

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	-----	3
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) レット症候群患者データベースのための登録票		
II . 分担研究報告	-----	11
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	-----	13
2 . MECP2遺伝子変異の生物学的解析		
伊藤 雅之	-----	15
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	-----	17
4 . 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		
白川 哲夫	-----	21
5 . レット症候群の臨床遺伝学的研究		
高橋 悟	-----	23
6 . レット症候群モデルマウスにおけるIGFBP3発現量の影響		
青天目 信	-----	25
7 . メチル化CpG結合タンパク 5 (MBD5)の機能解析		
堀家 慎一	-----	27
8 . 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		
田中 輝幸	-----	29
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	31
IV . 研究成果の刊行物・別刷	-----	33

# 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、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(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。

DBの構築は臨床医、臨床遺伝医、基礎研究者、患者代表者などによる研究チームを組織し、患者登録制によるDBシステムを作った。また、これまでの見直しにより新たに診断基準を作成した。

臨床研究では、グレリンの生物学的意義を検証し、有効性が示唆された。また、CDKL5とFOXG1の臨床遺伝学的意義を評価し、診断基準への適合を検討し、臨床病型と遺伝子異常との異同を明らかにした。

基礎研究では、MECP2のメチル化DNA結合領域(MBD)の点変異の研究より、臨床症状の軽症化に関与する候補分子の同定を行なった。マウス骨髄移植の技術的確立とMecp2欠損アストロサイトの生物学的意義を解明した。また、Mecp2欠損マウスの呼吸生理の病態を調べ、治療法開発の足がかり的研究を行った。IGFBP3の過剰発現が脳にもたらす影響を調べ、シナプスの安定化に関与していることを明らかにした。さらに、15q11-13領域のMECP2を介する遺伝子発現制御機構を解明し、非典型(早期発症てんかん)RTTの原因遺伝子であるCDKL5の発症機序を明らかにした。

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

研究協力者

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  
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  
西 芳寛 久留米大学医学部 講師  
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、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。

DBの構築は臨床医、臨床遺伝医、基礎研究者、患者代表者などによる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、患者登録制によるDBシステムを作った。これにより、臨床研究の基盤を作り上げる。

臨床研究では、生物学的マーカーとしてのグレリン(GRL)の意義を検証した。さらに、2010年の国際的診断基準改訂をもとに、CDKL5とFOXG1の臨床遺伝学的意義を評価し、我々の診断基準への適合を検討する。基礎研究では、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を解明する。骨髄移植および幹細胞移植療法をめざし、ES細胞とiPS細胞の樹立と臨床応用を展開する。また、RTTの呼吸生理に関する病態を調べた。IGFBP3の症状形成の分子病態の解析を行い、治療法開発のための基盤研究を進める。さらに、RTTおよびMECP2に関与する病態として、15q11-13領域のMECP2を介する遺伝子発現制御機構を解明し、非典型(早期発症てんかん)RTTの原因遺伝子であるCDKL5の発症機序を明らかにする。

B. 研究方法

(1) 患者データベース：DB研究チームにより患者DBのあり方を検討した。これに基づき、これまでの疫学研究を参考に患者登録票を作成した(資料1)。あわせて、患者登録票記入のための手引きを作成した。また、これまでの診断基準を見直し、国際的な基準をも

とに診断基準を作成した。

(2) 臨床研究： 生物マーカーとしての GRL を検証した。レット症候群女兒 (RTT 症例) および年齢・性別等を一致させた疾患コントロール (てんかん/精神発育遅滞症例 (EP/MR 症例)) の空腹時 GRL、GH、IGF-1 の血中濃度を測定し、身体パラメーター (身長、体重、頭周囲長、BMI) との相関について比較検討した。 *CDKL5* と *FOXG1* の臨床遺伝学的意義を調べるために、非典型的レット症候群を疑われ、*MECP2* 遺伝子異常のない患者を対象とし、*CDKL5* あるいは *FOXG1* 遺伝子の塩基配列決定法を行なった。必要に応じて multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法あるいは定量的 PCR (qRT-PCR) を行なった。

