

201419083B

厚生労働科学研究費補助金

障害者対策総合研究事業（神経・筋疾患分野）

レット症候群の早期診断と治療をめざした  
統合的研究

(H24-神経・筋-一般-007)

平成24年度～平成26年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成27（2015）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（障害者対策総合研究開発事業（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

平成24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成27（2015）年 3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

レット症候群の早期診断と治療をめざした統合的研究 伊藤雅之	5
----------------------------------	---

(資料1) レット症候群診断基準改訂版(2010年版)

(資料2) レット症候群患者データベースのための登録票

(資料3) レット症候群患者データベースの運用構想

II. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
--------------------	----

III. 研究成果の刊行物・別刷	27
------------------	----

## 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・治療法の開発をめざす。

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改正診断基準を作成した。さらに、これまでの臨床経験および文献的レビュー等を持ち寄り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。患者登録制による患者データベースシステムを作り、平成25年11月より運用している。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。

臨床研究として、表現型と遺伝子異常の相関を明らかにした。レット症候群の病因遺伝子は *MECP2*, *CDKL5*, *FOXP1* が知られている。改正診断基準による典型的レット症候群例では、高頻度で *MECP2* 変異が同定された。しかし、*CDKL5* 変異や *FOXP1* 変異の症例は神経症候の退行が明らかではなく、レット症候群の診断が少なかった。改正診断基準は *MECP2* 変異を有する均質な患者集団を同定することが可能であり、臨床研究や治験対象の利用に有用である。一方、典型的レット症候群の診断基準合致するが *MECP2* 異常がない症例に、*WDR45* 異常と *SHANK3* 異常を発見し、非典型的レット症候群症例に *PDHA1* 異常と *NR2F1* 異常を認めた。

基礎研究では、(1) 軽症化因子の探求：*MECP2*変異発現ベクターをつくり、線維芽細胞へ導入、症状への関連性が予測される分子を同定した。(2) *MECP2*下流遺伝子IGFBP3の発症病態の解明：*Igf3*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発現解析を行ない、レット症候群の発症病態の一部がIGFBP3によるものと考えられた。(3) *MECP2*が関与する神経系と心臓の病態解明：*Mecp2*欠損マウスとそのES細胞を用いて神経系の発生・分化過程の*MeCP2*役割を解析し、*MeCP2*の神経細胞成熟やグリア細胞分化への関与を明らかにした。また、*Mecp2*欠損マウス心臓の生理学的、分子生物学的解析から、心電図異常と特定の遺伝子発現異常を明らかにした。(4) 呼吸障害の分子機序の解明：*Mecp2*欠損マウスでは、生後2-7週齢で野生型母由来野生型マウスに比し無呼吸頻度が高かった ( $p < 0.01$ )。これは明初期をピークとする無呼吸頻度の日内変動がみられた。この変化は、分子病理学的に延髄呼吸中枢のVMAT2陽性puncta数減少と相関があるものと考えられた。一方、*Mecp2*欠損マウスの生後8日齢から7日間のバルプロ酸腹腔内投与により、無呼吸頻度が有意に減少した ( $p < 0.05$ )。発現解析の結果、延髄腹側呼吸核群の*Gad1* mRNA 発現量は*Mecp2*欠損マウスで有意に低下していた ( $p < 0.05$ ) が、バルプロ酸腹腔内投与により回復した ( $p < 0.05$ )。延髄腹側呼吸核群の*Gad1*プロモーター領域のメチル化レベルは高メチル化状態にあることが分かった。また、同部位でバルプロ酸投与により、H3K9, H4K5アセチル化レベルの上昇があった ( $p < 0.01$ )。*Mecp2*欠損マウスの無呼吸は延髄呼吸中枢のモノアミン作動性シナプス伝達障害と生後早期からのエピゲノム機構を介したGABA合成系の発現調節障害が関与していることが明らかになった。(5) *CDKL5*遺伝子異常の病態解明：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、酵母ツーハイブリッドとインタクトームスクリーニングによる*CDKL5*相互作用タンパクを同定した。また、*Cdk15* 欠損マウスを作成し解析した結果、海馬神経細胞のスパイン形態と密度の異常、易痙攣性、グルタミン酸受容体の機能と蛋白質の異常を明らかにした。さらに、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治療効果を明らかにした。(6) ヒト染色体15q11-q13領域のエピゲノム機構の病態解明：*MeCP2*のPrader-Willi/Angelman症候群(AS)責任遺伝子座における分子動態の一部を解明した。また、*MeCP2*と類似の機能をもつ*MBD5*の標的遺伝子の同定と分子機構を解明した。これらの結果から、*MeCP2*と*MBD5*の生物学的共通機構の存在が示唆され、その解明が広く発達障害の治療法開発へ発展できるものと期待できる。

本研究班の成果は、今後のレット症候群の臨床および研究に広く利用されることが期待できる。

## 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 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。レット症候群の原因遺伝子としてメチル化CpG結合タンパク2 (*MECP2*) が解明されたが、その複雑な分子機構と多彩な症状、診断の困難さにより臨床研究の進展は少なく、確立された治療法や療育法がない。本研究では、これまでの疫学研究から患者データベース (DB) を構築し、基礎研究とあわせてトランスレーショナルリサーチを展開し、科学的根拠に基づいた早期診断法を確立し、治療法の開発を目指す。

臨床医、臨床遺伝医、基礎研究者、患者代表者などによる臨床研究チームを組織し、諸外国を含めた広範な情報収集と意見交換を行ない、診断基準を改定し、患者登録制によるDBシステムを作る。最新の診断基準を本邦に適合するように改定する。また、診療ガイドブックを作成して、遺伝子診断を含む診断・診療支援を行い、疾患認知度の向上と早期診断の推進をはかる。DBは、治験を含む臨床研究と国内外の疫学研究等の基盤として活用する。

