

グリア細胞の生体内での働きには、サイトカイン等の分泌を介したニューロン支持細胞として働く以外に、神経毒として働く過剰なグルタミン酸を取り込み、代謝する働きがある。そこで次に、MeCP2の欠損がグリア細胞のGlu取り込み、代謝に及ぼす影響を調べた。まず、Glu添加によるGlu代謝関連のトランスポーター (EAATs; Excitatory amino acid transporters) や酵素 (GS; glutamine synthetase) 遺伝子の発現を調べた。その結果、WTグリア細胞では、Glu添加後、EAATs遺伝子の発現が低下するのに対して、RTTグリア細胞では、EAATs遺伝子の発現低下が認められないなど、EAATs遺伝子発現に異常が認められた。更にEAAT1とGS蛋白質の発現をウェスタンブロットで調べたところ、遺伝子発現と同様に、WTグリアではGlu添加によりEAAT1蛋白質発現は低下するのに対して、RTTグリア細胞では、その発現がほとんど変化せず維持された状態であった。また、GS蛋白質はGlu添加前からRTTグリア細胞で2.5倍程度発現が高く、両群ともにGlu刺激によりGS蛋白質の発現は一過性の上昇を示すものの、RTTグリア細胞におけるGS蛋白質の高値は維持されていた。以上の結果から、MeCP2は、グリア細胞においてグルタミン酸添加によるEAATs遺伝子の発現制御のみならず、GS蛋白質の発現に関与することが示された。更に、実際の生理的な働きとして、添加したGluに対するグリア細胞の代謝能について調べた結果、両群とも1 mM Gluを添加後、24時間もすれば培養上清中のほとんどのGluを取り込み、代謝するが、添加後、12-18時間では有為にRTTグリア細胞の培養上清中のGluが低値を示すことが明らかとなり、RTTグリア細胞ではGluの代謝が亢進している可能性が示唆された。

D. 考察

1. グレリンの研究

前思春期における血中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) が、RTT症例の身体発育 (低身長・小頭症) の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と思われる。マウス (野生型) への γ 線照射~骨髄移植の移植後8週での生存率 (成功率) は40% であり、生存した全個体での「骨髄のキメラ化」が確認された。移植後の死亡については移植直後の生存率が70%と低かった。今後、移植手技の習熟により生存率を向上させる必要がある。8週齢以降の生存個体については、今後、脳を含む各種臓器への「移植細胞」 (骨髄幹細胞に由来する細胞群) 生着状況について解析を

進めていく。さらに、神経内分泌ホルモン「グレリン」の併用による γ 線照射後の生存率・移植細胞の生着率への影響についても解析し、最終的にRTTマウスへの効率的な骨髄移植手技の確立を行う。

2. ES細胞、iPS細胞を用いた研究

本研究により、MeCP2はグリア細胞で発現し、グリア細胞の増殖や細胞傷害に対する生存率には影響しないものの、アストロサイト特有の遺伝子の発現調節に関わることが明らかとなった。グリア細胞は、種々の栄養因子やサイトカインの分泌によりニューロンの支持細胞として働く以外に、神経毒の過剰なGluの取り込みや代謝を行っているが、MeCP2は、Glu代謝関連遺伝子や蛋白質の発現調節を介してグリア細胞のGlu代謝に関わることが示された。今後、MeCP2欠損グリア細胞のGlu代謝の異常と*in vivo*フェノタイプ関連を調べることで、RTT発症や病態メカニズム解明の一助となることが期待される。実際、古くからRTT患者由来の脳脊髄液中のGlu濃度や核磁気共鳴スペクトルなどによるグルタミン-グルタミン酸の代謝等を調べたいいくつかの報告があり、近年、RTTモデル動物でも同様の解析が進められている。その一方で、RTT患者におけるNMDR型グルタミン酸レセプターの発現の変化も認められており、RTTの発症・病態メカニズムとグルタミン酸シグナルの関連を示す知見も蓄積されつつある。既に海外ではRTT患者に対するDextromethorphan (グルタミン酸レセプターアンタゴニスト) を利用した治験なども進められている。ただし、上述の*in vivo*における研究には技術的な問題から解釈の困難な報告もあり、今後、本研究を進展させるには、高度なバイオイメージングなど新技術を利用したRTTの発症や病態メカニズムとグルタミン酸ならびにグルタミン酸シグナルの詳細な解析が必要と思われる。

E. 結論

Rett症候群症例の身体発育のマーカーとして、グレリンを含めた GH-IGF-1系のホルモン測定が一部で有効である可能性が推定された。 γ 線照射後に同種マウスの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、グレリン投与による補助療法の検討を含めて骨髄移植技術を改良し、移植効率の改善を進める。さらに、RTTマウスに骨髄移植を施行して「骨髄キメラ・RTTマウス」を作出して、神経・発達障害に対する再生・移植療法の効果について 検討していく。MeCP2欠損マウス由来のアストロサイトの解析により、MeCP2欠損はアストロサイトにおけるアストロサイト特異的遺伝子の発現やグルタミン酸代謝に影響

することを見出した。

前年度に続いて、正常マウスならびにMeCP2欠損マウスから樹立したiPS細胞による種々のニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの効率良い分化誘導系の開発を継続している。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nishi Y, Mifune H, Kojima M. Ghrelin acylation by Ingestion of Medium-Chain Fatty Acids. *Methods in Enzymology* 2012; 514; 303-315.
2. Hamada N, Nishi Y, Tajiri Y, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Mifune H. Disrupted regulation of ghrelin production under anti-hypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats. *Circul J* 2012; 76; 1423-1429.
3. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Taku M, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M. Increased production of active ghrelin is relevant to hyperphagia in nonobese spontaneously diabetic torii rats. *Metabolism* 2012; 61; 491-495.
4. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Yabuki A. A-type natriuretic peptide level in angiotensin II type 1a-receptor knockout mice. *Exp Animals* 2012; 62; 31-38.
5. Mifune H, Nishi Y, Tajiri Y, Yabuki A. Different A-type Natriuretic Peptide Level in Five Strains of Mice. *The Journal of Veterinary Med Sci* 2012; 74; 499-502.
6. 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)
7. 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.
8. 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