(3) 基礎研究： *MECP2* の MBD の変異発現ベクターを作成し、マウス線維芽細胞に導入し、ヘテロクロマチンの集積性とその構造の影響と重症度との関連性を検討し、網羅的発現解析を行なった。 骨髄移植の解析では、放射線照射後マウスに GFP 発現骨髄細胞を移植した。また、*Mecp2* 欠損マウスからアストロサイト初代培養を行ない、細胞傷害に対する細胞生存率を WST-8 assay で評価し、グルタミン酸 (Glu) 代謝能を 1mM Glu を添加後経時的に培養上清中の Glu 濃度を測定して評価した。 RTT の呼吸病態解析では、全身型プレチスモグラフを用いて呼吸波形を 1 時間 (2-3 週齢) と 24 時間 (7 週齢) 連続で記録し、1 秒以上の無呼吸の回数を調べ、病理学的解析を行なった。病理学的解析では、8 週齢脳組織の小胞膜モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) の免疫組織化学を行い、自律神経中枢の dorsal motor nucleus of the vagus (DMV) と呼吸リズム形成を担っている nucleus of the solitary tract (NST) および ventral respiratory group (VRG) の VMAT2 陽性 puncta 数を明視野画像処理ソフトウェア (ImagePro7.0) を用いて解析した。また、ミルナシبران (セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬) の内服効果を調べた。 IGFBP3 の RTT の病態への影響を調べるために、*hIGFBP3* 過剰発現マウスを作成し *Mecp2* 欠損マウスと交配し、二重変異 (*hIGFBP3*<sup>+/+</sup>/*Mecp2*<sup>-/-</sup>) マウスを作成した。このマウスの生後 42 日の体重と脳重量、体性感覚野の皮質厚、Golgi 染色による体性感覚野第 V 層の先端樹状突起の基部から 100 $\mu$ m の分岐数、樹状突起上のシナプスボタンの形態 (filopodia spine, mushroom spine) の数を比較した。 15q11-13 領域のインプリンティングセンター (PWS-IC) の機能を調べるために、特定性由来ヒト 15 番染色体を 1 本保持したマウス F12 細胞 (神経様細胞株) の PWS-IC 欠失改変ヒト 15 番染色体を構築し、qRT-PCR、DNA メチル化解析、DNA-FISH 法、ChIP 法で 15q11-q13 領域のクロマチン動態と遺伝子発現を解析した。*Cdk15* 欠損マウスの表現型解析 (形態学的解析、電気生理学的解析、行動解析) を行なった。また、CDKL リン酸化基質スクリーニングを baculovirus 発現系

を用いて行なった。

(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済み、あるいは承認申請中である。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

(1) 患者データベース: DBシステムを作った。これに基づき、患者団体および研究班のホームページに登録票と手引き (資料 1) を案内した。また、診断基準を作成した。

(2) 臨床研究: GRL の検証では、RTT 症例の体重と血中 GRL 濃度で負の相関が認められた。しかし、RTT 症例の身長、BMI と GRL 濃度の間には有意な相関は認められなかった。RTT 症例、EP/MR 症例ともに、その頭周囲径は GRL 濃度と正相関を、血中 IGF-1 濃度とは負相関を示した。前思春期では、RTT 症例の活性型 GRL の比率が EP/MR 症例の比率より高かった ( $p < 0.05$ )。非典型的 RTT の診断基準に合致したのは、*CDKL5* 遺伝子異常 1 例 (1/2)、*FOXG1* 遺伝子異常 1 例 (1/3) であった。診断基準に合致しなかったのは、重度の精神運動発達遅滞のために“退行”が困難な症例であった。

(3) 基礎研究: *MECP2* の MBD 領域の変異によるヘテロクロマチンの集積性と症状の重症度との間に関連性を見出し、発現解析の結果、変異に特異的な異常発現分子を 2 つ同定した。放射線照射後マウスに GFP 発現骨髄細胞を移植し、生着した。また、アストロサイトの初代培養では野生型に比し GFAP と S100 の発現が 2-3 倍していた。Glu 代謝能解析では、*Mecp2* 欠損は細胞増殖や生存率に影響をしなかったが、Glu トランスポーター (EAATs) と合成酵素 (GS) の発現を調べた結果、これらの遺伝子発現に異常が認められた。RTT の呼吸病態解析では、生後 2-3 週齢の *Mecp2* 欠損マウスは野生型に比し無呼吸回数が増加し、生後 7 週では暗期に比べ明期で無呼吸回数の有意な増加がみられた。病理学的には、DMV と NST、VRG は野生型に比べ VMAT2 陽性 puncta 数の著しい減少がみられた。また、生母の遺伝子型の影響を調べた結果、生後 2 週から 7 週まではヘテロ接合雌由来野生型の無呼吸回数は野生型雌由来野生型の無呼吸回数に比べ有意に多かった。さらに、ミルナシبرانの長期経口投与で、無呼吸回数の有意な減少がみられた (*Mecp2* 欠損マウスの寿命は約 20% 延長した)。*hIGFBP3*<sup>+/+</sup>/*Mecp2*<sup>-/-</sup> マウスの体重は  $11.95 \pm 15.39$  g で *Mecp2* 欠損マウスと差がなかった ( $p > 0.05$ )。また、脳重量は  $0.28 \pm 0.00$  g ( $p < 0.05$ )、大脳皮質厚は  $940.83 \pm 1782.73$   $\mu$ m ( $p > 0.05$ )、分岐数は  $6.05 \pm 0.66$  本 ( $p > 0.05$ )、filopodia spine は  $79.4 \pm 301.72$  本 ( $p > 0.05$ )、mushroom spine は  $3.13 \pm 0.59$  本 ( $p < 0.05$ ) であった。ヒト染色体工学技術を用いて PWS-IC 欠失改変母方 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。PWS-IC欠失染色体で、15q11-13領域の解析で父方特異的なMAGEL2遺伝子の発現低下が認められた。また、DNA-FISH法により、父方アレ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クロマチン脱凝集が起こっていた。

