

---

厚生科学研究費補助金

脳科学研究事業

---

ゲノム不活化機構の異常に基づく  
脳発達障害の病態解明と治療法開発の研究

(H13-脳-009)

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

---

主任研究者：久保田健夫（国立精神・神経センター神経研究所）

分担研究者：後藤 雄一（国立精神・神経センター神経研究所）

伊藤 雅之（国立精神・神経センター神経研究所）

---

## 目 次

### I. 総括研究報告書

ゲノム不活化機構の異常に基づく脳発達障害の病態解明と治療法開発の研究

久保田健夫（国立精神・神経センター神経研究所） \_\_\_\_\_ 1

### II. 分担研究報告書

1. 久保田健夫（国立精神・神経センター神経研究所） \_\_\_\_\_ 3

2. 後藤 雄一（国立精神・神経センター神経研究所） \_\_\_\_\_ 5

3. 伊藤 雅之（国立精神・神経センター神経研究所） \_\_\_\_\_ 7

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 \_\_\_\_\_ 9

IV. 研究成果の刊行物・別刷 \_\_\_\_\_ 10

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

総括研究報告書

ゲノム不活化機構の異常に基づく脳発達障害の病態解明と治療法開発の研究

主任研究者 久保田健夫 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

ゲノム不活化（遺伝子発現抑制）機構の破綻による遺伝子の過剰発現に起因すると考えられる2つの発達障害疾患「レット症候群」と「環状 X 染色体不活化異常症」の病態を解明し新しい治療法を開発する研究を行った。その結果、レット症候群の責任遺伝子 MeCP2 がコードする蛋白は脳、とくに脳幹部で本症発症前の時期に神経細胞で強く発現することが明らかにされた。したがって本症候群の病態は、脳幹部において MeCP2 蛋白による遺伝子の発現抑制が起こらず過剰発現が生じていることと考えられた。また環状 X 染色体に不活化が生じない重症ターナー症候群の患者において、環状 X 染色体領域が Xcen-q12 であることが明らかにされた。したがってこの領域の遺伝子の過剰発現が重度知的障害に関係すると考えられた。今後過剰発現遺伝子の中からそれぞれの疾患の発症に関与する遺伝子を特定し、これによりこの遺伝子にアプローチするという新しい治療法開発をめざしていく。

分担研究者

後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所  
伊藤雅之 国立精神・神経センター神経研究所

A. 研究目的

ゲノムプロジェクトの進展・完了を受け、多数の疾患において責任遺伝子が同定され、それらのほとんどは、遺伝子内部に構造（塩基配列）の変化を起し機能低下を生じているものであった。一方正常状態を維持するため、遺伝子は適切な時期に発現が抑えられなければならないことも明らかになり、この発現抑制機構の異常によっても疾患を発症しうることが想定されるようになった。しかしながらそのような疾患の研究は遅れている。そこでわれわれは、遺伝子不活化（発現制御）機構に関する MeCP2 蛋白の異常症である「レット症候群」と、染色体全体において遺伝子不活化機構に異常が生じている「環状 X 染色体（環状 X）不活化異常症」の2つの発達障害をきたす疾患において、不活化異常による疾患の発症機序を明らかにする研究を行った。具体的には、不活化機構の異常により過剰発現している遺伝子を同定することにした。

B. 全体計画

[レット症候群の病態解明研究]

- (1) MeCP2 蛋白のゲノム上の結合領域の特定
- (2) ヒトおよびマウスの MeCP2 蛋白の高発現組織と時期の同定マウスとの遺伝子発現パターンの比較

[環状 X 不活化異常症の病態解明研究]

- (3) 環状 X 不活化異常症患者に共通の染色体領域の特定

C. 研究方法

[レット症候群の病態解明研究]

- (1) ヒト培養細胞を用いてクロマチン免疫沈降法で MeCP2 蛋白が結合するゲノム領域を特定する。
- (2) マウス組織およびインフォームドコンセントを得たヒト組織を用いて、高発現組織と高発現時期を明らかにする。

