

マイクログリアの血管を介した精神神経疾患発症メカニズムの解明

久保田義顕

慶應義塾大学 医学部 解剖学教室

【研究の背景】

自閉性障害や統合失調症などの精神神経疾患は、生命に直接的に関与する疾患では無いが、一旦発症すると慢性の経過をたどり、患者のクオリティ・オブ・ライフ(生活の質)を著しく損ねる。それ故、早急にそのメカニズムを解明し、根本的な治療法や予防法を確立することが社会的に求められている。精神神経疾患の多くは、一般的にその人の生まれながらの体質(遺伝素因)と生活習慣などの影響(環境因子)との両者が複雑に組み合わさって生じていると考えられている。また、遺伝素因を決めている遺伝子(感受性遺伝子)も単独ではなく複数存在し、同じ病名の患者でも個人によって感受性遺伝子の組み合わせは同一でないことが推定されている。このように複雑な発症機構を背景に持つ精神神経疾患の病態解明には、モデル動物とヒトゲノムのデータを統合して、できるかぎり多面的に解析することが不可欠である。

【目 的】

本研究は、精神神経疾患、特に自閉性障害の発症・増悪のメカニズムに関し、中枢神経系における免疫細胞であるマイクログリア(小膠細胞)の活性化の寄与、特に Leucine rich repeat containing 33(Lrrc33)の機能を中心とし、モデル動物の表現型とヒトゲノムのデータを統合してその全容を理解し、全く新しい治療法を開拓するための重要な基礎的知見を得ることを目的として遂行された。

【方 法】

本研究は、これまでの研究代表者のマイクロアレイ解析(Takase et al Blood 2012)において、血管内皮細胞特異的分子として見出した Lrrc33 が、マイクログリアの活性化制御に機能しているという、マウスにおける意外な知見に端を発する。血管における異常を期待して作成した Lrrc33 ノックアウトマウスが、血管形成に異常は無いものの、中枢神経系における免疫細胞であるマイクログリアが恒常的に活性化されているという表現型を認めた。さらには、このマイクログリアでは、炎症や外傷を負荷していないにもかかわらず、TNF α や IL1 β などの炎症性サイトカインの発現が数〜数十倍高かった。また、それら過剰な炎症サイトカインの神経への持続的曝露を反映し、海馬などの組織学的な神経変性を認めた。そこで、複数のマウス行動テスト(three chamber test、十字迷路試験、nest building test など)を行ったところ、若年齢より非常に強い自閉症様症状を認めた。また、この表現型は Csf1r-iCre および Lrrc33-flox マウスを用いた血球系細胞特異的 Lrrc33 欠損マウスでも認められる一方、血管内皮特異的欠損マウスでは認められず、マイクログリアの cell autonomous な異常であると考えられた。本研究ではまず、上記マウスの表現型のメカニズムの更なる追及を進められた。具体的には、Lrrc33 欠損マウスの自閉症様の症状が、本当にマイクログリアの活性化によるものなのか、また、どのような分子経路で活性化されているのかを、マウスへの阻害剤投与実験やダブルノックアウトによるレスキュー効果の検討、さらには、生化学的に Lrrc33 がどのような分子と結合し、相互作用を及ぼしているか、詳細に検討が行われた。また、同時進行で、ヒト自閉症サンプルを用いたゲノム解析が進行し、Lrrc33 遺伝子の変異とヒト自閉症の罹患との関連性が検討された。また、理化学研究所にて管理・保管されている、既存のヒト自閉症ゲノムサンプルを用いた解析を行った。このゲノム解析の中で Lrrc33 遺伝子において特徴的な変異様式が数個検出されたが、その変異の有意性を機能的に検証すべく、マウスに立ち戻り、ゲノム編集(Crispr/Cas9 システム)を用いてそ

