

I . 總括研究報告

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

本研究では、レット症候群(RTT)の臨床および基礎研究を行い、早期診断と治療法の確立を進める。レット症候群は小児期に発症する特異な稀少性発達障害であり、診断が難しい疾患である。

臨床研究では、2010年に改定された米国の診断基準を基に我国の実情にあった診断基準を作成し、これまでの臨床経験および文献的レビューから診療ガイドブックを作成した。これらの取り組みと従来からの遺伝子診断サービスにより、一般臨床医の早期診断を推進する。MECP2遺伝子異常は90%以上の典型的RTT患者で同定され、早期発症でてんかん型RTT患者ではCDKL5異常、先天型RTT患者ではFOXG1異常が同定されている。MECP2とFOXG1の重複例はすでに報告されているが、新たにCDKL5重複例を報告した。精神遅滞を合併した自閉症スペクトラム障害の男性患者で、無症候の母にもCDKL5重複を有していた。

基礎研究では、生後2週齢のMeCP2欠損マウス(Mecp2^{-/-})の延髄腹側呼吸核群のGad1プロモーター領域のCpGメチル化レベルに違いがみられた。Mecp2^{-/-}では野生型母より生まれた野生型に比べ高メチル化状態にあった。また、Mecp2^{-/-}の呼吸異常に延髄腹側呼吸核群のGad1プロモーターのCpGメチル化とヒストンアセチル化が影響していることが示唆された。IGFBP3欠損マウス、IGFBP3過剰発現マウスとMECP2欠損マウスとの二重改変マウスを作成し、IGFBP3過剰によりMECP2欠損効果が増強され、IGFBP3欠損によって回復することが分かった。Cdk15欠損マウスの解析の結果、CDKL5変異が興奮性シナプス機能異常をもたらすことが分かった。このことは、グルタミン酸受容体作動薬による治療の根拠となる。Mecp2^{-/-}やそのES細胞を用いて神経発生・分化過程におけるMeCP2解析の結果、MeCP2が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、Mecp2^{-/-}の心臓の生理学的、分子生物学的な解析の結果、Mecp2^{-/-}にQT延長などの心電図の異常を認めた。RTTのQT延長や不整脈などの病態メカニズム解明につながるものと期待される。さらに、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析し、15q11-q13領域のクロマチン動態が神経特異的な遺伝子発現に重要であることが分かった。

これらの研究成果はRTTの早期診断につなげ、今後の治療法開発へ発展させる基盤が出来たものと評価できる。

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	旭川医科大学医学部	講師
青天目 信	大阪大学医学部	助教
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

研究協力者

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
谷岡 哲次	NPOレット症候群支援機構	理事長

A. 研究目的

レット症候群は幼少児期からの多彩で年齢依存性に変化する症状のため、診断に苦慮する代表的疾患である。有効な治療法がなく、早期からの療育が求められる。そこで、最近の診断基準を本邦に適合する

ように改定し、診療ガイドブックを作成して、疾患認知度の向上と早期診断の推進をはかる。あわせて、遺伝子診断を含む診断・診療支援を行う。レット症候群の原因遺伝子としてMECP2が同定されて以来、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。ここでは3つの原因遺伝子の機能喪失および重複による臨床像の特徴を明らかにする。

基礎研究では、MeCP2欠損マウス(Mecp2^{-/-})の無呼吸と延髄腹側呼吸核群のglutamic acid decarboxylase 1(GAD1) mRNA発現との関係を分子病理学的に解析する。また、Mecp2^{-/-}およびIGFBP3欠損マウスとIGFBP3過剰発現マウスの二重改変マウスによる機能解析を行い、RTTの分子標的を明らかにする。Cyclin-dependent kinase-like 5(CDKL5)欠損マウスを作成し、てんかん、記憶障害、情動異常等の発達障害の分子機構の解明と、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RTTの突然死の病態の解明を行う。さらに、Angelman症

