

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床
および生物科学の集学的研究
(H21-難治-一般-110)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成22(2010)年 3月

レット症候群の診断基準 (案)

レット症候群は 1966 年の報告以来、これまでに DSM-IV-TR や ICD-10 などいくつかの診断基準が提唱されています。これらは数年ごとに改訂され、現在も Rett Clinical Meeting/3rd RettSearch Consortium Meeting では診断基準の見直しが行なわれています。こうした経緯は診断技術の進歩のみならず、レット症候群の病型の複雑を反映していると考えられます。

2009 年、厚生労働省科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業) 「レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床および生物科学の集学的研究」班 (研究代表者 伊藤雅之) と「特定疾患の疫学に関する研究」班 (研究代表者 永井正規) との共同研究により、本邦におけるレット症候群の患者数 (1030 名 (推定値))、有病率 (女児の 0.008% (推定値)) を初めて明らかにしました。諸外国の報告から、レット症候群の有病率は種族間に違いはないと考えられていましたが、本邦の有病率は欧米諸国のそれより低いものでした。この理由には、レット症候群の診断が困難なこと、実は種族間で違いがあること、が考えられます。そこで、「レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床および生物科学の集学的研究」班では、本邦の医療・療育の現況に則した「レット症候群の診断基準 (案)」を策定しました。これをもとに臨床場面での実証を重ね、本邦の「レット症候群の診断基準」を作り、普及させ、診断の標準化をはかります。さらに、International Rett Syndrome Foundation への提言や世界標準化を目的としています。

平成 22 年 2 月

厚生労働省厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患克服研究事業)

レット症候群の診断と予防・治療法確立のための臨床および生物科学の集学的研究班

研究代表者 伊藤 雅之 (国立精神・神経センター)

疫学調査担当 野村 芳子 (瀬川小児神経学クリニック)

臨床研究担当 松石豊次郎 (久留米大学医学部小児科)

1. 必須項目

A 出生時～生後6ヶ月頃

- 1) 胎生期および周生期 には異常に気がつかれない。
- 2) 生後6か月頃までは軽微であるが症状があり、それらは筋緊張の低下、日中の睡眠時間が長くおとなしい世話のかからない乳児である。
- 3) 出生時頭囲は正常のことが多いが小頭のこともある。

B 生後6ヶ月～1歳6ヶ月頃

- 4) ココモーションの障害（四つ這い移動、歩行のパターンの異常）。
- 5) 頭囲拡大の減衰。
- 6) 獲得されていた手の合目的な運動の消失及びそれに前後して本症に特異な手の常同運動の出現。

C 1歳6ヶ月頃～3歳頃（この時期に退行が見られることが多い）

- 7) 下肢から始まるジストニア姿勢。
- 8) 言語発達の遅滞、知的発達の遅滞。
- 9) 社会性、コミュニケーション機能、獲得言語の喪失。

D 小児期～成人期

- 10) ジストニアは緩徐進行する。その一部症状として側彎が進行することがある。
- 11) 社会性、コミュニケーションの改善を見ることも多い。

E 中高年

- 12) パーキンソニズムを呈することもある。

2. 補助項目

- 1) 睡眠パターンの障害。
- 2) 覚醒時の呼吸障害（過呼吸、息止め発作、空気や唾液を無理にはき出す、吞気）。
- 3) 末梢の血管運動障害。
- 4) 小さな足、冷たい足。小さくて薄い手。

3. 除外項目（他疾患の除外）

- 1) 蓄積病の症状（臓器肥大など）。
- 2) 代謝性疾患、神経変性疾患。
- 3)（周産期仮死の病歴などから）現症の原因と考えられる明らかな周生期あるいは後天性脳障害。しかし、これは必ずしもレット症候群を否定するものではない。
- 4) 脳炎・脳症、頭部外傷などによる神経学的後障害。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

レット症候群の全国疫学調査

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 室長
野村 芳子 瀬川小児神経学クリニック 副院長
研究協力者 松石豊次郎 久留米大学医学部小児科学 教授
立森 久照 国立精神・神経センター精神保健研究所精神保健計画部 室長
高森 一乗 日本大学歯学部小児歯科学講座 講師

研究要旨

疫学班（「特定疾患の疫学に関する研究」班（研究代表者：永井正規（埼玉医科大学公衆衛生学））との共同研究により、全国の医療・療育機関に対して、アンケート調査を行った。その結果、RTT患者数は1030人と推定され、有病率は女児の0.008%であった。さらに、患者実態調査のために二次調査を進めている。また、レット症候群の診断基準を作成し、有効性について実証を進めている。