*Cdk15*欠損マウスは海馬神経細胞樹状突起の長さ、分枝、樹状突起スパイン形態・密度に異常が認められた。また、過剰な抜けいれん性がみられ、海馬の長期増強 (LTP) の異常等を同定した。行動解析では、不安様行動とうつ様行動の亢進等の情動異常、記憶障害、社会性の異常、日内行動の異常等を同定した。生化学的手法を用いたKOマウスの興奮性シナプス解析により、グルタミン酸受容体サブユニットの異常を同定した。さらに、CDKL5リン酸化基質スクリーニングから複数の結合蛋白質候補を得た。

#### D. 考察

(1) 患者データベース：疾患DBは、その疾患の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る。今回作成したDBは、患者（およびその家族）主導による患者登録制はこれまでに数少ない。患者（およびその家族）が積極的に関わることで、研究への理解と課題の共有化が期待できる。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。今後の課題として、登録患者数をいかに増やすかが重要である。

(2) 臨床研究： 前思春期における活性型GRL比率がRTTの身体発育（低身長・小頭症）の生物マーカーとなる可能性が推定された。今後さらに症例数を増やした検討が必要である。非典型RTTはRTTの診断基準の全てを満たさないが、類似した症状を示すものと理解される。典型的RTTでは3歳以前にてんかんを発症することはまれであるが、*CDKL5*遺伝子異常の患者は乳児期早期から難治性てんかんを発症し、それ以外の症状は多彩である。その要因として、*CDKL5*遺伝子発現のX染色体不活化パターンの影響が考えられる。非典型RTTの診断基準に合致しなかったのは、運動機能・言語機能の発達障害が重度であった症例である。*FOXP1*遺伝子異常の症例の特徴は乳児期早期からの精神運動発達遅滞と小頭症である。*FOXP1*遺伝子は14番染色体（14q12）上にあり、患者間の臨床症状の重症度は比較的均一である。乳児期から重度の精神運動発達遅滞を呈するために、退行があると判断することが難しい症例が多い。今後、患者DBにより、これらの疾患の臨床症状の特徴が明らかになり、典型的RTTとの違いが明確になることが期待される。

(3) 基礎研究： MBDの点変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、MECP2の標的遺伝子の動態に影響を及ぼしていることが想定される。さらに解析を進め、軽症化に特有の遺伝子発現を見つけ出すことが期待

できる。骨髄の移植細胞のキメラ化が確認された。今後、生存個体の各種臓器への移植細胞生着状況を調べる。GRL併用による移植細胞の生着率も解析し、*Mecp2*欠損マウスの効率的な骨髄移植手技を確立する。*Mecp2*がアストロサイトに発現し、細胞の生存率に影響しないが、アストロサイトの特異的遺伝子発現に参与している。また、Glu代謝の関与が示唆された。

*Mecp2*欠損マウスの無呼吸回数が明期に多いことは、明期の光刺激が自律神経系に影響し、呼吸を不安定化させている可能性が考えられ、今後検討が必要である。延髄呼吸関連中枢のモノアミン作動性シナプスの減少とミルナシブランの無呼吸回数の改善は、RTTにみられる無呼吸発作にセロトニンあるいはノルアドレナリン神経伝達の低下が関与するという仮説を支持する。今後、他の神経伝達物質の関与についても検討する必要がある。また、生母マウスの遺伝子型の違いが無呼吸回数に影響していたことはヘテロ接合母マウスの何らかの病的因子が仔の呼吸中枢の発達を遅延させていることを示唆している。今後、分子遺伝学的解析が必要である。*hIGFBP3<sup>+</sup>/Mecp2*マウスは*Mecp2*欠損マウスに比して、体重は有意差はないが、脳重量は有意に軽かった。また、尖端樹状突起の分岐数やfilopodia spine数には差がなかったが、mushroom spine数は有意に減少していた。安定して存続する成熟型spineであるmushroom spineは、IGFBP3過剰発現により神経伝達の障害が示唆される。また、IGFBP3はIGF-1の機能発現に重要な分子であり、IGFBP3の動態を詳細に調べることで生物マーカーや治療法開発へ進展させることが可能性である。PWS-IC欠失父方染色体で父方アレ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、父方アレレル特異的なクロマチン脱凝集の形成・維持に父性発現するncRNAや*UBE3A-ATS*を必要としないことを意味している。また、PWS-IC欠失母方染色体で異所的クロマチン脱凝集が生じたことはMeCP2などのメチル化CpGを認識する分子が正常母方アレレルのコンパクトなクロマチン状態の維持に重要であることが示された。今後、15q11-13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の治療ターゲット分子の同定を試み、治療法の開発へ発展させる。

