

201128086A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

日本人脆弱 X 症候群
および関連疾患の診断・治療推進の研究

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 難波栄二

平成 24 年 (2012) 5 月

目次

I. 総括研究報告

日本人脆弱 X 症候群および関連疾患の診断・治療推進の研究	1
難波栄二	
（資料 1）班員名簿	5
（資料 2）国際シンポジウム	6

II. 分担研究報告

1. 脆弱 X 症候群のエピゲノムに関する研究	15
有波 忠雄	
2. 脆弱 X 症候群に対する既存の薬剤による pharmacotherapy	18
杉江 秀夫	
3. 精神遅滞バイオリソースでの検討、遺伝ガイドライン	21
後藤 雄一	
4. 日本人の広汎性発達障害における脆弱 X 症候群	23
佐々木 司	
5. 鳥取県の脆弱 X 症候群およびその関連疾患についての研究	26
大野 耕策	
6. FXTAS とパーキンソン病に関する研究	29
中島 健二	
7. 日本人脆弱 X 症候群および関連疾患の診断・治療推進の研究	33
石塚 文平	
8. 日本人脆弱 X 症候群および関連疾患の診断・治療推進の研究	35
松浦 徹	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	43
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

日本人脆弱X症候群および関連疾患の診断・治療推進の研究

研究代表者 難波 栄二 生命機能研究支援センター・教授

研究要旨

脆弱X症候群は知的障害の原因としては重要であり、近年治療法の開発が進んでおり、近い将来実用化される可能性が高まっている。日本人での本症の実態調査を進め、治療研究を推進する体制を構築することが緊要の課題となっている。本研究は、昨年度からスタートしたが、本年度は以下の研究が行われた。1) 小児神経学会、日本児童青年医学会、日本小児精神神経学会、および保健所の保健師に対する大規模な実態調査研究のまとめを行った。その結果、脆弱X症候群の患者は非常に少なく、小児神経学会の支援なども得て遺伝子診断などの普及し患者の診断を普及させることが重要と考えられた（難波、佐々木）。2) エピゲノム治療戦略を検討した（有波）。3) 社会生活に適応することを目指しpharmacotherapyを検討した（杉江）。4) 「精神遅滞バイオリソース」事業において遺伝子検査を行った（後藤）。5) 自閉症患者での検討を行った（佐々木）。6) mTORシグナルからのアプローチを検討した（大野）。6) FXTASとパーキンソン病との関係を検討した（中島）。7) 日本人において早発卵巣不全とCGGリピートの関係を検討した。8) 脆弱X症候群とも関連するSCA36の遺伝子変異を検討した（松浦）。

今後、脆弱X症候群の治療を進めるために、さらなる研究が必要となる。

A. 研究目的

平成21年度は「日本人脆弱X症候群の実態調査研究」（厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）の研究では、本症の保因者で発症するFragile X-associated Tremor Ataxia Syndrome (FXTAS)の日本で初めての患者を発見することができたが、本症の診断が不十分で

さらに遺伝子診断を充実させてゆくことが必要であることが結論づけられた。そこで、パンフレットを作成しシンポジウムを行い、患者さんやその家族の検体を収集できる体制を整えた。このように、さらに多くの患者を把握し、臨床治療研究を推進するための体制を作ることが改めて重要な課題として浮かび上がった。

そこで、平成22年度より本研究班においてさらに研究を推進している。

本年度は、1) 小児神経学会、日本児童青年医学会、日本小児精神神経学会、および保健所の保健師に対する大規模な実態調査研究のまとめを行った。(難波、佐々木)。2) エピゲノム治療戦略を検討した(有波)。3) 社会生活に適応することを目指しpharmacotherapyを検討した(杉江)。4) 「精神遅滞バイオリソース」事業において遺伝子検査を行った(後藤)。5) 自閉症患者での検討を行った(佐々木)。6) mTDRシグナルからのアプローチを検討した(大野)。6) FXTASとパーキンソン病との関係を検討した(中島)。7) 日本人において早発卵巣不全とCAGリピートの関係を検討した。8) 脆弱X症候群とも関連するSCA36の遺伝子変異を検討した(松浦)。

ここでは、1)を中心に記載する。2)から8)までの内容の詳細は、各分担研究報告に記載されている。

B. 研究方法と分担研究内容

1. 実態調査と遺伝子診断

本年は、小児神経学会小児神経専門医 1,022名、日本児童青年精神医学会および日本小児精神神経学会の医師会員 2451名、さらに全国の保健所 653

施設に所属する保健師に対するアンケート調査をまとめた。また、遺伝子診断を進めた。

(倫理面への配慮)

本研究は、鳥取大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認ならびに関係機関の倫理審査委員会の承認を得ておこなった。さらに、検体を依頼した場合に迅速に倫理的な対応ができるように、ホームページを充実させている。