2. 実用新案登録

なし。

Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35354

2. 学会発表

1. 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
2. 佐藤元康, 杉本博之, 西 芳寛. 血中グレリン切断酵素の精製と分解産物の生理活性 第54回日本脂質生化学会 2012. 6. 7-6. 8, 福岡.
3. 西 芳寛, 平田留美子, 御船弘治, 細田洋司, 寒川賢治, 馬田敏幸, 児島将康, 松石豊次郎. レット症候群モデルマウスにおけるグレリンの産生分泌動態とグレリンの治療応用 第39回 日本神経内分泌学会学術集会 2012. 9. 28-29, 小倉.
4. 田尻祐司, 西 芳寛, 原 健人, 平田留美子, 御船弘治: 肥満糖尿病モデル SDT fatty ラットにおける過食とグレリン分泌動態 第27回 日本糖尿病肥満動物学会 2013. 2. 22-23, 東京.
5. 濱田直和, 西 芳寛, 田尻祐司, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 御船弘治: 自然発症高血圧ラットにおける血圧調節とグレリン産生分泌調節の相互作用の障害について 第12回 日本内分泌学会九州地方会 2012. 8. 25, 久留米.
6. 小賤健一郎, 三井薫, 王宇清, 高橋知之. ヒトES/iPS細胞での再生医療の課題を克服する独自のアデノウイルスベクターと発現技術の開発 第11回日本再生医療学会総会(横浜)平成24年6月12-14日 パシフィコ横浜
7. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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. 特許第4839476号 特願2005-283085出願日: 2005年9月28日 発明者; 小財健一郎、ニン・チン・カイ、高橋知之。発明の名称: ヘパリン結合上皮増殖因子様増殖因子の新規医薬用途。登録日: 2011年10月14日

3. その他

なし。

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

研究分担者 白川 哲夫 日本大学歯学部小児歯科学講座 教授

研究要旨

MeCP2が欠損している雄ノックアウトマウス (*Mecp2^{-/-}*) について、全身型プレチスモグラフを用いて無拘束下で呼吸を測定し、得られたデータを野生型雄マウス (wild) と比較した。*Mecp2^{-/-}* については、生後2週においてwildに比べ有意な無呼吸回数の増加がみられ、生後7週での24時間の連続測定では、明期で無呼吸回数の有意な増加がみられた。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ブランの長期経口投与により、無呼吸回数の減少がみられた。*Mecp2^{-/-}* ではwildに比べ呼吸中枢を含む延髄での小胞膜モノアミントランスポーター2陽性終末数の著しい減少がみられたことから、*Mecp2^{-/-}* での無呼吸回数の増加について、呼吸関連中枢におけるモノアミン作動性シナプスの異常が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

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。

RTTのモデルマウスであるMeCP2欠損雄マウス *Mecp2^{-/-}* では、生後5週以降に無呼吸発作の頻度が著しく増加するとの報告があるが、呼吸動態の生後変化、ならびに24時間変動に関する報告は少なく、また脳内セロトニンやノルアドレナリン動態と無呼吸との関連についても十分な知見が得られていない。そこで今回、MeCP2の欠損が延髄の呼吸関連中枢におけるモノアミン神経伝達にどのような変化を惹起しているのかを明らかにすることを目的として *Mecp2^{-/-}* を対象に研究を行った。また、MeCP2についての生母の遺伝子型 (野生型とヘテロ接合型) の違いが、仔の呼吸中枢の発達にどのように影響しているかについても調べた。

B. 研究方法

①2~10週齢の *Mecp2^{-/-}* ならびに野生型雄マウス (wild) を一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (PLY4211; Buxco Electronics, 大阪) のチャンバー内に入れ、明暗が12:12の条件下で呼吸波形を1時間 (2, 3週齢)、あるいは24時間 (7週齢) 連続で測定・記録したのち、1秒以上の無呼吸の発生回数について解析を行った。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ブランを飲料水中に溶解し、生後3週から継続して摂取させ、7週齢で24時間の呼吸測定を行った。ミルナシブランの摂取量は約2 mg/dayとなるように濃度調節した。

② *Mecp2^{-/-}* ならびにwildについて8週齢で脳組織をとりだし、小胞膜モノアミントランスポーター2 (VMAT2) についての免疫組織染色を行った。呼吸を含めた自律神経機能の調節に関与している延髄の dorsal motor nucleus of the vagus (DMV)、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) について、VMAT2陽性puncta数を、明視野画像処理ソフトウェア (ImagePro7.0) を用いて数えた。

(倫理面への配慮)

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)

C. 研究結果

① *Mecp2^{-/-}* について、生後2, 3週においてwildに比べ著明な無呼吸回数の増加がみられ、生後7週で実施した24時間の連続測定では、暗期に比べ明期で無呼吸回数の有意な増加がみられた。

②ミルナシブランの長期経口投与により、24時間データについて比較した場合、無呼吸回数の有意な減少がみられた (*Mecp2^{-/-}* の寿命は約20%延長した)。

DMV, NST, VRGについて、8週齢の *Mecp2^{-/-}* ではいずれの部位についてもwildに比べVMAT2陽性puncta数の著しい減少がみられた。

③生後2週以降の *Mecp2^{-/-}* とwildの比較によって明らかになった無呼吸回数の違いについて、生母の遺伝子型がどのように影響しているかを調べる目的で、2~10週齢のwildマウスを2群 (野生型雌から生まれたwild, およびヘテロ接合雌から生まれたwild) に分け測定を行った。その結果、生後2週から7週までは、ヘテロ接合雌から生まれたwildの無呼吸回数が、野生型雌から生まれたwildの無呼吸回数に比べ有意に多かった。

D. 考察

Mecp2^{-/-} の無呼吸回数が明期に多いという結果については、明期の光刺激が自律神経系に影響して呼吸を不安定化させている可能性が考えられ、今後検討が必要と思われる。

組織学的検索により、延髄の呼吸関連中枢でのモ

ノアミン作動性シナプスの減少を示唆する結果が得られたこと、およびミルナシプランの経口投与により無呼吸回数の有意な減少がみられたことは、RTT患者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の仮説を支持するが、今後その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。

MeCP2の産生に異常がみられないwildマウスにおいて、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。

E. 結論

Mecp2^{fl/y}では明暗条件下で明期において無呼吸の発生回数が増加することが明らかになり、ミルナシプランの長期経口投与により無呼吸回数の有意な減少がみられたことから、医療応用を考えた場合、主として自律神経系でのセロトニンあるいはノルアドレナリン神経伝達を向上させることで、呼吸機能を含めたRTT患者の病態を改善できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

1. Shirakawa T, Takeuchi M, Nishiyama M, Kamoshita 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.
2. 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.

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。

レット症候群の臨床遺伝学的研究

分担研究者 高橋 悟 旭川医科大学小児科 講師

研究要旨

非典型的レット症候群の原因遺伝子*CDKL5*あるいは*FOXG1*に遺伝子異常が同定された患者の臨床症状を評価し、2010年に改訂されたレット症候群の診断基準との適合を検討した。非典型的レット症候群の診断基準に合致したのは、*CDKL5*に遺伝子異常を有した2例中1例、*FOXG1*に遺伝子異常を有した3例中1例のみだった。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、一度習得した機能を失うといった“退行”の判断が困難な症例であった。レット症候群の治療研究を行うには、診断基準に合致した均一な患者集団を対象とすることが必要であり、遺伝子異常と臨床症状との関連を明確にする必要がある。

A. 研究目的

レット症候群の原因遺伝子として*MECP2*が同定されて以来、レット症候群に類似した臨床症状を呈する非典型例の存在が知られ、「早期発症てんかん型」の原因遺伝子として*CDKL5*、「先天型」の原因遺伝子として*FOXG1*が同定された。レット症候群の治療法を確立するためには、病態の均一な患者集団を対象とした研究が必要である。このような目的のもと、2010年に国際的な診断基準の改訂が提案された（1，2）。本研究では、*CDKL5*あるいは*FOXG1*に遺伝子異常が同定された患者の臨床症状を再評価し、改訂診断基準への適合を検討した。