*CDKL5*遺伝子変異による発達障害の病態がシナプス機能異常であることが初めて明らかとなった。

#### E. 結論

(1) 患者データベース：RTTのDBを構築した。あわせて、診断基準の見直しを行なった。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登録数を増やす。

(2) 臨床研究： RTTの身体発育マーカーとしてGRLを含めたGH-IGF-1系のホルモン測定の部分的有効性が推定できた。*CDKL5*あるいは*FOXP1*の遺伝子異常患者の中には、重度の精神運動発達遅滞のために退行の

判断が困難であり、非典型RTTの診断基準に合致しない症例もある。

(3) 基礎研究：MECP2のMBDの点変異によるヘテロクロマチンの異常と症状の重症度との相関を明らかにした。さらに、解析を進め、治療法開発へ発展させる。骨髄キメラマウスを作出した。今後、骨髄移植技術の改良とGRL投与による補助療法の研究を進める。また、*Mecp2*欠損アストロサイトの発現異常やグルタミン酸代謝の影響は病態の一部を説明できる。今後、マウス由来iPS細胞の効率良い分化誘導系の開発を進める。

*Mecp2*欠損マウスは明期の無呼吸発生回数が増加し、ミルナシブランが改善した。このことから、自律神経系のセロトニンあるいはノルアドレナリン神経伝達を改善させることで呼吸機能を含めたRTTの症状を改善できることが示唆された。*hIGFBP3*/*Mecp2*マウスの成熟spineの減少は、RTTの神経機能障害との関係論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 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 (8): 741-749.
4. 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 (17): 13859-13867.
5. 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- $\beta$ -Valienamine on Murine  $G_{M1}$ -Gangliosidosis. *Mol Genet Metab* 2012; 106: 92-98.
6. Kaido T, Otsuki T, Saito Y, Sugai K, Takahashi

連性が考えられる。治療法開発の糸口となる可能性が示された。MeCP2による15q11-13領域の遺伝子発現制御機構の解明は、RTTの複雑な病態を明らかにする上で重要である。15q11-q13領域のクロマチン脱凝集にPWS-IC結合因子の重要性を明らかにした。この領域の分子機構の解明はRTTのみならずASやPWS、自閉症などの分子病態解明につながる。*Cdk15*欠損マウスでは、海馬神経細胞樹状突起とスパインの形態とシナプス機能の異常があり、行動解析の結果と一致していた。

F．健康危険情報なし。

G．研究発表  
1

- 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.
7. 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.
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* (in press)
9. Mizuochi T, Kimura A, Tanaka A, Muto A, Nittono H, Seki Y, Takahashi T, Kurosawa T, Kage M, Takikawa H, Matsuishi T. Characterization of urinary bile acids in a pediatric BRIC-1 patient: Effect of rifampicin treatment. *Clin Chim Acta* 2012;413(15-16):1301-1304.
10. 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
11. 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.
12. Takahashi S, Matsumoto N, Okayama A, Suzuki N, Araki A, Okajima K, Tanaka H, Miyamoto A.

FOXG1 mutations in Japanese patients with the congenital variant of Rett syndrome. *Clin Genet* 2012;82: 569-573.

13. Nagai M, Meguro-Horike M, Horike S. Epigenetic defects related to assisted reproductive technologies: Large offspring syndrome (LOS). *DNA Methylation-Genomic Technologies and Impact* 2012;167-182.

## 2.学会発表

1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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.

5. 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.

6. 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52回例会 平成24年10月20日, 大阪市.

7. 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

8. 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

9. 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

10. 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

11. 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

12. 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

13. 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.

14. 田中輝幸. 発達障害原因遺伝子 CDKL5 の多元的アプローチによる機能解析. 東京都医学研セミナー. 東京. 2012年3月12日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