C. 実態調査と遺伝子診断の研究結果

小児神経学会小児神経専門医1,022人中287名(28.1%)の回答を得た。本回答の中で脆弱X症候群の診断のついた例をもつ回答は、わずか7件(13例)であった。また、22名(7.6%)からは本研究に協力したくないとの回答を得た。日本児童青年精神医学会および日本小児精神神経学会の調査では、475名(26%)と270名(44%)から有効回答が得られた。このうち本症の検査をした事がある医師は、それぞれ44名(9.5%)と62名(23%)であった。有効回答を行った医師が現在担当している広汎性発達障害当事者はそれぞれ、36,839名および15,645名であり、このうち脆弱X症候群の検査は各244例(0.66%)と127例(0.81%)とわずかであった。検査で診断が確定した人数は、各々31名、16名であった。

検査方法では、染色体検査が各々8.8%、22.2%に対して、遺伝子検査は1%と6%にしか過ぎなかった。保健所保健師に対する調査では、309施設(回収率47.3%)から391通の回答を得た。脆弱X症候群という病気の名前を聞いたことがある保健師は391人中47人(12.0%)にとどまった。さらに、どのような疾患か知っている、と回答した保健師は34人(9%)とさらに少なく、実際に脆弱X症候群と診断された子どもと関わった保健師は6人(患者数は10人)のみであった。

遺伝子診断は、合計226例(うち精神遅滞バイオソースから137例)の遺伝子検査が行われ、Full mutation 4名(4家系)、Premutation 3名の異常に加え、Intermediate 4名が新たに明らかになった。

D. 考察

我々は、日本人男性では1万人に1人程度の患者が存在することを明らかにしており、日本人では5,000名程度の患者がいることが推測される。しかし、今回の大規模なアンケート調査において、把握されている患者数が著しく少なく、鳥取県の調査でも捕捉率が低いことが明らかとなった。これは、大規模調査のみならず東京大学こころの発達診療部においても、広汎性発達障害において検査がほとんど行われていない実態が明らかになっており、アンケート調査からは保健師のみならず医師の認知度が低いことが大きな問題であった。今後、今回作られたスコア化された臨床的スクリーニングの方法などを用いて、検査対象を広げることが重要である。本研究により、4家系の脆弱X症候群が明らかになり、今までに42例の患者さんが把握できた。さらに新しい患者さんの発掘とともに、治療研

究のための二次調査を進めてゆく。忙しい医師に対して二次調査の協力が得られにくい状況があり、専門の研究者などの派遣を今後考えてゆく必要がある。1例ではあるが、リスペリドンで症状が改善した例がある。外国で治験されているmGluR5阻害剤などが検討できる体制を早急につくりたい。

E. 結論

1. 小児神経学会、日本児童青年医学会、日本小児精神神経学会、および保健所の保健師に対する大規模な実態調査研究を行った。
2. 実態調査では脆弱X症候群の患者は非常に少なく、小児神経学会の支援なども得て遺伝子診断などの普及し患者の診断を普及させることが重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

難波 栄二 脆弱X症候群の分子機構と治療：医学のあゆみ 精神発達遅滞・自閉症の分子医学

Vol.239 No.6、633-638、2011

2. 学会発表

1. 足立香織、藤井裕士、大野耕策、難波栄二. 日本人脆弱X症候群の実態調査の重要性. 第52回日本小児神経学会総会 2010年5月20日-22日福岡市

2. Eiji Nanba, Kaori Adachi, Kazuhiro Ishii, Yuji Nakayama, Yoshiyasu Kohno, Mitsue Yano, Chikako Sato, Tadao Arinami, Hideo Sugie, Yuichi Goto, Tsukasa Sasaki, Kosaku Ohno, Aya Narita, Yuji Fujii, Kenichi kashiwabara, Yasuo Hritani, Hiromitsu Watanabe, Fumitoku Segawa, Ichiro Nozaki. Japanese Cases of Fragile-X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS). The National Fragile X Foundation 12th International Fragile X Conference At-a-Glance AGENDA. July 21-25, 2010. Detroit, USA.

