

2013/7085A

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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成26（2014）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25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成26（2014）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	5
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	7
(資料1) 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	15
2. <i>MECP2</i> 遺伝子変異の生物学的解析	
伊藤 雅之	17
3. 再生医療技術を利用したレット症候群(RTT)の病態解明に関する研究	
松石豊次郎	19
4. レット症候群モデルマウスの延髄 <i>GAD1</i> 遺伝子発現変化と無呼吸の関連性	
白川 哲夫	23
5. レット症候群の臨床遺伝学的研究	
高橋 悟	25
6. レット症候群モデルマウスにおける <i>IGFBP3</i> 発現量の影響	
青天目 信	27
7. メチル化CpG結合タンパク 5 (MBD5)の機能解析	
堀家 慎一	29
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	31
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷	37

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、臨床研究は少なく有効な治療法や療育法がない。本研究では、患者データベースを構築し、基礎研究とあわせて臨床研究を推進し、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・治療法の開発をめざす。

患者登録制による患者データベース体制を作り、運用し、遺伝子診断などの診療支援を行なっている。臨床遺伝学的研究では、FOXP1遺伝子解析を通して、14q12欠失症候群で見られる症候のうち、特異顔貌はC14orf23のハプロ不全の影響が考えられた。

基礎研究では、*Mecp2*欠損マウスの無呼吸の発症病態を明らかにし、バルプロ酸による治療の可能性が示唆された。*Mecp2*欠損マウスは心機能に異常はないが、QT延長などの不整脈が認められた。また、心臓に関与する一部の遺伝子発現異常がみられた。また、MECP2の下流遺伝子であるIGFBP3の発現異常がレット症候群の発症病態の一部を説明し、RTTの神経機能障害の関連とIGF-1療法の分子機序を解明する可能性が示された。*Cdk15*欠損マウスでは、海馬の神経細胞樹状突起スパインとシナプス受容体蛋白質と機能異常の存在が分かった。さらに、MECP2のMBDの点変異によるヘテロクロマチン異常を介した影響を明らかにした。MBD5発現異常がmicroRNAの発現制御や選択的スプライシングの機構に関与している可能性が示唆された。また、*Mecp2*欠損ES細胞を樹立し、心筋細胞に分化することができた。

これらの基礎研究の成果は、治療法の開発につながるものと期待される。

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
堀家 慎一 金沢大学学術総合センター 准教授

研究協力者

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
高橋 知之 久留米大学高次脳疾患研究所 准教授
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、患者デー

ターベースを構築し、基礎研究とあわせて多角的な研究を展開し、生物マーカーと早期診断法を確立し、創薬・治療法の開発をめざす。

本年度より、患者データベースの体制が整い運用している。あわせて、遺伝子診断を含む診断・診療支援を行っている。

臨床遺伝学的研究では、レット症候群典型例の約90%にMECP2遺伝子異常が同定されるが、非典型例ではMECP2遺伝子異常の検出率は低く、「早期発症てんかん型」では *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)* 遺伝子異常があり、「先天型」では *FOXP1* 遺伝子異常があることが知られている。比較的頻度が低い「先天型」では、*FOXP1* を含む14q12に欠失を有する症例と *FOXP1* 遺伝子内変異に起因する症例が知られている。この「先天型」レット症候群の臨床症状と遺伝子異常との関連を検討する。

基礎研究では、*Mecp2*欠損マウスはRTTモデルとして有効であり、このマウスを多角的に解析することで、複雑な症状を呈するRTTの病態を解明する。まず、*Mecp2*欠損マウスの異常呼吸運動について、延髄呼吸中枢の glutamic acid decarboxylase 1(GAD1) mRNA 発現とプロモーター領域のメチル化を解析する。次に、MECP2の下流遺伝子である insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) の RTT の発症病態の関与を明らかにするために遺伝子改変マウスの行動学的、形態学的解析を行なう。さらに、

Cdk15 欠損マウスを作製し、てんかん、記憶障害、情動異常等のメカニズムを解明する。

細胞生物学的研究では、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について、培養細胞を用いて明らかにする。また、MECP2 類縁の MBD5 の神経細胞における標的遺伝子の同定と発現制御メカニズムを明らかにする。*Mecp2* 欠損マウスの ES 細胞と iPS 細胞を樹立し、RTT 発症に関わる MeCP2 の神経系及び心臓発生・分化過程ならびに、心機能における機能的役割や病態メカニズムの解明、治療薬スクリーニングの基盤をつくる。

B. 研究方法

患者データベース登録票 (資料 1) を作成し、それに準拠した手引きを作成した。NPO法人レット症候群支援機構ホームページ (www.npo-rett.jp/) で、遺伝子診断の案内とともに紹介している。患者およびその家族が登録票と手引きを入手し、医師 (主治医) と登録票を作成し、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っている。国立精神・神経医療研究センターで登録、管理を行っている。

「先天型」レット症候群を疑われた23例を対象に、*FOXG1* 遺伝子の直接塩基配列決定法を行なった。変異のない症例はmultiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法あるいは定量的PCR法を追加した。また、遺伝子欠失範囲はarray-comparative genomic hybridization (CGH) 法 (high-resolution 400 K array (Agilent Technologies Inc.)) で決定した。

Mecp2 欠損マウスと野生型マウスを全身型プレチスモグラフ (PLY4211; Buxco Electronics) チャンバーに入れ、1時間の呼吸波形記録、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、生後8日齢から7日間、バルプロ酸の腹腔内投与 (2 mmol/kg/day) を行い、無呼吸への影響を生後15日で検討した。形態学的、発現解析として、生後2週齢の延髄腹側呼吸群組織を取出し、定量PCR法 (Light Cycler Nano, Roche Applied Science) により *GAD1* mRNA 量を測定し、バルプロ酸腹腔内投与マウスと比較した。さらに、bisulfite 処理の後 *GAD1* プロモーター領域の60クローンについて塩基配列を決定し、23個の CpG island についてメチル化を調べた。*Mecp2* 発現制御マウスを樹立したが、個体数の確保が困難であり、十分な解析を進められなかった。一方、*IGFBP3* 過剰発現マウスと *IGFBP3* 欠損マウスを作成し、*Mecp2* 欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成した。体重と脳重量、体性感覚野の皮質厚、神経細胞の分岐数とシナプスの形態 (filopodia-type spine, mushroom-type spine 数) を比較した。さらに、行動学的、形態学的解析と IGF-1 発現を調べた。*Cdk15* 欠損マウスの表現型解析として、神経細胞樹状突起及びスパインの計測、薬物投与による易けいれん性の

