

II. 分担研究報告

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

研究要旨

レット症候群では3つの原因遺伝子が同定されており、それらの機能喪失性変異が発症原因となる。*MECP2* 異常は、「典型例」の90%以上の患者で同定される。非典型例のうち、「早期発症てんかん型」では*CDKL5* 異常、「先天型」では*FOXG1* 異常が同定されている。*MECP2* と *FOXG1* の重複による臨床像についてはすでに報告があるが、*CDKL5* 重複を有する患者の臨床像は不明であった。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 *CDKL5* 重複が同定された。患者の母親も *CDKL5* 重複を有していたが、無症候であった。*CDKL5* 重複を有する女性の臨床像は、X染色体の不活化パターンの影響をうけると考えられた。

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、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。これらの遺伝子が重複した場合の臨床像は、レット症候群を呈する機能喪失性変異の場合とは異なることが知られている。*MECP2* 重複患者は、難治性てんかん、精神運動発達遅滞、反復性気道感染を合併する。*FOXG1* 重複患者は、乳児期発症のてんかん、精神運動発達遅滞を示す。これまでに *CDKL5* の重複患者の臨床像は明らかではなかったが、我々は精神遅滞の病因検索中に *CDKL5* 重複を有する男性患者を経験した。本研究では、レット症候群の原因遺伝子として同定されている3つの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ことを目的とした。

B．研究方法

遺伝子解析は、末梢血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。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．結果

精神遅滞を有する男性患者の原因検索中に、aCGH法にてXp22.13に約200kbの重複を認めた。MLPA法により、この領域内に *CDKL5* が含まれていることを確認した。同様の遺伝子重複は、無症候の母親にも検出された。この男性患者は、自閉症スペクトラム障害を合併していたが、てんかん発作の既往はなかった。母親のX染色体不活化パターンに偏りはなかった。

D．考察

CDKL5 の欠失は、乳児期発症の難治性てんかんの原因となるが、*CDKL5* の重複ではてんかん発症はなく、自閉症スペクトラム障害に知的障害を合併していた。この臨床像は、近年報告された7名の患者の臨床像とも一致していた（文献1）。この結果は、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を示している。レット症候群の病因遺伝子として同定された3つの遺伝子、*MECP2*、*CDKL5*、*FOXG1* の機能喪失あるいは重複による臨床像の特徴を表1にまとめた。

E．結論

CDKL5 重複は、男性の精神遅滞、自閉症スペクトラム障害の原因となる。*CDKL5* 重複を有する女性の臨床像は、X染色体の不活化パターンの影響をうける。

F．参考文献

1. Szafranski P, Golla S, Jin W, et al. Neurodevelopmental and neurobehavioral characteristics in males and females with *CDKL5* duplications. *Eur J Hum Genet* 2014. doi: 10.1038/ejhg.2014.217.

G．研究発表

1. 論文発表

1. Kumakura A, Takahashi S, Okajima K, Hata D: A haploinsufficiency of *FOXG1* identified in a boy with congenital variant of Rett syndrome. *Brain Dev* 36: 725-729, 2014
2. 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* 36: 794-800, 2014
3. 高橋 悟. Rett症候群の病態理解 -病因遺伝子

(MECP2, CDKL5, FOXP1) 変異に関連した臨床的特徴について- 脳と発達 46; 117-120, 2014

日 (東京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況

2. 学会発表

1. 中田昌利、熊倉 啓、高折 徹、中井理恵、岡嶋一樹、高橋 悟、秦 大資. FOXP1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)
2. 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. 日本文学遺伝学会第 56 回大会、平成 26 年 11 月 19

