

201024188A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床
および生物科学の集学的研究
(H22-難治-一般-133)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成23(2011)年 3月

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床
および生物科学の集学的研究
(H22-難治-一般-133)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成23(2011)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床および生物科学の集学的研究	1
伊藤雅之	
（資料1）レット症候群全国疫学調査 二次調査用紙	
（資料2）レット症候群全国疫学調査 二次調査結果	

II. 分担研究報告

1. レット症候群全国疫学調査	13
伊藤雅之、野村芳子、松石豊次郎、立森久照	
2. MECP2遺伝子変異の生物学的解析	15
伊藤雅之、工藤伸一	
3. レット症候群モデルマウスの無呼吸頻度の日内変動とモノアミン神経伝達	17
伊藤雅之、白川哲夫	
4. 非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の分子機能及び遺伝子変異による病態機序の解析	21
伊藤雅之、田中輝幸	
5. レット症候群の臨床病態マーカーとしてのグレリンの検討および再生医療技術を利用した病態解明に関する研究	23
松石豊次郎、西 芳寛、原 宗嗣、高橋知之、岡部恭典	
6. レット症候群の診断基準についての研究	27
野村芳子、瀬川昌也、八森 啓、木村一恵、長尾ゆり、林 雅晴	
7. 遺伝子改変細胞及びマウスの作製と行動、機能解析	31
栗政明弘、平塚正治	
8. インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析	33
堀家慎一、堀家牧子、宮野 勝	
9. レット症候群モデルマウスの脳内カテコラミン・セロトニン産生神経細胞における発達に伴う機能障害に関する研究	35
井手秀平	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	37
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------	----

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床および生物科学の集学的研究

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長

研究要旨

本研究では、レット症候群（RTT）を解明し、診断法と予防・治療法を確立するために、①RTTの臨床実態調査と体系的で包括的なマニュアル作成と生体試料の収集・管理、②エピゲノム機構の解明、③臨床的臨界期の解明の3つのテーマに取り組んだ。その結果、全国疫学一次調査において、患者総数1011名（中央値）、有病率0.009%が得られ、患者分布の地域差があることが分かった。

レット症候群の診断基準の普及と診断の標準化が必要であり、二次調査を通じて、診断基準と診断の手引きの作成を行っている。また、オーストラリアとの共同研究を行ない、臨床像や診断について、国際的な比較検討を進めた。

基礎研究の進展は、複雑な病態解明のみならず、治療法の開発に役立つ。特に、*Mecp2*の発現制御マウスは詳細な治療実験が可能であり、今後の展開が期待できる。

分担研究者

松石豊次郎・久留米大学医学部小児科学 教授
野村 芳子・瀬川小児神経学クリニック 副院長
栗政 明弘・鳥取大学大学院医学系研究科 准教授
堀家 慎一・金沢大学フロンティアサイエンス機構 特任助教
井手 秀平・東京都立東部療育センター 医師

研究協力者

田中 輝幸・東京大学大学院医学研究科発達医科学 准教授
白川 哲夫・日本大学歯学部小児歯科学講座 教授
工藤 伸一・北海道立衛生研究所微生物部 部長
立森 久照・国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神保健計画研究部 室長
高森 一乗・日本大学歯学部小児歯科学講座 講師
齊藤 貴志・国立精神・神経医療研究センター病院 小児神経科 医師
瀬川 昌也・瀬川小児神経学クリニック 院長
八森 啓・瀬川小児神経学クリニック 医師
木村 一恵・瀬川小児神経学クリニック 医師
長尾 ゆり・瀬川小児神経学クリニック 医師
林 雅晴・瀬川小児神経学クリニック 医師
平塚 正治・鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座細胞工学分野 助教
堀家 牧子・金沢大学学際科学実験センター 博士 研究員
宮野 勝・金沢大学フロンティアサイエンス機構 博士研究員

A. 研究目的

レット症候群（RTT）は乳児期からの姿勢・協調運動異常、常同運動、ジストニアなどの運動症状、知的発達障害、自閉性行動を特徴とし、心電図異常や側彎症など多臓器にわたる疾患である。これまでに全国的な疫学調査はなく、臨床実態は不明な点が多かった。RTTの原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2（*MECP2: Xq22*）の基礎研究が進められてきたが、X染色体不活化、*MECP2*変異部位による表現型の違いなど複雑な分子機構と診断の困難さ、検体収集システムの未整備により臨床研究が進んでいない。本研究では、RTTの臨床実態調査とそれに基づいた診断基準を作成し、生体試料の収集と研究基盤の構築、独自開発したモデルマウスの分子生物学的研究を進め、広範な視点から集学的研究を行う。

RTTは神経症状や精神症状だけでなく多臓器にわたる複雑な臨床像を呈するため、診断困難例が多く、その診断と治療・療育は経験によるところが大きい。そこで、(1) 全国疫学調査を行い、実態の把握に努め、治療・療育の標準化に重要な体系的で包括的な診断基準を作成する（伊藤、松石、野村）。また、診断、治療のための生物マーカーの探求を行なう（伊藤、松石、井手）。また、(2) *Mecp2*発現制御RTTモデルマウスを作製し、発症と治療の臨界期を特定し、それらの時期にモノアミンの動態を調べ、診断と治療のマーカー分子の同定、診断、重症度のマーカーを検索する（伊藤、栗政、井手）。さらに、(3) *MECP2*が関与するエピゲノム機構の研究（堀家）を行い、RTTの複雑な分子病態を解明するのみならず科学的な治療法の開発を視野に研究を進める。