生理学的解析、海馬スライスの電気生理学的解析、海馬・大脳皮質の興奮性シナプスの解析を行なった。

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。遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチン像を観察し、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調べ、網羅的発現解析を行なった。また、ゲノム編集技術により、SH-SY5Y 細胞株の MBD5 ヘテロ欠損細胞株を樹立した。この mRNA マイクロアレイ解析により MBD5 の量的変化による発現遺伝子の異常を明らかにした。*Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの ES 細胞を樹立し、心筋分化誘導を行い、その分化能を比較検討した。マウス ES 細胞による心筋分化誘導は胚様体形成法で行い、12日間の分化誘導後、分化過程における心筋分化マーカー遺伝子や蛋白質の発現を比較検討した。心臓の生理的機能評価のために、心エコーによる心機能、心電図の計測を行った。さらに、生後6週齢と8週齢で心臓組織の30個の心臓特異的遺伝子の発現を定量PCRを行なった。

(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を得た後進めている。また、マウスの作成と取扱いは、関連指針等に準拠し、小型実験動物倫理問題等検討委員会の承認のち行なった。

C. 研究結果

本年度の患者データベースへの登録は15名である。遺伝子診断は10名であり、1例に *FOXG1* 遺伝子変異を認めた以外、すべて *MECP2* 遺伝子変異であった。「先天型」レット症候群を疑われた23例のうち3例に *FOXG1* 遺伝子異常を認めた。2例は *FOXG1* 遺伝子内変異 (c.256dupC, p.Gln86ProfsX35; c.689G>A, p.Arg230His) で、1例は14q12領域の *FOXG1* と *C14orf23* を含む0.54-Mb欠失を有していた。これらの違いは、表現型に反映されている可能性が考えられた。

In vivo 解析では、*Mecp2* 欠損マウスは無呼吸頻度が高かった ($p < 0.01$)。これは生母の変異アレルの有無に影響されることが分かった。*Mecp2* 欠損マウスの無呼吸頻度はバルプロ酸投与により有意に改善した ($p < 0.05$)。また、延髄腹側呼吸群の *GAD1* mRNA 発現量は *Mecp2* 欠損マウスで有意に低く ($p < 0.05$)、バルプロ酸投与により改善した ($p < 0.05$)。これには、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーター領域の高メチル化状態があることが分かり、発現への影響と呼吸運動の異常の基盤になっているものと考えられた。*IGFBP3* 過剰発現マウス、*IGFBP3* 欠損マウスと *Mecp2* 欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成した。体重、脳重量、行動学的、形態学的解析と IGF-1 発現はいずれも *IGFBP3* の発現の有無に影響し、*IGFBP3* の欠損によって *Mecp2* 欠損マウスの症状が一部回復することが分かった。また、*Mecp2* 欠損マウスは不整

脈を呈し、QT 延長をきたしやすことが分かった。さらに発現解析の結果、*Mecp2* 欠損では心臓に関与する 30 個の遺伝子のうち 4 遺伝子が高発現し、6 遺伝子の低発現する傾向があった。*Cdk15* 欠損マウスの解析では、海馬 CA1 錐体ニューロンの樹状突起スパインの形態、サブクラス、及び密度に異常があり、興奮性アミノ酸投与によってけいれんが誘発された。また、長期増強の異常、脱分極の異常等を認め、グルタミン酸受容体サブユニットの構成異常があることが分かった。

In vitro 解析では、MBD領域の変異によるヘテロクロマチン像と重症度に関連性があった。発現解析とクロマチン免疫沈降解析の結果、変異特異的な発現分子を同定した。ゲノム編集により、C末側欠損MBD5をヘテロに持つ細胞株を樹立した。網羅的発現解析により、microRNAやsnRNAなどのnon-coding RNAが極めて高く、MBD5がnon-coding RNAの発現制御に影響していることが示唆された。*Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスのES細胞から心筋分化誘導を行い、4-6日目以降心筋分化転写因子発現があり、心筋分化を確認した。*Mecp2* 欠損心筋細胞は機能的に自動収縮し、野生型と違いはなかったが、心筋分化マーカーの高発現がみられた。

D. 考察

本年度より始まった疾患患者データベース登録は、臨床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り、疫学解析や臨床研究のためには多くの登録数が必要である。

「先天型」レット症候群の病態は多様であることが示唆された。*FOXG1* 遺伝子異常を有する症例の臨床的特徴は、乳児期早期からの精神運動発達遅滞と小頭症である。14q12欠失症候群でみられる顔貌の特徴は、C14orf23の欠失によるものと考えられた。

Mecp2 欠損マウスの無呼吸頻度は有意に高く、生母の変異アレルの有無に影響していた。この分子病態として、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーターの CpG メチル化状態が変化し、*GAD1* mRNA 発現に影響していることが分かった。これは、バルプロ酸投与によって *Mecp2* 欠損マウスの無呼吸頻度が改善することから、RTT の無呼吸発作と GABA 合成の関連性が示唆された。また、レット症候群の発症病態の一部が IGFBP3 による可能性が示唆された。これらの発現を調整することにより、*Mecp2* 欠損マウスの表現型が改善されることから、治療法開発のヒントになるものと期待される。さらに、RTT でみられる QT 延長と不整脈が *Mecp2* 欠損マウスで呈したことは、RTT の心筋機能研究に重要な情報を提供することができるものと期待される。*Cdk15* 欠損マウスでは、神経細胞樹状突起の未熟スパインが有意に増加していた。さらに、電気生理学的異常などの結果から、*Cdk15* 欠損マウスではグルタミン酸シグナリング障害があることが分かっ

た。これらのことから、*CDKL5* 遺伝子変異の病態は興奮性シナプス機能異常であると考えられた。

MECP2 の MBD の点変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、症状の重症度に影響することを見出した。このことは、MBD の遺伝子変異が *MECP2* の多数の標的遺伝子の発現に影響を及ぼし、症状の一部を説明しうることを示唆しているものと考えられた。また、*MeCP2* の microRNA の発現制御への関与や選択的スプライシング機構への関与が報告され、メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質の新たな機能が注目されている。MBD5 変異細胞でみられた microRNA の発現異常は自閉症患者で多数報告されている領域に関与していたことから、広く発達障害の病態形成に関与している可能性がある。さらに、*Mecp2* 欠損 ES 細胞は心筋細胞に分化する一方で、心筋分化過程の遺伝子発現を制御していることが示唆された。RTT の心臓の病態解明だけでなく、正常の心臓の発生・分化のエピゲノム機構の解明に有用な試料となるものと考えられた。