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 レット症候群患者データベースのための登録票

2013年4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	
選択肢の数字は1つだけ選んで○をしてください。複数選択可能な口欄には、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			
<b>記入日</b> 西暦( )年( )月( )日		<b>その他の症状(2) (調査票記入時点の状態を記載)</b>	
<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( )ヵ月 性別 女・男		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) □口 □舌 □上肢 □下肢 □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	
<b>自宅情報</b> 郵便番号 〒 - 住所  電話番号 ( ) -		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: □全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張亢進 1 無 2 有 (部位: □全身 □上肢 □下肢 □体幹) ・筋緊張低下から亢進に変化 1 無 2 有 ・覚醒時の歯ぎしり 1 無 2 有 3 不明 ・不随意運動 1 無 2 有 3 不明 「有」の場合 { □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	
<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) ( )		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※ 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 □過呼吸 □息止め □呑気 □急激な吐息・唾飛ばし ・心電図異常 1 無 2 有 3 不明 □QT延長 □その他の異常( ) ・睡眠パターンの異常 1 無 2 有 3 不明 □乳児期に日中の睡眠時間が長く、手がかからない □その他の異常( )	
<b>在胎出生歴</b> 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 頭圍( )cm 身長( )cm 胸圍( )cm		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 (□嚙まない □丸のみ □他) ・嚥下障害 1 無 2 有 (□溜め込み飲まない □誤嚥 □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	
<b>発達歴 (現在の状態ではなく、最初に獲得した時期を記載)</b> 首がすわる ( )ヵ月 寝返り ( )ヵ月 自分で起き上がって座る ( )ヵ月 四つ這い ( )ヵ月 つまみ立ち ( )ヵ月 独歩 ( )ヵ月 あやし笑い ( )ヵ月 人見知り ( )ヵ月 単語 ( )ヵ月 二語文 ( )ヵ月		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) □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 右 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 左 □正常 □内転変形 □脱臼 □不明 手術 1 無 2 有 ( )歳( )ヵ月時 ・足関節 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 手術 1 無 2 有 ( )歳( )ヵ月時 ・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) □側弯 □後弯 □前弯 ( )歳( )ヵ月から	
<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( )ヵ月		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) □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 1 無 2 有 3 不明 (有の場合、下記の各項目にチェック) □歯列不正 □咬合異常 □歯の摩擦 □その他( )	
<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※1 1 無 2 有 ( )歳( )ヵ月から 退行後の安定期または改善期 ( )歳( )ヵ月から □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※2 1 無 2 有 3 機能獲得なし ・上肢の機能※3 現在のレベル ( ) 過去の最高レベル ( ) 3. 手の常同運動 1 無 2 有 ( )歳( )ヵ月から □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※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 ( ) 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 ( )		11. その他症状 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	
<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 頭圍( )cm 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 ・頭圍の拡大速度の鈍化 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( )ヵ月から 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 □臨床観察 □遠城寺 □津守・稲毛 □その他( ) 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 □背景活動の徐波化 □てんかん性異常波 □紡錘波消失 □その他( )		<b>遺伝子検査</b> 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 直接シーケンシング法 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 □未検査 □CDKL5 □FOXG1 □その他( ) MECP2以外の遺伝子の異常 1 無 2 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)		<b>最終診断</b> 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	
施設名: 送付元連絡先: 〒 -  (電話): (メールアドレス):			

未記入の箇所、不明な点がある場合は、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: 〒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てい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。

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(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*<sup>-/-</sup>: RTT モデル) マウス、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*<sup>fl<sup>ox</sup>/y</sup>: 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*<sup>-/-</sup>)、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*<sup>fl<sup>ox</sup>/y</sup>) 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。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な薄いものの、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 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.

## 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*<sup>-/-</sup>) 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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

生後 2, 3, 5, 7 週の *Mecp2*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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。

*Mecp2*<sup>-/-</sup> 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。

*Mecp2*<sup>-/-</sup> 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。

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

2, 3, 5, 7 週のいずれの週齢でも、*Mecp2*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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。

生後 15 日の *Mecp2*<sup>-/-</sup> 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。

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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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。

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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> を比較したところ、*Mecp2*<sup>-/-</sup> ではな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*<sup>-/-</sup> と同腹の wild については *Mecp2*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> と wild で比較した。その結果、*Mecp2*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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*<sup>-/-</sup> 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。

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

「先天型」レット症候群の病因遺伝子として同定されたFOXG1 に遺伝子異常を有した3例について、その臨床症状と遺伝子異常との関連について検討した。3例中2例は、FOXG1 の遺伝子内変異に起因し、残りの1例は14q12 に微細欠失を有する患者であった。この欠失患者には14q12 欠失症候群で報告されている特異顔貌の特徴がみられ、同定された欠失範囲には2つの遺伝子FOXG1とC14orf23 が含まれていた。一方、FOXG1 遺伝子内変異の患者の顔貌には特徴はなかった。以上の所見より、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であると考えられた。

A．研究目的

レット症候群典型例のおよそ90%の症例では、MECP2 に異常が同定される。一方、レット症候群に類似するが異なった臨床経過を示す非典型例ではMECP2 異常の検出率は低く、「早期発症てんかん型」ではCDKL5 が、「先天型」ではFOXG1 が病因遺伝子として同定されている。「先天型」では、FOXG1 を含む14q12 に欠失を有する症例とFOXG1 の遺伝子内変異に起因する症例が知られている(1,2)。本研究では、「先天型」レット症候群の病態理解を深めることを目的とし、その臨床症状と遺伝子異常との関連を検討した。

B．研究方法

「先天型」レット症候群を疑われた患者のうち、MECP2 とCDKL5 に遺伝子変異のなかった23例を対象とした。遺伝子解析は、末梢血白血球より抽出したDNAを用いて、FOXG1 遺伝子について直接塩基配列決定法にて解析した。変異が同定されなかった場合には、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)法あるいは定量的PCR法にて解析した。遺伝子欠失範囲の決定は、array-comparative genomic hybridization (CGH)法にてhigh-resolution 400 K array (Agilent Technologies Inc.)を用いて行った。遺伝子解析は、旭川医科大学の倫理委員会の承認を得て、患者あるいは保護者への十分な説明と同意が得られた場合に行われた。