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、ジストニアなどの運動症状、知的発達障害、自閉性行動を特徴とし、心電図異常や側彎症など多臓器にわたる疾患である。広範な領域にわたる医療の必要性があるにもかかわらず、これまでに全国的な疫学調査はなかった。本研究では、全国の小児科を標榜する医療・療育機関を対象にアンケート調査を行い、本邦における患者数、有病率（20歳以下の女性における暫定の有病率（以下、暫定有病率））を明らかにするのみならず、診断、受診状況、療育環境などRTT患者の実態を解明する。

B. 研究方法

疫学班（「特定疾患の疫学に関する研究」班（研究代表者：永井正規（埼玉医科大学公衆衛生学））との共同研究により、全国の医療・療育機関へRTT患者のアンケート調査を行った。全国の小児科を有する全病院に大学医学部附属病院とレット症候群の患者が集中すると考える施設を加えた母集団（2,918施設）から層化無作為抽出された1020施設を対象に郵送による質問紙調査を行い、過去1年間（2008年11月より2009年10月）に診療したRTT患者およびRTT疑い例の有無と患者数を質問した。現在、回収した結果から個々の患者の実態把握のための二次調査を行っている。

（倫理面への配慮）

疫学調査および臨床研究にあたって、当該研究機関の倫理問題検討委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

一次調査対象1020施設からの有効回答は677施設（66.4%）で、RTTの報告患者数は計480名であった。この数値から求められる全国のRTTの推計患者数は約890人（95%信頼区間：680から1100人）であった。RTT疑い例の報告数は79名、全国の推計例数は約140人（95%信頼区間：120から150人）であった。つまり本邦のRTT患者数（含RTT疑い例）は1030人程度と推定され、これは20歳までの女性（1120万人（総務省統計局））の0.008%にあたる。また、患者分布の地域差があることが分かった（資料3）。現在、個々の患者の実態把握をするために二次調査を行っている。なお、男児の報告も4例（うち疑い例が3人）あったが、これらについては二次調査による診断の確認を待つこととし、上述の集計や推計には女児のみを使用した。

また、レット症候群診断基準（案）を作成した。

D. 考察

これまで、我が国におけるレット症候群（RTT）の疫学調査は行われたことがない。今回の調査によって初めて、RTTの暫定有病率が女児の0.008%であることが明らかになった。この数値は欧米諸国（0.01～0.015%）と比べて低く、その原因について、今後二次調査あるいはその後の追跡調査による詳細な解析で明らかにする必要がある。一方、今回の調査から患者分布の地域差が大きいことが分か

った。その一因として、RTTの診断の難しさが基盤にあると考えられる。これまでのRTTの診断基準は欧米諸国を中心に作成され、その神経学的徴候の難解な表現や臨床所見の取り方の特殊性などにより、十分普及されていなかった。そこで、一般小児科医にも理解しやすい本邦独自の診断基準を新たに作成する必要がある。現在、診断基準(案)を作成し、臨床実証の準備を進めている。

さらに、本邦における本症の認知度が低く、正しく診断がなされていない可能性も否定できない。そのための啓蒙も必要である。

E. 結論

本研究において、本邦で初めてレット症候群の全国疫学調査が始まった。一次調査において、患者総数1030名(推定値)、暫定有病率0.008%が得られた。また、患者分布の地域差が大きいことが分かった。レット症候群の診断基準の普及と診断の標準化が必要である。臨床経過などの詳細な二次調査を通じて、診断基準の策定、診断・治療・療育のための

マニュアル作成を行う必要がある。

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

なし

MECP2遺伝子変異の生物学的解析

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 室長

研究協力者 工藤 伸一 北海道立衛生研究所生物科学部 部長

齊藤 貴志 国立精神・神経センター病院小児神経科 専門修練医

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DNA結合領域 (MBD) の点変異と症状の重症度について、繊維芽細胞を用いて解析した。その結果、MECP2のMBD領域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の相関性を明らかにした。今後、発現解析を進め、軽症化をもたらす分子の同定を行う。これにより、新たな治療法の開発が期待できる。

A. 研究目的

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) は、DNA結合領域 (MBD) と転写抑制領域 (TRD) の二つの機能領域がある。このうち、MBDには点変異が多くみつき、症状との関連が議論されている。また、この領域のアミノ酸置換によりDNA結合能が著しく損なわれることが報告されている。そこで、MBDの点変異による発現分子機構を解明し、軽症化をもたらす分子の同定とそれを用いた治療法の開発を行う。