E. 結論

レット症候群の患者データベースを構築し、運用が始まった。あわせて、遺伝子診断などの診療支援を行った。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参加者を増やしていく必要がある。

FOXG1 遺伝子解析を通して、14q12欠失症候群でみられる症候のうち、特異顔貌は C14orf23 のハプロ不全の影響と考えられた。

Mecp2 欠損マウスの無呼吸は、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーターのメチル化と *GAD1* mRNA 発現が影響し、バルプロ酸による改善が得られた。また、生母マウスの変異アレルの有無が中枢発達へ影響している可能性が考えられた。IGFBP3 の発現異常がレット症候群の発症病態の一部を説明できる可能性が示唆され、RTT の神経機能障害の関連と 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。*Cdk15* 欠損マウスの解析から、海馬の神経細胞樹状突起スパインとシナプス受容体蛋白質と機能異常が分かった。*Mecp2* 欠損マウスは心機能に異常はないが、QT 延長などの不整脈が認められた。また、心臓に関与する一部の遺伝子発現異常がみられた。

MECP2 の MBD の点変異によるヘテロクロマチンの異常が症状に影響していることを明らかにした。MBD5 の発現異常が microRNA の発現制御や選択的スプライシングの機構に関与している可能性が示唆され、今後神経系の MBD5 機能を明確にすることにより、発達障害の解明だけでなく、他のメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質の異常による発症病態の解明にもつながる。さらに、*Mecp2* 欠損 ES 細胞を樹立し、心筋細胞に分化することができた。しかし、*Mecp2* 欠損心筋細胞では心筋分化マーカーの高発現が認められた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 伊藤雅之. レット症候群：自閉性障害をもつ特異な発達障害. SRL 宝函 2013;34 (2):28-39.
 2. Waga C, Asano H, Tsuchiya A, Itoh M, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S. Identification of novel SHANK3 transcript in the developing mouse neocortex. *J Neurochem* 2014;128(2):280-293.
 3. Miyazaki C, Saitoh M, Itoh M, Yamashita S, Miyagishi M, Takashima S, Moser AB, Iwamori M, Mizuguchi M. Altered phospholipid molecular species and glycolipid composition in brain, liver and fibroblasts of Zellweger syndrome. *Neurosci Lett* 2013;552:71-5.
 4. Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Itoh M, Uematsu M, Saito Y, Honda R, Kure S. Increased Ki-67 immunoreactivity in the white matter in hemimegalencephaly. *Neurosci Lett* 2013;548:244-8.
 5. Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Endoh K, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. *PLoS ONE* 2013 Jun 21;8(6):e66729.
 6. Suda K, Kishimoto S, Takahashi T, Nishino H, Okamura H, Teramachi Y, Yokoyama T, Yasukawa H, Ohbu K, Imaizumi T, Matsuishi T. Circulating Myeloid Dendritic Cells is Decreased in the Acute Phase of Kawasaki Disease. *J Clin Exp Cardiol* (in press)
 7. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu SI, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. *Brain Dev*. 2013 Dec 27. pii: S0387-7604(13)00310-0. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.
 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* 2013;36(3):565-573.
 9. Kumakura A, Takahashi S, Okajima K, Hata D: A haploinsufficiency of *FOXG1* identified in a boy with congenital variant of Rett syndrome. *Brain Dev* 2013 (in press)
 10. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu S, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi, T: Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett Syndrome. *Brain Dev* 2014 (in press)
 11. 田中輝幸, 奥田耕助. (2013). 小児の難治性てんかんと *CDKL5*. *Clinical Neuroscience* 31, 699-702.
- ### 2. 学会発表
1. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎. アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞へ高効率遺伝子導入技術の開発. 第13回日本再生医療学会総会(京都). 平成26年3月4-6日 国立京都国際会館.
 2. 高橋 悟. レット症候群の病態理解：病因遺伝子 (*MECP2*, *CDKL5*, *FOXG1*) 変異に関連した臨床的特徴、シンポジウム「ゲノムの構造・機能から見た発達障害疾患の病態理解」. 第55回日本小児神経学会総会 H25. 6. 1 (大分市)
 3. 中田昌利、熊倉啓、柴田洋史、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. 第116回日本小児科学会総会 H25. 4. 19 (広島市)
 4. Nishiyama M, Asano M, Iwasa S, Suzuki A, Wada T, Takiguchi H, Shirakawa T. Diurnal increase of apnea and reduced *GADI* mRNA expression in respiratory nuclei of *Mecp2*-deficient mice. *Neuroscience* 2013, Nov. 12, San Diego.
 5. 堀家慎一, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒一堀家牧子 「父性発現遺伝子 *MAGEL2* の遺伝子発現制御における染色体ダイナミクスの役割」第7回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良県新公会堂, 奈良, 2013年5月30~31日
 6. 堀家慎一 「*MeCP2* is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus.」酵母からのエピジェネティクス研究へのメッセージ, グランディア芳泉, あわら, 2013年9月2~4日
 7. 堀家慎一「神経疾患のジェネティクスとエピジェネティクス」日本心理学会 第77回大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2013年9月19~21日
 8. Horike S. (Oral) 「*MeCP2* is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus.」Epigenomics of Common Diseases, Wellcome Trust Conference Centre, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK 2013年11月7~10日
 9. 堀家慎一, 岡田源作, 棟居俊夫, 東田陽博, 横山茂, 目黒一堀家牧子 「自閉症発症機序におけるエピゲノムの重要性～オキシトシンレセプタープロ

- モーター領域の DNA メチル化解析〜」日本人類遺伝学会 第 58 回大会, 江陽グランドホテル, 仙台, 2013 年 11 月 20~23 日
10. 堀家慎一, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒一堀家牧子 「15q11-q13 領域の遺伝子発現制御における染色体ダイナミクスの役割」第 31 回染色体ワークショップ・第 12 回核ダイナミクス研究会, ホテルおかだ, 箱根, 2013 年 11 月 25~27 日
11. 堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, 目黒一堀家牧子 「Long non-coding RNA, UBE3A-ATS is essential for long-range gene regulation and chromosome territory in 15q11-q13 imprinted locus.」第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸ポートアイランド, 神戸, 2013 年 12 月 3~6 日
12. 難治性てんかん・発達障害原因遺伝子 CDKL5 の生体内分子機能・病態機序解析. 第 54 回日本神経病理学会総会学術研究会 (東京) (2013. 4. 25)
13. West 症候群・非典型 Rett 症候群の原因遺伝子 CDKL5 のノックアウトマウス作製・解析による病態機序の解明. 第 55 回日本小児神経学会 (大分) (2013. 5. 30)
14. Functional studies of the CDKL5, a causative gene for neurodevelopmental disorders, by interactome screening and loss-of-function analyses. 第 36 回日本神経科学大会 (京都) (2013. 6. 22)
15. 小児の難治性てんかんと CDKL5. 第 70 回東海てんかん集談会 (浜松) (2014. 2. 1)
- 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。

