

201128093A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成24年（2012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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告	3
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	5
伊藤 雅之	
II. 分担研究報告	11
1. 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	13
伊藤 雅之	
2. 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	15
松石 豊次郎	
3. 遺伝子改変細胞及びマウスの作製と行動、機能解析	19
栗政 明弘	
4. インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析	21
堀家 慎一	
5. 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	23
白川 哲夫	
6. 非典型レット症候群の原因遺伝子 <i>CDKL5</i> の分子機能及び遺伝子変異による病態機序の解析	25
田中 輝幸	
7. レット症候群の臨床、病態に関する研究 - 特に診断基準について	27
野村 芳子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	33

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

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、レット症候群の病態を解明し、診断法と予防・治療法を確立するために、①レット症候群の臨床実態調査と生体試料の収集・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。全国疫学一次調査の結果、推計患者数は1011人（95%信頼区間：778から1244人）が得られ、患者分布の地域差があることが分かった。二次調査を通じて、本邦の実態と国際診断基準を検討し、診断手引きの作成中である。

基礎研究では、インプリンティング遺伝子の分子機構の解明を行ない、成果を得ることが出来た。さらに、*Mecp2*欠損マウスの呼吸障害の分子生理学的解明は、レット症候群患者の病態理解に重要な成果を得ることが出来た。また、新規に作製した*Mecp2*の発現制御マウスと*Cdk15*欠損マウスの解析は、詳細な治療実験が可能となり、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
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
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

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
青天目 信・国立精神・神経医療研究センター病院
医師
井手 秀平・東京都立東部療育センター 医長
高橋 知之・久留米大学高次脳疾患研究所 准教授
西 芳寛・久留米大学医学部生理学講座 講師
高森 一乗・日本大学歯学部小児歯科学講座 講師
野村 芳子・瀬川小児神経学クリニック 副院長
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の原因遺伝子として、メチル化CpG結合タンパク2（*MECP2*:Xq22）、cyclin-dependent kinase-like 5（*CDKL5*:Xp22）、forkhead box G1（*FOXG1*:14q13）が知られている。これまで、主に*MECP2*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手引きを作成し、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る。

これまで、RTTは診断と治療・療育は医師の経験による差があり、診断困難例が多かった。そこで、(1) 全国疫学調査を行い、実態把握による診断手引きを作成する（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）。(2) *Mecp2*発現制御マウスを作製し、発症と治療の臨界期を特定し、解析している（伊藤、栗政、井手）。*Mecp2*欠損マウスを用いた生理学的異常（呼吸、睡眠）の解明を行った（白川）。また、*Cdk15*の分子病態およびその欠損マウスの解析を行った（田中）。(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、2008 年 11 月より 2009 年 10 月の 1 年間に診療した 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なった。本年度はシンポジウムを開催し、患者家族・医療関係者・研究者間の交流をはかった。
- (2) RTT の生物マーカーの検索 (松石、高橋、西) : 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、*Mecp2* 欠損マウスでの組織 GRL 量を調べた。
- (3) *Mecp2* 欠損マウス iPS 細胞の作製 (松石、高橋、西) : *Mecp2* 欠損マウスの新生仔尾部より線維芽細胞を初代培養し、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) をレトロウイルスベクターにて導入後、5-10 日間培養し、iPS 細胞コロニーの形成を認めた。iPS 細胞クローンに対して、RT-PCR による 12 種類の未分化マーカーの発現、アルカリフォスファターゼ染色、SSEA1、TRA1-60、OCT3/4 による免疫組織染色を行なった。
- (4) 患者由来変異 *MECP2* によるヘテロクロマチン構造の解析 (伊藤、井手) : *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、マウス線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。
- (5) 染色体 15q11-q13 領域の核内配置に関する研究 (堀家) : 15q11-q13 領域上の 9 つの BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を蛍光ラベルした FISH プローブを作製し、解析に用いた。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 の核内配置を調べ

た。

- (6) *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。サザンブ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。
- (7) CDKL5 相互作用蛋白の同定と *Cdk15* 欠損マウスの作製と解析 (田中) : Two-Hybrid 法により CDKL5 に対する相互作用スクリーニングを行った。マウス ES 細胞相同組み換えにより、*Cdk15* 遺伝子の exon を loxP で挟んだ *Cdk15* flox マウスを作製し、CAG-Cre マウスとの交配により *Cdk15* 欠損マウスを作製した。*Cdk15* 欠損マウスの組織学的、電気生理学的、および行動学的解析を行った。
- (8) *Mecp2* 欠損マウスの呼吸運動の測定と薬物による無呼吸の改善 (白川) : 全身型プレチスモグラフを用いて、呼吸波形を 24 時間連続で測定・記録した。またセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬であるミルナシプランを生後 3 週から経口的に摂取させ、7 週齢で呼吸測定を行った。組織学的解析のため、灌流固定後、抗 VMAT2 抗体による免疫組織化学的解析を行った。自律神経調節に関与する dorsal motor nucleus of the vagus (DMV)、nucleus of the solitary tract (NST)、ventral respiratory group (VRG) で評価した。(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久留米大学、金沢大学、鳥取大学、東京大学、日本大学に設置されている組換え DNA 安全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。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。

2010 年に発表された国際診断基準と本邦の実

態を照合し、実情にあった診断手引きを作成中である。

レット症候群シンポジウムでは、患者家族を中心として約80名の参加者を集め、研究や医療の最前線を報告し、意見交換を行なった。

(2) RTTの生物マーカーの検索：27症例のRTT患者（女児）より早朝空腹時の採血を施行し、RTTでは血中GRLが低値であることをみつけた（図1）。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。

*Mecp2*欠損マウスの血漿および脳内グレリン濃度は対照に比して有意に低下していた。

(3) *Mecp2*欠損マウスiPS細胞の作製：未分化マーカー発現iPS細胞を4クローン得た。iPS細胞クローンはLIF存在下フィーダー細胞上で、embryonic bodiesを形成し、多分化能を有した。

(4) 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。

(5) *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領域の約10Mbで核内配置をDNA-FISHで解析し、GABA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を認めた。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。*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。

(6) *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。

(7) CDKL5 相互作用蛋白の同定と *Cdk15* 欠損マウスの作製と解析：CDKL5 N末端側キナーゼ領域で19個、C末端側で2個の相互作用蛋白候補を同定した。

また、ジーンターゲティングにより*cdk15*欠損マウスを得た。*Cdk15*欠損マウスでは、海馬神経細胞樹状突起スパイン密度の異常、海馬スライスの電気

生理学的異常、行動解析による不安の亢進、うつ様行動の亢進、社会性的変化、情動異常、学習異常障害などを同定した。

(8) *Mecp2*欠損マウスの呼吸運動の測定と薬物による無呼吸の改善（白川）：*Mecp2*欠損マウスでは、生後7週において野生型に比べ著明な無呼吸回数の増加がみられ、明期で有意に多かった。またミルナシプランの長期経口投与により24時間の無呼吸回数の有意な減少がみられた。また*Mecp2*欠損マウスの寿命は約20%延長した。

VMAT2による免疫組織化学的解析では、DMV、NST、VRGにおけるVMAT2陽性puncta数を測定し比較した。*Mecp2*欠損マウスは、すべての部位でpuncta数の著しい減少がみられた。

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の推計患者数1,011人(95%信頼区間：778から1244人)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 low、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の実情にあった診断手引きを新たに作成し、啓蒙および普及させる必要がある。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。

また、本邦のRTTおよびMECP2の研究者の研究会を開催し、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、シンポジウムを開催し、患者家族・医療関係者・研究者の交流をはかり、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連絡をはかった。

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。特に、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は病態理解と治療法の開発に重要な情報を与えることが出来た。*MeCP2*のエピジェネティック機構によりiPS細胞とその分化には大きな影響が予測されていたが、今回の成功によりマウスiPS細胞の誘導

には必須ではないことが示唆された。

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。*Mecp2*欠損マウスによる自律神経系の機能障害の研究成果は、RTTの病態理解に重要な根拠となる。さらに、RTTの原因遺伝子の1つである*Cdk15*の研究の進展は別の角度からの病態解明に重要である。*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、RTTの推計患者数1,011人(95%信頼区間:778から1244人)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り、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手引きを策定する。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。*Mecp2*欠損マウスの研究成果は、RTTの自律神経系の障害を再現し、病態理解と治療戦略の重要な情報を提供した。さらに、*Mecp2*欠損マウスのES細胞、iPS細胞の樹立、*Cdk15*欠損マウスの多角的解析、*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. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M. Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. *Am J Med Genet A* 2011;155:2832-2837.
2. Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci* 2011;12:81.
3. Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S. The Developmental Changes of Na_v1.1 and Na_v1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res* 2011;1389:61-70.
4. Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M, Tomonaga K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic 4 mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 2011;85:4567-4571.
5. 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.
6. Itoh M, Tahimic CG, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto YI, Kurimasa A. Methyl CpG-binding Protein Isoform MeCP2_e2 Is Dispensable for Rett Syndrome Phenotypes but Essential for Embryo Viability and Placenta Development. *J Biol Chem* 2012 Feb 28. [Epub ahead of print]
7. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Matsuishi T. Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. *Int J Dev Neurosci* 2011;29:899-902.
8. Matsuishi T, Yamashita Y, Takahashi T, Nagamitsu S. Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives. *Brain Dev* 2011;33:627-631.
9. Watanabe Y, Yano S, Niihori T, Aoki Y, Matsubara Y, Yoshino M, Matsuishi T. A familial case of LEOPARD syndrome associated with a high-functioning autism spectrum disorder. *Brain Dev* 2011;33:576-579.
10. Ohya T, Yamashita Y, Shibuya I, Hara M, Nagamitsu S, Matsuishi T. Eyelid myoclonia with absences occurring during the clinical course of cryptogenic myoclonic epilepsy of early childhood. *Eur J Pediatr Neurol* 2011 (in press).
11. Nishi Y, Yoh J, Hiejima H, Kojima M. Structures and molecular forms of ghrelin-family peptides. *Peptides* 2011;32:2175-2182.
12. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Masuyama T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in non-obese spontaneously diabetic torii rats. *Metabolism* 2011 (in press).

13. Nishi Y, Mifune H, Kojima M. Ghrelin acylation by the ingested medium-chain fatty acids. *Methods in Enzymol* 2011 (in press).
14. Yasui DH, Scoles HA, Horike S, Meguro-Horike M, Dunaway KW, Schroeder DI, Lasalle JM. 15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain. *Hum Mol Genet* 2011;20:4311-4323.
15. Meguro-Horike M, Yasui DH, Powell W, Schroeder DI, Oshimura M, Lasalle JM, Horike S. Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome. *Hum Mol Genet* 2011;20:3798-3810.
16. 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;17:499-507.
17. 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;20:901-913.
18. Kikuri T, Yoshimura Y, Tabata F, Hasegawa T, Nishihira J, Shirakawa T. Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing multinuclear cells with migration inhibitory factor in vitro. *Exp Ther Med* 2012;3:37-43 (in press).
2. 学会発表
1. Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. Abnormal distribution of GABAergic interneurons leads to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Prague Symposium of Child Neurology and Developmental Epileptology. Prague, Czech Republic, 3-5, November, 2011.
2. 伊藤雅之. レット症候群の研究最前線. 第53回日本小児神経学会 シンポジウム3. 横浜. 5月26日、2011.
3. Nishi Y, Hara M, Matsuishi T. Plasma concentration of ghrelin in patients with Rett syndrome together with their relationship to clinical manifestations. 第84回日本内分泌学会総会 4月21日-23日、2011.
4. 原 宗嗣, 西 芳寛, 山下裕史朗, 松石豊次郎. Mecp2 遺伝子変異をもつレット症候群患者の血漿中グレルイン濃度の検討. 第53回日本小児神経学会総会, 横浜. 5月26日、2011.
5. Kurimasa A, Hotta E, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Live Cell Imaging and Kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling cells. The 70th annual meeting of Japanese Cancer Association, Nagoya, Oct. 3-5, 2011.
6. Horike S., Yasui D.H., Powell W., LaSalle J.M., Meguro-Horike M. A novel model of human 15q-duplication syndrome: Neuron-specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription. Cell Symposia, Autism Spectrum Disorders: From Mechanisms to Therapies, November 9-11, 2011, Arlington, VA, USA.
7. 堀家慎一. Epigenetics of autism spectrum disorders. 第21回日本臨床精神神経薬理学会・第41回日本神経精神薬理学会合同年会, 2011年10月27日-29日, 東京
8. Horike S, Yasui DH, Powell W, Schroeder DI, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome. The 32nd NAITO CONFERENCE ON Biological basis of mental functions and disorders, October 18-21, 2011, 山梨.
9. Horike S, Yasui DH, Powell W, Schroeder DI, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing and transcription in a novel model of human 15q-duplication syndrome. 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 11-15, 2011, Montreal, Canada.
10. Yasui DH, Scoles HA, Horike S, Meguro-Horike M, Dunaway KW, Schroeder DI, Lasalle JM. 15q11.2-13.3 chromatin analysis reveals epigenetic regulation of CHRNA7 with deficiencies in Rett and autism brain. 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 11-15, 2011, Montreal, Canada.
11. Ohhira T, Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Qi DL, Fujisaki C, David G, Oshimura M, Kugoh H. Evidence for a hTERT repressor gene on human

- chromosome 3p21.3 by using chromosome engineering. 12th International Congress of Human Genetics and The ASHG 61st Annual Meeting, October 11-15, 2011, Montreal, Canada.
12. Horike S. Higher order inter-chromosomal association of maternal and paternal alleles of 15q11-q13. ICC on Genomic Imprinting and Beyond, September 21-23, 2011, Barcelona, Spain.
13. Horike S., Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Neuron specific impairment of inter-chromosomal pairing in MeCP2-depleted neuronal cells. June 26-28, 2011, 12th Annual Rett syndrome Symposium, Leesburg, VA, USA.
14. 堀家慎一. ヒト 15q11-q13 領域におけるアレル特異的クロマチン脱凝集の解析. 日本分子生物学会 第11回春季シンポジウム, 2011年5月25日-26日, 金沢
15. Horike S., Powell W, LaSalle JM, Oshimura M, Meguro-Horike M. Role of PWS IC for paternal allele specific chromatin decondensation at 15q11-q13. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月19日~20日, 熊本
16. Meguro-Horike M, Yasui DH, Powell W, Schroeder DI, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. 15q11-q13 homologous pairing and transcriptions are impaired in a novel neuronal model of 15q duplication syndrome. 第5回日本エピジェネティクス研究会年会, 2011年5月19日-20日, 熊本
17. 田中輝幸. 神経発達障害原因遺伝子 CDKL5 変異マウスの網羅的行動解析. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ 2011年8月23日, 神戸
18. 田中輝幸. 発達障害原因遺伝子 CDKL5 の多面的アプローチによる機能解析 (シンポジウム: 脳形成障害とオミックス). 第52回日本神経病理学会総会学術研究会 2011年6月3日, 京都
19. 野村芳子. Rett 症候群の臨床と病態について (シンポジウム). 第53回日本小児神経学会総会 2011年5月26日, 横浜
20. Nomura Y. Motor symptoms, particularly dystonia, in Rett syndrome. IRSF, 2011, 6, 26.
- G. 知的所有権の取得状況.
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
(特許申請予準備中)
*Mecp2*発現制御マウス (伊藤雅之、栗政明弘)

II. 分担研究報告

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

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
研究協力者 青天目 信 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 研究生

研究要旨

本研究では、レット症候群の病態を解明し、診断法と予防・治療法を確立するために、レット症候群の臨床実態調査に取り組んだ。その結果、全国疫学一次調査において、全国のRTTの推計患者数1,011人 [95%信頼区間：778から1244人] が得られ、患者分布の地域差があることが分かった。二次調査を通じて、本邦の実態と国際診断基準を検討し、診断のてびきを作成している。

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。これまでに疫学調査はなく、臨床実態は不明な点が多かった。RTTの原因遺伝子MECP2の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てびきの作成を進める。

B. 研究方法

全国臨床実態調査と診断基準作成は、本難治性疾患克服研究事業疫学班（「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、2008年11月より2009年10月の1年間に診療した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なった。

本年度は、公開シンポジウムを開催し、患者家族・医療関係者・研究者間の交流をはかった。

（倫理面への配慮）

関係省庁の指針を遵守し、必要な手続きのもと本研究を遂行した。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。

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1,011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。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。また、2010年に発表された国際診断基準と本邦の実態を照合し、実情にあった診断手引きを作成中である。

レット症候群シンポジウムでは、約80名の参加者を集め、研究や医療の最前線を報告し、意見交換を行なった。

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、全国のRTTの推計患者数1,011人 [95%信頼区間：778から1244人] が明らかになった。ただし本調査では過去1年間の利用者に限って尋ねたため、RTTを有していても1年以上利用のなかった者は結果に反映されないため、この推計値は過小である可能性がある。しかしRTTを有して1年以上利用のない者は少ないと思われ、その影響は限定的と考える。また同一患者が複数の施設を利用した際に重複して計上される問題については、二次調査の回答を利用して重複計上を可能な限り排除した。今回得た推計患者数を20歳以下の女性の人口で除した値は0.009%であることが明らかになった。これを本邦のRTTの有病率と見なすことも可能であるが、ただし推計患者数には20歳以上の者も含まれているため過大な推計値であることに注意を要

する。この点は二次調査の回答などを利用しての検討を行いたい。それでも、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の実情にあった診断てびきを新たに作成し、啓蒙および普及させる必要がある。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。

また、本邦のRTTおよびMECP2の研究者の研究会を開催し、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、シンポジウムを開催し、患者家族・医療関係者・研究者の交流をはかり、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連絡をはかった。

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、全国のRTTの推計患者数1,011人[95%信頼区間:778から1244人]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てびきを策定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M. Progressive Leukoencephalopathy with Intracranial Calcification, Congenital Deafness and Developmental Deterioration. *Am J Med Genet A* 2011; 155:2832-2837.
2. Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Takahashi K, Kudo S, Nakagawa T, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. The protocadherins, PCDHB1 and PCDH7, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. *BMC Neurosci* 2011;12:81.

3. Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S. The Developmental Changes of Na_v1.1 and Na_v1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res* 2011;1389:61-70.
4. Honda T, Fujino K, Okuzaki D, Ohtaki N, Matsumoto Y, Horie M, Daito T, Itoh M, Tomonaga K. Upregulation of insulin-like growth factor binding protein 3 in astrocytes of transgenic 4 mice expressing Borna disease virus phosphoprotein. *J Virol* 2011;85:4567-4571.
5. 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.
6. Itoh M, Tahimic CG, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto YI, Kurimasa A. Methyl CpG-binding Protein Isoform MeCP2_e2 Is Dispensable for Rett Syndrome Phenotypes but Essential for Embryo Viability and Placenta Development. *J Biol Chem* 2012 Feb 28. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. Abnormal distribution of GABAergic interneurons leads to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Prague Symposium of Child Neurology and Developmental Epileptology. Prague, Czech Republic, 3-5, November, 2011.
2. 伊藤雅之. レット症候群の研究最前線. 第53回日本小児神経学会 シンポジウム3. 横浜. 5月26日, 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

分担研究者	松石 豊次郎	久留米大学医学部	小児科学講座	主任教授
研究協力者	西 芳寛	久留米大学医学部	生理学講座	講師
	原 宗嗣	久留米大学	高次脳疾患研究所	大学院
	高橋 知之	久留米大学	高次脳疾患研究所	准教授
	岡部 恭典	久留米大学医学部	生理学講座	助教

研究要旨

本研究は2つの研究から構成されている。1. ヒトのレット症候群(RTT)およびRTTモデルマウス(RTTマウス)を用いたグレリンの役割の研究では、成長発育障害、摂食障害、自律神経症状と、神経内分泌ホルモングレリンの血中濃度との関連について検討した。正常コントロールと比較して、RTTの血中グレリン値は有意に低値であり、摂食障害の高度な症例、消化管運動を中心とした自律神経障害の高度な症例で血中濃度がより低値であり、血中グレリン濃度は、RTTの病態を反映する有力なマーカーになると考えられた。RTTマウスの血中、脳内のグレリン含量もコントロールと比較して低値であり、ヒトでの解析結果を支持する形となった。2. 申請者は昨年度より、新たなRTT病態解析の戦略の1つとして、MeCP2を欠失したRTTモデルES細胞の樹立を行ない、MeCP2欠失ES細胞の未分化・分化状態における特性解析を行なうことでRTT発症メカニズムを解析した。その結果、MeCP2欠失ES細胞はコントロールのES細胞と比較して、その未分化維持能、神経分化能に異常が認められず、MeCP2遺伝子はES細胞の未分化能維持や神経細胞の初期発生に必須ではないことを示した。一方、MeCP2欠失ES細胞から誘導した神経細胞は電気生理学的な成熟が不十分であったことから、MeCP2遺伝子は神経細胞の成熟・機能発現過程で重要な役割を担う可能性を見出している。

本年度は、MeCP2欠失ES細胞の分化状態の更なる解析を進めるとともに、MeCP2欠損iPS細胞の樹立を試みた。

A. 研究目的

1. グレリン研究：レット症候群(RTT)は、発達障害、自律神経障害、自閉傾向をきたす小児神経疾患である。同疾患の責任遺伝子としてMeCP2遺伝子が同定されている。グレリンは成長・発達、摂食調節、自律神経調節などの生理作用を有するホルモンである。グレリン作用の多くはRTTの臨床症状と関連している。本研究では、①：RTT患児の血中グレリン濃度を正常コントロール群と比較し、②：同疾患の臨床症状と血中グレリン濃度との関連について調べ、③：MeCP2遺伝子を欠損させたRTTモデルマウス(RTTマウス)の血中、組織中グレリン含量を測定しコントロール群と比較検討する。本研究を通じて、血中グレリン濃度の測定が、RTTの病態マーカーとして有用であるか否かについて検討する。

2. 本研究は、RTTモデルiPS細胞を利用することで、RTT発症メカニズムを解明、更に治療薬物のスクリーニングシステムを樹立することを目的としている。本研究により、RTT発症に関わるMeCP2遺伝子の神経

分化過程における機能的役割の解明、更には、患者由来の生体試料の限られる中で、将来、RTT患者由来iPS細胞を用いた病態メカニズムの解明や治療薬スクリーニングの基盤確立の一助として期待される。

B. 研究方法

1. 本学の小児科外来でフォローアップされているRTTの43家系を中心に、27症例のRTT患者(女児)より早朝空腹時の採血を施行。血漿中のグレリン濃度についてRIA(N-RIA: Active ghrelin, C-RIA: Total ghrelin)を用いて測定した(学内倫理委員会承諾有り)。正常者コントロールとして同年齢の女児53症例の血漿中グレリン濃度を測定(学内倫理委員会承諾有り)。RTT症例と比較検討した。調査票を用いて上記のRTT症例の身体所見(身長、体重、肥満度)、臨床症状(摂食障害、消化管運動障害、概日リズム・睡眠障害ほか)と血中グレリン濃度との関連につい

て検討した。

2. RTTモデルiPS細胞の樹立と未分化過程における特性解析

2-1. RTTモデルES細胞の神経分化とRTTモデルES細胞由来神経細胞の解析

RTTモデルES細胞は、X染色体ゲノム上のMeCP2がloxP配列で挿まれており、Creリコンビナーゼ酵素によってMeCP2遺伝子を完全に欠失する。そこで昨年度までに、Creリコンビナーゼを発現するアデノウイルスベクター (Ad. CA-Cre) を感染し、MeCP2を欠失したMeCP2欠失ES細胞を樹立した。このRTTモデルES細胞を神経分化誘導法 (stromal cell-derived inducing activity, SDIA)、によって神経分化誘導し、その神経系細胞への分化能の評価を行なった。

2-2. RTTモデルiPS細胞の樹立と特性解析

本施設では、Bird. Aら (Nat Med 2001; 27:322-6.) によって作製されたMeCP2欠損RTTモデル動物を維持しており、このMeCP2欠損RTTモデルマウス由来のiPS細胞の樹立を行なった。雄の新生仔マウス (wild-type: control & Hemizygous) の尾部を採取し、一部は遺伝子解析に、残りの組織から初代培養の線維芽細胞を得た。この線維芽細胞に対してレトロウイルスに組み込まれた山中4因子を導入し、ES細胞継代用培地にて10日程度培養した結果、ES細胞用のiPS細胞コロニーが出現した。このコロニーを単離し、iPS細胞を得た。

(倫理面への配慮等)

本研究では、ヒトに由来する試料や遺伝子情報を始めとする個人情報を取り扱わないが、以下の研究課題名で、それぞれ久留米大学の遺伝子組換え実験安全委員会、ならびに動物実験センターに設置する委員会で審査後、実施の承認を受けている。従って第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置が定められている実験として、学内外の種々の指針や法令を遵守し実施されている。

・「Rett症候群の動物モデルにおける分子基盤の確立と遺伝子治療の試み」

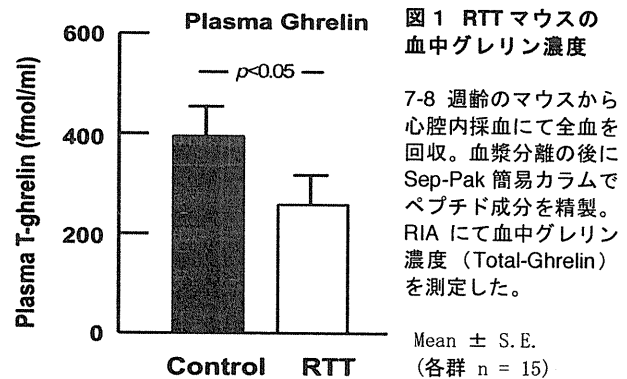
・「ヒト組織由来幹細胞と胚性幹 (ES) 細胞による目的細胞分化誘導法の確立と再生医療技術の開発」

・「レット症候群モデルマウス (MeCP2-null mutation) の神経生化学的研究と遺伝子治療の試み」

C. 研究結果

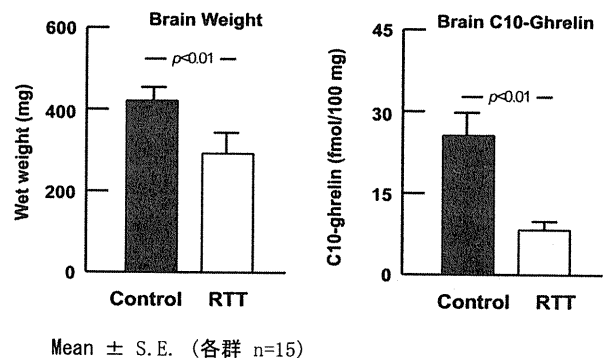
1-1. MeCP2欠損RTTモデルマウスの組織内グレリン含量の検討: 生後7-8週齢のMeCP2欠損RTTモデルマウス (Hemi-♂: RTTマウス, n=15) の血漿中、脳内グレリン含量を測定し、同週齢のコントロールマウス (C57BL6/J-♂, n=15) と比較検討した。RTTモデル

マウスの血漿中グレリン濃度はTotal-Ghrelin 256.2 ± 43.4 fmol/ml ($p < 0.05$ vs. Control: 398.4 ± 52.8 fmol/ml) (Mean \pm SE) であり、ヒトRTT症例と同様に血漿中グレリン濃度の低下が示された (図1)。

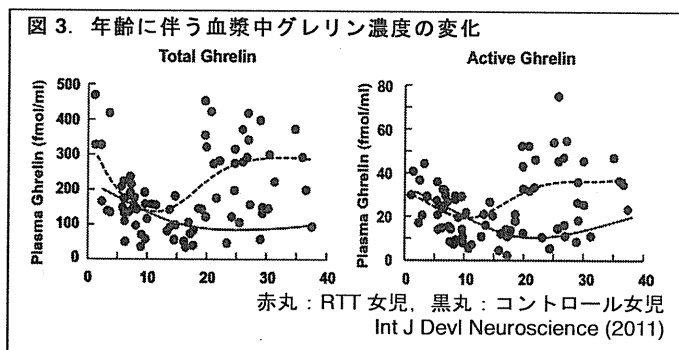


脳内で特異的に高発現するデカン酸修飾型グレリン (C10-Ghrelin) についても、RTTマウスの脳内含量はC10-Ghrelin 8.0 ± 0.4 fmol/100mg -tissue ($p < 0.01$ vs. Control: 26.5 ± 3.3 fmol/100 mg-tissue) (Mean \pm SE) であり、血漿中と同様に脳内のグレリン含量の低下が確認された。RTTマウスの脳湿重量は 349.2 ± 8.6 mg ($p < 0.001$ vs. Control: 404.4 ± 4.9 mg) と同週齢のコントロールより有意に低下しており、脳内グレリンの産生と脳発達との関連も推定された (図2)。

図2 RTTマウスの脳重量と脳内グレリン含量



1-2. RTT症例の血中グレリン濃度と同症例の臨床症状との相関: RTT症例の血中グレリン濃度はTotal-Ghrelin 113.5 ± 51.9 fmol/ml ($p < 0.01$ vs. Control: 215.5 ± 115.0), Active-Ghrelin 16.9 ± 1.6 fmol/ml ($p < 0.01$ vs. Control: 26.8 ± 16.9) (Mean \pm SD) であり、全ての測定系でRTT症例はコントロール群と比較して低値であった。年齢に伴う血中グレリン濃度の推移についても、RTT症例とコントロール女兒との間に有意な相違が確認された (図3)。



1-3. RTTの臨床病態と血漿中グレリン濃度の関連では、摂食障害 ($p < 0.01$)、便秘 ($p < 0.05$)をはじめとする消化管運動障害を有する症例で、同症状を認めない症例と比較して血中グレリン濃度の有意な低下が確認された(表1)。

表1. レット女児の臨床症状と血漿中グレリン濃度の相関

symptoms	Total Ghrelin		ρ	Octanoyl Ghrelin		ρ
	+	-		+	-	
Periodic breathing	104.9 (± 57.6) [N=17]	128.2 (± 39.0) [N=10]	0.27	17.7 (± 8.9) [N=17]	15.6 (± 7.3) [N=10]	0.54
Sleep disruption	111.8 (± 57.7) [N=18]	116.9 (± 40.9) [N= 9]	0.82	17.6 (± 8.6) [N=18]	15.6 (± 7.8) [N= 9]	0.55
Cold hands/feet	116.1 (± 51.1) [N=22]	102.0 (± 60.3) [N= 5]	0.59	16.7 (± 8.4) [N=22]	17.9 (± 8.6) [N= 5]	0.78
Epilepsy	107.9 (± 53.6) [N=23]	146.1 (± 25.2) [N= 4]	0.18	17.1 (± 8.5) [N=23]	16.1 (± 8.3) [N= 4]	0.82
Eating difficulties	56.5 (± 20.9) [N= 7]	133.5 (± 44.0) [N=20]	0.00**	11.5 (± 7.5) [N= 7]	18.8 (± 7.8) [N=20]	0.04*
Constipation	93.5 (± 58.2) [N=14]	135.1 (± 34.7) [N=13]	0.03*	15.4 (± 8.9) [N=14]	18.6 (± 7.5) [N=13]	0.33

データはMean \pm SD. にて表示。

*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ vs. symptom-free patients

Octanoyl ghrelin=Active ghrelin

Int J Devl Neuroscience (2011)

2-1. RTTモデルiPS細胞の樹立と未分化過程における特性解析

RTTモデルiPS細胞を樹立するために、RTTモデル動物(MeCP2欠損マウス)(Hemi \cdot ♂)の新生仔マウスの尾部線維芽細胞を初代培養し、山中4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc)をレトロウイルスベクターにて導入後、5-10日間培養し、iPS細胞コロニーの形成を認めた。顕微鏡下、形態的にコンパクトで辺縁がスムーズに細胞が密集したコロニーをそれぞれの個体ごとに少なくとも15個以上クローニングし、未分化状態の解析を行なった。それぞれのiPS細胞クローンに対して、RT-PCRによる12種類の未分化マーカーの発現、アルカリフォスファターゼ染色、SSEA1、TRA1-60、OCT3/4による免疫組織染色を行なった。その結果、評価した全てのマーカーを発現するiPS細胞クローンをWTとMeCP2欠損iPS細胞クローンを少なくとも4クローンずつ得る事に成功した。得られたRTTモデルiPS細胞クローンはES細胞やコントロールiPS細胞と同様に、LIF存在下、未分化維持を補助するフィーダー細胞上で増殖し、EBsを形成し多分化能を有することが明らかとなった。以上の結果から、

MeCP2はそのエピジェネティックな遺伝子発現制御によりiPS細胞の誘導に関わる可能性が指摘されていたが、MeCP2欠損マウスモデルからiPS細胞が誘導できることから、MeCP2はマウスiPS細胞の誘導に必須ではない可能性が示された。

D. 考察

1. 測定データをもとに算出したTotal-GhrelinとActive-Ghrelinの比率は10%前後に保たれていることから、検体の処理～保存状態は良好であると考えられる。従って、RTTでは循環血中(in vivo)でグレリン濃度が低下しているものと推定される。血中のグレリン濃度は食前の空腹時に上昇し、食後に低下する。また、日中より夜間に高値となる日内リズムを有する。RTTにおける空腹時血中グレリン濃度の低下は、同症候群の摂食行動異常や概日リズム異常と関連している可能性が高い。グレリンは自律神経調節を介して消化管運動を促進する。RTT症候群における低グレリン血症は、グレリン作用の低下を介して同症候群の消化管運動障害にも関連すると考えられる。グレリンを用いたトランスレーショナルリサーチは循環器領域、消化器領域、精神科領域で積極的に進められ、順調に成果を上げつつある。今後、小児発達障害の分野でも同ホルモンに関連した臨床研究の展開が期待される。

2. これまでの研究で、MeCP2遺伝子を欠失したRTTモデルES細胞を用いてRTTの病態メカニズムの解析から、RTTモデルES細胞により誘導した神経細胞は電気生理学的に未熟であること、更に、グリア細胞の分化が亢進することを見出しており、RTT病態メカニズムの解析における幹細胞の有用性を示した。そこで本年度は、iPS細胞の誘導技術を用いたRTTモデルiPS細胞の樹立を試み、樹立したiPS細胞を利用したRTTの病態メカニズムの解明を目的に研究を進めた。iPS細胞は、再生医療の細胞ソースとして期待されるのみならず、採取困難な難治性疾患のモデル細胞の樹立する技術としても期待されている。しかし、iPS細胞の樹立方法は2008年にYamanakaらによって開発されて以降、いくつか報告されている一方、iPS細胞の誘導メカニズムについては不明である。その中で近年、iPS細胞の誘導過程におけるエピジェネティックな遺伝子制御の重要性が報告されておりMeCP2の関与も指摘されている。今回のRTTモデル動物を利用した研究において、MeCP2欠損マウスからiPS細胞の樹立に成功したことは、MeCP2はiPS細胞の誘導過程において必須ではない、又は代償する分子が存在することを示唆すると考えられる。実際に、RTT患者由来のiPS細胞の報告が海外グループから報

告されており、モデル細胞樹立における懸念は解消したと考えられる。また、コントロールWTマウスから誘導したiPS細胞と同様に、未分化マーカーを発現し、旺盛な増殖、更にはEBs形成やSDIA法による多分化能、神経細胞分化能を示すことから、RTTモデルES細胞の研究を基に病態メカニズム解析に有用と考えられた。現在、RTTモデルES細胞と同様の神経分化能の評価を進めており、RTT病態メカニズム解析におけるiPS細胞の有用性を示すことで、将来、RTT患者由来のiPS細胞の樹立、更には患者由来iPS細胞を利用した治療化合物のスクリーニングへの応用を進めたいと考えている。

E. 結論

1. レット症候群で血中グレリン濃度の低下が確認された。グレリン作用の低下が、同症候群の臨床症状の発現に一部関与している可能性が推定された。血中のグレリン濃度の測定は、レット症候群の臨床病態と一定の相関を示すことから、同疾患の病態を反映するマーカーとしての利用が期待される。また、近年、今回のES細胞と同様に、病態モデル細胞の樹立にはiPS細胞技術の応用が期待されているが、RTT研究における有用性に付いても検討する事が重要であると考えられ現在確立中である。
2. MeCP2はiPS細胞の誘導過程においてエピジェネティック転写調節因子として働く可能性が指摘されていたが、山中4因子をMeCP2欠損マウス由来の線維芽細胞へ導入することで、RTTモデルiPS細胞が樹立できた。
3. RTTモデルiPS細胞は、Wild-typeマウスから誘導したコントロールiPS細胞と同様に、LIF存在下で強い増殖能を維持し、未分化マーカーを発現していた。このことから、MeCP2遺伝子はiPS細胞の増殖や未分化マーカーの発現を指標とした未分化能の維持には必ずしも必要でないことが示された。
4. RTTモデルiPS細胞は、コントロールES細胞と同様に、SDIA法によってNestin、TuJ、更にはTHを発現する神経細胞に分化した。よってRTTモデルiPS細胞は、ES細胞と同様に、神経細胞の分化による病態メカニズム研究に有用である可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Matsuishi T. Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. *Int J Devl Neurosci* 2011;29:899-902.
2. Matsuishi T, Yamashita Y, Takahashi T, Nagamitsu S. Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives. *Brain Dev.* 2011; 33: 627-631.
3. Shibuya I, ---Matsuishi T. Changes in salivary cortisol levels as a prognostic predictor in children with anorexia nervosa. *Int J Psychophysiol* 2011;82:196-201.
4. Yoh J, Nishi Y, Hosoda H et al.: Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin, in human subjects and the effect of glucose- or meal-ingestion on its dynamics. *Reg Peptides* 2011; 167:140-8.
5. Nishi Y, Hiejima H, Yoh J et al.: Structures and molecular forms of ghrelin-family peptides. *Peptides* 2011;32:2175-82.

2. 学会発表

1. Nishi Y, Hara M, Matsuishi T. Plasma concentration of ghrelin in patients with Rett syndrome together with their relationship to clinical manifestations. 第84回 日本内分泌学会総会 4月21日-23日 2011.
2. 原 宗嗣, 西 芳寛, 山下裕史朗, 松石豊次郎. Mecp2遺伝子変異をもつレット症候群患者の血漿中グレリン濃度の検討. 第53回 日本小児神経学会総会 5月26日 2011.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

遺伝子改変細胞及びマウスの作製と行動、機能解析

研究分担者 栗政 明弘 鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子医療学 准教授

研究協力者 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

研究要旨

Rett症候群の臨床的臨界期の特定や神経発達におけるMeCP2発現の重要性を明らかにするため、MeCP2発現をコントロールできるノックインマウス作製を行っている。胎生期において安定な遺伝子発現が得られるROSA26領域に、テトラサイクリンで発現制御可能なMeCP2遺伝子を持つ発現ユニットを導入し、トランスジェニックマウス作製を行った。キメラマウスの交配から、F1・F2マウス樹立ならびにCre発現マウスとの交配を継続している。また、緑色蛍光タンパク質GFPを融合したRett症候群患者に認められるMeCP2の突然変異を有するcDNA発現ベクターをL929マウス線維芽細胞に導入し、安定細胞株を分離してライブセルイメージングによるMeCP2の発現と細胞内局在を解析した。

A. 研究目的

MeCP2発現を制御して発達段階の異なる時期にその発現を変化させ、その結果生じうる神経発達の異常を検索することは、Rett症候群の病態解明の上で今後重要な取り組みとなる。胎生期における遺伝子発現が極めて保たれ、発現抑制を受けないとされるROSA26遺伝子座領域に注目した。この領域にジーンターゲティング・ノックイン手法を用いて遺伝子発現の制御を可能とさせるテトラサイクリン発現制御システムとMeCP2遺伝子を組み込む。組み込んだ制御系は、テトラサイクリン発現制御を行うtet遺伝子産物を産生し、さらにその産物がテトラサイクリンの濃度によってMeCP2遺伝子発現を制御するシステムが構築できる。

また、Rett症候群患者に認められる変異を有したMeCP2遺伝子をGFP融合タンパク質としてL929マウス線維芽細胞に導入し、その安定発現株を単離し、変異MeCP2の核内局在パターンの検討を行った。

B. 研究方法

ROSA26領域をノックインするプラスミドベクターに、MeCP2 cDNA配列を組み込み、MeCP2の発現制御用のジーンターゲティング・ノックイン用ベクターを構築した。

その基本構造は、ROSA26遺伝子のゲノム配列に、MeCP2遺伝子およびPGK-neoカセットが挿入され、pBluescriptにサブクローニングされている。MeCP2遺伝子の発現コントロールは、Cre組み換えタンパク質によりneo遺伝子を取り除いた後、テトラサイクリンで制御されるtranscription activator (tTA)

がROSA26プロモーターにより発現され、MeCP2とEGFP両遺伝子が発現コントロールされる。

得られたノックインベクターをマウスES細胞（129Sv/EvTac系統）にエレクトロポレーションにより導入する。PCRならびにサザンハイブリダイゼーションによりG418耐性ES細胞のコロニーをスクリーニングし、正しくターゲティングされたES細胞クローンを選別する。

このES細胞をBlastocystにインジェクションすることにより、キメラマウスを作製する。さらにC57BL/6J系統の雌マウスと交配し、F1マウスを得る。このマウスをさらに交配することにより、ROSA26遺伝子領域にMeCP2発現コントロールユニットを有するマウスを作製する。実際の発現コントロールは、さらにこのマウスをCreマウスと交配することにより、LoxPの組み換えを起こさせた後に得られる。

GFP融合野生型MeCP2と、そのMeCP2遺伝子にR106W、Y120D、F155C、T158Mの変異を有する発現ベクターを、Lipofectamine2000を用いてL929マウス線維芽細胞に導入し、緑色蛍光タンパク質を安定に発現する細胞株の単離を行った。これを、オリンパスLCV110培養顕微鏡を用いたライブセルイメージングにより観察を行った。

C. 研究結果

これまで高キメラマウスをC57BL/6マウスと交配させ、F1マウスを得た。さらに継代を重ね安定に導入遺伝子を引き継ぐF2・F3マウスを維持している。Creマウスと交配することにより、MeCP2発現制御可能なマウス作製を継続している。

GFP融合MeCP2の安定発現株を、それぞれの突然変異体に関して2株以上を単離することが出来た。MeCP2変異体は野生株に比較してその発現が低下しており、Rett症候群で認められる変異は細胞内でのMeCP2タンパク質の安定発現を阻害している可能性が示唆された。ライブセルイメージングにより、その局在を詳細に観察した。

D. 考察

すでにいくつもの遺伝子発現制御に関して成功例を持つROSA26領域とテトラサイクリン誘導系を採用し、MeCP2発現を制御できるRett症候群モデルマウス系の構築を試みている。Cre-LoxPによる組換え過程を経ながら、発現のコントロールが実際に可能かどうかを検証し、その後Rett症候群の表現型が得られるかなどの検討を行っていく。

また、Rett症候群で認められる変異を有するMeCP2タンパク質は、その細胞内発現量が減少しており、Rett症候群発症の病態に示唆を与えるものと考えられる。

E. 結論

ROSA26領域にMeCP2発現をコントロールするユニットを組み込むノックインマウスの作製を行っている。今後発現コントロールに関して検討を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomimatsu N, Mukherjee B, Deland K, Kurimasa A, Bolderson E, Khanna KK, Burma S. Exo1 plays a major role in DNA end resection in humans and influences double-strand break repair and damage signaling decisions. *DNA Repair* (Amst).

2012 Feb 10. [Epub ahead of print]

2. Itoh M, Tahimic CG, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto YI, Kurimasa A. Methyl CpG-binding Protein Isoform MeCP2_e2 Is Dispensable for Rett Syndrome Phenotypes but Essential for Embryo Viability and Placenta Development. *J Biol Chem* 2012 Feb 28. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Kurimasa A, Hotta E, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Live Cell Imaging and Kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling cells. The 70th annual meeting of Japanese Cancer Association, Nagoya: Oct.3-5, 2011
2. Hotta E, Okada A, Miyano Y, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Kurimasa A, Live Cell Imaging and Kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling cells. The 54th Annual meeting of the Japan Radiation Research Society, Kobe, Nov. 11-19, 2010

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析

研究分担者 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
研究協力者 堀家 牧子 金沢大学学際科学実験センター・日本学術振興会 特別研究員
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

研究要旨

本研究では、レット症候群（RTT）の原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2（MeCP2）のヒト15番染色体のAngelman症候群（AS）領域の分子機構を解明する。最近、自閉症やレット症候群患者の脳細胞で、母方と父方15番染色体の相互作用が15q11-q13領域の適切な遺伝子発現にとって大変重要であることが示された。そこで、これらの領域の染色体相互作用がどのように制御されているかについて解析し、新たな治療法の開発へ発展させる。

A. 研究目的

15q11-q13領域は、類縁疾患であるAngelman症候群（AS）やPrader-Willi症候群（PWS）の責任遺伝子座であり、メチル化CpG結合タンパク2（MeCP2）を介したエピゲノム機構によって遺伝子発現が制御されている。最近、レット症候群（RTT）や自閉症患者において15q11-q13領域の核内配置の異常が報告され、MeCP2がエピゲノム機構を介した核内配置の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、この15q11-q13領域におけるMeCP2の分子機構を解明することで、RTTのみならずASやPWS、自閉症などの類縁疾患の発症病態の解明へも発展させる。

B. 研究方法

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法で解析する。FISHプローブは、15q11-q13領域上の9つのBAC(Bacterial Artificial Chromosome)を蛍光ラベルし、解析に用いる。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（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する。

（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、遺伝子組み換えにおいては金沢大学遺伝子組換えDNA安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

15q11-q13領域、約10Mbにわたり各々の遺伝子座の核内配置をDNA-FISHで解析したところ、GABA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。

D. 考察

MeCP2のノックダウン細胞株や自閉症モデル細胞株において母方と父方15番染色体の相互作用が消失し、GABRB3やCHRNA7遺伝子の発現異常が認められた。このことは、15q11-q13領域における遺伝子発現制御にMeCP2を含めたエピゲノム機構の関与を改めて証明したことであり、RTTに限らずASやPSWなど広く発達障害の病態形成に関与していることを意味している。今後、さらに詳細なMeCP2を介した遺伝子発現制御機構を明らかにし、RTTの治療のターゲットとなる分子の同定を試みると共に、治療法の開発へ発展させる。

E. 結論

MeCP2による15q11-q13領域の遺伝子発現制御機構を明らかにすることは、RTTの複雑な病態を明らかにする上で大変重要である。本研究では、GABRB3遺伝子近傍に相同染色体のペアリング領域を見出した。このペアリング領域には、MeCP2やCTCF結合領域も存在し、MeCP2を介した核内配置の制御がRTTのみならずASやPWS、自閉症など発症機序に関与している可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yasui DH, Scoles HA, Horike S, Meguro-Horike