

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. <i>MECP2</i> 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 <i>CDKL5</i> 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、臨床研究は少なく有効な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臨床研究を推進し、科学的根拠に基づいた生物マーカーと早期診断法を確立し、創薬・治療法の開発をめざす。

患者登録制による患者データベース体制を作り、運用し、遺伝子診断などの診療支援を行なっている。臨床遺伝学的研究では、FOXG1遺伝子解析を通して、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が考えられた。

基礎研究では、*Mecp2*欠損マウスの無呼吸の発症病態を明らかにし、バルプロ酸による治療の可能性が示唆された。*Mecp2*欠損マウスは心機能に異常はないが、QT延長などの不整脈が認められた。また、心臓に関与する一部の遺伝子発現異常がみられた。また、MECP2の下流遺伝子であるIGFBP3の発現異常がレット症候群の発症病態の一部を説明し、RTTの神経機能障害の関連とIGF-1療法の分子機序を解明する可能性が示された。*Cdk15*欠損マウスでは、海馬の神経細胞樹状突起スパインとシナプス受容体蛋白質と機能異常の存在が分かった。さらに、MECP2のMBDの点変異によるヘテロクロマチン異常を介した影響を明らかにした。MBD5発現異常が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可能性が示唆された。また、*Mecp2*欠損ES細胞を樹立し、心筋細胞に分化することができた。

これらの基礎研究の成果は、治療法の開発につながるものと期待される。

分担研究者

松石豊次郎 久留米大学医学部 教授
白川 哲夫 日本大学歯学部 教授
高橋 悟 旭川医科大学 講師
青天目 信 大阪大学医学部 特任助教
堀家 慎一 金沢大学学術総合センター 准教授

研究協力者

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
高橋 知之 久留米大学高次脳疾患研究所 准教授
谷岡 哲次 NPOレット症候群支援機構 理事長

A. 研究目的

レット症候群(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、患者デー

ターベースを構築し、基礎研究とあわせて多角的な研究を展開し、生物マーカーと早期診断法を確立し、創薬・治療法の開発をめざす。

本年度より、患者データベースの体制が整い運用している。あわせて、遺伝子診断を含む診断・診療支援を行っている。

臨床遺伝学的研究では、レット症候群典型例の約90%にMECP2遺伝子異常が同定されるが、非典型例ではMECP2遺伝子異常の検出率は低く、「早期発症てんかん型」では*Cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5)*遺伝子異常があり、「先天型」ではFOXG1遺伝子異常があることが知られている。比較的頻度が低い「先天型」では、FOXG1を含む14q12に欠失を有する症例とFOXG1遺伝子内変異に起因する症例が知られている。この「先天型」レット症候群の臨床症状と遺伝子異常との関連を検討する。

基礎研究では、*Mecp2*欠損マウスはRTTモデルとして有効であり、このマウスを多角的に解析することで、複雑な症状を呈するRTTの病態を解明する。まず、*Mecp2*欠損マウスの異常呼吸運動について、延髄呼吸中枢のglutamic acid decarboxylase 1(GAD1)mRNA発現とプロモーター領域のメチル化を解析する。次に、MECP2の下流遺伝子であるinsulin-like growth factor binding protein 3(IGFBP3)のRTTの発症病態の関与を明らかにするために遺伝子改変マウスの行動学的、形態学的解析を行なう。さらに、

Cdk15 欠損マウスを作製し、てんかん、記憶障害、情動異常等のメカニズムを解明する。

細胞生物学的研究では、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について、培養細胞を用いて明らかにする。また、MECP2 類縁の MBD5 の神経細胞における標的遺伝子の同定と発現制御メカニズムを明らかにする。*Mecp2* 欠損マウスの ES 細胞と iPS 細胞を樹立し、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や病態メカニズムの解明、治療薬スクリーニングの基盤をつくる。

B. 研究方法

患者データベース登録票 (資料 1) を作成し、それに準拠した手引きを作成した。NPO 法人レット症候群支援機構ホームページ (www.npo-rett.jp/) 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。

「先天型」レット症候群を疑われた 23 例を対象に、*FOXG1* 遺伝子の直接塩基配列決定法を行なった。変異のない症例は multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法あるいは定量的 PCR 法を追加した。また、遺伝子欠失範囲は array-comparative genomic hybridization (CGH) 法 (high-resolution 400 K array (Agilent Technologies Inc.)) で決定した。

Mecp2 欠損マウスと野生型マウスを全身型プレチスモグラフ (PLY4211; Buxco Electronics) チャンバーに入れ、1 時間の呼吸波形記録、1 秒以上の無呼吸の発生回数について解析を行った。また、生後 8 日齢から 7 日間、バルプロ酸の腹腔内投与 (2 mmol/kg/day) を行い、無呼吸への影響を生後 15 日で検討した。形態学的、発現解析として、生後 2 週齢の延髄腹側呼吸群組織を取出し、定量 PCR 法 (Light Cycler Nano, Roche Applied Science) により *GAD1* mRNA 量を測定し、バルプロ酸腹腔内投与マウスと比較した。さらに、bisulfite 処理の後 *GAD1* プロモーター領域の 60 クローンについて塩基配列を決定し、23 個の CpG island についてメチル化を調べた。*Mecp2* 発現制御マウスを樹立したが、個体数の確保が困難であり、十分な解析を進められなかった。一方、*IGFBP3* 過剰発現マウスと *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。体重と脳重量、体性感覚野の皮質厚、神経細胞の分岐数とシナプスの形態 (filopodia-type spine, mushroom-type spine 数) を比較した。さらに、行動学的、形態学的解析と IGF-1 発現を調べた。*Cdk15* 欠損マウスの表現型解析として、神経細胞樹状突起及びスパインの計測、薬物投与による易けいれん性の

生理学的解析、海馬スライスの電気生理学的解析、海馬・大脳皮質の興奮性シナプスの解析を行なった。

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。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調べ、網羅的発現解析を行なった。また、ゲノム編集技術により、SH-SY5Y 細胞株の MBD5 ヘテロ欠損細胞株を樹立した。この mRNA マイクロアレイ解析により MBD5 の量的変化による発現遺伝子の異常を明らかにした。*Mecp2* 欠損マウスと野生型マウスの ES 細胞を樹立し、心筋分化誘導を行い、その分化能を比較検討した。マウス ES 細胞による心筋分化誘導は胚様体形成法で行い、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した。心臓の生理的機能評価のために、心エコーによる心機能、心電図の計測を行った。さらに、生後 6 週齢と 8 週齢で心臓組織の 30 個の心臓特異的遺伝子の発現を定量 PCR を行なった。

(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得た後進めている。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

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。「先天型」レット症候群を疑われた 23 例のうち 3 例に *FOXG1* 遺伝子異常を認めた。2 例は *FOXG1* 遺伝子内変異 (c.256dupC, p.Gln86ProfsX35; c.689G>A, p.Arg230His) で、1 例は 14q12 領域の *FOXG1* と *C14orf23* を含む 0.54-Mb 欠失を有していた。これらの違いは、表現型に反映されている可能性が考えられた。

In vivo 解析では、*Mecp2* 欠損マウスは無呼吸頻度が高かった ($p < 0.01$)。これは生母の変異アレルの有無に影響されることが分かった。*Mecp2* 欠損マウスの無呼吸頻度はバルプロ酸投与により有意に改善した ($p < 0.05$)。また、延髄腹側呼吸群の *GAD1* mRNA 発現量は *Mecp2* 欠損マウスで有意に低く ($p < 0.05$)、バルプロ酸投与により改善した ($p < 0.05$)。これには、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーター領域の高メチル化状態があることが分かり、発現への影響と呼吸運動の異常の基盤になっているものと考えられた。*IGFBP3* 過剰発現マウス、*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た。体重、脳重量、行動学的、形態学的解析と IGF-1 発現はいずれも *IGFBP3* の発現の有無に影響し、*IGFBP3* の欠損によって *Mecp2* 欠損マウスの症状が一部回復することが分かった。また、*Mecp2* 欠損マウスは不整

脈を呈し、QT 延長をきたしやすことが分かった。さらに発現解析の結果、*Mecp2* 欠損では心臓に關与する30個の遺伝子のうち4遺伝子が高発現し、6遺伝子の低発現する傾向があった。*Cdk15* 欠損マウスの解析では、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、及び密度に異常があり、興奮性アミノ酸投与によってけいれんが誘発された。また、長期増強の異常、脱分極の異常等を認め、グルタミン酸受容体サブユニットの構成異常があることが分かった。

In vitro解析では、MBD領域の変異によるヘテロクロマチン像と重症度に關連性があった。発現解析とクロマチン免疫沈降解析の結果、変異特異的な発現分子を同定した。ゲノム編集により、C末側欠損MBD5をヘテロに持つ細胞株を樹立した。網羅的発現解析により、microRNAやsnRNAなどのnon-coding RNAが極めて高く、MBD5がnon-coding RNAの発現制御に影響していることが示唆された。*Mecp2*欠損マウスと野生型マウスのES細胞から心筋分化誘導を行い、4-6日目以降心筋分化転写因子発現があり、心筋分化を確認した。*Mecp2*欠損心筋細胞は機能的に自動収縮し、野生型と違いはなかったが、心筋分化マーカーの高発現がみられた。

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、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。

「先天型」レット症候群の病態は多様であることが示唆された。*FOXG1*遺伝子異常を有する症例の臨床的特徴は、乳児期早期からの精神運動発達遅滞と小頭症である。14q12欠失症候群でみられる顔貌の特徴は、C14orf23の欠失によるものと考えられた。

Mecp2 欠損マウスの無呼吸頻度は有意に高く、生母の変異アレルの有無に影響していた。この分子病態として、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーターの CpG メチル化状態が変化し、*GAD1* mRNA 発現に影響していることが分かった。これは、バルプロ酸投与によって *Mecp2* 欠損マウスの無呼吸頻度が改善することから、RTT の無呼吸発作と GABA 合成の關連性が示唆された。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。これらの発現を調整することにより、*Mecp2* 欠損マウスの表現型が改善されることから、治療法開発のヒントになるものと期待される。さらに、RTT でみられる QT 延長と不整脈が *Mecp2* 欠損マウスで呈したことは、RTT の心筋機能研究に重要な情報を提供することができるものと期待される。*Cdk15* 欠損マウスでは、神経細胞樹状突起の未熟スパインが有意に増加していた。さらに、電気生理学的異常などの結果から、*Cdk15* 欠損マウスではグルタミン酸シグナリング障害があることが分かっ

た。これらのことから、*CDKL5* 遺伝子変異の病態は興奮性シナプス機能異常であると考えられた。

*MECP2*のMBDの点変異がヘテロクロマチン構造の違いもたらし、症状の重症度に影響することを見出した。このことは、MBDの遺伝子変異が*MECP2*の多数の標的遺伝子の発現に影響を及ぼし、症状の一部を説明しうることを示唆しているものと考えられた。また、*MeCP2*のmicroRNAの発現制御への関与や選択的スプライシング機構への関与が報告され、メチル化CpG結合ドメインタンパク質の新たな機能が注目されている。MBD5変異細胞でみられたmicroRNAの発現異常は自閉症患者で多数報告されている領域に關与していたことから、広く発達障害の病態形成に關与している可能性がある。さらに、*Mecp2*欠損ES細胞は心筋細胞に分化する一方で、心筋分化過程の遺伝子発現を制御していることが示唆された。RTTの心臓の病態解明だけでなく、正常の心臓の発生・分化のエピゲノム機構の解明に有用な試料となるものと考えられた。

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。

*FOXG1*遺伝子解析を通して、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。

Mecp2 欠損マウスの無呼吸は、延髄腹側呼吸群の *GAD1* プロモーターのメチル化と *GAD1* mRNA 発現が影響し、バルプロ酸による改善が得られた。また、生母マウスの変異アレルの有無が中枢発達へ影響している可能性が考えられた。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、RTT の神経機能障害の關連と 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。*Cdk15* 欠損マウスの解析から、海馬の神経細胞樹状突起スパインとシナプス受容体蛋白質と機能異常が分かった。*Mecp2* 欠損マウスは心機能に異常はないが、QT 延長などの不整脈が認められた。また、心臓に關与する一部の遺伝子発現異常がみられた。

*MECP2*の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。MBD5の発現異常がmicroRNAの発現制御や選択的スプライシングの機構に關与している可能性が示唆され、今後神経系のMBD5機能を明確にすることにより、発達障害の解明だけでなく、他のメチル化CpG結合ドメインタンパク質の異常による発症病態の解明にもつながる。さらに、*Mecp2*欠損ES細胞を樹立し、心筋細胞に分化することができた。しかし、*Mecp2*欠損心筋細胞では心筋分化マーカーの高発現が認められた。

F. 健康危険情報なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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)
7. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu SI, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T. Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. *Brain Dev.* 2013 Dec 27. pii: S0387-7604(13)00310-0. doi: 10.1016/j.braindev.2013.11.007.
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* 2013;36(3):565-573.
9. 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)

10. 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)
11. 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

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.
2. 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)
3. 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)
4. 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.
5. 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
6. 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
7. 堀家慎一「神経疾患のジェネティクスとエピジェネティクス」日本心理学会 第77回大会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 2013年9月19-21日
8. 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
9. 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

10. 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

11. 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

12. 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)

13. 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)

14. 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)

15. 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)

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。

資料1 レット症候群患者データベース登録票

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	
選択枝の数字は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、当てはまるものにのみ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
記入日 西暦()年()月()日		その他の症状(2) (調査票記入時点の状態を記載)	
患者情報 ふりがな () 漢字名 () 既登録番号 () 生年月日 西暦()年()月()日 年齢 ()歳()か月 性別 女・男		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) <input type="checkbox"/> 口 <input type="checkbox"/> 舌 <input type="checkbox"/> 上肢 <input type="checkbox"/> 下肢 <input type="checkbox"/> 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	
自宅情報 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: <input type="checkbox"/> 全身 <input type="checkbox"/> 上肢 <input type="checkbox"/> 下肢 <input type="checkbox"/> 体幹) ・筋緊張亢進 1 無 2 有 (部位: <input type="checkbox"/> 全身 <input type="checkbox"/> 上肢 <input type="checkbox"/> 下肢 <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> ジストニア <input type="checkbox"/> ジスキネジア <input type="checkbox"/> ミオクローヌス (複数回答可) <input type="checkbox"/> 寡動 <input type="checkbox"/> 振戦 <input type="checkbox"/> 分類不能	
病院情報 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 <input type="checkbox"/> 過呼吸 <input type="checkbox"/> 息止め <input type="checkbox"/> 呑気 <input type="checkbox"/> 急激な吐息・唾飛ばし ・心電図異常 1 無 2 有 3 不明 <input type="checkbox"/> QT延長 <input type="checkbox"/> その他の異常() ・睡眠パターンの異常 1 無 2 有 3 不明 <input type="checkbox"/> 乳児期に日中の睡眠時間が長く、手がからならない <input type="checkbox"/> その他の異常()	
在胎出生歴 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 頭囲()cm 身長()cm 胸囲()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 (口噛まない <input type="checkbox"/> 丸のみ <input type="checkbox"/> 他) ・嚥下障害 1 無 2 有 (口溜め込み飲まない <input type="checkbox"/> 誤嚥 <input type="checkbox"/> 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	
発達歴 (現在の状態ではなく、最初に獲得した時期を記載) 首がすわる ()か月 寝返り ()か月 自分で起き上がって座る ()か月 四つ這い ()か月 つかまり立ち ()か月 独歩 ()か月 あやし笑い ()か月 人見知り ()か月 単語 ()か月 二語文 ()か月		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) <input type="checkbox"/> 定期受診や健診として受診している <input type="checkbox"/> 不調時のみ受診 <input type="checkbox"/> その他 ・股関節 右 <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 内転変形 <input type="checkbox"/> 脱臼 <input type="checkbox"/> 不明 左 <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 内転変形 <input type="checkbox"/> 脱臼 <input type="checkbox"/> 不明 手術 1 無 2 有 ()歳()か月時 ・足関節 右 <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 尖足 <input type="checkbox"/> 内反 <input type="checkbox"/> 外反 <input type="checkbox"/> 凹足 <input type="checkbox"/> 不明 左 <input type="checkbox"/> 正常 <input type="checkbox"/> 尖足 <input type="checkbox"/> 内反 <input type="checkbox"/> 外反 <input type="checkbox"/> 凹足 <input type="checkbox"/> 不明 手術 1 無 2 有 ()歳()か月時 ・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) <input type="checkbox"/> 側弯 <input type="checkbox"/> 後弯 <input type="checkbox"/> 前弯 ()歳()か月から	
最初に気づいた症状と年齢 (複数回答可) <input type="checkbox"/> 寝てばかりいる <input type="checkbox"/> 哺乳力が弱い <input type="checkbox"/> 体が柔らかい <input type="checkbox"/> 視線が合いにくい <input type="checkbox"/> 目つきが気になる <input type="checkbox"/> 泣き止まない <input type="checkbox"/> 健診で異常を指摘された <input type="checkbox"/> その他 () その年齢 ()歳()か月		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) <input type="checkbox"/> 定期受診や健診として受診している <input type="checkbox"/> 不調時のみ受診 <input type="checkbox"/> 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) <input type="checkbox"/> 歯列不正 <input type="checkbox"/> 咬合異常 <input type="checkbox"/> 歯の摩耗 <input type="checkbox"/> その他()	
典型的レット症候群の必須条件 (調査票記入時点の状態を記載) 1. 退行 ^{**1} 1 無 2 有 ()歳()か月から 退行後の安定期または改善期 ()歳()か月から <input type="checkbox"/> 安定期有 <input type="checkbox"/> 改善期有 <input type="checkbox"/> 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 () 過去の最高のレベル () 3. 手の常同運動 1 無 2 有 ()歳()か月から <input type="checkbox"/> 手のねじれ・絞り <input type="checkbox"/> 手叩き・指打ち <input type="checkbox"/> 手洗いや手こすり <input type="checkbox"/> 手を口につける・入れる <input type="checkbox"/> 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	
その他の症状(1) (調査票記入時点の状態を記載) 1. 身体計測値 身長()cm 体重()kg 頭囲()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 ・頭囲の拡大速度の鈍化 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()か月から 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 <input type="checkbox"/> 臨床観察 <input type="checkbox"/> 遠城寺 <input type="checkbox"/> 津守・稲毛 <input type="checkbox"/> 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 <input type="checkbox"/> 背景活動の徐波化 <input type="checkbox"/> てんかん性異常波 <input type="checkbox"/> 紡錘波消失 <input type="checkbox"/> その他()		遺伝子検査 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 直接シーケンス法 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 <input type="checkbox"/> 未検査 <input type="checkbox"/> CDKL5 <input type="checkbox"/> FOXG1 <input type="checkbox"/> その他() MECP2以外の遺伝子の異常 1 無 2 有 異常の結果()	
医師署名 (自署) 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)		最終診断 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*^{-/-}: RTT モデル) マウス、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*^{fl^{ox}/y}: WT-) マウス、C57BL/6 マウス、それぞれ