レット症候群データベース 患者登録用紙		※登録番号
選択肢の数字は1つだけ選んで○をしてください。複数選択可能な欄には、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>記入日 西暦()年()月()日</p> <p>患者情報 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>自宅情報 郵便番号 〒 - 住所 電話番号 () -</p> <p>病院情報 病院名 () 主治医 () 電話番号 () - カルテ番号(患者番号) ()</p> <p>在胎出生歴 妊娠中の異常 1 無 2 有 出産時の異常 1 無 2 有() 在胎期間 ()週()日 出生時の 体重()g 頭囲()cm 身長()cm 胸囲()cm</p> <p>発達歴(現在の状態ではなく、最初に獲得した時期を記載) 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>最初に気づいた症状と年齢(複数回答可) <input type="checkbox"/>寝てばかりいる <input type="checkbox"/>哺乳力が弱い <input type="checkbox"/>体が柔らかい <input type="checkbox"/>視線が合いにくい <input type="checkbox"/>目つきが気になる <input type="checkbox"/>泣き止まない <input type="checkbox"/>健診で異常を指摘された <input type="checkbox"/>その他 () その年齢 ()歳()か月</p> <p>典型的レット症候群の必須条項(調査票記入時点の状態を記載)</p> <p>1. 退行^{※1} 1 無 2 有 ()歳()か月から 退行後の安定期または改善期 ()歳()か月から <input type="checkbox"/>安定期有 <input type="checkbox"/>改善期有 <input type="checkbox"/>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^{※2} 1 無 2 有 3 機能獲得なし ・上肢の機能^{※3} 現在のレベル () 過去の最高のレベル ()</p> <p>3. 手の常同運動 1 無 2 有 ()歳()か月から <input type="checkbox"/>手のねじれ・絞り <input type="checkbox"/>手叩き・指打ち <input type="checkbox"/>手洗い・手こすり <input type="checkbox"/>手を口につける・入れる <input type="checkbox"/>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^{※4} 1 無 2 有 3 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^{※5} 現在のレベル () 過去の最高レベル () 意思の表出^{※6} 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 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) 四つ這いが 1 問題なし 2 パターンの異常 3 不能 独歩が 1 問題なし 2 パターンの異常 3 不能 ・移動・運動の機能^{※7} 現在の主な移動方法 () 過去の最高レベル ()</p> <p>その他の症状(1)(調査票記入時点の状態を記載)</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 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・小頭症 1 無 2 有 3 不明 ・頭囲の拡大速度の鈍化 1 無 2 有 3 不明 ・成長障害・低身長 1 無 2 有 3 不明 ・小さい手・足 1 無 2 有 3 不明 ・初潮 1 無 2 有 ()歳()か月から</p> <p>3. 発達・知能指数 1 <20 2 21-35 3 36-50 4 51-69 5 70-84 6 ≥85 測定方法 <input type="checkbox"/>臨床観察 <input type="checkbox"/>遠城寺 <input type="checkbox"/>津守・稲毛 <input type="checkbox"/>その他()</p> <p>4. 精神発達の症状 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・自閉性 1 無 2 有 3 不明 ・てんかん 1 無 2 有 3 不明 ・脳波異常 1 無 2 有 3 不明 <input type="checkbox"/>背景活動の徐波化 <input type="checkbox"/>てんかん性異常波 <input type="checkbox"/>紡錘波消失 <input type="checkbox"/>その他()</p> <p>医師署名(自署) このデータは原情報に忠実に記入され、医師の確認のもとで作成されたことを証明します 西暦()年()月()日 (氏名)</p>	<p>その他の症状(2)(調査票記入時点の状態を記載)</p> <p>5. 行動の症状 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・常同運動 1 無 2 有 3 不明 部位(複数回答可) <input type="checkbox"/>口 <input type="checkbox"/>舌 <input type="checkbox"/>上肢 <input type="checkbox"/>下肢 <input type="checkbox"/>その他() ・場に合わない笑い 1 無 2 有 3 不明 ・場に合わない叫び 1 無 2 有 3 不明 ・視点が合わない 1 無 2 有 3 不明 ・痛み刺激に反応低下 1 無 2 有 3 不明</p> <p>6. 筋緊張・運動の症状 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・筋緊張低下 1 無 2 有 (部位:<input type="checkbox"/>全身 <input type="checkbox"/>上肢 <input type="checkbox"/>下肢 <input type="checkbox"/>体幹) ・筋緊張亢進 1 無 2 有 (部位:<input type="checkbox"/>全身 <input type="checkbox"/>上肢 <input type="checkbox"/>下肢 <input type="checkbox"/>体幹) ・筋緊張低下から亢進に変化 1 無 2 有 ・覚醒時の歯ざしり 1 無 2 有 3 不明 ・不随意運動 1 無 2 有 3 不明 「有」の場合 <input type="checkbox"/>ジストニア <input type="checkbox"/>ジスキネジア <input type="checkbox"/>ミオクローヌス (複数回答可) <input type="checkbox"/>寡動 <input type="checkbox"/>振戦 <input type="checkbox"/>分類不能</p> <p>7. 自律神経の症状 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・末梢血管反射異常^{※8} 1 無 2 有 3 不明 ・冷たい手・足 1 無 2 有 3 不明 ・覚醒時の呼吸異常 1 無 2 有 3 不明 「有」の場合 <input type="checkbox"/>過呼吸 <input type="checkbox"/>息止め <input type="checkbox"/>吞気 <input type="checkbox"/>急激な吐息・唾飛ばし ・心電図異常 1 無 2 有 3 不明 <input type="checkbox"/>QT延長 <input type="checkbox"/>その他の異常()</p> <p>・睡眠パターン^{※9}の異常 1 無 2 有 3 不明 <input type="checkbox"/>乳児期に日中の睡眠時間が長く、手がかからない <input type="checkbox"/>その他の異常()</p> <p>8. 消化管症状・機能 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・流涎 1 無 2 有 ・咀嚼障害 1 無 2 有 (口嚙まない <input type="checkbox"/>丸のみ <input type="checkbox"/>他) ・嚥下障害 1 無 2 有 (口溜め込み飲まない <input type="checkbox"/>誤嚥 <input type="checkbox"/>他) ・1回の平均食事時間 1 30分以内 2 30-60分 3 60分以上 ・摂食拒否 1 無 2 有 ・便秘 1 無 2 有</p> <p>9. 整形外科的問題 ・整形外科診療歴 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) <input type="checkbox"/>定期受診や健診として受診している <input type="checkbox"/>不調時のみ受診 <input type="checkbox"/>その他 ・股関節 右 <input type="checkbox"/>正常 <input type="checkbox"/>内転変形 <input type="checkbox"/>脱臼 <input type="checkbox"/>不明 左 <input type="checkbox"/>正常 <input type="checkbox"/>内転変形 <input type="checkbox"/>脱臼 <input type="checkbox"/>不明 手術 1 無 2 有 ()歳()か月時 ・足関節 右 <input type="checkbox"/>正常 <input type="checkbox"/>尖足 <input type="checkbox"/>内反 <input type="checkbox"/>外反 <input type="checkbox"/>凹足 <input type="checkbox"/>不明 左 <input type="checkbox"/>正常 <input type="checkbox"/>尖足 <input type="checkbox"/>内反 <input type="checkbox"/>外反 <input type="checkbox"/>凹足 <input type="checkbox"/>不明 手術 1 無 2 有 ()歳()か月時 ・脊椎異常 1 無 2 有 3 不明(有の場合、下記の各項目にチェック) <input type="checkbox"/>側弯 <input type="checkbox"/>後弯 <input type="checkbox"/>前弯 ()歳()か月から</p> <p>10. 歯科的問題 ・歯科診療歴 1 無 2 有(有の場合、下記の各項目にチェック) <input type="checkbox"/>定期受診や健診として受診している <input type="checkbox"/>不調時のみ受診 <input type="checkbox"/>その他 ・歯科的症状 1 無 2 有 3 不明(有の場合、下記の各項目にチェック) <input type="checkbox"/>歯列不正 <input type="checkbox"/>咬合異常 <input type="checkbox"/>歯の摩耗 <input type="checkbox"/>その他()</p> <p>11. その他症状</p> <p>除外診断項目 代謝性疾患・神経変性疾患 1 無 2 有 周生期・後天性の脳障害 1 無 2 有</p> <p>遺伝子検査 1 施行済み 2 実施予定 3 未施行 実施(予定)施設 () MECP2遺伝子検査 1 済 2 未 3 不明 検査法 1 直接シーケンス法 2 MLPA法 3 その他() MECP2の異常 1 無 2 有 異常の結果^{※9} () 他の遺伝子検査 <input type="checkbox"/>未検査 <input type="checkbox"/>CDKL5 <input type="checkbox"/>FOXG1 <input type="checkbox"/>その他() MECP2以外の遺伝子の異常 1 無 2 有 異常の結果()</p> <p>最終診断 1 典型的レット症候群 2 非典型的レット症候群 3 2010年診断基準^{※10}には当てはまらないがレット症候群 4 レット症候群ではないがMECP2異常がある</p> <p>施設名: 送付元連絡先: 〒 - (電話): (メールアドレス):</p>	
<p>未記入の箇所、不明な点がある場合は、こちらからお電話などにご確認させていただくことがあります。</p>		送付先: 〒187-8502 東京都小平市小川東町4-1-1 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第二部 伊藤雅之