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1 レット症候群の病因遺伝子異常による臨床像

病因遺伝子	MECP2		CDKL5	FOXP1
遺伝子座	Xq28		Xp22	14q12
遺伝子の機能	エピジェネティクスによる遺伝子発現調節		神経細胞のリン酸化酵素	終脳発生に必須の転写因子
患者性別	女兒	男児	女兒/男児	女兒/男児
機能喪失による臨床像	<ul style="list-style-type: none"> • 典型的レット症候群 • 非典型的レット症候群 (言語能力維持型) • 自閉症 • 精神遅滞 	<ul style="list-style-type: none"> • 致死的重症脳症 • 精神遅滞 	<ul style="list-style-type: none"> • 非典型的レット症候群 (早期発症てんかん型) • 早期乳児てんかん性脳症 	<ul style="list-style-type: none"> • 非典型的レット症候群 (先天型) • FOXP1関連脳症
重複による臨床像	<ul style="list-style-type: none"> • 無症候～同症状 (skewed XCI) 	<ul style="list-style-type: none"> • 乳児筋緊張低下 • 進行性痙性 • 重度精神遅滞 • 自閉症的症候 • てんかん • 反復性呼吸器感染 	男児 <ul style="list-style-type: none"> • 精神遅滞 • 自閉症的症候 • てんかん(-) 女兒 <ul style="list-style-type: none"> • 無症候～同症状 (skewed XCI) 	<ul style="list-style-type: none"> • 重度精神遅滞 • 自閉症的症候 • てんかん (乳児期発症、點頭てんかん) • 小頭症 (-)

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

レット症候群診療ガイドブックの作成

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 助教
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、レット症候群の診療に役立つ小児科医向けのガイドブックを作成することを目的とした。レット症候群は、当初原因が不明であったために、診断基準も複雑で、診断基準自体も6回もの改訂がなされた。そのため、初学者にとっては診断が容易ではなく、診断されずにいる症例も多いと考えられた。2010年にアメリカで大規模な臨床研究がなされて、簡便・簡潔な診断基準が提案された。この理解しやすい診断基準を紹介して、レット症候群をより多く診断できるようにするとともに、診断した患者の全身管理を的確に行えるように、レット症候群について現時点で判明している研究成果をまとめて、診療に寄与できるガイドブックを作成することとした。我々の先行研究では、我が国におけるレット症候群の頻度は、1万人の女性のうち、約0.9人と算出されている。レット症候群は、原因がわかる女性の精神発達遅滞の中で2番目に多いとされている。その診断と診療に有用な指針を作成することで、国内の小児神経診療に貢献できると考えている。

A. 研究目的

レット症候群(RTT)は、1966年にAndreas Rettにより報告された女児の精神発達遅滞を呈する疾患で、神経症状以外にも多彩な症状を呈する(Wien Med Wochenschr 1966;116:723)。当初、原因が不明であったため、固有の症状を組み合わせで診断する診断基準が作成され、臨床の現場で使用されては改訂するということが、計5回の改訂が行われている。診断基準の項目は多く、様々な臓器・神経系の症状を含むために、初学者にとっては敷居が高いものとなっている。アメリカで行われた臨床症状と遺伝子診断を基盤にした大規模な臨床研究をもとに、2010年に、より簡便な診断基準が提案された(Ann Neurol 2010;68:944)。

国内において、レット症候群の診療指針は、2回出版されている(1998年「レット症候群介護マニュアル」、2013年「レット症候群ハンドブックII」)。しかし、前者はすでに絶版で入手不能であり、後者は大部で、診療の場で使用するのは困難である。

我々は、より多くの患者が診断されることを目指して、2010年の簡便な診断基準を国内で紹介し、同時に現時点での最新の診療指針を記載した本を出版して、医療者・患者の双方にとって有用な診療ガイドブックを作成することとした。

B. 研究方法

研究班の構成メンバーのうち、臨床に関わるメンバーと、以前から班会議に出席したことのある研究者・臨床医に、レット症候群の症状や治療について、章を割り振って、分担執筆を依頼した。

C. 研究結果

章立てと執筆者は次のとおりである。

I	レット症候群の概要	
1	レット症候群の歴史	松石豊次郎
2	レット症候群の診断基準	青天目信
3	レット症候群の遺伝子 レット症候群の病態	高橋悟 伊藤雅之
II	よくある症状の解説と対処法	
1	退行	高橋悟
2	手の合目的運動の消失	青天目信
3	手の常同運動	青天目信
4	言語コミュニケーションの消失	青天目信
5	歩行障害	青天目信
6	発育障害と小頭症	原宗嗣
7	てんかん	青天目信
8	行動の問題、自閉症	高橋悟
9	筋緊張異常、不随意運動	青天目信
10	睡眠異常	宮本晶恵
11	痛覚鈍麻と自傷行為	青天目信
12	循環器の問題	原宗嗣
13	呼吸異常	坂田英明・白川哲夫
14	嚥下障害	保母妃美子・田村文誉
15	便秘・消化管運動異常	原宗嗣
16	思春期・第二性徴、内分泌	松石豊次郎
17	整形外科的問題	梶浦一郎
18	歯科・咀嚼・歯ぎしり	森崎市治郎
19	リハビリについて	梶浦一郎
III	社会福祉資源	青天目信
IV	今後期待される治療	伊藤雅之