一群あたり 10-14 匹で行った。心機能は、8 週目の RTT-マウス、対照コントロールとして WT-マウス、C57BL/6 マウス、それぞれ一群あたり 10、9、11 匹を心エコーによって評価した。

RTT モデルマウス心臓における遺伝子発現

6 および 8 週目の *Mecp2* 欠損 RTT モデルマウス (*Mecp2*^{-/-})、対照コントロールとして wild-type (*Mecp2*^{fl^{ox}/y}) マウスの心臓を摘出し、心房心室を含む心臓から全 RNA 抽出後、逆転写により cDNA を合成し、心臓特異的な 30 遺伝子の発現をリアルタイム PCR により解析した。また、*Mecp2* 遺伝子の有無により発現の異なる遺伝子に関しては、8 週目のマウスの心室部分における発現の比較解析を行った。

倫理面への配慮等

本研究では、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に薄いものの、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。

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*^{-/-}) 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*^{-/-}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*^{-/-}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*^{-/-}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*^{-/-}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*^{-/-}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^{-/-}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

- ①生後 2, 3, 5, 7 週の *Mecp2*^{-/-}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*^{-/-} 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。
- ②*Mecp2*^{-/-}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。
- ③*Mecp2*^{-/-}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。

④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

- ①2, 3, 5, 7 週のいずれの週齢でも、*Mecp2*^{-/-}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*^{-/-}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。
- ②生後 15 日の *Mecp2*^{-/-}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。
- ③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*^{-/-}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*^{-/-}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。

④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*^{+/y}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^{+/y}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*^{+/y}を比較したところ、*Mecp2*^{+/y}では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*^{+/y}と同腹の wild については *Mecp2*^{+/y}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*^{+/y}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*^{+/y}と wild で比較した。その結果、*Mecp2*^{+/y}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*^{+/y}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*^{+/y}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^{+/y}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 FOXC1 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、FOXC1 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 FOXC1 と C14orf23 が含まれていた。一方、FOXC1 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 FOXC1 が病因遺伝子として同定されている。「先天型」では、FOXC1 を含む 14q12 に欠失を有する症例と FOXC1 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 2 3 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、FOXC1 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

FOXC1 遺伝子異常は 3 例の患者で同定され、そのうち 2 例は FOXC1 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 FOXC1 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、FOXC1 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 2 3 例のうち、FOXC1 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。FOXC1 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 FOXC1 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)。FOXC1 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumakura A, Takahashi S, Okajima K, Hata D: A haploinsufficiency of FOXC1 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)

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)

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

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

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発揮する。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、Ifgbp3 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*-K0) 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*-K0 と hIGFBP3 のダブルキックアウトマウスを作成した。*Mecp2*-K0 のオスのマウス (-/y の hemizygous mouse) と *Mecp2*-K0-hIGFBP3-TG ダブルキックアウトマウスについて、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 μ m における分岐数、樹状突起上のシナプスタンタンを形態別に糸状の filopodia-type spine、キノコ状の mushroom-type spine の数を比較した。

C. 研究結果

Mecp2-K0 マウスと *Mecp2*-K0-hIGFBP3-TG ダブルキックアウトマウスの体重は、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 μ m, 940.83 \pm 1782.73 μ 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 K0 マウスで、IGFBP-3 を過剰発現させたダブルキックアウトのマウスでは、*Mecp2* 単独の K0 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 がダブルキックアウトマウスで有意に減少していたことは、IGFBP3 の過剰発現により、神経伝達が安定して行われない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 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ンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を用い、神経細胞様に分化誘導出来るヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞株でMBD5のヘテロ欠損細胞株を樹立する。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^{+/-}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^{+/-}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^{+/-}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^{+/-}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^{+/-}でおよそ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」の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 「15 q 11-q 13 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（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

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。

G. 研究発表

1. 論文発表
1. 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
1. 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)
2. 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)
3. 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)
4. 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)

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。

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 (2)	28-39	2013
Waga C, Asano H, Tsuchiya A, Itoh M, Goto Y, Kohsaka S, Uchino S.	Identification of novel SHANK3 t ranscript in the developing mous e neocortex.	<i>J Neuro chem</i>	128 (2)	280-293.	2014
Miyazaki C, Saito h M, Itoh M, Yama shita S, Miyagish i M, Takashima S, Moser AB, Iwamor i M, Mizuguchi M.	Altered phospholipid molecular s pecies and glycolipid compositio n in brain, liver and fibroblast s of Zellweger syndrome.	<i>Neurosc i Lett</i>	552	71-5	2013
Munakata M, Watan abe M, Otsuki T, Itoh M, Uematsu M, Saito Y, Honda R, Kure S.	Increased Ki-67 immunoreactivity in the white matter in hemimega lencephaly.	<i>Neurosc i Lett</i>	548	244-8	2013
Miyake K, Yang C, Minakuchi Y, Oho ri K, Soutome M, Endoh K, Hirasawa T, Kazuki Y, Ada chi N, Suzuki S, Itoh M, Goto Y, A hida T, Y.	Comparison of genomic and epigen omic expression in monozygotic t wins discordant for Rett syndrom e.	<i>PLoS ON E</i>	Jun 21; 8(6)	e66729	2013
Ohya T, ... Matsui shi T	Impaired exploratory eye movemen ts in children with Asperger' s syndrome.	Brain D ev			2013 (in pr ess)
Miyake N, , ---Ma tsuishi T---, Niik awa N.	MLL2 and KDM6A mutations inpatie nts with Kabuki syndrome.	Brain D ev	11 ; 71	161 (9) :22 34-43.	2013

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)
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			2013 (in press)
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

IV. 研究成果の刊行物・別刷

2. レット症候群：自閉性障害をもつ特異な発達障害

伊藤 雅之

(独)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 室長

Summary

レット症候群(Rett syndrome)は主に女兒にみられる、乳児期から始まる姿勢や協調運動の障害、対人関係の障害、常同運動など多彩な症状を年齢依存性に呈する疾患である。1966年に最初に報告されてから50年近くが過ぎた。その間、症例の蓄積によりいくつかの非典型例があることがわかり、原因遺伝子が解明され、診断基準が改正された。現在では、自閉性症状を有する発達障害の代表的な疾患で、多くの研究がなされている。しかし、未だに有効な治療法がなく、多科にわたる診療と多方面の医療関係者のみならず患者家族や周囲の人たちを含んだ全人的な取り組みが必要である。

Key words

レット症候群、メチル化 CpG 結合蛋白 2(MECP2)、自閉症、てんかん、小児難病

1. はじめに

レット症候群(Rett syndrome)は主に女兒にみられる、乳児期から始まる姿勢や協調運動の障害、対人関係の障害、常同運動など多彩な症状を年齢依存性に呈する疾患である。1966年、ウィーンの小児神経科医 Andreas Rett が初めて報告し、1983年、スウェーデンの Bengt Hagberg が35例の症例を詳細に報告し、疾患単位として確立された。その後、1999年、米国バイラー医科大学の Huda Zoghbi らによって責任遺伝子がみつかった。以来、遺伝子改変マウスなどの生物学的研究や分子遺伝学的研究

が進められ、最も基礎研究が進んでいる自閉性障害をもつ発達障害の1つである。

2010年の全国調査から、レット症候群の国内の有病率は、20歳以下女性の0.009%で、全国に1000人程度の患者が推定された、比較的稀な疾患である¹⁾。この有病率は、これまで報告されている欧米豪諸国のそれとほぼ同じである。

一方、自閉症の有病率は、最近の米国の報告では、全人口の約1.1%であり、この15年間で16倍以上になり、今後さらに増加していくと考えられている²⁾。

自閉症とは、「社会的な相互交渉の質的な障害」「コミュニケーション機能の質的な障害」「活動と興味の範囲の著しい限局性」の3つを特徴とする症候群である。自閉症という言葉は、1943年、米国ジョーンズ・ホプキンス大学児童精神科医 Leo Kanner が「外部との接触が困難な」11例の小児例を報告した際に名付けたことに始まり、その後、この定義に当てはまる様々な疾患が自閉症とされた。しかし、既に「自閉」という言葉は、1911年、スイスの精神科医 Eugen Bleuler が統合失調症の一症状に、自己の他からの遮断という意味で用いていて、1世紀の歴史をもつ。米国精神医学会の『Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM)』は世界的な診断基準として多くの国で採用されているが、1980年の第3版(DSM-III)で初めて自閉症が取り上げられ、DSM-III

PROFILE

伊藤 雅之



- 1988年 鳥取大学医学部卒業
鳥取大学医学部附属病院脳神経小児科
- 1993年 鳥取大学医学部脳神経病理学教室助手
- 1997年 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部研究員
- 1998年 カナダ・トロント小児病院リサーチフェロー
- 2001年 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部室長
- 2011年 (独)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室長

-R では広汎性発達障害の中に自閉症性障害がみられる。1994年のDSM-IVでは、広汎性発達障害は臨床疾患コードに変更され、その中に自閉性障害 (autistic disorder)、レット障害 (Rett disorder)、アスペルガー障害 (Asperger disorder) などが含まれた。2013年に改訂されたDSM-5では、「社会的な交互交渉の欠如」と「行動の限局性と反復性」の2徴を「自閉症スペクトラム障害 (autism spectrum disorders)」とし、従来の定義より広範な疾患を含んでいる(図1)。本稿では、このうち特異な遺伝性発達障害の代表的疾患であるレット症候群を概説する。

2. レット症候群の臨床

典型的レット症候群のほとんど全ては女児であるが、クラインフェルター (Klinefelter) 症候群 (47, XXY の核型を有する男児) や体細胞モザイク変異の男児例があることが知られている。

レット症候群の診断基準は、1983年に初めて策定されたが、その後、何回かの改訂が繰り返され、2010年に責任遺伝子と非典型例の詳細な分析を含めて改訂された(表1)³⁾。典型的レット症候群の臨床経過は、既に1986年にHagbergらが病期を分けて記載している(表2)^{4,5)}。ここで、特徴的なのは年齢依存性に様々な症状を呈する

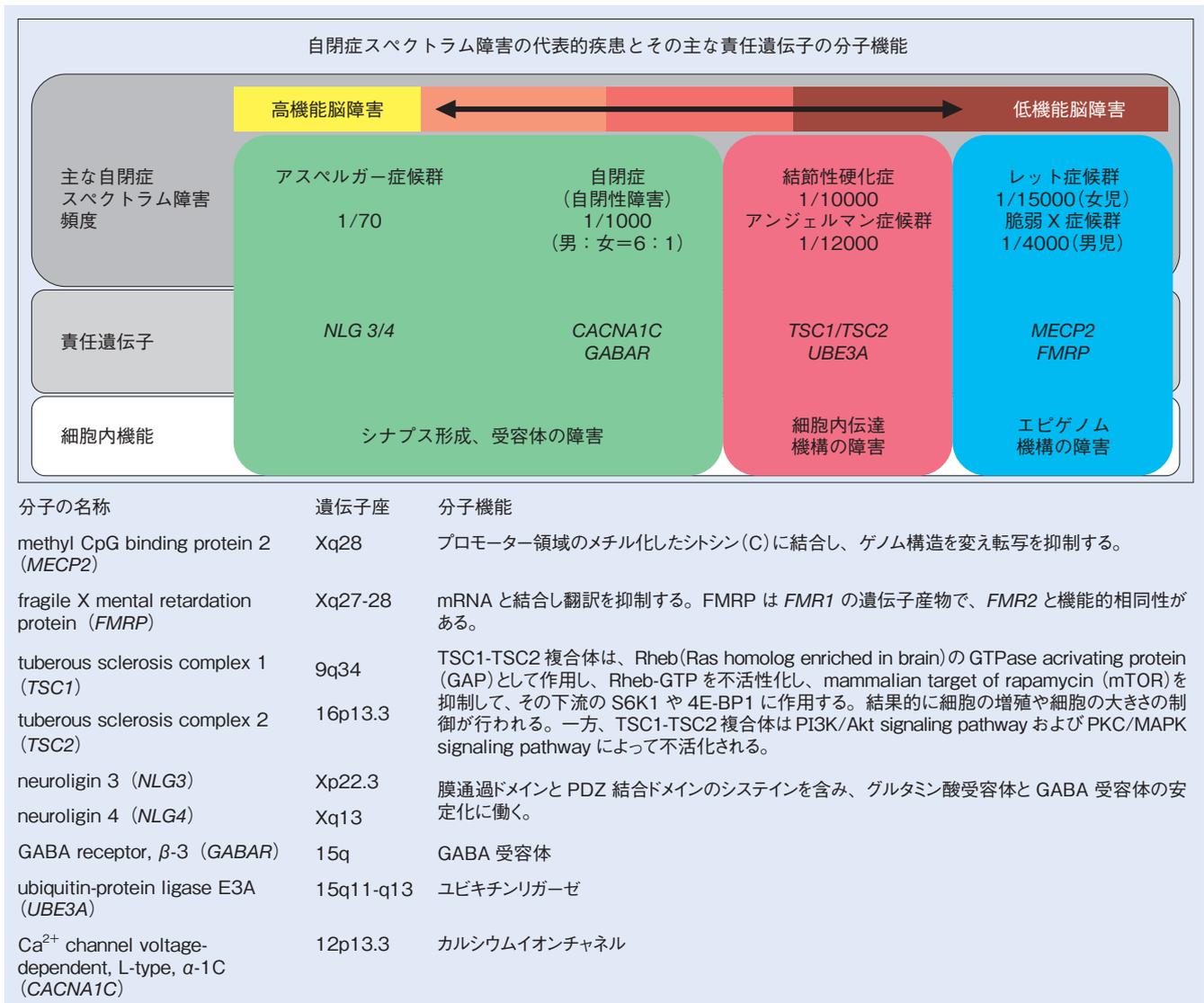


図1 自閉症スペクトラム障害の関連図

こと、したがって当初みられていた症状が経過とともにみられなくなり、新たな症状が加わることである。つまり、診療する年齢によっては問診でしか症状の確認ができなくなることがある。また、後述する責任遺伝子の特殊性のために症状の軽重の幅が大きいのもレット症候群の特徴である。