[X 染色体不活化異常症の病態解明研究]

- (3) 染色体 FISH 法とマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析により、環状 X 染色体を伴うターナー症候群患者の環状 X 染色体のサイズを特定する。

#### D. 結果および考察

##### [レット症候群の病態解明研究]

- (1) MeCP2 蛋白が結合するゲノム領域を含むクローンの解析の結果、MeCP2 蛋白の結合領域は特定のものではなく、既知の遺伝子領域を含むゲノム上の様々な領域であることが判明した。
- (2) MeCP2 蛋白は、ヒトにおいて脳とくに脳幹部で強く発現しており、胎生期に高く、生後低下することがわかった。脳組織における局在は、胎生期は核内に存在し、成人期は細胞質に移行することがわかった。MeCP2 蛋白が DNA 結合蛋白であることから、この蛋白は胎生期に主に機能していると考えられた。またマウスにおいてもヒトと同様に、胎生期の脳幹で強く、生後低下する傾向を認めた。このことより、マウスをヒトのモデルとして使用可能であることが示唆された。この結果をもとに、今後は本症のモデルマウスである *Mecp2* 遺伝子ノックアウトマウスの新生児期の脳幹部を材料にマイクロアレイを用いて正常マウスとの比較解析を行い、本症の原因と想定される脳幹過剰発現遺伝子の同定を行い、さらに(1)の結果と合わせ、MeCP2 蛋白結合性脳幹部過剰発現遺伝子を確定していく。

##### [X 染色体不活化異常症の病態解明研究]

- (3) 環状 X 染色体を伴うターナー症候群患者 3名の環状 X 染色体のサイズを決定し、その共通染色体領域が Xcen-q12 であることを明らかにした。さらにデータベースサーチにより、他の発達遅滞疾患との関係が想定されている 5 個の遺伝子を含む 74 個の遺伝子が存在することが判明した。さらに染色体上の異常発現をあきらかにするために、X 染色体上の遺伝子をプローブとした RNA-FISH 法を確立した。

#### E. 結論

遺伝子不活化機構の破綻の結果、正常遺伝子が過剰発現して発症していると想定される 2 つの発達障害疾患の病態解明研究を行った。その結果、レット症候群の研究においては、ヒトおよびマウスにおいて胎児期の脳幹部の神経細胞核において、強く発現していることを明らかにした。これにより、胎生期の脳幹部において MeCP2 蛋白により本来発現抑制されるべき遺伝子の異常な発現が、本症の原因と考えられた。また環状 X 不活化異常症の研究では環状 X の領域を特定し、これによりこの領域内の遺伝子の異常発現が本症の原因と考えられた。今後はさらに研究を進め両疾患に関与する過剰発現遺伝子を同定し、さらにそれら

の遺伝子をターゲットとした治療法の開発をめざしてゆく。

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ゲノム不活化機構の異常に基づく脳発達障害の病態解明と治療法の開発研究

主任研究者 久保田健夫 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

環状 X 染色体(環状 X)不活化異常症候群は、小さな環状 X が正常な不活化をうけずその上にある遺伝子が異常な発現をする疾患で、この結果生ずる X 連鎖遺伝子の過剰発現が知能障害に関係すると考えられてきた。しかしこれまで具体的にどの X 連鎖遺伝子の過剰発現が知能障害の原因となるかという点については明らかにされていなかった。そこで主任研究者らはまず DNA メチル化パターン解析により小さな環状 X 染色体を患者において環状 X 染色体が正常の不活化をうけていないことを明らかにし、ついで FISH 解析・DNA マーカーを用いた多型解析により 3 名の環状 X 染色体の共通領域が Xcen-q12 であることを特定した。さらにゲノムデータベースサーチにより、この領域内には 5 個の発達遅滞関連遺伝子を含む 74 の遺伝子が存在することが判明した。今後はこれらの遺伝子の脳発現性の有無を確認し、さらに RNA-FISH 法を用いて正常 X と環状 X の両 X 染色体上で発現しているような遺伝子を同定することで、不活化異常症候群の知能障害に関与する遺伝子を特定してゆく。