日本人脆弱X症候群および関連疾患の診断・治療推進の研究班


区分	氏名	所属等	職名
研究代表者	難波 栄二	鳥取大学 生命機能研究支援センター 遺伝子探索分野	教授
研究分担者	有波 忠雄	筑波大学 大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 遺伝医学	教授
	杉江 秀夫	自治医科大学 小児科学	教授
	後藤 雄一	(独) 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部	部長
	佐々木 司	東京大学 大学院教育学研究科 体教育学コース 健康教育学分野	教授
	大野 耕策	鳥取大学 医学部 医学科 脳神経医科学講座 脳神経小児科学分野	教授
	中島 健二	鳥取大学 医学部 医学科 脳神経医科学講座 脳神経内科学分野	教授
	石塚 文平	聖マリアンナ医科大学 産婦人科学	教授
	松浦 徹	岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 脳神経内科学	准教授
研究協力者	石井 一弘	筑波大学 大学院人間総合科学研究科 臨床医学系神経内科	准教授
	福田冬季子	自治医科大学 小児科学	講師
	杉江 陽子	浜松医科大学 小児科	臨床教授
	長嶋 雅子	自治医科大学 小児科学	助教
	金生由紀子	東京大学 医学部附属病院	特任准教授
	島田 隆史	東京大学 大学院医学系研究科	大学院生
	戸川 雅美	鳥取大学 医学部 医学科 脳神経医科学講座 脳神経小児科学分野	助教
	河野 義恭	北九州市立総合療育センター	副所長
	矢野 光江	北九州市立総合療育センター	臨床検査技師
	佐藤 親子	北九州市立総合療育センター	臨床検査技師
	中山 祐二	鳥取大学 生命機能研究支援センター 遺伝子探索分野	助教
	足立 香織	鳥取大学 生命機能研究支援センター 遺伝子探索分野	助教

資料 2

International Symposium "Fragile X, Autism and Intellectual Disabilities"

公開国際シンポジウム「脆弱 X 症候群、自閉症、知的障害の最前線」

2012 年 2 月 10 日（金）、東京医科歯科大学 M&D タワー 2 階 鈴木章夫記念講堂



International Symposium "Fragile X, Autism and Intellectual Disabilities"

公開国際シンポジウム「脆弱 X 症候群、自閉症、知的障害の最前線」

14:00-14:40 Lecture 1

Molecular mechanisms and experimental therapeutics of novel cognitive disorders.
 新規知的障害症候群の分子病的解明と治療開発
 Hiroki Okazawa
 (Professor and Chairman, Department of Neuropathology, Tokyo Medical and Dental University)
 岡澤 均 (東京医科歯科大学 神経病理学分野)

14:40-15:40 Lecture 2

Molecular pathways of fragile X premutation disorders
 脆弱 X 症候群の保因者における分子メカニズムの解明
 Paul J. Hagerman
 (Professor, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California Davis, School of Medicine)

15:40-15:50 Break time

15:50-16:50 Lecture 3

Advances in targeted treatments for fragile X syndrome
 脆弱 X 症候群の治療における最前線
 Paul J. Hagerman
 (Medical Director of the M.I.N.D. Institute, Endowed Chair in Fragile X Research, UC Davis Health System)

16:50-17:30 Lecture 4

The study of diagnosis and treatment for fragile X syndrome and related disorders in Japan.
 日本における脆弱 X 症候群および関連疾患の研究
 Fijii Nambe
 (Director and Professor, Research Center for Bioscience and Technology, Tottori University)
 南波 栄二 (鳥取大学 生命科学研究所支援センター 遺伝子探索分野)

Date: 14:00-18:00, February 10, Friday, 2012.
 2012 年 2 月 10 日 (金) 14 時 00 分 ~ 17 時 30 分

Venue: Tokyo Medical and Dental University,
 Akio Suzuki Memorial Hall, M&D Tower 2nd Floor
 東京医科歯科大学 M&D タワー 2 階 鈴木章夫記念講堂

文京区文京区湯谷1-5-45
 湯谷駅 徒歩 10 分
 丸の内線 湯谷駅 徒歩 10 分
 丸の内線 湯谷駅 徒歩 10 分
 丸の内線 湯谷駅 徒歩 10 分

事前申し込み制 (当日参加も可) 参加費無料 (学術関係者以外も参加可能です。但し、講演は英語です。)

参加申し込み・お問い合わせ先: 鳥取大学 生命科学研究所支援センター 遺伝子探索分野
 TEL: 0859-38-6472 E-mail: idencoun@med.tottori-u.ac.jp
<http://fragile-x.med.tottori-u.ac.jp/index.html>

※日本小児神経学会の国際事務局 (JINS) と提携です

Organized by:
 Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology, Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology
 Health and Labour Sciences Research Grants (Research on Intractable Diseases) "The study of diagnosis and treatment for fragile X syndrome and related disorders in Japan"

Supported by: The Japanese Society of Child Neurology

共催:
 文部科学省・科学技術振興機構 (ナノ・マイクロ・ロボットの創成
 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業
 「日本人脆弱 X 症候群および関連疾患の診断・治療法」の研究課題

後援:
 日本小児神経学会

参加人数 : 63 名

Molecular Mechanisms and Experimental Therapeutics of Novel Cognitive Disorders

Hitoshi Okazawa

Professor, Neuropathology, Tokyo Medical and Dental University

We previously discovered a novel gene, polyglutamine tract-binding protein-1 (PQBP1) as a mediator of polyglutamine disease pathology (Waragai et al., *Hum Mol Genet* 1999; Okazawa et al., *Neuron* 2002). PQBP1 interacts with multiple polyglutamine disease proteins including ataxin-1 and huntingtin. PQBP1 possesses a unique C-terminal domain (CTD) and a WW domain (WWD) conserved beyond species (*C. elegans*, *Drosophila* and *Arabidopsis*). PQBP1 interacts with a component of U5 spliceosome, U5-15kD via CTD, and another RNA binding protein, WBP11/NpwBP/SIPP or C-terminal tail of RNA polymerase II via WWD.

European Consortium of X-linked Mental Retardation (MR) identified that PQBP1 is a causative gene for non-syndromic MR and syndromic MR including Renpenning syndrome, Golabi-Ito-Hall syndrome and Sutherland-Haas syndrome. Recent analyses revealed the patient frequency among population is comparable to Rett syndrome, indicating the clinical significance of PQBP1.

We have investigated PQBP1 via multiple approaches, and found interacting partner molecules of PQBP1 (Waragai et al., *BBRC* 2000; Okazawa et al., *Neuron* 2002), revealed an intrinsically unstructured nature of CTD (Takahashi et al., *BBA* 2009, 2010), and made various animal models. *Drosophila* mutant of PQBP1 showed a defect in learning acquisition, which is caused by reduced expression of NR1 subunit of NMDA receptor in projection neurons (Tamura et al., *J Neurosci.* 2010). Correspondingly, knock down mouse model of PQBP1 showed anxiety-related cognitive impairment and reduced expression of NR1 (Ito et al., *Hum Mol Genet* 2009). An HDAC inhibitor, PBA recovered these phenotypes in both models. Meanwhile, overexpression of PQBP1 cause delayed degeneration of spinal motoneurons in mouse (Okuda et al., *Hum Mol Genet* 2003) and lifespan shortening in *Drosophila*.

We recently generated conditional KO mice of PQBP1, and found cell cycle regulation of neural stem cells underlies the microcephaly. I would like to show a new mechanism underlying PQBP1-linked of microcephaly.

新規知的障害疾患群の分子病態と実験的治療

岡澤 均

東京医科歯科大学 神経病理学分野 教授

私たちはポリグルタミン病の病態分子としてポリグルタミン結合タンパク 1 (PQBP1) を発見し報告した (Waragai et al., Hum Mol Genet 1999; Okazawa et al., Neuron 2002). PQBP1 は Ataxin-1, Huntingtin を含む多種類のポリグルタミン病原因タンパク質と結合する. PQBP1 は種(C. elegans, Drosophila and Arabidopsis)を超えて保存される C 末端ドメイン(CTD) と WW ドメイン(WWD)を持ち、CTD を介して U5 スプライソゾーム構成因子, U5-15kD と、WWD を介して RNA 結合タンパク, WBP11/NpwBP/SIPP および RNA ポリメラーゼ II と結合する.

近年、European Consortium of X-linked Mental Retardation が PQBP1 を症候性および非症候性の X 染色体伴性知的障害の原因因子として同定し、前者には Renpenning syndrome, Golabi-Ito-Hall syndrome, Sutherland-Haan syndrome が含まれる. 最近の報告によれば、欧米では Rett syndrome に近い頻度があると言われており、PQBP1 の臨床的重要性が指摘されている.

私たちは種々の手法を用いて PQBP1 機能解析と結合分子探索を行い(Waragai et al., BBRC 2000; Okazawa et al., Neuron 2002), CTD が天然変性タンパク質構造であることを示し(Takahashi et al., BBA 2009, 2010), さらに様々な動物モデルを作成してきた. ショウジョウバエ PQBP1 変異体は学習障害を示し、Drosophila NMDA 受容体の NR1 サブユニットが投射ニューロンで減少することが原因であることも示した (Tamura et al., J Neurosci. 2010). 同様に PQBP1 ノックダウンマウスでは不安関連認知障害を示した(Ito et al., Hum Mol Genet 2009). HDAC 阻害剤, PBA はこれらの症状をショウジョウバエ・マウスともに改善した. 一方、PQBP1 過剰発現は脊髄運動ニューロンの変性を示し (Okuda et al., Hum Mol Genet 2003)ショウジョウバエでも寿命の短縮を認めた.

私たちは PQBP1-cKO マウスを作成し、細胞周期異常を伴う小頭症を示すことを見いだしており、この点についても紹介したい.

Molecular advances in fragile X premutation disorders

Paul J Hagerman

Professor, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California Davis, School of Medicine

The fragile X (*FMR1*) gene is responsible for the leading inherited form of mental impairment (fragile X syndrome) and autism. This neurodevelopmental disorder is caused by large expansions (>200; full mutation) of a three-nucleotide (CGG) repeat in the gene. Remarkably, smaller repeat expansions (55 to 200 repeats; premutation) of the *FMR1* gene cause an entirely separate set of disorders: fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS), an adult-onset neurodegenerative disorder with features of Parkinsonism and dementia; fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI), with onset of menopausal symptoms before age forty; and neurodevelopmental problems that include behavioral and intellectual problems, which can also include autism and seizures. Thus, the same gene is responsible for several different conditions, involving different groups of individuals and in different age ranges.

The pathogenic basis of the premutation-associated disorders is now believed to be the “toxicity” of the expanded CGG repeat in the *FMR1* mRNA. Thus, the mechanism underlying the premutation disorders, including FXTAS, is entirely distinct from the gene silencing and protein deficiency that causes fragile X syndrome. Although FXTAS is an adult-onset disorder, recent findings in animal models indicate that RNA toxicity is leading to neuronal dysfunction at or before birth, which could explain the developmental problems experienced by some children with the premutation. Evidence is also beginning to emerge as to how the CGG-repeat mRNA causes cellular dysfunction, and points to dysfunction of the nuclear proteins responsible for production of microRNAs.

脆弱 X 症候群保因者における分子メカニズムの研究の進展

Paul J Hagerman

Professor, Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of California Davis, School of Medicine

FMR1 遺伝子は、最も高頻度の家族性精神障害である脆弱 X 症候群および自閉症の責任遺伝子である。この精神発達障害は、*FMR1* 遺伝子の 3 塩基 (CGG) リピートの伸長 (200 リピート以上、完全変異 : full mutation) によって引き起こされる。驚くべきことに、比較的短いリピート伸長 (55~200 リピート、前変異 : premutation) が全く別種の疾患を引き起こす。それらの疾患には、パーキンソン病や認知症の特徴をもち、成人発症の神経変性疾患である脆弱 X 関連振戦/運動失調症候群 (FXTAS)、40 歳以前に更年期障害を発症する脆弱 X 関連原発性卵巣機能不全 (FXPOI)、さらには行動や情緒の不安定、自閉症やてんかんをも含めた神経発達障害などがある。つまり、同じ遺伝子が、異なる個体集団や年齢層といった種々の条件下において様々な疾患の原因となっているのである。

現在、これらの premutation 関連疾患の根本的病因は、*FMR1* mRNA 内の伸長した CGG リピートの“細胞毒性”と考えられている。脆弱 X 症候群は遺伝子の不活性化とそれによるタンパク質の欠損によって引き起こされることから、FXTAS を含む premutation 関連の疾患の発症メカニズムは、全く異なるものであるといえる。最近の知見では、FXTAS の動物モデルにおいて RNA による毒性が出生時または出生前の神経機能障害に関与していることが示されている。FXTAS は本来成人で発症することから、このような知見は premutation をもつ子どもに認められた発達障害を説明するために有用である。さらに、伸長した CGG リピートを含む mRNA がどのように細胞障害を引き起こすのか、あるいはそれらが microRNA の生産に関与する核タンパク質の機能不全にどのように関与するのか、研究が進められており、premutation 関連疾患の分子メカニズムの解明が期待される。

Targeted Treatments for Fragile X Syndrome, leading the way for autism

Randi Hagerman MD

MIND Institute, University of California Davis Medical Center

The phenotype of fragile X syndrome (FXS) is caused by the absence or deficiency of FMRP, an RNA binding protein that controls the translation of many messages important for synaptic plasticity throughout the lifespan. The absence of FMRP leads to up-regulation of numerous proteins including MMP9 and also over-activation of the mGluR5 pathway. Numerous targeted treatments have been tried in animal models of FXS and have reversed aspects of FXS. Currently several trials are underway in children and adults with FXS. These include minocycline which lowers MMP9 levels and down-regulates translation. Efficacy of minocycline has been demonstrated in open trials and the results of a controlled trial which was just completed will be presented. In addition a controlled trial of Arbaclofen, a GABA B agonist which lowers glutamate at the synapse, has been completed in children and adults with FXS with demonstrated efficacy for those with FXS and autism or social anxiety. Currently larger controlled trials are in progress in both FXS and in those with ASD. Two mGluR5 antagonists are currently being studied in FXS in controlled trials and there is evidence in the autism mouse model that these treatments will be helpful in autism without FXS. Lastly ganaxolone, a GABA A agonist is in a controlled crossover trial in FXS with evidence that this may also be helpful in autism. Although targeted treatments will change the long term prognosis of those with FXS and autism it is essential that optimal educational interventions take place in addition to medication trials to normalize synaptic connections and optimize cognitive and behavioral gains.

脆弱 X 症候群の標的治療が自閉症の標的治療を開拓する

Randi Hagerman MD

MIND Institute, University of California Davis Medical Center

脆弱 X 症候群 (FXS) は、RNA 結合タンパクである FMRP の欠如または不足によって起こる。FMRP は生涯を通じて、シナプス可塑性に重要な多くのメッセンジャーRNA のタンパク質への翻訳を制御している。FMRP の欠如により、MMP9 を含む多数のタンパク質が発現を亢進し、mGluR5 パスウェイが過剰に活性化される。これらの分子を標的として、現在までに、FXS の動物モデルを用いた多数の標的治療が試みられており、FXS の症状の改善が認められたため、近年では、いくつかの治験も小児と成人の FXS 患者で進められている。ミノサイクリンを含むこれらの治験では、MMP9 のタンパク質レベルが下がることが認められている。ミノサイクリンの有効性はオープン試験で既の実証されており、対照試験の結果と共に近く発表される予定である。また、シナプスでのグルタミン酸を低下させる GABA B アゴニストである Arbaclofen の対照試験が小児と成人の FXS で完了しており、FXS、自閉症、社会不安などに効果があることが実証されており、現在、FXS と自閉症スペクトラム障害の両方で、より大規模な対照試験が進められている。さらに、2 つの mGluR5 拮抗薬については、FXS 以外の自閉症に効果があることが自閉症マウスモデルで実証されており、FXS での対照試験が行われている段階である。GABA アゴニストである ganaxolone についても FXS 患者でのクロスオーバー試験が実施されており、自閉症改善に役立つ可能性が示唆されてきている。このような標的治療は患者のシナプスを正常化し、認知と行動を正常化するため、FXS と自閉症患者の長期予後を改善することが期待されるが、その一方で、最適な教育的介入が行われることもまた必要不可欠である。

The study of diagnosis and treatment for Fragile X syndrome and its related disorders in Japan

Eiji Nanba

Division of Functional Genomics, Research Center for Bioscience and Technology

We have been established a Japanese research group for fragile X syndrome (FXS) and its related disorders (FXTAS and POI) from 2010 supported by “research on measures for intractable diseases” of the ministry of Health Labour and Welfare in Japan. We collected the patient information from more than 1,700 special doctors of child neurology and psychiatry, and the 309 public health center. We analyzed the FMR1 CGG expansion from more than 200 patients with mental retardation and found 4 full mutations and 3 premutations. Finally, 42 and 5 patients with FXS and FXTAS were diagnosed respectively. We do not detected the expansion in 111 patients with Parkinson disease. One hundred twenty-eight consecutive Japanese patients with sporadic, nonsyndromic POI and 98 controls with normal menstruation were analyzed. Six alleles in the intermediate range and two in the premutation range were found in five and two patients with POI, respectively, but none were identified in normal controls. The prevalence of FMR1 premutation among Japanese POI patients was 1.56% (2 of 128). The prevalence of having >36 CGG repeats in the FMR1 gene was significantly higher in patients with POI than in controls, and age at the onset of amenorrhea was significantly lower in patients with >38 repeats. We also tried to construct the CGG expansion model using the mouse A9 by human chromosome technology. We only made the several cell lines now. The cells will be useful for elucidate the expansion mechanism in Fragile X syndrome. We want to discuss the frequency, approach to the patients with FXS. We should found more patients with FXS for the therapeutic trial in Japan

日本人における脆弱 X 症候群と関連疾患の診断と治療の方向について

難波 栄二

鳥取大学生命機能研究支援センター 教授

平成 21 年度～23 年度において、厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）において、脆弱 X 症候群とその関連疾患の研究を行った。今回のシンポジウムでは、その結果を中心にこれらの疾患に対する日本での治療の方向について検討する。関連学会（小児神経学会、日本児童青年精神医学会、日本小児精神神経学会）の合計 1,700 人以上の医師に対してアンケート調査を行った。また、全国の保健所にもアンケート調査を行った。また、200 人以上の知的障害児などの遺伝子検査を行った。しかし、把握できた脆弱 X 症候群は 42 人であった。日本では、5000 人程度の患者が予測されており、今後より多くの患者をどう探してゆくかが大きな問題となっている。脆弱 X 症候群関連振戦/失調症候群（FXTAS）の患者は 5 人診断することができた。日本人パーキンソン病 111 名を検討したが、FXTAS の患者を見つけることはできなかった。さらに、卵巣早期不全症（POI）について検討した。その結果、CGG 繰り返し数が 36 以上の患者が対象に比して多く、日本人の卵巣早期不全症に FMR1 の CGG 繰り返し配列が関連することが示された。現在、基礎的な研究として CGG 繰り返し配列が代を経るごとに伸長するメカニズムを解析するシステムについても検討している。また、予備的検討の段階であるが X 症候群患者の治療などや新たな治療法の可能性についても触れる予定である。

日本においては、さらに脆弱 X 症候群の診断を普及し治療研究を推進することが重要であり、そのためには多くの医療関係者の協力が必要となる。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

脆弱X症候群のエピゲノムに関する研究

研究分担者 有波 忠雄 筑波大学教授

研究要旨

脆弱X症候群のエピゲノム治療戦略の可能性を探るため、MeCP2 と結合してエピゲノムメカニズムに関わる分子である SMARCA2 について解析を進めた。株化された脆弱X症候群患者の細胞に *SMARCA2* をノックダウンして *FMR1* の発現を mRNA と FMRP で確かめた。その結果、*FMR1* の再発現と FMRP の非常に弱いながら発現が認められた。マウスに対する薬剤のスクリーニングによりメタンフェタミンが脳での *Smarca2* 遺伝子発現の低下をもたらすことが分かった。*Smarca2* ノックアウトマウスでは mGluR5 受容体シグナル伝達の低下を支持するデータが得られた。本研究結果はメタンフェタミンによる脆弱X症候群の治療の可能性を支持する基礎データと解釈でき、さらに検討する価値があると考えられた。

A. 研究目的

脆弱 X 症候群の分子病態は原因遺伝子 *FMR1* の CGG トリプレットリピートの伸長により CGG を含む領域から上流の CpG 島のメチル化によりヒストンのアセチル化などクロマチンの凝集が起こり RNA 転写が妨げられるため FMRP の合成が起これないことが出発点となる。

このエピジェネティック機構に関係する分子として、MeCP2 と SWI/SNF 複合体が知られており、特に SWI/SNF 複合体の中でも、*SMARCA2* 遺伝子がコードする Brm タンパクが遺伝子のメチル化と転写抑制を促進させている可能性に関する報告、すなわち、逆に Brm の発現を低下させると脆弱 X 症候群の患者の細胞において *FMR1* の発現回復が見られたと報告されている。しかし、この報告以降、追試研究で検証は行われておらず、またこの先行研究は *FMR1* の回復を mRNA レベルのみで調べており、発現が回復した *FMR1* が正常にタンパクを合成しているかどうかは示されていない。

本研究では、脆弱 X 症候群の患者由来の培養細胞において、*SMARCA2* の発現を抑制した際の *FMR1* の発現変化を mRNA レベル、タンパクレベルで確認することにより、エピジェネティック機構を利用した脆弱 X 症候群の治療の可能性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

9 種類の脆弱 X 症候群の患者末梢血から樹立した B リンパ芽球株化細胞を用い培養して、Real-time PCR と Western blotting で *SMARCA2* と *FMR1* の発現量、タンパク量を測定し、RNAi による *SMARCA2* の発現低下とそれによる *FMR1*, FMRP の発現の変化を調べた。また、マウスを用い、脳で *Smarca2* の発現を低下させる薬物をスクリーニングした。

もし *Smarca2* の発現量を低下させる方法が脆弱 X 症候群の治療法として有用である可能性があるならばその影響をより広く調べる必要がある。*Smarca2* の発現量が低下させた場合の特徴を調べるために、*Smarca2*

ノックアウトマウスの解析を行った。脆弱 X 症候群との関係、*Grm5* の発現量を調べた。また、mGluR5 のシグナル伝達に関わる分子のひとつとして *Homer1* の発現量に対する影響を調べた。さらに、*Smarca2* ノックアウトの行動特徴を解析した。

C. 研究結果

full mutation の細胞でも、細胞株によっては FMR1 を発現しており、メチル化が外れているものがあった。その中で FMR1 mRNA が発現していない細胞株を選び、RNAi により SMARCA2 を発現低下させたところ、FMR1 mRNA の発現が見られるようになった。Western blotting で、full mutation の細胞で FMR1 mRNA の発現が見られるようになった細胞で非常に発現量は低いものの FMRP の可能性のあるバンドが見られた。

脳で *Smarca2* の発現量に影響を与える薬物をスクリーニングしたところ、メタンフェタミンが有意に発現量を低下させることが分かった。また、*Smarca2* のノックアウトマウスでは海馬、中脳で有意に *Grm5* mRNA の発現量が低いことが分かった。さらに、*Homer1bc* の発現量の低下と *Homer1a* の発現量の上昇が見られた。

Smarca2 ノックアウトマウスの行動に関しては特に変化は見られなかったが、N 非競合的 NMDA 受容体阻害薬である MK-801 による prepulse inhibition の障害が有意に悪化した。

D. 考察

脆弱 X 症候群はエピジェネティックなメカニズムによる FMRP が発現しないことによる疾患であり、エピジェネティックな病態を

介して脆弱 X 症候群の治療法を探ることは脆弱 X 症候群に対する正面からの治療法と考えられる。本研究はその可能性を示したものである。本研究では *SMARCA2* の発現を低下させることにより FMRP の再発現の可能性を示した。さらに、メタンフェタミンが脳において *SMARCA2* の発現低下をもたらす可能性を示した。*SMARCA2* の発現低下の影響を知るために *Smarca2* ノックアウトの解析を行い、mGluR5 受容体をコードする *Grm5* 遺伝子が発現低下していること、mGluR5 受容体遺伝子のシグナル伝達の機構に関わる *Homer1* の発現が低下していることなどが明らかとなった。これらは、mGluR5 受容体シグナルの減弱を意味している。メタンフェタミンは脆弱 X 症候群の一部の症状に有効であることが報告されている。本研究はまだ非常に予備的なデータしか得られていないが、メタンフェタミンの脆弱 X 症候群に対する治療効果がエピジェネティックなメカニズムに加えて mGluR5 受容体シグナルを介しての面もあることを示している。一方、また、*SMARCA2* の発現低下によるもし FMRP の再発現が可能となったとしても CGG リピートの伸長をもたらす RNA-toxic-gain-of-function を考慮しなければならない。