我々は、2009年に3～57歳までの264名のレット症候群女性患者の全国的な実態調査を行った。その結果、多彩な症状が高頻度に見られることがわかった⁹⁾。主要な症状は、概ね3歳頃までにみられるが、脊柱の異常など年齢を経てから出現する症状もある⁹⁾。

表 1 最近のレット症候群診断基準

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

典型的レット症候群の診断要件

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

非典型的レット症候群の診断要件

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

(1) 主要診断基準

1. 目的のある手の運動機能を習得した後に、その機能の部分的、あるいは完全な喪失
2. 音声言語を習得後に、その機能の部分的、あるいは完全な喪失
3. 歩行異常：歩行障害、歩行失行
4. 手の常同運動：手をねじる・絞る、手を叩く・鳴らす、口に入れる、手を洗ったり擦ったりするような自動運動

(2) 非典型的レット症候群診断のための支持的診断基準

1. 覚醒時の呼吸異常
2. 覚醒時の歯ぎしり
3. 睡眠リズム障害
4. 筋緊張異常
5. 末梢血管運動反射異常
6. 側彎・前彎
7. 成長障害
8. 小さく冷たい手足
9. 不適切な笑い・叫び
10. 痛覚への反応の鈍麻
11. 目によるコミュニケーション、じっと見つめるしぐさ

典型的レット症候群診断のためには、以下を除外する。

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

文献3の和訳および著者らとの意見交換から改変。診断基準の詳細は、NPOレット症候群支援機構(<http://www.npo-rett.jp>)、久留米大学医学部小児科(<http://www.ped-kurume.com>)を参照。

1) 乳児期の症状

患児は通常、正常に出生し、新生児期を過ごす。生後6か月から18か月頃までは一見、正常に発達するが、乳児期早期から「手がかからない」「哺乳が弱い」「泣き声が小さい」といった小さな気づきにくいサインを示すことが少なくない。また、筋緊張低下、這い這いや歩行など移動動作での協調運動の悪さに気づかれることがある。我々の調査では、概ね座位獲得まで得られるものの、その後の発達に遅れが目立つようになることがわかった。しかし、座位獲得まで得られない症例もある。

出生時の頭囲は正常であるが、生後3か月頃からその成長が乏しくなり小頭を呈する。しかし、全てのレット症候群患者に小頭がみられるわけではないが、乳児期に頭囲の成長がなくなれば本疾患を疑うべきである。

2) 乳児期以降の症状

乳児期の発達停止状態から生後18か月以降には、言語機能や運動機能の急激な退行を呈する。

特徴的なのは、合目的な手操作がなくなり、反復する手の常同運動が現れることである。手の常同運動は、手もみ動作がよくみられるが、それだけでなく手ばたきや口に入れるなどがみられる。また、この常同運動は上肢に限らず、頻度は低いものの、足にみられることがある。

さらに、生後18～24か月頃になると、発作的な奇声や啼泣、自閉的行動、パニック様発作、歯ぎしり、繰り返す無呼吸や多呼吸、てんかん、失調性歩行、振戦など、多彩な症状が現れる。このような退行と特徴的な症状を含む新たな症状が出現した後、症状安定期に入る。この時期には、症状の進行が止まっている、あるいは改善しているようにみえる。しかし、ゆっくりと進行し、運動量の低下、側彎などの骨格の変形、筋強直などを呈し、患児は年齢を経るとともにジストニア症状や手足の変形を呈するようになる。

これらの症状はよくみられるが、全例で全てが現れるわけではない。また、出現した症状の重症度が症例ごとに異なることもよくある。

3) レット症候群のてんかん

てんかんはレット症候群の約50～90%に出現し、その多くは全般性強直間代発作と複雑部分発作であるが、非定型欠神発作や無呼吸発作、間代性部分発作などもみら

れる。てんかん発作は症状安定期に入ると増加し、その後、機能低下期になると減少する。これらの発作では、脳波上てんかん発作波が認められないことがあるが、脳波異常を伴うてんかん発作を呈しても両親が気づかない場合もある。

レット症候群に特有の脳波異常はないが、早期に睡眠時の棘徐波複合を含む後頭優位の徐波リズムと背景脳波の徐波化がみられることがある(表2)。その後、後頭優位の徐波リズムがなくなり、背景脳波の徐波化は進み、多焦点性棘徐波複合の発作波を伴うことがある。また、全般性発作波は欠伸発作や全般性間代発作でしばしば観察されるが、無呼吸発作や過換気発作、突然の笑いや奇声、凝視などの発作性状態変化と関連していることがある。焦点性発作波は、局在性間代発作、頭を回旋させる発作、眼球を偏倚させる発作、無呼吸発作などに関連していることがある。

4) レット症候群のその他の症状

① 自律神経障害は広範で多彩な症状としてみられる。

- ・呼吸運動の異常は、多呼吸や無呼吸、息止めなどで現れ、酸素飽和度が80%以下になることがある。この原因として、脳幹の呼吸中枢の機能低下が考えられている。
- ・心機能障害として、QT延長、異常T波、心拍数の低下などがみられることがある。
- ・血管運動障害として、冷たい手足がしばしばみられる。

これは四肢末端に強く、下肢に強い傾向にある。

- ・成長障害や体重増加不良がほとんどの患者で見られる。これは嚥下運動に必要な口腔咽頭や食道、胃の協調運動の機能不全が原因で、そのため食事摂取が低下することが一因であると考えられている。
- ・消化器機能不全、便秘、機能的巨大結腸が比較的良好にみられる。このため、便嵌入、腸捻転、腸重積が起こることがある。
- ・胆のう機能低下として、胆石がみられることがある。
- ② 内斜視が観察されることがあるが、この内斜視は回復と再発を繰り返し、変動する。
- ③ 骨格の異常は、幼児期に「小さい手足」として気づかれる。これは、小頭と合わせてレット症候群に特徴的な身体的症状の1つである。小児期を超えると骨密度の減少がみられ、骨折の危険が増大する。また、年齢を経ると側彎が高頻度にみられる。
- ④ 歯ぎしり、歯並びや咬合の異常など歯科的問題を抱えることがある。

5) 予後

レット症候群の患児の多くは成人に達する。しかし、突然死の頻度は同年代の女性より有意に高い。この原因は、レット症候群に高頻度にみられるQT延長、異常T波、心拍数の低下など、心機能障害によるものと考えられている。

表2 典型的レット症候群の臨床病期

	発症からの時期	期間	臨床的特徴	脳波異常	
				覚醒時	睡眠時
第1期 (早期停滞期)	6~18か月	数か月	発達停滞、頭圍成長の減速、遊びに興味をもたない、筋緊張低下など。	正常ないし背景活動の徐波化。	正常
第2期 (進行期)	1~3年	数か月	急速な退行、易興奮性、不眠、合目的に手を使用しなくなる、てんかん、自閉症状、呼吸運動の異常(過呼吸、息止め、空気嚥下、無呼吸)など。	背景活動の後頭部優位の徐波化が顕著になる。稀に、棘波や鋭波が現れる。	睡眠時の特徴的な波形の形成不良。棘波や鋭波が現れる。
第3期 (症状安定期)	3~10年	数年	知的障害、自閉症状が目立たなくなる、てんかん、失調や失行、典型的な手の常同運動(手の握りしめ、手叩き、手を口に入れる)など。	背景活動の徐波化は広範になる。多焦点性の棘波や鋭波が広範にみられるようになる。	焦点性の棘波や鋭波と広範な徐波化がみられるようになる。
第4期 (機能低下期)	10年以上	数十年	動きが少なくなり車いすを要する、筋萎縮と強剛、痙性、進行性側弯、痙攣頻度の減少、栄養障害、るいそうなど。	背景活動の徐波化が進み、多焦点性棘波や鋭波、広範な棘徐波がみられるようになる。	ほとんど断続的に広範な棘徐波がみられる。

(文献4、5などから改変)

6) 生化学

1980年代より、髄液のアミン代謝産物やβエンドルフィン、サブスタンスPなどの異常が報告されているが、一定した見解はない。最近の研究で、血清グレリン値の低下が報告され、消化管障害などとの関連が考えられている⁷⁾。また、グレリンは中枢神経系にも存在し、レット症候群の症状との関係が調べられている。

7) 生理学

レット症候群の中中枢神経系症状は、電気生理学的に視覚や聴覚機能に異常はみられず、体性感覚刺激反応で高振幅化することや脳波の易興奮性があることから、高次脳機能障害によるものと考えられている。脳波異常や自律神経障害は前述の通りである。

睡眠の異常はレット症候群によくみられ、発達生理学的に睡眠リズムの未熟性が指摘されている。これは脳生理学的な発達の停止状態を反映しているものと考えられている。

また、画像生理学的研究から、レット症候群患者のドパミン取込み能が尾状核や被殻で著しく減少していることが報告されている⁸⁾。このことは基底核ドパミン神経系の機能低下を意味し、レット症候群患者にみられる筋強剛や拘縮などのパーキンソン様症状を反映しているものと考えられている。

8) 神経病理

レット症候群の脳は全体的に小さく、年齢対照に比較して30%以上の減少をみることがある。また、小脳虫部の低形成が報告されている。組織学的には、神経細胞は小さく、密度が高い。神経細胞の樹状突起は短く、未

熟シナプスが多い。中脳黒質や橋青斑核の神経細胞のメラニン顆粒の減少があり、基底核、脳幹のチロシン水酸化酵素、トリプトファン水酸化酵素、サブスタンスPの減少が報告されている。組織細胞学的には、GABA作動性抑制性神経細胞の機能障害の存在が考えられている。モデルマウスの研究でも同様の変化がみられ、てんかんや行動障害との関連が想定されている⁹⁾。

9) 非典型的レット症候群

1993年、Hagbergのレット症候群の分類提唱以来、非典型例があることが知られている。診断基準には、非典型的レット症候群の詳細な記載はないが、現在では以下の3つの亜型が使われている(表3)。興味深いことに、最近の臨床遺伝的研究から、遺伝子変異と、これらの非典型例の臨床像との関係が明らかになってきた。

■ 早期発症てんかん型 (Hanefeld variant)

典型的レット症候群類似の臨床経過をとるが、生後6か月以前よりてんかんがみられる。このてんかんは薬物治療に抵抗性で、日に数回繰り返し起こる難治性である。他に、重度な発達障害、頭囲発達の停止、コミュニケーション機能の消失、手の常同運動などがみられる。この早期発症てんかん型では、cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) の遺伝子変異がみつまっている¹⁰⁾。

■ 先天型 (congenital variant)

乳児期早期から発達遅延などがみられるため、明らかな退行はなく、臨床経過は典型的レット症候群と類似しているが、重度な発達障害と成長障害、小頭、有意言語の獲得がないなど、より重篤である。頭部MRIなどで、

表3 典型的レット症候群と非典型的レット症候群の臨床遺伝

臨床型	臨床的特徴	責任遺伝子	責任遺伝子の主な機能
典型的レット症候群	(本文参照)	MECP2 (Xq28.1)	RNA 転写の抑制
非典型的レット症候群 早期発症てんかん型 (Hanefeld variant)	生後6か月以前より難治性てんかんを呈する。	CDKL5 (Xp22.3)	細胞周期依存性キナーゼ 脳神経細胞に発現
先天型 (congenital variant)	乳児期早期から発達遅延がみられる。このため、明らかな退行はない。小頭、前頭葉の形成障害をみる。	FOXP1 (14q12)	前頭葉形成に重要な転写因子
言語能力維持型 (Zappella variant)	典型的レット症候群より進行が緩徐で軽症である。	MECP2 ; R133C が比較的多い。	MECP2 のゲノム DNA に結合する領域で、他の変異に比べて転写抑制機能が保たれている。

脳梁低形成や前頭葉の形成障害がみられる。この先天性では、*forkhead box G1 (FOXP1)* の遺伝子変異がみついている¹¹⁾。

■ 言語能力維持型

〔Zappella variant (preserved speech variant)〕

典型的レット症候群より進行が緩徐で軽症である。このため、発症初期にはレット症候群と診断するのが困難なことがある。臨床的特徴は、一旦獲得した機能の退行が遅く、手の常同運動は軽症あるいは非定型的であり、手の合目的動作は保たれている場合もあり、簡単な会話はできることがある。言語能力維持型では、*MECP2* 遺伝子の R133C 変異が高頻度に見られる¹²⁾。

10) 鑑別診断

■ 自閉症

レット症候群で小頭や痙攣が明らかでない場合、自閉症と診断されていることがある。しかし、自閉症の中に *MECP2* 遺伝子変異がみつかることがあるが、このような場合には厳密に鑑別することが困難である。遺伝子検査ができない場合は、脳波検査や画像診断を加味しながら、症状の変移を追っていく必要がある。詳細な病状の経過観察は、獲得した能力の退行の有無の判断に役立つ。レット症候群では退行を示すという特徴を有する。

■ アンジェルマン症候群 (Angelman syndrome)

アンジェルマン症候群は精神遅滞、てんかん、失調、手の同一運動、小頭などを呈し、レット症候群と症状の一部が重複する。アンジェルマン症候群の責任遺伝子は15番染色体 q11.2-13 領域にある *UBE3A* であり、患者の90%以上に15番染色体 q11.2-13 領域の遺伝子異常がみつかるが、そうでないアンジェルマン症候群の約2%の患者に *MECP2* 遺伝子変異がみついている¹³⁾。アンジェルマン症候群ではコントロール困難なてんかんが前面的にみられ、特有の顔貌を呈する。加えて、発達の退行はないためレット症候群との鑑別は困難ではないが、アンジェルマン症候群でも重症の場合には退行があるようにみえることがある。

■ 脳性麻痺

高齢で重度な痙性麻痺、成長障害、知的障害を呈する脳性麻痺患者では、レット症候群が疑われることがある。

周産期や乳幼児期の詳しい発達歴と遺伝子検査によって診断が可能である。

■ *MECP2* 遺伝子変異を伴う新生児脳症

男児の小頭を伴う新生児脳症は重度の筋緊張低下、不随意運動、難治性てんかん、中枢性低換気や呼吸不全などの呼吸運動異常を呈し、2歳までに死亡する。稀に、女兒にみられることがある。これらの重度な新生児脳症に、*MECP2* 遺伝子変異がみつかる。

■ X連鎖性精神遅滞

X連鎖性精神遅滞では、*MECP2* 遺伝子変異を考慮しなければならない。この精神遅滞は女兒では軽度で非進行性であるが、男児では重度で、躁うつ (psychosis)、錐体路症状 (pyramidal signs)、パーキンソン症状 (parkinsonian features)、巨睪丸 (macroorchidism) を呈する (PPM-X 症候群)¹⁴⁾。その他の症状として、重度な知的障害、安静時振戦、動作緩慢、運動失調などがみられるが、てんかんや小頭はなく、頭部MRIや脳波などの検査は正常であり、鑑別は詳細な経過観察で可能である。

3. レット症候群の臨床遺伝学

1999年に、レット症候群の責任遺伝子として、メチル化 CpG 結合蛋白 2 (*MECP2*) が同定された¹⁵⁾。その後、典型的レット症候群の約80%に *MECP2* 遺伝子変異がみつかったものの、*MECP2* 遺伝子異常がない症例が存在することがわかった。このうち、2005年に早期から難治性てんかんを呈するレット症候群患者に *CDKL5* が、2008年に乳児期早期から症状を呈するレット症候群の中から *FOXP1* が責任遺伝子として報告された。最近では、これら非典型的レット症候群は典型的レット症候群と一部の症状で重なりがみられるものの、同一の疾患範疇に入るか疑問視され、*CDKL5* 関連症候群や *FOXP1* 症候群などとして報告されることがある。ここでは、*MECP2* 遺伝子を中心に概説する。

1) *MECP2* 遺伝子変異

MECP2 は、1992年に、Adrian Birdらによって、ゲノムDNAのメチル化による遺伝子発現抑制機構に働く分子としてみつかった。その後、1999年にレット症候群の責任遺伝子であることが報告され、2001年に *Mecp2*

欠損によるレット症候群のモデルマウスが作られると研究は飛躍的に進んだ^{16,17)}。

レット症候群の約80%にMECP2遺伝子変異がみつかっている。MECP2は4つのエクソンからなり、それがコードするMECP2蛋白はメチル化DNA結合領域(MBD)と転写抑制領域(TRD)の機能領域をもつ。MBDはゲノムDNA上のメチル化されたシトシンとグアニン(CpG)部分に特異的に結合し、TRDはSin3AとHDACと複合体を形成してヒストン蛋白の凝集を起こし、その標的遺伝子の転写を抑制する。この遺伝子変異による機能障害は、標的遺伝子の発現を制御することができなくなる。これが病態形成の最初の段階であり、MECP2が標的とする遺伝子の発現異常がレット症候群の症状を決めると考えられている。

これまでの研究から、遺伝子変異と臨床表現型の関連性は一定の見解を得ていない。しかし、MBDではミスセンス変異(MECP2蛋白の1つのアミノ酸が置換される変異)が多く、TRDではナンセンス変異(MECP2蛋白が途中までしか作られない変異(このような未熟な蛋白は生体内では分解されることが多い))が多い(図2)。また、ミスセンス変異はナンセンス変異より軽症であることが多い傾向にある。ナンセンス変異では、3'末端側の変異は5'末端側の変異より軽症である傾向にある。さらに、比較的軽症な言語能力維持型の多くにR133C遺伝子変異がみつかる。この変異では、分子生物学的にこの遺伝子変異ではDNAへの結合能が保たれていることが

報告されている¹⁸⁾。同様に、A140V遺伝子変異も軽症で、女兒の軽度知的障害や男児の精神遅滞、男性のPPM-X症候群にみられる。この変異もMECP2の転写抑制活性が比較的維持されていることが報告されている¹⁹⁾。

一方、同じ遺伝子変異でも症状に軽重がみられる。それは、X染色体不活化(X-chromosome inactivation)という分子機構が要因と考えられている。X染色体不活化とは、通常女性もつ2本のX染色体(性染色体核型:XX)が、細胞の中で一方のみが活性化し、別の1本は不活化して働いていない状態をいい、それが全ての細胞に起こっている。レット症候群の女性患者は、MECP2遺伝子に変異があるX染色体と、変異がないX染色体をもつ。このうち、どちらの染色体が活性化されるかは胚発生初期に決定される。その結果、通常約半数の細胞では正常MECP2蛋白を発現し、残りの細胞では変異MECP2蛋白を発現するか欠損した状態となる。この変異MECP2蛋白あるいは欠損による機能障害を有する細胞の割合や分布に応じて、重篤度や症状も変化すると考えられている。1本のX染色体にMECP2遺伝子変異をもつ女性が神経学的症状を全くみせない例がある。これは、変異をもつX染色体の極端に偏った不活化による。

MECP2遺伝子変異はミスセンス変異やナンセンス変異だけでなく、欠失や重複といったゲノムの数的異常も起こる。遺伝子配列解析で変異がみつからなかったレット症候群患者の約30%に欠失が報告されている。MECP2

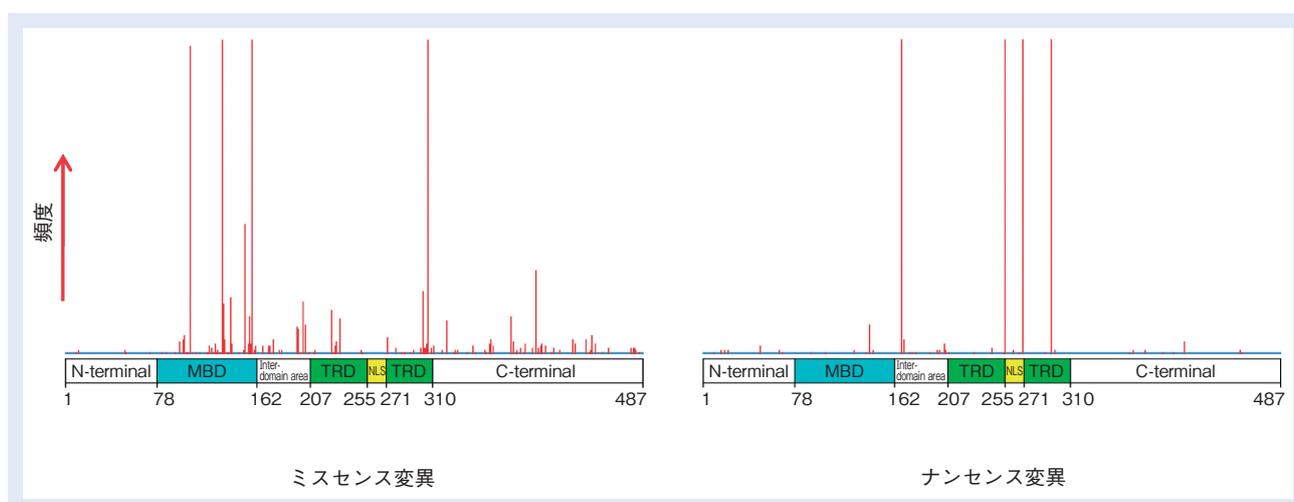


図2 MECP2 遺伝子変異の部位と頻度

MBD:メチル化DNA結合領域、TRD:転写抑制領域、NLS:核移行シグナル

[RettBASE:IRSF MECP2 Variation Database (<http://mecp2.chw.edu.au/>)より改変]

遺伝子の重複は、MECP2 重複症候群として最近報告されてきている。MECP2 重複症候群は、乳児低筋緊張、重度精神遅滞、言語能力の無獲得、進行性痙性運動障害、繰り返す呼吸器感染症、てんかんといった症状を呈し、MECP2 遺伝子を含む 0.3 から 2.3Mb のゲノム領域の重複を有する。患者は男児で母親が保因者になっていることがある。

2) MECP2 からみた分子病態

前述したように、MECP2 の機能は転写抑制であるため、レット症候群の責任遺伝子として報告されて以来、MECP2 が直接関与してレット症候群の病態形成につながる標的遺伝子が少なからずみつまっている(表 4)²⁰⁾。これらの中には、脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor : BDNF)やインスリン様成長因子結合蛋白 3(IGFBP-3)などの神経細胞の成長・成熟に関与する分子や神経系の発生や GABA 作動性抑制性神経細胞の発生・分化に重要な分子が含まれている。まだみつかっていない分子も含めて、レット症候群では複雑な細胞内および細胞間の機能障害がもたらされていることが垣間みられる。

3) CDKL5 遺伝子変異

CDKL5 遺伝子は X 染色体上にあり、その変異がレット症候群様の症状の患者にみつまっている。CDKL5 遺伝子変異を有するほとんどの症例が非典型的レット症候群[早期発症てんかん型(Hanefeld variant)]である。ま

た、CDKL5 遺伝子変異は重度な知的障害と早期発症の難治性てんかんを呈する男性患者にもみられる。

MECP2 は、calmodulin-dependent protein kinase II (CaMK II)によるリン酸化を受けることで神経細胞の樹状突起の再構築やシナプス形成をすることが報告されている。一方、細胞生物学的に、CDKL5 のリン酸化シグナル系が MECP2 と密接に関係している²¹⁾。CDKL5 による MECP2 のリン酸化の機能は、まだ十分にわかっていないが、分子生物学的に神経細胞の機能発現に影響を及ぼしていることは明らかである。このことが、CDKL5 遺伝子変異の表現型が MECP2 遺伝子変異の臨床像に一部似たことが起こっている分子病態であると考えられている。

4) FOXP1 遺伝子変異

FOXP1 遺伝子は、14 番染色体上にありレット症候群の先天型(congenital variant)で遺伝子変異がみつかると報告されている。ヘテロ接合体の遺伝子異常で発症するため、乳児期早期から重度な発達を呈する男児にもみつかることがある。軽度の顔面奇形と脳形成障害を伴うのが特徴である²²⁾。

FOXP1 は発生初期に神経細胞の移動に働き、大脳皮質の層構造を作る重要な分子である。一方、生後には、FOXP1 は WNT シグナルを抑制することが知られ、シナプス接続やシナプスの成熟、可塑性に関与していると考えられている。また、FOXP1 が成熟した神経細胞の神経保護作用を有することが示唆されている。MECP2 との相互作用は明確でないが、こうした生後の FOXP1 の

表 4 これまでにみつまっている主な MECP2 の標的遺伝子

MECP2 標的遺伝子	遺伝子産物の機能	生体での機能
<i>Bdnf</i>	神経栄養因子	神経細胞の成熟など
<i>xHairy2a</i>	転写抑制因子	中枢神経の発生
<i>DLX5/Dlx5</i>	転写因子	GABA 作動性抑制性神経細胞の発生
<i>Sgk1</i>	キナーゼ	外胚葉のアポトーシス制御
<i>Fkbp5</i>	グルココルチコイド受容体の調節因子	栄養因子伝達系
<i>Uqcrc1</i>	ミトコンドリア呼吸鎖酵素	ミトコンドリア機能発現
<i>FXYD1/Fxyd1</i>	イオンチャネル制御因子	細胞膜のイオン輸送調節
<i>IGFBP3/Igfbp3</i>	栄養因子伝達系	IGF- I の調節
<i>Crh</i>	神経ペプチド	神経系の情報伝達
<i>UBE3A</i>	ユビキチンリガーゼ	(アンジェルマン症候群責任遺伝子)
<i>GABAR3</i>	GABA 受容体	神経系の情報伝達

(文献 20 より改変)

機能障害が神経細胞の機能に重大な影響を及ぼしていることが想定されている。

4. レット症候群患者の検査と治療： 全人的な取組みの必要性

レット症候群の症状は神経系を中心とした発達障害に端を発するが、心機能や呼吸運動の障害、側彎などの骨格の障害など全身性で多彩な症状を呈するため、専門多科にわたった全人的取組みが必要である。具体的には、多領域にわたるチームによる定期的な検査、加療が求められる。特に留意すべき合併症は、成長障害、栄養摂取、神経系、消化管機能、運動機能、コミュニケーション機能、整形外科、歯科の合併症である。

1) 必要な検査、評価

- ① 発達評価
- ② 栄養摂取 / 摂食、消化機能 (便秘や胃食道逆流現象など)、身体測定
- ③ 睡眠、呼吸異常の評価
- ④ てんかんおよび抗てんかん薬の評価
- ⑤ 心電図・ホルター心電図での QT 延長の有無の検査
- ⑥ 自律神経障害の評価 (脳幹機能、サーモスタットによる末梢循環評価)
- ⑦ 側彎検査
- ⑧ 歯科的評価 (齲歯治療、咬合などの歯科衛生管理など)

2) 具体的な対症治療

治療は、患者ごとに異なる。治療・医学的管理は対症的であるが、各患者の症状に応じて栄養学、理学療法、作業療法、言語療法などの専門家との多領域のアプローチを行う。家族に対する精神的、社会的支援は重要であるが、具現化しているものは少ない。

- ① 患者・家族間の交流は精神的な支援を得るだけでなく、情報交換としても重要である。わが国には三団体があり、サマーキャンプなどの活動をしている [NPO 法人レット症候群支援機構 (大阪府)、日本レット症候群協会 (石川県)、さくらんぼ会 (福岡県)]。
- ② てんかんの治療は、小児神経科専門医により治療と管理を行うのが望ましい。てんかんには一般的な治療と管理を要する。トピラマート (topiramate) は、てんかん発作に有効だけでなく、呼吸異常の改善も報告され

ている。

- ③ 睡眠障害には、メラトニン (melatonin) が有効なことがある。
- ④ 高栄養液や高繊維食は便秘の予防に有効である。食事療法の効果がない場合には、マグネシウムなどの便軟化剤を用いる。また、食事は逆流防止剤や小さく刻んでとろみをつけたり、胃食道逆流の予防のための体位変換や骨密度減少を予防するためのカルシウム摂取などが勧められる。
- ⑤ 側彎や痙縮、拘縮の予防のために、早期から理学療法を行うことは移動能を維持する上で重要である。
- ⑥ QT 延長がある患者には、 β 遮断薬やペースメーカーが有効であることがある。

3) 注意すべき薬物

レット症候群の患者は、QT 延長などの循環器機能不全が高い危険率で発生するため、薬剤の選択は重要である。以下の薬剤には十分な注意が必要である。

- ・プロテアーゼ阻害薬：インジナビル、リトナビルなど
- ・抗精神病薬：チオリダジンなど
- ・三環系抗うつ薬：イミプラミンなど
- ・抗不整脈薬：キニジン、ソタコール、アミオダロンなど
- ・麻酔薬：チオペンタール、サクシニルコリンなど
- ・抗生物質：エリスロマイシンなどのマクロライド系抗菌薬、ケトコナゾールなどの抗真菌薬など

5. レット症候群の研究最前線—治療に向けて

2013 年 5 月現在、「レット症候群」をキーワードに PubMed 検索をかけると、2385 件の研究論文が見つかる。そのうち、1999 年の責任遺伝子発見以降では 1647 件を数え、2001 年のモデルマウスの発表以降では 1557 件に上る。最近 10 年間、世界中で急速に研究が進められているが、未だ有効な治療法はない。ここでは、近年のわが国におけるレット症候群の研究と治療法開発の最前線を概説する。

1) わが国のレット症候群の研究

1980 年代より臨床生理学的研究がなされ、近年では臨床遺伝学的、あるいは分子生物学的研究を中心に精力的に進められている。我々は、2009 年から厚生労働省科学研究費補助金事業としていくつかの研究に取り組ん

できた。以下、簡単に紹介する。

■ 基礎研究から

2001年に、*Mecp2*欠損マウスがレット症候群の症状を模していることが報告されると、これまで数多くの種類の*Mecp2*遺伝子改変マウスが作られた。その詳細は省くが、病態解析や治療法開発の研究に大いに役立っている。我々は、このマウスとレット症候群患者の脳からMECP2の標的遺伝子としてIGFBP-3をみつけた²³⁾。このIGFBP-3は生体内でインスリン様成長因子I(IGF-I)の細胞間輸送や組織内濃度調節を行っている。IGF-Iはニューロリギン(NLG)を活性化し、GABA受容体やグルタミン酸受容体を形成する働きがある^{24,25)}。そのため、MECP2の機能障害がIGFBP-3の量的異常を引き起こし、さらに細胞内IGF-Iの異常をもたらすものと考えられている(図3)。

他に、*Mecp2*欠損マウスによる呼吸障害の病態説明や*Cdk15*欠損マウスによる多角的分子機序の説明が行われている。前者では、セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害薬による症状の改善がみられ、これは脳幹の呼吸中枢核の機能や形態学的異常の改善と相関していることを明らかにした。また、国内のいくつかの施設では、レット症候群患者からiPS細胞を作製し、病態研究や治療法開発に取り組んでいる。アンジェルマン症候群の責任遺伝子を含む15番染色体q11-13領域はインプリンティング遺伝子や非翻訳RNAが多くみつまっている。この領域の遺伝子発現機構とMECP2との分子間相互関係の説明も行われている。アンジェルマン症候群の一部にMECP2遺伝子変異がみつまっていることと、症状の類似性があることから、レット症候群との分子遺伝子学的関連性の説明は、自閉性障害の病態理解には重要である。



図3 想定される、MECP2とIGFBP-3が関与する神経細胞の分子病態

■ 臨床研究から

わが国では、少数に限られた施設にレット症候群の患者が集まる傾向にあるため、大規模な臨床研究は少なかった。

最近の研究から、レット症候群の生物マーカーに血中グレリン濃度が利用できる可能性が出てきた。既に、*Mecp2*欠損マウスの研究から、血中グレリン濃度の低下をみつけている。これを基に、レット症候群患者と対照例の空腹時血中グレリン濃度、成長ホルモンやIGF-Iの血中濃度を測定した結果、レット症候群患者の体重と血中グレリン濃度で負の相関があることがわかった。特に前思春期では、レット症候群患者の活性型グレリン濃度が対照例に比して有意に高値であった⁷⁾。この血中グレリン濃度は、幼小児期の身体発育の生物マーカーになるものと考えられている。

2) 現在試みられている治療法

*Mecp2*欠損マウスの研究で、*Mecp2*発現を回復すると症状が改善されることが報告されている。このことは、完全な症状の回復は難しいまでも、積極的な介入によって治療の可能性が期待できることを意味している。これまでの臨床治験では有効性が支持されているものはないが、欧米で進められている治験を紹介する。米国にあるInternational Rett Syndrome Foundation(IRSF)を通じて、臨床研究や治験についての情報公開と治験参加者の募集を行っている(<http://www.rettsyndrome.org/research-programs/clinical-trials-and-databases>)。

■ IGF- I

*Mecp2*欠損マウスの研究から、IGF-Iの投与によって活動量の上昇、異常呼吸の改善、心拍数の安定化、生存率の改善といった有効性が報告される²⁶⁾と、IGF-Iの治験が始まった。そこでは、6例のレット症候群患者に6か月間の投与を行った結果、5例で呼吸運動の改善と3例で運動機能の改善が得られた²⁷⁾。現在、米国で第II相治験が進んでいるところである。

■ デシプラミン

デシプラミンは三環系抗うつ薬で、セロトニン/ノルアドレナリン再取り込み阻害作用を有する薬剤である。2007年に*Mecp2*欠損マウスで呼吸運動と生存率の改善が報告された²⁸⁾。その後、フランスの6施設共同で治験が行われ

ている。

■ デキストロメトルファン

デキストロメトルファンは鎮咳薬として日常診療で使われているが、非選択的セロトニン再取込み阻害作用とNMDA型グルタミン酸受容体阻害作用がある。米国で35例のレット症候群患者で治験を行い、副作用はほとんどなく、脳波上でのてんかん発作波を有意に減らしたと報告されている。現在、第Ⅱ相治験が進んでいるところである。

■ その他の治療の試み

Mecp2 欠損マウスを用いた実験段階であるが、いくつかの興味深い試みがなされている。

骨髄移植

2012年、正常ミクログリアを骨髄移植することにより、体重増加、無呼吸の減少などの呼吸運動の改善、運動機能の改善、生存率の改善が得られたことが報告された²⁹⁾。しかし、神経細胞は*Mecp2* 遺伝子変異を有したままであり、長期にわたる経過が不明であることなど臨床応用には多くの問題がある。

フィンゴリモド

フィンゴリモドは多発性硬化症の治療薬として使われているが、スフィンゴシン1受容体を介してBDNFの発現を上昇する。2012年に、これを*Mecp2* 欠損マウスに投与して、協調運動と生存率の改善が報告されている³⁰⁾。

これら以外にも様々な試みがなされてきたが、副作用などの問題から中止に終わったものも少なくない。今後も様々な取り組みがなされ、その中から有効な治療法が見つかることを切に願う。

6. おわりに

レット症候群に限らず、幼小児期に起こる進行性の病気はその家族と周囲に大きな影響を及ぼす。欧米では、早くから患者家族が医療者や研究者とチームを組んで治

療法の開発を進めている。わが国では、2009年に初めて厚生労働省の研究事業が始まり、疫学調査が行われた。既に約25年の遅れがある。ようやく、臨床研究や治験に向けた取り組みができてきた。また、わが国の基礎研究も本稿で紹介した以外に、ユニークな取り組みがなされている。これらの広く多彩な研究が統合されて、1日も早く治療法をみつけることが求められている。

現在、レット症候群患者データベース登録を行っている。これは近い将来の臨床研究、治験を推進することを目的とし、患者・患者家族・医療関係者が一体となったプロジェクトである。欧米豪では、既に20年以上の歴史があり、これを基に治験が進められている。わが国では始まったばかりであるが、レット症候群患者にとって有意義なものとなることを期待されている。その詳細はホームページ[NPO法人レット症候群支援機構(<http://www.npo-rett.jp>)、久留米大学医学部小児科(<http://www.ped-kurume.com>)]に譲るが、多くのレット症候群患者の登録が必要である。また、ここに引用した厚生労働省科学研究費補助金による研究事業の報告書は、NPO法人レット症候群支援機構のホームページで閲覧可能である。

レット症候群は国から難病指定を受け、小児慢性特定疾患の対象疾患である。したがって、所定の手続きをすれば、障害の内容と程度により公的給付や医療助成を受けることができる。こうしたことは、レット症候群に限らず、診療を行う上で知っておくべきことである。

本稿を終えるにあたり、全国アンケート調査にご協力いただいた医療機関の先生方に感謝申し上げます。また、本稿をご高閲していただいた厚生労働省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」研究班班員の先生方と、NPO法人レット症候群支援機構の方々に感謝申し上げます。

レット症候群と関連した疾患の情報については、下記へお問い合わせください。

伊藤雅之(国立精神・神経医療研究センター神経研究所 疾病研究第二部) itoh@ncnp.go.jp

■ 文献

- 1) 伊藤雅之ほか. 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総括研究報告 平成 22 年度総括・分担研究報告書. 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. 2011; 1-11.
- 2) Hughes V, et al. Epidemiology: Complex disorder. *Nature* 2012; 491: S2-S3.
- 3) Neul JL, et al. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 2010; 68: 944-50.
- 4) Hagberg B, et al. Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment prolife with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet Suppl* 1986; 1: 47-59.
- 5) Percy AK, et al. Rett syndrome: discrimination of typical and variant forms. *Brain Dev* 1987; 9: 458-61.
- 6) 伊藤雅之ほか. 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総合研究報告 平成 22 年度～23 年度総合研究報告書. 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. 2012; 5-21.
- 7) Hara M, et al. Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. *Int J Dev Neurosci* 2011; 29: 899-902.
- 8) Dunn HG, et al. Rett syndrome: investigation of nine patients, including PET scan. *Can J Neurol Sci* 2002; 29: 345-57.
- 9) Chao HT, et al. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 2010; 468: 263-69.
- 10) Tao J, et al. Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (*CDKL5/STK9*) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 2004; 75: 1149-54.
- 11) Ariani F, et al. *FOXG1* is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008; 83: 89-93.
- 12) Renieri A, et al. Diagnostic criteria for the Zappella variant of Rett syndrome (the preserved speech variant). *Brain Dev* 2009; 31: 208-16.
- 13) Ylisaukko-Oja T, et al. *MECP2* mutation analysis in patients with mental retardation. *Am J Med Genet A* 2005; 132A: 121-24.
- 14) Klauck SM, et al. A mutation hot spot for nonspecific X-linked mental retardation in the *MECP2* gene causes the PPM-X syndrome. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 1034-37.
- 15) Amir RE, et al. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23: 185-88.
- 16) Guy J, et al. A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 2001; 27: 322-26.
- 17) Chen RZ, et al. Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 2001; 27: 327-31.
- 18) Leonard H, et al. Patients with the R133C mutation: Is their phenotype different from patients with Rett syndrome with other mutations? *J Med Genet* 2003; 40: e52.
- 19) Gomot M, et al. *MECP2* gene mutations in non-syndromic X-linked mental retardation: phenotype-genotype correlation. *Am J Med Genet A* 2003; 123A: 129-39.
- 20) Chahrouh M, et al. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 2007; 56: 422-37.
- 21) Mari F, et al. *CDKL5* belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1935-46.
- 22) Mencarelli MA, et al. Novel *FOXG1* mutations associated with the congenital variant of Rett syndrome. *J Med Genet* 2010; 47: 49-53.
- 23) Itoh M, et al. Methyl CpG-binding protein 2 (a mutation of which causes Rett syndrome) directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse and human brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 2007; 66: 117-23.
- 24) Graf ER, et al. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* 2004; 119: 1013-26.
- 25) Varoqueaux F, et al. Neuroligins determine synapse maturation and function. *Neuron* 2006; 51: 741-54.
- 26) Tropea D, et al. Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2029-34.
- 27) Pini G, et al. IGF1 as a potential treatment for Rett syndrome: safety assessment in six Rett patients. *Autism Res Treat* 2012; 2012: 679801. doi: 10.1155/2012/679801.
- 28) Roux JC, et al. Treatment with desipramine improves breathing and survival in a mouse model for Rett syndrome. *Eur J Neurosci* 2007; 25: 1915-22.
- 29) Derecki NC, et al. Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 2012; 484: 105-9.
- 30) Deogracias R, et al. Fingolimod, a sphingosine-1 phosphate receptor modulator, increases BDNF levels and improves symptoms of a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 14230-35.



Original article

Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome

Munetsugu Hara^a, Yoshihiro Nishi^b, Yushiro Yamashita^c, Rumiko Hirata^c, Satoru Takahashi^d, Shin-ichiro Nagamitsu^c, Hiroshi Hosoda^e, Kenji Kangawa^e, Masayasu Kojima^f, Toyojiro Matsuishi^{c,*}

^a Department of Neonatology, Medical Center for Maternal and Child Health, St. Mary's Hospital, Kurume, Fukuoka 830-8543, Japan

^b Department of Physiology, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan

^c Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume, Fukuoka 830-0011, Japan

^d Department of Pediatrics, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Hokkaido 078-8510, Japan

^e Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565-8565, Japan

^f Institute of Life Science, Kurume University, Hyakunenkohen, Kurume, Fukuoka 839-0864, Japan

Received 18 January 2013; received in revised form 6 November 2013; accepted 18 November 2013

Abstract

Background: Most cases of Rett syndrome (RTT) are caused by mutations in *methyl CpG binding protein 2 (MECP2)*, and individuals with RTT have somatic growth failure, growth arrest of brain, epilepsy, and intellectual disability (ID). Ghrelin is a peptide hormone which stimulates growth hormone (GH) secretion from the pituitary gland. Ghrelin and GH regulate insulin-like growth factor-1 (IGF-1) synthesis, and this GH/IGF-1 axis is an endocrine axis involved in energy and sleep homeostasis and plays crucial roles in somatic and brain growth. This study aimed to determine whether circulating ghrelin, GH and IGF-1 reflect somatic and brain growth in RTT patients. **Methods:** We examined anthropometric data and circulating ghrelin, GH, and IGF-1 in 22 female RTT patients with epilepsy and ID (RTT-Ep/ID) and 14 age-matched females with epilepsy and ID (non-RTT-Ep/ID). **Results:** Body mass index (BMI) and height/length were significantly lower in RTT-Ep/ID than in non-RTT-Ep/ID in patients less than 20 years old. Plasma ghrelin in RTT-Ep/ID patients showed a significant inverse correlation with weight but had no significant correlations with BMI or height. Head circumference in both groups showed a significant positive correlation with circulating ghrelin and a significant negative correlation with circulating IGF-1. The ratio of octanoyl-ghrelin to total-ghrelin (O/T-ratio) is used as an indicator to estimate the biological activity of ghrelin. Among pre-adolescents, O/T-ratios were significantly higher in the RTT-Ep/ID group than in the non-RTT-Ep/ID group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Timing of growth-spurts differed between the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups, possibly due to a common (but yet unknown) mechanism of growth failure. Ghrelin/GH/IGF-1 axis function was aberrant in both the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups. The initial clinical course of Rett syndrome affects the development of the sleep–wake cycle and locomotion in early infancy, both of which may be based on the dysfunction of the aminergic neurons modulated by ghrelin/GH/IGF-1 axis. Further study with a larger sample size should help clarify the precise mechanisms controlling the somatic growth and hormonal features in Rett syndrome.

© 2013 The Japanese Society of Child Neurology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Rett syndrome; MECP2; Intellectual disability; Growth; Ghrelin; GH; IGF-1

1. Introduction

Rett syndrome (RTT; MIM 312750) is an X-linked neurodevelopmental disorder caused by mutations in

* Corresponding author. Tel.: +81 942 31 7565; fax: +81 942 38 1792.

E-mail address: tmatsu@med.kurume-u.ac.jp (T. Matsuishi).

methyl CpG binding protein 2 (MECP2) [1]. RTT is characterized by somatic growth failure following the deceleration of head growth, intellectual disability, erratic and purposeless rhythmic movement and sleep disruption [2,3]. Somatic growth failure is a major aspect of the developmental arrest. In a population-based cohort, the mean weight, height, and body mass index Z scores in subjects with RTT were below those of their age group in the general population and decreased steadily with age. Moreover, growth failure occurs less frequently in girls and women with better development and less morbidity typically associated with RTT, and in those with late truncation mutations or C terminal mutations of the *MECP2* gene [4–6]. The growth hormone (GH)/insulin-like growth factor-1 (IGF-1) axis has essential roles in somatic growth. Ghrelin is a peptide hormone involved in the GH/IGF-1 axis. Ghrelin secreted during fasting promotes the secretion of GH through the GH secretagogue receptor (GHS-R) and this in turn promotes the synthesis and secretion of IGF-1 [7,8]. The Ghrelin/GH/IGF-1 axis is an endocrine axis involved in energy and sleep homeostasis [9]. Plasma concentration of ghrelin is negatively regulated by circulating IGF-1 [8]. GH regulates somatic growth and development directly through the activation of GH receptors and indirectly through IGF-1 [10,11]. IGF-1 mediates tissue formation and remodeling, bone growth, postnatal growth and muscle metabolism [11,12]. IGF-1 is widely expressed in the central nervous system (CNS) [13], where it regulates neuronal and glial cell proliferation, and strongly promotes neuronal cell survival and synaptic maturation [13,14]. In genetically modified mice, postnatal overexpression of IGF-1 contributed to brain overgrowth characterized by an increase in the number of neurons and oligodendrocytes [13]. In contrast, ablation of IGF-1 and IGF-1 receptor (IGF-1R) expression resulted in growth retardation not only of body but also of brain [14]. In the CNS, ghrelin is synthesized mainly at the hypothalamus [15], whereas its receptor, GHS-R type 1a, is broadly distributed within the CNS [11]. Ghrelin promotes cell proliferation in both the embryonic and adult nervous systems [11] and stimulates the proliferation of neuronal precursor cells through GHS-R [16]. Moreover, ghrelin modifies the sleep–wake (S–W) rhythm by increasing wakefulness and decreasing the duration of REM sleep periods via GHS-R in the hypothalamus and pituitary gland [17]. S–W rhythm is related to GH ultradian rhythmicity in humans [18]. Maximal GH release occurred within minutes of the sleep onset of stage 3 or 4 sleep [17]. Ghrelin secretion is pulsatile and displays an ultradian rhythmicity. The number of peaks and the interval between peaks of ghrelin are similar to those observed for GH secretion, whereas peak amplitudes are much more important for GH [17]. Consequently, ghrelin and the GH/IGF-1 axis play crucial roles not only in somatic growth and

but also in CNS development. In our previous work, plasma ghrelin levels were high during infancy in RTT patients, then decreased whereas plasma ghrelin levels increased at puberty in healthy controls [19]; however, we did not examine the relationship between somatic growth disturbances and circulating levels of GH and IGF-1, in RTT. Moreover, we did not compare plasma ghrelin levels between patients with RTT and patients with epilepsy and intellectual disability (Ep/ID), although there is a high incidence of Ep/ID in RTT patients [19]. Therefore, in the present study we compared the circulating ghrelin, GH and IGF-1 concentrations and anthropometric data, i.e., weight, height, body mass index (BMI), and occipito-frontal head circumference (OFC), in RTT and non-RTT patients with Ep/ID.

2. Methods

Clinical diagnosis of RTT was confirmed in 22 female patients according to the recently proposed RTT Diagnostic Criteria [2]. The age of our RTT-Ep/ID patients ranged from 4.0 to 37.5 years old. RTT patients manifested sleep disruptions (18/22) and periodic breathing (14/22). Plasma concentrations of ghrelin, GH and IGF-1 were measured in the RTT-Ep/ID patients and in 14 age-matched female patients with epilepsy and intellectual disability (Ep/ID; age range 3.3–23.9 years old). *MECP2* mutations were confirmed in all 22 RTT-Ep/ID patients by *MECP2* gene analysis. All had a developmental quotient (DQ) or intelligence quotient (IQ) below 20. Of the 14 patients with non-RTT-Ep/ID, seven had profound retardation (IQ < 20), one had severe ID (IQ = 20–34), two had moderate ID (IQ = 35–49), three had mild ID (IQ = 50–69), and one had an IQ below 70 (precise score unknown). None of the participants received autonomic nerve regulators or had undergone gastrostomy. We also collected the participants' clinical data (including age for developmental comparisons): 0–10 yr-olds [RTT-Ep/ID, *n* = 7; non-RTT-Ep/ID, *n* = 6], 10–20 yr-olds [RTT-Ep/ID, *n* = 10; non-RTT-Ep/ID, *n* = 6], and over-20-year-olds [RTT-Ep/ID, *n* = 5; non-RTT-Ep/ID, *n* = 2], weight, height, BMI and occipito-frontal head circumference (OFC). These data were converted into standard deviation (Z score) values based on the U.S. National Center for Health Statistics/World Health Organization references [20]. Written informed consent was obtained from a parent for each patient. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Kurume University School of Medicine.

3. Measurement of plasma ghrelin levels

The extraction of plasma ghrelin from blood was performed by a method described previously [21,22]. The separated plasma samples were stored at –80 °C within

5 min to prevent degradation of rapidly regulated proteins. The plasma samples were semi-purified with a Sep-Pak C18 cartridge before the ghrelin radioimmunoassay (RIA). Two ghrelin-specific RIAs were used; one, named N-RIA, recognizes the N-terminal portion of octanoyl-modified active ghrelin, and the other, named C-RIA, recognizes the C-terminal portion of ghrelin irrespective of its octanoyl modification. The plasma level of octanoyl-ghrelin, which is post-transnationally octanoylated at Ser3, was measured by N-RIA [21,23]. The plasma level of total ghrelin, i.e. the sum of the non-octanoyl and octanoyl ghrelin levels, was measured by C-RIA.

3.1. Measurement of serum growth hormone (GH) and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) levels

Serum concentrations of GH and IGF-1 were measured in duplicate by immunoradiometric assays according to the manufacturer's protocol (Active Growth Hormone IRMA DSL-1900 and Active Non-Extraction IGF-1 IRMA DSL-2800, respectively, Diagnostics System Laboratories, Webster, TX) or a radioimmunoassay kit (SRL, Tokyo). Each assay was calibrated with manufacturer-supplied standards.

3.2. Statistical analysis

The concentrations of plasma total- and octanoyl-ghrelin and serum GH and IGF-1 were compared between the two subject groups by *t*-tests, and Pearson's correlation coefficients were used to measure monotonic

associations between variables. The data are summarized as mean \pm standard deviations (s.d.). *P*-values ≤ 0.05 were considered significant.

4. Results

The mean values of BMI-for-age and height/length-for-age *Z* scores in RTT-Ep/ID patients were significantly lower than those of non-RTT-Ep/ID patients (Table 1). Conversely, the octanoyl-/total-ghrelin ratios in RTT-Ep/ID patients were significantly higher than those of non-RTT-Ep/ID patients. The developmental data (Table 2) show that the serum GH concentrations in RTT-Ep/ID patients were significantly lower than those of non-RTT-Ep/ID patients between the ages of 0 and 10 years. The means of the height/length-for-age *Z* score of RTT-Ep/ID patients between the ages of 0 and 20 years were significantly lower than those of non-RTT-Ep/ID patients within the same age range. Over 20 years old, the mean of the height/length-for-age *Z* score of RTT-Ep/ID patients was similar to that of non-RTT-Ep/ID patients. On the other hand, the octanoyl-/total-ghrelin ratios of RTT-Ep/ID patients between the ages of 0 and 20 years were significantly higher than those of non-RTT-Ep/ID patients within the same age range. There were no significant differences in plasma concentrations of total- and octanoyl-ghrelin or serum concentrations of GH and IGF-1 between the two groups. Plasma total- and octanoyl-ghrelin concentrations, and the serum GH and IGF-1 concentrations showed no significant correlation with height/length-for-age *Z* score in either group. As shown in

Table 1
Characteristics of the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID patients.

Characteristics	RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 22)		Non-RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 14)		<i>p</i>
	Mean \pm s.d	Range	Mean \pm s.d	Range	
Age (years)	16.44 \pm 8.56	4.00–37.50	11.77 \pm 6.23	3.25–23.92	0.09
Weight (kg)	28.90 \pm 12.44	11.60–54.00	31.53 \pm 13.82	11.40–61.00	0.56
Weight-for-age (<i>Z</i> score)	−0.86 \pm 2.17	−4.35–2.52	0.35 \pm 1.56	−2.22–3.12	0.06
BMI (kg/m ²)	15.57 \pm 3.64	9.70–22.80	17.41 \pm 3.69	12.41–25.65	0.15
BMI-for-age (<i>Z</i> score)	−2.18 \pm 2.17	−7.91–0.50	−0.47 \pm 1.73	−3.02–3.16	0.02*
Height/length (cm)	133.01 \pm 19.59	88.10–156.5	131.41 \pm 23.46	91.30–169.30	0.83
Height/length-for-age (<i>Z</i> score)	−2.68 \pm 0.85	−3.99–1.02	−1.30 \pm 1.01	−3.47–0.94	0.00**
OFC (cm)	50.64 \pm 2.48	46.50–54.30	50.77 \pm 2.46	46.80–54.30	0.88
OFC-for-age (<i>Z</i> score)	0.52 \pm 1.73	−2.41–3.08	0.70 \pm 1.57	−2.19–3.08	0.76
Total ghrelin (fmol/ml)	127.80 \pm 87.62	39.72–442.72	164.77 \pm 113.27	21.92–454.75	0.28
Octanoyl ghrelin (fmol/ml)	17.76 \pm 8.80	2.75–32.13	12.56 \pm 9.47	2.00–30.84	0.10
Octanoyl-/total-ghrelin ratio	16.26 \pm 6.64	5.91–29.31	7.68 \pm 3.78	3.45–18.14	0.00**
GH (ng/ml)	1.62 \pm 2.60	0.05–11.50	2.10 \pm 1.91	0.15–5.75	0.56
IGF-1 (ng/ml)	168.25 \pm 96.12	60.31–375.00	201.57 \pm 92.69	47.00–350.00	0.31
IGF-1/GH ratio	618.13 \pm 1194.27	30.43–5540.00	367.79 \pm 601.71	15.06–2333.33	0.47

The data are means \pm s.d. Ep: epilepsy; ID: intellectual disability; RTT: Rett syndrome; OFC: occipito-frontal head circumference. The means of BMI-for-age *Z* score, height/length-for-age *Z* score, and octanoyl-/total ghrelin ratio in the RTT-Ep/ID group were significantly different compared to those of the non-RTT-Ep/ID group.

* *p* < 0.05 (*t*-test).

** *p* < 0.01 (*t*-test).

Table 2
Developmental characteristics of the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID patients.

Characteristics	0–10 (years)		<i>p</i>	10–20 (years)		<i>p</i>	>20 (years)		<i>p</i>
	RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 7)	Non-RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 6)		RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 10)	Non-RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 6)		RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 5)	Non-RTT-Ep/ID (<i>n</i> = 2)	
	Mean ± s.d.	Mean ± s.d.		Mean ± s.d.	Mean ± s.d.		Mean ± s.d.	Mean ± s.d.	
Weight-for-age (<i>Z</i> score)	−3.14 ± 0.78	−0.28 ± 1.53	0.00**	−0.42 ± 1.78	0.16 ± 1.02	0.48	1.44 ± 0.78	2.78 ± 0.48	0.64
BMI-for-age (<i>Z</i> score)	−1.74 ± 1.11	0.28 ± 2.17	0.05	−3.02 ± 2.87	−1.39 ± 1.13	0.21	−1.09 ± 1.11	0.05 ± 0.00	0.15
Height/length- for-age (<i>Z</i> score)	−2.84 ± 0.77	−1.24 ± 0.78	0.00**	−2.96 ± 0.65	−1.73 ± 0.89	0.01*	−1.88 ± 0.77	−0.17 ± 1.57	0.13
OFC-for-age (<i>Z</i> score)	−1.20 ± 0.98	−0.43 ± 1.34	0.26	1.06 ± 1.55	1.26 ± 1.16	0.79	1.87 ± 0.98	2.41 ± 0.94	0.50
Total ghrelin (fmol/ml)	208.34 ± 107.84	226.22 ± 157.49	0.81	91.56 ± 45.68	123.50 ± 18.27	0.13	87.51 ± 107.84	104.25 ± 30.25	0.61
Octanoyl ghrelin (fmol/ ml)	26.85 ± 4.28	17.16 ± 11.33	0.09	12.15 ± 6.32	7.87 ± 3.62	0.16	16.27 ± 4.28	12.83 ± 14.09	0.68
Octanoyl-/total- ghrelin ratio	14.91 ± 5.63	7.98 ± 1.54	0.01*	15.84 ± 7.80	6.36 ± 2.67	0.01*	19.00 ± 5.63	10.80 ± 10.39	0.22
GH (ng/ml)	0.93 ± 0.96	3.05 ± 1.90	0.03*	2.32 ± 3.65	1.62 ± 1.91	0.67	1.16 ± 0.96	0.68 ± 0.52	0.65
IGF-1 (ng/ml)	127.11 ± 43.34	154.00 ± 103.39	0.55	183.38 ± 119.92	250.00 ± 76.60	0.25	195.60 ± 43.34	199.00 ± 35.36	0.96
IGF-1/GH ratio	302.77 ± 232.00	418.65 ± 938.17	0.76	480.89 ± 644.60	310.07 ± 204.78	0.54	1334.12 ± 2368.34	388.34 ± 244.59	0.62

The data are means ± s.d. The RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups were divided into the following age groups: 0–10 years old, 10–20 years old, and over 20 years old. The means of the weight-for-age *Z* score, height/length-for-age *Z* score, octanoyl-/total ghrelin ratio and the serum GH concentrations in the 0–10-years-old group with RTT were significantly different compared to those of the non-RTT-Ep/ID group in the same age range. The means of height/length-for-age *Z* score and octanoyl-/total-ghrelin ratio in the 10–20-years-old group with RTT were significantly different compared to those of the non-RTT-Ep/ID group in the same age range. Abbreviations are explained in Table 1.

* *p* < 0.05 (*t*-test).

** *p* < 0.01 (*t*-test).

Table 3, plasma concentrations of total-ghrelin showed significantly negative correlations with age, weight, and OFC-for-age *Z* score in both RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID patients, whereas the serum IGF-1 concentrations showed significantly positive correlations with weight, BMI-for-age and OFC-for-age *Z* score in RTT-Ep/ID patients. The octanoyl-/total-ghrelin ratio showed a significantly positive correlation with OFC-for-age *Z* score only in RTT-Ep/ID patients. No statistical analysis to present definite relationships between genotype and phenotype is possible because of the small sample size, as shown in Supplementary Table 1.

5. Discussion

It is well known that patients with RTT exhibit short statures compared to healthy individuals with normal somatic growth [2]. The mean growth of length, weight and head circumference in classic RTT fell below growth chart levels for the normative population and growth failure occurs less frequently in girls with RTT, who show better development, less morbidity typically associated with RTT, and late truncation mutations [5]. RTT patients with C-terminal deletions had the highest *Z* scores for weight and BMI. Their BMI *Z* scores were significantly higher when compared with all other mutations [4]. BMI, weight, and height *Z* scores of RTT patients without enteral support did not identify

statistically significant differences between any genotype groups. Isaacs et al. previously found that microcephaly was associated with lower weight-for-age *Z* scores [24]. We previously reported that the mean values of weight, BMI, height/length and OFC-for-age *Z* scores in RTT patients were lower than those of healthy controls, and that eating difficulties in RTT patients were significantly correlated with the plasma levels of total and octanoyl ghrelin [19]. Although eating difficulties may be caused by inadequate dietary intake, growth problems in Rett syndrome are also known to be related to the specific genotypes. Eating difficulties and growth failure in RTT patients with low levels of plasma ghrelin are also presumed to be caused by *MECP2* mutations. However we did not identify any statistically significant overall correlations between the *Z* score and genetic profile because of small sample size.

In the present study, the time points for growth spurts in RTT-Ep/ID children were delayed compared to those in non-RTT-Ep/ID children, whereas subsequently RTT-Ep/ID patients achieved growth in height equivalent to that of non-RTT-Ep/ID patients. Previously, we and others have reported that the values for occipito-frontal head circumference (OFC) in RTT-Ep/ID patients were significantly smaller than those in healthy controls [2,19]. However, in this study there was no significant difference in OFC values between the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups. In most

Table 3

Correlation among anthropometric data and circulating ghrelin, GH and IGF-1 between the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID patients.

Characteristics	Total ghrelin	Octanoyl ghrelin	Octanoyl/total ghrelin ratio	IGF-1	GH
<i>Non-RTT-Ep/ID (n = 14)</i>					
Age (years)	−0.62*	−0.49	0.05	0.36	−0.43
Weight-for-age (Z score)	−0.53*	−0.41	0.07	0.25	−0.40
BMI-for-age (Z score)	−0.08	−0.07	−0.00	0.04	−0.24
Height/Length-for-age (Z score)	0.06	0.21	0.47	0.18	0.10
OFC-for-age (Z score)	−0.60*	−0.50	0.05	0.52	−0.67**
<i>RTT-Ep/ID (n = 22)</i>					
Age (years)	−0.44*	−0.37	0.21	0.25	0.01
Weight-for-age (Z score)	−0.63*	−0.52*	0.37	0.62**	0.25
BMI-for-age (Z score)	−0.10	0.09	0.32	0.65**	0.24
Height/Length-for-age (Z score)	−0.20	0.05	0.23	−0.04	−0.20
OFC-for-age (Z score)	−0.72**	−0.55**	0.47*	0.58**	0.22

Pearson's correlation coefficients were used to measure monotonic associations in the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups. The plasma total-ghrelin concentrations showed a significantly negative correlation with age, weight-for-age Z score and OFC-for-age Z score in both the RTT and non-RTT-Ep/ID patients. The plasma octanoyl-ghrelin concentrations showed a significantly negative correlation with weight and OFC-for-age Z score only in the RTT-Ep/ID patients. The serum IGF-1 concentrations showed a significantly positive correlation with weight-for-age Z score, BMI-for-age Z score and OFC-for-age Z score only in the RTT-Ep/ID patients. Octanoyl/total-ghrelin ratio showed a significantly positive correlation with OFC-for-age Z score only in the RTT-Ep/ID patients. The serum GH concentrations showed a significantly negative correlation with OFC-for-age Z score only in non-RTT-Ep/ID patients. Abbreviations are explained in Table 1.

* $p < 0.05$.** $p < 0.01$.

children with postnatal-onset microcephaly, developmental outcome and somatic growth were markedly retarded [25]. In children with epilepsy, it was reported that onset of epileptic symptoms was preceded by a reduction in brain volume [26]. In disorders associated with ID, reductions in dendritic branch complexity and dendritic length, both of which bring about a reduction of brain volume, have been reported to be common pathological features [27]. These data supports the suggestion that the short stature and microcephaly of both groups may have been affected by epilepsy and intellectual disability during early infancy. However, the median age of onset of epilepsy in RTT is around 4 years [3]. This does not coincide with the timing of the deceleration of head growth. The deceleration of head growth and the characters of neuronal architecture may be partly determined by the genotype. On the other hand, the neurons and neuronal systems involved in the development of S–W rhythm and locomotion are affected in early infancy of RTT [28]. Segawa reported that this pathophysiology was based on the dysfunction of the aminergic neurons of the brainstem in early infancy. This causes autistic tendency and failure in synaptogenesis of the cortex and consequently causes microcephaly. Furthermore, this causes failure in restriction of atonia into REM stage. This induces dysfunction of the pedunculo-pontine nuclei (PPN) and consequently dysfunction of the dopamine neurons. This causes dysfunction of the supplementary motor area through the ascending pathway of the basal ganglia to the thalamus, consequently causes loss of purposeful hand use and induces the characteristic stereotyped hand movements. Ghrelin

depolarizes PPN postsynaptically and dose-dependently via GHS-Rs [29]. The metabolic rate of girls with RTT was lower while sleeping, but not while awake, than in healthy controls [30]. Short stature, microcephaly and disorder of the circadian S–W cycle of RTT in early infancy may reflect the dysfunction of aminergic neurons modulated by the ghrelin/GH/IGF-1 axis.

In the present study, circulating levels of GH, IGF-1 and ghrelin in RTT-Ep/ID patients did not differ significantly from those in non-RTT-Ep/ID patients. Furthermore, the levels of circulating GH, IGF-1 or ghrelin were not significantly correlated with height in either group. On the other hand, our present study revealed a significant positive correlation between body weight and serum IGF-1 levels in RTT-Ep/ID patients. Within the RTT-Ep/ID group, we also found a significant inverse correlation between plasma octanoyl-ghrelin (active ghrelin) level and body weight. These findings are in line with those of previous reports demonstrating a positive correlation between serum IGF-1 level and body weight in a group of healthy children with normal growth [31]. Our findings are also supported by previous reports showing that the secretion of total ghrelin is negatively regulated by circulating IGF-1 through a negative-feedback loop [32]. IGF-1 ameliorates the RTT-like symptoms in a mouse model of the disease [33]. An Italian pilot study of RTT revealed that there are no risks associated with IGF1 administration [34].

In general, bone mineral deficits and bone-related disorders including fractures and scoliosis were common in RTT and deficits in bone mineral density were identified across a broad range of *MECP2* mutations [35]. In an

Australian Rett syndrome cohort study, the p.R168X and p.T158M mutations predicted the low value of the areal bone mineral density and bone mineral content for all bone outcomes [36]. The activated ghrelin/GH/IGF-1 axis stimulates longitudinal bone growth and increases the body weights of growing children [37,38]. However, a study by Caffarelli et al., reported that plasma levels of ghrelin did not reflect longitudinal bone growth in female RTT patients within a growing period and both age and height were independent predictors of total body bone mineral density [39]. Similarly, the short stature of our RTT-Ep/ID patients (a consequence of insufficient longitudinal bone growth), could not be predicted by their circulating levels of ghrelin, GH or IGF-1. These findings in RTT may imply that ghrelin stimulation is insufficient to induce the required peak amplitudes of GH secretion [40], and this may be caused by the dysfunction of aminergic neurons from early infancy.

Octanoyl ghrelin is a major active form of ghrelin which is post-translationally modified with an octanoyl-group at its Ser3 residue [7]. In fact, the ratio of octanoyl-ghrelin to total-ghrelin (O/T-ratio) is used as an indicator to estimate the biological activity of ghrelin [41]. In our study, the O/T-ratio of patients less than 20 years old was significantly higher in the RTT-Ep/ID group than in the non-RTT-Ep/ID group. In addition, this O/T-ratio exhibited a significantly positive correlation with OFC-for-age Z score only in RTT-Ep/ID patients. In comparison to non-RTT-Ep/ID patients, RTT-Ep/ID patients below the age of 20 had shorter height, smaller OFC, and a higher O/T-ratio. This unexpected finding may reflect alterations in respect of endocrine control by the ghrelin/GH/IGF-1 axis. On the other hand, these results coincide temporally with early development. These phenomena appear to occur independently and concurrently, as the result of epigenetic processes that temporally and spatially control gene activity during ontogenesis. Organ patterning and size are based on the spatiotemporal formation of morphogen gradients [42,43]. The *MECP2* gene determines cell fate, morphology and proliferation through posttranslational modifications [44]. In RTT, epigenetic regulation of gene expression involved in the morphogens linked to the growth of bone and brain and the enzymes mediating the modification of ghrelin may be improperly and irrelevantly influenced by *MECP2* mutation in early infancy.

This study has two major limitations. One is that we obtained results from single-time-point assays, and the other is the relatively small sample size of the groups (22 RTT-Ep/ID patients, 14 non-RTT-Ep/ID patients). The use of provocation tests (i.e. GHRH-loading test for GH) or measurement of the circadian profiles of ghrelin and other somatotrophic hormones in a larger number of RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID patients,

would allow us to evaluate the various functions of the ghrelin/GH/IGF-1 axis in more detail.

In conclusion, we found in this study a difference in the timing of growth-spurts between RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups, which might be due to a common (but yet unknown) mechanism of microcephaly. We also found that the regulatory functions of the ghrelin/GH/IGF-1 axis were aberrant in both the RTT-Ep/ID and non-RTT-Ep/ID groups. Further study with a larger sample size should reveal the precise mechanisms controlling the anthropometric and hormonal features in Rett syndrome.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Masayuki Itoh, National Institute of Neuroscience and Dr. Eiichiro Tanaka, Kurume University School of Medicine for their valuable advice. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 30389283 to M.H., Nos. 22591145 to Y.N. and 21591338 to T.M.) from the Japan Society for the Promotion of Science and research grant from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan (Intramural Research Grant [21B-5] for Neurological and Psychiatric Disorders of NCNP, and Research on Intractable Diseases 21-110 and 22-133 to T.M.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2013.11.007>.

References

- [1] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999;23:185–8.
- [2] Percy AK, Neul JL, Glaze DG, Motil KJ, Skinner SA, Khwaja O, et al. Rett syndrome diagnostic criteria: lessons from the natural history study. *Ann Neurol* 2010;68:951–5.
- [3] Schultz RJ, Glaze DG, Motil KJ, Armstrong DD, del Junco DJ, Hubbard CR, et al. The pattern of growth failure in Rett syndrome. *Am J Dis Child* 1993;147:633–7.
- [4] Oddy WH, Webb KG, Baikie G, Thompson SM, Reilly S, Fyfe SD, et al. Feeding experiences and growth status in a Rett syndrome population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:582–90.
- [5] Tarquino DC, Motil KJ, Hou W, Lee HS, Glaze DG, Skinner SA, et al. Growth failure and outcome in Rett syndrome: specific growth references. *Neurology* 2012;79:1653–61.
- [6] Bebbington A, Percy A, Christodoulou J, Ravine D, Ho G, Jacoby P, et al. Updating the profile of C-terminal *MECP2* deletions in Rett syndrome. *J Med Genet* 2010;47:242–8.
- [7] Kojima M, Kangawa K. Ghrelin: structure and function. *Physiol Rev* 2005;85:495–522.

- [8] Jarkovská Z, Rosická M, Marek J, Hána V, Weiss V, Justová V, et al. Plasma levels of total and active ghrelin in acromegaly and growth hormone deficiency. *Physiol Res* 2006;55:175–81.
- [9] Laposky AD, Bass J, Kohsaka A, Turek FW. Sleep and circadian rhythms: key components in the regulation of energy metabolism. *FEBS Lett* 2008;582:142–51.
- [10] Perrini S, Laviola L, Carreira MC, Cignarelli A, Natalicchio A, Giorgino F. The GH/IGF-1 axis and signaling pathways in the muscle and bone: mechanisms underlying age-related skeletal muscle wasting and osteoporosis. *J Endocrinol* 2010;205:201–10.
- [11] Laviola L, Natalicchio A, Perrini S, Giorgino F. Abnormalities of IGF-1 signaling in the pathogenesis of diseases of the bone, brain, and fetoplacental unit in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E991–9.
- [12] Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 2001;22:53–74.
- [13] Russo VC, Gluckman PD, Feldman EL, Werther GA. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev* 2005;26:916–43.
- [14] D'Ercole AJ, Ye P. Expanding the mind: insulin-like growth factor 1 and brain development. *Endocrinology* 2008;149:5958–62.
- [15] Sato T, Nakamura Y, Shiimura Y, Ohgusu H, Kangawa K, Kojima M. Structure, regulation and function of ghrelin. *J Biochem* 2012;151:119–28.
- [16] Sato M, Nakahara K, Goto S, Kaiya H, Miyazato M, Date Y, et al. Effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on neurogenesis of the rat fetal spinal cord. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;350:598–603.
- [17] Tolle V, Bassant MH, Zizzari P, Poindessous-Jazat F, Tomasseto C, Epelbaum J, et al. Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep–wake patterns in rats. *Endocrinology* 2002;143:1353–61.
- [18] Van Cauter E, Copinschi G. Interrelationships between growth hormone and sleep. *Growth Horm IGF Res* 2000;10(Suppl B):S57–62.
- [19] Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Yoh J, Takahashi S, Nagamitsu S, et al. Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. *Int J Devl Neurosci* 2011;29:899–902.
- [20] de Oris M, Onyango AW, Borghi E, Garza C, Yang H. Comparison of the world health organization (WHO) child growth standards and the national center for health statistics/WHO international growth reference: implications for child health programmes. *Public Health Nutr* 2006;9:942–7.
- [21] Hosoda H, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin and des-acyl ghrelin: two major forms of rat ghrelin peptide in gastrointestinal tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:909–13.
- [22] Yoh J, Nishi Y, Hosoda H, Tajiri Y, Yamada K, Yanase T, et al. Plasma levels of n-decanoyl ghrelin, another acyl- and active-form of ghrelin, in human subjects and the effects of glucose- or meal- ingestion on its dynamics. *Regul Pept* 2011;167:140–8.
- [23] Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999;402:656–60.
- [24] Issaacs JS, Murdock M, Lane J, Percy AK. Eating difficulties in girls with Rett syndrome compared with other developmental disabilities. *J Am Diet Assoc* 2003;103:224–30.
- [25] Rosman NP, Tarquinio DC, Datsersis M, Hou W, Mannheim GB, Emigh CE, et al. Postnatal-onset microcephaly: pathogenesis, pattern of growth, and prediction of outcome. *Pediatrics* 2011;127:665–71.
- [26] Lawson JA, Vogrin S, Bleasel AF, Cook MJ, Burns L, McAnally L, et al. Predictors of hippocampal, cerebellar, and cerebellar volume reduction in childhood epilepsy. *Epilepsia* 2000;41:1540–5.
- [27] Kaufmann WE, Moser HW. Dendritic anomalies in disorders associated with mental retardation. *Cereb Cortex* 2000;10:981–91.
- [28] Segawa M. Discussant – pathophysiologicals of Rett syndrome. *Brain Dev* 2001;23(Suppl 1):S218–23.
- [29] Kim J, Nakajima K, Oomura Y, Wayner MJ, Sasaki K. Electrophysiological effects of ghrelin on pedunculopontine tegmental neurons in rats: an in vitro study. *Peptides* 2009;30:745–57.
- [30] Motil KJ, Schultz R, Brown B, Glaze DG, Percy AK. Altered energy balance may account for growth failure in Rett syndrome. *J Child Neurol* 1994;9:315–9.
- [31] Camurdan MO, Bideci A, Demirel F, Cinaz P. Serum ghrelin, IGF-1 and IGFBP-3 levels in children with normal variant short stature. *Endocr J* 2006;53:479–84.
- [32] Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, Westwood M, Clayton PE. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003;59:649–54.
- [33] Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, et al. Partial reversal of Rett syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:2029–34.
- [34] Pini G, Scusa MF, Congiu L, Benincasa A, Morescalchi P, Bottiglioni I, et al. IGF-1 as a potential treatment for Rett syndrome: safety assessment in six Rett patients. *Autism Res Treat* 2012;2012:679801.
- [35] Motil KJ, Ellis KJ, Barrish JO, Caeg E, Glaze DG. Bone mineral content and bone mineral density are lower in older than younger females with Rett syndrome. *Pediatric Res* 2008;64:435–9.
- [36] Jefferson AL, Woodhead HJ, Fyfe S, Briody J, Bebbington A, Strauss BJ, et al. Bone mineral content and density in Rett syndrome and their contributing factors. *Pediatric Res* 2011;69:293–8.
- [37] Gil-Campos M, Aquilera CM, Cañete R, Gil A. Ghrelin: a hormone regulating food intake and energy homeostasis. *Br J Nutr* 2006;96:201–26.
- [38] Veldhuis JD, Bowers CY. Integrating GHS into the ghrelin system. *Int J Pept* 2010;2010:1–41.
- [39] Caffarelli C, Gonnelli S, Tanzilli L, Hayek J, Vichi V, Franci MB, et al. The relationship between serum ghrelin and body composition with bone mineral density and QUS parameters in subjects with Rett syndrome. *Bone* 2012;50:830–5.
- [40] Huppke P, Roth C, Christen HJ, Brockmann K, Hanefeld F. Endocrinological study on growth retardation in Rett syndrome. *Acta Paediatr* 2001;90:1257–61.
- [41] Akamizu T, Shinomiya T, Irako T, Fukunaga M, Nakai Y, Nakai Y. Separate measurement of plasma levels of acylated and desacylated ghrelin in healthy subjects using a new direct ELISA assay. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6–9.
- [42] Gurdon JB, Bourillot PY. Morphogen gradient interpretation. *Nature* 2001;413:797–803.
- [43] Affolter M, Basler K. The decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* 2007;8:663–74.
- [44] Zachariah RM, Rastegar M. Linking epigenetics to human disease and Rett syndrome: the emerging novel and challenging concepts in MeCP2 research. *Neural Plast* 2012;2012:415825.



Case report

A haploinsufficiency of *FOXG1* identified in a boy with congenital variant of Rett syndrome

Akira Kumakura^{a,*}, Satoru Takahashi^b, Kazuki Okajima^b, Daisuke Hata^a

^a Department of Pediatrics, Kitano Hospital, The Tazuke Kofukai Medical Institute, Osaka, Japan

^b Department of Pediatrics, Asahikawa Medical University, Asahikawa, Japan

Received 10 November 2012; received in revised form 1 September 2013; accepted 13 September 2013

Abstract

Background: Forkhead box G1 gene (*FOXG1*) mutations and deletions are associated with a congenital variant of Rett syndrome (RTT). Nucleotide alterations of the coding region of *FOXG1* have never caused dysmorphic features. **Patient:** An 8-year-old boy with the congenital variant of RTT who showed severe psychomotor deterioration, epilepsy, acquired microcephaly, and involuntary movements including jerky movements of the upper limbs and tongue protrusion. He showed dysmorphic features including round face, anteverted nostrils, and tented upper lips. Brain magnetic resonance imaging showed hypoplasia of the frontal lobes and the rostral part of the corpus callosum. The molecular cytogenetic analysis confirmed a *de novo* deletion of 14q12 including *FOXG1* in this patient. **Conclusion:** We identified the smallest deletion of 14q12 involving *FOXG1* among those previously reported. Dysmorphic facial features are a characteristic for the patients with chromosomal deletion including *FOXG1*. In our patient, *C14orf23* is the only transcript other than *FOXG1*. Therefore, *C14orf23* might be responsible for facial dysmorphism. © 2013 Published by Elsevier B.V. on behalf of The Japanese Society of Child Neurology.

Keywords: Rett syndrome; Congenital variant; *FOXG1*; *C14orf23*; Dysmorphic facial features

1. Introduction

Rett syndrome (RTT), a severe neurodevelopmental disorder with characteristic clinical features including psychomotor deterioration, acquired microcephaly, seizures, and loss of purposeful hand movements, has incidence of 1:10,000 female births. It is the second most common cause of severe mental retardation in females. About 90% of typical RTT cases are attributable to mutations in the methyl-CpG-binding protein 2 gene (*MECP2*) located on the X chromosome. Therefore, the affected patients have been exclusively females [1].

Mutational analyses conducted for RTT patients without *MECP2* abnormalities have revealed mutations in the cyclin-dependent kinase-like 5 gene (*CDKL5*) on Xp22 or mutations in the forkhead box G1 gene (*FOXG1*) on 14q12. *CDKL5* mutations are associated with the early onset seizures variant of RTT in both females and males [2,3]. Both loss of function mutations and microdeletions of *FOXG1* have been identified in patients with the congenital variant of RTT, accounting for 0.6% in patients with RTT [4–9]. The congenital variant of RTT is characterized by brain malformation that is specific to the forebrain, severe psychomotor deterioration, and involuntary movements including tongue protrusion and stereotyped jerky movements of the upper limbs. *FOXG1* is a brain-specific transcriptional factor that is necessary for fetal neurogenesis. Lack of *FOXG1* function suppresses neural stem cell self-renewal and promotes premature cortical neural expansion, engendering

* Corresponding author. Address: Department of Pediatrics, Kitano Hospital, The Tazuke Kofukai Medical Institute, 2-4-20 Ohgimachi, Kita-Ku, Osaka 530-8480, Japan. Tel.: +81 6 6312 8824; fax: +81 6 6312 8867.

E-mail address: a-kumakura@kitano-hp.or.jp (A. Kumakura).

an insufficient quantity of telencephalic neurons [10–12]. This report describes a Japanese boy who showed postnatal developmental deterioration and arrested head growth after 10 months of age. Moreover, he showed irregular jerky movements of the upper limbs. We initially diagnosed him as having dyskinetic or athetotic cerebral palsy. However, according to the diagnostic criteria for classical and variant RTT [13], this patient was regarded as having a congenital variant of RTT. Therefore, we conducted *FOXG1* mutational analysis, which revealed a *de novo* deletion of *FOXG1* at 14q12.

2. Case report

The patient, an 8-year-old boy, was born to non-consanguineous, healthy Japanese parents at 38 weeks

gestation after an uneventful pregnancy. His birth weight and length were, respectively, 2680 g (−0.78 SD) and 49.0 cm (−0.17 SD). He had normal occipito–frontal circumference (OFC) of 32.0 cm (−0.86 SD) with no auxological abnormality. He showed no asphyxia or jaundice. He had no siblings and no family history of neuromuscular diseases, metabolic disorders, dysmorphic syndrome, or other developmental disorders. He had developed with no complications during the neonatal period. However, he showed developmental delay and deterioration after 3 months of age. His motor skills had progressed to rolling over. Subsequently, his head control deteriorated and he became less able to roll over, being bedridden. He showed severe mental retardation with no explosive language, but with deficient social reciprocal communication including eye contact and eye

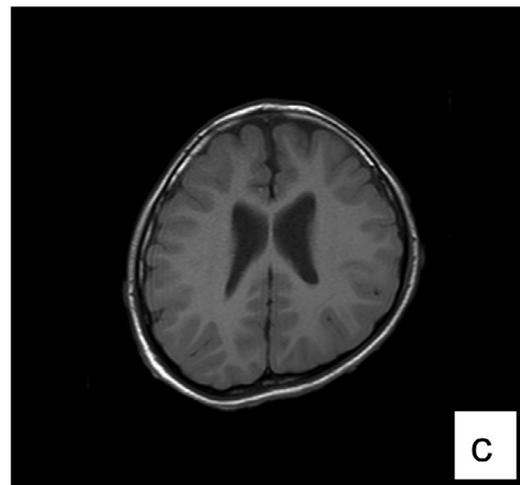
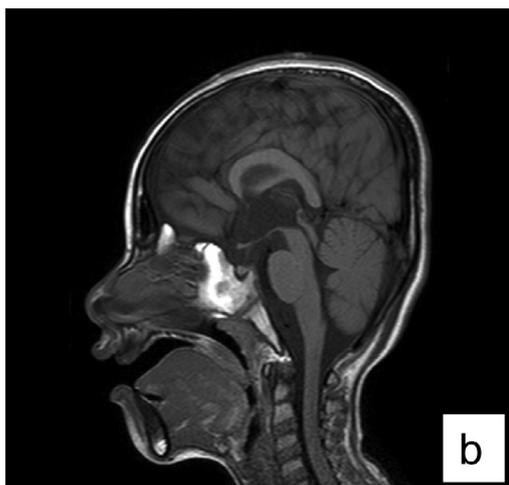
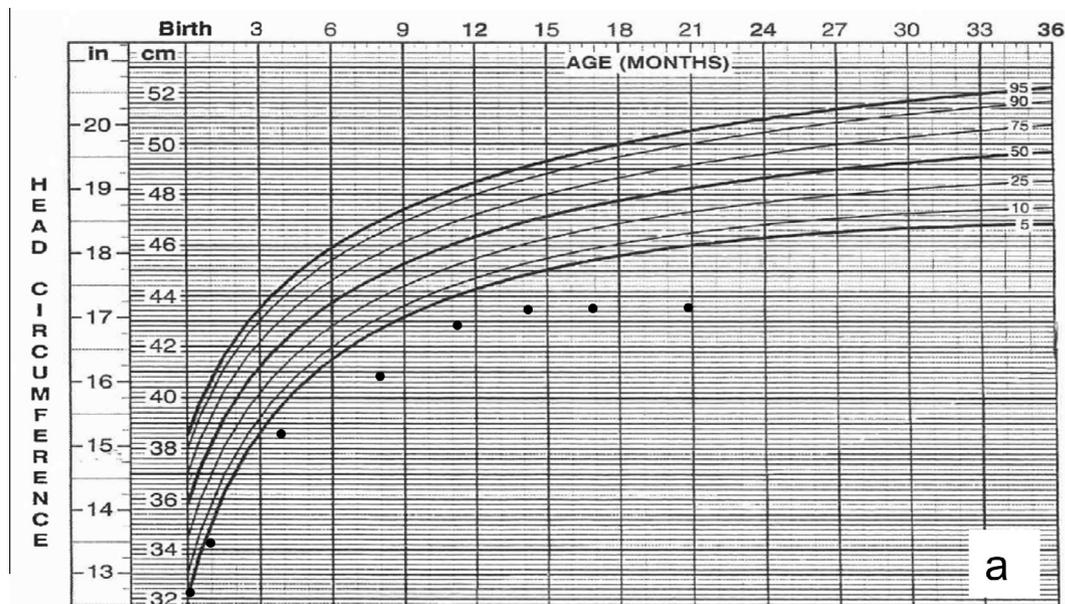


Fig. 1. (a) Growth curve of occipito-frontal circumference shows postnatal microcephaly became more evident between 4 and 8 months of age. (b and c) Brain magnetic resonance imaging (MRI) shows hypoplasia of the rostral part of the corpus callosum ((b) TR/TE = 529.283/13.000) and frontal lobes ((c) TR/TE = 505.224/13.000).

gaze. His sleep pattern did not acquire circadian rhythm. He needed no enteral tube feeding. Postnatal microcephaly became more evident at 4–8 months of age (Fig. 1a). In addition to acquired microcephaly, he had dysmorphisms including a round face, anteverted nostrils, and tented upper lips. Physical examination revealed severe truncal hypotonia. He demonstrated dyskinesic involuntary movements: peculiar jerky movements of the upper limbs pushed in different directions and tongue protrusion. He showed no stereotypic hand washing or hand mouthing, as patients with RTT typically do. Ophthalmological and audiological examinations yielded normal results. Chromosomal analysis revealed normal karyotype, 46, XY. Extensive metabolic investigations including serum amino-acid quantification, serum acylcarnitine profile quantification, and urine organic acid quantification revealed no abnormality.

At three years of age, he experienced unprovoked seizures: nocturnal tonic seizures and sometimes hypermotor seizures. Interictal electroencephalography (EEG) revealed sharp waves over the bilateral frontopolar areas. Therefore, we diagnosed him as having symptomatic focal epilepsy. Brain magnetic resonance imaging (MRI) revealed hypoplasia of the frontal lobes

and the rostral part of the corpus callosum (Fig. 1b and c). Antiepileptic drugs including zonisamide, phenytoin, and phenobarbital controlled his epileptic seizures well. From six years of age, atypical absence and tonic seizures appeared. Interictal EEG showed high-amplitude slow activity and diffuse slow spike and wave complex predominantly over the frontal areas. These seizures were treated with valproate, topiramate, and lamotrigine, which produced some improvement in seizure frequency. These clinical and radiological features are compatible with those of the congenital variant of RTT.

3. Genetic analysis

After obtaining written informed consent from his parents, genomic DNA was extracted from the peripheral blood leukocytes of the patient and his parents and was used for mutation screening. The compatible primers for polymerase chain reaction (PCR) were used to obtain DNA fragments spanning the entire *FOXG1* coding region [4]. Mutation screenings were performed by direct sequencing of the exon1-derived PCR products. Direct sequencing of the entire *FOXG1* coding region yielded a normal result. Screening of the patient's

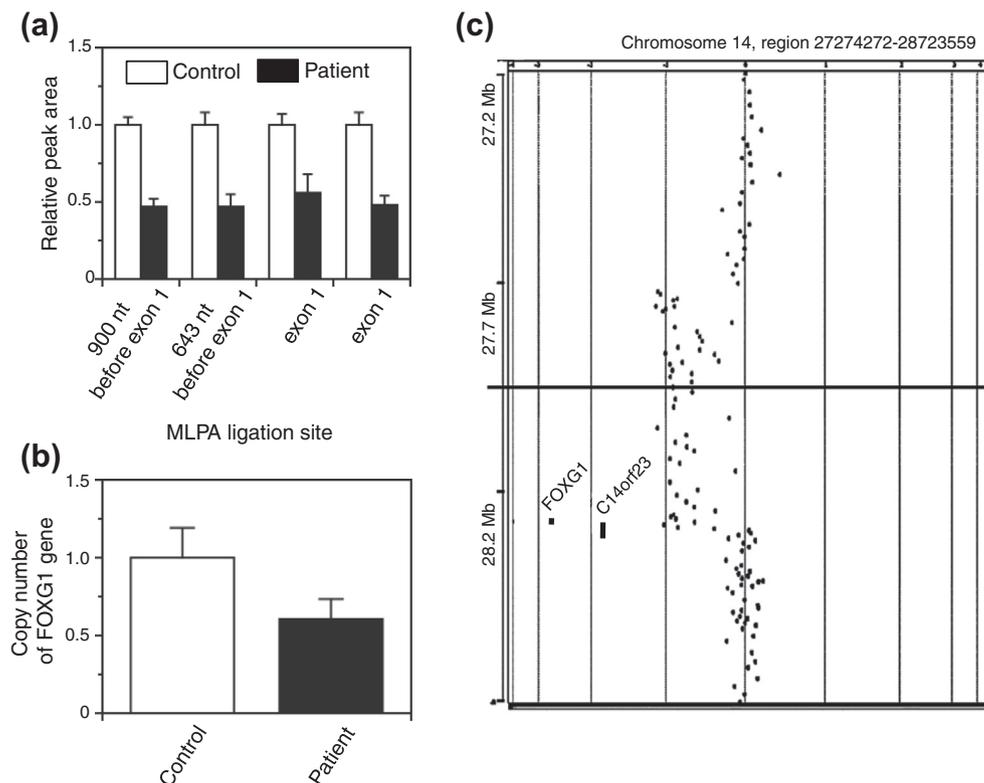


Fig. 2. Heterozygous deletion of the *FOXG1* in the patient. (a) MLPA analysis performed on DNA from the patient revealed deletion of exon 1 in *FOXG1* and a region upstream of exon 1. Results indicate the relative peak area of a probe target sequence with normalization against normal male samples and are shown as means \pm SD ($n = 4$). (b) The number of *FOXG1* copies was ascertained using quantitative real-time PCR assay based on the relative amplification of the target sequence (*FOXG1*) and the internal standard *RNaseP*. Results show the ratio of *FOXG1* versus *RNaseP* gene copies, shown as means \pm SD ($n = 4$). (c) The array-CGH result shows the log₂ intensity ratios of the patient versus reference DNA. A 0.54-Mb deletion was detected at 14q12. This region includes only two genes: *FOXG1* and *C14orf23*.

DNA using an MLPA kit (MLPA-P075-A1; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) revealed a deletion in 14q12 including exon 1 of *FOXG1* and a region upstream of exon 1 (Fig. 2a). Gene dosage analysis was performed using quantitative real-time PCR [4], which confirmed the deletion of *FOXG1* in the patient (Fig. 2b). Testing of the patient's parents confirmed that the deletion of *FOXG1* was *de novo*. To define the boundary of the deleted region, array-based comparative genomic hybridization (aCGH) analysis was performed using a high-resolution 400 K array (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. As a consequence, 540 Kb deletion was confirmed at 14q12 from 27.78 to 28.32 Mb (Fig. 2c; according to UCSC Human Genome Browser, on March 2006 Assembly). Only two genes are included in the region: *FOXG1* and a putative gene, *C14orf23*, with unknown function.

4. Discussion

This report described a Japanese boy with a *de novo* heterozygous deletion of *FOXG1*. *FOXG1*-related disorders consist of 14q12 microdeletion syndrome, loss of function mutation in *FOXG1* and 14q12 microduplication syndrome [4–9,14,15]. *FOXG1* is located on the autosomal chromosome. However, *FOXG1* abnormalities have been found more frequently

in females than in males, probably because of the predominance of females in the diagnosis of RTT. This case report confirmed that *FOXG1* haploinsufficiency causes the congenital variant of RTT in males as well as in females.

His neurological symptoms and brain MRI findings were consistent with a diagnosis of congenital variant of RTT. Patients with 14q12 microdeletion or *FOXG1* point mutation show cardinal clinical features including severe psychomotor deterioration after 3–6 months, acquired microcephaly, truncal hypotonia, epilepsy, and involuntary movements such as tongue protrusion and stereotyped jerky movements of the upper limbs. Brain MRI findings of patients with 14q12 microdeletion or *FOXG1* point mutation are indicate hypogenesis of the rostral part of the corpus callosum and delayed myelination that is specific to frontal lobe. In 2006, Bisgaard et al. reported the first case of microdeletion in chromosome band 14q12, resulting in haploinsufficiency for *FOXG1* [4,5]. Since that first case, more than 10 such cases have been reported [6–8]. In 2008, Ariani et al. reported the first two cases with point mutations of *FOXG1* [4]. In 2009, Yeung et al. reported a case of microduplication in chromosome band 14q12 including *FOXG1* [14]. A considerable phenotypic overlap exists between patients with 14q12 microdeletion, loss of function of mutation in *FOXG1*, 14q12 microduplication, and our patient (presented in

Table 1

Summary of clinical findings of this case, 14q12 microdeletion, *FOXG1* point mutation, and 14q12 microduplication.

	This study	14q12 microdeletion [4,5]	<i>FOXG1</i> point mutation [3]	14q12 microduplication [9,10]
Psychomotor deterioration	After 3 months	After 3–6 months	After 3 months	Sometimes after 3 months
Developmental delay	Postnatal onset	Postnatal onset	Postnatal onset	From birth
Hypotonia	+	+	+	Sometimes
Microcephaly	Postnatal onset	Postnatal onset	Postnatal onset or congenital	Sometimes postnatal
Epilepsy	Refractory	Treatable	Treatable	Sometimes refractory infantile spasms
<i>Involuntary movements</i>				
Jerky movements	+	+	+	–
Tongue protrusion	+	+	+	–
Hand stereotypies	–	+	+	–
Sleep disturbance	+	Sometimes	Sometimes	–
Feeding problems	–	+	Sometimes	–
<i>Brain MRI</i>				
Corpus callosum	Hypogenesis	Sometimes agenesis	Hypogenesis	Hypogenesis
White matter	Delayed myelination (frontal lobe)	Delayed myelination	Delayed myelination	Reduction of white matter volume
Cortex	No abnormality	Not reported	Gyral simplification (frontal lobe)	Not reported
Dysmorphisms	Round face Anteverted nostril Tented upper lips	Epicanthic folds Bulbous nasal tip Depressed nasal bridge Tented upper lips	Not significant	Mid face hypoplasia Flat nasal bridge Small palpebral fissures

the Table 1), suggesting a dosage-sensitive role for *FOXG1* in brain development [14]. *FOXG1* plays an important role in forebrain development [10–12]. These developmental abnormalities, which were specific to the forebrain, appear to be a key feature associated with *FOXG1* haploinsufficiency, although patients with 14q12 microduplication showed no specific abnormalities of the brain MRI [14,15].

Facial dysmorphisms including epicanthic folds, bulbous nasal tip, depressed nasal bridge, and tented upper lips have often been demonstrated in patients with 14q12 microdeletions. By contrast, these features are not seen in patients with *FOXG1* point mutations. It seems likely that the facial dysmorphisms are caused by a contiguous deletion of other genes at 14q12. However, our patient and a previously reported patient [16] who have deletions of only two genes, *FOXG1* and a putative gene *C23orf14C14orf23*, also show distinctive facial features similar to patients with 14q12 microdeletions. Because the identified deletion was the smallest among those previously reported, this deletion narrowed the critical region for facial dysmorphism. Consequently, *C14orf23* might be responsible for facial dysmorphism. Further investigations must be conducted to elucidate the function of *C14orf23* for facial dysmorphism.

Acknowledgment

We thank the members of the patient's family, whose help and participation made this work possible.

References

- [1] Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein2. *Nat Genet* 1999;23:185–8.
- [2] Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, et al. *CDKL5/STK9* is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 2005;42:103–7.
- [3] Liang JS, Shimojima K, Takayama R, Natsume J, Shichiji M, Hirasawa K, et al. *CDKL5* alterations lead to early epileptic encephalopathy in both genders. *Epilepsia* 2011;52:1835–42.
- [4] Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, et al. *FOXG1* is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83:89–93.
- [5] Bisgaard AM, Kirchhoff M, Tumer Z, Jepsen B, Brondum-Nielsen K, Cohen M, et al. Additional chromosomal abnormalities in patients with previously detected abnormal karyotype, mental retardation, and dysmorphic features. *Am J Med Genet A* 2006;140:2180–7.
- [6] Papa FT, Mencarelli MA, Caselli R, Katzaki E, Sampieri K, Melini I, et al. A 3 Mb deletion in 14q12 causes severe mental retardation, mild facial dysmorphisms and Rett-like features. *Am J Med Genet A* 2008;146A:1994–8.
- [7] Mencarelli MA, Kleefstra T, Katzaki E, Papa FT, Cohen M, Pfundt R, et al. 14q12 microdeletion syndrome and congenital variant Rett syndrome. *Eur J Med Genet* 2009;52:148–52.
- [8] Florian C, Bahi-Buisson N, Bienvenn T. *FOXG1*-related disorders: from clinical description to molecular genetics. *Mol Syndromol* 2011;2:153–63.
- [9] Pintandi M, Calevo MG, Vignoli A, Parodi E, Ajello F, Baglietto MG. Epilepsy in Rett syndrome: clinical and genetic features. *Epilepsy Behav* 2010;19:296–300.
- [10] Hanashima C, Li SC, Shen L, Lai E, Fishell G. Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* 2004;303:56–9.
- [11] Danesin C, Houart C. Developmental mechanisms, patterning and evolution A Fox stops the Wnt: implications for forebrain development and diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2012;4:323–30.
- [12] Filippis RD, Pancrazi L, Bjogo K, Rosset A, Kleefstra T, Grillo E, et al. Expanding the phenotype associated with *FOXG1* mutations and in vivo FoxG1 chromatin-binding dynamics. *Clin Genet* 2012;4:395–403.
- [13] Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, et al. Rett search consortium. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 2010;68:944–50.
- [14] Yeung A, Bruno D, Scheffer IE, Carranza D, Burgess T, Slater HR, et al. 4.45 Mb microduplication in chromosome band 14q12 including *FOXG1* in a girl with refractory epilepsy and intellectual impairment. *Eur J Med Genet* 2009;52:440–2.
- [15] Brunetti-Pierri N, Paciokowski AR, Ciccone R, Della Mina E, Bonaqlia MC, Borqatti R, et al. Duplications of *FOXG1* in 14q12 are associated with developmental epilepsy, mental retardation, and severe speech impairment. *Eur J Hum Genet* 2011;19:102–7.
- [16] Jacob FD, Ramaswamy V, Andersen J, Bolduc FV. Atypical Rett syndrome with selective *FOXG1* deletion detected by comparative genomic hybridization: case report and review of literature. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1577–81.