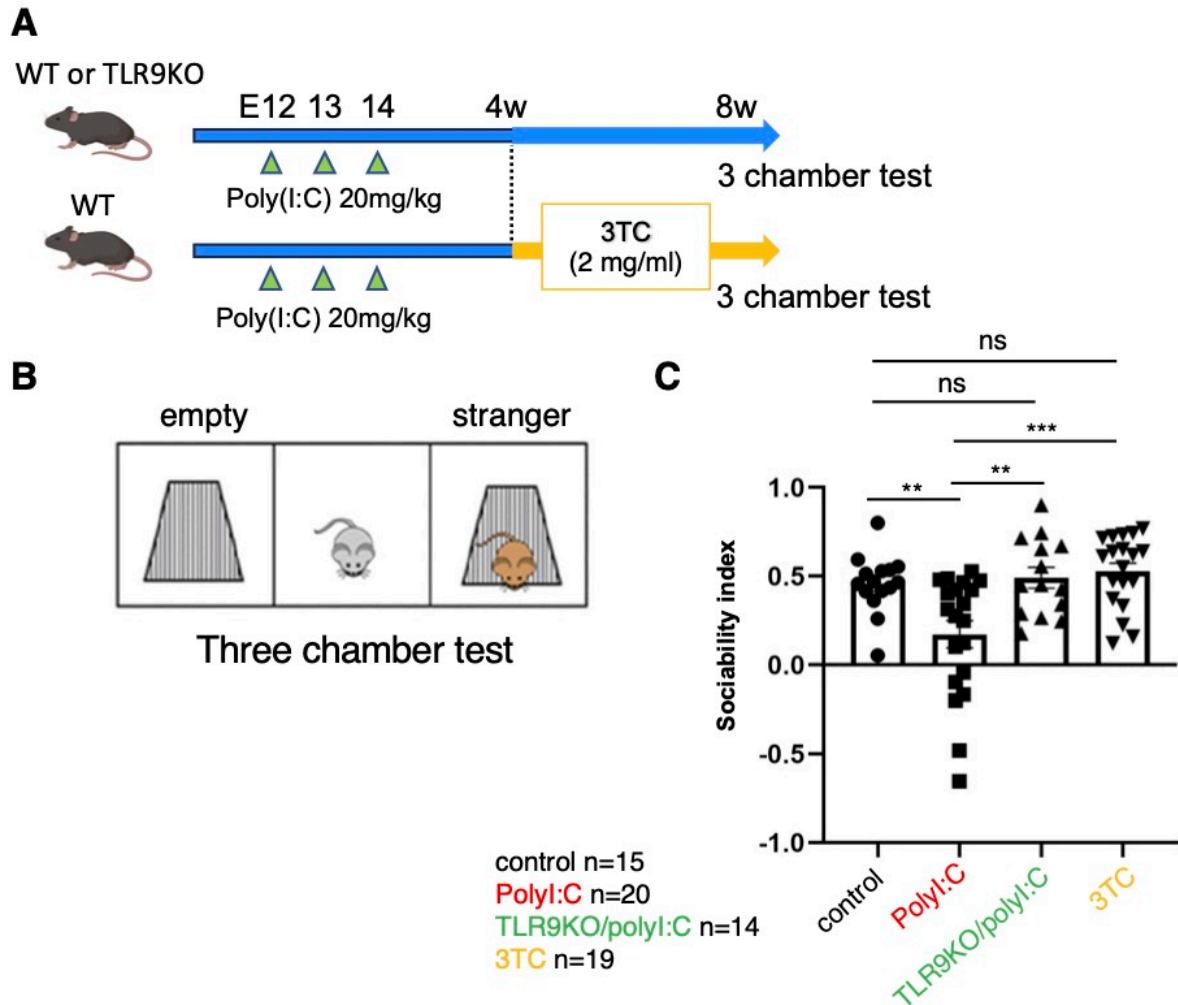


図 8. 母体免疫活性化誘導性社会性異常に対する TLR9 欠損及び逆転写酵素阻害剤の効果。

A) WT あるいは TLR9 KO 妊娠マウスに polyI:C を投与 (E12, 13, 14 の 3 回)、MIA を誘導後、WT マウスの一部には 3TC を飲水投与した。B), C) これらマウスの 3 チャンバーテストとその結果。