B. 研究方法

(1) 全国臨床実態調査と診断基準作成(野村、伊藤、松石、立森)：疫学班(「特定疾患の疫学に関する研究」班(研究代表者：永井正規(埼玉医科大学公衆衛生学))との共同研究により、全国の医療・療育機関へRTT患者のアンケート調査を行った。全国の小児科を有する全病院に大学医学部附属病院とレット症候群の患者が集中すると考える施設を加えた母集団(2,918施設)から層化無作為抽出された1,020施設を対象に郵送による質問紙調査を行い、過去1年間(2008年11月より2009年10月)に診療したRTT患者およびRTT疑い例の有無と患者数を尋ねた(一次調査)。現在、個々の患者の実態把握のための二次調査を行い(二次調査用紙(資料1))、解析した(二次調査結果(資料2))。

また、オーストラリアとの共同研究を行ない、臨床像や診断について、国際的な比較検討を行っている。

(2) RTTの生物マーカーの検索(松石、井手)：研究参加の同意を得られた患者検体を用いて、脳と消化管に分布するペプチドホルモンであるグレリン(GRL)をRIA法により、症状との関連性を調べた。また、レット症候群モデルマウスのモノアミン・アミノ酸をHPLC法で測定し、診断および病期を反映する生物マーカーの探求を行った。

(3) 患者由来変異MECP2によるヘテロクロマチン機構の解析(伊藤、工藤)：MECP2のDNA結合領域(MBD)の患者由来変異7種類についてGFPとの融合タンパク発現ベクターを作成し、マウス繊維芽細胞に導入する。これら変異タンパクを発現した細胞でのヘテロクロマチンの違いとメチル化パターンの違い構造の違いを観察し、ヘテロクロマチン構造の相違と症状の重症度との関連性を検討した。

(4) MECP2による染色体15q11-q13領域のAS責任遺伝子座の遺伝子発現制御機構の解明(堀家)：神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において15q11-q13領域の核内配置がどのように制御されているかDNA-FISH法で解析した。FISHプローブは、15q11-q13領域上の9つのBAC(Bacterial Artificial Chromosome)を蛍光ラベル化し、解析に用いた。さらに、母方と父方15番染色体の相互作用がどのように制御されているかをMeCP2やCTCF、RAD21(コヒーシン)ノックダウンSH-SY5Y細胞を作製し、15q11-q13の核内配置を明らかにした。

(5) *Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスの作製(伊藤、栗政)：染色体ROSA26領域に*Mecp2*のcDNA+EGFPを組み入れ、組み換えによりマウスES細胞に導入し

た。サザンプロット等により確認し、これをマウス胚に入れ、キメラマウスを作製した。高い導入率が期待できるキメラマウスから、戻し交配を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたって、関係省庁の指針を遵守し、必要な手続きを行った。疫学調査および臨床研究においては、当該研究機関の倫理問題検討委員会の承認を得て行った。また、遺伝子改変および動物実験にあたって、国立精神・神経医療研究センターおよび金沢大学、鳥取大学大学院医学研究科に設置されている組換えDNA実験委員会および動物実験に関する倫理委員会等の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 臨床実態調査：一次調査対象1,020施設からの有効回答は677施設(66.4%)で、RTTの報告患者数は計569名であった。この数値から求められる全国のRTTの推計患者数は1011人(95%信頼区間：778から1244人)であった(資料2)。これは20歳までの女性(1120万人(総務省統計局))の0.009%にあたる。また、患者分布の地域差があることが分かった。現在、個々の患者の実態把握をするために二次調査の解析を進めている。

過去の診断基準の見直しと本邦の診断基準、および診断の手引きを作成中である。今後、協力を得ている患者に対して、実用化に向けた臨床実証を行う。また、臨床像や診断について、国際的な比較検討を進めている。

(2) RTTの生物マーカーの検索：すでに集積している患者検体から、RTTでは血中GRLが低値であることをみつけた。さらに、GRL値と症状、MECP2遺伝子変異との関連性を調べている。また、モノアミンをRIA法で測定し、結果の解析を行なった。

(3) 変異MECP2のヘテロクロマチン機構の解析：MECP2のMBD領域に変異を作製し、発現ベクターを構築し、マウス繊維芽細胞に導入した。これら遺伝子変異によるヘテロクロマチン構造の違いを観察し、ヘテロクロマチン構造の相違と症状の重症度との相関を見出した。さらに、ゲノムDNAへの結合能、転写活性化能、転写に与える影響についてDNAチップによる発現解析およびクロマチン免疫沈降解析を行っている。

(4) MECP2による染色体15q11-q13領域のAS責任遺伝子座の遺伝子発現制御機構の解明：15q11-q13領域、約10Mbの各遺伝子座の核内配置をDNA-FISHで解析した。その結果、GAB受容体β3サブユニット*GABRB3*遺伝子近傍で特異的に相同染色体のペアリングが認められた。また、これらの母方と父方15番染色体の相互作用は、自閉症モデル細胞株では消失し