B. 研究方法

非典型的レット症候群を疑われ旭川医科大学小児科を紹介された患者のうち、*MECP2*に遺伝子異常のなかった患者を対象とした。遺伝子解析は、末梢血白血球より抽出したDNAを用いて、*CDKL5*あるいは*FOXG1*遺伝子について塩基配列決定法にて解析した。変異が同定されなかった場合には、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法あるいは定量的PCR法にて解析した。遺伝子診断は、旭川医科大学の倫理委員会の承認を得て、患者あるいは保護者への十分な説明と同意が得られた場合に行われた。

C. 研究結果

非典型的レット症候群の診断基準に合致したのは、*CDKL5*に遺伝子異常を有した2例中1例、*FOXG1*に遺伝子異常を有した3例中1例のみだった（表1）。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、一度習得した機能を失うといった“退行”の判断が困難な症例であった。

D. 考察

非典型的レット症候群とは、①手の合目的運動の退行、②言語機能の退行、③歩行異常、④手の常同

運動といった典型的レット症候群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。典型的レット症候群の患者では3歳以前にてんかんを発症することはまれであるが、*CDKL5*に遺伝子異常を有する患者は、乳児期早期から難治性てんかんを発症する。それ以外の症状は、多様性を示す。その要因として、X染色体（Xp22）上にある*CDKL5*遺伝子の発現に及ぼすX染色体不活化パターンの影響が考えられている。非典型的レット症候群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。*FOXG1*に遺伝子異常を有する症例の特徴は、乳児期早期からの精神運動発達遅滞と小頭症である。*FOXG1*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。これから行われる全国からの患者登録により、これらの疾患の臨床症状の特徴が明らかになり、典型的レット症候群との違いが明確になることが期待される。

E. 結論

*CDKL5*あるいは*FOXG1*に遺伝子異常を有する患者の中には、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、非典型的レット症候群の診断基準に合致しない症例もある。

参考文献

- 1) Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, et al. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol*. 2010; 68: 944-950
- 2) Percy AK, Neul JL, Glaze DG, et al. Rett syndrome diagnostic criteria: lessons from the Natural History Study. *Ann Neurol* 2010; 68: 951-955

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.

2. 学会発表

1. Hara M, Nishi Y, Yoh J, Takahashi S, Yamashita Y, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Plasma IGF-1 and serum ghrelin in patients with Rett syndrome and its relationship to the head growth. 12th International Child Neurology Congress and 11th Asian Oceanian Child Neurology Congress, May 27-Jun 1, 2012, Brisbane,

Australia

2. 熊倉啓、中田昌利、内尾寛子、高橋悟、秦大資. FOXP1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)

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 非典型的レット症候群の臨床症候と改訂診断基準

患者・性別	No.1, female	No.2, female	No.3, female	No.4, female	No.5, male
遺伝子異常	<i>CDKL5</i> c.2112C>A p.Tyr704X	<i>CDKL5</i> c.1568delA p.Asp523AlafsX2	<i>FOXG1</i> c.689G>A p.Arg230His	<i>FOXG1</i> c.256dupC p.Gln86ProfsX35	<i>FOXG1</i> deletion of the gene
<必須事項>					
退行	○	×	○	×	○
<主要診断基準>					
1. 手の合目的運動の退行	○	×	×	×	×
2. 言語機能の退行	×	×	×	×	×
3. 歩行異常	○	○	○	○	○
4. 手の常同運動	○	○	○	○	×
<支持的診断基準>					
1. 覚醒時の呼吸障害	×	×	×	×	×
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	×	×	×	×	×
6. 側彎・前彎	○	○	○	○	○
7. 成長障害	○	×	○	○	○
8. 小さく冷たい手足	○	×	×	○	×
9. 不適切な笑い・叫び	×	×	○	×	×
10. 痛覚反応の鈍麻	×	×	×	×	×
11. 見つめるしぐさ	×	×	×	×	×

典型的レット症候群: 必須事項+4つの主要診断基準をすべて満たす。

非典型的レット症候群: 必須事項+主要診断基準(2つ以上)+支持的診断基準(5つ以上)

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

研究分担者 青天目 信 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 特任助教

研究要旨

本研究では、レット症候群(RTT)の原因遺伝子のMECP2の下流遺伝子であるIGFBP-3が、レット症候群の病態に、どのように関与しているのかを解明する。また、近年、開発されたIGF-1治療は、モデルマウスと患者の双方で、症状を改善するが、そのメカニズムはまだ解明されていない。レット症候群のモデルマウスのIGFBP-3の発現量を変化させることにより生じる表現型を解析し、IGFBP3の発現増加がRTTの病態に与える影響を解明し、IGF-1療法のメカニズムを解明して、より有効な治療法の開発に役立てる。

A. 研究目的

レット症候群(RTT)の原因遺伝子であるMECP2は、さまざまな遺伝子のプロモーターに結合してその発現を調節する働きを担っている。我々は、MECP2の下流遺伝子としてIGFBP3を発見した(J Neuropathol Exp Neurol 2007;66:117)。成長ホルモン(GH)は下垂体で分泌された後、肝臓でIGF-1の産生を促し、このIGF-1が体内の各臓器で作用を発揮する。筋や長管骨、軟骨に働いて、体格を大きくし、神経では神経発生、髄鞘化、シナプス形成、樹状突起形成を促す。IGF-1には、特異的な結合タンパクが存在し、血液中にはIGF-1と結合して、標的臓器まで運ぶ機能とIGF-1の機能を制御する役割を担っている。そうした結合タンパクの中で、最も多いのがIGFBP3である。我々は、先述の研究で、IGFBP3遺伝子上流のプロモーター領域に、MECP2が結合すること、モデルマウスとヒトのRTT患者の双方でIGFBP3の発現が増加していることを示した。

B. 研究方法

すでにRTTのモデル動物として確立されたMecp2欠損(Mecp2-KO)マウス(Nat Genet 2001;27:322)と既報告のヒトIGFBP3を組み込んだhIGFBP3トランスジェニック(hIGFBP3-TG)マウス(Endocrinol 2001;142:1958)を掛け合わせて、Mecp2-KOとhIGFBP3のダブルミュータントマウスを作成した。Mecp2-KOマウスとMecp2-KO-hIGFBP3-TGダブルミュータントマウスについて、生後42日時点での体重と脳重量、体性感覚野における皮質厚、Golgi染色で、体性感覚野第V層に存在する先端樹状突起の基部から100 μ mにおける分岐数、樹状突起上のシナプスボタンを形態別に糸状のfilopodia-type spine、キノコ状のmushroom-type spineの数を比較した。