臨床研究では、臨床遺伝学的研究を行う。典型的レット症候群の約90%にメチル化CpG結合タンパク2 (*MECP2*) 異常が同定される。一方、非典型的レット症候群では *MECP2* 異常は低い、「早期発症てんかん型」では *Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)* 異常が知られ、「先天型」では *Forkhead box G1 (FOXP1)* 異常が報告されている。そこで、典型的レット症候群の *MECP2* 異常のない患者で他の遺伝子異常を認めた患者の特徴を後方視的に検討する。さらに、これら患者の臨床像と遺伝子変異との関連を明らかにし、治療法研究に向けた基盤データを作成する。

基礎研究では、(1) 軽症化因子の探求：*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。(2) *MECP2* 下流遺伝子 *IGFBP3* の発症病態の解明：*Igfbp3* 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。(3) *MECP2* が関与する神経系と心臓の病態解明：レット症候群の発症に関わる *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を明らかにする。(4) 呼吸障害の分子機序の解明：*Mecp2* 欠損マウスの無呼吸発作に関して、時間変動、延髄呼吸関連中枢のモノアミンとGABA系の発現障害とその分子機序を明らかにする。(5) *CDKL5* 遺伝子異常の病態解析：酵母ツーハイブリッドとインタラクトームスクリーニングを用いた *CDKL5* の相互作用タンパクの同定と、*Cdk15* 欠損マウスを作成し、表現型解析による loss-of-function 分子機構解析を行い、*CDKL5* の分子機能と機能喪失によるてんかん、記憶障害、情動異常等の発達障害の分子機序を解明する。(6) ヒト染色体15q11-q13領域のエピゲノム機構の病態解明：ヒト染色体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、*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。そこで、15q11-q13領域における *MECP2* の分子動態を解明し、エピゲノム機構と発達障害との関連を解明する。

### 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、新しい診断基準を作成し公表した(資料1)。これに基づき、これまでの疫学研究を参考に、患者データベース登録票を作成し、それに準拠した手引きを作成し、患者データベースを構築した。NPO法人レット症候群支援機構ホームページ ([www.npo-rett.jp/](http://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)の協力のもと登録票を作成し、患者データベース管理者へ郵送し、登録している。また、各分野の専門医、研究者による診療ガイドブックを作成した。

臨床遺伝学的研究は、レット症候群と診断された患者のうち、遺伝子検査を施行された患者について、臨床的特徴を診療録より後方視的に検討した。遺伝子解析は、患者あるいは保護者への十分な説明と同意ののち、採血後末梢血白血球よりDNAを抽出し、サンガー法にて行った。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。

基礎研究は、(1) 軽症化因子の探求：*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。(2) MECP2 下流遺伝子 IGFBP3 の発症病態の解明: *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。また、MECP2 欠損マウスとヒト IGFBP3 (hIGFBP3) 過剰発現マウス (hIGFBP3-TG) の二重改変マウスを作成し、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 $\mu$ 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 数等の行動学的、形態学的解析を行った。(3) MECP2 が関与する神経系と心臓の病態解明: ① *Mecp2* 欠損マウスの ES 細胞の心筋分化: *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、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 (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、電子顕微鏡による心臓の刺激伝導系を比較検討し、心筋分化能と形態異常を評価した。② RTT モデルマウス心臓の生理学的解析: *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの心エコーによる心機能と心電図検査を行った。心電図検査は、6 週齢と 8 週齢の *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウス 10-14 匹を行った。心機能は、8 週齢の *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウス 9-11 匹を評価した。③ RTT モデルマウス的心臓における遺伝発現: 6 週齢と 8 週齢の *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの心臓の RNA 抽出後、30 個の心臓特異的遺伝子の発現を定量 PCR により解析した。(4) 呼吸障害の分子機序の解明: ① 生後 2~10 週齢の *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) のチャンバーに入れ、呼吸波形を定時 1 時間 (2-3 週齢) と 24 時間連続 (7 週齢) で測定、記録したのち 1 秒以上の無呼吸の発生回数を調べた。② 生後 8 週齢 *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの脳組織の小胞膜モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) の免疫組織染色を行った。自律神経機能の中核である延髄の dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) と呼吸リズム形成の nucleus of the solitary tract (NST)、ventral respiratory group (VRG) の VMAT2 陽性 puncta 数を画像処理ソフトウェア (ImagePro7.0) で計測した。③ *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの生後 8 日から 7 日間、18:00 に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。また、投与後に 4% パラフォルムアルデヒドで環流固定し、脳組織を 25  $\mu$ m の厚さで連続切片を作製し、アセチル化 H3K9, H3K14, H4K5, H4K8

ヒストン特異的抗体と抗 NeuN 抗体による蛍光二重染色を行った。DAPI 封入後、蛍光顕微鏡 (Nikon 80i) で全切片を画像化後、蛍光強度を ImagePro7.0 にて細胞単位で定量化し比較検討した。④ 生後 2 週齢の *Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの延髄腹側呼吸群の組織から RNA を抽出し、定量 PCR により *Gad1* mRNA 量を調べた。バルプロ酸投与マウスも同様に *Gad1* mRNA の測定を行い比較した。また、延髄腹側呼吸群の組織から DNA を抽出し、bisulfite 処理後 *Gad1* の近位プロモーター領域の nested PCR を行い、サブクローニング後塩基配列を決定した。該当領域の 23 ヶ所の CpG 領域のメチル化 cytosine を検出した。(5) *CDKL5* 遺伝子異常の病態解析: ① *CDKL5* 相互作用蛋白の同定: Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 を用い、*CDKL5* N 末端側キナーゼ領域と C 末端側領域を pGBKT7 ベクターにクローニングし bait ベクターを作成し、マウス脳 cDNA Library (Clontech) に対して相互作用スクリーニングを行った。さらに、baculovirus 発現系を用いて精製した 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)。② *Cdk15* 欠損マウスの作成と解析: ES 細胞相同組み換えにより、*Cdk15* 遺伝子の flox マウスおよびこのマウスと CAG-Cre マウスとの交配により、*Cdk15* 欠損マウスを作成した。その後、神経細胞樹状突起及びスパインの解析、薬物投与による易けいれん性解析、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機能、微細構造、蛋白質解析を行った。(6) ヒト染色体 15q11-q13 領域のエピゲノム機構の病態解明: ① ヒト染色体 15q11-q13 領域のインプリンティングセンター (PWS-IC) の染色体ドメインレベルの遺伝子発現およびクロマチン動態の解明のため、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) を用いて、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を解析した。② 神経細胞分化における MBD5 の役割を明らかにするため、ゲノム編集技術の一つであるジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) を用い、神経細胞様に分化誘導出来るヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株で MBD5 のヘテロ欠損細胞株を樹立した。樹立した細胞株を発達障害患者のモデル細胞として、mRNA マイクロアレイ解析により MBD5<sup>+/-</sup> で発現変化を呈する遺伝子の同定を試みた。同定した MBD5 のターゲット遺伝子の機能と生化学的解析により MBD5 の機能を明らかにする。

