

平成27年度研究助成報告書

平成 28年 5月30日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 堀家 慎一



1. 研究課題 X染色体不活性化機構の制御によるレット症候群の新規治療法の確立

2. 研究期間 平成27年 4月 1日 ~ 平成28年 3月31日

3. 研究（経過・成果）の概要

レット症候群は、女兒のみに発症する進行性神経発達障害であり、1999年に原因遺伝子として MeCP2 が同定されて以来、世界中で精力的に、その発症機序の解明および治療法の開発研究が推し進められてきた。特に、MeCP2 はメチル化 CpG 結合タンパク質をコードする転写因子であり、その機能そのものが直接レット症候群の表現型に寄与することは考えづらく、MeCP2 によって制御を受けるターゲット遺伝子の同定に世界中の注目が集まってきた。そして、これまでの研究から BDNF, DLX5, IGFBP3 などのターゲット遺伝子の同定に成功してきたが、それらの知見を応用した治療法の確立には未だ至っていない。その理由の一つは、MeCP2 の遺伝子量が極めて重要であり、他の疾患のようにウイルスベクターを用いた正常遺伝子の過剰な導入法の適用は、難しいためである。そこで、本研究では上記の問題点を克服するために、レット症候群の女兒が本来もつ正常な MeCP2 アレルを活性化し、欠失のある MeCP2 アレルを不活性化する治療戦略を構築した。申請者の治療戦略では、MeCP2 の遺伝子量は正確に維持され、且つ組織特異的・時期特異的な遺伝子発現を可能とすることから、治療におけるリスクは極めて小さいものと考えられる。そこで、本研究では将来の治療への応用を目指した基礎的知見の収集を目的に、X染色体不活性化機構を人工的に制御し、レット症候群の女兒が本来もつ正常な MeCP2 アレルを活性化し、欠失のある MeCP2 アレルを不活性化する治療戦略を構築した。平成27年度は、下記に示した MeCP2 欠損ヒト iPS 細胞と XIST 欠損ヒト iPS 細胞の樹立をおこなった。

① MeCP2 欠損ヒト iPS 細胞の樹立

ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを利用し、MeCP2 遺伝子のエクソン 3 の欠失を行った。樹立した MeCP2 欠損 iPS 細胞において、ウエスタンブロット法により MeCP2 の欠損を確認した。

② 正常な MeCP2 を持つ X 染色体上の XIST 遺伝子の欠損

MeCP2 の欠損と同様に、CRISPR/Cas9 システムを利用し、XIST 遺伝子領域（約 30kb）の欠失を行った。通常のヒト iPS 細胞は、プライム型であり、X 染色体の不活性化を維持しているため、樹立した iPS 細胞のナイーブ型への変換を ReproNaive(リプロセル)を用いて培養し、ナイーブ型 iPS 細胞への誘導・維持実験をおこなっている。今後、ナイーブ型の MeCP2/XIST 欠損 iPS 細胞を分化誘導し、分化細胞にて、正常な MeCP2 が選択的に発現することをウエスタンブロット法により確認する。その上で、iPS 細胞から神経分化させ、BDNF, DLX5, IGFBP3 などのターゲット遺伝子がどのように変化するか明らかにする予定である。