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	白川 哲夫	日本大学歯学部	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。本疾患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。

患者データベースは、臨床医、臨床遺伝医、患者代表者などによるデータベース小委員会を組織し、患者登録制による患者データベースシステムを作り、運用している。今後、疫学解析と臨床研究に向けた体制の整備と登録患者の収集を進める。

A. 研究目的

昨年度、患者データベースの体制作りを行い、これに基づいて、患者データベースを構築し、運用している。この目的は、これまで本邦にはなかった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基盤として活用するためである。あわせて、遺伝子診断を含む診断・診療支援を行う。

B. 研究方法

患者データベース登録票（（総括）表1）を作成し、それに準拠した手引きを作成した（（総括）資料1）。NPO法人レット症候群支援機構ホームページ（www.npo-rett.jp/）で、遺伝子診断の案内とともに紹介している。患者およびその家族が登録票と手引きを入手し、医師（主治医）と登録票を作成し、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っている。国立精神・神経医療研究センターで登録、管理を行っている。

（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をえた。

C. 研究結果

本年度の患者データベースへの登録は15名である。遺伝子診断は10名であり、1例にFOXG1遺伝子変異を認めた以外、すべてMECP2遺伝子変異であった。

D. 考察

本年度より始まった疾患患者データベース登録は認

知度が低く、今後シンポジウムなどの機会や社会啓蒙活動を通して広める努力が必要である。このデータベースは臨床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り、疫学解析や臨床研究のためには多くの登録数が必要である。

また、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、運用が始まった。あわせて、遺伝子診断などの診療支援を行った。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参加者を増やしていく必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 伊藤雅之. レット症候群：自閉性障害をもつ特異な発達障害. SRL 宝函 2013;34 (2):28-39.

2. 学会発表

なし。

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。

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、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出す。

IGFBP3欠損マウスとMECP2欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成し、行動学的、形態学的解析とIGF-1発現解析を行なった。その結果、いずれもIGFBP3欠損によって回復することが分かった。レット症候群の発症病態の一部がIGFBP3による可能性が示唆された。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

昨年度に継続して、レット症候群の原因遺伝子メチル化CpG結合タンパク2 (MECP2) のメチル化DNA結合領域 (MBD) 遺伝子変異の分子生物学的解明とMECP2発現制御マウス、IGFBP3欠損マウスによる機能解析を行い、レット症候群の治療の分子標的を明らかにする。

MECP2は標的遺伝子の転写を抑制する分子であり、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。また、MECP2発現制御マウスを用いて治療の臨界期を求める。IGFBP3欠損マウスによるIGFBP3の症状形成の病態を調べる。

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、遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチン像を観察し、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。また、ヘテロクロマチン像の違いと遺伝子発現の関連を明らかにするために、DNAチップを用いて網羅的発現解析を行なった。

MECP2発現制御マウスを樹立したが、個体数の確保が難しく、本年度の解析を進めることが困難であった。一方、IGFBP3欠損マウスを作成し、MECP2欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成した。行動学的、形態学的解析とIGF-1発現を調べた。

(倫理面への配慮) 本研究では、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のち、行なった。また、マウスの作成と取扱いは、関連指針等に準拠し、小型実験動物倫理問題等検討委員会の承認ののち行なった。