C．研究結果

FOXG1 遺伝子異常は3例の患者で同定され、そのうち

2例はFOXG1 の遺伝子内変異(c.256dupC, p.Gln86ProfsX35; c.689G>A, p.Arg230His) (3)であった。残りの1例は、14q12 に0.54-Mbの欠失を有し、その欠失範囲にはFOXG1 とC14orf23 が含まれていた(4)。この欠失症例では、特異顔貌(円形顔貌、上向きの鼻孔、テント状の上口唇)がみられ、これまでに14q12 欠失症候群で報告されている特徴に一致するものであった(1,2)。しかし、FOXG1 の遺伝子内変異の症例ではこのような顔貌の特徴は見られなかった。

D．考察

「先天型」レット症候群を疑われた患者23例のうち、FOXG1 異常が同定されたのは3例のみであり、「先天型」レット症候群に類似の症候を示す病態は多様であることが示唆された。FOXG1 異常を有する症例の臨床的特徴は、乳児期早期から明らかとなる精神運動発達遅滞と小頭症である。我々が経験した14q12 欠失症候群の欠失範囲は、これまでの報告の中では最も狭く、その中には2つの遺伝子FOXG1 とC14orf23 が含まれていた。この患者でみられた特異顔貌は、14q12 欠失症候群で報告されている特徴に一致するものであった(1,2)。FOXG1 の遺伝子内変異の症例では、このような顔貌の特徴は見られなかったことより、14q12 欠失症候群でみられる顔貌の特徴はC14orf23 の欠失による影響と考えることができた。

E．結論

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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kumakura A, Takahashi S, Okajima K, Hata D:  
A haploinsufficiency of FOXP1 identified in a boy with congenital variant of Rett syndrome.  
Brain Dev 2013 (in press)
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 2014 (in press)

### 2. 学会発表

1. 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 H25.6.1 (大分市)
2. 中田昌利、熊倉啓、柴田洋史、内尾寛子、高橋 悟、秦大資. FOXP1 遺伝子異常を認めた congenital Rett 症候群の一男児例. 第116回日本小児科学会総会 H25.4.19 (広島市)

## G. 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

レット症候群モデルマウスにおける IGFBP3 発現量の影響

研究分担者 青天目 信 大阪大学大学院医学系研究科小児科学 特任助教  
研究代表者 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)のモデルマウスにおいて、RTTの原因遺伝子のMECP2の下流遺伝子であるIGFBP-3の発現量を変化させて生じる表現型を、主に神経病理学的方法を用いて解析する。近年、開発されたIGF-1治療は、モデルマウスと患者の双方で、症状を改善するが、MECP2がIGF-1を直接修飾することは証明されていない。IGFBP3はIGF-1の機能発現に重要なタンパクであり、RTTにおけるIGFBP3の役割を解明することにより、IGF-1療法のメカニズムが解明し、より有効な治療法の開発につながると期待される

A. 研究目的

レット症候群(RTT)の原因遺伝子であるMECP2は、さまざまな遺伝子のプロモーターに結合してその発現を調節する働きを担っている。我々は、そう

したMECP2の下流遺伝子として、DLX5/6とIGFBP3を発見した(Nat Genet 2005;37:31, J Neuropathol Exp Neurol 2007;66:117)。

IGFBP3は、成長ホルモン(GH)の下流に存在する

IGF-1 と結合するタンパクの中で、最も多いものである。GH は下垂体で分泌された後、肝臓で IGF-1 の産生を促し、この IGF-1 が体内の各臓器で作用を發揮する。筋や長管骨、軟骨に働いて、身体の成長を促し、神経では神経発生、髄鞘化、シナプス形成、樹状突起形成を促す。IGF-1 には、特異的な結合タンパクが存在し、血液中では IGF-1 と結合して、標的臓器まで運ぶ機能と IGF-1 の機能を制御する役割を担っている。そうした結合タンパクの中で、最も多いのが IGFBP-3 である。我々は、先述の研究で、IGFBP-3 遺伝子上流のプロモーター領域に、MECP2 が結合すること、モデルマウスとヒトの RTT 患者の双方で IGFBP3 の発現が増加していることを示した。

この研究では、RTT のモデルマウスで、Igfbp3 の発現量を変化させた時の症状・表現型を、主に神経病理学的方法を用いて解析し、RTT 症状発現における IGFBP3 の関与を同定する。