(倫理面への配慮) 本研究では、各研究施設の当該委員会等において承認を得たのち行った。臨床研究

では、事前に書面で承諾・不承諾をはかり、本人および保護者の承諾下で施行した。また、回収されたデータは個人照合が出来ないように、データ収集の時点から匿名化を徹底した。学内外の種々の指針や法令を遵守し実施した。

### C. 研究結果

2010年の診断基準の基づき、注釈を加えて新しい診断基準を作成した(資料1)。今後、これによる臨床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について、患者データベース登録システムを利用して追跡する。

これまでの患者データベースへの登録は41名である。遺伝子診断は全例で行われているが、登録は35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。遺伝子異常が見つからなかった症例が2例登録されている。旭川医大では、臨床的にレット症候群を疑われて病因遺伝子検査を行った78名の患者のうち50例に*MECP2*変異を同定した。*MECP2*変異のない症例は改訂診断基準に合致していなかった。一方、典型的レット症候群の改訂診断基準に合致し*MECP2*変異がない症例はなかった。非典型的レット症候群のうち、改訂診断基準に合致していたのは*CDKL5*変異の2例中1例と*FOXG1*変異の4例中2例のみだった。改訂診断基準に合致しないのは、重度の精神運動発達遅滞のため“退行”の判断が困難な症例であった。大阪大学では、レット症候群10名の*MECP2*遺伝子検査の結果、5名で*MECP2*異常を認めた。*MECP2*異常のない5名のうち3名で*WDR45*遺伝子、*PDHA1*遺伝子、*NR2F1*遺伝子に異常を確認した。臨床的特徴は、*WDR45*異常では改訂診断基準上典型的レット症候群であり、*PDHA1*異常と*NR2F1*異常では非典型的レット症候群であるが、*PDHA1*異常では高乳酸血症があり、*NR2F1*異常では視神経乳頭の萎縮と蒼白化があった。久留米大学では、典型的レット症候群患者に*SHANK3*異常をみつけた。

基礎研究では、(1)軽症化因子の探求：*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ことが分かった。(2)MECP2下流遺伝子IGFBP3の発症病態の解明：*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、形態学的解析の結果、*Mecp2*欠損マウスと二重遺伝子改変マウスの体重は、 $13.83 \pm 3.31\text{g}$ 、 $11.95 \pm 15.39\text{g}$  ( $p>0.05$ )、脳重量は、 $0.37 \pm 0.00\text{g}$ 、 $0.28 \pm 0.00\text{g}$  ( $p<0.05$ )、皮質厚は $974.85 \pm 3225.55\ \mu$

$m$ 、 $940.83 \pm 1782.73\ \mu\text{m}$  ( $p>0.05$ )、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。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。(3)MECP2が関与する神経系と心臓の病態解明：①*Mecp2*欠損マウスのES細胞の心筋分化誘導：*Mecp2*欠損マウスと野生型マウスのES細胞から胚様体(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、*Mecp2*欠損マウスのES細胞の心筋分化特異的遺伝子の発現は、野生型マウスのES細胞と同様であった。しかし、8日目以降の*Mecp2*欠損マウスのES細胞で、alphaMHCの発現が高い傾向が認められた。分化誘導後6、8、10日目のEBsをマーカー分子の免疫染色した結果、*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、*Mecp2*欠損マウスES細胞は野生型マウスES細胞に比較して、心筋分化マーカーの高発現傾向があることが分かった。また、*Mecp2*欠損マウスの心臓刺激伝導系の微細構造異常を認めた。②*Mecp2*欠損マウスの心機能解析：生後6、8週齢の*Mecp2*欠損マウスと野生型マウスの心電図検査では、QT延長がみられた。心エコー解析は、*Mecp2*欠損マウス左心室壁厚は有意に菲薄化していた。③*Mecp2*欠損マウス心臓の遺伝子発現解析：生後6、8週齢の*Mecp2*欠損マウスと野生型マウスの心臓関連の30個の遺伝子発現解析の結果、*Mecp2*欠損マウス心臓で高発現傾向の4遺伝子と低発現傾向の6遺伝子をみつけた。(4)呼吸障害の分子機序の解明：①生後2、3週齢の*Mecp2*欠損マウスでは無呼吸回数の有意な増加がみられ、生後7週齢の24時間測定では明初期をピークとする高頻度無呼吸があり、日内変動がみられた。②生後8週齢の*Mecp2*欠損マウスのDMV、NST、VRGでは、VMAT2陽性puncta数の有意な減少がみられた。③生後2週齢以降の*Mecp2*欠損マウスの高頻度無呼吸について、生母の遺伝子型の影響を考慮して解析した結果、生後2~7週齢の*Mecp2*欠損マウスの無呼吸頻度は野生型マウスから生まれた野生型マウスに比し有意に高い( $p<0.01$ )が、同腹野生型マウスと比較すると無呼吸頻度に有意差はなかった。生後2週齢の*Mecp2*欠損マウスへのバルプロ酸の腹腔内投与は有意に無呼吸頻度を減少させた( $p<0.05$ )。生後2週齢の*Mecp2*欠損マウスの延髄腹側呼吸核群の*Gad1* mRNA発現量は、野生型メスから生まれた野生型マウスに比し、有意に低下していた( $p<0.05$ )。しかし、バルプロ酸腹腔内投与後、*Mecp2*欠損マウスの*Gad1* mRNA発現量は有意に増加した( $p<0.05$ )。④延髄腹側呼吸核群の*Gad1*近位プロモーター領域の23ヶ所のCpGメチル化レベルは、*Mecp2*欠損マウスとその同腹野生型マウスは野生型マウスから生まれた野生型マウスに比し高メチル化状態にあった。生後2週齢の*Mecp2*欠損マウスの7日間バルプロ酸投与により、延髄腹側呼吸核群神経細胞のヒストン上のリジン残