C. 研究結果

Mecp2-KOマウスとMecp2-KO-hIGFBP3-TGダブルミュータントマウスの体重は、13.83 \pm 3.31g, 11.95 \pm 15.39 g ($p > 0.05$)、脳重量は、0.37 \pm 0.00 g, 0.28

\pm 0.00 g ($p < 0.05$)、皮質厚は974.85 \pm 3225.55 μ m, 940.83 \pm 1782.73 μ m ($p > 0.05$)、分岐数は5.49 \pm 0.31本, 6.05 \pm 0.66本 ($p > 0.05$)、filopodia type spineは、59.64 \pm 27.32本, 79.4 \pm 301.72本 ($p > 0.05$)、mushroom-typeは、6.02 \pm 3.38本, 3.13 \pm 0.59本 ($p < 0.05$)であった。

D. 考察

Mecp2のKOマウスで、IGFBP-3を過剰発現させたダブルミュータントのマウスでは、Mecp2単独のKOマウスと比較して、体重は有意差はないが、脳重量は有意に軽かった。また、Golgi染色では、先端樹状突起の分岐数やfilopodia-type spineの数には有意差がなかったが、mushroom-typeの数は有意に減少していた。神経樹状突起上に存在するdendritic spineは、形態からfilopodia type spine、stubby type spine、mushroom-type spineに分類されるが、filopodia type spineは分~日単位で出現・消失することが知られているが、mushroom-type spineは週~月単位にわたって、安定して存続する成熟するspineと考えられている。神経と神経の間の興奮性信号伝達が行われるのは、こうしたspine上に存在するシナプスであり、mushroom-type spineがダブルミュータントマウスで有意に減少していたことは、IGFBP3の過剰発現により、神経伝達が安定して行われなことを示唆している可能性がある。

IGF-1は、IGFBP3が結合して、標的臓器に運搬されたり、左葉を修飾されたりする重要な生理活性を持つホルモンだが、近年、IGF-1をRTTのモデルマウスに投与すると、生存期間、運動機能、呼吸数、心拍数が改善することが示された(PNAS 2009;106:2029)。また、米国とイタリアで行われている治験でIGF-1により患者の症状が改善していることも示されている(私信)。しかし、IGF-1が、どのようなメカニズムによりRTTのモデルマウスや患者の症状を改善しているのかは、不明である。IGFBP3はIGF-1の機能発現に重要な役割を果たしているホルモンであり、IGFBP3の動態や働きを探ることにより、IGF-1治療の

メカニズムの解明や、より効率的な治療法について理解を深められる可能性があると考えられた。

E. 結論

本研究では、hIGFBP3を過剰発現させたMecp2-KOマウスでは、脳重量が減り、成熟したdendritic spineが減少していることが示された。この減少は、RTTの患者の神経機能障害と関連している可能性とIGF-1療法のメカニズムを解明する糸口となる可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし。
2. 学会発表 なし。

H. 知的財産権の出願・登録

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

研究協力者 堀家 慎一 金沢大学学際科学実験センター・准教授
研究協力者 堀家 牧子 金沢大学学際科学実験センター・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 Prader-Willi/Angelman症候群 (AS) 責任遺伝子座における分子動態を解明する。最近、自閉症やレット症候群患者の脳神経細胞において、15q11-q13領域のクロマチン動態が適切な神経特異的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、15q11-q13領域のクロマチン動態がどのように制御されているか明らかにし、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領域のクロマチン動態の異常が報告され、MeCP2がエピゲノム機構を介したクロマチン動態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の分子動態を解明することで、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

親由来の明らかなヒト15番染色体を1本保持したマウスF12細胞（神経様細胞株）において、15q11-q13領域のインプリンティングセンター (PWS-IC) がどのように染色体ドメインレベルの遺伝子発現及びクロマチン動態を規定しているか明らかにするため、ヒト染色体工学技術を用いてPWS-ICを欠失させた改変ヒト15番染色体を各々構築し、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がどのように制御されているか解析する。

（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

ヒト染色体工学技術を用いてPWS-ICを欠失させた改変母方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。構築したPWS-IC欠失染色体で、15q11-q13領域の遺伝子発現をqRT-PCR法で解析したところ、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法によりクロマチン動態を解析したところ、父方アレル特異的なクロマチン脱凝集は15q

11-q13領域のインプリンティングセンター (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にクロマチン脱凝集が起こっていた。

D. 考察

PWS-IC欠失父方染色体において、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・維持に父性発現を呈する長鎖ノンコーディングRNA、*UBE3A-ATS*の転写が必要ないことを示唆している。逆に、PWS-IC欠失母方染色体において異所的にクロマチン脱凝集が生じたことから、MeCP2などのメチル化CpGを認識する分子が正常母方アレルにおける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-q13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極めて重要である。本研究では、MeCP2などのメチル化PWS-ICに結合する因子が15q11-q13領域のクロマチン脱凝集などの高次クロマチン構造を介して神経細胞特異的な遺伝子発現を制御していることを見出した。この15q11-q13領域の高次クロマチン動態には、MeCP2などのメチル化CpG結合蛋白質が中心的役割を担っていると考えられ、その作用機序の解明はRTTのみならずASやPWS、自閉症など発症機序の解明につながる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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. 堀家慎一「高次遺伝子発現制御機構へのブレイクスルー」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
2. 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
3. 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
3. 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

4. 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

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。

非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の遺伝子変異による病態機序の解析

研究協力者 田中 輝幸 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室・准教授

研究要旨

非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の遺伝子変異による病態機序の解明を目的として、我々が独自に作製した*Cdk15* ノックアウト (KO) マウスの神経科学的表現型解析と、プロテオミクス解析を用いたCDKL5リン酸化基質のスクリーニングを行った。その結果*Cdk15* KOマウスにおいて、海馬神経細胞樹状突起とスパインの形態・密度異常、海馬の電気生理学的異常、情動異常、記憶障害、シナプス機能・形態異常を同定した。また新規CDKL5リン酸化基質候補を同定した。

A. 研究目的

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) 遺伝子は早期発症てんかんを伴う非典型レット症候群の原因遺伝子である。しかしその遺伝子変異による病態機序は未解明であり、治療法も不明である。私はこれらの問題解決を目指し、*Cdk15*ノックアウト (KO) マウスを作製し、その解析を行うと同時に、プロテオミクス解析を用いたCDKL5リン酸化基質の網羅的スクリーニングを行った。

B. 研究方法

1. *Cdk15* KOマウスの表現型解析

- (1) 神経細胞樹状突起及びスパインの解析
- (2) 薬物投与による易けいれん性解析
- (3) 海馬スライスの電気生理学的解析
- (4) マウスの行動解析
- (5) 海馬シナプスの機能、微細構造解析

2. CDKL5リン酸化基質スクリーニング

baculovirus発現系を用い発現・精製したGST標識CDKL5キナーゼドメインをグルタチオンセファロース・アフィニティーカラムに固定化した上に、マウス脳サイトゾルを添加、溶出し、高速液体クロマトグラフィー+質量分析 (LC-MS/MS) を行った (名古屋大学大学院医学系研究科天野睦紀博士との共同研究)。