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、変異タンパクによるヘテロクロマチン像を観察した結果、変異によるヘテロクロマチン像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、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。

IGFBP3欠損マウスは個体数を確保でき、MECP2欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成した。行動学的、形態学的解析とIGF-1発現はいずれもIGFBP3欠損によって回復することが分かった。

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、症状の重症度に影響することを見出した。このことは、MBDの遺伝子変異がMECP2の多数の標的遺伝子の発現に影響を及ぼし、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出す。

また、レット症候群の発症病態の一部がIGFBP3による可能性が示唆された。

E. 結論

MBDの点変異によるヘテロクロマチンの異常が症状に影響していることを明らかにした。さらに、解析を進め、治療法開発へ発展させる。また、IGFBP3の発現異常がレット症候群の発症病態の一部を説明できる可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Waga C, Asano H, Tsuchiya A, Itoh M, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S. Identification of novel SHANK3 transcript in the developing mouse neocortex. *J Neurochem* 2014;128(2):280-293.
 2. Miyazaki C, Saitoh M, Itoh M, Yamashita S, Miyagishi M, Takashima S, Moser AB, Iwamori M, Mizuguchi M. Altered phospholipid molecular species and glycolipid composition in brain, liver and fibroblasts of Zellweger syndrome. *Neurosci Lett* 2013;552:71-5.
 3. Munakata M, Watanabe M, Otsuki T, Itoh M, Uematsu M, Saito Y, Honda R, Kure S. Increased Ki-67 immunoreactivity in the white matter in hemimegalencephaly. *Neurosci Lett* 2013;548:244-8.
 4. Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Ohori K, Soutome M, Endoh K, Hirasawa T, Kazuki Y, Adachi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, Andoh T, Kurosawa H, Oshimura M, Sasaki M, Toyoda A, Kubota T. Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome. *PLoS ONE* 2013 Jun 21;8(6):e66729.
2. 学会発表
なし。
- 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。

再生医療技術を利用したレット症候群(RTT)の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 山下裕史朗 久留米大学医学部 小児科学講座 教授
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 高次脳疾患研究所 助教

研究要旨

これまで *Mecp2* 遺伝子 (MeCP2) を欠損した RTT モデル ES 細胞や RTT モデルマウスを用いて神経系の発生・分化過程における MeCP2 の役割の解析を進めてきた。その結果、MeCP2 は ES 細胞からの神経分化に必須ではない一方で、神経細胞の成熟やグリア細胞の分化に関わることを見出した。また、RTT モデルマウスを用いた研究から、MeCP2 はグリア細胞の遺伝子発現を調節し、生理学的機能の制御に関わることを報告した。

本年度は、上記の研究と平行して進めてきた RTT モデル ES 細胞の分化研究において関連の示唆された心臓における MeCP2 の機能的役割を調べるために、RTT モデルマウスの心臓病態に着目して生理学的、分子生物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と比較して、MeCP2 を欠損した RTT モデルマウスでは、心機能に有為な変化が認められない一方、心電図の異常が認められた。また、RTT モデルマウスと対照コントロールマウスの心臓における遺伝子の発現を解析したところ、有為に発現の異なる遺伝子を見出した。近年、MeCP2 欠損マウスにおいて QT 延長をはじめとする不整脈が報告されており、本成果は RTT の QT 延長や不整脈など、心臓における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

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 の神経系及び心臓発生・分化過程ならびに、心機能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

RTT モデル ES 細胞における心筋分化の評価
MeCP2 欠損した RTT モデル (RTT-) ES 細胞及び、コントロールの wild-type (WT-) ES 細胞から心筋分化誘導を行い、その分化能を比較検討する。マウス ES 細胞による心筋分化誘導は胚様体 (embryoid body) 形成法で行い、12 日間の分化誘導後、分化過程における心筋分化マーカー遺伝子や蛋白質の発現を比較検討することで、心筋分化能を評価する。

RTT モデルマウス心臓の生理学的解析

心臓の生理的機能評価を行うために、MeCP2 欠損マウスならびに対照コントロールマウスの心エコーによる心機能および、心電図の計測を行った。心電図の測定は、6 および 8 週目の *Mecp2* 欠損 (*Mecp2*^{-/-}: RTT モデル) マウス、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*^{fl^{ox}/y}: WT-) マウス、C57BL/6 マウス、それぞれ

一群あたり 10-14 匹で行った。心機能は、8 週目の RTT-マウス、対照コントロールとして WT-マウス、C57BL/6 マウス、それぞれ一群あたり 10、9、11 匹を心エコーによって評価した。

RTT モデルマウス心臓における遺伝子発現

6 および 8 週目の *Mecp2* 欠損 RTT モデルマウス (*Mecp2*^{-/-})、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*^{fl^{ox}/y}) マウスの心臓を摘出し、心房心室を含む心臓から全 RNA 抽出後、逆転写により cDNA を合成し、心臓特異的な 30 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。また、*Mecp2* 遺伝子の有無により発現の異なる遺伝子に関しては、8 週目のマウスの心室部分における発現の比較解析を行った。

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
- ・ 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

・ES/iPS細胞における目的細胞分化誘導法の確立と再生医療技術の開発

C. 研究結果

RTT モデル ES 細胞における心筋分化誘導

MeCP2 欠損した RTT-ES 細胞及び、コントロールの WT-ES 細胞から血清存在下で胚様体 (embryoid bodies: EBs) 形成を介した心筋分化誘導を行ったところ、両群において EBs が形成され、7 日目を経過した頃より自動収縮する EBs が観察された。また、EBs を介した心筋分化誘導後、2 日毎に心筋分化特異的な遺伝子の発現を調べたところ、コントロールの WT-ES 細胞群と同様に、RTT-ES 細胞群でも、4-6 日目以降 Nkx2.5 遺伝子などの心筋分化に必須の転写因子の発現が、6-8 日目以降 alphaMHC 遺伝子の発現が認められ、MeCP2 欠損した ES 細胞は心筋に分化することが出来ることが示された。また、alphaMHC に関しては、8 日目以降、RTT-EBs 群でその発現が高い傾向が認められた。更に、分化誘導後 6、8、10 日目の EBs をマーカー分子に対する抗体で免疫染色した結果、MeCP2 欠損の RTT-EBs 群で、sMHC、Nkx2.5 陽性 EBs の割合が高い傾向が認められた。以上の結果から、MeCP2 欠損した RTT-ES 細胞は、正常な WT-ES 細胞と同様に、自動収縮する心筋細胞に分化する一方で、RTT-ES 細胞は、WT-ES 細胞に比較して、心筋分化にともなう心筋分化マーカーの発現が高くなる傾向があることが示された。