以上、大阪大学出版局より出版した。

D. 考察

現時点で、レット症候群の病態や遺伝学、診療指針に関する患者向けの文書は、海外の書籍を翻訳したものしかない。

この書籍を作成したことにより、医療者が診療の指針として役立てることに加え、患者・家族が疾患の理解を進め、より積極的に診療に参加できることが期待される。

E . 結論

本研究では、最新の基礎研究と臨床研究の知見を盛り込んだ書籍を作成した。今後の我が国におけるレット症候群の診療に有用なガイドブックを作成できた。

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

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

IGFBP3欠損マウスあるいはIGFBP3過剰発現マウスと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、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。レット症候群の発症病態の一部がIGFBP3によることを明らかにした。さらに、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

レット症候群の原因遺伝子メチル化CpG結合タンパク2 (MECP2) 遺伝子欠損マウスおよびIGFBP3欠損マウスとIGFBP3過剰発現マウスの二重遺伝子改変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。

B．研究方法

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欠損マウスとの二重遺伝子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。

一方、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。

（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。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

IGFBP3欠損マウス、IGFBP3過剰発現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

レット症候群の症状の一部が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わかった。このことから、IGFBP3が治療のターゲットになりうると思われる。

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。

E．結論

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、治療ターゲットになりうるものと考えられた。可能性が示唆された。

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. Akamatsu T, Dai H, Mizuguchi M, Goto Y, Oka A, Itoh M. LOX-1 Is a Novel Therapeutic Target in Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Am J Pathol* 2014;184:1843-1852.
3. 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.
4. 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.
5. 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.

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,中島 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.

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

再生医療技術を利用したレット症候群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
高橋知之 久留米大学高脳疾患研究所（小児科）・准教授
原 宗嗣 久留米大学高次脳疾患研究所・助教
弓削康太郎 久留米大学医学部小児科学講座・助手

研究要旨

申請者はこれまで *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。この1年間は、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 QT 延長などの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、基礎研究で、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、RTT の突然死の病態を解明し、心機能における機能的役割や治療薬スクリーニングの基盤確立の一助とする。

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 細胞を、コントロールの wild-type (WT-) ES 細胞から心筋分化誘導と比べ、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、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、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、形態異常を評価する。

RTT モデルマウス心臓の生理学的解析

MeCP2 欠損マウスと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、基礎実験は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。

C．研究結果

(1) 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 細胞から両群において胚様体 (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、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。更に、電子顕微鏡で心臓の刺激伝道系の異常が確認され現在投稿中で Revise 状態である。

(2) 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 何れも有為に長くなる 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。心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薄かった。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。

(3) 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、刺激伝道系の形態学的変化があり、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

MeCP2 が心筋分化過程の遺伝子発現を制御することで、心筋分化を調節する可能性が示唆された。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。

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。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Hara M., Ohba C, Yamashita Y., Saitsu H., Matsumoto N., Matsuishi T. *De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome -like phenotype in a female patient.* *Am J Med Genet A* 2015 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. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.
3. Matsuoka M, Nagamitsu S, Iwasaki M, Iemura A, Yamashita Y, Maeda M, Kitani S, Kakuma T, Uchimura N, Matsuishi T. High incidence of sleep problems in children with developmental disorders: Results of a questionnaire survey in a Japanese elementary school. *Brain Dev* 36: 35-44, 2014
4. Ohya T, Morita K, Yamashita Y, Egami C, Ishii Y, Nagamitsu S, Matsuishi T. Impaired exploratory eye movements in children with Asperger 's syndrome. *Brain Dev* 36: 241-247, 2014
5. Shibuya I, Nagamitsu S, Okamura H, Ozono S, Chiba H, Ohya T, Yamashita Y, Matsuishi T. High correlation between salivary cortisol awakening response and the psychometric profiles of healthy children. *Bio Psycho Social Med* 8: 9, 2014