これらの変異をマウス個体で再現、行動異常の解析がなされた。

【結 果】

まず、マイクログリアの活性化による TNF α の過剰状態が、神経障害、自閉症様症状の本質なのかどうか、TNF 阻害剤 (Lenalidomide) 投与や、Tnf ノックアウトマウスとの交配を行ったところ、Lrrc33 ノックアウトマウスの行動異常が有意に改善された。また、Lrrc33 は、自然免疫のセンサー分子であり、マイクログリアの活性化の引き金となる Toll 様受容体 (Toll like receptor: TLR) の相同分子であることが知られるが (Liu et al Biochem Biophys Res Commun 2013)、Lrrc33、および各種 TLR のタグ付きコンストラクトを培養細胞に導入、それぞれの結合を免疫沈降法により確認したところ、TLR の中でも、ウイルス由来 dsRNA をリガンドとする TLR3 との結合が確認された。これを基に、Lrrc33 ノックアウトマウスに TLR3 の阻害剤投与、Tlr3 ノックアウトマウスとの交配を施したところ、マイクログリアの活性化の表現型が有意に抑えられた。同時に、理化学研究所脳科学総合研究センターにて保持されている、ヒト自閉症のサンプルにおける Lrrc33 の SNPs 解析を行ったところ、自閉症に特異的なアミノ酸置換を伴う一塩基変異が 3 つ得られた。そのうち 2 つについて、ゲノム編集 (Crispr/Cas9 システム) により、その変異を再現する遺伝子改変マウスを作製したところ、2 つのうち 1 つの変異マウス (R688C) において、Lrrc33 ノックアウトマウス同様の行動異常が見られた。

【考 察】

本研究で明らかになった Lrrc33 ノックアウトマウスの表現型のメカニズムとしては、Lrrc33 が自然免疫受容体の一つである TLR3 とのヘテロダイマー形成により、内因性の negative regulator として働いており、その欠失によって、マイクログリアが恒常的に活性化され、TNF α などの炎症性サイトカインの過剰産生により、海馬をはじめとする、脳神経への器質的なダメージの蓄積が、行動異常というアウトプットとして現れるというものである。本研究の焦点となった Lrrc33 遺伝子は、ヒト 3 番染色体長腕 29 領域 (3q29) に存在する。3q29 の 1.5Mb の領域の両端には長い繰り返し配列が認められ、実際その欠失が 3q29 microdeletion 症候群として知られる。興味深いことに、本症候群の典型的な症状として、精神発達遅延、自閉症が認められる。3q29 には約 30 遺伝子が存在するが、現在のところ責任遺伝子は同定されていない。本研究における結果は、Lrrc33 が 3q29 microdeletion 症候群の責任遺伝子であることと矛盾せず、かつヒト精神神経疾患に単独で関わっていることを示唆するものである。ヒトゲノム解析、および Crispr/Cas9 変異マウスの解析によって得られた 688 番目のアルギニンの変異が、生化学的にどのような意味を持つかは今のところ不明である。当初想定していた、TLR の馬蹄形の細胞外ドメインの内側に位置しているとすればリーズナブルであるが、膜貫通ドメインに近い部分に存在する。これが Lrrc33 の高次構造に影響しているのか、または Lrrc33 の発現自体に影響しているのか、より詳細な解析が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

先述のごとく、自閉性障害や統合失調症は、ひとたび罹患すると患者のクオリティー・オブ・ライフは一生涯影響を受けるため、その病態の全容の解明が求められており、根本的な治療法や予防法を確立することが社会的に求められている。また、現時点において、疾患の原因として複数の遺伝子および環境要因、それらの複合的な相互作用が想定されているが、その詳細は明らかではない。本研究では精神神経疾患の発症・病態の進行において、近年世界的に着目されているマイクログリアの関与の分子機構から疾患の発症機構の一端を明らかにしたものである。極論で言うと、一部の自閉性障害は、早期からの炎症抑制 (TNF 阻害剤など) によって、その発症、増悪を防げることを本研究は示唆していると言える。

【参考・引用文献】

Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, Kubota Y, Otsu A, Suzuki R, Ishitobi H, Mochizuki H, Kojima T, Takano S, Uchida K, Takahashi S, and *Ema M. Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo Blood 120(4): 914-23. 2012.

Liu J, Zhang Z, Chai L, Che Y, Min S, Yang R. Identification and characterization of a unique leucine-rich repeat protein (LRRC33) that inhibits Toll-like receptor-mediated NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 434(1):28-34, 2013.