基H3K9および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なかった。(5) *CDKL5* 遺伝子異常の病態解析：① *CDKL5* 相互作用蛋白の同定：酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、*CDKL5* N末端側キナーゼ領域で19個、C末端側で2個の、微小管関連蛋白、細胞質モーター蛋白、シナプス関連蛋白、イオンチャネル、転写因子などを含む相互作用候補タンパクを同定した。また、インタラクトームスクリーニングによって、複数の細胞骨格、細胞質モーター蛋白、シナプス関連蛋白を同定した。② *Cdk15* KOマウス表現型解析：*Cdk15* 欠損マウスの海馬CA1錐体神経細胞の樹状突起スパインの形態、サブクラスおよび密度に異常が認められた。*Cdk15* 欠損マウスへの興奮性アミノ酸投与により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、*Cdk15* 欠損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。生化学的解析と免疫電子顕微鏡による構造解析の結果、NMDA型グルタミン酸受容体サブユニットの構成異常を同定した。さらに、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マウスと同レベルまで軽減し、致死性けいれんから回復することを明らかにした。(6) ヒト染色体15q11-q13領域のエピゲノム機構の病態解明：① 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番染色体を構築した。15q11-q13領域の遺伝子発現量は父方特異的な *MAGEL2* 遺伝子の発現低下を認めた。次に、DNA-FISH法で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が、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。15番染色体テリトリーと *MAGEL2* 遺伝子座の相関関係では、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分かった。② ZFNによるヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞株のMBD5ノックアウト細胞を作成した。ZFNによるDNA切断、ミスマッチ修復による5塩基の挿入の結果、核移行シグナル (NLS) からC末側を欠損した断片化MBD5をヘテロに持つ細胞株を樹立した。発現解析によりMBD5<sup>+/+</sup>で発現変化を呈する遺伝子スクリーニングを行った。また、神経細胞分化の際に発現変化のある遺伝子を比較し、さらにMBD5<sup>+/+</sup>で分化誘導時に発現異常がある遺伝子スクリーニングした。その結果、microRNAやsnRNAなどのnon-coding RNAの占める割合が極めて高かった。

#### D. 考察

典型的レット症候群の原因遺伝子として1999年に *MECP2* が同定され、非典型的レット症候群の原因遺伝

子として2004年に早期発症てんかん型の *CDKL5* が報告され、2008年に先天型の *FOXG1* が報告された。*MECP2* 遺伝子異常症例の臨床蓄積に伴い、従来のレット症候群の診断基準の妥当性を再検討する必要性が高まり、819例のレット症候群患者の診察・病歴聴取・遺伝子解析から、自然歴を明らかにし、2010年に新しい診断基準が発表された。平成24年度より、診断基準の見直しと診療ガイドブックの作成を行った。この改定診断基準では、乳児期における退行とその後安定期が続くという発達のパターンが必須であり、意味のある上肢の動きや言語コミュニケーションの悪化、歩行異常、上肢の常同運動はそれに次ぐ重要な要件として挙げられた。レット症候群様の上肢の常同運動は他の疾患でも認められる非特異的な所見であり、*CDKL5* や *FOXG1* の遺伝子異常の患者でも、上肢の常同運動は認めるが、初期の発達がほぼ認められず、退行がないために、診断基準を満たさない症例が多くなると考えられる。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今後に期すが、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。また、平成25年度より患者データベース登録を行っている。登録数は増えているが、まだ認知度が低くシンポジウムや社会啓蒙活動を通して広める必要がある。今後、臨床実態の解明のみならず、治験や疫学解析、臨床研究の基盤データとして活用していく。

臨床遺伝学的研究では、典型的レット症候群の改正診断基準に合致していたすべての症例で *MECP2* 変異が同定された。非典型的レット症候群の病因遺伝子として同定された *CDKL5* と *FOXG1* に変異を有する症例では、レット症候群の診断基準を満たさないことが多く、その病態は *MECP2* 変異によるレット症候群とは異なるものと考えられる。

*WDR45* 遺伝子異常の症例は典型的レット症候群の改正診断基準を満たしていた。これまで報告されている *WDR45* 異常症例は、淡蒼球と黒質に鉄沈着する神経疾患 (neurodegeneration with brain iron accumulation) の一つで BPAN (beta-propeller protein-associated neurodegeneration) として知られている。また、*PDHA1* はピルビン酸脱水素酵素欠損症の原因遺伝子であり、*NR2F1* 遺伝子は知的障害と視神経萎縮を合併する患者にみつけた原因遺伝子で機能は不明である。レット症候群は、*SHANK* 遺伝子も含めて多彩な遺伝子異常を包括する疾患群であり、患者データベースを活用して専門的に長期間の詳細な症状の記録が必要である。

基礎研究では、(1) 軽症化因子の探求：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みいだした。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