RTT モデルマウス心臓における生理学的解析

6 および 8 週目の RTT モデルマウスと対照コントロールとして、WT-マウス、更には C57BL/6 マウスの心電図を計測した。その結果、6 および 8 週目 RTT モデルマウスの心電図は、QT、cQT 何れも有為になる QT 延長が認められた。その他の指標についても、RTT モデルマウスと対照コントロールのマウスでは有為な違いが認められ、RTT モデルマウスは不整脈を呈することが明らかとなった。その一方で、エコーによる心機能解析は、RTT モデルマウス左心室壁の厚さは有為には薄いものの、それ以外に心機能上の異常は認められなかった。RTT モデルマウスの心臓は、その体重に相関して対照マウスに比較して小さいことから、左室壁の厚さの違いは心臓の大きさの違いに関連するものと考えられる。

RTT モデルマウス心臓における遺伝子発現

6 および 8 週目の RTT モデルマウスと対照コントロールとして WT-マウスの心臓において、心臓の生理機能や構造の維持に関わる転写因子、構造分子、チャネル分子など少なくとも 30 種類以上の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法によって解析した。その結果、30 種類の遺伝子のうち 4 遺伝子が RTT モデルマウスの心臓で高くなる傾向が認められ、6 遺伝子の発現が低くなる傾向が認められた。以上の結果から、MeCP2

欠損により心臓における遺伝子発現が変化し、MeCP2 は成体マウスの心臓で遺伝子発現制御に関わる可能性が示された。

D. 考察

近年、エピジェネティックな遺伝子発現制御の心臓の発生・分化における重要性を示す報告がなされているが、本研究によって、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる MeCP2 が欠損していても ES 細胞は心筋細胞に分化する一方で、MeCP2 が心筋分化過程の遺伝子発現を制御することで、心筋分化を調節 (分化効率に影響) する可能性が示唆された。このことから、MeCP2 に着目した心筋細胞の分化研究は、RTT の心臓における病態解明のみならず、心臓の発生・分化におけるエピジェネティックな遺伝子制御の重要性を解明する良い実験系になると考えられる。

また、以前から RTT 患者では、ある一定の割合で QT 延長など不整脈の症状を呈することが報告されており、近年、MeCP2 欠損したマウスでも、神経系の異常を主な原因とした QT 延長や不整脈が認められることが報告されている。今回、ES 細胞の心筋分化研究を足がかりに、RTT モデルマウスの心機能を評価したところ、我々の実験系でも RTT モデルマウスは QT 延長や不整脈を呈することが示された。また更に、いくつかの心機能や構造の維持に関わる重要な遺伝子の発現が、RTT モデルマウス心臓とコントロールの正常マウスで異なることも明らかとなった。このことは、MeCP2 が、心臓の機能調節を司る神経系のみならず、心臓そのもので遺伝子の発現制御に関わるなど重要な役割を担う可能性を示している。

以上のことから、今後、MeCP2 による心臓における遺伝子発現制御メカニズムや RTT-ES 細胞の詳細な心筋分化メカニズム、更には ES 細胞を利用した心筋分化特異的遺伝子のエピジェネティックな調節メカニズムを調べることで、RTT における不整脈の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。

E. 結論

- (1) MeCP2 欠損 ES 細胞は胚葉体形成を介した心筋分化系で心筋細胞に分化し、MeCP2 欠損 EBs では、心筋分化マーカーの発現がコントロール EBs に比較して高くなる傾向が認められた。
- (2) MeCP2 欠損した RTT モデルマウスでは、心エコーによる心機能評価では大きな問題は無い一方で、QT 延長などの不整脈が認められた。
- (3) RTT モデルマウスの心臓では、コントロールのマウスに比較して、心臓の構造や機能を保つ遺伝子幾つかの遺伝子の発現が有為に変化する遺伝子が認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suda K, Kishimoto S, Takahashi T, Nishino H,

- Okamura H, Teramachi Y, Yokoyama T, Yasukawa H, Ohbu K, Imaizumi T, Matsuishi T. Circulating Myeloid Dendritic Cells is Decreased in the Acute Phase of Kawasaki Disease. *J Clin Exp Cardiol* (in press)
2. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu SI, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. *Brain Dev.* 2013 Dec 27. pii: S0387-7604(13)00310-0. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.
3. 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 cholestsis patients with mutations in the *SRD5B1* (*AKR1D1*) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis* 2013;36(3):565-573.
2. 学会発表
1. 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎. アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞へ高効率遺伝子導入技術の開発. 第13回日本再生医療学会総会(京都). 平成26年3月4-6日 国立京都国際会館.
- 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。

レット症候群モデルマウスの延髄 GAD1 遺伝子発現変化と無呼吸の関連性

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 欠損雄ノックアウトマウス (*Mecp2*^{-/-}) について、生後 2, 3, 5, 7 週で全身型プレチスモグラフを用いて 1 時間の呼吸測定を行い、得られたデータを野生型雄マウス (wild) と比較した。またそれらのマウスについて生後 8 日から 7 日間、バルプロ酸の腹腔内投与を行い、無呼吸への影響を生後 15 日で検討した。その結果、*Mecp2*^{-/-} ではいずれの週齢でも野生型母から生まれた wild と比べ無呼吸頻度が高かった ($p < 0.01$) が、同腹の wild とは有意差がみられなかった。バルプロ酸の投与により、*Mecp2*^{-/-} では vehicle 投与群に比べ無呼吸頻度が有意に減少した ($p < 0.05$)。生後 2 週における延髄腹側呼吸群での *GAD1* mRNA 発現量は、*Mecp2*^{-/-} で有意に低下していた ($p < 0.05$) が、バルプロ酸の腹腔内投与により増加した ($p < 0.05$)。延髄腹側呼吸群での *GAD1* 近位プロモーター領域の 23 個所の CpG について、メチル化レベルを bisulfite sequencing 法で検討したところ、*Mecp2*^{-/-} ならびに同腹の wild では、野生型母より生まれた wild に比べ高メチル化状態にあることが明らかになった。以上より、*Mecp2*^{-/-} に特徴的な無呼吸の増加に、延髄腹側呼吸群での *GAD1* プロモーターの CpG メチル化ならびに母マウスの遺伝子型が影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Mecp2^{-/-} では生後 5 週以降に無呼吸の頻度が著しく増加するとの報告があるが、延髄の呼吸中枢の生後変化と無呼吸との関係は明確ではない。また、呼吸調節に主要な働きをしている GABA の合成酵素の一つである glutamic acid decarboxylase 1 (GAD1) が無呼吸にどのように関わっているかも不明である。そこで今回、MeCP2 の欠損が延髄の呼吸中枢における *GAD1* の mRNA 発現ならびにプロモーターの CpG メチル化にどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