2 .学会発表

1. Yamashita Y, Ohya T, Kaneko M, Egami C, Tada Y, Anai C, Mukasa A, Nagamitsu S, Iramina K, Matsuishi T. The objective evaluation of diadochokinesia: A comparison between typically developing children and children with ADHD. The 2nd Asian Congress on ADHD, 2014. 3 (Tokyo)
2. Yamashita Y, Fujita F, Tada Y, Anai C, Mukasa A, Egami C, Okamura H, Yuge K, Ohya T, Iemura A, Nagamitsu S, Matsuishi T. Quality of life (QOL) reported by children with ADHD and their moters participated in summer treatment program. PAS/ASPR Joint Meeting, 2014. 5 (Vancouver)
3. 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)

G . 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

特記なし

3 . その他

特記なし

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、生後 2 週において延髄腹側呼吸群での *Gad1* 近位プロモーター領域の CpG メチル化レベルを調べたところ、*Mecp2*^{-/-} 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。これまでのわれわれの研究で、延髄腹側呼吸群での *Gad1* mRNA 発現がバルプロ酸の腹腔内投与により増加したことから、バルプロ酸が延髄腹側呼吸群ニューロンでのコアヒストン H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 のアセチル化に及ぼす影響について免疫蛍光染色によって比較した。その結果、*Mecp2*^{-/-} ではコントロールに比べ、バルプロ酸投与群で H3K9, H4K5 のアセチル化レベルの上昇が認められた ($p < 0.01$)。以上より、*Mecp2*^{-/-} の呼吸異常に、延髄腹側呼吸群での *Gad1* プロモーターの CpG メチル化ならびに同領域のヒストンアセチル化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、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は明確ではない。また延髄腹側呼吸群での *Gad1* mRNA 発現を調節しているメカニズムについても明らかにされていない。

そこで今回、*Mecp2*^{-/-} の延髄腹側呼吸群における *Gad1* のプロモーターの CpG メチル化、ならびに同部位でのコアヒストン H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 のアセチル化について免疫蛍光染色法を用いて研究を行った。

B. 研究方法

生後 2 週の *Mecp2*^{-/-} ならびに wild について、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 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。

生後 2 週の *Mecp2*^{-/-} ならびに wild に、生後 8 日から 7 日間、バルプロ酸あるいは生理食塩水の腹腔内投与を行った。投与終了後に 4% パラフォルムアルデヒドにて灌流固定し、脳組織を摘出した。25 μ m の厚さで延髄の連続切片を作製後、一次抗体としてアセチル化した H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 の各ヒストンに特異性のあるポリクローナル抗体を使用し、抗 NeuN モノクローナル抗体とともに 4 にて一晚インキュベートしたのち蛍光 2 重染色を行った。

DAPI 反応成分を含む封入剤にて封入後、CCD カメ

ラを備えた落射蛍光顕微鏡 (Nikon 80i) にてすべての切片について均一な条件下で蛍光画像を取得した。そののち各アセチル化ヒストンの蛍光強度を ImagePro7.0 にて細胞単位で定量、比較した。切片間の蛍光測定誤差を補正するため、各ヒストンの蛍光強度は個々の細胞核での DAPI の測定値に対する比率として計算した。

(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

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 箇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。

生後 2 週の *Mecp2*^{-/-} にバルプロ酸を 7 日間投与したところ、延髄腹側呼吸群ニューロンでの、ヒストン上のリジン残基 H3K9 および H4K5 について、バルプロ酸投与群でコントロール (生理食塩水群) に比べ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、wild ではいずれのアセチル化部位においても変化がみられなかった。

D. 考察

本研究では *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。この知見から、*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* mRNA の転写抑制, それらに続く GAD1 活性の低下による GABA 合成の減少が関与していることが推測された。

延髄腹側呼吸群ニューロンでのヒストン上のリジン残基 H3K9 および H4K5 について, *Mecp2*^{-/-} のバルプロ酸投与群でアセチル化レベルの上昇が認められたこと, 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というこれまでの結果を合わせて考察すると, *Mecp2*^{-/-} での無呼吸には, エピジェネティックな GAD1 活性調節異常による GABA 合成の低下が関与していることが強く示唆される。

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 発現量の低下が関与しており, *Gad1* プロモーターに対応するコアヒストン H3K9 および H4K5 の修飾もそれらに影響を与えている可能性が示された。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Sato M, Toriumi T, Watanabe N, Watanabe E, Akita D, Mashimo T, Akiyama Y, Isokawa K, Shirakawa T, Honda M. Characterization of mesenchymal progenitor cells in crown and root pulp from human mesiodentes. *Oral Dis* 2015;21:e86-e97. doi: 10.1111/odi.12234.
2. 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.