## B . 研究方法

すでに RTT のモデル動物として確立された Mecp2 ノックアウト (Mecp2-KO) マウス (Nat Genet 2001;27:322) と既報告のヒトの IGFBP3 を組み込んだ hIGFBP3 トランスジェニック (hIGFBP3-TG) マウス (Endocrinology 2001;142:1958) を掛け合わせて、Mecp2-KO と hIGFBP3 のダブルミュータントマウスを作成した。Mecp2-KO のオスのマウス (-/y の hemizygous mouse) と Mecp2-KO-hIGFBP3-TG ダブルミュータントマウスについて、生後 42 日時点での体重と脳重量、体性感覚野における皮質厚、Golgi 染色で、体性感覚野第 V 層に存在する先端樹状突起の基部から 100 $\mu$ 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により、神経伝達が安定して行われなことを示唆している可能性がある。

IGF-1 は、IGFBP3 が結合して、標的臓器に運搬されたり、左葉を修飾されたりする重要な生理活性を持つホルモンだが、近年、IGF-1 を RTT のモデルマウスに投与すると、生存期間、運動機能、呼吸数、心拍数が改善することが示された (Proc Nat Acad Soc 2009;106:2029)。また、米国とイタリアで行われている治験で IGF-1 により患者の症状が改善していることも示されている (私信)。しかし、IGF-1 が、どのようなメカニズムにより RTT のモデルマウスや患者の症状を改善しているのかは、不明である。IGFBP-3 は IGF-1 の機能発現・制御に重要な役割を果たしているホルモンであり、IGFBP-3 の動態や働きを探ることにより、IGF-1 治療のメカニズムの解明や、より効率的な治療法について理解を深められる可能性があると考えられた。

現在、Igfbp3 のノックアウトマウスと Mecp2-KO

filopodia-type spine、キノコ状の mushroom-type spine の数を比較した。

## C . 研究結果

Mecp2-KO マウスと Mecp2-KO-hIGFBP3-TG ダブルミュータントマウスの体重は、13.83  $\pm$  3.31g、11.95  $\pm$  15.39 g ( $p > 0.05$ )、脳重量は、0.37  $\pm$  0.00 g、0.28  $\pm$  0.00 g ( $p < 0.05$ )、皮質厚は 974.85  $\pm$  3225.55  $\mu$ m、940.83  $\pm$  1782.73  $\mu$ m ( $p > 0.05$ )、分岐数は 5.49  $\pm$  0.31 本、6.05  $\pm$  0.66 本 ( $p > 0.05$ )、filopodia type spine は、59.64  $\pm$  27.32 本、79.4  $\pm$  301.72 本 ( $p > 0.05$ )、mushroom-type は、6.02  $\pm$  3.38 本、3.13  $\pm$  0.59 本 ( $p < 0.05$ ) であった。

## D . 考察

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

## E . 結論

本研究では、hIGFBP-3 を過剰発現させた Mecp2-KO マウスでは、脳重量が減り、成熟した dendritic spine が減少していることが示された。この減少は、RTT の患者の神経機能障害と関連している可能性と IGF-1 療法のメカニズムを解明する糸口となる可能性が示された。

## G . 研究発表

1. 論文発表  
なし。
2. 学会発表  
なし。

## H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし。

2. 実用新案登録 なし。

3. その他 なし。

## メチル化CpG結合タンパク 5 (MBD5)の機能解析

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

近年の全ゲノム解析により、MBD5（メチル化CpG結合ドメインタンパク質5）が欠失している症例が数多く報告された。同じメチル化CpG結合ドメインをもつMeCP2は自閉症を主徴とするレット症候群の原因遺伝子であり、MBD5とMeCP2が共通の機能により脳の発達過程において何らかの重要な役割を担っていると示唆される。そこで、本研究では神経細胞におけるMBD5のターゲット遺伝子の同定並びに、その制御メカニズムを明らかにすることにより、メチル化CpG結合ドメインタンパク質を介したエピジェネティクスと発達障害との関連を解き明かす。

### A．研究目的

近年の発達障害患者の全ゲノム解析により、MBD5（メチル化CpG結合ドメインタンパク質5）が欠失あるいは重複している症例が数多く報告された。MBD5もMeCP2同様、メチル化CpG結合ドメイン（MBD）を有するタンパク質であるが、メチル化CpGへの結合能が明確に示されないため、メチル化CpGに直接結合する以外の機能を有していると推測されるが、発達障害の発症機序における役割は全く分かっていない。そこで、本研究では神経細胞におけるMBD5のターゲット遺伝子の同定並びに、その制御メカニズムを明らかにすることにより、MBD5の脳での機能を明確にすると共に、メチル化CpG結合ドメインタンパク質を介したエピジェネティクスと発達障害との関連を解き明かす。

### B．研究方法

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ジंक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する。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る。同定したMBD5のターゲット遺伝子の機能より、MBD5の機能を類推し、生化学的実験により、MBD5の機能を明らかにする。