A. 研究目的

女性における 2 本の X 染色体は 1 本が不活化され、男性との発現遺伝子量のバランスが計られている。この不活化が生じないと通常その個体は致死的となり、小さい場合でも重度の障害を生ずる。

これまで小さな環状 X 染色体(環状 X)に不活化が生じていない患者の知能障害に、不活化不全にともなう小さい X 染色体上の遺伝子の異常な発現が関与していると考えられてきた。しかしながら遺伝子の過剰発現を証明した研究はなく、また具体的に環状 X 上のどの遺伝子の過剰発現が発達障害に関係するかは全く不明であった。

そこでわれわれは小さな環状 X を伴う重症知能障害患者 3 名の解析を通じて、これを明らかにすることにした。

B. 研究方法

対象は、ターナー症候群の核型に小さな環状 X 染色体を伴う患者 3 名とした。患者はいずれも重篤な発達遅滞を呈していた。

X 染色体の不活化の有無の判定には、近年われわれが独自に開発した、正確で簡便な X 染色

体上のアンドロゲン受容体遺伝子のプロモーターのメチル化を利用した PCR 法を用いた。

環状 X 染色体の共通領域の特定には、X 染色体上の DNA プローブを用いた FISH 法を用いた。環状 X にその断片のシグナルを認めた場合は環状 X 上にその断片領域が存在し、認めない場合は環状 X 上にその断片領域が存在しないという方法で、環状 X の大きさを判定した。プローブ間の情報を得るためにマイクロサテライトマーカーを用いた多型解析を行った。患者とその両親の DNA を各マーカーのプライマーで PCR 増幅し、両親のアレルの伝達を認めた場合はそのマーカー領域は環状 X に存在し、片親アレルしか認めない場合はそのマーカー領域は環状 X に存在しない、として判定した。

環状 X の領域として特定されたゲノム領域内の遺伝子の同定法として、NCBI のゲノムデータベースを用いた。

C. 研究結果

対象の環状 X ターナー症候群患者 3 名において、メチル化 PCR 法により、正常 X と環状 X がアンドロゲン受容体遺伝子プロモーター領域において非メチル化状態、すなわちいずれの X とも

不活化されていない不活化異常の状態であることが判明した。

FISH 法・マイクロサテライトマーカー法により患者 3 名の環状 X 染色体のサイズを決定され、その共通染色体領域が Xcen-q12 であることが判明した。

データベースサーチにより、発達遅滞関連遺伝子 5 個を含む、74 個の遺伝子が Xcen-q12 領域に存在することが判明した。

#### D. 考察

環状 X ターナー症候群患者において環状 X が不活化されていないことが判明したことより、環状 X の領域が正常 X 上のそれとともに、両方で活性であることが示された。したがってこの領域の遺伝子は、片方の X 染色体で不活化が起きている正常女性に比較し、2 倍の発現が生じていると考えられた。

一般に遺伝子疾患は、遺伝子の発現が低下することに起因するが、ある種の神経疾患（Charcot-Marie 病や Pelizaeus-Merzbacher 病）では、倍量発現でも発症することがわかってきた。環状 X 不活化不全患者においても遺伝子の倍量発現が、その神経症状（知能障害）に関与していると考えられる。

今回の研究で X 染色体長腕セントロメア近傍の領域の発達遅滞関連遺伝子 5 個を含む、74 個の遺伝子が、過剰発現により知能障害を生じさせる候補遺伝子であると考えられた。

本研究の成果をふまえ、最近確立された RNA-FISH 法でこれらのうちのどの遺伝子が実際に、正常 X・環状 X の両者の上で発現しているかを判定し、両発現を認めたものに対し、神経毒性や知能障害との関連性を神経培養細胞やトランスジェニックマウスの作製で検証することが必要と考えられる。

#### E. 結論

重篤な発達遅滞を呈するターナー症候群患者において、環状 X 染色体の不活化異常を証明した。

3 名の環状 X 染色体の共通領域を特定し、発達遅滞関連遺伝子 5 個を含む、74 個の遺伝子が存在することを明らかにした。

今後この遺伝子を候補として、過剰発現の有無、神経系への影響の有無、発達遅滞との関連性の有無を調べることで、過剰発現性発達遅滞関連遺伝子を同定してゆく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Takeo Kubota. (2001) Brain Dev 23:S177-S181.