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、マウス繊維芽細胞に導入する。導入した細胞において、(1) 遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチンへの集積性とその構造への影響を観察し、変異がもたらすRTT患者の症状の重症度との関連性を検討した。(2) 発現パターンの違いをDNAチップを用いて網羅的に調べた。

(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、遺伝子組換えにおいては国立精神・神経センター組換えDNA実験安全委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

MECP2のMBD領域に変異を作製し、発現ベクターを構築し、マウス繊維芽細胞に導入した。(1) これら遺伝子変異による変異タンパクのヘテロクロマチンへの集積性とその構造への影響を観察した結果、変異によるヘテロクロマチンの集積性と症状の重

重症度との間に関連性が存在することを見出した。

(2) ゲノムDNAへの結合能、転写活性化能、転写に与える影響についてDNAチップによる発現解析およびクロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を進めている。

D. 考察

MBD領域の遺伝子変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、影響の度合いと症状の重症度に相関があることを見出した。このことは、MBD領域の遺伝子変異がMECP2の多数の標的遺伝子の動態に影響を及ぼしていることを意味している。さらなる解析により、軽症化に特有の遺伝子発現パターンを見つけ出すことが期待できる。

E. 結論

MECP2のMBD領域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。今後、これらの発現解析を進めて、軽症化に関わる分子の同定を行う。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Larimore JL, Chapleau CA, Kudo S, Theibert A, Percy AK, Pozzo-Miller L. Bdnf overexpression in hippocampal neurons prevents dendritic atrophy caused by Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 2009;34:199-211.
2. Chapleau CA, Calfa GD, Lane MC, Albertson AJ, Larimore JL, Kudo S, Armstrong DL, Percy A, Pozzo-Miller L. Dendritic spine pathologies

in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol Dis* 2009;35:219-233.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

2. 学会発表
なし

レット症候群の臨床病態マーカーとしてのグレリンの検討
および再生医療技術を利用した病態解明に関する研究

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第2部 室長
研究協力者 松石豊次郎 久留米大学医学部小児科学講座 教授
高橋 知之 久留米大学高次脳疾患研究所 准教授
西 芳寛 久留米大学医学部生理学講座 講師

研究要旨

本研究は2つの研究から構成されている。(1) レット症候群(RTT)におけるグレリンの役割の研究では、成長発育障害、摂食障害、自律神経症状と神経内分泌ホルモングレリン(GRL)の血中濃度との関連について検討した。正常対照と比較して、RTTの血中GRL値は有意に低値であり、摂食障害の高度な症例、消化管運動を中心とした自律神経障害の高度な症例で血中濃度がより低値であった。血中GRL濃度は、RTTの病態を反映する有力なマーカーの可能性はある。(2) MeCP2を欠失したRTTモデルES細胞の樹立を行ない、神経細胞の成熟・機能発現に及ぼす影響を調べた。MeCP2はES細胞の未分化能維持や神経細胞の初期発生に必須ではないが、神経細胞の成熟・機能発現過程で重要な役割を担う可能性が示唆された。

A. 研究目的

(1) グレリン研究: レット症候群(RTT)は発達障害、自律神経障害、自閉傾向などをきたす小児神経変性疾患であり、グレリン(GRL)は成長・発達、摂食調節、自律神経調節などの生理作用を有するホルモンで、グレリン作用の多くはRTTの臨床症状と関連している。RTT患者の血中GRL濃度を正常対照群と比較し、RTTの臨床症状と血中GRL濃度との関連について調べる。

(2) MeCP2欠損ES細胞(RTT-ES細胞)の樹立と未分化過程の解析: RTTの責任遺伝子として、MeCP2遺伝子が同定されている。RTT-ES細胞を用いてRTTの発症機序を解明する。

B. 研究方法

(1) 本学小児科通院の43家系のRTT患者を中心に28症例の早朝空腹時血液を用いて、血中GRL濃度を3系統(N-RIA、C-RIA、D-RIA)で測定した。正常対照は同年齢の95症例で、同様に血中GRL濃度を測定し、両群間で比較した。さらに、RTT患者における身体所見(身長、体重、肥満度)、臨床症状(摂食障害、消化管運動障害、概日リズム・睡眠障害ほか)と血中GRL濃度との関連性を検討した。

(2) MeCP2を欠失したES細胞(RTT-ES細胞)を樹立した。対照には、LacZ遺伝子発現のES細胞を作製して用いた。RTT-ES細胞のLIF存在下の細胞形態、

増殖能、未分化分子の発現を解析し、未分化維持能を評価した。さらに、共培養SDIA法を用いて、RTT-ES細胞の神経分化能とドーパミン産生細胞への分化能、ドーパミン産生・分泌能を評価し、電気生理学的解析を行なった。