ていた。さらに、MeCP2やCTCFのノックダウン細胞株でも同様に相同染色体のペアリングの異常が認められた。

(5) *Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスの作製：新規ROSA26法による発現制御*Mecp2*遺伝子改変ES細胞および改変マウスを作製した。改変ES細胞において発現制御のテトラサイクリン投与量について検討中である。また、改変マウスについては第6世代まで戻し交配が終了し、次年度には解析に用いることが可能である。

D. 考察

これまで、我が国におけるレット症候群 (RTT) の疫学調査は行われたことがなかった。今回の調査によって初めて、RTTの有病率が(20歳以下の女性)の0.009%であることが明らかになった。この数値は欧米諸国(0.01~0.015%)と比べて比較的低く、その原因について、今後二次調査の詳細な解析で明らかにする必要がある。一方、今回の調査から患者分布の地域差が大きいことが分かった。その一因として、RTTの診断の難しさと医師のRTTの認知度の低さが基盤にあると考えられる。これまでのRTTの診断基準は欧米諸国を中心に作成され、その神経学的徴候の難解な表現や臨床所見の取り方の特殊性などにより、十分普及されていなかった。そこで、一般小児科医にも理解しやすい本邦独自の診断基準を新たに作成し、啓蒙および普及させる必要がある。現在、診断基準および診断の手引きを作成し、この臨床実証の準備を進めている。こうした診断基準の確立と普及は本邦におけるRTTの正確な実態把握のみならず、早期からの治療・療育への介入に不可欠であり、家庭や学校への支援をしていく上で重要である。

国際的なRTTの疫学的比較検討を進めている。これは、診断のあり方のみならず、医療・療育体制を見直す意味でも重要な情報となることが期待される。

また、本邦のRTTおよびMECP2の研究者の研究会(班会議)を開催し、最新の研究情報の交換のみならず、共同研究の推進をはかることができた。さらに、日本レット症候群協会、さくらんぼ会、NPOレット症候群支援機構との交流をはかった。

RTTの生物マーカーの探求とMECP2の分子生物学的研究の成果は、世界をリードするものであり、今後さらに発展することが期待できる。グレリンの発見は世界に先立つものであり、症状の重症度との関連を解析している。また、MECP2発現制御機構の解明は、RTTだけでなく15番染色体インプリンティング遺伝子が関与するPrader-Willi症候群やAngelman症候群など広く自閉症の病態解明の可能

性もある意義深い研究である。さらに、*Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスは、いままでにない遺伝子発現制御機構のモデルマウスで、これにより詳細な治療実験の展開が期待できる。

E. 結論

本研究において、本邦で初めてレット症候群の全国疫学調査が始まった。一次調査において、患者総数1011名(中央値)、有病率0.009%が得られた。また、患者分布の地域差が大きいことが分かった。レット症候群の診断基準の普及と診断の標準化が必要である。今後、臨床経過などの詳細な解析を行ない、本邦の実情にあった診断基準を策定する。基礎研究の進展は、複雑な病態解明のみならず、治療法の開発に役立つ。特に、*Mecp2*の発現制御マウスの完成は、詳細な治療実験が可能であり、今後の展開が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itoh M, Takizawa Y, Hanai S, Okazaki S, Miyata R, Shu H, Inoue T, Akashi T, Goto Y, Hayashi M. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. *Differentiation* 2010; 80:118-122.
2. Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21:588-596.
3. Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal development of neurons in focal cortical dysplasia: neuronal mis-maturation from an immunohistochemical consideration. *Seizure* 2010;19:274-279.
4. Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology* 2011;31:38-41.

5. Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. Insulin facilitates repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade. *Neuroscience* 2010;170:1199-1208.
 6. Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, Iwata K, Shirakawa T. In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. *Oral Dis* 2011 (in press).
 7. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ. CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* 2011 (in press).
 8. 和田崇, 滝口旗一, 武内倫子, 黒木洋祐, 関信幸, 高森一乗, 白川哲夫. *Mecp2* 欠損 Rett 症候群モデルマウスにみられる呼吸の異常と病態変化. *障歯誌* 2010;31:730-736.
 9. 白川哲夫. スペシャルニードの子どもたちへの歯科医療・病診連携. *小児歯誌* 2010;48:40.
 10. Okabe Y, Kusaga A, Takahashi ., Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K. Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. *Brain Res* 2010;1360:17-27.
 11. Matsuishi T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Takahashi T. Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives. *Brain Dev* 2011 (in press).
 12. Nomura Y. Rett syndrome. In: Katie Kompolti, Leonard Verhagen ed. *Encyclopedia of Movement Disorders*. Elsevier, New York, 2010;3:38-41.
 13. 野村芳子. Rett症候群の運動発達. In: 五十嵐隆 総編集、久保田雅也 専門編集. 「小児科臨床ピクシス19」ここまでわかった小児の発達. 中山書店、2010 ; 159-163.
 14. 野村芳子. レット症候群. *精神科治療学*. 2010;25:264-265.
 15. 野村芳子. レット症候群. *症候群ハンドブック*. 中山書店 (印刷中)
 16. Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP. Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radio-sensitivity and chromosomal instability. *Radiat Res* 2011;175: 83-89.
 17. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II-alpha and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
 18. Hori N, Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S. Aberrant CpG Methylation of the Imprinting Control Region KvDMR1 Detected in Assisted Reproductive Technology-Produced Calves and Pathogenesis of Large Offspring Syndrome. *Animal Reproduction Science* 2010;122:303-312.
 19. Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Fujisaki C, Qi DL, Ohhira T, Gilley D, Oshimura M, Kugoh H. (2010) Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integrity* 2010;1: 6.
 20. Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto Y. Abnormal glucose metabolism in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain Dev* 2010;32:506-510.
2. 学会発表
 1. Itoh M. Synaptic dysfunction of Rett syndrome; delayed synaptic maturation is the first step of cortical dysfunction. The 2nd European Rett syndrome Symposium. Edinburgh, UK, 7-10, October, 2010.
 2. Saito T, Okazaki S, Inoue T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical Layer-formation of Human Developing brains and lissencephalies: Consideration of layer-specific marker expression. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.
 3. Itoh M, Okazaki S, Kuki I, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. *Aristaless*-related homeobox (*ARX*) gene null-mutation exhibits abnormal distribution of GABAergic interneurons: immunohistochemical study of human X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. The 17th International Congress of

- Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.
4. Itoh M, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Akashi T, Hayashi M and Goto Y. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human *ARX*-null mutation: consideration of pancreas differentiation. The 12th European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic, 24-28, April, 2010.
 5. 奥田耕助, 渡邊紀, 水口雅, 田中輝幸. 難治性てんかんと発達遅滞の原因遺伝子 *CDKL5* の相互作用の探索. 第 33 回日本神経科学大会 2010. 9. 2 (神戸)
 6. 田中輝幸, 渡邊紀, 奥田耕助, 縣千聖, 佐藤天平, 上野寛枝, 浅原弘嗣, 水口雅. West 症候群・非典型 Rett 症候群の原因遺伝子 *CDKL5* の機能解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会 2010. 4. 23 (東京)
 7. 松石豊次郎. Rett 症候群に学ぶ—臨床・基礎研究からの 22 年と今後の展望— 第 52 回日本小児神経学会 会長講演 2010. 5. 20 (福岡)
 8. 原宗嗣, 葉純子, 西芳寛, 山下裕史朗, 児島将康, 松石豊次郎ほか: レット症候群における血漿中グレリン濃度の検討. 第 52 回日本小児神経学会 2010. 5. 20 (福岡)
 9. Segawa M, Nomura Y. Approach to Neurotransmitter Disorders. 11th International Child Neurology Congress-ICNC-2010, Meet the experts session. May2-7, 2010, Cairo, Egypt.
 10. Nomura Y. Rett syndrome and Neurodevelopment. The spring Congress of Korean Child Neurology Society. May 14, 2010. Incheon, Korea.
 11. Nomura Y, Yukishuta S, Kimura K, Segawa M. Clinical Characteristics of Rett syndrome with silent mutation of *MECP2*. 11th Annual Rett syndromesymposium. Virginia, USA, June 27-29, 2010.
 12. 野村芳子, 瀬川昌也. レット症候群. 第 18 回日本レット協会サマーキャンプ. 国立信州高遠少年自然の家. 2010. 9. 18-20 (長野)
 13. Kurimasa A, Okuda S, Okada A, Miyano Y, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Live cell imaging and kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling U2OS cells. Keystone Symposia, Genomic Instability and DNA Repair (B4) Jan. 30-Feb. 4, 2011, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA
 14. 堀家慎一, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒-堀家牧子. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第 55 回日本人類遺伝学会, 2010. 10. 27-30 (大宮)
 15. Horike S, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. The American Society of human Genetics, 60th Annual Meeting, November 3-6, 2010, Washington DC.
 16. Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Epigenetics Europe, September 14-15, 2010, Dublin, Ireland.
 17. Horike S, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Signalling to Chromatin, September 7-10, 2010, Cambridge, UK.
 18. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Sweden-Japan Joint Colloquium, September 6-7, 2010, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
 19. 目黒-堀家牧子, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 堀家慎一 Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会 2010. 5. 28-29 (米子)
 20. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons.

9th Annual International Meeting for Autism
Research (IMFAR), May 20-22, 2010,
Philadelphia, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
(特許申請予定)

*Mecp2*発現制御マウス (伊藤雅之、栗政明弘)

レット症候群 第二次調査個人票

厚生労働省・厚生労働科学研究費補助金（難病克服研究事業）
レット症候群の診断と予防・治療確立のための臨床および生物科学の基学的研究費
特定疾患の治学に関する研究費

この調査票はレット症候群の実態調査のみに使用し、ここに記された記録は秘守されます。該当する番号を丸でかこむ、
または_____上か()内にご記入ください。冒頭に【複】とある項目は複数回答可です。

記載者氏名 _____ 記載年月日 _____ 平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

貴施設名 _____ 電話 _____

所在地 _____ E-MAIL _____
(省略可)

担当診療科 1 小児科 2 小児神経科 3 その他 ()

Table with 2 columns: 調査対象 (患者番号) and 性別 (1男, 2女). Includes fields for 生年月 (1明治, 2大正, 3昭和, 4平成, 5西暦), 居住地 (都・道・府・県・不明), and 出生地 (都・道・府・県・不明).