候群(AS)や Prader-Willi 症候群 (PWS) の責任遺伝子座である 15q11-q13 領域の MeCP2 を介したエピゲノム機構を解明する。

B. 研究方法

2010年に発表された米国の診断基準の基づき、診断基準作成責任者と意見交換しながら、本邦に適合した表現への変換と改正、注釈を加えて、新しい診断基準を公表した。また、診療ガイドブックを作成するために、各分野の専門医、研究者へ執筆依頼を行い、編集作業等に取りかかった。

遺伝子解析は、末梢白血球より抽出したDNAを用いて、塩基配列決定法にて行った。変異が同定されなかった場合には、array-based comparative genomic hybridization (aCGH) 法、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法、定量的PCR法にて解析した。

動物実験では、生後2週齢の *Mecp2*^{-/-} と野生型の脳組織を冷却し延髄腹側呼吸核群の組織から DNA を抽出した。bisulfite 処理を行ったのち *Gad1* プロモーター領域の塩基配列を決定し、23ヶ所の CpG についてメチル化 cytosine を検出した。バルプロ酸あるいは生理食塩水の腹腔内投与を行い、脳組織を固定後アセチル化 H3K9、H3K14、H4K5、H4K8 の抗体と抗 NeuN 抗体の二重染色を行った。 *IGFBP3* 欠損マウスと *IGFBP3* 過剰発現マウスを作成し、すでにある *Mecp2*^{-/-} との二重改変マウスを作成した。これらマウスの行動学的、形態学的解析と IGF-1 発現を調べた。行動学的解析は、オープンフィールド、十字迷路を行った。形態学的観察は、ゴルジ法による神経細胞の樹状突起の形態、成熟、免疫組織化学によるシナプス成熟を観察した。また、IGF-1 発現は、ウエスタンブロットおよび ELISA による定量を行った。 *Cdk15* 欠損マウスについて、神経細胞樹状突起及びスパイン、薬物投与による易けいれん性解析、海馬スライス電気生理学的解析、海馬・大脳皮質の興奮性シナプスの機能、微細構造、蛋白質解析、グルタミン酸受容体阻害薬による興奮性アミノ酸誘発性けいれんのレスキューを行った。 *Mecp2*^{-/-} の ES 細胞の心筋分化マーカー遺伝子や蛋白質の発現、および電子顕微鏡による心臓の刺激伝道系を比較検討することで、心筋分化能、形態異常を評価した。また、 *Mecp2*^{-/-} の心エコーによる心機能と心電図の計測を行った。 *Mecp2*^{-/-} の心臓の遺伝子発現は、30個の心臓特異的遺伝子の定量 PCR により解析した。

細胞実験では、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 番染色体を構築し、qRT-PCR、DNA メチル化解析、DNA-FISH 法、ChIP 法により、15q11-q13 領域のクロマチン動態と遺伝子発現を調べた。

(倫理面への配慮等)

すべての研究は、各研究施設の当該倫理委員会の承認を得て、臨床研究においては患者あるいは保護者

への十分な説明と同意を得てのちに行った。また、組み換え DNA 実験安全委員会、実験動物倫理問題等検討委員会等の承認を得たのちに行った。各研究は、当該研究施設の利益相反 (COI) に関する審査、承認を得たのちに行った。

C. 研究結果

改正診断基準 (図1) を公表した。今後、これによる診断と遺伝子診断の相関を調べる。また、診療ガイドブックを刊行した。このガイドブックを利用することによる疾患認知と早期診断の関係を患者データベース登録システムを利用して追跡する。