(倫理面への配慮)

本研究は、久留米大学の遺伝子組換え実験安全委員会と同動物実験センターの承認を受け、学内外の種々の指針や法令を遵守し、実施している。

C. 研究結果

(1) RTT症例の血中GRL濃度は、全GRL 117.0 ± 13.1 fmol/ml ($p < 0.01$ 、対照: 210.1 ± 12.5)、活性型GRL 17.7 ± 1.6 fmol/ml ($p < 0.01$ 、対照: 27.7 ± 1.7)、D-GRL 38.5 ± 4.6 fmol/ml ($p < 0.01$ 、GRL 64.8 ± 3.0)であり、全ての測定系でRTT患者は対照群と比較して有意に低値であった。さらに、摂食障害や便秘など消化管運動障害のRTT症例($p < 0.05$)は、同症状のない症例と比較して血中GRL濃度が有意に低下していた。

(2) 樹立したRTT-ES細胞は、対照ES細胞と同様にOct3/4やSTAT3を発現し、倍加時間に有為差はなかった。ES細胞の未分化維持や増殖能にMeCP2は必須でないことが分かった。また、RTT-ES細胞の神経分化誘導では、共培養後4日目にNestinとTuJ1陽性細胞がみられ、8日目に定常状態に達し、TH陽性細胞

もみられた。さらに、RTT-ES細胞由来神経細胞の電位依存性ナトリウムチャンネルとカリウムチャンネルの未発達傾向が観察された。

D. 考察

(1) 血中 GRL 濃度は食事と日内リズムに影響されることから、本研究では定点採血を行い、比較的安定した結果が得られた。GRL は自律神経調節を介して消化管運動を促進することが知られ、RTT の血中 GRL 濃度の低下が摂食行動異常や消化管運動障害に影響をおよぼしていると考えられる。

(2) 我々の確立した RTT-ES 細胞は神経発生から分化過程の連続的実験を可能にした。今回の結果から、MeCP2 は神経発生・分化よりも神経細胞の成熟過程で重要な役割を担うと考えられた。また、RTT-ES 細胞の膜特性に有意差が認められた。これは、神経細胞がネットワークを形成する過程において、病的なシナプス形成が引き起こされている可能性が考えられる。

E. 結論

RTT の血中 GRL 濃度の低下を明らかにした。GRL の機能低下が RTT の臨床症状の一部の発症病態に関与していると考えられた。血中 GRL 濃度は RTT の臨床像と一定の相関を示すことから、RTT の生物マーカーの可能性がある。また、MeCP2 の神経細胞の成熟過程での重要性を示唆した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohya T, Nagai T, Matsuishi T. A pilot study on the changes in immunity after ACTH therapy in patients with West syndrome. *Brain Dev* 2009;31:739-743.
2. Egami C, Morita K, Ohya T, Ishii Y, Yamashita Y, Matsuishi T. Developmental characteristics of visual cognitive function during childhood according to exploratory eye movements. *Brain Dev* 2009;31:750-757.
3. Yamashita Y, Mukasa A, Matsuishi T. Short-term effect of American summer treatment program for Japanese children with attention deficit hyperactivity disorder. *Brain Dev* 2010;32:115-122.
4. Hiejima H, Nishi Y, Hosoda H et al. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin, upon

fasting in rodents. *Regulatory Peptides* 2009;156,:47-56.

5. Kawahara Y, Kawahara H, Kaneko M, Yamada M, Nishi Y, Tanaka E, Nishi A. Peripherally administered ghrelin induces bimodal effects on the mesolimbic dopamine system depending on food-consumptive states. *Neuroscience* 2009;161:855-864.

2. 学会発表

1. Nishi Y, Hiejima H, Hosoda H, Yoh J et al. Regional and subcellular distribution of n-decanoyl ghrelin and its dynamics in rodents. International Symposium on Ghrelin. Tokyo, Nov. 19, 2009.
2. Nishi Y, Yoh J, Hiejima H et al. Regional distribution and the dynamics of n-decanoyl ghrelin, another acyl-form of ghrelin. 26th International Congress of Physiological Sciences. Kyoto, July 31, 2009.
3. Ohya T, Nagamitsu S, Hara M, Yamashita Y, Matsuishi T. The relationship between sleep disorder and seizure disorder in Angelman syndrome: a case report. International Symposium on Epilepsy in Autism Spectrum Disorders and Related Conditions. Kurume, May 10, 2009.
4. Watanabe Y, Yano S, Yoshino M, Niihori T, Matsubara Y, Aoki Y, Matsuishi T. A familial case of Leopard syndrome associated with high-functioning autism spectrum disorder. International Symposium on Epilepsy in Autism Spectrum Disorders and Related Conditions. Kurume, May 10, 2009.
5. 葉純子、西芳寛、原宗嗣、松石豊次郎ほか。デカノイルグレリンの分泌動態：ヒト血中における検討。第60回西日本生理学会。福岡。2009年11月6日。