Table with 2 columns: 記載日現在の年齢, 推定発症年齢, 貴施設初診時年齢. Each row has fields for ()歳 ()カ月.

診断した医療機関 1 貴院 2 他院 (医療・療育機関名: _____)

診断 1 レット症候群 2 レット症候群の疑い

【複】 診断の根拠 1 DSM-IV (R) 2 ICD-10 3 Rett syndrome diagnostic criteria (1985)
4 Rett syndrome diagnostic criteria (1988) 5 Rett syndrome diagnostic criteria (2002)
6 その他 () 9 不明

I 初診時に認められた症状

Table with 2 columns: 症状 (e.g., 運動発達遅滞, ロコモーションの異常) and 回答 (0 無, 1 有, 9 不明). Includes sub-questions for various symptoms like 頸定, 寝返り, 座位, etc.

II 家族歴

Table with 2 columns: 家族結核 (0 無, 1 有) and 疾患 (罹患者の患者との続柄). Includes options for Rett syndrome, autism, and other mental retardation.

* 血族結核、家族歴は、問診で知り得た範囲内で結構です。可能であれば、三等親までは調べてください。

III 母親の本児妊娠について

1 異常	0 無	1 有 (内容)	9 不明
------	-----	-----------	------

IV 出生歴

1 異常	0 無	1 有 (内容)	9 不明
2 出生時の体格	体重 () g	身長 () cm	頭囲 () cm

V 既往歴

1 疾患名 (罹患年齢)	0 無	1 有 ()	9 不明
2 外傷 (部位と受傷年齢)	0 無	1 有 ()	9 不明
3 骨折 (部位と年齢)	0 無	1 有 ()	9 不明
4 手術 (内容と年齢)	0 無	1 有 ()	9 不明
5 その他 (内容と年齢)	0 無	1 有 ()	9 不明

VI 現病の特徴的徴候の有無について * () はその発現年齢を記してください

a 身体所見

1 初診時身長	1 () cm	9 不明	
2 初診時体重	1 () kg	9 不明	
3 初診時頭囲	1 () cm	9 不明	
4 頭囲拡大の減速	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明
5 便秘	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明
6 足が冷たい	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明
7 初潮	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明
8 その他 (内容と年齢)	0 無	1 有 (内容 ; 歳 カ月)	

b 運動機能

1 安定	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
2 寝返り	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
3 座位	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
4 四つ這い移動	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
5 上記1の場合 異常パターン	0 無	1 有 (内容)	9 不明	
6 独歩	0 未	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
7 【複】上記1の場合 異常パターン	1 横揺れ歩行	2 つま先歩行	3 その他 () 9 不明	
8 手の合目的運動の消失	0 無	1 有 (歳 カ月から)	9 不明	
9 【複】常同運動	0 無	1 手にあり (歳 カ月から)	2 口にあり (歳 カ月から)	3 足にあり (歳 カ月から) 9 不明
10 他の不随意運動	0 無	1 有 (内容 :) (時期 : 歳 カ月から)	9 不明	
11 【複】筋緊張異常	0 無	1 低下 (歳 カ月から)	2 亢進 (歳 カ月から)	3 ジストニア性 (歳 カ月から) 9 不明
12 脊柱異常 側弯	0 無	1 有 (内容) (歳 カ月)	9 不明	
13 脊柱異常 後弯	0 無	1 有 (内容) (歳 カ月)	9 不明	
14 運動の退行	0 無	1 有 (内容) (歳 カ月から)	9 不明	
15 その他	0 無	1 有 ()		

c 精神・情緒の発達及び異常

1 精神遅滞	0 無	1 有 (推定DQ/IQ : , 測定方法 :) (施行時年齢 : 歳 カ月)	9 不明							
2 有意語	0 無	1 単語 (語)	2 二語文 3 その他 9 不明							
3 【複】自閉傾向	0 無	1 おとなしい (歳 カ月から)	2 手がかからない (歳 カ月から)	3 視線が合わない (歳 カ月から)	4 多動 (歳 カ月から)	5 その他 (歳 カ月から) 9 不明				
4 【複】情緒異常	0 無	1 奇声 (歳 カ月から)	2 興奮 (歳 カ月から)	3 自傷 (歳 カ月から)	4 固執 (歳 カ月から)	5 ケラケラ笑う (歳 カ月から)	6 泣く (歳 カ月から)	7 鬱状態 (歳 カ月から)	8 見つめる (歳 カ月から)	9 不明

5 精神機能の退行	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 ()

d けいれん性疾患、呼吸異常

1 有熱時けいれん	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 てんかん	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 【複】呼吸異常	0 無 1 過呼吸 (歳 カ月から) 2 息づめ (歳 カ月から) 3 呑気 (歳 カ月から) 4 他 (内容 ; 歳 カ月から) 9 不明
4 その他	0 無 1 有 ()

e 睡眠異常

1 睡眠覚醒リズム障害	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 日中の睡眠過多	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 夜間覚醒	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
4 夜泣き	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
5 夜驚	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 (内容 ; 歳 カ月) 9 不明

f 歯科・口腔の問題

1 歯ぎしり	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 咬合不全	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 嘔心、飲み込みの異常	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
4 その他	0 無 1 有 ()