精神遅滞を有する男性患者に、Xp22.13 に約 200kb の重複を認め、この領域内に *CDKL5* が含まれていた。動物実験では、延髄腹側呼吸核群における *Gad1* プロモーター領域の CpG メチル化レベルは、 *Mecp2*^{-/-} と同腹の野生型では野生型母から生まれた野生型に比べ高メチル化状態にあった。生後2週齢の *Mecp2*^{-/-} にバルプロ酸の7日間投与で、H3K9 と H4K5 のアセチル化レベルの上昇が認められた ($p < 0.01$)。一方、H3K14 と H4K8 ではアセチル化レベルに変化が認められず、野生型ではいずれのアセチル化も変化がなかった。 *IGFBP3* 欠損マウス、 *IGFBP3* 過剰発現マウス、 *Mecp2*^{-/-} との二重改変マウスの行動学的、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。 *Cdk15* 欠損マウスの表現型解析では、海馬 CA1 錐体神経細胞の樹状突起スパインの形態、サブクラスと密度に異常があり、易けいれん誘発性がみられた。 *Mecp2*^{-/-} の ES 細胞の心筋分化誘導では、自動収縮が観察され、心筋分化特異的な遺伝子発現は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 α MHC 遺伝子の発現が認められた。 *Mecp2*^{-/-} の心臓の生理学的解析では、QT 延長がみられ、左心室壁が有意に薄かった。 *Mecp2*^{-/-} の心臓の遺伝子発現では、対象の30遺伝子のうち4遺伝子が高くなる傾向があり、6遺伝子が低くなる傾向があった。

細胞実験では、父方特異的な *MAGEL2* 遺伝子の発現低下が認められた。さらに、DNA-FISH法により15q11-q13領域のクロマチン動態を解析した結果、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にクロマチン脱凝集が起こっていた。発現 *MAGEL2* 遺伝子座は15番染色体テリトリーの外側にループアウトし、未発現 *MAGEL2* 遺伝子座は15番染色体テリトリーの内側にあることが分かった。

D. 考察

診断基準の見直しと診療ガイドブックの作成を行った。レット症候群の患者は多彩で変化しやすい症状のため、診断が遅れることが少なくない。今回公表した診断基準と診療ガイドブックの評価はこれから

であるが、遺伝子診断と合わせてレット症候群の早期診断に寄与するものと考えられる。

*CDKL5*の欠失は乳児期発症の難治性てんかんの原因であるが、*CDKL5*の重複はてんかんはなく自閉症スペクトラム障害に知的障害を合併する表現型であった。中枢神経系の正常な機能発現には*CDKL5*の発現量が厳密に調節される必要があることが分かった。

動物実験から、*Mecp2*^{-/-}でみられる頻回な無呼吸が延髄腹側呼吸核群の*Gad1*プロモーターの高メチル化とそれによる*Gad1* mRNAの転写抑制、*GAD1*発現低下によるGABA合成の減少が推測された。また、バルプロ酸による回復はエピゲノム機構を利用した治療法の開発の基盤となるものと考えられた。RTTの症状の一部がIGFBP3によってもたらされ、回復することから、IGFBP3の量的異常が発症病態に影響していることが分かった。このことから、IGFBP3が治療のターゲットになりうると考えられる。さらに、IGFBP3が脳内IGF-1の量的規制に関与していることが明らかになり、現在行われているIGF-1治療の実験的根拠になりうる。*Cdk15*欠損マウスでは、グルタミン酸シグナリング障害が明らかとなった。NMDA型グルタミン酸受容体阻害薬による興奮性アミノ酸誘発性けいれんの回復は分子治療法の開発の基盤となると考えられる。心筋分化にMeCP2が寄与している可能性が示唆され、RTTの不整脈の発症や病態メカニズム解明につながるものと考えられた。

細胞実験では、15q11-q13領域の父方アレー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*の転写が必要ないものと考えられた。一方、PWS-IC欠失母方染色体では、MeCP2などのメチル化CpGを認識する分子が正常母方アレー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と考えられた。

E. 結論

本邦の実情に合わせたわかりやすいレット症候群の診断基準に改正した。また、診療ガイドブックを作成した。これらを活用することで、レット症候群の早期診断が可能となることが期待される。また、*CDKL5*重複は男性の精神遅滞と自閉症スペクトラム障害の原因となることが分かった。