①生後 2, 3, 5, 7 週の *Mecp2*^{-/-} ならびに wild を一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (PLY4211 ; Buxco Electronics) のチャンバー内に入れ、10:00-11:00 の 1 時間、呼吸波形を測定・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。生後 3 週までは生母に養育させ、明暗条件は 07:00-19:00 を明期とした。wild については、生母が *Mecp2*^{-/-} と同一のものと、野生型母 (C57BL/6J) から生まれたもので区別して数値処理を行った。

②*Mecp2*^{-/-} ならびに wild について、生後 8 日から 7 日間、18:00 にバルプロ酸の腹腔内投与を行い、無呼吸への影響を生後 15 日で検討した。バルプロ酸の一回投与量は 2 mmol/kg/day とした。

③*Mecp2*^{-/-} ならびに wild について生後 2 週で脳組織をとりだし、ただちに冷却したのちクリオスタット上で延髄腹側呼吸群の組織を 18 ゲージの注射針を用いてパンチアウトした。そののち組織から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法 (Light Cycler Nano, Roche

Applied Science) により *GAD1* mRNA 量を測定した。また、バルプロ酸の腹腔内投与を行ったマウスについても同様に *GAD1* mRNA の測定を行い、vehicle 投与群と比較した。

④上記の方法で延髄腹側呼吸群の組織をパンチアウトし DNA を抽出した。bisulfite 処理を行ったのち *GAD1* の近位プロモーター領域について nested PCR を行い、得られた産物をプラスミドにサブクローニングし、塩基配列を決定した。それぞれの群につき 60 クローンを得て、クローニングした領域に含まれる 23 の CpG についてメチル化 cytosine を検出した。

(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 2013-歯-001, AP10D008)

C. 研究結果

①2, 3, 5, 7 週のいずれの週齢でも、*Mecp2*^{-/-} は野生型母より生まれた wild と比べ無呼吸頻度が高かった ($p < 0.01$)。一方、*Mecp2*^{-/-} と同じ母 (*Mecp2* ヘテロ接合マウス) から生まれた wild と比較した場合、無呼吸の頻度に有意差はみられなかった。

②生後 15 日の *Mecp2*^{-/-} について、バルプロ酸の腹腔内投与により、vehicle 投与群に比べ無呼吸頻度が有意に減少した ($p < 0.05$)。wild については、無呼吸頻度に対するバルプロ酸の影響はみられなかった。

③生後 2 週における延髄腹側呼吸群での *GAD1* mRNA 発現量は、野生型母から生まれた wild に比べ *Mecp2*^{-/-} で有意に低下していた ($p < 0.05$)。バルプロ酸の腹腔内投与により、*Mecp2*^{-/-} の *GAD1* mRNA 発現量は有意に増加し ($p < 0.05$)、バルプロ酸を投与した wild との

比較では有意差は認められなかった。

④延髄腹側呼吸群における *GAD1* 近位プロモーター領域の CpG メチル化レベルを 23 個所について調べたところ、*Mecp2*^{-/-}ならびに同腹の wild では、野生型母から生まれた wild に比べ高メチル化状態にあることが明らかになった。

D. 考察

Mecp2^{-/-}では生後 5 週以降に無呼吸頻度の上昇が報告されている。本研究において野生型母から生まれた wild と *Mecp2*^{-/-}を比較したところ、*Mecp2*^{-/-}ではいずれの週齢においても有意に無呼吸頻度が高かった。一方、*Mecp2*^{-/-}と同腹の wild については *Mecp2*^{-/-}がどの週齢でも高い値を示したものの、両者の無呼吸頻度に有意差は認められなかった。

母の遺伝子型の違いによる仔の無呼吸頻度の違い、ならびに *Mecp2*^{-/-}での著明な無呼吸頻度の上昇がどのようなメカニズムを介して引き起こされているかを解明するため、延髄腹側呼吸群での GABA の働きに着目し、GABA の合成酵素の一つである *GAD1* の mRNA 発現、ならびに *GAD1* の近位プロモーターに存在する CpG のメチル化状態を調べ、*Mecp2*^{-/-}と wild で比較した。その結果、*Mecp2*^{-/-}では野生型母から生まれた wild に比べ *GAD1* の mRNA 発現量の低下が認められ、*GAD1* プロモーターの CpG のメチル化レベルが上昇していた。

以上の知見から、*Mecp2*^{-/-}で認められた無呼吸頻度の上昇に、延髄腹側呼吸群での *GAD1* プロモーターの CpG 高メチル化とそれによる *GAD1* 活性の低下、ならびに GABA 合成の減少が関与していることが推測された。バルプロ酸投与によって *Mecp2*^{-/-}の無呼吸が減少し、延髄腹側呼吸群での *GAD1* mRNA 発現量の増加が認められたことは、無呼吸と GABA 合成との関連性を強く示唆する。

母親が野生型か *Mecp2* ヘテロ接合型かによって同じ wild で無呼吸頻度に違いが生じた理由として、呼吸リズムの安定性に関与している仔マウスの延髄腹

側呼吸ニューロン群の発達に、少なくとも生後 2 週以前に *Mecp2* ヘテロ接合型の母から何らかの負の影響が及んだことが考えられた。それが胎生期において仔マウスの中枢に働いたものか、それとも出生後の 2 週間の哺乳期に働いたものかについては今後検討が必要であるが、母マウスの遺伝子型の違いによって *GAD1* プロモーターの CpG のメチル化に違いがみられたことから、*GAD1* mRNA 発現へのエピジェネティックな影響も考えられる。

E. 結論

Mecp2^{-/-}に特徴的な無呼吸の増加に、延髄腹側呼吸群での *GAD1* プロモーターの CpG 高メチル化ならびにそれによる *GAD1* mRNA 発現量の低下、ならびに母マウスの遺伝子型の違いに基づく仔マウスの中枢発達への影響が関与している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし。

2. 学会発表

1. Nishiyama M, Asano M, Iwasa S, Suzuki A, Wada T, Takiguchi H, Shirakawa T. Diurnal increase of apnea and reduced *GAD1* mRNA expression in respiratory nuclei of *Mecp2*-deficient mice. Neuroscience 2013, Nov. 12, San Diego.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。