VII 検査

1 頭部MRI/CT異常	0 無 1 有 (所見) 9 不明
2 染色体検査	0 未検査 1 G-band 2 高精度分染法 3 FISH 4 その他 ()
3 検査した場合 染色体所見	0 異常なし 1 所見あり (具体的に)
4 MECP2遺伝子検査	0 未検査 1 有 (検査実施施設名)
5 検査した場合 MECP2遺伝子異常	0 無 1 有 (結果) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

VIII 治療・療育 (使用薬剤等を記載してください)

1 抗てんかん薬	0 無 1 有 (薬剤名:) 9 不明
2 他の内服薬	0 無 1 有 (薬剤名:) 9 不明
3 胃ろう	0 無 1 有 (造設年齢: 歳 カ月) 9 不明
4 創傷手術	0 無 1 有 (手術年齢: 歳 カ月) 9 不明
5 理学療法 (PT)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
6 作業療法 (OT)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
7 言語療法 (ST)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
8 心理指導	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
9 音楽療法	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
10 水泳	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
11 その他	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明

IX 医療費

1 【複】公費負担	0 無 1 精神障害者自立支援 2 小児慢性特定疾患 3 心身障害者医療費助成制度 4 療育手帳 5 身障者手帳 6 生活保護 7 その他 () 9 不明
2 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

X 福祉関連

1 通所	0 無 1 療育センター 2 その他 () 9 不明
2 在宅介護支援	0 無 1 有 (内容) 9 不明
3 入所	0 無 1 重症心身障害者・児施設 2 その他 () 9 不明
4 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

XI その他

1 受診状況（最近1年間）	1 主に通院 2 主に入院 3 通院と入院 4 転院（転院先： 9 不明
2 現在の状況	1 独歩 2 車いす 3 寝たきり 4 死亡（死亡時期：平成__年__月__日；死因：____；剖検：1 施行 2 未施行） 5 その他（ 9 不明
3 最終受診日	平成 年 月 日

以下、当研究班への要望や患者様でお困りの点など、ご自由にご記入ください。

この二次調査票について、ご記入いただいた先生へ直接ご連絡差し上げることがあります。この点をご了承いただき、ご連絡方法をご指示ください。（電話番号、E-MAILアドレスが1ページと同じであれば、ご記入の必要はありません。）

- 1 連絡を受けても良い
- 電話（電話番号： _____）
- E-MAIL（アドレス： _____）
- ファックス（ファックス番号： _____）
- その他（通信方法： _____）
- ご都合の良いお時間などがございましたら、以下にお知らせください。
- （ _____ ）
- 2 連絡を受けたくない

ご協力ありがとうございました。

(資料2) レット症候群全国調査 二次調査結果

レット症候群およびその疑い例 (男女)

	対象機関数		調査機関数		回収機関数		報告患者数	推計患者数	標準誤差	95%信頼区間	
	N	n ₀	抽出率 (%)	n	回収率 (%)	下限				上限	
99床以下	987	45	4.6%	13	28.9%	1	76	72	0	218	
100-199床	552	53	9.6%	31	58.5%	4	71	68	0	205	
200-299床	311	61	19.6%	37	60.7%	3	25	17	0	59	
300-399床	289	112	38.8%	80	71.4%	6	22	7	7	36	
400-499床	143	113	79.0%	78	69.0%	20	37	8	22	51	
500床以上	171	171	100.0%	134	78.4%	55	70	7	56	84	
大学病院	128	128	100.0%	91	71.1%	111	156	33	91	221	
特別層	337	337	100.0%	213	63.2%	350	554	52	452	655	
計	2918	1020	35.0%	677	66.4%	550	1011	119	778	1244	

層別の推計患者数、標準偏差、信頼区間は参考値である。

分担研究報告

分担研究報告書

レット症候群の全国疫学調査

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長
野村 芳子 瀬川小児神経学クリニック 副院長
松石豊次郎 久留米大学医学部小児科学 教授
研究協力者 立森 久照 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神保健計画研究部室長
高森 一乗 日本大学歯学部小児歯科学講座 講師

研究要旨

疫学班（「特定疾患の疫学に関する研究」班（研究代表者：永井正規（埼玉医科大学公衆衛生学））との共同研究により、全国の医療・療育機関に対して、アンケート調査を行った。その結果、RTT患者数は1011人と推定され、有病率は女児の0.009%であった。さらに、患者実態調査のために二次調査を行なった。2010年にRettsSearch Consortiumが提唱したレット症候群の診断基準を参考に本邦の診断基準および診断手引きを作成中である。

A. 研究目的

レット症候群（RTT）は乳児期からの姿勢・協調運動異常、常同運動、ジストニアなどの運動症状、知的発達障害、自閉性行動を特徴とし、心電図異常や側彎症など多臓器にわたる疾患である。広範な領域にわたる医療の必要性があるにもかかわらず、これまでに全国的な疫学調査はなかった。本研究では、全国の小児科を標榜する医療・療育機関を対象にアンケート調査を行い、本邦における患者数、有病率（20歳以下の女性における有病率（以下、推定有病率））を明らかにするのみならず、診断、受診状況、療育環境などRTT患者の実態を解明する。