動物実験では、*Mecp2*^{-/-}に特徴的な無呼吸の増加に延髄腹側呼吸核群の*Gad1*プロモーターのCpG高メチル化と*Gad1* mRNA発現量の低下が関与していた。

IGFBP3の発現異常がRTTの発症病態の一部に寄与していた。*Cdk15*欠損マウスでは、海馬の神経細胞樹状突起スパインの形態・密度とシナプスグルタミン酸受容体蛋白質の異常、シナプス機能異常があり、グルタミン酸受容体阻害薬によって興奮性アミノ酸誘発性けいれんをレスキューした。*Mecp2*^{-/-}のES細胞は心筋細胞に分化し、心筋分化マーカーの発現が高くなる傾向が認められた。また、*Mecp2*^{-/-}にQT延長などの不整脈がみられ、複数の遺伝子発現の変

化が認められた。

細胞実験では、MeCP2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た。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sukigara S, Dai H, Nabatame S, Otsuki T, Hanai S, Honda R, Saito T, Nakagawa E, Kaido T, Sato N, Kaneko Y, Takahashi A, Sugai K, Saito Y, Sasaki M, Goto Y, Koizumi S, Itoh M. Expression of Astrocyte-related Receptors in Cortical Dysplasia with Intractable Epilepsy. *J Neuropathol Exp Neurol* 2014;73:798-806.
2. Itoh M, Iwasaki Y, Ohno K, Inoue T, Hayashi M, Ito S, Matsuzaka T, Ide S, Arima M. Nationwide survey of Arima syndrome: new diagnostic criteria from epidemiological analysis. *Brain Dev* 2014;36:388-393.
3. 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;128:280-293.
4. Jansen F, Simone Mandelstam S, Ho AW, Mohamed I, Sarnat H, Kato M, Fukasawa T, Saito H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins R, Chow C, Harvey S, Jackson G, Peter C, Berkovic S, Scheffer I, Leventer R. Is Focal Cortical Dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia* 2014;55(3):e22-e26. doi: 10.1111/epi.12533.
5. 奥田耕助, 田中輝幸. 難治性てんかんを伴う神経発達障害の原因遺伝子 *CDKL5* のシナプス伝達調節機構の解明に向けて. 日本薬理学雑誌. 2015 (in press).
6. 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. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.
7. Meguro-Horike, M., Horike, S. (2015) MMCT-Mediated Chromosome engineering technique applicable to functional analysis of lncRNA and nuclear dynamics. *Methods Mol Biol*, 1262; 277-289.
8. 目黒牧子, 堀家慎一「発達障害の遺伝学から明らかとなる多彩なエピジェネティクスの役割」エピジェネティクスの産業応用, シーエムシー出版, 2014年4月