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

レット症候群の診断と治療・療育マニュアルの作成と生体試料の収集

研究分担者	野村 芳子	瀬川小児神経学クリニック	副院長
研究協力者	瀬川 昌也	瀬川小児神経学クリニック	院長
	八森 啓	瀬川小児神経学クリニック	医師
	木村 一恵	瀬川小児神経学クリニック	医師
	長尾 ゆり	瀬川小児神経学クリニック	医師
	林 雅晴	瀬川小児神経学クリニック	医師

研究要旨

本研究ではこれまで試みられてきたレット症候群の診断基準をレビューし、我々が検討してきている本症の診断に必要な臨床的特徴を述べ、本症の診断について検討した。またこれらをもとに科学的根拠に基づいた治療と療育のマニュアルを検討した。生体試料の収集についても検討した。

A. 研究目的

レット症候群（RTT）の診断は、本症の臨床的特徴に基づいて行われてきた。1999年にその病因遺伝子としてMethyl CpG binding protein2（MECP2）遺伝子の発見後、MECP2変異が診断に取り入れられてきている。しかし、臨床像の捉え方に共通の認識がなされておらず、これまで複数の診断基準が提唱されてきた。本研究はこれまで提唱されてきた診断基準を検討し、正確な診断法を確立する。また、現時点では根本的な薬物による治療はないため、個々の病態にあった理学療法、作業療法、音楽療法などの指導のためのマニュアル化を行なう。

B. 研究方法

これまでに提唱されてきた診断基準をレビューし、それぞれの意味を検討し、独自の診断基準の策定と治療、療育法マニュアル化を行なう。

（倫理面への配慮）

本研究は瀬川小児神経学クリニック倫理規定を遵守して行った。患者本人、患者本人が未成年または知的障害のために判断が不可能な場合は保護者に説明し、同意を得られた場合のみ研究を行った。個人の情報、プライバシーの保護に十分配慮した。

C. 研究結果

〔診断基準について〕 RTTは、1966年Andreas Rettにより、特異な症状を呈する大脳萎縮症として初めて報告された。以来、RTTの診断は臨床的特徴に基づいて行われてきた。これまでの主な診断基準は次のようなものがある。

(1) Hagberg B, Goutières, Hanefeld F, Rett A,

Wilson J. *Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. Brain Dev* 1985;7:372-3.

(2) The Rett Syndrome Diagnostic Criteria Work Group. *Diagnostic criteria for Rett syndrome. Ann Neurol* 1988;23:425-8.

(3) Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O. *An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett syndrome clinical criteria consensus panel. Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting. Baden Baden, Germany, 11 September 2001.*

(4) DSM-IV-TR

(5) ICD-10

我々は本症の重要な臨床的特徴である特異な精神運動発達遅滞と症状の年齢依存性に注目し、報告してきた。

発症は乳児期早期でおとなしく、筋緊張低下し、睡眠覚醒リズムの異常があり乳児期早期より日中の睡眠時間が多い。これらの症状は軽微で、見逃されることが多い。乳児期後半には這い這いの異常が特徴的で、四つ這い移動の不獲得や遅くれ、移動運動パターンの異常などがみられる。これら本症の歩行はロコモーション障害と考えられる。また、随意性の手の機能の獲得が遅れる。頭囲の拡大が減退する。乳児期後半から幼児期にかけて、精神運動発達の退行、周囲に対し反応を示さなくなる。こうした特徴のうち、乳児期早期の症状と這い這いの異常、周囲に対する反応の消失は自閉症の早期症状と共通である。本症に特異な、手の随意機能の消失と同

時に出現する手の常同運動は、しばしば上肢全体、口、舌、歯軋り、時に下肢におよぶことが少なくない。小児期初期より、ジストニア性筋緊張が下肢から出現し、経過と共に四肢、体幹のジストニア姿勢が進行する。これが後彎、側彎となって現れ、小児期から思春期に進行することが多い。頭囲の発達は減衰し、小頭を呈してくる。てんかんもしばしばみられる。睡眠覚醒障害に加えて、突然の笑いや泣きもみることがある。息づめ、過呼吸などの呼吸障害も特異で、呑気による異常な腹部膨満をきたすこともある。咀嚼障害、嚥下障害もしばしばみられ、便秘症もほぼ必発である。小児期には、冷足などの自律神経障害が出現する。身長、体重、手足の大きさの成長が停滞し、極度の痩せ、時に肥満をみることがある。