C. 研究結果

1. *Cdk15* KOマウス解析

Cdk15 KOマウスにおいて、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。KOマウスに対する興奮性アミノ酸投与によって、過剰な強いけいれんが誘発された。海馬スライスの電気生理学的解析により、KOマウスにおける長期増強 (LTP) の異常等を同定した。KOマウス行動解析により、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。

2. CDKL5リン酸化基質スクリーニング

初回のスクリーニングを行い、複数の結合蛋白質候補を得た。再現性確認のため、現在2回目のスクリーニング中である。

D. 考察

我々の研究結果から、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

Cdk15 KOマウスの神経科学的解析によって、記憶・学習・情動に極めて重要な働きを担う海馬の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同定された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし。
2. 学会発表
1. 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
2. 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.
3. 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

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。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤雅之	てんかんの病理	辻 貞俊	最新医学別冊. 新しい診断と治療の ABC 74	最新医学社	大阪	2012	72-82

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	1470	89-97	2012
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	323	128 - 133	2012
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	71	741 - 749	2012
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	287	13859 - 13867	2012
Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Namba E, Ohno K.	Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine G_{M1} -Gangliosidosis.	Mol Genet Metab	106	92-98	2012
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	10	217 - 225	2012

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	413	1301 - 1304	2012
Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Koshi 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	7	e35354	2012
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	518	55-59	2012
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	82	569 - 573	2012
Nagai M, Meguro-Horike M, Horike S.	Epigenetic defects related to assisted reproductive technologies: Large offspring syndrome (LOS).	DNA Methylation-Genomic Technologies and Impact		167 - 182	2012

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Methyl CpG-binding Protein Isoform MeCP2_e2 Is Dispensable for Rett Syndrome Phenotypes but Essential for Embryo Viability and Placenta Development*[§]

Received for publication, October 2, 2011, and in revised form, February 26, 2012. Published, JBC Papers in Press, February 28, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.309864

Masayuki Itoh^{†1,2}, Candice G. T. Tahimic^{§1,3}, Shuhei Ide[‡], Akihiro Otsuki[§], Toshikuni Sasaoka[¶], Shigeru Noguchi^{||4}, Mitsuo Oshimura^{§**}, Yu-ichi Goto[‡], and Akihiro Kurimasa^{§**}

From the [‡]Department of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira 187–8502, Japan, the [§]Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science, and the ^{**}21st Century Centers of Excellence Program, Research Core for Chromosome Engineering Technology, Tottori University, Yonago 683–8503, Japan, the [¶]Department of Laboratory Animal Science, Kitasato University School of Medicine, Sagami-hara 252–0374, Japan, and the ^{||}Signal Transduction Project, Kanagawa Academy of Science and Technology, Kawasaki 213–0012, Japan

Background: There are two isoforms of MeCP2: MeCP2_e1 and _e2. It is not known whether MeCP2_e2 has specific functions *in vivo*.

Results: Deletion of MeCP2_e2 results in no neurological phenotypes but confers a survival disadvantage to embryos and placenta defects.

Conclusion: MeCP2_e2 functions in placenta development and embryo survival.

Significance: MeCP2_e2 deletion results in a non-Rett syndrome phenotype but adversely affects embryo viability.

Methyl CpG-binding protein 2 gene (*MeCP2*) mutations are implicated in Rett syndrome (RTT), one of the common causes of female mental retardation. Two MeCP2 isoforms have been reported: MeCP2_e2 (splicing of all four exons) and MeCP2_e1 (alternative splicing of exons 1, 3, and 4). Their relative expression levels vary among tissues, with MeCP2_e1 being more dominant in adult brain, whereas MeCP2_e2 is expressed more abundantly in placenta, liver, and skeletal muscle. In this study, we performed specific disruption of the MeCP2_e2-defining exon 2 using the Cre-*loxP* system and examined the consequences of selective loss of MeCP2_e2 function *in vivo*. We performed behavior evaluation, gene expression analysis, using RT-PCR and real-time quantitative PCR, and histological analysis. We demonstrate that selective deletion of MeCP2_e2 does not result in RTT-associated neurological phenotypes but confers a survival disadvantage to embryos carrying a MeCP2_e2 null allele of maternal origin. In addition, we reveal a specific requirement for MeCP2_e2 function in extraembryonic tissue, where selective loss of MeCP2_e2 results in placenta defects and up-regulation of *peg-1*, as determined by the parental origin of the mutant allele. Taken together, our findings suggest a novel

role for MeCP2 in normal placenta development and illustrate how paternal X chromosome inactivation in extraembryonic tissues confers a survival disadvantage for carriers of a mutant maternal MeCP2_e2 allele. Moreover, our findings provide an explanation for the absence of reports on MeCP2_e2-specific exon 2 mutations in RTT. MeCP2_e2 mutations in humans may result in a phenotype that evades a diagnosis of RTT.

Methyl CpG-binding protein 2 gene (*MeCP2*) mutations are implicated in Rett syndrome (RTT),⁵ one of the common causes of female mental retardation (1, 2). RTT patients exhibit apparently normal early psychomotor development and then gradually lose previously acquired psychomotor skills. Stereotypic hand movements and microcephaly are also clinical features of this disorder (3). MeCP2 binds to methylated CpG dinucleotides and functions as a transcriptional repressor through its interactions with the Sin3A/histone deacetylase complex and the SWI/SNF chromatin remodeling complex (4–8). To date, two MeCP2 isoforms have been characterized. The first reported MeCP2 isoform, referred to as MeCP2_e2 (translational start site in exon 2; also known as MeCP2A or MeCP2 β), is generated by splicing of all four exons and has a translation start site in the middle of exon 2. The more recently discovered isoform, MeCP2_e1 (translational start site in exon 1; also known as MeCP2B or MeCP2 α), results from alternative splicing of exons 1, 3, and 4 and has a translation start site in exon 1 (9, 10). Their relative expression levels vary among tissues, with MeCP2_e1 being more dominant in adult brain, whereas MeCP2_e2 is expressed more abundantly in placenta,

* This work was supported by Ministries of Health, Labor, and Welfare Grants 15B-3, 18A-3, H21-Nanchi-Ippan-110, and H22-Nanchi-Ippan-133 and by Ministries of Education, Culture, Science, Sports, and Technology of Japan Grant 18390304.

[§] This article contains supplemental Fig. 1.

[†] Both authors contributed equally to this work.

[‡] To whom correspondence should be addressed: 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan. Tel.: 81-423461713; Fax: 81-423461743; E-mail: itoh@ncnp.go.jp.

[§] Recipient of a Japanese Government Research Scholarship. Present address: Endocrine Unit, San Francisco Veterans Affairs Medical Center, San Francisco, CA 94121.

[¶] Present address: Pharmaceuticals Analysis Group, Food Analysis and Safety Assessment Center, Food Technology Research Laboratories, R&D Division, Meiji Co. Ltd., Odawara 250–0862, Japan.