2) 久保田 健夫. (2001) 医学のあゆみ 197: 1025-1028.

##### 2. 学会発表

1) The American Society of Human Genetics 51th Annual Meeting. 2001.10.14, San Diego, USA.

2) 第 43 回日本小児神経学会総会 2001.6.8、岡山.

3) 第 46 回日本人類遺伝学会 2001.10.5、大宮.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）  
分担研究報告書

ゲノム不活化機構の異常に基づく脳発達障害の病態解明と治療法開発の研究

分担研究者 後藤雄一 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

レット症候群の原因は、メチル化された遺伝子に結合しその発現を抑制する蛋白をコードする MeCP2 遺伝子の変異であることが近年明らかにされた。しかしこの蛋白がどのような遺伝子に結合しているかは明らかにされていない。そこで分担研究者らは、MeCP2 蛋白が結合する遺伝子をゲノム上で探索する研究を行った。方法は MeCP2 蛋白とそれが結合している DNA 断片を複合体のまま MeCP 蛋白抗体で沈降させ、沈降物中の DNA 断片を回収する方法であるクロマチン免疫沈降法を用いた。この方法で得られた DNA 断片をクローン化して塩基配列を決定し、ゲノムデータベースの情報よりどのような遺伝子部分に相当するかを検討した。その結果、MeCP2 蛋白は既知の遺伝子を含むさまざまなゲノム領域に結合していることが判明した。今後は、この MeCP2 結合遺伝子のうちどれが病態に関係しているかをマウスを用いた発現解析研究とともに明らかにしてゆく。

A. 研究目的

レット症候群は X 連鎖優性遺伝病で、X 染色体上の MeCP2 遺伝子の変異がその原因であることが近年明らかにされた。一方 MeCP2 蛋白はメチル化された遺伝子プロモーターに結合するとその遺伝子の発現を抑制する機能を有するタンパクである。したがってレット症候群の病態は、MeCP2 蛋白の変異によって本来の抑制が効かず結果として過剰発現している遺伝子に起因すると推測される。しかしながら具体的に MeCP2 蛋白が抑制するメチル化遺伝子はゲノム上のどの遺伝子であるかは明らかにされていない。そこで分担研究者らは、MeCP2 蛋白抗体を用いた免疫沈降 (ChIP) 法により、MeCP2 蛋白が結合するゲノム領域を明らかにすることにした。

B. 研究方法

方法は 1) インフォームドコンセントを得て採取された正常者の血液細胞から樹立されたリンパ芽球細胞を用いて、2) これをホルムアルデヒド固定して DNA 結合蛋白を DNA にクロスリンクさせ、3) 超音波で細胞内の DNA を断片化させる、4) DNA 結合蛋白の抗体を用いて目的の蛋白とそれに結合する DNA 断片を沈降さ

せる、5) 沈降物より DNA を回収する、という ChIP 法を用いた。これにより回収された DNA 断片群を平滑化し、blunt end プラスミドベクターにサブクローニングし大腸菌に electroporation 法で transformation を行い、塩基配列決定をおこなった。この配列をゲノムデータベースサーチにより、ゲノムのどの領域の該当するかを検討した。

C. 研究結果

プラスミドを含む大腸菌コロニーが約 100 個得られ、これまでにこのうち 46 個のプラスミドクローンの塩基配列を決定した。

その結果、24 個のクローンがヒト断片を含んでいることが確認され、このうち 58%が遺伝子調節領域であるプロモーターの基準を満たす領域であった。ゲノムデータベースサーチ特定のゲノム領域に完全に合致したクローンは 4 個あり、このうち 1 個が既知の遺伝子であった。