パターンをみつけだし、治療法開発の足がかりを作る。(2) MECP2下流遺伝子IGFBP3の発症病態の解明: *Mecp2*欠損マウスとIGFBP-TGの二重改変マウスでは、*Mecp2*欠損マウスと比較して、体重に有意差はないが脳重量は有意に低く、神経細胞の先端樹状突起の分岐数やfilopodia-type spine数に有意差がないが、mushroom-type数は有意に減少していた。また、神経樹状突起上に存在するdendritic spineの観察から、二重改変マウスの成熟型mushroom-type spineが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。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。さらに、*Igf1bp3*欠損マウスと*Mecp2*欠損マウスとの二重改変マウスを作成し、その解析を進める。(3) MECP2が関与する神経系と心臓の病態解明: 今回の研究から、MECP2の心筋分化の関与が示唆された。また、*Mecp2*欠損マウスでも、レット症候群と同様にQT延長や不整脈を呈することが示された。これに、心機能や構造に関わる遺伝子発現の障害が影響しているものと考えられた。*Mecp2*欠損マウスのES細胞は、レット症候群の不整脈の発症病態機序の解明に有用であると考えられた。(4) 呼吸障害の分子機序の解明: ① *Mecp2*欠損マウスの無呼吸頻度が明初期に上昇することは、光刺激が自律神経系に影響して呼吸リズムを不安定化させている可能性が考えられ、脳内の時計中枢との関連性を含めて今後検討する必要がある。② *Mecp2*欠損マウスの組織学的解析から、レット症候群患者の無呼吸発作に延髄呼吸中枢のセロトニン、ノルアドレナリン神経伝達異常が関与することを示唆する。③野生型マウスでも、生母の変異アレルの有無の違いにより無呼吸頻度の上昇が起こることは、ヘテロ接合母体の子宮内環境や母性行動が野生型母体と異なり、それにより仔の呼吸中枢の発達が遅延したものと考えられる。*Gad1*近位プロモーター領域のCpGメチル化との関連性も含めた今後の検討が必要である。④ *Mecp2*欠損マウスは野生型母から生まれた野生型マウスに比し*Gad1*mRNA発現量の低下があり、*Gad1*プロモーターのCpGメチル化レベルが上昇していたことは、*Mecp2*欠損マウスの無呼吸頻度上昇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*の量的低下、GABA合成の減少が関与しているものと考えられた。また、バルプロ酸投与による*Mecp2*欠損マウスの無呼吸減少と延髄腹側呼吸核群の*Gad1* mRNA発現量増加は、無呼吸とGABA合成との関連性を強く示唆する。*Mecp2*欠損マウスのバルプロ酸投与により、延髄腹側呼吸核群神経細胞のヒストンH3K9とH4K5のアセチル化レベルの上昇と*Gad1* mRNA発現量増加、無呼吸頻度の減少したことは、バルプロ酸がヒストン修飾を変化させたことによる治療効果と考えられた。(5) *CDKL5*遺伝子異常の病態解析: 今回明らかとなった*CDKL5*と相互作用するタンパクは複数のシナプス関連蛋白を含み、*CDKL5*との相互作用がシナプス機能調節に関わるものと考えられた。また、*Cdk15*欠損マウスの神経

細胞樹状突起では、未熟なスパインが有意に増加し、興奮性アミノ酸に対する過剰興奮と興奮性神経細胞のNMDA型グルタミン酸受容体タンパク異常、電気生理学的異常などから、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治療効果は、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。(6) ヒト染色体15q11-q13領域のエピゲノム機構の病態解明: ①15q11-q13領域はゲノム刷り込みにより、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欠失父方染色体では、特異的なクロマチン脱凝集の形成・維持に父性発現の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、メチル化CpGを認識する分子が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。また、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ことは、15q11-q13領域の遺伝子発現制御機構の解明に重要な手掛かりを与える。これらの分子機構の解明は、レット症候群の治療標的分子の同定へ発展させることが期待できる。②近年、MECP2がmicroRNA発現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の新たな機能として注目を浴びているだけでなく、自閉症発症機序との関連性も指摘されている。この新たな遺伝子発現制御機構の解明が、今後の発達障害の基礎的研究に発展していくものと考えられる。

本研究の成果は、今後のレット症候群の臨床および研究に広く利用、展開されることが期待できる。

## 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。レット症候群の改正診断基準は、*MECP2*変異を有する比較的均質な患者集団を同定することが可能であり、治療法研究の患者対象の選択基準として適切である。非典型的レット症候群の病因遺伝子として同定された*CDKL5*と*FOXG1*の変異による神経症候は、*MECP2*変異とは異なる病態によるものと考えべきである。また、レット症候群の改正診断基準を満たしても*MECP2*遺伝子異常がなければ、他の遺伝子検査を考慮する必要がある。

レット症候群の患者データベースを構築し、運用を進めている。あわせて、遺伝子診断などの診療支援を行っている。今後、講演会や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。

基礎研究では、(1)軽症化因子の探求: 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みつけだす。(2) MECP2下流遺伝子IGFBP3の発症病態の解明:hIGFBP3過剰発現*Mecp2*欠損マウスは、脳重量減少と成熟dendritic spineの減少があり、レット症候群患者の神経機能障害と関連し、レット症候群の発症病態の一部がIGFBP3によるものであり、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。(3) MECP2が関与する神経系と心臓の病態解明:①*Mecp2*欠損マウスES細胞は心筋細胞に分化し、心筋分化マーカー発現が高かった。②*Mecp2*欠損マウスでは心機能に異常はないが、QT延長等の不整脈を認めた。③*Mecp2*欠損マウスの心臓は、心臓の構造や機能に関連する遺伝子発現変化があった。(4) 呼吸障害の分子機序の解明:本研究結果から、レット症候群患者の呼吸運動障害に対して延髄のセロトニンやノルアドレナリン神経伝達を改善させる薬物、バルプロ酸等の延髄のGABA神経伝達を改善する薬物の治療的効果が期待できる。(5) *CDKL5*遺伝子異常の病態解析:新規*CDKL5*相互作用タンパクを複数同定した。また、*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の形態と密度、グルタミン酸受容体の機能異常が同定された。さらに、グルタミン酸受容体阻害薬による誘発性けいれんの回復は、非典型レット症候群の病態機序がシナプスグルタミン酸受容体機能異常によることを明らかにし、その治療法開発の基盤ができた。(6) ヒト染色体15q11-q13領域のエピゲノム機構の病態解明:①MECP2等のメチル化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明らかにした。この分子機序の解明はレット症候群だけでなく、自閉症など発症病態の解明につながるものと考えられた。②MECP2をはじめとするメチル化CpG結合ドメインを有する分子機構の一部を解明した。今後、これらの分子の脳内機能を解明し、レット症候群の病態を明らかにする。

