

according to the manufacturer's protocols (Dharmacon, Lafayette, CO, USA). Accell non-targeting siRNA was used in control knockdowns. Briefly, we plated SH-SY5Y cells onto Lab-Tek™ II-CC2™ Chamber Slides (Nalge Nunc) and then incubated them for 72 h in serum-free Accell SMART pool transfection medium containing 1 μ M of MeCP2, CTCF or RAD21 siRNAs. After 72 h of siRNA treatment, we replaced the medium with 1% serum-supplemented Accell medium containing 16 nm PMA and a pool of each siRNA, as appropriate. For pairing analysis and knockdown assessment, cells were fixed in Histochoice (Amresco) or harvested after an additional 72 h of incubation. MeCP2, CTCF and RAD21 knockdowns were confirmed by western blot analysis using rabbit anti-MeCP2 (Diagenode, Sparta, NJ, USA), rabbit anti-CTCF (CST, Danvers, MA, USA), rabbit anti-RAD21 (CST) and rabbit anti-GAPDH (CST), with the appropriate rabbit secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase for detection (Bio-Rad). Immunostaining was conducted with anti-MeCP2, anti-CTCF and anti-RAD21, and detection was achieved with secondary Alexa Fluor 555-goat anti-rabbit or Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit (Invitrogen).

DNA methylation analysis

We performed DNA methylation analysis using EpiTect® Bisulfite Kits (Qiagen), according to the manufacturer's protocols. Specific primers for the amplification of bisulfite-treated DNA were designed using MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>). PCR was performed using GoTaq® Master Mix (Promega). PCR conditions were as follows: 2 min hot start at 95°C, followed by 32 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 58°C for 30 s and extension at 72°C for 30 s. The PCR products were directly cloned into the pGEM®-T Easy vector (Promega). Twenty individual clones were sequenced from both ends using a 310 Genomic Analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) according to the standard protocols. Primer sequences are available on request.

Chromatin immunoprecipitation

Chromatin was prepared from SH-SY5Y cells and purified by urea gradient centrifugation, as previously described (52). Immunoprecipitation, reverse crosslinking and PCR amplification were also performed as previously described (52), with some modifications. Briefly, a panel of restriction enzymes (NEB, Ipswich, MA, USA) was used to digest chromatin into 100–700 bp DNA fragments. Digested chromatin was pre-cleared with Protein G Dynabeads (Invitrogen) alone, then with normal rabbit IgG (CST) and then finally with Protein G Dynabeads. Pre-cleared chromatin was incubated overnight with rabbit anti-CTCF or with equivalent amounts of normal rabbit IgG as a control for non-specific binding. PCR amplification was performed for 35 cycles with one-twentieth of the IP products. Primer sequences are available on request.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Karen N. Leung for her advice on FISH protocols and Masako Tada, Hiroyuki Kugoh for critical reading of the manuscript. We would also like to thank Sachiyo Akagi and Miwa Miyano for their help with the MMCT and PCR analysis.

Conflict of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was supported in part by Grants-in-Aid for JSPS Fellows and a Short-term Fellowship from the International Human Frontier Science Program (M.M.-H.), the Program for Improvement of Research Environment for Young Researchers from the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology (S.H.), Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (S.H.), Grants-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (S.H.), Grants-in-Aid for Young Scientists (B) (S.H.), The Cell Science Research Foundation, Daiichi-Sankyo Foundation of Life Science, Mitsubishi Pharma Research Foundation and Life Science Foundation of Japan (S.H.), the Program for Promotion of Basic and Applied Researches for Innovations in Bio-oriented Industry (H.I., S.H.) and the National Institutes of Health (J.M.L., R01HD048799 and R01HD41462).

REFERENCES

1. Folstein, S.E. and Rosen-Sheidley, B. (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 943–955.
2. Fombonne, E. (2003) Epidemiological surveys of autism and other pervasive developmental disorders: an update. *J. Autism Dev. Disord.*, **33**, 365–382.
3. Cook, E.H. Jr. and Scherer, S.W. (2008) Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*, **455**, 919–923.
4. Pinto, D., Pagnamenta, A.T., Klei, L., Anney, R., Merico, D., Regan, R., Conroy, J., Magalhaes, T.R., Correia, C., Abrahams, B.S. *et al.* (2010) Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*, **466**, 368–372.
5. Wang, N.J., Liu, D., Parokony, A.S. and Schanen, N.C. (2004) High-resolution molecular characterization of 15q11-q13 rearrangements by array comparative genomic hybridization (array CGH) with detection of gene dosage. *Am. J. Hum. Genet.*, **75**, 267–281.
6. Cook, E.H. Jr, Lindgren, V., Leventhal, B.L., Courchesne, R., Lincoln, A., Shulman, C., Lord, C. and Courchesne, E. (1997) Autism or atypical autism in maternally but not paternally derived proximal 15q duplication. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 928–934.
7. Schroer, R.J., Phelan, M.C., Michaelis, R.C., Crawford, E.C., Skinner, S.A., Cuccaro, M., Simensen, R.J., Bishop, J., Skinner, C., Fender, D. *et al.* (1998) Autism and maternally derived aberrations of chromosome 15q. *Am. J. Med. Genet.*, **76**, 327–336.
8. Lauritsen, M., Mors, O., Mortensen, P.B. and Ewald, H. (1999) Infantile autism and associated autosomal chromosome abnormalities: a register-based study and a literature survey. *J. Child Psychol. Psychiatry*, **40**, 335–345.
9. Veenstra-Vanderweele, J., Christian, S.L. and Cook, E.H. Jr. (2004) Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **5**, 379–405.
10. Szatmari, P., Paterson, A.D., Zwaigenbaum, L., Roberts, W., Brian, J., Liu, X.Q., Vincent, J.B., Skaug, J.L., Thompson, A.P., Senman, L. *et al.* (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet.*, **39**, 319–328.

11. Knoll, J.H., Nicholls, R.D., Magenis, R.E., Graham, J.M. Jr, Lalande, M. and Latt, S.A. (1989) Angelman and Prader-Willi syndromes share a common chromosome 15 deletion but differ in parental origin of the deletion. *Am. J. Med. Genet.*, **32**, 285–290.
12. Reik, W. and Walter, J. (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.*, **2**, 21–32.
13. Kishino, T., Lalande, M. and Wagstaff, J. (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat. Genet.*, **15**, 70–73.
14. Matsuura, T., Sutcliffe, J.S., Fang, P., Galjaard, R.J., Jiang, Y.H., Benton, C.S., Rommens, J.M. and Beaudet, A.L. (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat. Genet.*, **15**, 74–77.
15. Jiang, Y.H., Sahoo, T., Michaelis, R.C., Bercovich, D., Bressler, J., Kashork, C.D., Liu, Q., Shaffer, L.G., Schroer, R.J., Stockton, D.W. *et al.* (2004) A mixed epigenetic/genetic model for oligogenic inheritance of autism with a limited role for UBE3A. *Am. J. Med. Genet. A*, **131**, 1–10.
16. Schanen, N.C. (2006) Epigenetics of autism spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **15**, R138–R150.
17. Grafodatskaya, D., Chung, B., Szatmari, P. and Weksberg, R. (2010) Autism spectrum disorders and epigenetics. *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry*, **49**, 794–809.
18. Hogart, A. and LaSalle, J.M. (2009) Chromosome 15q11–13 duplication syndrome brain reveals epigenetic alterations in gene expression not predicted from copy number. *J. Med. Genet.*, **46**, 86–93.
19. LaSalle, J.M. and Lalande, M. (1996) Homologous association of oppositely imprinted chromosomal domains. *Science*, **272**, 725–728.
20. Thatcher, K.N., Peddada, S., Yasui, D.H. and LaSalle, J.M. (2005) Homologous pairing of 15q11–13 imprinted domains in brain is developmentally regulated but deficient in Rett and autism samples. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 785–797.
21. Kugoh, H., Mitsuya, K., Meguro, M., Shigenami, K., Schulz, T.C. and Oshimura, M. (1999) Mouse A9 cells containing single human chromosomes for analysis of genomic imprinting. *DNA Res.*, **6**, 165–172.
22. Mitsuya, K., Meguro, M., Lee, M.P., Katoh, M., Schulz, T.C., Kugoh, H., Yoshida, M.A., Niikawa, N., Feinberg, A.P. and Oshimura, M. (1999) LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 1209–1217.
23. Meguro, M., Mitsuya, K., Nomura, N., Kohda, M., Kashiwagi, A., Nishigaki, R., Yoshioka, H., Nakao, M., Oishi, M. and Oshimura, M. (2001) Large-scale evaluation of imprinting status in the Prader-Willi syndrome region: an imprinted direct repeat cluster resembling small nucleolar RNA genes. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 383–394.
24. Nakabayashi, K., Bentley, L., Hitchins, M.P., Mitsuya, K., Meguro, M., Minagawa, S., Bamforth, J.S., Stanier, P., Preece, M., Weksberg, R. *et al.* (2002) Identification and characterization of an imprinted antisense RNA (MESTIT1) in the human MEST locus on chromosome 7q32. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1743–1756.
25. Pahlman, S., Hoehner, J.C., Nanberg, E., Hedborg, F., Fagerstrom, S., Gestblom, C., Johansson, I., Larsson, U., Lavenius, E., Ortoft, E. *et al.* (1995) Differentiation and survival influences of growth factors in human neuroblastoma. *Eur. J. Cancer*, **31A**, 453–458.
26. Spengler, B.A., Biedler, J.L. and Ross, R.A. (2002) A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Cancer Genet. Cytogenet.*, **138**, 177–178.
27. El-Maarri, O., Buiting, K., Peery, E.G., Kroisel, P.M., Balaban, B., Wagner, K., Urman, B., Heyd, J., Lich, C., Brannan, C.I. *et al.* (2001) Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established during or after fertilization. *Nat. Genet.*, **27**, 341–344.
28. Jay, P., Rougeulle, C., Massacrier, A., Moncla, A., Mattei, M.G., Malzac, P., Roëckel, N., Taviaux, S., Lefranc, J.L., Cau, P. *et al.* (1997) The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat. Genet.*, **17**, 357–361.
29. Xiong, Z. and Laird, P.W. (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2532–2534.
30. Hogart, A. and LaSalle, J.M. (2010) Epigenetic Dysregulation of 15q11–13 GABAA Receptor Genes in Autism. In *The Neurochemical Basis of Autism*, Springer, pp. 113–127.
31. Kurukuti, S., Tiwari, V.K., Tavoosidana, G., Pugacheva, E., Murrell, A., Zhao, Z., Lobanekov, V., Reik, W. and Ohlsson, R. (2006) CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 10684–10689.
32. Ohlsson, R., Bartkuhn, M. and Renkawitz, R. (2010) CTCF shapes chromatin by multiple mechanisms: the impact of 20 years of CTCF research on understanding the workings of chromatin. *Chromosoma*, **119**, 351–360.
33. Williams, A. and Flavell, R.A. (2008) The role of CTCF in regulating nuclear organization. *J. Exp. Med.*, **205**, 747–750.
34. Donohoe, M.E., Silva, S.S., Pinter, S.F., Xu, N. and Lee, J.T. (2009) The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature*, **460**, 128–132.
35. Wendt, K.S., Yoshida, K., Itoh, T., Bando, M., Koch, B., Schirghuber, E., Tsutsumi, S., Nagae, G., Ishihara, K., Mishiho, T. *et al.* (2008) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature*, **451**, 796–801.
36. Herzing, L.B., Cook, E.H. Jr. and Ledbetter, D.H. (2002) Allele-specific expression analysis by RNA-FISH demonstrates preferential maternal expression of UBE3A and imprint maintenance within 15q11-q13 duplications. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1707–1718.
37. Kai, Y., Wang, C.C., Kishigami, S., Kazuki, Y., Abe, S., Takiguchi, M., Shirayoshi, Y., Inoue, T., Ito, H., Wakayama, T. *et al.* (2009) Enhanced apoptosis during early neuronal differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance. *Cell Res.*, **19**, 247–258.
38. Lee, C. and Scherer, S.W. (2010) The clinical context of copy number variation in the human genome. *Expert Rev. Mol. Med.*, **12**, e8.
39. Teller, K., Solovei, I., Buiting, K., Horsthemke, B. and Cremer, T. (2007) Maintenance of imprinting and nuclear architecture in cycling cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 14970–14975.
40. Nakatani, J., Tamada, K., Hatanaka, F., Ise, S., Ohta, H., Inoue, K., Tomonaga, S., Watanabe, Y., Chung, Y.J., Banerjee, R. *et al.* (2009) Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11–13 duplication seen in autism. *Cell*, **137**, 1235–1246.
41. Hogart, A., Nagarajan, R.P., Patzel, K.A., Yasui, D.H. and LaSalle, J.M. (2007) 15q11–13 GABAA receptor genes are normally biallelically expressed in brain yet are subject to epigenetic dysregulation in autism-spectrum disorders. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 691–703.
42. Cook, E.H. Jr, Courchesne, R.Y., Cox, N.J., Lord, C., Gonen, D., Guter, S.J., Lincoln, A., Nix, K., Haas, R., Leventhal, B.L. *et al.* (1998) Linkage-disequilibrium mapping of autistic disorder, with 15q11–13 markers. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 1077–1083.
43. Buxbaum, J.D., Silverman, J.M., Smith, C.J., Greenberg, D.A., Kilifarski, M., Reichert, J., Cook, E.H. Jr, Fang, Y., Song, C.Y. and Vitale, R. (2002) Association between a GABRB3 polymorphism and autism. *Mol. Psychiatry*, **7**, 311–316.
44. Martin, E.R., Menold, M.M., Wolpert, C.M., Bass, M.P., Donnelly, S.L., Ravan, S.A., Zimmerman, A., Gilbert, J.R., Vance, J.M., Maddox, L.O. *et al.* (2000) Analysis of linkage disequilibrium in gamma-aminobutyric acid receptor subunit genes in autistic disorder. *Am. J. Med. Genet.*, **96**, 43–48.
45. Delahanty, R.J., Kang, J.Q., Brune, C.W., Kistner, E.O., Courchesne, E., Cox, N.J., Cook, E.H. Jr., Macdonald, R.L. and Sutcliffe, J.S. (2011) Maternal transmission of a rare GABRB3 signal peptide variant is associated with autism. *Mol. Psychiatry*, **16**, 86–96.
46. Chang, J., Zhang, B., Heath, H., Galjart, N., Wang, X. and Milbrandt, J. (2010) Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)-regulated DNA methylation alters CCCTC-binding factor (CTCF)/cohesin binding and transcription at the BDNF locus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 21836–21841.
47. Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U. and Zoghbi, H.Y. (1999) Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.*, **23**, 185–188.
48. Watson, P., Black, G., Ramsden, S., Barrow, M., Super, M., Kerr, B. and Clayton-Smith, J. (2001) Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J. Med. Genet.*, **38**, 224–228.
49. Lam, C., Yeung, W., Ko, C., Poon, P., Tong, S., Chan, K., Lo, I., Chan, L., Hui, J., Wong, V. *et al.* (2000) Spectrum of mutations in the MECP2 gene in patients with infantile autism and Rett syndrome. *J. Med. Genet.*, **37**, E41.
50. Samaco, R.C., Hogart, A. and LaSalle, J.M. (2005) Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: MECP2 deficiency

- causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 483–492.
51. Murrell, A., Heeson, S. and Reik, W. (2004) Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat. Genet.*, **36**, 889–893.
52. Horike, S., Cai, S., Miyano, M., Cheng, J.F. and Kohwi-Shigematsu, T. (2005) Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of *DLX5* in Rett syndrome. *Nat. Genet.*, **37**, 31–40.
53. Yang, T., Adamson, T.E., Resnick, J.L., Leff, S., Wevrick, R., Francke, U., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. and Brannan, C.I. (1998) A mouse model for Prader-Willi syndrome imprinting-centre mutations. *Nat. Genet.*, **19**, 25–31.
54. Leung, K.N., Vallerio, R.O., DuBose, A.J., Resnick, J.L. and LaSalle, J.M. (2009) Imprinting regulates mammalian snoRNA-encoding chromatin decondensation and neuronal nucleolar size. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 4227–4238.
55. Inoue, J., Mitsuya, K., Maegawa, S., Kugoh, H., Kadota, M., Okamura, D., Shinohara, T., Nishihara, S., Takehara, S., Yamauchi, K. *et al.* (2001) Construction of 700 human/mouse A9 monochromosomal hybrids and analysis of imprinted genes on human chromosome 6. *J. Hum. Genet.*, **46**, 137–145.
56. Koi, M., Shimizu, M., Morita, H., Yamada, H. and Oshimura, M. (1989) Construction of mouse A9 clones containing a single human chromosome tagged with neomycin-resistance gene via microcell fusion. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 413–418.

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

和田 崇¹⁾・滝口旗一¹⁾・武内倫子¹⁾・黒木洋祐¹⁾関 信幸¹⁾・高森一乗^{1,2)}・白川哲夫^{1,2)}

要旨：Rett 症候群は主として女兒に発症する疾患で、自閉症状のほか、上下肢の協調運動障害、手もみ様の常同運動、歯ぎしり、息止め発作などを特徴とする。原因遺伝子である *MeCP2* (methyl-CpG binding protein 2) が欠損した雄マウス (*Mecp2*^{-/-}) では、同症候群に類似した無呼吸がみられる。本研究では、*Mecp2*^{-/-}の無呼吸の特性を明らかにする目的で、全身型プレチスモグラフによって無拘束下で呼吸波形を測定して、野生型雄マウス (wild) と比較した。

Mecp2^{-/-}では、1秒以上続く無呼吸の回数が生後5週で wild と比べ有意に多く、7週で無呼吸の回数はさらに増加した。1日の時間帯で無呼吸の回数に違いがあるかどうかを調べる目的で、明期 (7:00~19:00) のうちの4時間 (11:00~15:00) と暗期 (19:00~7:00) のうちの4時間 (23:00~3:00) で比較したところ、5週齢、7週齢いずれにおいても無呼吸回数は明期に多かった。マウスを恒暗条件下に置き、11:00~15:00の時間帯で無呼吸回数を測定して明暗条件下での計測値と比較したところ、wild では違いがみられなかったが *Mecp2*^{-/-}では無呼吸回数が有意に少なかった。これらの結果は、光刺激が *Mecp2*^{-/-}の呼吸中枢に作用して呼吸リズムの形成になんらかの影響を与えている可能性を示唆している。

以上より、本モデルマウスは、Rett 症候群における無呼吸の病態の解明に有用と考えられた。

Key words : Rett syndrome, *MeCP2*, Apnea, Mouse model

緒 言

Rett 症候群は約1万人に1人の頻度で主に女兒に発症する X 連鎖優性遺伝病である。1966年に小児神経科医 Andreas Rett によって初めて報告され¹⁾、1983年の Hagberg らの報告²⁾によって広く知られるようになった。いずれの報告においても、本症は乳児期に正常な発育を示すが、1歳を過ぎて発症した後は、四肢協調運動の障害や上肢の常同運動など特徴的な症状を呈すること、および退行性の経過をたどることが記されている。

その後の研究により、本症は X 染色体上に存在する *MeCP2* (methyl-CpG binding protein 2) の遺伝子変異が発症に直接関与していることが明らかにされた^{3,4)}。Rett 症候群患者は自閉症状、てんかん、重度の精神遅滞、側湾、失調性歩行、睡眠リズムの異常、異常な呼吸パターン、摂食機能障害、歯ぎしり、特有の常同運動 (指打ち、手擦り、手打ちなど)、自律神経障害、

などを特徴とする¹⁻⁷⁾。また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いわれている。これらの呼吸異常は睡眠時には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⁵⁾。

本症の原因遺伝子 *MeCP2* が同定されたのち、そのノックアウトマウスが作成された⁶⁾。*MeCP2* をもたない雄マウス (*Mecp2*^{-/-}) では、出生時には異常がみられないものの、生後3~5週頃からヒトと同じような症状が出現し、通常10週以内に死亡する⁶⁾。

本研究では、*Mecp2*^{-/-}においておおむね生後5週以降に顕在化することが示されている無呼吸の病態について検討する目的で、全身型プレチスモグラフを用いて無拘束下で呼吸波形の測定を行い、呼吸の特性について解析した。また現在のところ、Rett 症候群にみられる息ごらえ発作がなぜ覚醒時のみに出現するのかについて全く不明であることから、*Mecp2*^{-/-}の呼吸波形を明期および暗期でそれぞれ4時間ずつ記録し解析を行った。

材料ならびに方法

1. 実験動物および飼育条件

Mecp2 ヘテロ欠損雌マウス (B6 ; 129 P2-*Mecp2*^{tm1Bird}/J, STOCK # 003890 ; Jackson Labora-

¹⁾ 日本大学歯学部小児歯科学講座
(主任：白川哲夫教授)

²⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所顎口腔機能研究部門
(原稿受付日：平成22年6月15日)
(原稿受理日：平成22年9月6日)

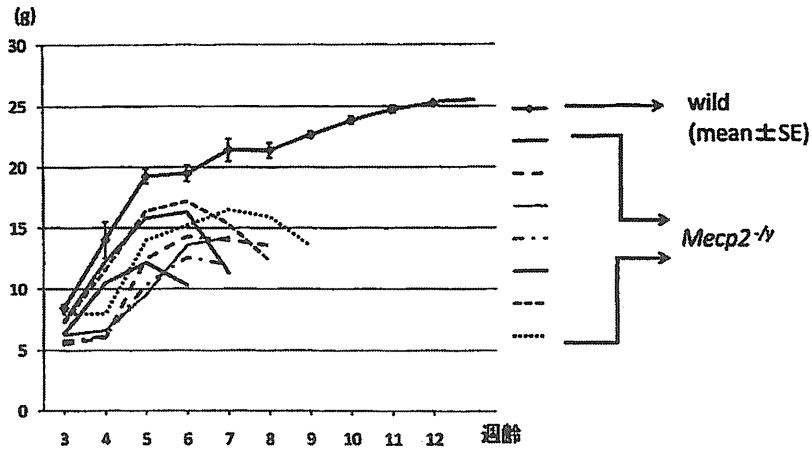


図1 *Mecp2*^{-/-}の体重変化と生存期間

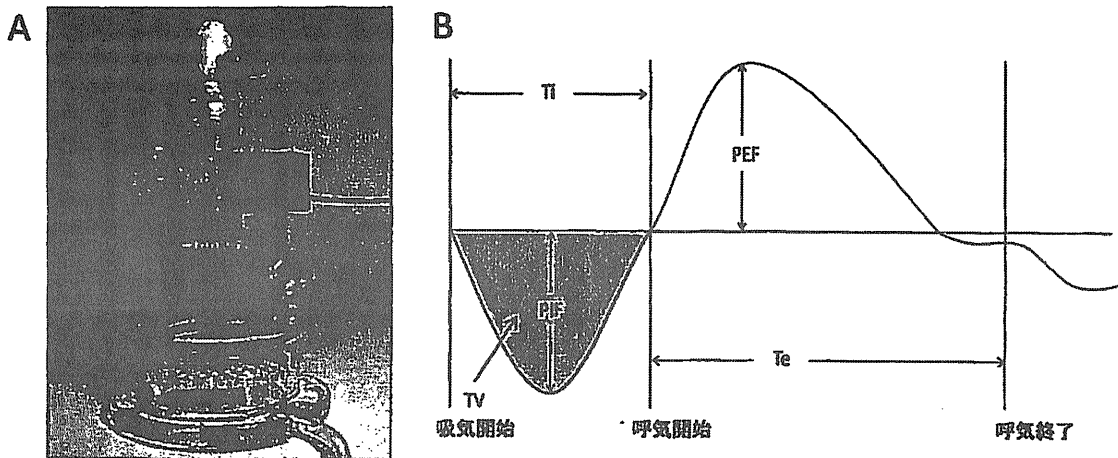


図2

A 全身型プレチスモグラフのチャンパー

B 呼吸波形についての計測パラメータ

tory, Bar Harbor, Maine, USA) 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し, 両者を交配することで *Mecp2*^{-/-} を得た。コントロールとして, C57BL/6J の雄マウス (wild) を用いた。食餌にはマウス・ラット・ハムスター用飼料 MF 飼育用 (オリエンタル酵母工業) 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。出産後, 飼育ケージ内で母親に授乳させ, 生後 21 日に母仔を分離した。離乳後は個体ごとに分離して飼育し, それぞれの仔マウスについて 1 週間ごとに体重を計測した。飼育室の照度は, 蓋を外した状態での飼育ケージの床部での測定で 40~50 lux であった。

MeCP2 タンパクを全く作ることができない *Mecp2*^{-/-} では, 出生時には異常がみられないものの, 生後 3~5 週頃からヒトに類似した無呼吸や運動の異常

が出現し, 症状が徐々に進行して通常 10 週以内に死亡する⁹⁾。予備実験において生後 7 週以降で死亡率が増加し, 生後 8 週以降では呼吸の測定期間中に死亡する個体が見られたことから (図 1), 本研究では 5 週齢および 7 週齢の *Mecp2*^{-/-} を測定対象とした。

なお, 本研究は日本大学歯学部実験動物委員会の承認を得て実施し, 実験動物の取扱いは同委員会の指針に従って行った (承認番号 18-7 2006 歯 007-1, 007-2)。

2. 呼吸測定

週齢が等しい *Mecp2*^{-/-} と wild で呼吸を測定した。マウスを無麻酔の状態で一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (PLY 4211: Buxco Electronics, 大阪) のチャンパー内に入れ (図 2 A), 圧トランスデューサーと増幅器により, 呼吸に伴うチャンパー内の気流変化を検出することにより呼吸波形を連続的に測定・記録した。記録時間は, 暗期の 23:00~3:00 (Dark) および明期の

11:00~15:00 (Light) とし、それぞれ測定開始の4時間前にマウスをチャンパーに入れて測定環境に馴化させたのちデータを記録した。チャンパー内の照度は、床部での測定で10 lux になるよう調節した。

プレチスモグラフによる測定を生後5週と7週で行い、1秒以上の無呼吸の発生回数 (Apnea Counts/4 hr), 呼吸頻度 (Breath/min), 一回換気量 (Tidal Volume: TV), 吸気時間 (Inspiratory Time: Ti), 呼気時間 (Expiratory Time: Te), 最大吸気流量 (Peak Inspiratory Flow: PIF), 最大呼気流量 (Peak Expiratory Flow: PEF) について解析を行った (図2 B)。

また、無呼吸に対する明期の光の影響を検討するため、7週齢の *Mecp2*^{-/-} と wild について、19:00 から恒暗条件にして翌日の11:00~15:00 (Dark 2) に呼吸の測定を行い、無呼吸回数について解析を行った。

3. 統計処理方法

統計学的検定には分散分析を用いた。反復測定を含むデータの統計処理には二元配置分散分析を用い、群間に対応のない場合には一元配置分散分析を用いた。また群間比較には Bonferroni 法を用いた。p 値が0.05 未満であるときに有意差ありとした。

結 果

1. 無呼吸回数

図3 A に *Mecp2*^{-/-} ならびに wild から記録した呼吸波形を示す。wild の安静時の呼吸波形はきわめて安定していた。*Mecp2*^{-/-} では、通常は wild に類似した呼吸波形を示したが、安静時であっても図に示すような無呼吸がしばしば出現した。

Mecp2^{-/-} と wild の無呼吸回数の比較では、*Mecp2*^{-/-} で回数が有意に多かった。*Mecp2*^{-/-} の無呼吸回数は、5週齢と比較して7週齢で増加し (図3 B) (5週 wild: 947±102, *Mecp2*^{-/-}: 2,976±203; 7週 wild: 709±61, *Mecp2*^{-/-}: 4,817±325), いずれの週齢でも暗期に比べ明期で有意に多かった (図3 C) (5週 Dark-wild: 425±54, *Mecp2*^{-/-}: 1,227±115; 5週 Light-wild: 522±60, *Mecp2*^{-/-}: 1,750±312; 7週 Dark-wild: 311±30, *Mecp2*^{-/-}: 1,869±184; 7週 Light-wild: 398±36, *Mecp2*^{-/-}: 2,948±174) (wild: n=8, *Mecp2*^{-/-}: n=7)。明期で無呼吸の回数が増加した理由として、飼育室の光環境が関与している可能性が考えられたため、恒暗条件下で呼吸波形を測定したところ、*Mecp2*^{-/-} の Dark 2 での無呼吸回数は、明暗条件下の Light と比較して有意に少なかった (図3

D) (Dark 2-*Mecp2*^{-/-}: 1,876±287, n=7)。一方、wild では *Mecp2*^{-/-} でみられた無呼吸についての光環境の影響は認められなかった (Dark 2-wild: 406±50, n=8)。

2. 呼吸頻度

5週齢, 7週齢ともに wild に比べ *Mecp2*^{-/-} で呼吸頻度が有意に低かった。また明期と暗期の比較では、*Mecp2*^{-/-} ならびに wild ともに明期で呼吸頻度が低かった (図4 A)。

3. 一回換気量

5週齢, 7週齢ともに *Mecp2*^{-/-} は wild に比べて有意に低い値を示した。また明期と暗期の比較では、*Mecp2*^{-/-} ならびに wild ともに明期のほうが有意に低かった (図4 B)。

4. 吸気時間, 呼気時間

吸気時間について5週齢では *Mecp2*^{-/-} と wild で差がみられなかったが、7週齢では wild に比べ *Mecp2*^{-/-} が有意に長かった。一方、呼気時間は5週齢, 7週齢ともに wild に比べ *Mecp2*^{-/-} が有意に長かった。また吸気時間および呼気時間についての明期と暗期の比較では、5週齢, 7週齢ともに明期で有意に長かった (図4 C, D)。

5. 最大吸気流量, 最大呼気流量

5週齢, 7週齢ともに、いずれの流量についても *Mecp2*^{-/-} は wild に比べて有意に少なかった。また明期と暗期の比較では、5週齢, 7週齢ともに明期で有意に少なかった (図4 E, F)。

考 察

呼吸異常は Rett 症候群患者にみられる主要な症状の一つであり、無呼吸に伴って過呼吸がみられることも多く、また息ごらえ発作を呈する場合もある^{2,5)}。このような Rett 症候群の呼吸異常は中枢性であり、呼吸リズムを作り出している中枢あるいはそれを調節する機構になんらかの異常があることが推測されている⁹⁾。しかしながら、現在のところ Rett 症候群患者の中枢でどのような病的変化が生じているのかについての報告は少なく^{10,11)}、実体はほとんど明らかにされていない。

興味深いことは、Rett 症候群患者の覚醒時においてみられる無呼吸発作が、睡眠時にはほとんど出現しないことである¹²⁾。このことは、Rett 症候群において、睡眠覚醒に関わる脳機能あるいは外界の明暗環境が呼吸リ

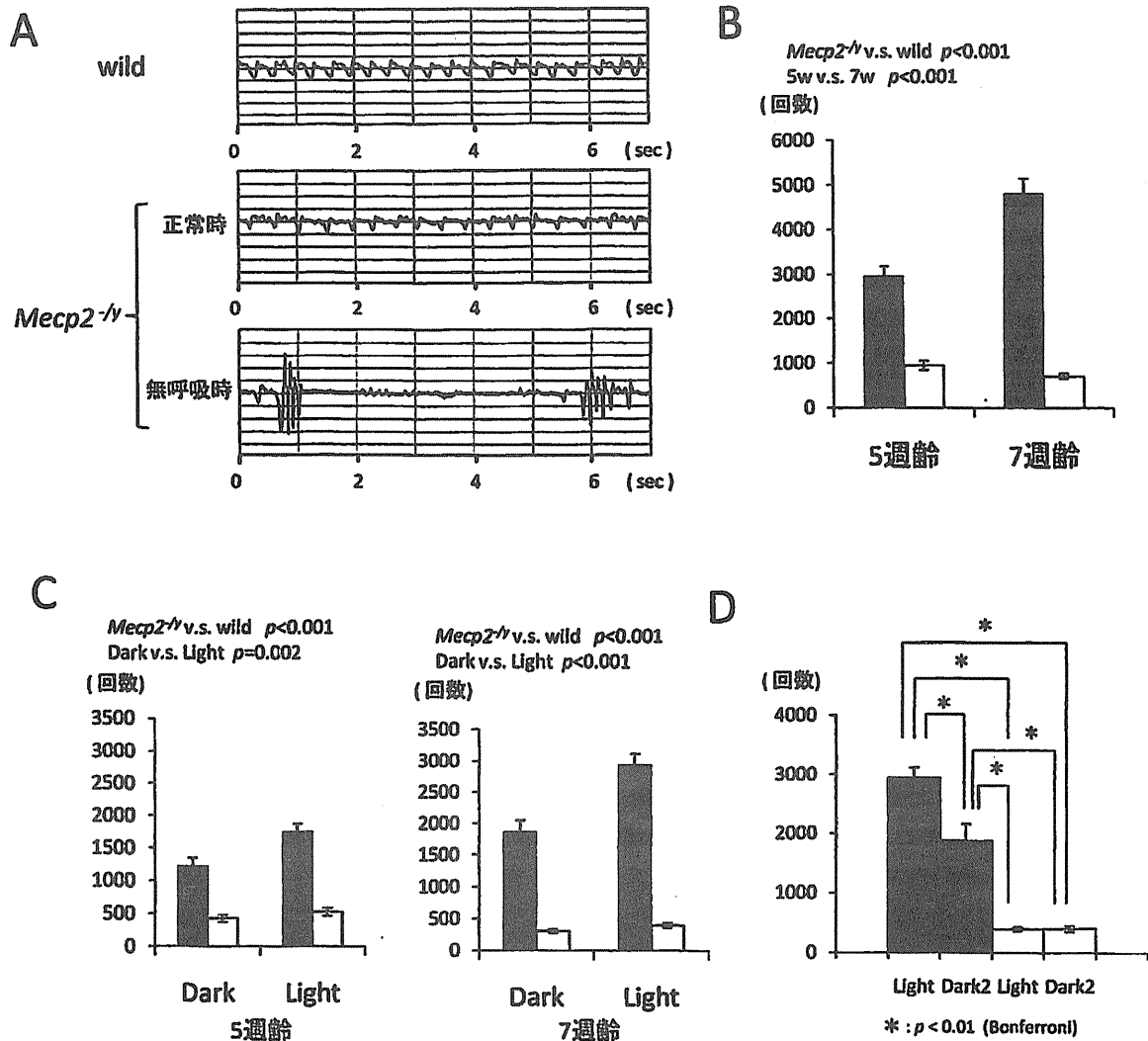


図3

- A 呼吸波形 (7週齢)
- B 無呼吸回数：明期と暗期の各4時間の合計値の比較
- C 無呼吸回数の明期と暗期の比較
- D 明暗条件下 (Light) と恒暗条件下 (Dark 2) での無呼吸回数の比較
- Mecp2^{-/-} (n=7)
- wild (n=8)

ズム中枢あるいはその調節系に対してなんらかの影響を与えている可能性を示唆する。また、精神の緊張時に無呼吸発作が顕著になることから、睡眠覚醒や明暗条件以外にも呼吸異常を誘発する要因があることが推測され、その有力候補として自律神経系の異常、特に交感神経系と副交感神経系のバランスの乱れが考えられている⁹⁾。本研究では、ヒトに類似した症状を示す Mecp2^{-/-}の呼吸について解析することで、MeCP2の機能異常あるいは欠失が、呼吸調節系にどのような病的変化を惹起しているのかについて調べた。

無呼吸回数が増加する要因として光による直接の影響を考え、マウスを通常の明暗条件ではなく、本来明期で

あるはずの時間帯も暗くする恒暗環境において無呼吸への影響を調べたところ、恒暗条件下の11:00~15:00の時間帯での無呼吸回数について、Mecp2^{-/-}では明暗条件下と比較して有意に無呼吸回数が減少していた。このことは、網膜を介して中枢に伝わった光刺激が、なんらかの経路を通じて呼吸リズムを作り出している中枢に影響を与えていることを示唆している。一方で7週齢のwildでは、そのような光の影響は全く認められなかった。これらのことから、Mecp2^{-/-}については生後7週においても呼吸中枢あるいはその調節系の成熟が不十分か、または機能的に不安定であり、wildマウスに比べて著しく光の影響を受けやすい状態にあると推測された。

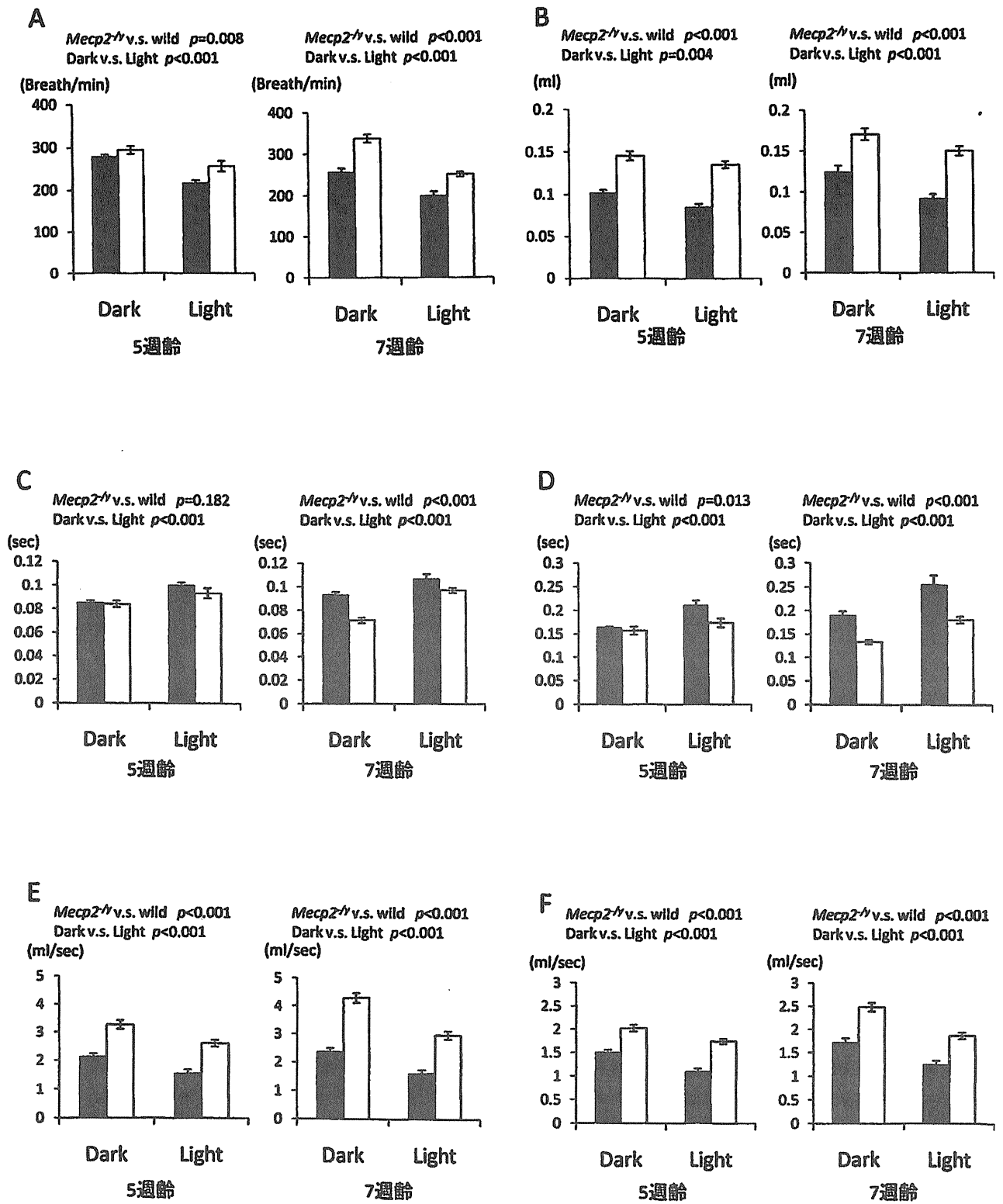


図 4

A 呼吸頻度
 B 一回換気量
 C 吸気時間
 D 呼気時間
 E 最大吸気流量
 F 最大呼気流量

■ *Mecp2^{-/-}* (n=7)
 □ wild (n=8)

呼吸頻度, 一回換気量, 呼気時間, 吸気時間, 最大吸気流量, 最大呼気流量を明期と暗期で比較した結果では, *Mecp2*^{-/-}と wild は同じ傾向を示した。この結果は, サーカディアンリズムを作り出している中枢の基本的な機能が, *Mecp2*^{-/-}においても, 少なくとも生後7週の時点で維持されていることを示している。

Mutohらは光刺激がサーカディアンリズムの中枢である視交叉上核を介してマウスの副交感神経を抑制することを明らかにした¹³⁾。Rett症候群患者において無呼吸発作が精神的緊張時に多くみられるという報告から, 精神的緊張に伴う交感神経の興奮, あるいは副交感神経の抑制が無呼吸の発生に関与していることが示唆されるが, 光刺激がマウスの副交感神経系を抑制することと併せて考えると, *Mecp2*^{-/-}でみられた明期における無呼吸エピソードの増加には, 光刺激による副交感神経の抑制が関与している可能性がある。

ヒトにおいてマウスと同様に光刺激が自律神経系を介して Rett 症候群の病態に影響を与えているのかどうかは興味深い問題である。一般の障害者と同様に, Rett 症候群患者にとっても歯科治療が精神的, 肉体的ストレスになっていることは否定できない。もし, 歯科的ストレスに加えて診療室の比較的明るい環境も無呼吸発作に影響しているならば, 遮光を工夫することで無呼吸の発生を制御できる可能性があり, 今後, 注意深い検証が必要と思われる。

Rett 症候群患者の神経学的予後を改善する治療は今のところない。現在の Rett 症候群患者に対する医療は, 補助医療や対症療法に焦点が当てられている。Rett 症候群患者の髄液でオピオイドの上昇が観察され, オピオイド拮抗薬ナルトレキソンの経口投与の効果が研究された。それによると呼吸の不整の減少を認めたが, 薬の鎮静作用の影響もあるため, その効果についてまだ確定的とはいえない¹⁴⁾。なお, ジアゼパムの経口投与により, 無呼吸発作の著明な改善が認められたとの国内の医療機関からの報告があることから¹⁵⁾, 今後, *Mecp2*^{-/-}の呼吸異常について, ジアゼパムなどの薬物の効果を個体レベル, 組織レベルで検討していく必要があると考えられる。

結 論

Mecp2^{-/-}では, 生後5週から7週にかけて無呼吸回数が著しく増加した。無呼吸回数は暗期に比べ明期に多く, 無呼吸の発生に光の刺激が直接関与している可能性が示唆された。

本研究は, 学術フロンティア推進プログラム, 日本学術振興会科学研究費補助金 No.18390551 および No.19659544, ならびに平成21年度日本大学大学院歯学研究科共同研究費および佐藤研究費により実施した。

本研究の成果の一部は第26回日本障害者歯科学会学術大会(2009年10月30日, 名古屋)において発表した。

文 献

- 1) Rett, A.: On a unusual brain atrophy syndrome in hyperammonemia in childhood. *Wien Med. Wochenschr.*, 116: 723-726, 1966.
- 2) Hagberg, B., Aicardi, J., *et al.*: A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: Report of 35 cases. *Ann. Neurol.*, 14: 471-479, 1983.
- 3) Xiang, F., Zhang, Z., *et al.*: Chromosome mapping of Rett syndrome: a likely candidate region on the telomere of Xq. *J. Med. Genet.*, 35: 297-300, 1998.
- 4) Amir, R. E., Van den Veyver, I. B., *et al.*: Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.*, 23: 185-188, 1999.
- 5) Nomura, Y., Segawa, M., *et al.*: Rett syndrome-clinical studies and pathophysiological consideration. *Brain Dev.*, 6: 475-486, 1984.
- 6) Motil, K. J., Schultz, R. J., *et al.*: Oropharyngeal dysfunction and gastroesophageal dysmotility are present in girls and women with Rett syndrome. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 29: 31-37, 1999.
- 7) Takamori, K., Kuroshita, R., *et al.*: Electromyographic analysis of bruxism in a patient with Rett syndrome. *Ped. Dent. J.*, 18: 214-217, 2008.
- 8) Guy, J., Hendrich, B., *et al.*: A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.*, 27: 322-326, 2001.
- 9) Katz, D. M., Dutschmann, M., *et al.*: Breathing disorders in Rett syndrome: progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 168: 101-108, 2009.
- 10) Saito, Y., Ito, M., *et al.*: Reduced expression of neuropeptides can be related to respiratory disturbances in Rett syndrome (Suppl.). *Brain Dev.*, 23: 122-126, 2001.
- 11) Itoh, M., Ide, S., *et al.*: Methyl CpG-binding protein 2 (a mutation of which causes Rett syndrome) directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse and human brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 66: 117-123, 2007.
- 12) Julu, P. O., Kerr, A. M., *et al.*: Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch. Dis. Child.*, 85: 29-37, 2001.

- 13) Mutoh, T., Shibata, S., *et al.* : Melatonin modulates the light-induced sympathoexcitation and vagal suppression with participation of the suprachiasmatic nucleus in mice. *J. Physiol.*, 547 : 317-332, 2003.
- 14) Christodoulou, J. and Ho, G. : MECP2-related disorders. *Gene Reviews.*, 2001.
- 15) 栗原まな, 熊谷公明, 他 : Diazepamが無呼吸発作に奏功した Rett 症候群の 6 歳女児例 ポリグラフによる検討. *脳と発達*, 33 : 58-62, 2001.

Breathing Difficulties in a Mouse Model of Rett Syndrome with a *MeCP2*-null Mutation

WADA Takashi¹⁾, TAKIGUCHI Hatakazu¹⁾, TAKEUCHI Michiko¹⁾, KUROKI Yosuke¹⁾, SEKI Nobuyuki¹⁾, TAKAMORI Kazunori^{1,2)} and SHIRAKAWA Tetsuo^{1,2)}

¹⁾Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry
(Chief : Prof. SHIRAKAWA Tetsuo)

²⁾Division of Oral and Craniomaxillofacial Research, Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry

Rett syndrome is an X-linked neurodevelopmental disease accompanied by complex, disabling phenotypes, including breathing symptoms. This syndrome mainly affects females, and the patient exhibits stereotyped hand movements, impaired coordination of limbs, grinding of teeth, breath-holding, etc. Because Rett syndrome is caused by mutations in the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 (*MeCP2*), we used *MeCP2*-deficient mice as a model of this syndrome and measured respiratory functions by using whole-body plethysmography.

Heterozygous female mice (B6 ; 129P2-*Mecp2*^{tm1Bird}/J : Jackson Laboratory) were mated with male C57BL/6J mice in an animal experiment facility at the Nihon University School of Dentistry, and hemizygous *MeCP2*-deficient males (*Mecp2*^{-/-}) were obtained. The breathing pattern of *Mecp2*^{-/-} and male C57BL/6J mice was measured at 5 and 7 weeks of age under a 12 : 12 light-dark cycle (lights on : 7 : 00-19 : 00), and apnea counts, respiration frequency, tidal volume, inspiratory time, expiratory time, peak inspiratory flow, and peak expiratory flow were calculated using software (Buxco Electronics) for analyzing plethysmographic data.

Apnea counts increased with the progress of symptoms at 7 weeks of age in *Mecp2*^{-/-} and the counts were larger during the light phase (11 : 00-15 : 00) than the dark phase (23 : 00-3 : 00). When the animals were placed in constant darkness and the apnea counts during 11 : 00-15 : 00 were compared to the counts obtained under the 12 : 12 light-dark condition, it became apparent that the elimination of light significantly reduced the apnea counts in *Mecp2*^{-/-} but not in male C57BL/6J mice.

These results indicate that the *MeCP2*-null mutation causes progressive breathing difficulties that are more prominent during the light phase than the dark phase. Turning the light off may ameliorate the breathing difficulties in *Mecp2*^{-/-}.