D. 考察

シークエンス解析の結果、MeCP2 蛋白は、ゲノム上の様々な領域に結合していることがわかった。一方で当初予測されたメチル化された反復配列 (例: Alu 配列) には結合が認められなかった。

このことは、現在公表されているゲノム情報からは MeCP2 蛋白はゲノム上の反復配列ではなく、さまざまな遺伝子領域により結合していることを示唆していると考えられた。

今後は、さらに配列決定を行い、“MeCP2 結合領域データベース”を作成し、マウスを用いた脳における遺伝子発現解析から得られる MeCP2 の下流に位置する遺伝子群と比較検討することで、本症の病態に関係するような MeCP2 蛋白が結合しそれによる発現調節を受けるような遺伝子を特定してゆく。

本研究により MeCP2 蛋白によって発現調節されている脳発現遺伝子（いわば MeCP2 蛋白のターゲット遺伝子）を明らかにすることで、将来的にはその遺伝子を標的とした本症の新しい治療法が開発できると考えられる。

#### E. 結論

レット症候群の病態を明らかにするために、本症の責任遺伝子がコードする蛋白 MeCP2 が結合する遺伝子を明らかにする研究を行った。クロマチン免疫法を用いてその領域を探索した結果、MeCP2 蛋白はさまざまなゲノム領域に結合していることが明らかになった。今後は、この情報と発現解析から得られる情報と統合して、本症の発症に関係する“MeCP2 ターゲット遺伝子”を同定していく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- 1) The American Society of Human Genetics  
51th Annual Meeting. 2001.10.14, San Diego, USA.
- 2) 第43回日本小児神経学会総会 2001.6.8., 岡山.
- 3) 第46回日本人類遺伝学会 2001.10.5, 大宮.

#### G. 知的所有権の取得状況

なし



厚生科学研究費補助金 (脳科学研究事業)

分担研究報告書

ゲノム不活化機構の異常に基づく脳発達障害の病態解明と治療法開発の研究

分担研究者 伊藤雅之 国立精神・神経センター神経研究所

研究要旨

近年レット症候群の原因は MeCP2 遺伝子の変異であることが明らかにされた。しかし MeCP2 遺伝子変異によりどのような機序で本症患者の神経症状を呈してくるかは明らかでない。そこで分担研究者らは、MeCP2 蛋白の機能がメチル化された遺伝子の発現を抑制することと本症の主病変部が脳幹部であることを考えあわせ、本症の病態は、MeCP2 蛋白により本来発現が抑制されている遺伝子が MeCP2 蛋白異常により脳幹部において過剰発現することと考えた。このような過剰発現遺伝子を同定するため、今年度はまず MeCP2 蛋白発現の経時的推移に関する検討を行った。その結果 MeCP2 蛋白がヒト・マウスとも胎生期・新生児期に、脳幹部で高発現し、さらにこの高発現期においてはニューロンの核に局在していることを明らかにした。今後はこの結果をもとに本症のモデルマウスである *Mecp2* 遺伝子ノックアウトマウスの新生児期の脳幹部 RNA を材料に、正常マウスとともにマイクロアレイを用いて比較してノックアウトマウスで過剰発現している遺伝子を同定してゆく。

A. 研究目的

レット症候群の遺伝的原因として、コードする蛋白がメチル化された遺伝子プロモーターに結合しその発現を抑制する、X 染色体上の遺伝子 *MeCP2* の変異であることが明らかにされた。一方本症患者の症状から脳幹部が主病変部と考えられてきた。そこで分担研究者らは、本症の病態は、脳幹部で MeCP2 蛋白により発現が抑制されている遺伝子が MeCP2 蛋白異常により過剰発現することと考え、このような過剰発現遺伝子 (*MeCP2* 蛋白のターゲット遺伝子) を同定する研究を行った。その目的は以下の通りである。