9. Aono Y, Taguchi H, Saigusa T, Uchida T, Takada K, Takiguchi H, Shirakawa T, Shimizu N, Koshikawa N, Cools AR. Simultaneous activation of the 1A-, 1B- and 1D-adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behav Pharmacol* 2015;26:73-80.
10. Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T, Watanabe M. Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. *J Neurosci* 2014;34(35):11534-11548.
2. 学会発表
1. 辻村 啓太, 入江 浩一郎, 中嶋 秀行, 江頭 良明, 深尾 陽一郎, 藤原 正幸, 伊藤 雅之, 高森 茂雄, 2島 欽一. レット症候群原因因子MeCP2による興奮性シナプス伝達制御の分子基盤. シンポジウム S3-F-1 (神経発達障害と正常脳形成: 神経分化と移動による脳機能の運命決定). 第37回日本神経科学大会. 2014年9月13日. 横浜
2. Itoh M, Kurimasa A. MeCP2_e2 is required for placenta development. The FEBS-EMBO 2014 Conference. Paris, France, 30 August-4 September, 2014.
3. 田中輝幸. 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).
4. 奥田耕助, 田中輝幸「難治性てんかんと併発する重度発達障害の原因遺伝子 CDKL5 のシナプス伝達調節機能と情動・記憶における役割」(シンポジウム: X-連鎖知的障害の分子病態解明への挑戦) 第87回日本薬理学会年会 (仙台) (2014.3.21).
5. 田中輝幸, 渡邊紀, 萩原舞, 村上拓冬, 小林静香, 真鍋俊也, 高雄啓三, 宮川剛, 深谷昌弘, 阪上洋行, 水口雅, 奥田耕助. 神経発達障害原因遺伝子CDKL5の機能解析. 第37回日本神経科学大会 Neuro 2014 (2014. 9.13).
6. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Okabe Y, Tanaka E, Matsuishi T. Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in MeCP2-null mouse. 13th Rett syndrome Symposium, 2014. 6 (Washington, USA)
7. 中田昌利、熊倉 啓、高折 徹、中井理恵、岡嶋一樹、高橋 悟、秦 大資. FOXG1ハプロ不全を認めたcongenital Rett症候群の一男児例. 第56回日本小児神経学会総会、平成26年5月29日 (浜松市)
8. 高野亨子、西村貴文、涌井敬子、高橋 悟、稲葉雄二、古庄知己、福嶋義光. CDKL5 遺伝子の重複を認め、発達遅滞、低身長、小頭症を呈した男児. 日本人類遺伝学会第56回大会、平成26年11月19日 (東京都)
9. 堀家慎一, Yasui DH, Powell W, LaSalle JM, 目黒一堀家牧子. PWS-IC is essential for the higher order chromatin organization of 15q11-q13 and the location of a paternally expressed gene within a chromosome 15 territory. 高等研カンファレンス Chromatin Decoding, 国際高等研究所, 京都, 2014年5月12~15日
10. 目黒牧子, 堀家慎一. クロマチンダイナミクスを制御する PWS/AS インプリンティングセンターの新たな役割. 第8回日本エピジェネティクス研究会, 伊藤国際学術センター, 東京, 2014年5月25~27日
11. 堀家慎一, Yasui DH, LaSalle JM, Resnick JL, 目黒牧子. 高次クロマチンダイナミクスを介した PWS-IC による遺伝子発現制御機構の解析. 第8回日本エピジェネティクス研究会, 伊藤国際学術センター, 東京, 2014年5月25~27日
12. 堀家慎一. 核内ダイナミクスと遺伝子発現. 名市大エピジェネティクス研究会, ホテル木曽路, 南木曽, 2014年9月4~5日
13. 堀家慎一. 発達障害におけるエピジェネティクス研究. 第57回日本神経化学学会大会・第36回日本生物学的精神医学会, 奈良県文化会館, 奈良, 2014年9月29~10月1日
14. 目黒牧子, 赤木佐千代, 堀家慎一. CRISPR/Cas システムを用いたヒト染色体ドメインの大規模欠失によるクロマチンダイナミクスの解析. 第4回ゲノム編集研究会, 広島国際会議場, 広島, 2014年10月6~7日
15. Horike S. MeCP2 is required for chromatin higher-order structure and dynamics at the imprinted 15q11-q13 locus. Epigenomics of Common Diseases, Wellcome Trust Conference Centre, Churchill College, Cambridge, UK 2014年10月28~31日
16. S Horike, DH Yasui, W Powell, JM LaSalle, M Meguro-Horike. PWS-IC is essential for the higher order chromatin organization of 15q11-q13 and the location of a paternally expressed gene within a chromosome 15 territory. The 4D Nucleome 2014, Hiroshima, 2014年12月17~20日
- H . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
- 1 . 特許取得
なし。
- 2 . 実用新案登録
なし。
- 3 . その他
なし。