3. 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.
4. Nakamura H, Kato R, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. Spatiotemporal profiles of dental pulp nociception in rat cerebral cortex: An optical imaging study. *J Comp Neurol* 2015 *in press* doi: 10.1002/cne.23692.

2 . 学会発表 該当なし

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

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

研究分担者 田中輝幸 東京大学大学院医学系研究科発達医学教室・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、独自に作製した *Cdk15* ノックアウト (KO) マウスの神経科学的解析を行った。その結果 *Cdk15* KO マウスにおいて、海馬神経細胞樹状突起スパインの形態・密度異常、易痙攣性、シナプスグルタミン酸受容体機能・蛋白質の異常を同定し、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に成功した。以上の成果から、*CDKL5* 変異に伴う病態が興奮性シナプス機能異常である事が示され、グルタミン酸受容体作動薬による治療の基盤が見出された。

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及び根本的治療法は未解明である。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、神経科学的解析を行った。本研究の目的は、*Cdk15* KO マウスのてんかん、記憶障害、情動異常等の発達障害のメカニズムの解明である。

B. 研究方法

・ *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) 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
- (5) 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

C. 研究結果

・ *Cdk15* KO マウス異常表現型解析

Cdk15 KO マウスにおいて、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、脱分極の異常等を同定した。生化学的手法及び免疫電子顕微鏡を用いた KO マウスの興奮性シナプス解析により、NMDA 型グルタミン酸受容体サブユニットの構成異常及び足場蛋白質の増加を同定した。更に、NMDA 型グルタミン酸受容体の阻害薬投与により、興奮性アミノ酸誘発性けいれんが、野生型と同レベルまで軽減し、致死性のけいれんをレスキューした。

D. 考察

Cdk15 KO マウスでは神経細胞樹状突起において未熟

なスパインが有意に増加していることが明らかとなった。興奮性アミノ酸に対する過剰興奮、興奮性ニューロンのNMDA型グルタミン酸受容体蛋白質の異常、電気生理学的異常などから、本KOマウスにおける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レスキューの成功は、上記の病態機序に対する分子治療法の開発の基盤となるものである。本研究結果から、*CDKL5* 遺伝子変異による発達障害の病態が興奮性シナプス機能異常であることが示され、治療の方策の一つが見出された。

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同定され、グルタミン酸受容体阻害薬によって KO マウスの興奮性アミノ酸誘発性けいれんをレスキューする事が出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).

2. 学会発表

1. 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).
2. 奥田耕助, 田中輝幸. 「難治性てんかんを伴う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).
3. 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).

G. 知的所有権の取得状況
特許取得、実用新案登録 なし

インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析

研究分担者 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、前年度に引き続き 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

前年度までに、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。そこで、本年度は DNA-FISH 法により 15q11-q13 領域のクロマチン動態を詳細

に解析することで、MAGEL2 遺伝子の発現低下を引き起こしたクロマチン動態を明らかにすることとした。その結果、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。さらに、15 番染色体テリトリーと MAGEL2 遺伝子座の相関関係について解析したところ、発現している 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、発現していない 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明らかとなった。

D．考察

15q11-q13 領域は、ゲノム刷り込みを受け、親アレル特異的な遺伝子発現及びクロマチン動態を呈する。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。一方、父方 PWS-IC が 1Mb 離れた MAGEL2 遺伝子座の核内配置をコントロールしている事実は大変興味深く、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. 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.
2. 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

2. 学会発表

1. 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
2. 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制御する PWS-IC の新たな役割」*日本生化学会北陸支部 第 32 回大会*, 富山, 2014 年 5 月 24 日
3. 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
4. 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

5. 堀家慎一【招待講演】「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

6. 堀家慎一【招待講演】「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

7. 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

8. 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

9. 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制御する PWS-IC の新たな役割」*第 32 回染色体ワークショップ*, 第 13 回核ダイナミクス研究会, 広島, 2014 年 12 月 15~17 日

9. 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

なし