病態理解の上で重要な年齢依存性の変化はステージング (Haberg and Witt-Engerström, Kerr) と名付け、症状を整理している (資料4)。また、MECP2の変異解析結果も診断には重要である。

[治療・療育のマニュアル] 治療・療育のマニュアルは、一般の小児神経医師、小児科医師、その他関連の医師、療育機関のパラメディカル担当者、患者家族、教師などを対象としている。その概要を記す。

(1) レット症候群の定義について

本症は特異な発達障害で、主として神経系を障害するが、他の内蔵機能の症状も見逃すことができない。代表的な症状について述べる。

(2) レット症候群の病態について

(3) レット症候群の病因について

(4) レット症候群の治療・療育について

現時点での主となる治療・療育の指針として次の如くまとめられる。いずれも対症療法である。

(4-1) サポート的な治療・療育：理学療法、作業療法、言語療法、心理療法、音楽療法、その他。

(4-2) 併発症、合併症に対する治療：てんかん、側彎症、呼吸異常、心臓リズム障害、その他。

[生体試料の収集] 本症の正確な診断と今後の病態・病因の研究、それに基づいた治療法開発を目指した臨床および基礎研究は臨床医と基礎研究者の密接な協力と連携が欠かせない。患者とその家族の理解のもとに種々の生体試料を採取、保管を進める。現在、臨床データ、画像データ、血液・尿・髄液試料、筋・末梢神経・皮膚などの生検を収集している。

現在、iPS細胞研究を目的とした線維芽細胞の収集を準備中である。

D. 考察

本症の診断基準は、臨床的特徴と病態の関連性に基づいて作成する必要がある。RTTの病態理解が不十分なだけでなく、RTTの全例にMECP2変異はなく、他の疾患にもMECP2変異がみついているため、これまでの診断基準は実態を反映していなかった。したがって、今回作成した診断基準(案)に基づいて、新たな診断基準を作成し、標準化をはかる。

[治療・療育のマニュアル] 本症は特異な発達障害であり、主として神経系を障害するが、他の内蔵機能の症状も重要である。治療・療育のマニュアル作成は、本症の臨床的特徴を詳細に理解し、かつそれぞれの病態に基づいた対応のために必要である。

E. 結論

RTTの診断は当初より臨床診断であり、病因遺伝子が解明された以後も基本的には臨床診断であることは変わらない。しかし、病因遺伝子の解明により病態の理解が深まり、診断基準もリファインされている。

治療は現時点では対症療法であるが、本症の認知が進むに従いより正しい治療が個々の患者になされていくことが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nomura Y. Rett syndrome. In: Katie Kompoliti, Leonard Verhagen ed. Encyclopedia of Movement Disorders. Elsevier, New York, 2010. (in press)

2. 学会発表

1. Nomura Y. A case of Angelman syndrome. Rett Search Clinical Meeting, Chicago, USA, June 30-July 1, 2009.
2. 瀬川昌也、野村芳子. レット症候群 その臨床から基礎まで. 第17回日本レット症候群協会サマーキャンプ. 愛知県. 2009年8月7日.
3. 野村芳子. レット症候群 研究の最近の進歩. 第17回日本レット症候群協会サマーキャンプ. 愛知県. 2009年8月7日.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

遺伝子改変細胞及びマウスの作製と行動、機能解析

研究分担者 栗政 明弘 鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子医療学 准教授

研究協力者 平塚 正治 鳥取大学医学部生命科学科分子細胞生物学講座細胞工学分野 助教

研究要旨

レット症候群の臨床的臨界期の特定や神経発達におけるMeCP2発現の重要性を明らかにするため、MeCP2発現をコントロールできるノックインマウス作製を試みた。胎生期において安定な遺伝子発現が得られるROSA26領域に、テトラサイクリンで発現制御可能なMeCP2遺伝子を持つ発現ユニットを導入し、トランスジェニックマウス作製を行った。

A. 研究目的

レット症候群（RTT）の研究は、原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク質2（MeCP2）の基礎生物学的研究やMeCP2欠損マウスによる病態解析が行われ、IGFBP3のantagonistを用いた治療実験が進められている。しかし、発達障害特有の症状の時間的特異性や回復可能な臨界期の研究は未だ行われていない。