（倫理面への配慮）

本研究では、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

神経分化におけるMBD5の役割を明らかにするため、ZFNを用いヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞株でMBD5のノックアウトを行った。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。発達障害患者においてMBD5の欠失はヘテロであることから、本樹立細胞を発達障害患者のモデル細胞として、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スクリーニングを行った。本研究はMBD5の脳での機能を明らかにすることを主目的とするため、正常SH-SY5Y細胞とMBD5<sup>+/-</sup>のSH-SY5Y細胞をPMA（Phorbol 12-Myristate 13-acetate）処理により神経細胞に分化した時に発現変化のある遺伝子（神経分化に関与する遺伝子）同士を比較し、MBD5<sup>+/-</sup>で分化誘導に際し発現に異常が生じた遺伝子をスクリーニングした。その結果、とても興味深いことにmicroRNAやsnRNAなどのnon-coding RNAの占める割合が極めて高く、MBD5がそれらnon-coding RNAの発現制御に関わっている可能性が示唆された。

### D．考察

最近、Rett症候群の原因遺伝子であり、MBD5と同様にメチル化CpG結合ドメインを有するMeCP2がmicroRNAの発現制御に関わっていること、また、選択的スプライシングの機構に関与していることなどが報告されており、メチル化CpG結合ドメインタンパク質の新たな機能として注目されている。一方、今回MBD5<sup>+/-</sup>でおおよそ2倍の発現上昇を認めたmicroRNA、MIR548A1は6p22.3に位置するが、この領域は自閉症患者で欠失が多数報告されており、自閉症発症機序を考える上でも大変興味深い。また、発現量がおおよそ半分にまで減少しているMOG遺伝子はナルコレプシーとカタレプシー家系の解析で変異が同定されている。発達障害の患者において、しばしば睡眠障害が認められることから、MBD5を介したMOG遺伝子の発現制御機構が発達障害の発症機序に関与していることが示唆される。

### E．結論

MBD5はメチル化CpG結合ドメインを有するにも関わらず、DNA結合能が明確ではないため、「メチル化CpGに結合し、遺伝子を不活性化する」とは異なる

機能を有していることが推測されている。最近, Rett 症候群の原因遺伝子であるメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質 MeCP2 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ことが報告され, メチル化 CpG 結合ドメインタンパク質の新たな機能として注目されている。MeCP2 も片アレルの変異により Rett 症候群を発症するが, 何故自閉症などの神経系にその症状が発症するのかは明らかになっていない。同じメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質である MBD5 が MeCP2 と同様, 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のか, だとすると MeCP2 との棲み分けはどのようにして行われているのか, など, 脳における MBD5 の機能を明確にすることにより, 単に MBD5 の欠失で生じる発達障害の発症メカニズムの解明だけでなく, 他のメチル化 CpG 結合ドメインタンパク質の異常に伴い生じる病態の解明にもつながると考えている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし。

### 2. 学会発表

- 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
- 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
- 堀家慎一【招待講演】「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

- 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
- 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
- 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
- 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得 なし。
- 実用新案登録 なし。
- その他 なし。

厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省障害者総合対策事業）  
研究協力者研究報告書

非典型レット症候群の原因遺伝子 *CDKL5* の遺伝子変異による病態機序の解析

研究協力者 田中輝幸 東京大学大学院医学系研究科発達医科学教室・准教授  
研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター 室長

研究要旨

非典型レット症候群の原因遺伝子 *CDKL5* の遺伝子変異による病態機序の解明を目的として、我々が独自に作製した *Cdk15* ノックアウト (KO) マウスの神経科学的表現型解析を行った。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、更にシナプス機能・蛋白質の異常を同定し、ヒトの *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唆された。

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) マウスを作製した。本研究の目的は、*Cdk15* KO マウスでのてんかん、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

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、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。

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。更に、興奮性アミノ酸に対する過剰興奮、

興奮性ニューロンの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。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唆された。

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・密度とシナプス受容体蛋白質の異常、シナプス機能異常が同定された。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

「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)

「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)

「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)

(招待講演) 「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)

G. 知的所有権の取得状況

特許取得、実用新案登録 なし



### III . 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松石豊次郎	27.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			2013	84-87
松石豊次郎	レット症候群研究の現況と展望		日本臨床			2013	2043-53

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	34	28-39	2013
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	128(2)	280-293	2014
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	552	71-75	2013

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	548	244-248	2013
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, Kubota T.	Comparison of genomic and epigenomic expression in monozygotic twins discordant for Rett syndrome.	PLoS ONE	Jun 21;8(6)	e66729	2013
Hara M,--Matsuishi T.	Relation between circulating GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett Syndrome.	Brain Dev		in press	2013
Ohya T, ... Matsuishi T	Impaired exploratory eye movements in children with Asperger ' s syndrome.	Brain Dev		in press	2013
Miyake N, , ---Matsuishi T---,Niikawa N.	MLL2 and KDM6A mutations inpatients with Kabuki syndrome.	Brain Dev	161 (9)	2234-43.	2013
田中輝幸、奥田耕助	小児の難治性てんかんと CDKL5	Clinical Neuroscience	31	699-702	2013