1. MeCP2 蛋白の高発現部位と高発現時期を明らかにする。
2. 高発現部位・時期において *Mecp2* ノックアウトマウスと正常マウス間のマイクロアレイを用いた発現パターンの比較し、レット症候群の病態に直接関わるような MeCP2 により発現抑制される (*MeCP2* の下流) 遺伝子を明らかにする。

B. 研究方法

MeCP2 蛋白の発現解析には、ヒトおよびマウ

スの MeCP2 蛋白に対する抗体とマウスの脳組織およびインフォームドコンセントを得て研究使用が許可されたヒト脳組織を用いた免疫染色法を用いた。マイクロアレイを用いた遺伝子発現パターン解析には、新生マウスの脳幹部から RNA を抽出し、これをマイクロアレイ解析の材料とし、解析には 36,000 遺伝子が載った AFFYMETRIX の Murine Genome Set を用いた。マイクロアレイ解析に用いる *Mecp2* 遺伝子ノックアウトマウスは米国 Jackson Lab から入手することにした。

C. 研究結果

1. MeCP2 蛋白の経時的発現検討を行った結果、ヒトにおいて脳、特に脳幹部で高発現していた。さらにこの発現は胎生期から新生児期に高く、その後急速に低下していた。高発現を呈した胎生期の脳幹部では、MeCP2 蛋白はニューロンの核に局在していた。局在は成人期になると細胞質に移動していた。

2. マイクロアレイ解析を用いた発現パターンの解析における予備実験を行った。その結果、新生マウスの脳幹から本解析に必要な RNA 量が確保できることが確認された。

#### D. 考察

経時的発現解析の結果、MeCP2 蛋白は胎生期・新生児期の脳幹部で高発現が観察され、この時期においてはニューロンの核に局在していた。このことから胎生期・新生児期の脳幹部では MeCP2 蛋白は、ニューロンの核内でさまざまな核遺伝子に結合しその発現を抑制していると考えられた。この結果とレット症候群患者の発症時期が乳児期であることを考えあわせると、発症前の胎生期・新生児期の MeCP2 遺伝子発現抑制不全が、本症の発症に関係していると考えられた。一方ヒトと同様な経時的発現推移がマウスでも見られたことから、本症の発現解析がマウスを用いても可能であることが示唆された。

#### E. 結論

レット症候群の病態を明らかにするために、本症の責任遺伝子がコードする蛋白 MeCP2 により発現抑制を受ける遺伝子を明らかにする研究を行った。これまでに、ヒトの MeCP2 蛋白の発現が生後早期までに脳、とくに脳幹部で神経細胞核で高発現を呈することを明らかにした。またこの発現パターンはマウスにおいても同様であった。今後はこの知見をもとに、本症のモデルマウスを用いたマイクロアレイ解析を行うことで、MeCP2 蛋白により調節をうける脳幹部発現遺伝子を明らかにしていく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Saito Y, Ito M, Ozawa Y, Matsuishi T, Hamano K, Takashima S. Brain Dev 23 Suppl 1:S122-S126, 2001.

##### 2. 学会発表

第 43 回日本小児神経学会総会 2001.6.8、岡山.

#### G. 知的所有権の取得状況

現在作成中のテトラサイクリン on/off 系 *Mecp2* 遺伝子改変 Rett 症候群モデルマウスの知的所有権の出願・取得を予定。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeo Kubota	A new assay for the analysis of X-chromosome inactivation in carriers with an X-linked disease.	Brain Dev	23 Suppl 1	S177-S181	2001.
久保田健夫	ゲノムインプリンティング -遺伝子発現制御機構の解明から予防医学へ-	「予防医学のミレニアム/ミレニアム医学の方策」	医学のあゆみ	197: 1025-1028	2001.
Yoshiaki Saito, Masayuki Ito, Yuri Ozawa, Toyojiro Matsuishi, Kenzo Hamano, Sachio Takashima:	Reduced expression of neuropeptides can be related to respiratory disturbances in Rett syndrome.	Brain Dev	23 Suppl 1	S122-S126	2001.

20010650

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。