^{||} The abbreviations used are: RTT, Rett syndrome; TRE, tetracycline-responsive promoter; tTA, tetracycline transactivator; XCI, X chromosome inactivation; PGK, phosphoglycerate kinase.

MeCP2_e2 Isoform-specific Function and Embryo Viability

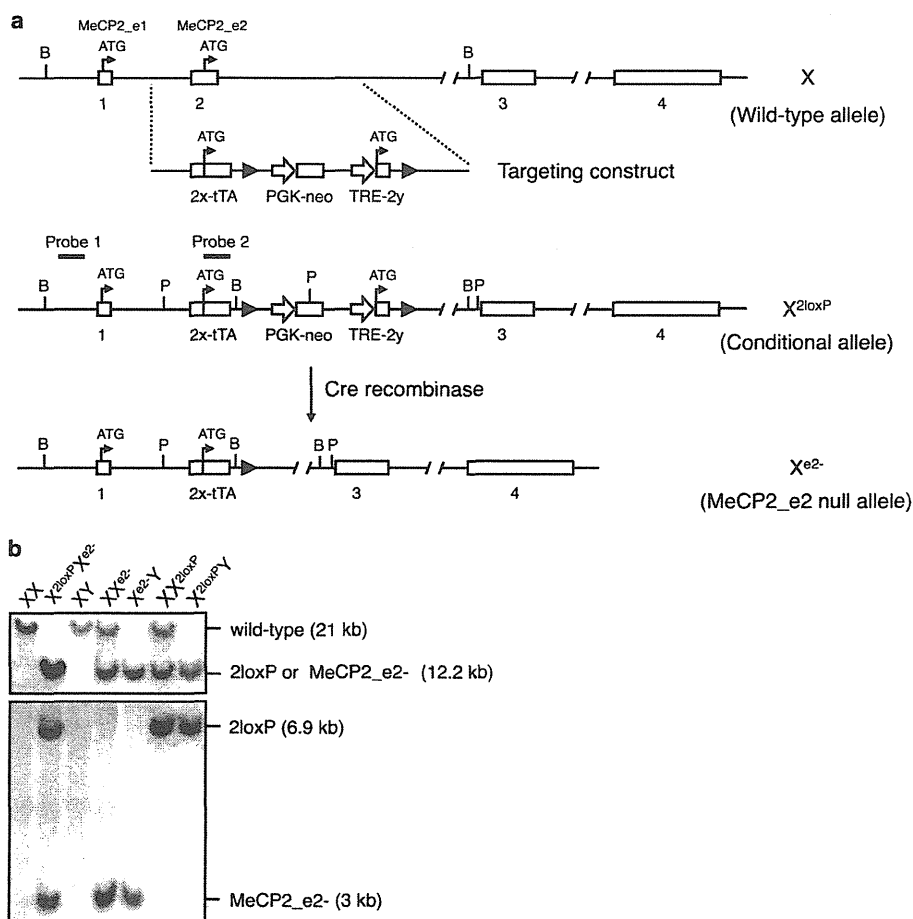


FIGURE 1. Generation of MeCP2_e2-deficient mice. *a*, strategy for selective targeting of MeCP2_e2. Transcription start sites for MeCP2_e2 and MeCP2_e1 before and after exon 2 disruption are shown. loxP sites are denoted as filled triangles. Relative location of probes for Southern hybridization, and positions of restriction enzymes BamHI (B) and PvuII (P) are indicated. Crossing of MeCP2_e2 conditional mice with Nestin-Cre deleter mice results in the excision of the transcriptional start site of MeCP2_e2 and the creation of the MeCP2_e2 null allele, not only in neuronal cells but also in the germ line. Note that the transcriptional start of MeCP2_e1 remains intact after disruption of the MeCP2 locus. *b*, MeCP2_e2 wild-type and mutant alleles as differentiated by two sets of Southern hybridization. For the first screening (top), genomic DNA was digested with BamHI and probed to visualize the presence of the targeted MeCP2 locus containing the exon 2x-tTA sequence. In the second screening (bottom), PvuII-digested genomic DNA was probed to differentiate between the conditional (X^{2loxP}) and null (X^{e2-}) alleles. Approximate band sizes are indicated in parentheses.

liver, and skeletal muscle (10). The most common MeCP2 mutations in RTT occur in exons shared by both isoforms (11). However, no mutation in the MeCP2_e2-defining exon 2 has ever been reported in RTT. In this study, we performed specific disruption of the MeCP2_e2-defining exon 2 using the Cre-loxP system and examined the consequences of selective loss of MeCP2_e2 function *in vivo*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Selective Targeting of MeCP2_e2—The MeCP2_e2 null allele was generated by Cre recombinase-mediated excision of exon 2 in MeCP2_e2 conditional mice (Fig. 1). MeCP2 sequences were either directly derived or amplified from genomic DNA obtained from C57BL/6J ES cells or a BAC clone carrying the MeCP2 locus. The 5'-end of the targeting vector consisted of a 1.2-kb region possessing homology to intron 1 and was generated by high fidelity PCR. The early part of exon 2 containing the untranslated region (referred to as exon 2x) was fused to the tetracycline transactivator (tTA) gene, having a stop codon and poly(A) sequence. The latter half of exon 2 (referred to as exon

2y) beginning from the ATG start site of MeCP2_e2 was placed under the control of the tetracycline-responsive promoter, TRE. A pair of loxP sites flanked this TRE-exon 2y sequence. A PGK-driven neomycin selection marker was positioned between the first loxP site and the TRE-2y region. The 3' arm of the targeting vector consisted of a 5.9-kb EcoRI fragment derived from intron 2.

Generation of MeCP2_e2 Null Mice—A correctly targeted ES cell clone, confirmed by Southern blot analysis, was injected into 3.5-day postconception (dpc) C57BL/6J blastocysts. Approximately 10 ES cells were injected per blastocyst, and 20 blastocysts were transferred to each pseudopregnant recipient. The resulting chimeric offspring were intercrossed mice to generate F1 progeny. For deletion of MeCP2_e2, we crossed MeCP2_e2^{+2loxP} females with deleter mice carrying a Cre recombinase transgene under the control of the Nestin promoter. However, leaky expression from Nestin promoter-driven Cre recombinase induced a deletion in the germ line, resulting in progeny that carried the MeCP2_e2 null allele