その結果、TLR KO や 3TC 投与群では社会性異常が改善されることがわかった (図 8B, 8C)。これらの結果は、MeCP2 KO とは異なる ASD モデルにおいても、共通して cDNA 産生亢進→TLR9 活性化→MG 活性化プロセスがその発症に関与し、このプロセス関連因子は普遍的な治療標的となる可能性を示した。

今後の展望および課題

これまで結果から、2つの異なる原因による ASD 様症状の発症には、「神経系細胞における L1 cDNA の産生亢進→TLR9 を介した MG 活性化→SASP 因子等の放出→神経系細胞の機能障害」というプロセス (悪性ポジティブフィードバックループ) が共通して関与することが示唆された。このことは、同様に L1 の発現亢進や MG 活性化が観察される老齢脳や、アルツハイマー病脳、筋萎縮性側索硬化症脳、統合失調症脳など他の PSD 脳においても同様のプロセスが神経機能障害の原因であるとの推察を可能にする。また、臨床応用を考えた場合にも、今回の結果は RTi がこのように非常に多くの NPD の治療に有効であるものと推察される。しかし、今回使用した RTi はもともと後天性免疫不全症候群 (AIDS) の治療のためにヒト免疫不全ウイルス (HIV) の逆転写酵素を標的として開発されたものであり、通常の細胞内 DNA ポリメラーゼに対する阻害活性も保有し、副作用が懸念さ

れる。そのため、今後はより L1 の逆転写酵素に特異的な RTi を開発する必要がある。このような RTi を開発することを通じて、今後、このプロセス因子を標的とした臨床応用が飛躍的に推進されることを期待したい。

(完)

引用文献

- 1) Matsuda T., Murao N., Katano Y., Juliandi B., Kohyama J., Akira S., Kawai T. & Nakashima K. TLR9 signalling in microglia attenuates seizure-induced aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature communications* 6, 6514 (2015).
- 2) Muotri A.R., Marchetto M.C., Coufal N.G., Oefner R., Yeo G., Nakashima K. & Gage F.H. L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443–446 (2010).
- 3) Cronk J.C., Derecki N.C., Ji E., Xu Y., Lampano A.E., Smirnov I., Baker W., Norris G.T., Marin I., Coddington N., Wolf Y., Turner S.D., Aderem A., Klibanov A.L., Harris T.H., Jung S., Litvak V. & Kipnis J. Methyl-CpG Binding Protein 2 Regulates Microglia and Macrophage Gene Expression in Response to Inflammatory Stimuli. *Immunity* 42, 679–691 (2015).
- 4) Ohashi M., Korsakova E., Allen D., Lee P., Fu K., Vargas B.S., Cinkornpumin J., Salas C., Park J.C., Germanguz I., Langerman J., Chronis C., Kuoy E., Tran S., Xiao X., Pellegrini M., Plath K. & Lowry W.E. Loss of MECP2 Leads to Activation of P53 and Neuronal Senescence. *Stem Cell Reports* 10, 1453–1463 (2018).
- 5) Durand S., Patrizi A., Quast K.B., Hachigian L., Pavlyuk R., Saxena A., Carninci P., Hensch T.K. & Fagiolini M. NMDA receptor regulation prevents regression of visual cortical function in the absence of Mecp2. *Neuron* 76, 1078–1090 (2012).
- 6) Guy J., Gan J., Selfridge J., Cobb S. & Bird A. Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143–1147 (2007).
- 7) Tsujimura K., Irie K., Nakashima H., Egashira Y., Fukao Y., Fujiwara M., Itoh M., Uesaka M., Imamura T., Nakahata Y., Yamashita Y., Abe T., Takamori S. & Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell reports* 12, 1887–1901 (2015).
- 8) Vogel Ciernia A. & LaSalle J. The landscape of DNA methylation amid a perfect storm of autism aetiologies. *Nature reviews Neuroscience* 17, 411–423 (2016).