MeCP2発現を制御して発達段階の異なる時期にその発現を変化させ、その結果生じうる神経発達の異常を検索することは、RTTの病態解明の上で今後重要な取り組みとなると考えられる。また、その病態の形成時期を特定することは、今後のRTTの治療の取り組みに際して臨床的臨界期を特定することにつながり、極めて重要な情報となりうる。

我々は、胎生期における遺伝子発現が極めて保たれ、発現抑制を受けないとされるROSA26遺伝子座領域に注目し、この領域にジーンターゲティング・ノックイン手法を用いて遺伝子発現の制御を可能とさせるテトラサイクリン発現制御システムとMeCP2遺伝子を組み込む。組み込んだ制御系は、ROSA26領域の持つ特性から、遺伝子発現抑制から免れて安定したテトラサイクリン発現制御を行うtet遺伝子産物を産生し、さらにその産物がテトラサイクリンの濃度によってMeCP2遺伝子発現を制御するシステムが構築できる。

B. 研究方法

ROSA26領域をノックインするプラスミドベクターは、大阪大学宮崎教授より供与されたものを使用した。このベクターの構造をより詳細に明らかにするため、ベクター上にある各遺伝子の既知配列を用いてシーケンスプライマーを作製し、特に各遺伝子間の接合部を中心にDNA配列を得て、プラスミド

のほぼ全長の配列を確認する。その情報をもとに、MeCP2 cDNA配列を組み込み、MeCP2の発現制御用のジーンターゲティング・ノックイン用ベクターを構築する。

その基本構造は、ROSA26遺伝子のゲノム配列に、MeCP2遺伝子およびPGK-neoカセットが挿入され、pBluescriptにサブクローニングされている。MeCP2遺伝子の発現コントロールは、Cre組み換えタンパク質によりneo遺伝子を取り除いた後、テトラサイクリンで制御されるtranscription activator (tTA)がROSA26プロモーターにより発現され、MeCP2とEGFP両遺伝子が発現コントロールされる。

得られたノックインベクターは、大量培養の後に精製し、マウスES細胞（129Sv/EvTac系統）にエレクトロポレーションにより導入する。PCRならびにサザンハイブリダイゼーションによりG418耐性ES細胞のコロニーをスクリーニングし、正しくターゲティングされたES細胞クローンを選別する。

このES細胞をBlastocystにインジェクションすることにより、キメラマウスを作製する。高効率にES細胞由来の組織を有する雄マウスを、さらにC57BL/6J系統の雌マウスと交配し、F1マウスを得る。このマウスをさらに交配することにより、ROSA26遺伝子領域にMeCP2発現コントロールユニットを有するマウスを作製する。実際の発現コントロールは、さらにこのマウスをCreマウスと交配することにより、LoxPの組み換えを起こさせた後に得られる。

（倫理面への配慮）

本研究は環境中への拡散防止しつつ遺伝子組み換え生物の使用を行う「第二種使用等」に分類され、DNA組換え安全委員会の承認の元に行われる。

C. 研究結果

オリジナルのノックインベクターの構造配列を解析した後、MeCP2遺伝子を組み込んだノックインベクターの作製に成功した。その後、研究方法に従って、目的のES細胞の20株を得た。そのうち正常核型を有する2株 (A2、A20) を胚盤胞に注入し、偽妊娠ICR系統マウスの子宮に移植した。得られた産子のうち毛色判定により、129系統マウス由来のES細胞とホストマウス系統のキメラマウスを確認した。

その結果、2株のES細胞を注入した初期胚(計63個)から、合計3頭のキメラマウスを得ることが出来た。これらのうち、毛色判定で高キメラ個体と判定されたのは、A20由来のキメラマウス2頭であった。引き続き、これらの高キメラマウスをC57BL/6マウスと交配させ、F1マウスを得た。今後はさらに、Creマウスと交配することにより、MeCP2発現制御可能なマウスを作製していく。

D. 考察

テトラサイクリン誘導系を用いて目的の遺伝子発現制御を行う実験は、過去多くの遺伝子座で試みられてきたが成功した例は少ない。これは、ノックインした遺伝子座の多くで、発現コントロールユニットの発現が抑制され、制御が働かなくなる可能性が指摘されている。今回我々は、すでにくつもの成功例を持つROSA26領域をそのノックインの場所として採用している。その点で、我々の目的とする発現制御が達成される可能性は高いと考えている。

ノックインベクターは、そのサイズが極めて大きく、取り扱いが非常に困難であった。そのため、出来るだけその配列の詳細を明らかにして、MeCP2発現調節用に改変したことは、成功した一つの要因であると考えられた。完成したノックインベクターを使ってのROSA26領域への導入は極めて順調に進

行している。今後は、発現のコントロールが実際に可能かどうかを検証し、その後Rett症候群の表現型が得られるかなどの検討を行っていく予定である。

E. 結論

ROSA26領域にMeCP2発現をコントロールするユニットを組み込むノックインマウスの作製を行っている。これまで、予定通りの進展が得られている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Inoue T, Nakayama Y, Yamada H, Li YC, Yamaguchi S, Osaki M, Kurimasa A, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle* 2009;8:1279-1291.