MeCP2_e2 Isoform-specific Function and Embryo Viability

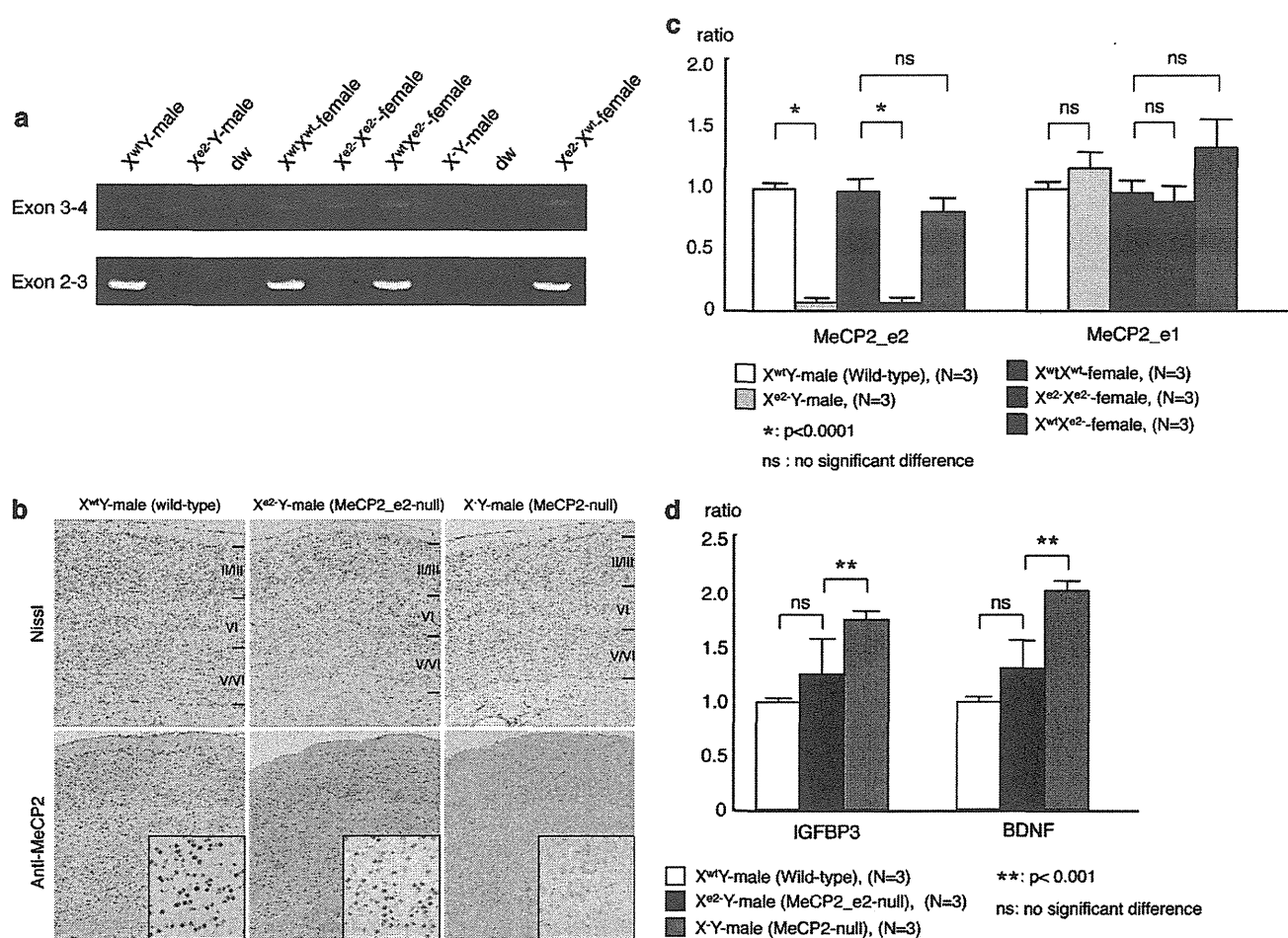


FIGURE 2. Absence of RTT-associated phenotypes in MeCP2_e2-deficient mice. *a*, reverse transcription PCR showing the selective loss of MeCP2_e2 transcripts in brains of MeCP2_e2 null males and females at P28. *b*, sections of P28 mouse brain were stained with cresyl violet to visualize neurons. Immunohistochemical staining was performed using anti-MeCP2 antibody. The MeCP2-deficient mouse, a previously reported MeCP2_e2 and MeCP2_e1 knockout (12), shows thinning of the cerebral cortex and no MeCP2-immunopositive cells. MeCP2_e2 null mouse exhibits MeCP2-immunopositive cells in the cerebral cortex. *c*, real-time PCR analysis of MeCP2_e2 and MeCP2_e1 of P28 brains. The MeCP2_e2-deficient mouse shows MeCP2_e1 expression but not MeCP2_e2, as indicated by the presence of exons 3 and 4 and the absence exons 2 and 3. *d*, quantitation of BDNF and IGFBP3 transcripts in P0 MeCP2_e2-deficient mice by real-time PCR. An $X^{wt}Y$ male mouse was used as a reference. Statistical analysis was performed using Student's *t* test at $p < 0.0001$ (*) and $p < 0.001$ (**). Error bars, S.D.

TABLE 1

Offspring distribution at 4 weeks of age; crossing of $X^{wt}X^{e2-}$ females and $X^{wt}Y$ males (maternal transmission of MeCP2_e2 null allele)

χ^2 sum = 107.04, $p < 0.0001$. % Change = (% observed value - % expected value) / % expected value $\times 100$.

	$X^{wt}X^{wt}$	$X^{e2-}X^{wt}$	$X^{wt}Y$	$X^{e2-}Y$	Total
Observed	52 (27%)	27 (14%)	101 (53%)	12 (6%)	192
Estimated	48 (25%)	48 (25%)	48 (25%)	48 (25%)	192
% Change	8%	-44%	-112%	-76%	

TABLE 2

Offspring distribution at 4 weeks of age; crossing of $X^{wt}X^{e2-}$ females and $X^{e2-}Y$ males (biparental transmission of MeCP2_e2 null allele)

χ^2 sum = 16.20, $p < 0.002$. % Change = (% observed value - % expected value) / % expected value $\times 100$.

	$X^{wt}X^{e2-}$	$X^{e2-}X^{e2-}$	$X^{wt}Y$	$X^{e2-}Y$	Total
Observed	11 (28%)	4 (10%)	20 (50%)	5 (12%)	40
Estimated	10 (25%)	10 (25%)	10 (25%)	10 (25%)	40
% Change	10%	-60%	100%	-50%	

(X^{e2-}). This population was expanded and used in succeeding experiments. Genotypes of the resulting progeny were assessed by an initial PCR screen followed by two sets of Southern blotting. The MeCP2_e2 null allele was generated by Cre recombinase-mediated excision of exon 2 in MeCP2_e2 conditional mice (Fig. 1). A previously reported MeCP2 null mouse, B6.129P2(C)-MeCP2^{tm1.1Bird} (described as MeCP2^{-/-}), generated by targeted disruption of exons 3 and 4 (12), was obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) and used as a control for some of the experiments. All animal studies were per-

formed with the approval of the Animal Care Committee of the National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Japan.