本研究の成果は、今後のレット症候群の臨床および研究に広く利用、展開されることが期待できる。

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. Kumakura A, Takahashi S, Okajima K, Hata D: A haploinsufficiency of FOXG1 identified in a boy with congenital variant of Rett syndrome. *Brain Dev* 2014;36:725-729.
5. 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;36:794-800.
6. Ohba C, Nabatame S, Iijima Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Tanaka F, Ozono K, Saito H, Matsumoto N. De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain. *J Hum Genet* 2014;59:292-295.
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* 2014;36:794-800.
8. 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* 2014;36:35-44.
9. 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* 2014;36:241-247.
10. 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 Psychol Social Med* 2014;8:9.
11. 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.

12. Aono Y, Taguchi H, Saigusa T, Uchida T, Takada K, Takiguchi H, Shirakawa T, Shimizu N, Koshikawa N, Cools AR. Simultaneous activation of the  $\alpha 1A$ -,  $\alpha 1B$ - and  $\alpha 1D$ -adrenoceptor subtypes in the nucleus accumbens reduces accumbal dopamine efflux in freely moving rats. *Behav Pharmacol* 2015;26:73-80.
13. 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;34:11534-11548.
14. 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* 2014, Oct *in press* doi: 10.1002/cne.23692.
15. Horie N, Nasu D, Endo M, Uchida A, Kaneko T, Shirakawa T, Shimoyama T. Oral opportunistic infections in institutionalized patients with motor and intellectual disabilities. *J Oral Sci* 2014;56:85-89.
16. Meguro-Horike M, Horike S. MMCT-Mediated Chromosome engineering technique applicable to functional analysis of lncRNA and nuclear dynamics. *Methods Mol Biol* 2015;1262:277-289.
17. 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*. 2014;46:47-50.
18. 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).
19. 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
20. Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The Kick-In System: A Novel Rapid Knock-In Strategy. *PLoS ONE* 2013;9(2): e88549.
21. 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;8(6):e66729.
22. 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;36:565-573.
23. Honda MJ, Watanabe E, Mikami Y, Saito Y, Toriumi T, Shirakawa T, Shimizu N, Watanabe N, Isokawa K. Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2013;28:e451-e460.
24. 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.
25. 松石豊次郎: レット症候群研究の現況と展望. *日本臨床* 2013.11; 71(11): 2043-53
26. 松石豊次郎: Rett症候群. 稀少難治てんかん診療マニュアル 疾患の特徴と診断のポイント. 総編集 大槻泰介、須貝研司、小国弘量、井上有史、永井利三郎. 東京: 診断と治療社 2013: 84-7
27. 田中輝幸, 奥田耕助. 小児の難治性てんかんと CDKL5. *Clin Neurosci* 2013;31:699-702.
28. Sakakibara T, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012;71:741-749.
29. Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2\_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012;287:13859-13867.
30. Suzuki Y, Ichinomiya S, Kurosawa M, Matsuda J, Ogawa S, Iida M, Kubo T, Tabe M, Itoh M, Higaki K, Nanba E, Ohno K. Therapeutic Chaperone Effect of N-Octyl 4-Epi-b-Valienamine on Murine GM1-Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012;106:92-98.
31. Arai A, Saito T, Hanai S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res* 2012;1470:89-97.
32. Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Yuko Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: Consideration of

- epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci* 2012; 323: 128-133.
33. Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi A, Kaneko Y, Sakakibara T, Saito Y, Takahashi H, Honda R, Nakagawa E, Sasaki M, Kakita A, Itoh M. Novel pathological abnormalities of deep brain structures including dysplastic neurons in anterior striatum associated with focal cortical dysplasia in epilepsy. *J Neurosurg Pediatr* 2012;10:217-225.
  34. 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;413:1301-1304.
  35. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, Tanaka E, Matsuishi T. Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35354
  36. 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.
  37. 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.
  38. 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
  39. 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;413:1301-1304.
  40. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, Tanaka E, Matsuishi T. Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE* 2012;7(4):e35354.
  41. Kikuri T, Yoshimura Y, Tabata F, Hasegawa T, Nishihira J, Shirakawa T. Stage-dependent suppression of the formation of dentin-resorbing multinuclear cells with migration inhibitory factor in vitro. *Exp Ther Med* 2012;3:37-43.
  42. 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, 2012.
  43. Sato K, Shirakawa T, Sakata H, Asanuma S. Effectiveness of the analysis of craniofacial morphology and pharyngeal airway morphology in the treatment of children with obstructive sleep apnoea syndrome. *Dentomaxillofac Radiol* 2012;41:411-416.
  44. Nagai M, Meguro-Horike M, Horike S. Epigenetic defects related to assisted reproductive technologies: Large offspring syndrome (LOS). *DNA Methylation—from Genomics to Technology*, 2012:167-182.
  45. 伊藤雅之. てんかんの病理. 最新医学別冊. 新しい診断と治療のABC 74. てんかん. 最新医学社. 大阪. 72-82pp, 2012.
2. 学会発表
    1. Itoh M, Kurimasa A. MeCP2\_e2 is required for placenta development. The FEBS-EMBO 2014 Conference. Paris, France, 30 August - 4 September, 2014.
    2. 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)
    3. Yamashita Y, Fujita F, Tada Y, Anai C, Mukasa A, Egami C, Okamura H, Yage K, Ohya T, Iemura A, Nagamitsu S, Matsuishi T: Quality of life reported by children with ADHD and their mothers who participated in a summer treatment program. The 2nd Asian Congress on ADHD, 2014. 3 (Tokyo)
    4. Yamashita Y, Fujita F, Tada Y, Anai C, Mukasa A, Egami C, Okamura H, Yage K, Ohya T, Iemura A, Nagamitsu S, Matsuishi T: Quality of life (QOL) reported by children with ADHD and their mothers participated in summer treatment program. PAS/ASPR Joint Meeting, 2014. 5 (Vancouver)
    5. 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 (Chantilly, Washington, USA)
    6. Horike S, 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
7. 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
  8. 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
  9. 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)
  10. 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)
  11. 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)
  12. 奥田耕助, 田中輝幸「難治性てんかんと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).
  13. 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).
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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, ホテル木曾路, 南木曾, 2014年9月4~5日
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. Itoh M. Disrupted migration of GABAergic interneurons lead to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. The 21st World Congress of Neurology. Vienna, Austria, 21-26, September, 2013.
  23. 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, November 2013, San Diego.
  24. 伊藤雅之. 自閉症の神経科学研究: レット症候群の治療に向けた生物学的研究. 第55回日本小児神経学会学術集会. 大分. 平成25年5月31日, 2013.
  25. 高橋 悟. レット症候群の病態理解: 病因遺伝子 (*MECP2*, *CDKL5*, *FOXP1*) 変異に関連した臨床的特徴. 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. 平成25年6月1日 (大分市)
  26. 松石豊次郎: 「発達障害児の早期発見、対応」—脳科学、睡眠からのアプローチ. 第23回日本外来小児科学会 2013. 9. 1 (福岡)
  27. 松石豊次郎: 脳科学、睡眠からみた発達障害児の早期発見、対応. 第1回日本発達神経学学会 2013. 9. 9 (兵庫)
  28. 平田留美子, 西芳寛, 御船弘治, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 田中永一郎, 原宗嗣, 山下裕史朗, 松石豊次郎: 生後発達に伴うマウス脳内でのグレリン含量の変動に関する検討. 第116回日本小児科学会総会 2013. 4. 21 (広島)

29. 田中輝幸「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)
30. 田中輝幸「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)
31. 田中輝幸「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)
32. 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
33. 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
34. 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
35. 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, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK 2013 年 11 月 7~10 日
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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
44. 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. 21<sup>st</sup> Congress of the International Association for Disability and Oral Health, 28-31, October 2012, Melbourne.
45. 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. Congress of the International Association for Disability and Oral Health, 28-31, October 2012, Melbourne.
46. 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)
47. Okabe Y, Takahashi T, Tanaka E, Matsuishi T. Neural development of MeCP2 null embryonic stem cells RETT syndrome Symposium in Fukuoka. 2012 年 4 月 22 日 福岡
48. Horike S. et al. A noncoding imprinted RNA, MESTIT1 is essential for the repression in cis of KLF14. 62th Annual Meeting; The American Society of Human Genetics, Nov. 6-10, 2012, San

Francisco, USA

49. 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.
50. 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
51. 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
52. 伊藤雅之. 本邦におけるレット症候群研究の現状と課題. 2012レット症候群シンポジウムIN大阪. 大阪, 平成24年12月16日.
53. 熊倉啓、中田昌利、内尾寛子、高橋悟、秦大資. FOXG1遺伝子異常を認めた congenital Rett症候群の一児例. 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.
54. 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
55. 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
56. 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
57. 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
58. 熊倉 啓、中田昌利、内尾寛子、高橋 悟、秦 大資. FOXG1遺伝子異常を認めた congenital Rett症候群の一男児例. 日本小児神経学会近畿地方会第 5 2 回例会. 平成24年10月20日 (大阪市)
59. 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. 6. 2)
60. 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 (福岡) (2012. 4. 22)
61. 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」都医学研セミナー (東京) (2012. 3. 12)
62. 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
63. 堀家慎一他. 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
64. 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
65. 堀家慎一他. 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

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1. 特願2012-117128 発明者；発明者；小賤健一郎、三井薫、高橋知之 発明の名称：ヒトES/iPS細胞における遺伝子発現方法 出願日：2012年5月23日

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。



## 資料1 レット症候群診断基準改訂版（2010年版）<sup>訳注1</sup>

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

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

### 典型的レット症候群の診断要件

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

### 非典型的レット症候群の診断要件

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

### 主要診断基準

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

### 典型的レット症候群診断のための除外基準

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

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

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

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

#### 脚注

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

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

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

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

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

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

資料2 レット症候群患者データベースのための登録票

2013年3月4日

レット症候群データベース 患者登録用紙		※登録番号	
□には、当てはまるところに☑のようにチェックを入れてください		(注) 患者記入欄(医師代筆可) 患者または医師が記入する欄 医師が記入する欄	
<b>記入日</b> 西暦( )年( )月( )日 <b>患者情報</b> ふりがな ( ) 漢字名 ( ) 既登録番号 ( ) 生年月日 西暦( )年( )月( )日 年齢 ( )歳( )か月 性別 女・男 <b>自宅情報</b> 郵便番号 〒 - 住所 電話番号 ( ) - <b>病院情報</b> 病院名 ( ) 主治医 ( ) 電話番号 ( ) - カルテ番号(患者番号) ( )		<b>その他の症状(2) (調査票記入時点の状態を記載)</b> 5. 行動の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック・複数回答可) ・常同運動 □無 □有 □不明 □口 □舌 □上肢 □下肢 □その他( ) ・場に合わない笑い □無 □有 □不明 ・場に合わない叫び □無 □有 □不明 ・視点が合わない □無 □有 □不明 ・痛み刺激に反応低下 □無 □有 □不明 6. 筋緊張・運動の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・筋緊張低下 □無 □有 (□全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張亢進 □無 □有 (□全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張低下から亢進に変化 □無 □有 ・覚醒時の歯ざしり □無 □有 □不明 ・不随意運動 □無 □有 □不明 「有」の場合 □ジストニア □ジスキネジア □ミオクローヌス (複数回答可) □寡動 □振戦 □分類不能 7. 自律神経の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・末梢血管反射異常 <sup>※8</sup> □無 □有 □不明 ・冷たい手・足 □無 □有 □不明 ・覚醒時の呼吸異常 □無 □有 □不明 「有」の場合 □過呼吸 □息止め □呑気 □急激な吐息・唾飛ばし ・心電図異常 □無 □有 □不明 □QT延長 □その他の異常( ) ・睡眠パターンの異常 □無 □有 □不明 □乳児期に日中の睡眠時間が長く、手がかからない 8. 消化管症状・機能 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・流涎 □無 □有 ・咀嚼障害 □無 □有 (□嚙まない □丸のみ □他) ・嚥下障害 □無 □有 (□溜め込み飲まない □誤嚥 □他) ・1回の平均食事時間 □30分以内 □30-60分 □60分以上 ・摂食拒否 □無 □有 ・便秘 □無 □有 9. 整形外科的問題 ・整形外科診療歴 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □定期受診や健診として受診している □不調時のみ受診 □その他 ・股関節 手術 □無 □有 ( )歳( )か月時 右 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 左 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 ・足関節 手術 □無 □有 ( )歳( )か月時 右 □正常 □尖足 □内反 □外反 □凹足 □不明 左 □正常 □尖足 □内反 □外反 □凹足 □不明 ・脊椎異常 □無 □有 □不明 (有の場合、下記の各項目にチェック) □側弯 □後弯 □前弯 ( )歳( )か月から 10. 歯科的問題 ・歯科診療歴 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □定期受診や健診として受診している □不調時のみ受診 □その他 ・歯科的症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) □歯列不正 □咬合異常 □歯の摩耗 11. その他症状	
<b>在胎出生歴</b> 妊娠中の異常 □無 □有 出産時の異常 □無 □有( ) 在胎期間 ( )週( )日、□不明 出生時の 体重( )g 頭囲( )cm 身長( )cm 胸囲( )cm <b>発達歴 (現在の状態ではなく獲得した時期を記載)</b> 首がすわる ( )か月 寝返り ( )か月 自分で起き上がり座る ( )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 <b>最初に気づいた症状と年齢 (複数回答可)</b> □寝てばかりいる □哺乳力が弱い □体が柔らかい □視線が合いにくい □目つきが気になる □泣き止まない □健診で異常を指摘された □その他 ( ) その年齢 ( )歳( )か月		<b>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)</b> 1. 退行 <sup>※1</sup> □無 □有 ( )歳( )か月から 退行後の安定期または改善期 ( )歳( )か月から □安定期有 □改善期有 □安定期・改善期が無いまたは現在も退行中 2. 手の目的運動の退行 <sup>※2</sup> □無 □有 □機能獲得なし ・上肢の機能 <sup>※3</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高のレベル( ) 3. 手の常同運動 □無 □有 ( )歳( )か月から □手のねじれ・絞り □手叩き・指打ち □手洗い・手こすり □手を口につける・入れる □その他( ) (複数回答可) 4. 言語・音声コミュニケーションの退行 <sup>※4</sup> □無 □有 □機能獲得なし ・言語機能・コミュニケーションのレベル ことばや音声の表出 <sup>※5</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高レベル( ) 意思の表出 <sup>※6</sup> 現在のレベル( ) 過去の最高レベル( ) 5. 四つ這い・歩行の異常 □無 □有(有の場合、下記の全項目にチェック) 四つ這いが □問題なし □パターンの異常 □不能 独歩が □問題なし □パターンの異常 □不能 ・移動・運動の機能 <sup>※7</sup> 現在の主な移動方法( ) 過去の最高レベル( )	
<b>その他の症状(1) (調査票記入時点の状態を記載)</b> 1. 身体計測値 身長( )cm 体重( )kg 頭囲( )cm 2. 身体的症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・小頭症 □無 □有 □不明 ・頭囲の拡大速度の鈍化 □無 □有 □不明 ・成長障害・低身長 □無 □有 □不明 ・小さい手・足 □無 □有 □不明 ・初潮 □無 □有 ( )歳( )か月から 3. 発達・知能指数 □<20 □21-35 □36-50 □51-69 □70-84 □≥85 測定方法 □臨床観察 □遠城寺 □津守・稲毛 □その他( ) 4. 精神発達の症状 □無 □有(有の場合、下記の各項目にチェック) ・自閉性 □無 □有 □不明 ・てんかん □無 □有 □不明 ・脳波異常 □無 □有 □不明 □背景活動の徐波化 □てんかん性異常波 □紡錘波消失		<b>除外診断項目</b> 代謝性疾患・神経変性疾患 □無 □有 周生期・後天性の脳障害 □無 □有 <b>遺伝子検査</b> □施行済み □実施予定 □未施行 実施(予定)施設 ( ) MECP2遺伝子検査 □済 □未 □不明 検査法 □直接シーケンス法 □MLPA法 □その他( ) MECP2の異常 □無 □有 異常の結果 <sup>※9</sup> ( ) 他の遺伝子検査 □未検査 □CDKL5 □FOXG1 □その他( ) MECP2以外の遺伝子の異常 □無 □有 異常の結果( )	
<b>医師署名 (自署)</b> このデータは原情報に忠実に記入され、医師の確認のもとに作成されたことを証明します 西暦( )年( )月( )日 (氏名)		施設名: 送付元連絡先: 〒 - (電話): (メールアドレス):	

未記入の箇所、不明な点の一つでもある場合は、こちらからお電話などにてご確認させていただくことがあります。

送付先: 〒830-0011 福岡県久留米市旭町67  
久留米大学バイオ統計センター  
角辰之

