

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
(H22-難治-一般-133)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 雅之

平成23（2011）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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 -----	1
伊藤雅之	
(資料1) レット症候群全国疫学調査 二次調査用紙	
(資料2) レット症候群全国疫学調査 二次調査結果	

II. 分担研究報告

1. レット症候群全国疫学調査 -----	13
伊藤雅之、野村芳子、松石豊次郎、立森久照	
2. MECP2遺伝子変異の生物学的解析 -----	15
伊藤雅之、工藤伸一	
3. レット症候群モデルマウスの無呼吸頻度の日内変動とモノアミン神経伝達 -----	17
伊藤雅之、白川哲夫	
4. 非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の分子機能及び遺伝子変異による病態機序の解析 -	21
伊藤雅之、田中輝幸	
5. 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 -----	23
松石豊次郎、西 芳寛、原 宗嗣、高橋知之、岡部恭典	
6. レット症候群の診断基準についての研究 -----	27
野村芳子、瀬川昌也、八森 啓、木村一恵、長尾ゆり、林 雅晴	
7. 遺伝子改変細胞及びマウスの作製と行動、機能解析 -----	31
栗政明弘、平塚正治	
8. インプリンティング遺伝子の細胞生物学的解析 -----	33
堀家慎一、堀家牧子、宮野 勝	
9. レット症候群モデルマウスの脳内カテコラミン・セロトニン産生神経細胞における発達に伴 う機能障害に関する研究 -----	35
井手秀平	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	39
-----------------------	----

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

総括研究報告書

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

研究代表者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長

研究要旨

本研究では、レット症候群（RTT）を解明し、診断法と予防・治療法を確立するために、①RTTの臨床実態調査と体系的で包括的なマニュアル作成と生体試料の収集・管理、②エピゲノム機構の解明、③臨床的臨界期の解明の3つのテーマに取り組んだ。その結果、全国疫学一次調査において、患者総数1011名（中央値）、有病率0.009%が得られ、患者分布の地域差があることが分かった。

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り、二次調査を通じて、診断基準と診断の手引きの作成を行っている。また、オーストラリアとの共同研究を行ない、臨床像や診断について、国際的な比較検討を進めた。

基礎研究の進展は、複雑な病態解明のみならず、治療法の開発に役立つ。特に、*Mecp2*の発現制御マウスは詳細な治療実験が可能であり、今後の展開が期待できる。

分担研究者

松石豊次郎・久留米大学医学部小児科学 教授
野村 芳子・瀬川小児神経学クリニック 副院長
栗政 明弘・鳥取大学大学院医学系研究科 准教授
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
井手 秀平・東京都立東部療育センター 医師

研究協力者

田中 輝幸・東京大学大学院医学研究科発達医科学
准教授
白川 哲夫・日本大学歯学部小児歯科学講座 教授
工藤 伸一・北海道立衛生研究所微生物部 部長
立森 久照・国立精神・神経医療研究センター精神
保健研究所精神保健計画研究部 室長
高森 一乗・日本大学歯学部小児歯科学講座 講師
齊藤 貴志・国立精神・神経医療研究センター病院
小児神経科 医師
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
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
堀家 牧子・金沢大学学際科学実験センター 博士
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

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。これまでに全国的な疫学調査はなく、臨床実態は不明な点が多かった。RTTの原因遺伝子であるメチル化CpG結合タンパク2（*MECP2:Xq22*）の基礎研究が進められてきたが、X染色体不活化、*MECP2*変異部位による表現型の違いなど複雑な分子機構と診断の困難さ、検体収集システムの未整備により臨床研究が進んでいない。本研究では、RTTの臨床実態調査とそれに基づいた診断基準を作成し、生体試料の収集と研究基盤の構築、独自開発したモデルマウスの分子生物学的研究を進め、広範な視点から集学的研究を行う。

RTTは神経症状や精神症状だけでなく多臓器にわたる複雑な臨床像を呈するため、診断困難例が多く、その診断と治療・療育は経験によるところが大きい。そこで、(1) 全国疫学調査を行い、実態の把握に努め、治療・療育の標準化に重要な体系的で包括的な診断基準を作成する（伊藤、松石、野村）。また、診断、治療のための生物マーカーの探求を行なう（伊藤、松石、井手）。また、(2) *Mecp2*発現制御RTTモデルマウスを作製し、発症と治療の臨界期を特定し、それらの時期にモノアミンの動態を調べ、診断と治療のマーカー分子の同定、診断、重症度のマーカーを検索する（伊藤、栗政、井手）。さらに、(3) *MECP2*が関与するエピゲノム機構の研究（堀家）を行い、RTTの複雑な分子病態を解明するのみならず科学的な治療法の開発を視野に研究を進める。

B. 研究方法

(1) 全国臨床実態調査と診断基準作成(野村、伊藤、松石、立森)：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付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1,020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尋ねた(一次調査)。現在、個々の患者の実態把握のための二次調査を行い(二次調査用紙(資料1))、解析した(二次調査結果(資料2))。

また、オーストラリアとの共同研究を行ない、臨床像や診断について、国際的な比較検討を行っている。

(2) RTTの生物マーカーの検索(松石、井手)：研究参加の同意を得られた患者検体を用いて、脳と消化管に分布するペプチドホルモンであるグレリン(GRL)をRIA法により、症状との関連性を調べた。また、レット症候群モデルマウスのモノアミン・アミノ酸をHPLC法で測定し、診断および病期を反映する生物マーカーの探求を行った。

(3) 患者由来変異 MECP2 によるヘテロクロマチン機構の解析(伊藤、工藤)：MECP2 の DNA 結合領域(MBD)の患者由来変異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。これら変異タンパクを発現した細胞でのヘテロクロマチンの違いとメチル化パターンの違い構造の違いを観察し、ヘテロクロマチン構造の相違と症状の重症度との関連性を検討した。

(4) MECP2による染色体15q11-q13領域のAS責任遺伝子座の遺伝子発現制御機構の解明(堀家)：神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において15q11-q13領域の核内配置がどのように制御されているかDNA-FISH法で解析した。FISHプローブは、15q11-q13領域上の9つのBAC(Bacterial Artificial Chromosome)を蛍光ラベル化し、解析に用いた。さらに、母方と父方15番染色体の相互作用がどのように制御されているかをMeCP2やCTCF、RAD21(コヒーシン)ノックダウンSH-SY5Y細胞を作製し、15q11-q13の核内配置を明らかにした。

(5) *Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスの作製(伊藤、栗政)：染色体ROSA26領域に*Mecp2*のcDNA+EGFPを組み入れ、組み換えによりマウスES細胞に導入し

た。サザンブロット等により確認し、これをマウス胚に入れ、キメラマウスを作製した。高い導入率が期待できるキメラマウスから、戻し交配を行った。

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたって、関係省庁の指針を遵守し、必要な手続きを行った。疫学調査および臨床研究においては、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。また、遺伝子改変および動物実験にあたって、国立精神・神経医療研究センターおよび金沢大学、鳥取大学大学院医学研究科に設置されている組換えDNA実験委員会および動物実験に関する倫理委員会等の承認を得て行った。

C. 研究結果

(1) 臨床実態調査：一次調査対象1,020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569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1011人(95%信頼区間：778から1244人)であった(資料2)。これは20歳までの女性(1120万人(総務省統計局))の0.009%にあたる。また、患者分布の地域差があることが分かった。現在、個々の患者の実態把握をするために二次調査の解析を進めている。

過去の診断基準の見直しと本邦の診断基準、および診断の手引きを作成中である。今後、協力を得ている患者に対して、実用化に向けた臨床実証を行う。また、臨床像や診断について、国際的な比較検討を進めている。

(2) RTTの生物マーカーの検索：すでに集積している患者検体から、RTTでは血中GRLが低値であることをみつけた。さらに、GRL値と症状、MECP2遺伝子変異との関連性を調べている。また、モノアミンをRIA法で測定し、結果の解析を行なった。

(3) 変異 MECP2 のヘテロクロマチン機構の解析：MECP2 の MBP 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。これら遺伝子変異によるヘテロクロマチン構造の違いを観察し、ヘテロクロマチン構造の相違と症状の重症度との相関を見出した。さらに、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解析を行っている。

(4) MECP2による染色体15q11-q13領域のAS責任遺伝子座の遺伝子発現制御機構の解明：15q11-q13領域、約10Mbの各遺伝子座の核内配置をDNA-FISHで解析した。その結果、GAB受容体β3サブユニット *GABRB3* 遺伝子近傍で特異的に相同染色体のペアリングが認められた。また、これらの母方と父方15番染色体の相互作用は、自閉症モデル細胞株では消失し

ていた。さらに、MeCP2やCTCFのノックダウン細胞株でも同様に相同染色体のペアリングの異常が認められた。

(5) *Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスの作製：新規ROSA26法による発現制御*Mecp2*遺伝子改変ES細胞および改変マウスを作製した。改変ES細胞において発現制御のテトラサイクリン投与量について検討中である。また、改変マウスについては第6世代まで戻し交配が終了し、次年度には解析に用いることが可能である。

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かった。今回の調査によって初めて、RTTの有病率が(20歳以下の女性)の0.009%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%)と比べて比較的 low、その原因について、今後二次調査の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の診断の難しさと医師のRTTの認知度の低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し、啓蒙および普及させる必要がある。現在、診断基準および診断の手引きを作成し、この臨床実証の準備を進めている。こうした診断基準の確立と普及は本邦におけるRTTの正確な実態把握のみならず、早期からの治療・療育への介入に不可欠であり、家庭や学校への支援をしていく上で重要である。

国際的なRTTの疫学的比較検討を進めている。これは、診断のあり方のみならず、医療・療育体制を見直す意味でも重要な情報となることが期待される。

また、本邦のRTTおよびMECP2の研究者の研究会(班会議)を開催し、最新の研究情報の交換のみならず、共同研究の推進をはかることができた。さらに、日本レット症候群協会、さくらんぼ会、NPOレット症候群支援機構との交流をはかった。

RTTの生物マーカーの探求とMECP2の分子生物学的研究の成果は、世界をリードするものであり、今後さらに発展することが期待できる。グレリンの発見は世界に先立つものであり、症状の重症度との関連を解析している。また、MECP2発現制御機構の解明は、RTTだけでなく15番染色体インプリンティング遺伝子が関与するPrader-Willi症候群やAngelman症候群など広く自閉症の病態解明の可能

性もある意義深い研究である。さらに、*Mecp2*発現制御遺伝子改変マウスは、いままでにない遺伝子発現制御機構のモデルマウスで、これにより詳細な治療実験の展開が期待できる。

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1011名(中央値)、有病率0.009%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。今後、臨床経過などの詳細な解析を行ない、本邦の実情にあった診断基準を策定する。基礎研究の進展は、複雑な病態解明のみならず、治療法の開発に役立つ。特に、*Mecp2*の発現制御マウスの完成は、詳細な治療実験が可能であり、今後の展開が期待できる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Itoh M, Takizawa Y, Hanai S, Okazaki S, Miyata R, Shu H, Inoue T, Akashi T, Goto Y, Hayashi M. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. *Differentiation* 2010; 80:118-122.
2. Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21:588-596.
3. Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal development of neurons in focal cortical dysplasia: neuronal mis-maturation from an immunohistochemical consideration. *Seizure* 2010;19:274-279.
4. Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology* 2011;31:38-41.

5. Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. Insulin facilitates repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade. *Neuroscience* 2010;170:1199-1208.
 - 6 Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, Iwata K, Shirakawa T. In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. *Oral Dis* 2011 (in press).
 7. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ. CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* 2011 (in press).
 8. 和田崇, 滝口旗一, 武内倫子, 黒木洋祐, 関信幸, 高森一乗, 白川哲夫. *Mecp2* 欠損 Rett 症候群モデルマウスにみられる呼吸の異常と病態変化. *障歯誌* 2010;31:730-736.
 9. 白川哲夫. スペシャルニードの子どもたちへの歯科医療・病診連携. *小児歯誌* 2010;48:40.
 10. Okabe Y, Kusaga A, Takahashi ., Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K. Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. *Brain Res* 2010;1360:17-27.
 11. Matsuishi T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Takahashi T. Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives. *Brain Dev* 2011 (in press).
 12. Nomura Y. Rett syndrome. In: Katie Kompoliti, Leonard Verhagen ed. *Encyclopedia of Movement Disorders*. Elsevier, New York, 2010;3:38-41.
 13. 野村芳子. Rett症候群の運動発達. In: 五十嵐隆 総編集, 久保田雅也 専門編集. 「小児科臨床ピクシス19」ここまでわかった小児の発達. 中山書店、2010 ; 159-163.
 14. 野村芳子. レット症候群. *精神科治療学*. 2010;25:264-265.
 15. 野村芳子. レット症候群. 症候群ハンドブック. 中山書店 (印刷中)
 16. Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP. Differential role of DNA-PKcs phospho-rylations and kinase activity in radio- sensitivity and chromosomal instability. *Radiat Res* 2011;175: 83-89.
 17. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II-alpha and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]
 18. Hori N, Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S. Aberrant CpG Methylation of the Imprinting Control Region KvDMR1 Detected in Assisted Reproductive Technology-Produced Calves and Pathogenesis of Large Offspring Syndrome. *Animal Reproduction Science* 2010;122:303-312.
 19. Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Fujisaki C, Qi DL, Ohhira T, Gilley D, Oshimura M, Kugoh H. (2010) Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integrity* 2010;1: 6.
 20. Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto Y. Abnormal glucose metabolism in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain Dev* 2010;32:506-510.
2. 学会発表
1. Itoh M. Synaptic dysfunction of Rett syndrome; delayed synaptic maturation is the first step of cortical dysfunction. The 2nd European Rett syndrome Symposium. Edinburgh, UK, 7-10, October, 2010.
 2. Saito T, Okazaki S, Inoue T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical Layer-formation of Human Developing brains and lissencephalies: Consideration of layer-specific marker expression. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.
 3. Itoh M, Okazaki S, Kuki I, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. *Aristaless*-related homeobox (*ARX*) gene null-mutation exhibits abnormal distribution of GABAergic interneurons: immunohistochemical study of human X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. The 17th International Congress of

Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.

4. Itoh M, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Akashi T, Hayashi M and Goto Y. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human *ARX*-null mutation: consideration of pancreas differentiation. The 12th European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic, 24-28, April, 2010.
5. 奥田耕助, 渡邊紀, 水口雅, 田中輝幸. 難治性てんかんと発達遅滞の原因遺伝子 *CDKL5* の相互作用の探索. 第 33 回日本神経科学大会 2010.9.2 (神戸)
6. 田中輝幸, 渡邊紀, 奥田耕助, 縣千聖, 佐藤天平, 上野寛枝, 浅原弘嗣, 水口雅. West 症候群・非典型 Rett 症候群の原因遺伝子 *CDKL5* の機能解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会 2010.4.23 (東京)
7. 松石豊次郎. Rett 症候群に学ぶ—臨床・基礎研究からの 22 年と今後の展望— 第 52 回日本小児神経学会 会長講演 2010.5.20 (福岡)
8. 原宗嗣, 葉純子, 西芳寛, 山下裕史朗, 児島将康, 松石豊次郎ほか: レット症候群における血漿中グレリン濃度の検討. 第 52 回日本小児神経学会 2010.5.20 (福岡)
9. Segawa M, Nomura Y. Approach to Neurotransmitter Disorders. 11th International Child Neurology Congress-ICNC-2010, Meet the experts session. May2-7, 2010, Cairo, Egypt.
10. Nomura Y. Rett syndrome and Neurodevelopment. The spring Congress of Korean Child Neurology Society. May 14, 2010. Incheon, Korea.
11. Nomura Y, Yukishuta S, Kimura K, Segawa M. Clinical Characteristics of Rett syndrome with silent mutation of *MECP2*. 11th Annual Rett syndromesymposium. Virginia, USA, June 27-29, 2010.
12. 野村芳子, 瀬川昌也. レット症候群. 第 18 回日本レット協会サマーキャンプ. 国立信州高遠少年自然の家. 2010.9.18-20 (長野)
13. Kurimasa A, Okuda S, Okada A, Miyano Y, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ, Live cell imaging and kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling U2OS cells. Keystone Symposia, Genomic Instability and DNA Repair (B4) Jan.30-Feb.4, 2011, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA
14. 堀家慎一, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒-堀家牧子. Homologous

- pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第 55 回日本人類遺伝学会, 2010.10.27-30 (大宮)
15. Horike S, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. The American Society of human Genetics, 60th Annual Meeting, November 3-6, 2010, Washington DC.
 16. Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Epigenetics Europe, September 14-15, 2010, Dublin, Ireland.
 17. Horike S, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Signalling to Chromatin, September 7-10, 2010, Cambridge, UK.
 18. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. Sweden-Japan Joint Colloquium, September 6-7, 2010, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
 19. 目黒-堀家牧子, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 堀家慎一 Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第 4 回日本エピジェネティクス研究会 2010.5.28-29 (米子)
 20. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons.

9th Annual International Meeting for Autism
Research (IMFAR), May 20-22, 2010,
Philadelphia, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
(特許申請予定)

*Mecp2*発現制御マウス (伊藤雅之、栗政明弘)

レット症候群 第二次調査個人票

厚生労働省・厚生労働科学研究費補助金（難病克服研究事業）
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連学的研究班
特定疾患の遺伝に関する研究班

この調査票はレット症候群の実態調査のみに使用し、ここに記された記録は秘守されます。該当する番号を丸でかこむ、または_____上か()内にご記入ください。冒頭に【複】とある項目は複数回答可です。

記載者氏名 _____ 記載年月日 平成 _____ 年 _____ 月 _____ 日

貴施設名 _____ 電話 _____
所在地 _____ E-MAIL _____
(省略可)

担当診療科 1 小児科 2 小児神経科 3 その他 ()

Table with 2 columns: 調査対象 (患者番号) and 性別 (性 1 男 2 女). Includes fields for birth date (生年月日) and birthplace (居住地).

Table with 2 columns: 記載日現在の年齢, 推定発症年齢, 貴施設初診時年齢. Includes fields for age in years and months.

診断した医療機関 1 貴院 2 他院 (医療・療育機関名:)

診断 1 レット症候群 2 レット症候群の疑い

Table with 2 columns: 【複】診断の根拠 and 1-9 options including DSM-IV (R), ICD-10, and Rett syndrome diagnostic criteria.

I 初診時に認められた症状

Large table listing 15 symptoms (e.g., 運動発達遅滞, 口コモーションの異常) with multiple choice options (0-9) for each.

II 家族歴

Table for family history with 2 main items: 1 血族結婚 and 2 【複】疾患 (罹患者の患者との続柄).

* 血族結婚、家族歴は、問診で知り得た範囲内で結構です。可能であれば、三等親までは調べてください。

III 母親の本児妊娠について

1 異常	0 無 1 有 (内容) 9 不明
------	--------------------

IV 出生歴

1 異常	0 無 1 有 (内容) 9 不明
2 出生時の体格	体重 (g) 身長 (cm) 頭囲 (cm)

V 既往歴

1 疾患名 (罹患年齢)	0 無 1 有 () 9 不明
2 外傷 (部位と受傷年齢)	0 無 1 有 () 9 不明
3 骨折 (部位と年齢)	0 無 1 有 () 9 不明
4 手術 (内容と年齢)	0 無 1 有 () 9 不明
5 その他 (内容と年齢)	0 無 1 有 () 9 不明

VI 現病の特徴的徴候の有無について * () はその発現年齢を記してください

a 身体所見

1 初診時身長	1 () cm 9 不明
2 初診時体重	1 () kg 9 不明
3 初診時頭囲	1 () cm 9 不明
4 頭囲拡大の減速	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
5 便秘	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
6 足が冷たい	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
7 初潮	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
8 その他 (内容と年齢)	0 無 1 有 (内容 ; 歳 カ月)

b 運動機能

1 頸定	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
2 寝返り	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
3 座位	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
4 四つ這い移動	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
5 上記1の場合 異常パターン	0 無 1 有 (内容) 9 不明
6 独歩	0 未 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
7 【複】上記1の場合 異常パターン	1 横揺れ歩行 2 つま先歩行 3 その他() 9 不明
8 手の合目的運動の消失	0 無 1 有 (歳 カ月から) 9 不明
9 【複】常同運動	0 無 1 手にあり (歳 カ月から) 2 口にあり (歳 カ月から) 3 足にあり (歳 カ月から) 9 不明
10 他の不随意運動	0 無 1 有 (内容:) (時期: 歳 カ月から) 9 不明
11 【複】筋緊張異常	0 無 1 低下 (歳 カ月から) 2 亢進 (歳 カ月から) 3 ジストニア性 (歳 カ月から) 9 不明
12 脊柱異常 側弯	0 無 1 有 (内容) (歳 カ月) 9 不明
13 脊柱異常 後弯	0 無 1 有 (内容) (歳 カ月) 9 不明
14 運動の退行	0 無 1 有 (内容) (歳 カ月から) 9 不明
15 その他	0 無 1 有 ()

c 精神・情緒の発達及び異常

1 精神遅滞	0 無 1 有 (推定DQ/IQ: _____、測定方法: _____) (施行時年齢: 歳 カ月) 9 不明
2 有意語	0 無 1 単語 (語) 2 二語文 3 その他 9 不明
3 【複】自閉傾向	0 無 1 おとなしい (歳 カ月から) 2 手がつかからない (歳 カ月から) 3 視線が合わない (歳 カ月から) 4 多動 (歳 カ月から) 5 その他 (歳 カ月から) 9 不明
4 【複】情緒異常	0 無 1 奇声 (歳 カ月から) 2 興奮 (歳 カ月から) 3 自傷 (歳 カ月から) 4 固執 (歳 カ月から) 5 ケラケラ笑う (歳 カ月から) 6 泣く (歳 カ月から) 7 鬱状態 (歳 カ月から) 8 見つめる (歳 カ月から) 9 不明

5 精神機能の退行	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 ()

d けいれん性疾患、呼吸異常

1 有熱時けいれん	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 てんかん	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 【複】呼吸異常	0 無 1 過呼吸 (歳 カ月から) 2 息づめ (歳 カ月から) 3 呑気 (歳 カ月から) 4 他 (内容 ; 歳 カ月から) 9 不明
4 その他	0 無 1 有 ()

e 睡眠異常

1 睡眠覚醒リズム障害	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 日中の睡眠過多	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 夜間覚醒	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
4 夜泣き	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
5 夜驚	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 (内容 ; 歳 カ月) 9 不明

f 歯科・口腔の問題

1 歯ぎしり	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
2 咬合不全	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
3 嘔む、飲み込みの異常	0 無 1 有 (歳 カ月) 9 不明
4 その他	0 無 1 有 ()

VII 検査

1 頭部MRI/CT異常	0 無 1 有 (所見) 9 不明
2 染色体検査	0 未検査 1 G-band 2 高精度分染法 3 FISH 4 その他 ()
3 検査した場合 染色体所見	0 異常なし 1 所見あり (具体的に)
4 MECP2遺伝子検査	0 未検査 1 有 (検査実施施設名)
5 検査した場合 MECP2遺伝子異常	0 無 1 有 (結果) 9 不明
6 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

VIII 治療・療育 (使用薬剤等を記載してください)

1 抗てんかん薬	0 無 1 有 (薬剤名:) 9 不明
2 他の内服薬	0 無 1 有 (薬剤名:) 9 不明
3 胃ろう	0 無 1 有 (造設年齢: 歳 カ月) 9 不明
4 側弯手術	0 無 1 有 (手術年齢: 歳 カ月) 9 不明
5 理学療法 (PT)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
6 作業療法 (OT)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
7 言語療法 (ST)	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
8 心理指導	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
9 音楽療法	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
10 水泳	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明
11 その他	0 無 1 有 (開始年齢: 歳 カ月から; 現在の頻度: 月に__回程度) 9 不明

IX 医療費

1 【複】公費負担	0 無 1 精神障害者自立支援 2 小児慢性特定疾患 3 心身障害者医療費助成制度 4 療育手帳 5 身障者手帳 6 生活保護 7 その他 () 9 不明
2 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

X 福祉関連

1 通所	0 無 1 療育センター 2 その他 () 9 不明
2 在宅介護支援	0 無 1 有 (内容) 9 不明
3 入所	0 無 1 重症心身障害者・児施設 2 その他 () 9 不明
4 その他	0 無 1 有 (内容) 9 不明

(資料2) レット症候群全国調査 二次調査結果

レット症候群およびその疑い例 (男女)

	対象機関数		調査機関数		回収機関数		報告患者数	推計患者数	標準誤差	95%信頼区間	
	N	n ₀	抽出率 (%)	n	回収率 (%)	下限				上限	
99床以下	987	45	4.6%	13	28.9%	1	76	72	0	218	
100-199床	552	53	9.6%	31	58.5%	4	71	68	0	205	
200-299床	311	61	19.6%	37	60.7%	3	25	17	0	59	
300-399床	289	112	38.8%	80	71.4%	6	22	7	7	36	
400-499床	143	113	79.0%	78	69.0%	20	37	8	22	51	
500床以上	171	171	100.0%	134	78.4%	55	70	7	56	84	
大学病院	128	128	100.0%	91	71.1%	111	156	33	91	221	
特別層	337	337	100.0%	213	63.2%	350	554	52	452	655	
計	2918	1020	35.0%	677	66.4%	550	1011	119	778	1244	

層別の推計患者数、標準偏差、信頼区間は参考値である。

分担研究報告

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・神経医療研究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
松石豊次郎 久留米大学医学部小児科学 教授
研究協力者 立森 久照 国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所精神保健計画研究部室長
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1011人と推定され、有病率は女児の0.009%であった。さらに、患者実態調査のために二次調査を行なった。2010年にRettSearch Consortiumが提唱したレット症候群の診断基準を参考に本邦の診断基準および診断手引きを作成中である。

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有病率（以下、推定有病率））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1,020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。さらに、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た（資料1）。

（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た後に行った。

C. 研究結果

一次調査：対象 1,020 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 550 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 1011 人（95%信頼区間：778 から 1244 人）であった。これは 20 歳までの女性（1120 万人（総務省統計局））の 0.009%にあたる。また、患者分布の地域差があることが分かった。

二次調査：一次調査の結果を受けて、対象 550 名について二次アンケート調査を各施設を通して行なった。その結果、263 名の回答を得て、分析中である。

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0.009%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%）と比べて幾分低く、その原因について、今後二次調査の解析で明らかにする。一次調査の結果から患者分布の地域差があることが分かった。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、診断基準および診断

の手引きを作成中である。

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1011名、有病率0.009%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

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・神経医療研究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微生物部 部長

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。また、これらの細胞の100%導入株を作製した。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。

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について、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・神経医療研究センター組換え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症

度との間に関連性が存在することを見出した。現在、100%導入細胞を確立し、(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示唆している。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. Itoh M, Takizawa Y, Hanai S, Okazaki S, Miyata R, Shu H, Inoue T, Akashi T, Goto Y, Hayashi M. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: consideration of pancreas differentiation. *Differentiation* 2010; 80:118-122.
2. Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K,

Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21(3):588-596.

3. Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal development of neurons in focal cortical dysplasia: neuronal mis-maturation from an immunohistochemical consideration. *Seizure* 2010; 19: 274-279.

4. Shirai S, Takahashi K, Kohsaka S, Tsukamoto T, Isogai H, Kudo S, Sawa H, Nagashima K, Tanaka S. High expression of MeCP2 in JC virus-infected cells of progressive multifocal leukoencephalopathy brains. *Neuropathology*. 2011;31:38-41.

2. 学会発表

1. Itoh M. Synaptic dysfunction of Rett syndrome; delayed synaptic maturation is the first step of cortical dysfunction. The 2nd European Rett syndrome Symposium. Edinburgh, UK, 7-10, October, 2010.

2. Saito T, Okazaki S, Inoue T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical Layer-formation of Human Developing brains

and lissencephalies: Consideration of layer-specific marker expression. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.

3. Itoh M, Okazaki S, Kuki I, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. *Aristaless*-related homeobox (*ARX*) gene null-mutation exhibits abnormal distribution of GABAergic interneurons: immunohistochemical study of human X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.

4. Itoh M, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Akashi T, Hayashi M and Goto Y. Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human *ARX*-null mutation: consideration of pancreas differentiation. The 12th European Congress of Endocrinology, Prague, Czech Republic, 24-28, April, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

レット症候群モデルマウスの無呼吸頻度の日内変動とモノアミン神経伝達

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

研究協力者 白川 哲夫 日本大学歯学部小児歯科学講座 教授

研究要旨

MeCP2 が欠損している雄ノックアウトマウス (*Mecp2*^{-/-}) では、生後 4 週頃から Rett 症候群に類似した神経症状や呼吸異常が現れ、時間の経過とともに重症化した後、通常 10 週以内に死亡する。MeCP2 の欠損が自律神経系ならびに呼吸系にどのような病的変化を惹起しているのかについて明らかにするため、*Mecp2*^{-/-} の自発行動量を長期連続測定するとともに、全身型プレチスモグラフを用いて無拘束下で呼吸を 24 時間連続測定し、得られたデータを野生型雄マウス (wild) と比較した。また延髄の呼吸中枢における小胞膜モノアミントランスポーター 2 (VMAT2) 発現の免疫組織学的検討を行い、呼吸異常との関連性について調べた。その結果、MeCP2 欠損はマウスの自発行動および呼吸頻度のサーカディアンリズムには影響しないが、*Mecp2*^{-/-} では生後 7 週において無呼吸回数の著明な増加がみられ、明暗条件下では明期に発生頻度が高いことが明らかになった。*Mecp2*^{-/-} では wild に比べ生後 8 週において呼吸中枢での VMAT2 陽性 puncta 数の著しい減少がみられたことから、無呼吸回数の増加について、呼吸中枢におけるモノアミン作動性シナプスの異常が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究から、*Mecp2*^{-/-} では生後 5 週以降に無呼吸発作の頻度が著しく増加し、この無呼吸発作の重症化が *Mecp2*^{-/-} の寿命に直接関連していることが示されている。レット症候群患者では健常者に比べ突然死の頻度が高いことが報告されており、*Mecp2*^{-/-} のような急激な呼吸機能の悪化は認められないものの、呼吸調節あるいは自律神経系の何らかの異常が突然死に関連している可能性が示唆されている。呼吸パターンの異常は多くの場合、過呼吸・無呼吸を断続的に繰り返すものが多いと言われているが、これらの呼吸異常は睡眠時にはほとんど出現しないとされており、日中、特に精神緊張時に顕著になることが報告されている。現在のところ、*Mecp2*^{-/-} について呼吸動態の 24 時間変動に関する報告はまだなく、行動や呼吸のサーカディアンリズムが正常に維持されているかどうかについても詳細な検討は行われていない。

そこで今回、MeCP2 の欠損が自律神経系ならびに呼吸調節系にどのような病的変化を惹起しているのかを明らかにすることを目的として *Mecp2*^{-/-} について研究を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物および飼育条件

Mecp2 ヘテロ欠損雌マウス (B6;129P2-*Mecp2*^{tm1Bird/J}, STOCK# 003890 : Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) ならびに C57BL/6J 野生型雄マウス (オリエンタル酵母工業, 東京) を購入後、本学動物実験施設にて飼育および交配を行い *Mecp2*^{-/-} を得た。コントロールとして、C57BL/6J 雄マウス (wild) を用いた。飼育環境は明期 7:00~19:00, 暗期 19:00~7:00, 室温 24 ± 1°C, 湿度 50 ± 5% とした。飼育ケージ内の照度は、蓋を外した状態でのケージ床部での測定で 40~50 lux であった。出産後、飼育ケージ内で母親に授乳させ、生後 3 週で母仔を分離したのち自発行動量を測定した。

2. 行動量測定

Mecp2^{-/-} と wild を、自発運動センサー (NS-AS01 ; (株)ニューロサイエンス, 東京) を備えた行動量測定用ユニットに一匹ずつ入れ、小動物用自発行動計測システム (ClockLab ; Actimetrics Inc., Evanston, USA) を用いて行動量を記録した。*Mecp2*^{-/-} と wild について、7:00~19:00 を明期とする明暗条件 (LD, 19:00~7:00 : dark, 7:00~19:00 : light) 下で約 3 週間行動リズムを計測したのち、恒暗条件 (DD) にして行動リズムの計測を継続しフリーランニングリズムを調べた。

3. 呼吸測定

7週齢の *Mecp2^{-/-}* ならびに wild を無麻酔の状態で一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (PLY4211; Buxco Electronics, 大阪) のチャンバー内に入れ, 圧トランスデューサーと増幅器により, 呼吸に伴うチャンバー内の気流変化を検出することにより呼吸波形を24時間連続で測定・記録した。測定開始の4時間前にマウスをチャンバーに入れて測定環境に馴化させたのちデータを記録した。チャンバー内の照度は, 床部での測定で40 lux になるよう調節した。

プレチスモグラフによる測定を生後7週で行い, 1秒以上の無呼吸の発生回数 (Apnea counts / 4 hr), 呼吸頻度 (Breath / min) について *Mecp2^{-/-}* と wild で解析を行った。無呼吸の検出には, 解析プログラムが持つ呼吸波形の弁別アルゴリズムによる自動検出機能を用いた。

4. VMAT2 の免疫組織学的検出

生後8週 of *Mecp2^{-/-}* ならびに wild についてペントバルビタール (100 mg/kg) の腹腔内投与にて安楽死させた後, 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し, スクロース置換後, 25 μ m の厚さで薄切標本を作製した。ブロッッキング後, 切片を一次抗体 (Rabbit Anti-VMAT2, 1:1000, Phoenix pharmaceuticals, inc., CA) と4°C, overnight でインキュベートした後, 二次抗体 (ヒストファイニンシンプルスチン MAX-PO (R), ニチレイ) と室温にて60分間反応させ, VECTASTAIN DAB Substrate Kit (SK-4100, VECTOR LABORATORIES, INC. MI) で発色させた。

呼吸機能等の自律神経調節に関与している dorsal motor nucleus of the vagus (DMV), 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) について, obex より 0.2mm 吻側の位置で, それぞれ 156 μ m \times 200 μ m の範囲内にある VMAT2 陽性 puncta 数を, 画像処理ソフトウェア (ImagePro7.0) を用いて数えた。

5. 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 18-7 2006 歯 007-1, 007-2)

C. 研究結果

(1) 行動量

12:12 の明暗条件下で, *Mecp2^{-/-}* は24時間周期の明瞭な自発行動リズムを示した。しかしながら行動量は wild に比べ少なく, 毎日の行動開始時間にばらつきが認められた。*Mecp2^{-/-}* と wild の比較で, 明暗環境への同調能力に基本的な違いは認められなかった。*Mecp2^{-/-}* と wild それぞれの明暗条件と恒暗条件での12時間毎の行動量を比較したところ, 自発行動量に対する光環境の違いによる影響はなかった。

(2) 無呼吸回数

Mecp2^{-/-} と wild の無呼吸回数の比較では, どの時間帯においても *Mecp2^{-/-}* で回数が多かった。wild では無呼吸回数が一日を通じてほぼ一定であったのに対し, *Mecp2^{-/-}* の無呼吸回数は暗期に比べ明期で有意に多かった ($p < 0.01$, Bonferroni 法)。明暗条件下と恒暗条件下の比較で, *Mecp2^{-/-}* について明暗条件下では24時間の変動が有意であったのに対し (one-way ANOVA 法), 恒暗条件下では有意な変動はみられなかった。なお wild では明暗条件下と恒暗条件下で無呼吸回数の違いは認められなかった。

(3) 呼吸頻度

呼吸頻度について, 明期, 暗期ともに *Mecp2^{-/-}* は wild に比べ低い値を示した。*Mecp2^{-/-}* ならびに wild ともに, 呼吸頻度は暗期で高く明期で減少する明瞭な日内変動を示した。両者について, 恒暗条件下においても明期に相当する7:00~19:00に呼吸頻度が減少しており, 日内変動に関して光環境の影響はみられなかった。

(4) VMAT2陽性puncta数

MeCP2^{-/-} と wild それぞれについて, DMV, NST, VRG における VMAT2 陽性 puncta 数を測定し比較したところ, いずれの部位についても *MeCP2^{-/-}* では wild に比べ puncta 数の著しい減少がみられた。

D. 考察

(1) MeCP2欠損とサーカディアンリズム

Mecp2^{-/-} の行動量は wild よりも少なかったが, 明暗環境への同調能力に基本的な違いは認められなかった。また自発行動量に対する光環境の違いによる影響もみられなかった。この結果は, サーカディアンリズムの振動を作り出している中枢が, *Mecp2^{-/-}* においてもおおむね正常に機能しており, 無呼吸が頻発する生後7週の時点でもリズムが維持されていることを示している。

(2) *Mecp2^{-/-}* の呼吸異常の日内変動

wild では無呼吸回数が一日を通じてほぼ一定であったのに対し, *Mecp2^{-/-}* の無呼吸回数は暗期に比べ

明期で多く、明瞭な 24 時間変動が認められた。*Mecp2*^{-/-}の無呼吸回数が夜行性動物であるマウスにとっての活動期である暗期ではなく休息期である明期に多いという結果については、Rett 症候群患者の無呼吸発作のほとんどが活動期である日中に出現することと矛盾しているようにみえるが、昼行性、夜行性にかかわらず、光は交感神経系を刺激することから、明期の光刺激が自律神経系に影響して呼吸を不安定化させている可能性が考えられ、今後検討が必要と思われる。

(3) *Mecp2*^{-/-}におけるモノアミン作動性神経の変化

呼吸中枢における VMAT2 発現の免疫組織学的検討を行った結果、DMV, NST, VRG のいずれの部位についても *MeCP2*^{-/-}では wild に比べ生後 8 週において VMAT2 陽性 puncta 数の著しい減少がみられた。このことは、*MeCP2*^{-/-}において呼吸中枢でのモノアミン作動性ニューロンによる調節系に異常が生じ、その結果として呼吸リズムパターンの形成あるいは安定化が障害されたことを示唆している。

E. 結論

MeCP2 欠損はマウスの自発行動および呼吸頻度のサーカディアンリズムには影響しないが、*Mecp2*^{-/-}では明暗条件下で明期において無呼吸の発生回数が増加することが明らかになった。この明期の無呼吸の増加には、延髄呼吸中枢でのモノアミン神経系の異常と、自律神経性呼吸調節への光刺激の影響が関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. Insulin facilitates

repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen activated protein kinase cascade.

Neuroscience 2010;170:1199-1208.

2. Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, Iwata K, Shirakawa T. In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint. *Oral Dis* 2011: in press.
3. Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ. CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells Dev* 2011: in press.
4. 和田崇, 滝口旗一, 武内倫子, 黒木洋祐, 関信幸, 高森一乗, 白川哲夫. *Mecp2* 欠損 Rett 症候群モデルマウスにみられる呼吸の異常と病態変化. *障歯誌* 2010;31:730-736.
5. 白川哲夫 スペシャルニードの子どもたちへの歯科医療・病診連携. *小児歯誌* 2010;48(2);40.

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。

非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の分子機能及び遺伝子変異による病態機序の解析

研究分担者 伊藤 雅之 国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第2部 室長
研究協力者 田中 輝幸 東京大学大学院医学研究科国際保健学 発達医科学 准教授

研究要旨

乳児期発症のてんかんを伴う非典型レット症候群の原因遺伝子CDKL5の分子機能と遺伝子変異による病態機序の解明を目的として、私は酵母ツーハイブリッド法を用いたCDKL5相互作用蛋白の同定と、*Cdk15* ノックアウト (KO) マウスの作製及び表現型解析を行った。酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、N末端側キナーゼ領域に対して19個、C末端側領域に対して2個の、イオンチャンネル、細胞骨格、モーター蛋白、核内因子を含む、相互作用蛋白候補を同定した。また新規に作製した*Cdk15* KOマウスの表現型解析により、大脳神経細胞における樹状突起スパインの異常と、脳内遺伝子発現の変化を同定した。今後更に解析を深め、CDKL5の分子作用ネットワークと loss-of-function機構の解明から、レット症候群の病態機序の解明を進めて行く。

A. 研究目的

Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) 遺伝子は、N末端側に Mitogen-activated kinases (MAPKs) 及び Cyclin-dependent kinases (CDKs) と相同性のあるキナーゼ配列を持つセリン・スレオニン・キナーゼをコードする遺伝子である。当初 CDKL5 遺伝子と疾患との関連は不明であったが、2003 年以降、乳児期発症のてんかんを伴う非典型レット症候群 女児における遺伝子変異の報告が相次ぎ、CDKL5 遺伝子はてんかんを伴う発達障害の原因遺伝子として近年注目を集めている。しかし、その神経発達における分子機能、及び遺伝子変異による神経病理学的機序はほとんどわかっていない。

CDKL5 の脳神経系発達における分子機能と機能異常病態の解明を目指し、酵母ツーハイブリッドスクリーニングを用いた相互作用蛋白の同定と、CDKL5 ノックアウト (KO) マウスの作製による *in vivo* loss-of-function 機構解析を行った。

B. 研究方法

1. CDKL5 相互作用蛋白の同定

Clontech Matchmaker GAL4 Two-Hybrid System 3 を用い、(1) CDKL5 N末端側キナーゼ領域のキナーゼ不活性型変異体、(2) 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 (pGBKT-CDKL5-N, pGBKT-CDKL5-C) を作製した。

マウス脳 cDNA Library (Clontech) と、

pGBKT-CDKL5-N、pGBKT-CDKL5-C で形質転換した AH109 株をそれぞれ接合させて、相互作用スクリーニングを行った。

2. CDKL5 KO マウスの作製と解析

Cdk15 遺伝子の exon を loxP ではさんだ conditional targeting vector を構築し、TT2F マウス ES 細胞へ導入、相同組み換え体 ES 細胞株を選択し、それらの ES 細胞株よりキメラマウスを作製した。キメラマウスの交配により *Cdk15* flox マウスを取得し、flox マウスと CAG-Cre マウスとの交配により、*Cdk15* KO マウスを作製した。

KO マウスの、体重及び脳重量測定、Nissl 染色による脳の細胞構築、けいれん誘発試験、大脳ゴルジ染色による樹状突起スパイン解析、更に DNA マイクロアレイを用いて、脳内遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果

1. 酵母ツーハイブリッドスクリーニング

酵母ツーハイブリッドスクリーニングにより、CDKL5 N末端側キナーゼ領域で 19 個、C末端側で 2 個の相互作用蛋白候補を同定した。これらの蛋白には、微小管関連蛋白、細胞質モーター蛋白、シナプス関連蛋白、イオンチャンネル、転写因子、などが含まれていた。

2. *Cdk15* KO マウス

TT2F マウス ES 細胞を用いたジーンターゲティング

法によって、*Cdk15 flox* マウスを作製し、CAG-Cre マウスとの交配によって、*Cdk15* KO マウスを獲得した。

Cdk15 KO マウスの、一般的所見、てんかん原性、樹状突起スパイン、脳内遺伝子発現変化について解析を行い、ゴルジ染色を用いたスパイン解析で、野生型と比べて変化を認めた。マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析では、野生型と比較して発現量に差のある遺伝子を複数個同定した。

D. 考察

酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、21個のCDKL5相互作用蛋白候補が得られた。酵母ツーハイブリッド法は、蛋白質間の直接結合を検出出来る優れた方法であるが、偽陽性の可能性、酵母内における反応という特殊性があり、本結果は他の系を用いて再確認する必要がある。今後これら蛋白の、CDKL5相互作用の検証と機能解析を行う。

Cdk15 KO マウスの表現型解析によって樹状突起スパインの異常を認め、KO マウスにおけるシナプス機能異常が示唆された。今後より詳細にスパインの形態解析を行い、*Cdk15* とスパイン、シナプスの成熟との関連を明らかにし、更に電気生理学的手法、マウス行動解析などにより機能との関連を明らかにしていく予定である。

E. 結論

酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって、21個のCDKL5相互作用蛋白候補が得られた。*Cdk15* KO マウスの作製と解析によって、神経細胞樹状突起ス

パインの異常と、脳内遺伝子発現の変化が認められた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

1. 奥田耕助, 渡邊紀, 水口雅, 田中輝幸. 難治性てんかんと発達遅滞の原因遺伝子 CDKL5 の相互作用の探索. 第 33 回日本神経科学大会 2010.9.2 (神戸)

2. 田中輝幸, 渡邊紀, 奥田耕助, 縣千聖, 佐藤天平, 上野寛枝, 浅原弘嗣, 水口雅. West 症候群・非典型 Rett 症候群の原因遺伝子 CDKL5 の機能解析. 第 51 回日本神経病理学会総会学術研究会 2010.4.23 (東京)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

分担研究報告書

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

分担研究者	松石豊次郎	久留米大学医学部	小児科学講座	教授
研究協力者	西 芳寛	久留米大学医学部	生理学講座	講師
	原 宗嗣	久留米大学	高次脳疾患研究所	大学院
	高橋 知之	久留米大学	高次脳疾患研究所	准教授
	岡部 恭典	久留米大学医学部	生理学講座	助手

研究要旨

われわれは以下の2つの研究を進めてきた。1. ヒトのレット症候群(RTT)におけるグレリンの役割研究では、RTT患者の血漿中グレリン濃度は年齢依存性に低値となり、健常群とは異なる分布を示した。臨床症状では食行動異常を有するもの、便秘を有するものではさらに低値を示した。また血漿中グレリン濃度、血清中 IGF-1 濃度と頭囲において各々相関関係は有意であった。血漿中グレリン濃度は RTT の病態を反映した有力な生化学的指標となる事が示唆された。2. 昨年度より、MeCP2 を欠失した RTT モデル ES 細胞の樹立を行ない、MeCP2 欠失 ES 細胞の未分化・分化状態における特性解析を行なった。MeCP2 欠失 ES 細胞はコントロールの ES 細胞と比較して、その未分化維持能、神経分化能に異常が認められず、MeCP2 遺伝子は 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ことを示した。一方、MeCP2 欠失 ES 細胞から誘導した神経細胞は電気生理学的な成熟が不十分であったことから、MeCP2 遺伝子は神経細胞の成熟・機能発現過程で重要な役割を担う可能性を見出している。本年度は、MeCP2 欠失 ES 細胞の分化状態の更なる解析を進めるとともに、MeCP2 欠損 iPS 細胞の樹立を試みた。

A. 研究目的

1. グレリン研究：レット症候群(RTT)は、成長発達障害、自律神経障害、自閉傾向をきたす小児神経疾患である。責任遺伝子として MeCP2 遺伝子が同定されている。近年、本邦において神経内分泌ホルモン「グレリン」が発見され、成長、空腹感、消化管の蠕動運動に対して促進作用を有することが解明された。グレリンのこれらの生理作用と RTT の機能障害との関連が推定される。本研究では RTT 患者の血漿中グレリン濃度を健常群と比較する。また、同疾患の臨床症状と血漿中グレリン濃度との関連について調べる。さらに血清中の成長関連因子 (GH、IGF-1) と血漿中グレリン濃度の相関関係を調べ、これらの物質と身体測定値との関連性を検討する。本研究を通じて、血漿中グレリン濃度の測定が、RTT の病態マーカーとして有用であるか否かについて検討する。

2. RTT モデル ES 細胞を利用することで、RTT 症候群の発症メカニズムを解明することを目的としている。本研究により、RTT 発症における MeCP2 遺伝

子の神経初期発生過程における機能的役割の解明が期待されるとともに、未分化幹細胞における MeCP2 遺伝子の解析が可能となり、近年成体の脳組織にもその存在が示されている神経幹細胞における MeCP2 遺伝子の機能を理解するための一助となると期待される。また、近年発見された iPS 細胞は、将来患者由来の iPS 細胞を樹立する事で、患者の細胞そのものを利用した病態メカニズムや治療薬、治療法の研究が期待されており、RTT モデルマウスの iPS 細胞を樹立・解析する事は、臨床応用への重要なステップと考えられる。

B. 研究方法

1. 久留米大学の小児科外来でフォローアップされている 27 症例の女兒の RTT 患者より早朝空腹時の採血を施行した。血漿中のグレリン濃度について 3 種類の測定系 (N-RIA, C-RIA, D-RIA) を用いて測定した。血漿中グレリン濃度のうち平均値±2 標準偏差の範囲外のは外れ値とした。正常コントロールとして同年齢女兒の 55 症例の血漿中グレリン

濃度を測定し、RTT 症例 (27 症例) と比較検討した。調査票を用いて上記の RTT 症例の身体所見 (身長、体重、BMI、頭囲)、臨床症状 (食行動異常、便秘、四肢冷感、てんかん、投薬内容ほか) と血中グレリン濃度との関連について検討した。RTT 患者の MeCP2 遺伝子変異についても確認、同定した。

(倫理面への配慮等)

RTT 正常コントロールおよび実験方法は全て学内の倫理委員会の承認を得て施行した。

2-1. RTT モデル ES 細胞の神経分化と RTT モデル ES 細胞由来神経細胞の解析

RTT モデル ES 細胞は、X 染色体ゲノム上の MeCP2 が loxp 配列で挿まれており、Cre リコンビナーゼ酵素によって MeCP2 遺伝子を完全に欠失する。そこで昨年度までに、Cre リコンビナーゼを発現するアデノウイルスベクター (Ad. CA-Cre) を感染し、MeCP2 を欠失した MeCP2 欠失 ES 細胞を樹立した。この RTT モデル ES 細胞を神経分化誘導法 (stromal cell-derived inducing activity, SDIA)、によって神経分化誘導し、その神経系細胞への分化能の評価を行なった。

2-2. RTT モデル iPS 細胞の樹立と特性解析

本施設では、Bird A. ら (Nat Med 2001;27:322-6.) によって作製された MeCP2 欠損 RTT モデル動物を維持しており、この MeCP2 欠損 RTT モデルマウス由来の iPS 細胞の樹立を行なった。雄の新生仔マウス (wild-type: control & Hemizygous) の尾部を採取し、一部は遺伝子解析に、残りの組織から初代培養の線維芽細胞を得た。この線維芽細胞に対してレトロウイルスに組み込まれた山中 4 因子を導入し、ES 細胞継代用培地にて 10 日程度培養した結果、ES 細胞用の iPS 細胞コロニーが出現した。このコロニーを単離し、iPS 細胞を得た。

(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」
- ・「ヒト組織由来幹細胞と胚性幹 (ES) 細胞による目的細胞分化誘導法の確立と再生医療技術の開発」
- ・「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」

C. 研究結果

1. (a) RTT 症例と健常群との比較および症状との関連

データの概観を理解する目的で、t 検定による RTT と健常者の群間比較を行なった。身体測定値では、体重 (RTT : 27.9 ± 11.7 kg vs. Control: 40.3 ± 16.0 kg, $p < 0.01$)、BMI (RTT: 15.4 ± 3.5 kg/m² vs. Control: 18.7 ± 3.3 kg/m², $p < 0.01$)、身長 (RTT: 131.8 ± 19.3 cm vs. Control: 142.4 ± 23.4 cm, $p < 0.05$)、頭囲 (RTT: 50.4 ± 2.5 cm vs. Control: 52.4 ± 3.1 cm, $p < 0.01$) について、RTT 患者では健常群より有意に低値を示した。この条件で、血漿中グレリン濃度は Total-Ghrelin (RTT: 113.5 ± 51.9 fmol/ml vs. Control: 215.5 ± 115.0 , $p < 0.01$)、Active-Ghrelin (RTT: 16.9 ± 8.3 fmol/ml vs. Control: 26.4 ± 14.3 , $p < 0.01$) であり、両者とも健常者群と比較して RTT 群では低値であった。

これまでの研究から、グレリンは年齢や成長にもなって、その血中濃度が変化する事が示されている。そこで、より詳細に、年齢と血中グレリン濃度の関係を示すために加法モデル (スプライン) を用いた検定を行なった。その結果、血漿中グレリンは RTT 群、健常群ともに思春期までは減少するが、その後は RTT では減少、健常群では増加する傾向が認められた。

(b) RTT 症例間の内訳と血漿中グレリン濃度

RTT 症例の臨床症状の内訳は食行動障害 7 名 (25.9%)、便秘 14 名 (51.9%)、中途覚醒 18 名 (66.7%)、異常呼吸パターン 17 名 (63.0%)、四肢冷感 22 名 (81.5%)、てんかん 23 名 (85.2%) だった。

Total-Ghrelin 濃度は、食行動異常 (有 7 名: 56.5 ± 20.9 fmol/ml, $p < 0.01$ vs. 無 20 名: 133.5 ± 44.0)、便秘 (有 14 名: 93.5 ± 58.2 fmol/ml, $p < 0.05$ vs. 無 13 名: 135.1 ± 34.7) の症状を示す場合に有意に低値を示した。同様に、Active-Ghrelin 濃度も、食行動異常 (有 7 名: 11.5 ± 7.5 fmol/ml, $p < 0.05$ vs. 無 20 名: 18.8 ± 7.8) と便秘 (有 14 名: 93.5 ± 58.2 fmol/ml, $p < 0.05$ vs. 無 13 名: 135.1 ± 34.7) の症状を示す場合に有意に低値だった。一方、ジェノタイプや四肢冷感、てんかんでの検定では有意差は示さなかった。

また RTT における身体測定値や成長関連因子との相関関係を検討し RTT 症例の血漿中グレリン濃度は Total-Ghrelin, Active-Ghrelin とともに年齢 (Total-Ghrelin: $r = -0.40$, $p < 0.05$, Active-Ghrelin: $r = -0.36$, $p < 0.05$)、体重 (Total-Ghrelin: $r = -0.59$, $p < 0.01$, Active-Ghrelin: $r = -0.48$, $p < 0.01$)、頭囲 (Total-Ghrelin: $r = -0.66$, $p < 0.01$, Active-Ghrelin: $r = -0.49$, $p < 0.01$) と有意な相関関係を示した。血漿中グレリンと成長関連因子との

相関関係は Total-Ghrelin と Active-Ghrelin で $r=0.67$, $p < 0.01$, 一方血清中 GH と IGF-1 では $r=0.51$, $p < 0.01$ で有意な相関関係を示した。Total-Ghrelin と血清中 IGF-1 でも有意な相関関係を示した (Total-Ghrelin: $r = -0.39$, $p < 0.05$)。

2-1. RTT モデル ES 細胞の神経分化と RTT モデル ES 細胞由来神経細胞の解析

昨年度までに、MeCP2 遺伝子の神経分化初期過程における機能的役割を解明するために、MeCP2 欠損 ES 細胞における SDIA 法による神経分化の誘導を行なった。その結果、MeCP2 遺伝子の有無に関わらず、神経分化初期や神経幹細胞のマーカーである Nestin 発現コロニーや神経分化マーカーの Neuron-specific tubulin beta type3 (TuJ)、ドーパミン産生神経細胞をマーカーである Tyrosine Hydroxylase (TH) 発現コロニーの出現が認めれ、MeCP2 欠損は ES 細胞の神経細胞やドーパミン産生細胞の発生・分化に影響しない事が示された。そこで、本年度は更に詳細に、MeCP2 欠損 ES 細胞の神経分化を神経細胞に限らず、グリア細胞等、神経関連の様々な分化マーカーによる評価を行なった。グリア細胞のマーカー分子として知られる GFAP 陽性コロニーの出現が MeCP2 欠損 ES 細胞で促進する事が明らかとなった。以上の結果から、MeCP2 は ES 細胞の神経分化過程において、グリア細胞の発生・分化を制御している可能性が示唆された。

2-2. RTT モデル ES 細胞の樹立と未分化過程における特性解析

雄の新生仔 RTT モデルマウス由来の線維芽細胞にレトロウイルスベクターにより山中 4 因子を導入後、10 日間培養する事によって、多数の ES 細胞用コロニー (iPS 細胞コロニー) を得る事に成功した。iPS 細胞株を数十クローン単離培養し、genomic PCR による MeCP2 アレルのスクリーニングをする事によって、MeCP2 を完全に欠質した iPS 細胞が得られた事を確認した。また、更に得られた個々のクローンにおける未分化マーカー遺伝子の発現や多分化能を評価することによって、品質の良い iPS 細胞のクローニングに成功した。以上のことから、近年、MeCP2 遺伝子は未分化細胞のエピジェネティクスに関わる可能性が示されているが、MeCP2 欠損 iPS 細胞の樹立は可能で、ES 細胞の場合と同様に、MeCP2 は iPS 細胞の未分化維持や旺盛な増殖能に必須でないことが示された。

D. 考察

1. 健常者の血漿中グレリン濃度は生後から乳児期まで増加し、その後減少に転じるが、思春期以降では再び年齢依存性に増加する。これに対して、RTT では 10 歳以降は、更に低下し、全く異なったパタ

ーンを示した。また健常者では、血漿中グレリン濃度は体重、BMI や身長との逆相関があるが、RTT では相関関係が認められなかった。これは年齢依存性に認められるものの、RTT における低身長、痩身など身体測定値は、血漿中グレリン濃度に反映していないことを示しており、RTT におけるグレリン抵抗性や二次的なグレリン産生低下が示唆された。これに関連して、とりわけ食行動異常や便秘の RTT では、症状特異的にグレリンの低値を示した。興味深い事に、視床下部の核間でも、グレリン産生細胞が存在し、摂食関連ペプチドを介して摂食を促す事が示されている。また近年、視床下部特異的な MeCP2 欠損マウスにおいて過食や肥満が認められ、また、MeCP2-KO や Tg マウスにおいて視床下部における遺伝子発現制御の異常が認められている。以上の事から、RTT における血中グレリン濃度の低値は自律神経系の失調、とりわけ視床下部機能の障害を反映していると考えられる。

近年、グレリンは神経細胞や神経幹細胞の増殖を促進することが示されている。一方でグレリンは GH 分泌促進を介して、血中 IGF-1 を維持する。また近年血中並びに髄液の IGF-1 と自閉症や頭囲との関連が指摘されている (Huppke et al., 2001; Riikonen et al., 2008)。興味深いことに、身体測定値の中でも頭囲に関しては、RTT における血漿中グレリン濃度と逆相関が得られた。このことから、グレリンは直接、あるいは IGF-1 の誘導を介して脳神経の発達にかかわる可能性も示唆される。

一方、血中グレリンは主に胃で産生される。RTT は、成長障害が認められるものの、これまでの剖検例から胃のサイズや組織的な異常は認められていない (Armstrong et al., 2001)。また、血漿中 Active-Ghrelin は胃の GOAT によって修飾されるが、健常群に比較して RTT では Total-Ghrelin 濃度と Active-Ghrelin 濃度は低値を示すものの、O/T 比に有意な差は認められなかった。これは胃本来のグレリンの産生や修飾機能は正常に働くことを示唆している。従って、胃の機能異常よりは、むしろ産生を命令する上位の神経系、即ち自律神経系の障害により、グレリン産生が低下している可能性が考えられた。

最近、グレリン投与による cachexic な状態や消化管機能障害の改善も報告されており、グレリンは RTT の症状改善薬として期待される。

2. これまで、RTT の病態メカニズムの研究は主に MeCP2 遺伝子が強く発現する神経細胞を中心として進められてきた。しかしながら、近年、MeCP2 遺伝子はグリア細胞にも発現する事、更には GFAP などグリア細胞で機能する分子の発現を制御する事が示されており。今回、昨年に引き続き MeCP2 欠損 RTT モデル ES 細胞の分化を評価したところ、GFAP

を発現するグリア細胞の分化が促進されるといった結果は今後、RTT の病態メカニズム解析を行なう上で重要な知見となると思われる。今後は、神経細胞のみならず、グリア細胞における MeCP2 の機能的役割を解析も行ないたいと考えている。

また、昨年度からの RTT モデル ES 細胞を利用した研究成果から、iPS 細胞を利用した場合でも、重要な知見が得られる可能性が高まった。多様な遺伝子のエピジェネティックな制御に関わる MeCP2 は iPS 細胞の樹立においても一役買っている可能性が示唆されていたが、今回、RTT モデルマウスから RTT モデル iPS 細胞の樹立に成功したことで、MeCP2 の有無は iPS 細胞の誘導には影響しない、または影響する場合でも、他の遺伝子により代用出来る可能性が示唆される。本年度は、いくつかの品質の良い iPS 細胞を樹立することが出来たので、今後は実際に RTT モデル iPS 細胞を利用した分化研究を進める事で、RTT 研究における iPS 細胞の有用性を示すとともに、患者由来 iPS 細胞の樹立等、臨床応用を目標として研究を進めたいと考えている。

E. 結論

1. RTT で血中グレリン濃度の低下が確認された。グレリン作用の低下が、同症候群の臨床症状の発現に一部関与している可能性が推定された。血中のグレリン濃度の測定は、RTT の臨床病態と一定の相関を示すことから、同疾患の病態を反映するマーカーとしての利用が期待される。

2-1. RTT モデル ES 細胞の神経分化誘導において、GFAP 陽性グリア細胞の分化が促進されており、MeCP2 はグリア細胞の分化を制御している可能性が示唆された。

2-2. MeCP2 欠損マウスから、RTT モデル iPS 細胞を確立する事ができた。RTT モデル iPS 細胞は、ES 細胞と同様に、LIF 存在下で強い増殖能を維持し、未分化マーカーを発現していた。この事から、MeCP2 遺伝子は iPS 細胞の樹立や iPS 細胞の増殖、未分化能の維持には必ずしも必要でない可能性が示され

た。

F. 健康危険情報
なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Okabe Y, Kusaga A, Takahashi ., Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K. Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. *Brain Res* 2010;1360;17-27.

2 Matsuishi T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Takahasi T. Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives. *Brain Dev* 2011 (in press)

2. 学会発表

1. 松石豊次郎. Rett 症候群に学ぶ—臨床・基礎研究からの 22 年と今後の展望— 第 52 回日本小児神経学会 会長講演 2010.5.20 (福岡)

2. 原宗嗣、葉純子、西芳寛、山下裕史朗、児島将康、松石豊次郎ほか. レット症候群における血漿中グレリン濃度の検討. 第 52 回日本小児神経学会 2010.5.20 (福岡)

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の妥当性を我々が臨床的に診断した症例において検討した。その結果、いずれの診断基準も必ずしも十分とは云えなかった。本症は特異な神経発達障害であり、その診断には病態に基づいた症状とその年齢依存性の出現と経過を基に診断することが大切である。それにより可及的に早期の診断と治療が可能となると考えられる。

A. 研究背景と目的

レット症候群(RTT)は当初乳児期後期に発症する退行性の疾患と考えられた。我々は臨床的特徴の詳細な検討、終夜睡眠ポリグラフによる睡眠要素の解析から本症は乳児期早期に発症する特異な神経発達障害であることを初めて報告した。その後この考えは世界的に賛成されることとなった。1999年、その病因遺伝子としてMethyl CpG binding protein2遺伝子(MECP2)が解明され、本症が特異な神経発達障害である事が分子生物学的にも確認された。以来、基礎的な研究には目覚ましいものがある。また、臨床的にRTTと診断された症例で、MECP2の変異が検出出来ない症例、また、MECP2の変異があるが臨床的にはRTTとは異なった症状を呈する症例が報告されてきており、RTTの診断に関して議論がなされている。

これまで複数の診断基準が提唱されている。本研究はこれらのRTTの診断基準について検討し、より早期の正しい診断に関しての考えを述べる。

B. 研究方法

1. これまで提唱されている診断基準の妥当性について検討した。

2010年8月までに瀬川小児神経学クリニックを受診し、レット症候群、レット症候群疑いの患者を抽出し、それらにつき遺伝子検査実施の有無、その結果を確認、MECP2遺伝子変異有り群と変異無し群の両群に分けた。

これらの患者につき、1985年、1988年、2010年の

レット症候群診断基準に沿って適合の可否を調査した。但し、2002年の診断基準は基本的には2010年のものとほぼ同じ方針であり、割愛した。以下にそれぞれの診断基準を記す。

(1) 1985年の診断基準

Hagberg B, Goutières, Hanefeld F, Rett A, Wilson J. Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. Brain Dev 1985;7:372-3.

Rett syndrome:

Criteria for Inclusion and Exclusion 1985

Rett syndrome: diagnostic criteria for inclusion

- 1 Female sex
 - 2 A normal pre-and perinatal period;essentially normal psychomotor development through the first 6, often 12-8 mos of life
 - 3 Normal head circumference at birth Deceleration of head growth (and therefore by inference,brain growth)between 6 mos-4yrs of age
 - 4 Early behavioral, social and psychomotor regressin (loss of achived abilities);development of communication dysfunction and signs of dementia
 - 5 Loss of acquired purposeful hand skill through ages1-4
 - 6 Hand wringing-clapping-"washing hand" stereotypees appearing between ages 1-4
 - 7 Appearance of gait apraxia and truncal apraxia/ataxia through ages 1-4
 - 8 Diagnosis tentative until 3-5 yrs of age
- Rett syndrome: criteria for exclusion at the present stage
- 1 Visceromegaly, other signs of organ storage
 - 2 Retinopathy or optic atrophy before 6
 - 3 Congenital microcephaly
 - 4 Perinatally acquired brain impairment

(Brain Dev 1985; 7:372-3)

(2) 1988年の診断基準

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

Diagnostic criteria for Rett syndrome 1988

Necessary Criteria

Apparently normal prenatal and perinatal period
 Apparently normal psychomotor development through the first 6 months
 Normal head circumference at birth
 Deceleration of head growth between ages 5 months and 4 years
 Loss of acquired purposeful hand skills between ages 6 and 30 months, temporally associated with communication dysfunction and social withdrawal
 Development of severely impaired expressive and receptive language, and presence of apparent severe psychomotor retardation
 Stereotypic hand movements such as hand wringing/squeezing, clapping/tapping, mouthing and "washing"/rubbing automatisms appearing after purposeful hand skills are lost
 Appearance of gait apraxia and truncal apraxia/ataxia between ages 1 and 4 years
 Diagnosis tentative until 2 to 5 years of age

Supportive Criteria

Breathing dysfunction
 Periodic apnea during wakefulness
 Intermittent hyperventilation
 Breath-holding spells
 Forced expulsion of air or saliva
 EEG abnormalities
 Slow waking background and intermittent rhythmical slowing(3-5 Hz)
 Epileptiform discharges, with or without clinical seizures
 Seizures
 Spasticity, often with associated development of muscle wasting and dystonia
 Peripheral vasomotor disturbances,
 Scoliosis
 Growth retardation
 Hypotrophic small feet

Exclusion Criteria

Evidence of intrauterine growth retardation
 Organomegaly or other signs of storage disease
 Retinopathy or optic atrophy
 Microcephaly at birth
 Evidence of perinatally acquired brain damage
 Existence of identifiable metabolic or other progressive neurological disorder
 Acquired neurological disorders resulting from severe infections or head trauma

(Ann Neurol 1988; 23:425-428)

(3) 2002年の診断基準

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. European Journal of Pediatric Neurology 2002;6:0611. 1-5.

(4) 2010年の診断基準

Neul J, Kaufmann W, Glaze D, et al. Rett syndrome: Revised Diagnostic Criteria and Nomenclature. Ann Neurol 2010;68:944-950.

RTT Diagnostic Criteria 2010

Main Criteria

- 1 Partial or complete loss of acquired purposeful hand skills
- 2 Partial or complete loss of acquired spoken language
- 3 Gait abnormalities: impaired (dyspraxic) or absence of ability
- 4 Stereotypic hand movements such as hand wringing/squeezing, clapping/tapping, mouthing and washing/rubbing automatisms

Exclusion Criteria

- 1 Brain injury secondary to trauma (peri- or postnatally), neurometabolic disease, or severe infection that causes neurological problems
- 2 Grossly abnormal psychomotor development in first 6 months of life

Supportive Criteria atypical RTT

- | | |
|-------------------------------------|---|
| 1 Breathing disturbances when awake | 6 scoliosis/kyphosis |
| 2 Bruxism when awake | 7 Growth retardation |
| 3 Impaired sleep pattern | 8 Small cold hands and feet |
| 4 Abnormal muscle tone | 9 Inappropriate laughing/screaming spells |
| 5 Peripheral vasomotor disturbances | 10 Diminished response to pain |
| | 11 Intense eye communication - "eye pointing" |

Ann Neurol, 2010;68:944-950)

2. 結果の判断基準は次のようにした。

正常な妊娠・分娩の基準については、胎児仮死、常位胎盤早期剥離で緊急帝王切開。アプガースコア 1、3日に及ぶ遅延分娩など明らかなものは異常とした。臍帯巻絡 2 回、早期破水、遅延分娩等あっても、特に異常の記載または報告の無い場合は妊娠、分娩時異常なしとした。

定額が5ヵ月以後の場合、‘生後6ヵ月までの正常な発育’について異常と判断した。

出生時の頭囲については、31.5cm以下を異常とした。

3. 上記の検討結果を踏まえ、診断のガイドラインを検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は瀬川小児神経学クリニックの倫理規定を遵守して行った。患者本人、患者本人が未成年の場合、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

1. 2010年8月までに瀬川小児神経学クリニックを受診し、レット症候群と診断した患者は206名であった。内111名にてMECP2の解析が行われていた。MECP2変異患者は83名であった。(71名は当院にて、12名は他院にて検査を施行されていた。)この内カルテの情報不十分であった患者3名を除外し、80名にて検討した。MECP2の変異が確認されなかった患者は28名であった。(23名は当院にて、5名は他院にて検査施行されていた。)

現時点で、検査未実施、また遺伝子変異が不明の患者は95名であった。この中には、レット症候群疑いの症例13名も含まれる。)

2. 1985年、1988年、2010年の診断基準により各項目の適合、不適合を調べた。

(1) 1985年の診断基準にて解析した結果を表1にまとめた。

(2) 1988年の診断基準にて解析した結果を表2にまとめた。

(3) 2010年の診断基準にて解析した結果を表3にまとめた。

表1

	-1985年-	MECP2変異有群			MECP2変異無群		
		適合	除外	不明	適合	除外	不明
1	性別は女	80	0	0	27	1	0
2	正常な妊娠・周産期の経過し、1歳から1歳6か月のうち、最初の6か月は本質的に正常な精神運動発達	57(86)	6	3	18(22)	4	1
3	出生時の頭囲は正常。6か月から4歳の間に頭部・腕の成長の減速	27(88)	6	25	7(17)	7	3
4	社会、精神運動の発達(できたことができなくなる)、認知のサインやコミュニケーションの発達の障害	79		1	10	4	14
5	1から4歳の間にすでに獲得していた目的を持った手の動きの消失	25	11	44	5	5	18
6	1から4歳の間にwringing-clapping(手をひねったり、たたき)手を洗うような常同的な手の動きの出現	64	11	5	21	3	4
7	1から4歳の間に歩行や移動の失行の出現	80	0	0	24	1	3

	MECP2変異有群	MECP2変異無群
1 胎児基準	25	10
2 内臓巨大症・袖の癒着のサインの貯留	0	0
3 6歳前に網膜症や視神経萎縮が見られる	0	0
4 先天性の小頭症	17	6
5 周産期に脳に障害を受けた	8	0

表2

-1988年-				MEQP2変異有群			MEQP2変異無群		
必要不十分な診断基準									
	適応	除外	不明	適応	除外	不明	適応	除外	不明
産産期は正常に経過	68	13	1	22	6	0			
生後6カ月までは正常に成長発達	67	10	3	19	7	2			
出生時の頭圍は正常	58	17	5	17	9	2			
55月から6歳の間に頭圍の異常な増進	38	8	38	13	7	8			
30ヵ月から6歳の間に獲得した運動的・手技的・社会的・コミュニケーションの障害や社会性の欠如	25	0	55	3	0	25			
言葉への反応に乏しく、重度の精神運動遅滞を示す	74	3	3	22	2	4			
意図的な手の機能が失われた後に、手のひねりやしぼり、手をたいたり、口に持っていったり、手を洗うようにこすり合わせるといった、常同運動を示す	64	11	5	21	3	4			
1歳から4歳の間に体幹の異常な運動失調や歩行障害が出現する	80	0	0	24	1	3			

	MEQP2変異有群	MEQP2変異無群
胎内から成長遅滞が見られる	25	10
体内から成長遅滞が見られる	0	0
器官の形成不全等の疾患の徴候がある	1	1
網膜症や後神経炎、出生時より小脳症	17	7
産産期に後天性脳障害の所見	8	1
すでにわかっている代謝性の疾患や他の神経疾患の存在	8	1
重症感染症または頭部外傷から生じている後天性神経障害	0	1

表3

-2010年-				MEQP2変異有群			MEQP2変異無群		
主要な基準									
	適応	除外	不明	適応	除外	不明	適応	除外	不明
獲得した有目的な手の機能の一部または完全な消失	80	0	0	12	3	13			
獲得した言葉の一部または完全な消失	80	0	0	10	2	16			
歩行障害:運動失調や歩行機能の欠如	80	0	0	28	1	1			
意図的な手の機能が失われた後に、手のひねりやしぼり、手をたいたり、口に持っていったり、手を洗うようにこすり合わせるといった、常同運動を示す	75	2	3	24	2	2			
主要な基準2つを満たす	80			28	1	1			

	MEQP2変異有群	MEQP2変異無群
胎内から成長遅滞が見られる	10	9
妊娠中や出産後に二次的に進んだ脳障害、神経代謝疾患、神経学的問題を引き起こす重症度の感染症	8	2
生後6カ月までの間の顕著な精神運動発達異常	10	7

3. 本研究での診断のガイドライン

我々は本症の臨床的特徴、即ち、特異な精神運動発達遅滞と本症に特有な症状が一定の年齢範囲に出現することに注目し、本症は乳児期早期に発症、特異な発達障害であることを提唱した。

乳児期早期には、おとなしく、筋緊張は低下している。睡眠覚醒リズムは異常で、乳児期早期より日中の睡眠時間が多い。これらの症状は大変軽微であり、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ある。即ち、四つ這い移動が出来ない、または遅れる、異常な屈曲パターンなどである。また、随意性の手の機能の獲得が遅れ、頭圍の拡大が減退する。

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。これらの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といえる。これらが本症にみられる自閉傾向といえる。

本症に最も特異な症状は随意性の手の機能の消失と同時に出現してくる手の常同運動である。この常同運動はしばしば上肢全体、口、舌、歯軋り、時に下肢を含むことも少なくない。

小児期初期よりジストニア性筋緊張が下肢から

出現し、ジストニア姿勢を呈してくる。経過と共に四肢、体幹のジストニア姿勢が進行してくる。後者は後彎、側彎であり、小児期から思春期にかけて進行することが多い。

頭圍の発達減退は減退し、小頭を呈してくる。本症に見る歩行はレット博士により失行と表現されたが、我々はロコモーションの障害と述べてきている。

癲癇もしばしば見られるが、その重症度は個人差がある。睡眠覚醒障害はしばしばみられ、突然笑ったり、泣いたりすることも少なくない。

本症に見られる呼吸障害は特異であり、息づめ、過呼吸、などであり、吞気のために異常な腹部の膨満をきたすことも多い。年齢と共にバルサルバ・マニューバー様を呈することもある。咀嚼障害、嚥下障害もしばしば見られる。便秘症もほぼ必発である。小児期になると足は冷たく、本症の自律神経障害である。身長、体重、手足の大きさも発達が停滞する。

極度の痩せ、時に肥満を見ることもある。

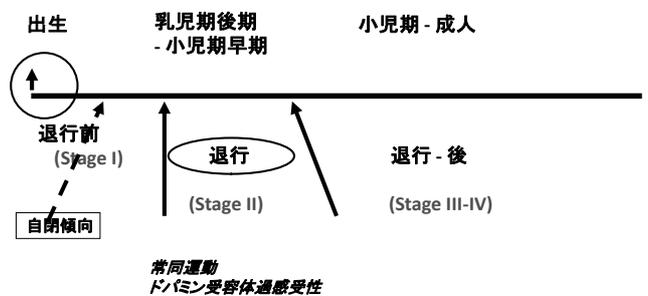
年齢依存性の症状出現

- 乳児期早期 (初発症状);
姿勢筋緊張低下、自閉傾向
- 乳児期後期;
ロコモーションの障害、頭圍停滞
- 早期小児期;
目的を持った手の運動機能の消失、常同運動の出現
筋緊張亢進、ジストニー、側彎
奇異呼吸、てんかん、精神遅滞
- 後期小児期-成人;
安定?

(Nomura et al. 1984)

我々が注目し、その病態との関連でも重要と主張してきている年齢依存性の変化は、ステージングとして述べられてきている (Hagberg and Witt-Engerström, Kerr)。

経年齢的臨床症状の推移



SNCC Tokyo

Correlation of the criteria proposed by Hagberg and Witt-Engerström 1986, and Kerr 2001

診断基準について

以上の如く、これまで提唱された診断基準を用い我々が臨床的にRTTと診断した患者、*MECP2* の変異有り無しとの両グループに於いてそのvalidity (妥当性) を検討した結果を示した。

項目ごとの差はあるが1985年、1988年の診断基準とも条件を満たさないものがかかり見られた。2010年の基準は変異を有する群ではほぼ満たされていたが、変異無し群では満たさない例があった。

D. 考察

本症の診断基準作成は詳細な臨床的特徴の解析と病態の関連を基礎に検討される必要がある。しかし、これまでの診断基準は、臨床的特徴の複雑さとその病態との関連に関する理解が十分でないために必ずしも十分とはいえない。

また、病因遺伝子の解明は本症の診断に重要なエポックをなすところとなったが、その変異は臨床的に診断された症例に必ずしもみられず、*MECP2* の変異を呈する他の疾患概念の報告が述べられてきており、今後更なる研究を要するところである。

今回は臨床的に我々がRTTと診断した患者を*MECP2* の変異有り群と無し群に分けてそのvalidity (妥当性) を検討したが、今後*MECP2* の変異を持ち、他の臨床症状を呈する患者、また他の疾患コントロール症例についての検討をし、比較することも、これらの診断基準の意味について、参考となると考えられる。

診断基準のそれぞれの項目が持つ病態との関連で検討していくことが本質的な事と考えられる。

E. 結論

レット症候群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。

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きているといえる。

しかし、改善を目指しこれまで試みられてきている診断基準は病態と関連づけたものとはいえない。

従って、可及的早期の正しい診断には経過中どの時点においても病態を常に理解したアプローチが欠かせないと云える。

そのためには所謂診断基準でなくRTTの場合特徴的な発達障害(粗大運動、巧緻運動、精神機能、情緒機能の発達)、本症に特徴的及び特異な症状が如何に年齢依存性に出現し、変化しているかに焦点を

あてて診察することにより適切な早期の診断が可能である。

その事により、早期の治療、介入が可能となると考えられる。

F. 健康危険情報

なし。

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;3:38-41.
2. 野村芳子. Rett症候群の運動発達. In: 五十嵐隆 総編集、久保田雅也 専門編集. 「小児科臨床ピクシス19」ここまでわかった小児の発達. 中山書店、2010 ; 159-163.
3. 野村芳子. レット症候群. 精神科治療学. 2010;25:264-265.
4. 野村芳子. レット症候群. 症候群ハンドブック. 中山書店 (印刷中)

2. 学会発表

1. Segawa M, Nomura Y. Approach to Neurotransmitter Disorders. 11th International Child Neurology Congress-ICNC-2010, Meet the experts session. May2-7, 2010, Cairo, Egypt.
2. Nomura Y. Rett syndrome and Neurodevelopment. The spring Congress of Korean Child Neurology Society. May 14, 2010. Incheon, Korea.
3. Nomura Y. Yukishuta S, Kimura K, Segawa M. Clinical Characteristics of Rett syndrome with silent mutation of *MECP2*. 11th Annual Rett syndromesymposium. Virginia, USA, June 27-29, 2010.
4. 野村芳子、瀬川昌也. レット症候群. 第18回日本レット協会サマーキャンプ. 国立信州高遠少年自然の家. 2010. 9. 18-20 (長野)

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

Rett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行っている。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。キメラマウスの交配から、F1・F2マウス樹立へと交配を継続している。また、Rett症候群患者に認められるMeCP2の突然変異を有するcDNA発現ベクターをL929マウス線維芽細胞に導入し、安定細胞株を分離してその発現を解析した。

A. 研究目的

Rett症候群の研究は、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、Rett症候群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Rett症候群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。

また、今年度はRett症候群患者に認められる変異を有したMeCP2遺伝子をGFP融合タンパク質としてL929マウス線維芽細胞に導入し、その安定発現株を単離し、変異MeCP2の核内局在パターンの検討を行った。

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クエ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し、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。

GFP 融合野生型 MeCP2 と、その MeCP2 遺伝子に R106W、Y120D、F155C、T158M の変異を有する発現ベクターを、Lipofectamine2000 を用いて L929 マウス線維芽細胞に導入し、緑色蛍光タンパク質を安定に発現する細胞株の単離を行った。

(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

ノックインベクターを導入し、目的の領域に組み込まれた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。

これらのうち高キメラマウスをC57BL/6マウスと交配させ、F1マウスを得た。さらに継代を重ね安定に導入遺伝子を引き継ぐF2マウスを獲ている。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。

GFP融合MeCP2の安定発現株を、それぞれの突然変異体に関して2株以上を単離することが出来た。MeCP2変異体は野生株に比較してその発現が低下しており、Rett症候群で認められる変異は細胞内でのMeCP2タンパク質の安定発現を阻害している可能性が示唆された。

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、すでにい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。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。

また、Rett症候群で認められる変異を有するMeCP2タンパク質は、その細胞内発現量が減少しており、Rett症候群発症の病態に示唆を与えるものと考えられる。

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。今後発現コントロールに関して検討を進める。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP. Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radiosensitivity and chromosomal instability. *Radiat Res* 2011;175:83-89.
2. Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E. NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II-alpha and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 2011 Jan 18. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. Kurimasa A, Okuda S, Okada A, Miyano Y, Tomimatsu N, Iwabuchi K, and Chen DJ, Live cell imaging and kinetics of DNA double-strand breaks (DSBs) foci in cycling U2OS cells. Keystone Symposia, Genomic Instability and DNA Repair (B4) Jan. 30-Feb. 4, 2011, Keystone Resort, Keystone, Colorado, USA

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。最近、自閉症やレット症候群患者の脳細胞で、母方と父方15番染色体の相互作用が15 q 11- q 13領域の適切な遺伝子発現にとって大変重要であることが示された。そこで、これらの領域の染色体相互作用がどのように制御されているかについて解析し、新たな治療法の開発へ発展させる。

A. 研究目的

15 q 11- q 13領域は、類縁疾患であるAngelman症候群（AS）やPrader-Willi症候群（PWS）の責任遺伝子座であり、メチル化CpG結合タンパク2（MeCP2）を介したエピゲノム機構によって遺伝子発現が制御されている。最近、レット症候群（RTT）や自閉症患者において15 q 11- q 13領域の核内配置の異常が報告され、MeCP2がエピゲノム機構を介した核内配置の制御に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、この15 q 11- q 13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PWS、自閉症などの類縁疾患の発症病態の解明へも発展させる。

B. 研究方法

神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞において15q11-q13領域の核内配置がどのように制御されているかDNA-FISH法で解析する。FISHプローブは、15q11-q13領域上の9つのBAC(Bacterial Artificial Chromosome)を蛍光ラベルし、解析に用いる。さらに、母方と父方15番染色体の相互作用がどのように制御されているかをMeCP2やCTCF、RAD21（コヒーシン）ノックダウンSH-SY5Y細胞を作製し、15q11-q13の核内配置を明らかにする。

（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

15q11-q13領域、約10Mbにわたり各々の遺伝子座の

核内配置をDNA-FISHで解析したところ、GAB受容体 β 3サブユニット*GABRB3*遺伝子近傍で特異的に相同染色体のペアリングが認められた。また、これらの母方と父方15番染色体の相互作用は、自閉症モデル細胞株では消失していた。さらに、MeCP2やCTCFのノックダウン細胞株でも同様に相同染色体のペアリングの異常が認められた。

D. 考察

MeCP2のノックダウン細胞株や自閉症モデル細胞株において母方と父方15番染色体の相互作用が消失し、*GABRB3*や*CHRNA7*遺伝子の発現異常が認められた。このことは、15 q 11- q 13領域における遺伝子発現制御にMeCP2を含めた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、さらに詳細なMeCP2を介した遺伝子発現制御機構を明らかにし、RTTの治療のターゲットとなる分子の同定を試みると共に、治療法の開発へ発展させる。

E. 結論

MeCP2による15 q 11- q 13領域の遺伝子発現制御機構を明らかにすることは、RTTの複雑な病態を明らかにする上で大変重要である。本研究では、*GABRB3*遺伝子近傍に相同染色体のペアリング領域を見出した。このペアリング領域には、MeCP2やCTCF結合領域も存在し、MeCP2を介した核内配置の制御がRTTのみならずASやPWS、自閉症など発症機序に関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hori N, Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S. Aberrant CpG Methylation of the Imprinting Control Region KvDMR1 Detected in Assisted Reproductive Technology-Produced Calves and Pathogenesis of Large Offspring Syndrome. *Animal Reproduction Science* 2010;122:303-312.
2. Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Fujisaki C, Qi DL, Ohhira T, Gilley D, Oshimura M, Kugoh H. (2010) Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integrity* 2010;1: 6.

2. 学会発表

1. 堀家慎一, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 目黒-堀家牧子. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第55回日本人類遺伝学会, 2010.10.27 -30 (大宮)
2. Horike S, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. The American Society of human Genetics, 60th Annual Meeting, November 3-6, 2010, Washington DC.
3. Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human

maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. *Epigenetics Europe*, September 14-15, 2010, Dublin, Ireland.

4. Horike S, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Meguro-Horike M. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. *Signalling to Chromatin*, September 7-10, 2010, Cambridge, UK.
5. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. *Sweden-Japan Joint Colloquium*, September 6-7, 2010, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
6. 目黒-堀家牧子, Leung KN, Yasui DH, 押村光雄, LaSalle JM, 堀家慎一 Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 第4回日本エピジェネティクス研究会 2010.5.28-29 (米子)
7. Meguro-Horike M, Leung KN, Yasui DH, Oshimura M, LaSalle JM, Horike S. Homologous pairing of chromosome 15q11-q13 is associated with significant disruption of gene expression in human maternal chromosome 15 microcell transferred neurons. 9th Annual International Meeting for Autism Research (IMFAR), May 20-22, 2010, Philadelphia, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

レット症候群モデルマウスの脳内カテコラミン・セロトニン産生神経細胞における発達に伴う機能障害に関する研究

研究分担者 井手 秀平 東京都立東部療育センター 医師

研究要旨

レット症候群ではカテコラミン・セロトニン神経系の異常が予想されているが、髄液検査などでは確定した結論は得られていない。我々は*Mecp2*-nullマウス（レット症候群モデルマウス）において脳内ノルエピネフリン濃度が生後4週以降に、脳内ドパミンとセロトニンに関しては6週以降に、野生型とくらべて低下することを示した。また免疫染色では、青斑核、黒質、縫線核におけるTH陽性細胞、TpH陽性細胞の数には変化を認めずこれらの神経細胞の脱落は起こっていなかった。二つの結果からレット症候群モデルマウスにおいて、カテコラミン・セロトニン産生神経細胞は4週以降の成熟が障害されるものと想像された。これらの結果はカテコラミン・セロトニンをターゲットにした治療やMECP2の機能を考える際に重要なものであると考えた。

A. 研究目的

レット症候群の典型例では、自閉傾向→常同的な手の運動→てんかん→筋緊張亢進、と臨床症状が乳児期より順序立てて出現する。野村と瀬川はこの臨床的特徴と生理学的研究から、セロトニン産生細胞の集まる縫線核とノルエピネフリン産生細胞の集まる青斑核が初発病変であり、その後にドパミン系の postsynaptic supersensitivity が現れると予想した (Nomura Y, Segawa M 1986)。

実際にレット症候群のカテコラミン・セロトニン神経系の障害があるのかどうかについて、レット症候群患者の髄液内 HVA, MHPG, 5 HIAA の測定がおこなわれているが、レット症候群で有意に低下するという報告 [Zoghbi (1989), Ramaekers (2001)] と正常範囲であるとする報告 [Riederer (1985), Perry (1988), Lekman (1990)] があり結論は出ていない。

本研究の目的は、レット症候群のモデルマウスである *Mecp2*-null マウスのモノアミン・セロトニンおよび代謝産物の脳内濃度を測定し、それらの濃度に野生型との差が出現するかどうか、また出現するならばどの時期にどの順番でおこるのかを明らかにすること。また免疫染色にて病理所見に異常が出現するかどうかを調べることである。

B. 研究方法

（脳内神経伝達物質測定）生後 0, 14, 28, 42 日の *Mecp2*-null マウス 3 匹、コントロールとして野生型の同胞雄マウス 4 匹を使用した。麻酔後に脳を取り出し-80℃で保存。脳重量を測定後した後、2vol/wt の 0.1N 過塩素酸を加えてまるとと破碎し

遠心し、上清中のノルアドレナリン、ドパミン、セロトニンとその代謝産物、アミノ酸の濃度を HPLC で測定した。

（免疫化学染色）生後 42 日の *Mecp2*-null マウス 3 匹とコントロールとして野生型の同胞雄マウス 3 匹を使用した。連続凍結切片（10 μm 厚）を、tyrosine hydroxylase (TH) と tryptophan hydroxylase (TpH) に対する抗体を用いて免疫化学染色を行った。細胞数測定を容易にするため silver intensification を行った。青斑核、黒質における TH 陽性細胞数をカウントし比較した。

C. 研究結果

Mecp2-null マウスは生後 3-8 週に神経症状（自発運動低下、不規則な呼吸、てんかん発作、hindlimb clasping など）を呈する。脳重量の比較では、*Mecp2*-null マウスでは生後 2 週目以降の脳重量の増加が止まり、生後 4 週以降では有意に脳重量が軽い結果となった（図 1）。*Mecp2*-null マウスのノルエピネフリン (NE) 脳内濃度は、生後 4 週以降で野生型よりも有意に濃度が低下していた。*Mecp2*-null マウスのドパミン (DA)、セロトニン (5HT) の脳内濃度は、生後 6 週目で有意に低下していた。NE, DA, 5HT それぞれの代謝産物である MHPG, HVA, 5HIAA の脳内濃度は MHPG の 4 週目が有意差があったが、そのほかでは有意な差が認めなかった。またグルタミン酸と GABA 濃度では *Mecp2*-null マウスが低い傾向はあったが、有意な違いは認めなかった。

カテコラミン・セロトニン濃度で有意な違いがで

た6週目における、青班核、黒質、縫線核の免疫化学染色による観察をおこなった。青班核と黒質におけるTH陽性細胞の細胞数は違いを認めず、細胞体の大きさも定性的な検討であるが違いを認めなかった(図2)。

D. 考察

Mecp2-null マウスにおいては、まず生後4週でNE濃度が、6週目でDA、5HT濃度が野生型に比べて低下していた。これはレット症候群で予想されたカテコラミン・セロトニン神経系の障害を支持する結果であった。障害の始まる時期としては、NEが一番早期であり差も大きかった。レット症候群に対してカテコラミン・セロトニン神経系をターゲットとした治療が検討されはじめているが、本研究の結果はこれらの試みに対する論拠となるものである。

カテコラミン・セロトニンそのものの測定に比べて、それらの代謝産物の濃度では低下の傾向がみられたが有意差は見出せなかった。レット症候群においてHVAや5HIAAの髄液濃度測定の研究が行われ、現在のところ一定の結果を得ていないが、もともとこれらの代謝産物では差が表れにくいのもかもしれない。これらの濃度は神経伝達物質の産生速度、保持能力、代謝速度に影響されるためこのような場合があり得る。

免疫染色の結果では、カテコラミン・セロトニン産生細胞に細胞数減少は認めなかった。これらの細胞数が低下するとの報告もあるが、すべて蛍光発色による観察である。蛍光にくらべて我々は銀増感法を用いておりTH濃度が低い場合でもカウントされると考えられる。細胞数が低下するとの報告はTH濃度が低下することを反映しているのではないかと考えた。我々の結論では、TH濃度は低下するかもしれないが、THを発現する神経細胞そのものの脱落はおこらないことを示している。神経伝達物質濃度の上昇が2週までは異常なく増加することからも、これらの神経細胞は正常に発生し、ある程度までは成熟していくものと考えた。神経伝達物質濃

度も2週以降にも低下はせずに横ばいになるだけであることも考え合わせると、*Mecp2*-null マウスにおいて、カテコラミン・セロトニン神経細胞は4週以降の成熟が障害されるものと想像された考えられた。MeCP2の機能を考える場合や治療法の検討に際して、細胞死がおこるのかどうかは重要な問題であると考ええる。

E. 結論

Mecp2-null マウス(レット症候群モデルマウス)で日齢依存性にカテコラミン・セロトニン神経系の障害がおこる。このときにこの神経細胞におこっていることは細胞の成熟障害と考えた。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto Y. Abnormal glucose metabolism in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain Dev* 2010;32:506-510.

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。

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
Nomura Y	Rett syndrome	Kompoliti K, Verhagen L	Encyclopedia of Movement Disorders	Elsevier	New York	2010	38-41
野村芳子	Rett症候群の運動発達	五十嵐隆、久保田雅也	「小児科臨床ピクシス19」ここまでわかった小児の発達	中山書店	大阪	2010	159-163

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
Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M.	Neocortical Layer Formation of Human Developing Brains and Lissencephalies: Consideration of Layer-Specific Marker Expression.	Cerebral Cortex	21	588-596	2011
Itoh M, Takizawa Y, Hanai S, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Akashi T, Hayashi M, Goto Y.	Partial loss of pancreas endocrine and exocrine cells of human ARX-null mutation: Consideration of pancreas differentiation	Differentiation	80	118-122	2010
Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M.	Abnormal maturation of non-dysmorphic neurons in focal cortical dysplasia: Immunohistochemical considerations	Seizure	19	274-279	2010
Takei H, Fujita S, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M	Insulin facilitates repetitive spike firing in rat insular cortex via phosphoinositide 3-kinase but not mitogen	Neuroscience	170	1199-1208	2010
Kuroki Y, Honda K, Kijima N, Wada T, Arai Y, Matsumoto N, Iwata K, Shirakawa T	In vivo morphometric analysis of inflammatory condylar changes in rat temporomandibular joint.	Oral Diseases		in press	2011
Mikami Y, Ishii Y, Watanabe N, Shirakawa T, Suzuki S, Irie S, Isokawa K, Honda MJ	CD271/p75NTR inhibites the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages.	Stem Cells & Development		in press	2011

和田崇, 滝口旗一, 武内倫子, 黒木洋祐, 関信幸, 高森一乗, 白川哲夫	<i>Mecp2</i> 欠損Rett症候群モデルマウスにみられる呼吸の異常と病態変化.	日本障害者歯科学会雑誌	31	730-736	2010
白川哲夫	スペシャルニードの子どもたちへの歯科医療・病診連携	小児歯誌	48	40	2010
野村芳子	レット症候群	精神科治療学	25	264-265	2010
Okabe Y, Kusaga A, Takahashi T, Mitsumasu C, Murai Y, Tanaka E, Higashi H, Matsuishi T, Kosai K.	Neural development of methyl-CpG-binding protein 2 null embryonic stem cells: A system for studying Rett syndrome.	Brain Res	1360	17-27	2010
Matsuishi T, Yamashita Y, Nagamitsu S, Takahashi T.	Rett syndrome: The state of clinical and basic research, and future perspectives.	Brain Dev		in press	2011
Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS, Chen BP.	Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radio-sensitivity and chromosomal instability.	Radiat Res	175	83-89	2011
Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S, Sueoka E.	NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II-alpha and DNA-dependent protein kinase.	Blood		in press	2011
Hori, N. Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S.	Aberrant CpG Methylation of the Imprinting Control Region KvDMR1 Detected in Assisted Reproductive Technology-Produced Calves and Pathogenesis of Large Offspring Syndrome.	Animal Reproduction Science	122	303-312	2010
Abe S, Tanaka H, Notsu T, Horike S, Fujisaki C, Qi DL, Ohhira T, Gilley D, Oshimura M, Kugoh H.	Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering.	Genome Integrity	1	6	2010
Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto Y.	Abnormal glucose metabolism in aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency.	Brain Dev	32	506-510	2010