RT-PCR and Real-time Quantitative PCR—We prepared 3–8 fresh frozen brains and placentas of various genotypes at 13.5 dpc and postnatal days 0 (P0) and 28 (P28). Total RNA was isolated from mouse tissue using the RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA) following the manufacturer's recommendations. We carried out reverse transcription with the First-Strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences) or TaqMan

MeCP2_e2 Isoform-specific Function and Embryo Viability

reverse transcription reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) using oligo(dT). Primer sequences and annealing conditions are as follows: for MECP2 exons 2 and 3, 5'-TTAGGGCTCAGGGAGGAAAA-3' (forward) and 5'-CAAATCATTAGGGTCCAAGG-3' (reverse) with annealing temperature of 50 °C and expected PCR product size of 451 bp; for MECP2 exons 3 and 4, 5'-ATTATCCGTGACCGGGGA-3' (forward) and 5'-TGATGCTGCTGCCTTTGGT-3' (reverse) with annealing temperature of 55 °C and an expected PCR product size of 354 bp.

For quantitative analysis, we carried out PCR amplifications using Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's recommendations in a real-time ABI PRISM 7700 platform (Applied Biosystems). Relative transcript ratios were normalized to GAPDH RNA. Primers and probes for mouse *MeCP2* (common sequence of *MeCP2_e2* and *MeCP2_e1*), *MeCP2_e2*, *MAP2*, *IGFBP3*, and *BDNF* are available from Applied Biosystems. The probes 5'-CGCCGAGCGGAGGAG-3' and 5'-CCTGGTCTTCTGACTTTTCTTCCA were designed to amplify a portion of the *MeCP2_e1* transcript, and a probe of CCTCTCGCTCCTCC-3' was used. Sequence Detection System 1.7 software (Applied Biosystems) was used for analysis.

Immunohistochemical Analysis and TUNEL Assay—Tissues were fixed in 4% paraformaldehyde and then embedded in paraffin. Three-micrometer sections were prepared and stained with cresyl violet to visualize neurons. Purified MeCP2 antibody (provided by Dr. S. Kudo, Hokkaido Institute of Public Health, Sapporo, Japan), cleaved caspase-3 antibody (Chemicon International Inc., Temecula, CA), Peg-1 antibody (Atlas Antibodies AB, Stockholm, Sweden), and CRCX4 antibody (Abnova, Taipei, Taiwan) were used for immunohistological experiments. TUNEL assays were performed using terminal deoxynucleotidyltransferase (Roche Applied Science) following the manufacturer's recommendations.

Behavior Analysis—We performed tail suspension, foot-printing, and open field analysis, using 4- or 5-week-old wild-type, *MeCP2_e2*^{-/-}, *MeCP2_e2*^{2loxP}, and *MeCP2*^{-ly} males.

Statistical Analysis—Statistical analysis was performed using the χ^2 test. Animal crossings were performed to evaluate the effect of parent-specific transmission of the *MeCP2_e2* null allele using appropriate sample sizes. Statistical significance of the expression levels was evaluated using Student's *t* test with a significance level of $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

MeCP2_e2-null Mouse Generation—We generated the *MeCP2_e2* mutant allele (*X*^{e2-}) by crossing mice carrying a tetracycline-inducible *MeCP2_e2* conditional allele (*X*^{2loxP}) with deleter mice carrying a Nestin-driven Cre recombinase transgene (Fig. 1). We observed germ line transmission of the *MeCP2_e2* null allele in some of the F3 generation (Fig. 1), probably resulting from leaky expression of Nestin-driven Cre recombinase in non-brain tissue. This subpopulation was expanded, and the F10 to F12 generations were used for the experiments in this study. We confirmed loss of *MeCP2_e2* expression, whereas *MeCP2_e1* transcription remained intact in these animals (Fig. 2, a and c). Brain histological analysis

TABLE 3

Offspring distribution at 4 weeks of age; crossing of *X*^{wt}*X*^{wt} females and *X*^{e2-}*Y* males (paternal transmission of *MeCP2_e2* null allele)

χ sum = 2.28, no significant difference. % Change = (% observed value - % expected value)/% expected value) × 100.

	<i>X</i> ^{wt} <i>X</i> ^{e2-}	<i>X</i> ^{wt} <i>Y</i>	Total
Observed	50 (48%)	55 (52%)	105
Estimated	52.5 (50%)	52.5 (50%)	105
% Change	-4%	4%	

TABLE 4

Offspring distribution at 13.5 dpc; crossing of *X*^{wt}*X*^{e2-} females and *X*^{wt}*Y* males (maternal transmission of *MeCP2_e2* null allele)

χ sum = 13.25, $p < 0.005$. % Change = (% observed value - % expected value)/% expected value) × 100.

	<i>X</i> ^{wt} <i>X</i> ^{wt}	<i>X</i> ^{e2-} <i>X</i> ^{wt}	<i>X</i> ^{wt} <i>Y</i>	<i>X</i> ^{e2-} <i>Y</i>	Total
Observed	36 (28%)	28 (22%)	46 (36%)	18 (14%)	128
Estimated	32 (25%)	32 (25%)	32 (25%)	32 (25%)	128
% Change	13%	-13%	44%	-44%	

TABLE 5

Offspring distribution at 13.5 dpc; crossing of *X*^{wt}*X*^{wt} females and *X*^{e2-}*Y* males (paternal transmission of *MeCP2_e2* null allele)

χ sum = 2.28, no significant difference. % Change = (% observed value - % expected value)/% expected value) × 100.

	<i>X</i> ^{wt} <i>X</i> ^{e2-}	<i>X</i> ^{wt} <i>Y</i>	Total
Observed	27 (61%)	17 (39%)	44
Estimated	22 (50%)	22 (50%)	44
% Change	23%	-23%	

showed no difference between *MeCP2_e2* null mouse and wild-type mice (Fig. 2b).

Phenotypes and Expression Analyses of *MeCP2_e2*-null Mice—At birth, mice carrying *MeCP2_e2* mutant alleles were indistinguishable from wild-type littermates. They developed into fertile adults and did not display any neurological deficits observed in murine models for RTT (12, 13), indicating that *MeCP2_e1* is sufficient to carry on the functions of *MeCP2* in the brain. Moreover, mice carrying *MeCP2_e2* mutant alleles lived as long as their wild-type siblings, over 2 years (data not shown). Immunohistochemical staining of brain tissue from *X*^{e2-}*Y* and *X*^{wt}*X*^{e2-} animals at 28 days of age revealed normal morphology of neuronal layers in contrast to the denser packaging of neurons in a previously reported RTT model wherein both *MeCP2* isoforms have been knocked out (Fig. 2b) (14, 15). Taken together, these results demonstrate that loss of *MeCP2_e1* function is not sufficient to cause RTT-associated neurological phenotypes.

To examine the implications of *MeCP2_e2* deficiency on *MeCP2* transcriptional silencing activity, we checked mRNA levels of two *MeCP2*-regulated genes, insulin like growth factor binding protein 3 (*IGFBP3*) (16, 17) and brain-derived nerve growth factor (*BDNF*) (18). The mRNA levels of these genes in brains of *X*^{e2-}*Y* mice did not significantly differ from those of age-matched wild-type males (Fig. 2d). In contrast, *IGFBP3* and *BDNF* transcript levels increased by 1.6- and 2-fold, respectively, in the *X*⁻*Y* total *MeCP2* knockout. These findings indi-