2. 学会発表

1. 永吉悠里、奥田沙奈絵、岡田茜、押村光雄、汐田剛史、栗政明弘 DNA 2 本鎖切断により誘導される 53BP1 新規リン酸化部位の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1~3 日
2. 奥田沙奈絵、永吉悠里、岡田茜、押村光雄、汐田剛史、栗政明弘 DNA-PK リン酸化部位に対する RNA アプタマーの作製 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 2009 年 10 月 1~3 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

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 金沢大学フロンティアサイエンス機構 特任助教

研究協力者 堀家 牧子 金沢大学学際科学実験センター・日本学術振興会 特別研究員

宮野 勝 金沢大学フロンティアサイエンス機構 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）のヒト15番染色体のAngelman症候群（AS）領域の分子機構を解明する。MeCP2抗体によるクロマチン免疫沈降（ChIP）法でMeCP2結合領域を同定した。また、この領域における*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の転写領域を明らかにした。今後、これらの領域のdsRNAの産生について解析し、分子生物学的アプローチからの新たな治療法の開発へ発展させる。

A. 研究目的

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）はエピゲノム機構の中心的分子であり、ヒト15番染色体のAngelman症候群（AS）領域のインプリンティング機構をも制御している。このAS領域におけるMeCP2の分子機構を解明することで、RTTのみならずASやPrader-Willi症候群（PWS）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

MeCP2抗体を用いて、クロマチン免疫沈降（ChIP）法によるヒト15番染色体上のMeCP2結合領域を同定する。さらに、MeCP2によって*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の発現がどのように制御されているかMeCP2ノックダウンSH-SY5Y細胞を作製し、機能および発現解析を行う。

（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

ChIP法に用いるMeCP2抗体の選択と条件検討が重要であり、ヒト15番染色体上のMeCP2結合領域を選択的に解析した。ヒト15q11-q13にある*UBE3A*遺伝子の3' UTR領域にMeCP2結合領域を同定した。また、*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の転写領域をRT-PCRで詳細に検討した結果、このMeCP2結合領域内に複数のオーバーラップする領域を見出した。

D. 考察

*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の転写制御機構について、MeCP2結合領域内に複数の候補領域が得られたことは、MeCP2のエピゲノム機構の関与を改めて証明したことであり、RTTに限らずASやPSWなど広く発達障害の病態形成に関与していることを意味している。今後、これらの領域のdsRNAの産生について解析する。MeCP2ノックダウンの結果とあわせて、*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の転写制御機構を解明することで治療法の開発へ発展させることが期待できる。

E. 結論

MeCP2による下流遺伝子*UBE3A*の転写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大変重要である。本研究では、*UBE3A*の3' UTR領域に新規のMeCP2結合領域を見出した。このことはMeCP2がこの結合領域の*UBE3A*とアンチセンスRNA（*UBE3A-AS*）の転写制御に関与している可能性がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Horike S, Ferreira JCP, Meguro-Horike M, Choufani S, Smith AC, Shuman C, Meschino W, Chitayat D, Zackai E, Scherer SW, Weksberg R. Screening of DNA Methylation at the H19 Promoter or the Distal Region of its ICR1 Ensures Efficient Detection of Chromosome 11p15 Epimutations in Russell-Silver

Syndrome. *Am J Med Genet* 2009;149A: 2415-2423.

2. 東田陽博, 堀家慎一, 吉原亨, 小泉恵太. 自閉症の遺伝子・分子生物・実験動物学的研究: 自閉症分子マーカー探索の第一歩. *医学のあゆみ* 2009;231:1072-1078.

2. 学会発表

1. Meguro-Horike M, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-13 is associated with significant disruption of gene expression within the paired region. The 32nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan,

Yokohama, December 9, 2009.

2. Horike S, Meguro-Horike M, Oshimura M. Characterization of regulatory sequences essential for homologous pairing of chromosome 15q11-13. 59th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Honolulu, USA, October 21, 2009
3. Horike S. Characterization of regulatory sequences essential for homologous pairing of chromosome 15q11-13. 18th Lake Shirakaba Conference, Vedbaek, Denmark, June 20, 2009

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし