

201224119A

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

レット症候群の早期診断と治療をめざした  
統合的研究

（H24-神経・筋-一般-007）

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成25（2013）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

レット症候群の早期診断と治療をめざした  
統合的研究

(H24-神経・筋-一般-007)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成25（2013）年 3月

# 目 次

I. 総括研究報告	-----	3
レット症候群の早期診断と治療をめざした統合的研究		
伊藤 雅之	-----	4
( 図 1 ) レット症候群患者データベースの運用構想		
( 資料 1 ) レット症候群診断基準		
( 資料 2 ) レット症候群患者データベースのための登録票		
II. 分担研究報告	-----	13
1. レット症候群患者データベース構築と運用に関する研究		
伊藤 雅之	-----	14
2. <i>MECP2</i> 遺伝子変異の生物学的解析		
伊藤 雅之	-----	16
3. 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と再生医療技術を利用した病態解明に関する研究		
松石豊次郎	-----	18
4. レット症候群モデルマウスの呼吸機能異常に関する研究		
白川 哲夫	-----	22
5. レット症候群の臨床遺伝学的研究		
高橋 悟	-----	24
6. レット症候群のモデルマウスを用いたIGFBP3過剰発現の影響		
青天目 信	-----	28
7. インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析		
堀家 慎一	-----	30
8. 非典型レット症候群の原因遺伝子 <i>CDKL5</i> の遺伝子変異による病態機序の解析		
田中 輝幸	-----	32
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	35
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	39

# I. 総括研究報告

レット症候群の早期診断と治療をめざした統合的研究

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター 室長

研究要旨

レット症候群(RTT)は年齢依存的に多彩な症状を呈する特異な発達障害である。RTTの原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2(MECP2)の基礎研究は進展しているものの、臨床研究は少なく、確立された治療法や療育法がない。本研究では、患者データベース(DB)を構築し、基礎研究とあわせてトランスレーショナルリサーチを展開し、科学的根拠に基づいた生物マーカーと早期診断法を確立し、創薬・治療法の開発を目指す。

DBの構築は臨床医、臨床遺伝医、基礎研究者、患者代表者などによる研究チームを組織し、患者登録制によるDBシステムを作った。また、これまでの見直しにより新たに診断基準を作成した。

臨床研究では、グレリンの生物学的意義を検証し、有効性が示唆された。また、CDKL5とFOXG1の臨床遺伝学的意義を評価し、診断基準への適合を検討し、臨床病型と遺伝子異常との異同を明らかにした。

基礎研究では、MECP2のメチル化DNA結合領域(MBD)の点変異の研究より、臨床症状の軽症化に関与する候補分子の同定を行なった。マウス骨髄移植の技術的確立とMecp2欠損アストロサイトの生物学的意義を解明した。また、Mecp2欠損マウスの呼吸生理の病態を調べ、治療法開発の足がかり的研究を行った。IGFBP3の過剰発現が脳にもたらす影響を調べ、シナプスの安定化に関与していることを明らかにした。さらに、15q11-13領域のMECP2を介する遺伝子発現制御機構を解明し、非典型(早期発症てんかん)RTTの原因遺伝子であるCDKL5の発症機序を明らかにした。

分担研究者

松石豊次郎 久留米大学医学部 教授  
白川 哲夫 日本大学歯学部 教授  
高橋 悟 旭川医科大学 講師  
青天目 信 大阪大学医学部 特任助教

研究協力者

堀家 慎一 金沢大学学術総合センター 准教授  
田中 輝幸 東京大学医学部 准教授  
栗政 明弘 鳥取大学医学部 准教授  
立森 久照 国立精神・神経医療研究センター室長  
梶浦 一郎 大阪発達総合療育センター 理事長  
森崎市治郎 大阪大学歯学部 教授  
原 宗嗣 久留米大学医学部 助教  
西 芳寛 久留米大学医学部 講師  
谷岡 哲次 NPOレット症候群支援機構 理事長

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、自閉性行動障害、てんかんを主徴とし、呼吸運動異常や心電図異常、側彎症など年齢依存的に多彩な症状を呈する疾患である。RTTの原因遺伝子としてメチル化CpG結合タンパク2(MECP2)が解明されたが、その複雑な分子機構と多彩な症状、診断の困難さにより臨床研究の進展は少なく、確立された治療法や療育法がない。本研究では、これまでの疫学研究から患者データベース(DB)を構築し、基礎研究とあわせてトランスレーショナルリサーチを展開し、科学

的根拠に基づいた生物マーカーと早期診断法を確立し、創薬・治療法の開発を目指す。

DBの構築は臨床医、臨床遺伝医、基礎研究者、患者代表者などによる研究チームを組織し、諸外国を含めた広範な情報収集と意見交換を行ない、患者登録制によるDBシステムを作った。これにより、臨床研究の基盤を作り上げる。

臨床研究では、生物学的マーカーとしてのグレリン(GRL)の意義を検証した。さらに、2010年の国際的診断基準改訂をもとに、CDKL5とFOXG1の臨床遺伝学的意義を評価し、我々の診断基準への適合を検討する。基礎研究では、MECP2のメチル化DNA結合領域(MBD)の点変異がもたらす生物学的影響を解明する。骨髄移植および幹細胞移植療法をめざし、ES細胞とiPS細胞の樹立と臨床応用を展開する。また、RTTの呼吸生理に関する病態を調べた。IGFBP3の症状形成の分子病態的解析を行い、治療法開発のための基盤研究を進める。さらに、RTTおよびMECP2に関与する病態として、15q11-13領域のMECP2を介する遺伝子発現制御機構を解明し、非典型(早期発症てんかん)RTTの原因遺伝子であるCDKL5の発症機序を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 患者データベース: DB研究チームにより患者DBのあり方を検討した(図1)。これに基づき、これまでの疫学研究を参考に患者登録票を作成した(資料2)。あわせて、患者登録票記入のための手引きを作成した。また、これまでの診断基準を見直し、国際的な

基準をもとに診断基準を作成した（資料1）。

(2) 臨床研究：①生物マーカーとしてのGRLを検証した。レット症候群女児（RTT症例）および年齢・性別等を一致させた疾患コントロール（てんかん/精神発育遅滞症例（EP/MR症例））の空腹時GRL、GH、IGF-1の血中濃度を測定し、身体パラメーター（身長、体重、頭周囲長、BMI）との相関について比較検討した。②*CDKL5*と*FOXG1*の臨床遺伝学的意義を調べるために、非典型的レット症候群を疑われ、*MECP2*遺伝子異常のない患者を対象とし、*CDKL5*あるいは*FOXG1*遺伝子の塩基配列決定法を行なった。必要に応じてmultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法あるいは定量的PCR (qRT-PCR)を行なった。

(3) 基礎研究：①*MECP2*のMBDの変異発現ベクターを作成し、マウス線維芽細胞に導入し、ヘテロクロマチンの集積性とその構造の影響と重症度との関連性を検討し、網羅的発現解析を行なった。②骨髄移植の解析では、放射線照射後マウスにGFP発現骨髄細胞を移植した。また、*Mecp2*欠損マウスからアストロサイト初代培養を行ない、細胞傷害に対する細胞生存率をWST-8 assayで評価し、グルタミン酸 (Glu) 代謝能を1mM Gluを添加後経時的に培養上清中のGlu濃度を測定して評価した。③RTTの呼吸病態解析では、全身型プレチスモグラフを用いて呼吸波形を1時間

(2-3週齢)と24時間(7週齢)連続で記録し、1秒以上の無呼吸の回数を調べ、病理学的解析を行なった。病理学的解析では、8週齢脳組織の小胞膜モノアミントランスポーター2 (VMAT2) の免疫組織化学を行い、自律神経中枢のdorsal motor nucleus of the vagus (DMV) と呼吸リズム形成を担っているnucleus of the solitary tract (NST) およびventral respiratory group (VRG) のVMAT2陽性puncta数を明視野画像処理ソフトウェア (ImagePro7.0) を用いて解析した。また、ミルナシプラン (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬) の内服効果を調べた。④*IGFBP3*のRTTの病態への影響を調べるために、*hIGFBP3*過剰発現マウスを作成し*Mecp2*欠損マウスと交配し、二重変異 (*hIGFBP3*<sup>+</sup>/*Mecp2*<sup>-</sup>) マウスを作成した。このマウスの生後42日の体重と脳重量、体性感覚野の皮質厚、Golgi染色による体性感覚野第V層の先端樹状突起の基部から100μmの分岐数、樹状突起上のシナプスボタンの形態 (filopodia spine、mushroom spine) の数を比較した。⑤15q11-13領域のインプリンティングセンター (PWS-IC) の機能を調べるために、特定性由来ヒト15番染色体を1本保持したマウスF12細胞 (神経様細胞株) のPWS-IC欠失改変ヒト15番染色体を構築し、qRT-PCR、DNAメチル化解析、DNA-FISH法、ChIP法で15q11-q13領域のクロマチン動態と遺伝子発現を解析した。⑥*Cdk15* 欠損マウスの表現型解析 (形態学的解析、電気生理学的解析、行動解析) を行なった。また、CDKLリン酸化基質スクリーニングをbaculovirus発現系を用いて行なった。

(倫理面への配慮) 本研究では、各研究施設の当該委員会等において承認済み、あるいは承認申請中である。臨床研究では、事前に書面で承諾・不承諾をはかり、本人および保護者の承諾下で施行した。また、回収されたデータは個人照合が出来ないように、データ収集の時点から匿名化を徹底した。学内外の種々の指針や法令を遵守し実施した。

### C. 研究結果

(1) 患者データベース：DBシステムを作った (図1)。これに基づき、患者団体および研究班のホームページに登録票と手引き (資料2) を案内した。また、診断基準を作成した (資料1)。

(2) 臨床研究：①GRLの検証では、RTT症例の体重と血中GRL濃度で負の相関が認められた。しかし、RTT症例の身長、BMIとGRL濃度の間には有意な相関は認められなかった。RTT症例、EP/MR症例ともに、その頭周囲径はGRL濃度と正相関を、血中IGF-1濃度とは負相関を示した。前思春期では、RTT症例の活性型GRLの比率がEP/MR症例の比率より高かった ( $p < 0.05$ )。②非典型的RTTの診断基準に合致したのは、*CDKL5*遺伝子異常1例 (1/2)、*FOXG1*遺伝子異常1例 (1/3) であった。診断基準に合致しなかったのは、重度の精神運動発達遅滞のために“退行”が困難な症例であった。

(3) 基礎研究：①*MECP2*のMBD領域の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を見出し、発現解析の結果、変異に特異的な異常発現分子を2つ同定した。②放射線照射後マウスにGFP発現骨髄細胞を移植し、生着した。また、アストロサイトの初代培養では野生型に比しGFAPとS100βの発現が2-3倍していた。Glu代謝能解析では、*Mecp2*欠損は細胞増殖や生存率に影響をしなかったが、Gluトランスポーター (EAATs) と合成酵素 (GS) の発現を調べた結果、これらの遺伝子発現に異常が認められた。③RTTの呼吸病態解析では、生後2-3週齢の*Mecp2*欠損マウスは野生型に比し無呼吸回数が増加し、生後7週では暗期に比べ明期で無呼吸回数の有意な増加がみられた。病理学的には、DMVとNST、VRGは野生型に比べVMAT2陽性puncta数の著しい減少がみられた。また、生母の遺伝子型の影響を調べた結果、生後2週から7週まではヘテロ接合雌由来野生型の無呼吸回数は野生型雌由来野生型の無呼吸回数に比べ有意に多かった。さらに、ミルナシプランの長期経口投与で、無呼吸回数の有意な減少がみられた (*Mecp2*欠損マウスの寿命は約20%延長した)。④*hIGFBP3*/*Mecp2*マウスの体重は  $11.95 \pm 15.39$ gで*Mecp2*欠損マウスと差がなかった ( $p > 0.05$ )。また、脳重量は  $0.28 \pm 0.00$  g ( $p < 0.05$ )、大脳皮質厚は  $940.83 \pm 1782.73$  μm ( $p > 0.05$ )、分岐数は  $6.05 \pm 0.66$  本 ( $p > 0.05$ )、filopodia spineは  $79.4 \pm 301.72$  本 ( $p > 0.05$ )、mushroom spineは  $3.13 \pm 0.59$  本 ( $p < 0.05$ ) であった。⑤ヒト染色体工学技術を用いてPWS-IC欠失改変母方15番染色体および改変父方15番染色体の構築に成功した。PWS-IC欠失染色体

で、15q11-13領域の解析で父方特異的なMAGEL2遺伝子の発現低下が認められた。また、DNA-FISH法により、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集はPWS-ICを欠失したにも関わらずクロマチン脱凝集状態を維持していた。一方、PWS-IC欠失母方染色体では異所的クロマチン脱凝集が起こっていた。

⑥*Cdk15*欠損マウスは海馬神経細胞樹状突起の長さ、分枝、樹状突起スパイン形態・密度に異常が認められた。また、過剰な易けいれん性がみられ、海馬の長期増強 (LTP) の異常等を同定した。行動解析では、不安様行動とうつ様行動の亢進等の情動異常、記憶障害、社会性の異常、日内行動の異常等を同定した。生化学的手法を用いたKOマウスの興奮性シナプス解析により、グルタミン酸受容体サブユニットの異常を同定した。さらに、CDKL5リン酸化基質スクリーニングから複数の結合蛋白質候補を得た。

#### D. 考察

(1) 患者データベース：疾患DBは、その疾患の実態を解明するだけでなく、患者・医療者・研究者をつなぎ、治療への基盤データとして重要である。今回作成したDBは、患者（およびその家族）主導による患者登録制はこれまでに数少ない。患者（およびその家族）が積極的に関わることで、研究への理解と課題の共有化が期待できる。全国的に3つレット症候群の患者団体が知られているが、その数は患者総数の半分に満たない。今後の課題として、登録患者数をいかに増やすかが重要である。

(2) 臨床研究：①前思春期における活性型GRL比率がRTTの身体発育（低身長・小頭症）の生物マーカーとなる可能性が推定された。今後さらに症例数を増やした検討が必要である。②非典型RTTはRTTの診断基準の全てを満たさないが、類似した症状を示すものと理解される。典型的RTTでは3歳以前にてんかんを発症することはまれであるが、*CDKL5*遺伝子異常の患者は乳児期早期から難治性てんかんを発症し、それ以外の症状は多彩である。その要因として、*CDKL5*遺伝子発現のX染色体不活化パターンの影響が考えられる。非典型RTTの診断基準に合致しなかったのは、運動機能・言語機能の発達障害が重度であった症例である。*FOXP1*遺伝子異常の症例の特徴は乳児期早期からの精神運動発達遅滞と小頭症である。*FOXP1*遺伝子は14番染色体（14q12）上にあり、患者間の臨床症状の重症度は比較的均一である。乳児期から重度の精神運動発達遅滞を呈するために、退行があると判断することが難しい症例が多い。今後、患者DBにより、これらの疾患の臨床症状の特徴が明らかになり、典型的RTTとの違いが明確になることが期待される。

(3) 基礎研究：①MBDの点変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、MECP2の標的遺伝子の動態に影響を及ぼしていることが想定される。さらに解析を進め、軽症化に特有の遺伝子発現を見つけ出すことが期待できる。②骨髄の移植細胞のキメラ化が確認された。

今後、生存個体の各種臓器への移植細胞生着状況を調べる。GRL併用による移植細胞の生着率も解析し、*Mecp2*欠損マウスの効率的な骨髄移植手技を確立する。*Mecp2*がアストロサイトに発現し、細胞の生存率に影響しないが、アストロサイトの特異的遺伝子発現に関与している。また、Glu代謝の関与が示唆された。③*Mecp2*欠損マウスの無呼吸回数が明期に多いことは、明期の光刺激が自律神経系に影響し、呼吸を不安定化させている可能性が考えられ、今後検討が必要である。延髄呼吸関連中枢のモノアミン作動性シナプスの減少とミルナシプランの無呼吸回数の改善は、RTTにみられる無呼吸発作にセロトニンあるいはノルアドレナリン神経伝達の低下が関与するという仮説を支持する。今後、他の神経伝達物質の関与についても検討する必要がある。また、生母マウスの遺伝子型の違いが無呼吸回数に影響していたことはヘテロ接合母マウスの何らかの病的因子が仔の呼吸中枢の発達を遅延させていることを示唆している。今後、分子遺伝学的解析が必要である。④*hIGFBP3*/*Mecp2*マウスは*Mecp2*欠損マウスに比して、体重は有意差はないが、脳重量は有意に軽かった。また、先端樹状突起の分岐数やfilopodia spine数には差がなかったが、mushroom spine数は有意に減少していた。安定して存続する成熟型spineであるmushroom spineは、IGFBP3過剰発現により神経伝達の障害が示唆される。また、IGFBP3はIGF-1の機能発現に重要な分子であり、IGFBP3の動態を詳細に調べることで生物マーカーや治療法開発へ進展させることが可能性である。⑤PWS-IC欠失父方染色体で父方アレル特異的なクロマチン脱凝集が維持されていたことは、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集の形成・維持に父性発現するncRNAや*UBE3A-ATS*を必要としないことを意味している。また、PWS-IC欠失母方染色体で異所的クロマチン脱凝集が生じたことはMeCP2などのメチル化CpGを認識する分子が正常母方アレルのコンパクトなクロマチン状態の維持に重要であることが示された。今後、15q11-13領域のクロマチン状態の形成・維持に関わる因子を同定すると共に、MeCP2を介した遺伝子発現制御機構を明らかにする。さらに、RTTの治療ターゲット分子の同定を試み、治療法の開発へ発展させる。⑥*CDKL5*遺伝子変異による発達障害の病態がシナプス機能異常であることが初めて明らかとなった。

#### E. 結論

(1) 患者データベース：RTTのDBを構築した。あわせて、診断基準の見直しを行なった。今後、セミナー等の広報活動を通して、患者データベースへの登録数を増やす。

(2) 臨床研究：①RTTの身体発育マーカーとしてGRLを含めたGH-IGF-1系のホルモン測定の部分的有效性が推定できた。②*CDKL5*あるいは*FOXP1*の遺伝子異常患者の中には、重度の精神運動発達遅滞のために退行の判断が困難であり、非典型RTTの診断基準に合致しな

い症例もある。

(3) 基礎研究：①MECP2のMBD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。さらに、解析を進め、治療法開発へ発展させる。②骨髄キメラマウスを作出した。今後、骨髄移植技術の改良とGRL投与による補助療法の研究を進める。また、*Mecp2*欠損アストロサイトの発現異常やグルタミン酸代謝の影響は病態の一部を説明できる。今後、マウス由来iPS細胞の効率良い分化誘導系の開発を進める。

③*Mecp2*欠損マウスは明期の無呼吸発生回数が増加し、ミルナシプランが改善した。このことから、自律神経系のセロトニンあるいはノルアドレナリン神経伝達を改善させることで呼吸機能を含めたRTTの症状を改善できることが示唆された。④*hIGFBP3*<sup>+/+</sup>/*Mecp2*マウスの成熟spineの減少は、RTTの神経機能障害との関連性が考えられる。治療法開発の糸口となる可能性が示された。⑤MeCP2による15q11-13領域の遺伝子発現制御機構の解明は、RTTの複雑な病態を明らかにする上で重要である。15q11-q13領域のクロマチン脱凝集にPWS-IC結合因子の重要性を明らかにした。この領域の分子機構の解明はRTTのみならずASやPWS、自閉症などの分子病態解明につながる。⑥*Cdk15*欠損マウスでは、海馬神経細胞樹状突起とスパインの形態とシナプス機能の異常があり、行動解析の結果と一致していた。

F. 健康危険情報  
なし。

G. 研究発表

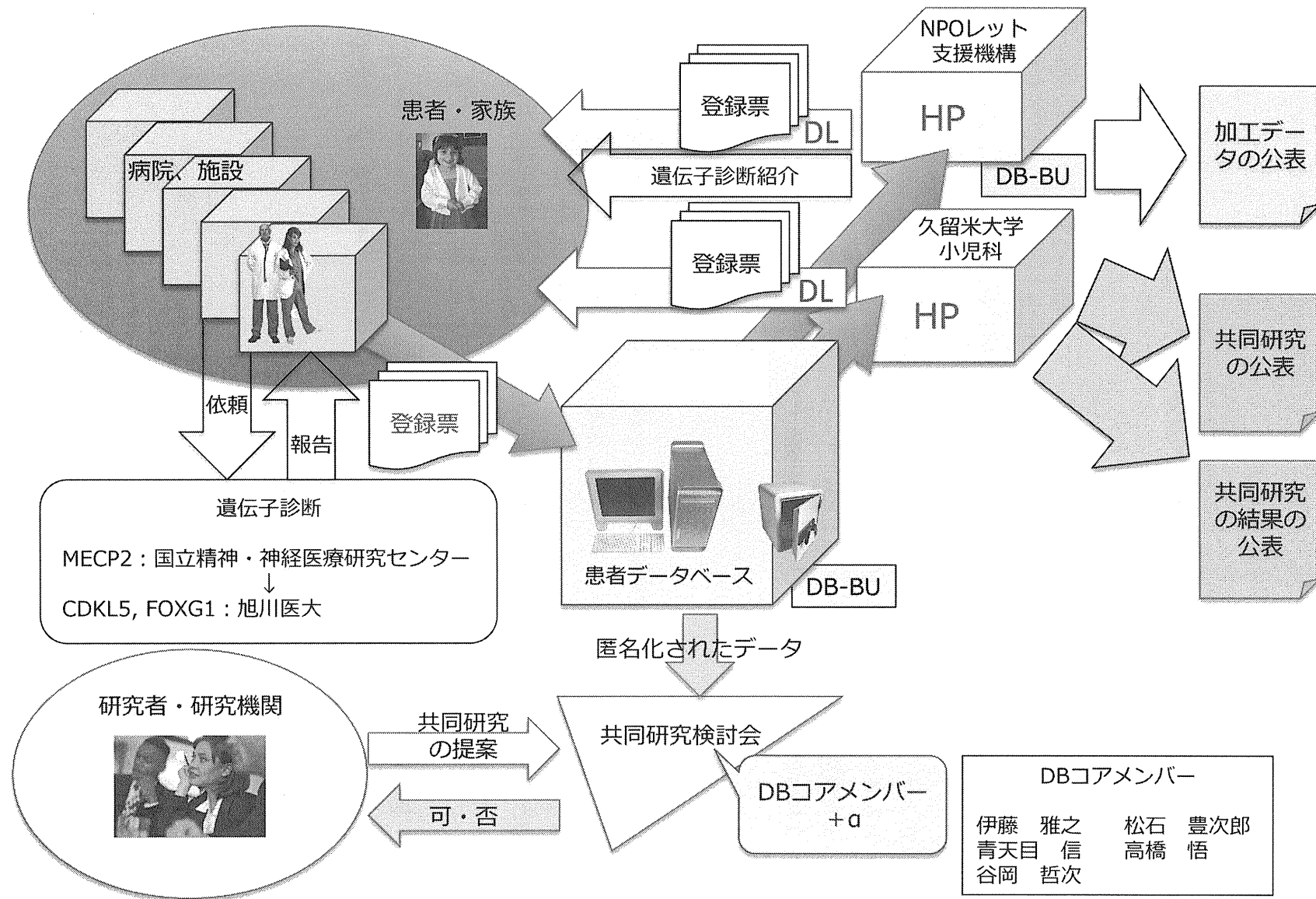
1. 論文発表

1. Arai A, Saito T, Hanai S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res* 2012;1470:89-97.
2. Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Yuko Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: Consideration of epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci* 2012; 323: 128-133.
3. Sakakibara T, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71 (8): 741-749.
4. Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2\_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859-13867.
5. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K. Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine G<sub>M1</sub>-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 92-98.
6. Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Kakita A, Itoh M. Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr* 2012;10:217-225.
7. 伊藤雅之. てんかんの病理. 最新医学別冊. 新しい診断と治療のABC 74. てんかん. 最新医学社. 大阪. 72-82pp, 2012.
8. Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T. Two neonatal cholestasis patients with mutations in the *SRD5B1 (AKR1D1)* gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis* (in press)
9. Mizuochi T, Kimura A, Tanaka A, Muto A, Nittono H, Seki Y, Takahashi T, Kurosawa T, Kage M, Takikawa H, Matsuishi T. Characterization of urinary bile acids in a pediatric BRIC-1 patient: Effect of rifampicin treatment. *Clin Chim Acta* 2012;413(15-16):1301-1304.
10. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, Tanaka E, Matsuishi T. Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35354
11. Takei H, Song L, Ebihara K, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. Histaminergic effects on the frequency of repetitive spike firing in rat insular cortex. *Neurosci Lett* 2012;518:55-59.
12. Takahashi S, Matsumoto N, Okayama A, Suzuki N, Araki A, Okajima K, Tanaka H, Miyamoto A. FOXP1 mutations in Japanese patients with the congenital variant of Rett syndrome. *Clin Genet* 2012;82: 569-573.



13. Nagai M, Meguro-Horike M, Horike S. Epigenetic defects related to assisted reproductive technologies: Large offspring syndrome (LOS). *DNA Methylation-Genomic Technologies and Impact* 2012;167-182.
2. 学会発表
1. 伊藤雅之. 本邦におけるレット症候群研究の現状と課題. 2012レット症候群シンポジウムIN大阪. 大阪, 平成24年12月16日.
2. Hara M, Nishi Y, Hirata R, Yoh J, Matsuishi T. Plasma ghrelin and serum IGF-1 levels in patients with Rett syndrome and its relationship to the head growth. 12th International Child Neurology Congress 2012. 5/27-6/1, Australia.
3. Okabe Y, Takahashi T, Tanaka E, Matsuishi T. Neural development of MeCP2 null embryonic stem cells. RETT syndrome Symposium in Fukuoka 平成24年4月22日 福岡.
4. Shirakawa T, Takeuchi M, Nishiyama M, Kamohita R, Takiguchi H, Wada T. Therapeutic management of malocclusion caused by a lip sucking habit in a girl with Rett syndrome. The 21st Congress of the International Association for Disability and Oral Health, 28-31, October 2012, Melbourne.
5. Nishiyama M, Wada T, Takiguchi H, Takamori K, Asano M, Iwasa S, Suzuki A, Shirakawa T. Abnormal breathing and occlusal disharmony in a mouse model of Rett syndrome. The 21st Congress of the International Association for Disability and Oral Health, 28-31, October 2012, Melbourne.
6. 熊倉啓、中田昌利、内尾寛子、高橋悟、秦大資. FOXG1遺伝子異常を認めた congenital Rett症候群の一男児例. 日本小児神経学会近畿地方会第52回例会 平成24年10月20日, 大阪市.
7. 堀家慎一「高次遺伝子発現制御機構へのブレークスルー」日本分子生物学会 第12回春季シンポジウム、石和温泉 慶山、2012年4月26日
8. 堀家慎一 他 (ポスター発表) 「PEG1/MEST遺伝子領域のゲノム刷り込み制御機構の解明」第6回日本エピジェネティクス研究会年会、学術総合センター、東京、2012年5月14日～15日
9. 堀家慎一「自閉症とエピジェネティクス」応用動物科学セミナー「エピジェネティクスの深淵」、東京大学 弥生講堂一条ホール、2012年7月20日
10. 堀家慎一 他 (口演) 「広汎性神経発達障害に関連する15q11-q13ゲノム刷り込み領域のアレル特異的クロマチンダイナミクスの解析」日本人類遺伝学会第57回大会、京王プラザホテル、東京、2012年10月24日～27日
11. Horike S. et al. A noncoding imprinted RNA、MESTIT1 is essential for the repression in cis of KLF14. The 62th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics. Nov. 6-10, 2012. San Francisco. USA
12. 田中輝幸. 遺伝子改変動物モデルによる神経発達障害研究と今後の展望. 第85回日本産業衛生学会. 名古屋. 2012年6月2日
13. 田中輝幸. Multidimensional approach to functional analysis of Cyclin-dependent kinase-like 5, the causative gene for atypical Rett syndrome」Rett Syndrome Symposium in Fukuoka. 2012. 4. 22. Fukuoka.
14. 田中輝幸. 発達障害原因遺伝子CDKL5の多元的アプローチによる機能解析. 東京都医学研セミナー. 東京. 2012年3月12日
- II. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
1. 特願2012-117128 発明者; 発明者; 小賤健一郎、三井薫、高橋知之 発明の名称: ヒトES/iPS細胞における遺伝子発現方法 出願日: 2012年5月23日
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

# 「レット症候群」患者データベースの運用構図



添付資料  
 図1 レット症候群患者データベースの運用構図

## 資料1 レット症候群診断基準

レット症候群診断基準改訂版(2010年版)<sup>訳注1</sup>

(「Neul JL, et al. Rett Syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. Ann Neurol 2010;68:944-950.」の和訳および著者らとの意見交換から)

出生時の頭囲が正常だが、生後頭囲の成長速度が遅れてきた時にも診断を考慮する<sup>訳注2</sup>

### 典型的レット症候群の診断要件

1. 回復期や安定期が後続する退行期があること<sup>a</sup>
2. すべての主要診断基準とすべての除外診断基準を満たすこと
3. 支持的診断基準は必須ではないが、典型的レット症候群では認められることは多い

### 非典型的レット症候群の診断要件

1. 回復期や安定期が後続する退行期があること
2. 主要診断基準4項目のうち2つ以上を満たすこと
3. 支持的診断基準11項目のうち5つ以上を満たすこと

### 主要診断基準

1. 目的のある手の運動機能を習得した後に、その機能を部分的、あるいは完全に喪失すること
2. 音声言語<sup>b</sup>を習得後に、その機能を部分的、あるいは完全に喪失すること
3. 歩行異常：歩行障害、歩行失行
4. 手の常同運動：手をねじる・絞る、手を叩く・鳴らす、口に入れる、手を洗ったりこすったりするよ  
うな自動運動

### 典型的レット症候群診断のための除外基準

1. 明らかな原因のある脳障害（周産期・周生期・後天性の脳障害、神経代謝疾患、重度感染症などによる脳損傷<sup>c</sup>）
2. 生後6ヵ月までに出現した精神運動発達の明らかな異常<sup>d</sup>

### 非典型的レット症候群診断のための支持的診断基準<sup>e</sup>

1. 覚醒時の呼吸異常
2. 覚醒時の歯ぎしり
3. 睡眠リズム障害
4. 筋緊張異常
5. 末梢血管運動反射異常<sup>訳注4</sup>

6. 側弯・前弯
7. 成長障害
8. 小さく冷たい手足
9. 不適切な笑い・叫び
10. 痛覚への反応の鈍麻
11. 目によるコミュニケーション、じっと見つめるしぐさ

#### 脚注

- a 明らかな退行が判明する前にMECP2の遺伝子変異が同定された患者において、3歳未満で機能的な退行を認めないが、その他の臨床所見がレット症候群を示唆する場合には、「レット症候群疑い例 (possible Rett syndrome)」と診断をつける。こうした患者は明らかな退行を認めるまでは6-12ヵ月おきに診察をして再評価するべきである。退行が明らかになれば、診断は「確定的なレット症候群 (definite Rett syndrome)」に変更する。しかし、5歳までに明らかな退行を示さなかった場合には、レット症候群の診断は疑わしい。
- b 習得した言語の喪失は、患者が発語・発声の点で、最もできるようになった状態を基準とする。これは、明確な単語やより高度な言語機能の獲得に限らない。つまり、喃語<sup>訳注5</sup>を習得した後に、それが消失した場合には、習得した言語を喪失したと判定する。
- c 神経機能異常を直接生じると考えられる所見が、神経学的診察、眼科的診察、またはMRIやCTで示されなければならない
- d 正常の発達水準で、定頸(首のすわり)、嚥下、あやし笑いが認められない場合を指す。生後6ヵ月までに、全身性の軽い筋緊張異常や微細な発達異常<sup>訳注3</sup>が生じることは、レット症候群ではよくあり、除外診断基準の要件とはならない。
- e ここに挙げた臨床症候をが、現在または過去に認められれば、支持的診断基準を満たしたと考える。こうした症候の多くは年齢依存性に変化し、特定の年齢で明らかになるか優勢になる。そのため、非典型的レット症候群の診断は、年少例よりも年長例で容易となる。5歳未満の若い患者で、退行期があり、主要診断基準を2つ以上満たすが、支持的診断基準が5つ以上は認められない場合には、「非典型的レット症候群疑い例 (probably atypical Rett syndrome)」と診断すべきである。こうした患者はその後も再評価し、診断をその時の所見に合わせて変更しなくてはならない。

訳注1 これまでに1985年から2002年にかけて、6つの診断基準が発表されてきた。1999年にMECP2が原因遺伝子として同定され、その後症例の解析を行う中で、2002年版の診断基準を含め、これまでの診断基準に適合しない症例があることが明らかになってきた。RTT Rare Disease Clinical Research Center (RDCRC)は、2006年から2010年にかけて、819人のレット症候群患者の診察・病歴聴取・遺伝子解析を行い、レット症候群の自然歴を明らかにして、新しい診断基準を2010年に提案した。この研究により、より重要で本質的な症状が明らかになり、明瞭・簡潔な診断基準が完成した。

訳注2 頭囲拡大の速度が鈍化することは、以前の診断基準(2002年版など)では、必須診断基準の項目に含まれていたが、必ずしも不可欠でないことが明らかになった。しかし、有名な症候であり、臨床医にレット症候群を鑑別診断にあげる可能性があること、特徴的な症候であることから、前文としては記載するが、診断基準には含まないことにした。

訳注3 レット症候群の患者の自発的な運動をビデオ解析した研究で、生後4ヵ月までの動きについても、診断がつく前に家族が撮影していたビデオを用いて、general movementを含めて、全例で異常を認めた、とする研究がある。

訳注4 環境や外界からの刺激(寒冷・疼痛・緊張、入浴など)により、末梢血管が拡張・収縮する反応

訳注5 乳児期に出す意味のない声。生後2-3ヵ月頃のアアー、ウーウー、5-6ヵ月頃のバーバー、ダーダーという声など。9-10ヵ月頃までに母音・子音を発音する技術が確立して、単語を話せなくても、成人の発話に近い発声が可能となる。声帯や咽頭・喉頭などの発声器官の運動練習という意味があると言われていたが、初期は必ずしも周囲の人への意思伝達の意図があるとは限らない。

レット症候群データベース 患者登録用紙		※登録番号
□には、当てはまるところに□のようにチェックを入れてください		(注) 患者記入欄(医師代筆可) 患者または医師が記入する欄 医師が記入する欄
<p><b>記入日</b> 西暦( )年( )月( )日</p> <p><b>患者情報</b> ふりがな ( ) 漢字名 ( ) 既登録番号 ( ) 生年月日 西暦( )年( )月( )日 年齢 ( )歳( )か月 性別 女・男</p> <p><b>自宅情報</b> 郵便番号 〒 - 住所</p> <p>電話番号 ( ) -</p> <p><b>病院情報</b> 病院名 ( ) 主治医 ( ) 電話番号 ( ) - カルテ番号(患者番号) ( )</p> <p><b>在胎出生歴</b> 妊娠中の異常 □無 □有 出産時の異常 □無 □有 ( ) 在胎期間 ( )週( )日、□不明 出生時の 体重( )g 頭囲( )cm 身長( )cm 胸囲( )cm</p> <p><b>発達歴(現在の状態ではなく獲得した時期を記載)</b> 首がすわる ( )か月 寝返り ( )か月 自分で起き上がって座る ( )か月 四つ這い ( )か月 つかまり立ち ( )か月 独歩 ( )か月 あやし笑い ( )か月 人見知り ( )か月 単語 ( )か月 二語文 ( )か月</p> <p><b>最初に気づいた症状と年齢(複数回答可)</b> □寝てばかりいる □哺乳力が弱い □体が柔らかい □視線が合いにくい □目つきが気になる □泣き止まない □健診で異常を指摘された □その他 ( ) その年齢 ( )歳( )か月</p>	<p><b>その他の症状(2) (調査票記入時点の状態を記載)</b></p> <p>5. 行動の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック・複数回答可) ・常同運動 □無 □有 □不明 □□ □舌 □上肢 □下肢 □その他( ) ・場に合わない笑い □無 □有 □不明 ・場に合わない叫び □無 □有 □不明 ・視点が合わない □無 □有 □不明 ・痛み刺激に反応低下 □無 □有 □不明</p> <p>6. 筋緊張・運動の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・筋緊張低下 □無 □有 (□全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張亢進 □無 □有 (□全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張低下から亢進に変化 □無 □有 ・覚醒時の歯ぎしり □無 □有 □不明 ・不随意運動 □無 □有 □不明 「有」の場合 □ジストニア □ジスキネジア □ミオクローヌス (複数回答可) □寡動 □振戦 □分類不能</p> <p>7. 自律神経の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・末梢血管反射異常※ □無 □有 □不明 ・冷たい手・足 □無 □有 □不明 ・覚醒時の呼吸異常 □無 □有 □不明 「有」の場合 □過呼吸 □息止め □呑気 □急激な吐息・唾飛ばし ・心電図異常 □無 □有 □不明 □QT延長 □その他の異常( ) ・睡眠パターンの異常 □無 □有 □不明 □乳児期に日中の睡眠時間が長く、手がかからない</p> <p>8. 消化管症状・機能 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・流涎 □無 □有 ・咀嚼障害 □無 □有 (□噛まない □丸のみ □他) ・嚥下障害 □無 □有 (□溜め込み飲み飲まない □誤嚥 □他) ・1回の平均食事時間 □30分以内 □30-60分 □60分以上 ・摂食拒否 □無 □有 ・便秘 □無 □有</p> <p>9. 整形外科的問題 ・整形外科診療歴 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □定期受診や健診として受診している □不調時のみ受診 □その他 ・股関節 手術 □無 □有 ( )歳( )か月時 右 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 左 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 ・足関節 手術 □無 □有 ( )歳( )か月時 右 □正常 □尖足 □内反 □外反 □凹足 □不明 左 □正常 □尖足 □内反 □外反 □凹足 □不明 ・脊椎異常 □無 □有 □不明 (有の場合、下記の各項目にチェック) □側弯 □後弯 □前弯 ( )歳( )か月から</p> <p>10. 歯科的問題 ・歯科診療歴 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □定期受診や健診として受診している □不調時のみ受診 □その他 ・歯科的症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □歯列不正 □咬合異常 □歯の摩耗 ( )</p> <p>11. その他症状</p>	
<p><b>典型的レット症候群の必須条件(調査票記入時点の状態を記載)</b></p> <p>1. 退行※<sup>1</sup> □無 □有 ( )歳( )か月から 退行後の安定期または改善期 ( )歳( )か月から □安定期有 □改善期有 □安定期・改善期が無いまたは現在も退行中</p> <p>2. 手の目的運動の退行※<sup>2</sup> □無 □有 □機能獲得なし ・上肢の機能※<sup>3</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高のレベル( )</p> <p>3. 手の常同運動 □無 □有 ( )歳( )か月から □手のねじれ・絞り □手叩き・指打ち □手洗い・手こすり □手を口につける・入れる □その他( ) (複数回答可)</p> <p>4. 言語・音声コミュニケーションの退行※<sup>4</sup> □無 □有 □機能獲得なし ・言語機能・コミュニケーションのレベル ことばや音声の表出※<sup>5</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高レベル( ) 意思の表出※<sup>6</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高レベル( )</p> <p>5. 四つ這い・歩行の異常 □無 □有(有の場合、下記の全項目にチェック) 四つ這いが □問題なし □パターンの異常 □不能 独歩が □問題なし □パターンの異常 □不能 ・移動・運動の機能※<sup>7</sup> 現在の主な移動方法( ) 過去の最高レベル( )</p>	<p><b>除外診断項目</b> 代謝性疾患・神経変性疾患 □無 □有 周生期・後天性の脳障害 □無 □有</p>	
<p><b>その他の症状(1) (調査票記入時点の状態を記載)</b></p> <p>1. 身体計測値 身長( )cm 体重( )kg 頭囲( )cm</p> <p>2. 身体的症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・小頭症 □無 □有 □不明 ・頭囲の拡大速度の鈍化 □無 □有 □不明 ・成長障害・低身長 □無 □有 □不明 ・小さい手・足 □無 □有 □不明 ・初潮 □無 □有 ( )歳( )か月から</p> <p>3. 発達・知能指数 □&lt;20 □21-35 □36-50 □51-69 □70-84 □≥85 測定方法 □臨床観察 □遠城寺 □津守・稲毛 □その他( )</p> <p>4. 精神発達の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・自閉性 □無 □有 □不明 ・てんかん □無 □有 □不明 ・脳波異常 □無 □有 □不明 □背景活動の徐波化 □てんかん性異常波 □紡錘波消失</p>	<p><b>遺伝子検査</b> □施行済み □実施予定 □未施行 実施(予定)施設 ( ) MECP2遺伝子検査 □済 □未 □不明 検査法 □直接シーケンス法 □MLPA法 □その他( ) MECP2の異常 □無 □有 異常の結果※<sup>8</sup> ( ) 他の遺伝子検査 □未検査 □ODKL5 □FOXG1 □その他( ) MECP2以外の遺伝子の異常 □無 □有 異常の結果( )</p>	
<p><b>医師署名(自筆)</b> このデータは原情報に忠実に記入され、医師の確認のもとに作成されたことを証明します 西暦( )年( )月( )日 (氏名)</p>	<p><b>施設名:</b> 送付元連絡先: 〒 - (電話): (メールアドレス): 送付先: 〒 -</p>	

未記入の箇所、不明な点があつてもある場合は、こちらからお電話などにてご確認させていただくことがあります。

## II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
分担研究報告書

レット症候群患者データベース構築と運用に関する研究

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター 室長  
分担研究者 松石豊次郎 久留米大学医学部 教授  
分担研究者 高橋 悟 旭川医科大学医学部 講師  
分担研究者 青天目 信 大阪大学医学部 特任助教  
分担研究者 谷岡 哲次 NPOレット症候群支援機構 理事長  
研究協力者 立森 久照 国立精神・神経医療研究センター 室長  
研究協力者 森崎市治郎 大阪大学歯学部 教授  
研究協力者 梶浦 一郎 大阪発達総合療育センター 理事長

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*) のメチル化DNA結合領域 (MBD) 点変異の生物学的意義を調べるために、変異発現ベクターをつくり、線維芽細胞へ導入した。発現解析の結果、症状への関連性が予測される分子を同定した。今後、分子生物学的な解析を進め、治療法開発へ発展させる。

A. 研究目的

本邦におけるレット症候群患者数は、これまでの研究から約1000人で、20歳までの女性の0.09%の有病率であることを報告している。ときに、診断が困難なことがあり、病状が進んだ後に診断されることも少なくない。一方、欧米諸国では治験の試みがなされている。本邦においても、生物マーカーの実用化や治療候補分子の検索が進んでいる。そこで、治験を含む臨床研究と広く国内外の疫学研究等のための患者データベースを構築することが必要である。本研究では、新しい診断基準を作り、その手引きをもとに、患者データベースを構築する。

B. 研究方法

まず、患者データベースのあり方を検討した（（総括）図1）。さらに、これまでの疫学研究をもとに、患者登録票を作成した（（総括）資料2）。あわせて、手引きを作成した。また、これまでの診断基準を見直し（表1）、国際的な基準にもとづいた診断基準を作成した（（総括）資料1）。

（倫理面への配慮）本研究では、当該研究施設の倫理問題検討委員会において承認申請中である。

C. 研究結果

患者データベースのあり方として、患者団体および研究班のホームページを通して、患者およびその家族が登録票と手引き（（総括）資料1）（（総括）資料2）を入手し、医師（主治医）と登録票を作成する（（総括）図1）。その後、患者データベース管理者へ郵送し、登録する。その際に必要な遺伝子解析の案内も行なう。これらの準備は完了したので、当該研究施設の倫理問題検討委員会の承認を得られ次第実行する。

D. 考察

疾患患者データベースは、その疾患の実態を解明するだけでなく、患者・医療者・研究者をつなぎ、治験への基盤データとして重要である。

今回作成した患者データベースは、患者（およびその家族）主導による点で斬新である。これは、患者（およびその家族）が積極的に関わることで、研究への理解と課題の共有化が期待できる。

全国的に3つレット症候群の患者団体が知られているが、その数は患者総数の半分に満たない。いかに啓蒙し、参加数を増やすかが今後の課題である。

E. 結論

レット症候群の患者データベースを構築した。あわせて、診断基準の見直しを行ない、分かりやすいものにした。今後、セミナー等の広報活動を通して、患者データベースへの参加者を増やしていく。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. 伊藤雅之. 本邦におけるレット症候群研究の現状と課題. 2012レット症候群シンポジウムIN大阪. 大阪, 平成24年12月16日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

表1 これまでのレット症候群診断基準の比較

発表年 雑誌名	1985	1988	1990	1994	1994	2002		2010	
	Brain Dev	Ann Neurol		Ped Neurol		Eur J Pediatr Neurol 典型例	歪型	Ann Neurol 典型例	Ann Neurol 非典型例
回復期・安定期が後続する退行				○			○	◎	◎
有目的な手の使用の退行・消失	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	○
獲得した言語音声コミュニケーションの退行・消失		◎	◎	○	◎	◎	○	◎	○
歩行異常	◎	◎	◎	△	◎	◎	△	◎	○
手の常同運動	◎	◎	◎	○	◎	◎	○	◎	○
出生前・周産期異常なし	◎	◎	◎		◎	◎			
出生後はしばらく異常なし	◎								
出生時頭囲正常	◎	◎	◎		◎	◎			
出生後の頭囲拡大の鈍化	◎	◎	◎	○	◎	◎	○		
社会的交流の消失	◎		◎	○	◎	◎			
認知障害						◎			
喃語の減少・消失							○		
重度精神発達遅滞			◎		◎				
当初は暫定診断	◎	◎							
女性	◎								
覚醒時の呼吸異常		○		△		○	△		△
覚醒時の歯ざり				△		○	△		△
睡眠パターン異常						○	△		△
筋緊張異常						○			△
末梢血管運動反射異常		○				○			△
側弯・前弯		○		△		○	△		△
成長障害		○				○			△
小さく冷たい手足		○		△		○	△		△
不適切な笑い・叫び				△			△		△
痛覚鈍麻				△			△		△
視線によるコミュニケーション				△			△		△
腹部膨満・吞気				△			△		
筋量減少		○				○	△		
下肢の神経学的異常		○		△					
脳波異常		○		△					
けいれん		○							
頭部外傷・神経代謝疾患・重度感染症	◎	◎				◎		◎	
6ヵ月までの発達異常		◎			◎	◎		◎	
臓器腫大	◎	◎				◎			
網膜症、視神経萎縮、白内障	◎					◎			
除外 周産期・出生後の脳障害		◎				◎			
代謝異常・進行性神経疾患		◎				◎			
子宮内胎児発育遅延		◎							
出生時の小頭症	◎								
診断に必要とされる条件				○の3/6+ △の5/11		○は非必 須	○の3/6 +△の 5/11		

◎ 必須事項

太字 2010年基準記載事項

下線 全基準で共通する項目

斜体 2010年で採用されず、以前の3基準以上で採用された項目



MECP2遺伝子変異の生物学的解析

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター 室長

研究協力者 栗政 明弘 鳥取大学大学院医学系研究科 准教授

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) のメチル化DNA結合領域 (MBD) 点変異の生物学的意義を調べるために、変異発現ベクターをつくり、線維芽細胞へ導入した。発現解析の結果、症状への関連性が予測される分子を同定した。今後、分子生物学的な解析を進め、治療法開発へ発展させる。

A. 研究目的

レット症候群は、主に女兒にみられる特異な発達障害である。本症の原因遺伝子として、メチル化CpG結合タンパク2 (MECP2) が報告されている。MECP2は標的遺伝子の転写を抑制する分子であり、メチル化DNA結合領域 (MBD) と転写抑制領域 (TRD) からなる。レット症候群患者にみつかると点変異の多くはMBD内にあり、徴候-遺伝子変異相関が知られている。そこで、MBDの点変異がもたらす生物学的影響について、培養細胞を用いて明らかにする。

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、マウス線維芽細胞に導入した。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、変異がもたらすレット症候群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た。

C. 研究結果

MECP2のMBD領域に変異発現ベクターをマウス線維芽細胞に導入し、(1) 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。また、(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) 解析を行なった。その結果、変異に特異的な異常発現分子を2つ同定した。そのうち1つはレット症候群の症状に関連した分子である可能性が分かった。

D. 考察

MBDの点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、症状の一部を説明しうることを示唆している。今後、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て出すことが期待できる。

E. 結論

MBD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。さらに、解析を進め、治療法開発へ発展させる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Arai A, Saito T, Hanai S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res* 2012;1470:89-97.
2. Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Yuko Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: Consideration of epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci* 2012; 323: 128-133.
3. Sakakibara T, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71 (8): 741-749.
4. Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A.

Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2\_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859-13867.

5. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K. Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine  $G_{M1}$ -Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 92-98.

6. Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Kakita A, Itoh M. Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr* 2012;10:217-225.

7. 伊藤雅之. てんかんの病理. 最新医学別冊. 新しい診断と治療のABC 74. てんかん. 最新医学社. 大阪. 72-82pp, 2012.

## 2. 学会発表

1. Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. GABAergic interneurons lead to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Symposium 1, Basic Science. The 10th European Congress on Epileptology. London, UK, 1, October, 2012.
2. Itoh M, Inage Y, Kitamura K, Goto Y, Halliday WC. GABAergic interneuron pathology: ARX normal development and its mutation. The 10th European Congress of Neuropathology, Edingburgh, UK, 5-9 June, 2012.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。
2. 実用新案登録 なし。
3. その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野））  
分担研究報告書

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と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  
研究協力者 平田留美子 久留米大学医学部 小児科学講座 大学院  
研究協力者 高橋 知之 久留米大学 高次脳疾患研究所 准教授  
研究協力者 原 宗嗣 久留米大学医学部 小児科学講座 助教  
研究協力者 岡部 恭典 久留米大学医学部 生理学講座 助教

研究要旨

1. グレリンの研究：今年度は、以下の2つの解析を施行した。①Rett症候群の症例（RTT症例）におけるグレリン、成長ホルモン（GH）、インスリン様成長因子1（IGF-1）の血中濃度と身体パラメーター（身長、体重、頭周囲ほか）の各々の相関についての検討。②レット症例への新規治療法の確立を目指して、レット症候群モデルマウス（RTTマウス）へのグレリン投与による治療効果の検討、及び、RTTマウスへの骨髄移植（骨髄キメラマウス作成）に向けた基礎検討を施行した。結果、RTT症例およびEP/MR症例ともに「グレリン・GH・IGF-1システム」の機能障害が存在し、「血中の全グレリンに対する活性型グレリンの比率」が両群の身体発育、脳発育の指標となる可能性が推定された。グレリン投与により、発症早期のRTTマウスの死亡率が低下した。野生型マウスにGFP-Tgマウスの全骨髄細胞を移植して「骨髄キメラマウス」の作出に成功した。今後、RTTマウスの生命予後・身体症状に対する骨髄移植の改善効果について「グレリンの併用」を含めて検討していく。

2. ES細胞、iPS細胞を用いた研究：本年度は、RTTモデルES細胞の分化研究において関連の示唆された、グリア細胞におけるMeCP2の機能的役割を調べるために、RTTモデルマウス脳由来のグリア細胞の分子生物学、生理学的な解析を行った。その結果、対照コントロールの正常マウス由来グリア細胞と比較して、MeCP2を欠損したグリア細胞では、細胞増殖や細胞障害、細胞毒に対する細胞生存率の有意な差が認められないものの、アストロサイト特有の遺伝子発現やグルタミン代謝の亢進が認められることが明らかとなった。近年、MeCP2欠損マウスのRTT様症状の発症にニューロン以外のアストロサイトやマイクログリアの異常が関わる可能性が報告されており、本成果はグリア細胞からみたMeCP2欠損によるRTT病態メカニズム解明の一助となることが期待される。

A. 研究目的

1. グレリンの研究

①レット症候群の生物学マーカーの確立

1. グレリン研究：レット症候群症例（ヒト）の身体発育・臨床症状のパラメーターとしての、グレリン・GH・IGF-1システムの有効性について検討した。

②レット症候群への骨髄移植・幹細胞移植療法をめざした基礎的検討

骨髄中・脂肪組織中に存在する幹細胞を用いた再生医療の技術は、各種の難治性疾患の治療へと応用されつつある。本研究は、正常骨髄幹細胞に由来するグリア系細胞をRTT症例の脳組織内に生着させ、これによってRTT症例の臨床症状の進展を防止する事を最終目標とする。今年度はその第1段階として、野生型マウスにGFP-Tgマウスの骨髄細胞を移植して「骨髄キメラマウス」を作成する為の「基本手技の確立」をめざした。

2. ES細胞、iPS細胞を用いた研究：本研究は、RTTモデル動物やES/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. グレリンの研究

レット症候群・女兒（RTT症例）、および、年齢・性別等を一致させた疾患コントロール（てんかん・精神発育遅滞症例：EP/MR症例）について、空腹時採血でのグレリン、GH、IGF-1の血中濃度を測定し、各ホルモン値と身体パラメーター（身長、体重、頭周囲長、BMI）との相関について、両群を比較・検討した。

（倫理面への配慮）採血・データ収集については、事前に書面で承諾・不承諾をはかり、本人および保護者の承諾下で施行した。また、回収されたデータは個人照合が出来ないように、データ収集の時点から匿名化を徹底させた。

野生型マウス（C57BL/6）にγ線照射を施行して、

LD50-30（照射後30日で50%生存となる $\gamma$ 線照射量）を決定した。決定されたLD50-30の照射下（ $\sim 11.5$  Gy）で骨髄系細胞を除去した野生型マウス（♂、生後4週齢ほか）に、オワンクラゲの緑色蛍光色素（GFP）を全身性に発現させたトランスジェニックマウス（GFP-Tgマウス：10-15週齢、♀）（C57BL/6の同種遺伝背景）の大腿骨から回収した全骨髄細胞を移植して、アイソレータ管理・抗生剤投与下に飼育して生存率を測定した。生存マウスは、骨髄移植後4、8週で尾静脈採血を施行し、血中の白血球における緑色蛍光の有無について、蛍光顕微鏡下に観察した。

## 2. ES細胞、iPS細胞を用いた研究

RTTモデルマウス由来グリア細胞によるMeCP2欠損のグリア細胞に及ぼす影響の解析

本施設では、RTT病態解明するために、Bird-AらにRTTモデル動物として樹立されたMeCP2欠損マウスを維持してきた。そこで、MeCP2欠損のグリア細胞を得るために新生仔RTTモデルマウス（Hemi・♂）の脳皮質からグリア細胞の初代培養を行った。対照コントロールのグリア細胞は、同腹の新生仔マウス（wild-type・♂）から培養した。初代培養グリア細胞は、継代とともに増殖能を失うことから、3回継代目の細胞により、細胞の分子生物学的、機能評価を行った。細胞の増殖率に関しては、継代時の細胞計数とBrdU取り込みによるDNA合成を指標とし、種々の細胞傷害に対する細胞生存率はWST-8 assayにより評価した。アストロサイト特有遺伝子や蛋白質の発現は、それぞれ半定量RT-PCR法、ウェスタンブロット法によって調べた。グルタミン酸（Glu）の代謝能については、1mM Gluを添加後、経時的に培養上清中のGlu濃度を測定することで評価した。

（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. グレリンの研究

RTT症例の体重と血中グレリン濃度との間に有意な負の相関が認められた。一方で、同症例の身長、BMIとグレリン濃度の間には有意な相関は認められなかった。RTT症例、EP/MR症例ともに、その頭周囲径は血中グレリン濃度と有意な正相関を、血中IGF-1濃度とは有意な負の相関を示した。前思春期では、RTT症例の活性型グレリンの比率（全グレリン濃度に占めるオクタン酸グレリン濃度の比率）は、EP/MR症例の比率より有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

野生型マウス（4週齢）への $\gamma$ 線照射によるLD50-30は10 $\sim$ 12 Gyと算定された。野生型マウスに $\gamma$ 線照射（11.5 Gy：0.76 Gy/min  $\times$  13.8 min）を施行し、2時間後にGFP-Tgマウスの大腿骨から回収した全骨髄細胞（ $2.5 \times 10^6$  cells/匹）を静脈注入で移植。移植後のマウスはアイソレータ（準無菌）管理・抗生剤投与下に経過観察した。移植マウス10匹中7匹が移植翌日まで生存。移植後2週間の時点で4匹が生存。移植後4週の時点での検討で、4匹中4匹（100%）のマウスの末梢血・白血球に「GFP」による蛍光が確認された。同4個体については移植後8週の時点で全個体が生存している。

RTTモデルマウス由来グリア細胞によるMeCP2欠損のグリア細胞に及ぼす影響の解析

まず、RT-PCR法によって、初代培養した対照コントロールのWild-type（WT）グリア細胞には、MeCP2が発現することが、一方で、RTTモデルマウス由来（RTT）のグリア細胞では、種々のアストログリア細胞のマーカー遺伝子（GFAP； glial fibrillary acidic protein、S100beta）の発現が、2-3倍亢進することが示された。このことからグリア細胞にもMeCP2が発現し、遺伝子発現の制御に関わることが示唆された。

### 2. ES細胞、iPS細胞を用いた研究

WTグリア細胞と比較して、RTTグリア細胞では、形態的な異常は認められなかった。また、継代毎の細胞計数やBrdUの取り込み効率による細胞増殖については、WTグリア細胞と有意な差は認められなかった。次に、酸化ストレスや高アンモニア、グルタミン酸（Glu）神経毒による影響を調べたが、 $H_2O_2$ や $NH_4Cl$ によって両群のグリア細胞ともに濃度依存的な細胞傷害が観察されるものの、その生存率に有意差は認められなかった。一方、Glu神経毒に対しては、両群とも10 mM Gluという高濃度でも細胞傷害はほとんど認められなかった。この結果から、我々の実験条件下ではグリア細胞におけるMeCP2の欠損は、細胞増殖や生存率にはほとんど影響しないことが示された。