

様式 2

2020年度研究助成報告書

2021年 3月 31日

NPO 法人 Rett 症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 自治医科大学 宮内 彰彦



1. 研究課題 Rett 症候群に対する MECP2 発現調節等を介した遺伝子治療法開発
2. 研究期間 2020年 4月 1日 ~ 2021年 3月 31日
3. 研究（経過・成果）の概要

Rett 症候群の病因遺伝子である *MECP2* は、X 染色体上に存在するため細胞単位のランダムな不活化を受けており、正常な *MECP2* 蛋白質を発現する細胞と発現の無い細胞が混在する。*MECP2* の変異と、各細胞の X 染色体の不活性化現象が分子病態の理解を複雑にしている。本研究では、*MECP2* 関連疾患の遺伝子治療法開発を目的とし、内在する *MECP2* の発現、および導入(外来)*MECP2* 遺伝子の発現量の制御を検討した。

まず Rett 症候群に対するアデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを用いた遺伝子治療法の検討を行った。Rett 症候群の遺伝子治療用の AAV ベクターとして、神経細胞への移行に優れた AAV.GTX ベクターに低発現プロモーターと *MECP2* 遺伝子を導入した AAV ベクターを作製し、実験必要量を得ることができた。AAV ベクターは、ヒト iPS 細胞から分化させた神経細胞、マウス初代神経細胞への感染により、外来性および内在性 *MECP2* 発現量のモニタリングが可能であることを明らかにした。マウス用の AAV ベクターは、Rett 症候群のモデル動物である *Mecp2* 欠損マウスのヘテロ雌に投与し、運動障害等の評価の改善、組織や神経細胞の変化を観察予定である。産出個体数が揃い次第、投与を実施する。なお、マウスやブタへの GFP 遺伝子のみ AAV ベクターによる脳・神経細胞経路の検討により、大槽への

投与で、脳に広範囲に及んだ遺伝子発現を確認できている。

MECP2 発現量のコントロール法の開発では、MECP2 関連疾患で、Rett 症候群と対として考えられることが多い MECP2 重複症候群も対象としている。miRNA mimic が、MECP2 重複症候群患者または非罹患者由来の繊維芽細胞、および非罹患者 iPS 細胞由来の神経細胞の MECP2 mRNA 発現に及ぼす影響を調べた。その結果、多くの miRNA 種で発現を抑制した。現在、核酸医薬(miRNA mimic、SiRNA、アンチセンスオリゴ等)および遺伝子編集技術を応用した dCAS9 の融合による複合的な方法により、正常遺伝子の発現レベルの制御可能な AAV ベクターの構築工程に進んでいる。

また、新規変異として、MECP2 の 281 番のアミノ酸変異を持つ Rett 症候群患者由来の iPS 細胞を作製した。今後、iPS 細胞由来の神経細胞の変化や X 染色体不活性化因子等が MECP2 に与える影響について検討する。

様式 1

助成金収支報告書

2021年 3月 31日

NPO 法人症候群支援機構
代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 自治医科大学 宮内 彰彦



1. 研究課題名 Rett 症候群に対する MECP2 発現調節等を介した遺伝子治療法開発

2. 助成金交付額 2,000,000 円

3. 費目別使用実績

(単位 円)

項目	金額	備考
消耗品費	29,810	アキュターゼ 他
消耗品費	112,200	STEMdiff Neural Progenitor Medium 1Kit 他
消耗品費	111,265	StemFit (R) AK02N (A液: 400mL/B液: 100mL/C液: 2mL) 他
消耗品費	98,175	STEMdiff SMADi Neural Induction Kit, 2pack
消耗品費	221,171	スタンダードオリゴ 3本 No.1604025 他
消耗品費	150,672	リアルタイム RT-PCR 用 プライマー 他
消耗品費	378,180	JR#003890 マウス メス
消耗品費	57,970	MeCP(D4F3)XP Rabbit mAB
消耗品費	7,326	C57BL/6J 11W メス 他
消耗品費	5,659	マウス 妊娠 19日目 ♀ 1匹
消耗品費	463,320	JR#008679 マウス BP
消耗品費	5,478	マウス 9週令 ♂ 2匹
消耗品費	124,795	抗マウス Nestin, ラットモノクローナル抗体 (7A3) 50 μ L 他
消耗品費	1,683	チューブインク (緑)