B. 研究方法

疫学班（「特定疾患の疫学に関する研究」班（研究代表者：永井正規（埼玉医科大学公衆衛生学））との共同研究により、全国の医療・療育機関へRTT患者のアンケート調査を行った。全国の小児科を有する全病院に大学医学部付属病院とレット症候群の患者が集中すると考える施設を加えた母集団（2,918施設）から層化無作為抽出された1,020施設を対象に郵送による質問紙調査を行い、過去1年間（2008年11月より2009年10月）に診療したRTT患者およびRTT疑い例の有無と患者数を質問した。さらに、回収した結果から個々の患者の実態把握のための二次調査を行った（資料1）。

（倫理面への配慮）

疫学調査および臨床研究にあたって、当該研究機関の倫理問題検討委員会の承認を得た後に行った。

C. 研究結果

一次調査：対象 1,020 施設からの有効回答は 677 施設（66.4%）で、RTT の報告患者数は計 550 名であった。この数値から求められる全国の RTT の推計患者数は 1011 人（95%信頼区間：778 から 1244 人）であった。これは 20 歳までの女性（1120 万人（総務省統計局））の 0.009%にあたる。また、患者分布の地域差があることが分かった。

二次調査：一次調査の結果を受けて、対象 550 名について二次アンケート調査を各施設を通して行なった。その結果、263 名の回答を得て、分析中である。

D. 考察

これまで、我が国におけるレット症候群（RTT）の疫学調査は行われたことがない。今回の調査によって初めて、RTTの暫定有病率が女児の0.009%であることが明らかになった。この数値は欧米諸国（0.01～0.015%）と比べて幾分低く、その原因について、今後二次調査の解析で明らかにする。一次調査の結果から患者分布の地域差があることが分かった。その一因として、RTTの診断の難しさが基盤にあると考えられる。これまでのRTTの診断基準は欧米諸国を中心に作成され、その神経学的徴候の難解な表現や臨床所見の取り方の特殊性などにより、十分普及されていなかった。そこで、一般小児科医にも理解しやすい本邦独自の診断基準を新たに作成する必要がある。現在、診断基準および診断

の手引きを作成中である。

さらに、本邦における本症の認知度が低く、正しく診断がなされていない可能性も否定できない。そのため啓蒙も必要である。

E. 結論

本研究において、本邦で初めてレット症候群の全国疫学調査が始まった。一次調査において、患者総数1011名、有病率0.009%が得られた。また、患者分布の地域差が大きいことが分かった。レット症候群の診断基準の普及と診断の標準化が必要である。臨床経過などの詳細な二次調査を通じて、診断基準の

作成を行う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

MECP2遺伝子変異の生物学的解析

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長
研究協力者 工藤 伸一 北海道立衛生研究所微生物部 部長

研究要旨

レット症候群の原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2 (MECP2) のDNA結合領域 (MBD) の点変異と症状の重症度について、繊維芽細胞を用いて解析した。その結果、MECP2のMBD領域の点変異によるヘテロクロマチンの異常と症状の重症度の相関性を明らかにした。また、これらの細胞の100%導入株を作製した。今後、発現解析を進め、軽症化をもたらす分子の同定を行う。

A. 研究目的

レット症候群の原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2 (MECP2) は、DNA結合領域 (MBD) と転写抑制領域 (TRD) の二つの機能領域がある。このうち、MBDには点変異が多くみつき、症状との関連が議論されている。また、この領域のアミノ酸置換によりDNA結合能が著しく損なわれることが報告されている。そこで、MBDの点変異による発現分子機構を解明し、軽症化をもたらす分子の同定とそれを用いた治療法の開発を行う。

B. 研究方法

MECP2のMBDの変異遺伝子7種類についてGFPとの融合タンパク発現ベクターを作成し、マウス繊維芽細胞に導入する。導入した細胞において、(1) 遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチンへの集積性とその構造への影響を観察し、変異がもたらすRTT患者の症状の重症度との関連性を検討した。(2) 発現パターンの違いについて、DNAチップを用いて網羅的に調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では、確立された培養細胞を用いた実験であり、遺伝子組換えにおいては国立精神・神経医療研究センター組換えDNA実験安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

MECP2のMBD領域に変異を作製し、発現ベクターを構築し、マウス繊維芽細胞に導入した。(1) これら遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチンへの集積性とその構造への影響を観察した結果、変異によるヘテロクロマチンの集積性と症状の重症

度との間に関連性が存在することを見出した。現在、100%導入細胞を確立し、(2) ゲノムDNAへの結合能、転写活性化能、転写に与える影響についてDNAチップによる発現解析およびクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を進めている。

D. 考察

MBD領域の遺伝子変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、影響の度合いと症状の重症度に相関があることを見出した。このことは、MBD領域の遺伝子変異がMECP2の多数の標的遺伝子の動態に影響を及ぼしていることを示唆している。解析を進め、軽症化に特有の遺伝子発現パターンを見つけ出すことが期待できる。

E. 結論

MECP2のMBD領域の点変異によるヘテロクロマチンの異常と症状の重症度との相関を明らかにした。今後、これらの発現解析を進めて、軽症化に関わる分子の同定を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itoh M, Takizawa Y, Hanai S, Okazaki S, Miyata R, Shu H, Inoue T, Akashi T, Goto Y, Hayashi M. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. *Differentiation* 2010; 80:118-122.
2. Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K,

- Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21(3):588-596.
3. Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal development of neurons in focal cortical dysplasia: neuronal mis-maturation from an immunohistochemical consideration. *Seizure* 2010; 19: 274-279.
4. Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology*. 2011;31:38-41.
2. 学会発表
1. Itoh M. Synaptic dysfunction of Rett syndrome; delayed synaptic maturation is the first step of cortical dysfunction. The 2nd European Rett syndrome Symposium. Edinburgh, UK, 7-10, October, 2010.
2. Saito T, Okazaki S, Inoue T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical Layer-formation of Human Developing brains and lissencephalies: Consideration of layer-specific marker expression. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.
3. Itoh M, Okazaki S, Kuki I, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. *Aristaless*-related homeobox (*ARX*) gene null-mutation exhibits abnormal distribution of GABAergic interneurons: immunohistochemical study of human X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.
4. Itoh M, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Akashi T, Hayashi M and Goto Y. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human *ARX*-null mutation: consideration of pancreas differentiation. The 12th European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic, 24-28, April, 2010.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

レット症候群モデルマウスの無呼吸頻度の日内変動とモノアミン神経伝達

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長
研究協力者 白川 哲夫 日本大学歯学部小児歯科学講座 教授

研究要旨

MeCP2 が欠損している雄ノックアウトマウス (*Mecp2*^{+/y}) では、生後4週頃から Rett 症候群に類似した神経症状や呼吸異常が現れ、時間の経過とともに重症化した後、通常10週以内に死亡する。MeCP2 の欠損が自律神経系ならびに呼吸系にどのような病的変化を惹起しているのかについて明らかにするため、*Mecp2*^{+/y} の自発行動量を長期連続測定するとともに、全身型プレチスモグラフを用いて無拘束下で呼吸を24時間連続測定し、得られたデータを野生型雄マウス (wild) と比較した。また延髄の呼吸中枢における小胞膜モノアミントランスポーター2 (VMAT2) 発現の免疫組織学的検討を行い、呼吸異常との関連性について調べた。その結果、MeCP2 欠損はマウスの自発行動および呼吸頻度のサーカディアンリズムには影響しないが、*Mecp2*^{+/y} では生後7週において無呼吸回数の著明な増加がみられ、明暗条件下では明期に発生頻度が高いことが明らかになった。*Mecp2*^{+/y} では wild に比べ生後8週において呼吸中枢での VMAT2 陽性 puncta 数の著しい減少がみられたことから、無呼吸回数の増加について、呼吸中枢におけるモノアミン作動性シナプスの異常が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究から、*Mecp2*^{+/y} では生後5週以降に無呼吸発作の頻度が著しく増加し、この無呼吸発作の重症化が *Mecp2*^{+/y} の寿命に直接関連していることが示されている。レット症候群患者では健常者に比べ突然死の頻度が高いことが報告されており、*Mecp2*^{+/y} のような急激な呼吸機能の悪化は認められないものの、呼吸調節あるいは自律神経系の何らかの異常が突然死に関連している可能性が示唆されている。呼吸パターンの異常は多くの場合、過呼吸・無呼吸を断続的に繰り返すものが多いと言われているが、これらの呼吸異常は睡眠時にはほとんど出現しないとされており、日中、特に精神緊張時に顕著になることが報告されている。現在のところ、*Mecp2*^{+/y} について呼吸動態の24時間変動に関する報告はまだなく、行動や呼吸のサーカディアンリズムが正常に維持されているかどうかについても詳細な検討は行われていない。

そこで今回、MeCP2 の欠損が自律神経系ならびに呼吸調節系にどのような病的変化を惹起しているのかを明らかにすることを目的として *Mecp2*^{+/y} について研究を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および飼育条件

Mecp2 ヘテロ欠損雌マウス (B6;129P2-*Mecp2*^{tm1Bird/J}, STOCK# 003890: Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) ならびに C57BL/6J 野生型雄マウス (オリエンタル酵母工業, 東京) を購入後、本学動物実験施設にて飼育および交配を行い *Mecp2*^{+/y} を得た。コントロールとして、C57BL/6J 雄マウス (wild) を用いた。飼育環境は明期 7:00~19:00, 暗期 19:00~7:00, 室温 24 ± 1°C, 湿度 50 ± 5% とした。飼育ケージ内の照度は、蓋を外した状態でのケージ床部での測定で 40~50 lux であった。出産後、飼育ケージ内で母親に授乳させ、生後3週で母仔を分離したのち自発行動量を測定した。

2. 行動量測定

Mecp2^{+/y} と wild を、自発運動センサー (NS-AS01; (株)ニューロサイエンス, 東京) を備えた行動量測定用ユニットに一匹ずつ入れ、小動物用自発行動計測システム (ClockLab; Actimetrics Inc., Evanston, USA) を用いて行動量を記録した。*Mecp2*^{+/y} と wild について、7:00~19:00 を明期とする明暗条件 (LD, 19:00~7:00: dark, 7:00~19:00: light) 下で約3週間行動リズムを計測したのち、恒暗条件 (DD) にして行動リズムの計測を継続しフリーランニングリズムを調べた。