E. 結論

メタンフェタミンの脆弱 X 症候群に対する治療メカニズムとして SMARCA2 (*Brm*) を介したエピジェネティクスが関与していることが示唆された。脆弱 X 症候群の治療選択肢の一つとしてメタンフェタミンやその他の *SMARCA2* の発現低下をもたらす薬剤も考えられた。

F. 研究発表 (論文発表)

1. Horiuchi Y, Iida S, Koga M, Ishiguro H, Iijima Y, Inada T, Watanabe Y, Someya T, Ujike H, Iwata N, Ozaki N, Kunugi H, Tochigi M, Itokawa M, Arai M, Niizato K, Iritani S, Kakita A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. Association of SNPs linked to increased expression of SLC1A1 with schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B(1):30-37, 2012.
2. Tanaka S, Syu A, Ishiguro H, Inada T, Horiuchi Y, Ishikawa M, Koga M, Noguchi E, Ozaki N, Someya T, Kakita

A, Takahashi H, Nawa H, Arinami T. DPP6 as a candidate gene for neuroleptic-induced tardive dyskinesia. *Pharmacogenomics J.* in press (2011 Aug 9. doi: 10.1038/tpj.2011.36. Epub ahead of print)

G. 知的所有権の取得状況 (特許取得、実用新案登録、その他)
なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

脆弱 X 症候群に対する既存の薬剤による pharmacotherapy
—症例報告—

研究分担者 杉江秀夫

自治医科大学小児科学 教授

研究要旨：

脆弱 X 症候群は精神遅滞を呈する疾患であるが、約半数に自閉症スペクトラムを合併する。また多動性、衝動行動、パニックなどは患児が社会生活に適応する際に問題となる。従って社会生活への適応の改善は、本症の児の成長発達にとって重要である。外来で経験した 1 例では、教育機関との連携とともに、一定の薬物療法の併用で社会適応が改善した。脆弱 X 症候群の pharmacotherapy について考察するとともに、報告をミニレビューした。なお日本では多くの薬剤に保険適応がないので、その点への配慮、および家族へのインフォームドコンセントは重要であり、合わせて、副作用のチェックも重要である。

A. 研究目的

脆弱 X 症候群の約半数に自閉症スペクトラム障害を合併し、また多動性、衝動性の併存も多い。さまざまな療育、環境の調整など、発達期の児の支援が行われているが、その症候の程度によっては薬物療法を併用することも考慮される。脆弱 X 症候群ではどのような薬物療法がされているかレビューするとともに、薬物療法について経験を報告する。

B. 研究方法

(1) 対症：

8 歳男児。学校、家庭での問題行動の相談で来院。既往歴では 3 歳の時に、言語発達遅滞、多動で某医受診し、療育及び、言語訓練を受けていた。やや大きい耳、腫れぼったい目、長い顔、斜視、時折、手を合わせて叩く常同行動が見られた。行動パターンでは衝動行動、奇声などがみられた。こだわり行動、視線の合いにくさ、乏しい表情があり、対話を試みるも不良であった。鑑別として脆弱 X 症候群が疑われたため、染色体検査（葉酸欠乏培地）を行ったところ、26%の X 染色体に脆弱部位がみられた。

学校では、他児への他害行動、衝動行動などがみられ、教員もその対応に苦慮していた。家庭ではある程度行動の制御は可能であったが、時にパニックとなり、両親もその対応に難渋していた。睡眠障害も見られ、入眠困難、中途覚醒が認められた。

(2) 評価方法

Maes の報告した 28 項目のチェックリストをもとに一部修正した脆弱 X 症候群のチェックリスト、薬物療法前後で ABC-J で評価を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では自治医科大学倫理委員会の承認を受けている。

C. 研究結果

当初メチルフェニデートを 18mg/日から投与したが、学校での給食摂取が減少したことから中止し、リスペリドンへ変更した。リスペリドン 0.5→1mg/日でやや食欲は増加したが、ABC-J で評価するとリスペリドン服薬前ではサブスケール I (興奮性) : 27、II (無気力) : 10、III (情動行動) : 2、IV (多動) : 31、V (不適切な言語) : 2 であったが、服用後 1 カ月で再検したところサブ