

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006 ～ 2008
課題番号：18390551
研究課題名（和文） Rett 症候群モデルによる中枢および顎口腔機能異常の発症メカニズムの解明
研究課題名（英文） Investigations of the anomalies occurred in central and oromandibular functions in the model of Rett syndrome
研究代表者
白川 哲夫（SHIRAKAWA TETSUO）
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：00187527

研究成果の概要: Rett 症候群モデルの雄マウスでは、死亡する約 2 週前より体重が減少に転じ、摂食量の急激な低下が生じること、またヘテロ欠損雌マウス (Mecp2+/-) を 30 週以上通常の餌で飼育すると、約 80% が過食による著しい肥満を呈することが明らかになった。肥満を呈した Mecp2+/- では、延髄においてチロシン水酸化酵素の著明な減少がみられ、視床下部ではメラニン凝集ホルモンとその受容体の上昇が認められた。Mecp2+/- の肥満にはこれら中枢の変化が関わっている可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2006 年度	6,900,000	290,000	7,190,000
2007 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総 計	15,500,000	2,870,000	18,370,000

研究分野：小児歯科学、神経科学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：Rett 症候群、MeCP2、顎口腔機能、摂食調節中枢、肥満

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群は広汎性発達障害に含まれる疾患であり、ヒトでは 1 万人に 1 人から 1 万 5 千人に 1 人の割合でほとんど女兒に発症する。全例で精神遅滞を伴うほか、てんかん発作、過呼吸や息止め発作、歯ぎしりによる著明な咬耗が高い割合で認められる。全身的に運動機能の協調不全が認められ、顎口腔の運動にも異常があるため咀嚼や発声に障害をきたす。また睡眠障害や手もみなどの常同運動がみられることも多い。

これまでに、メチル化 DNA 結合タンパク

MeCP2 の異常が Rett 症候群の諸症状を引き起こしていることが明らかになっているが、MeCP2 をコードする遺伝子 *Mecp2* の変異がどのように疾患の発症に関わっているのかについて詳細は不明である。

2. 研究の目的

Rett 症候群は主として女兒に発症するが、MeCP2 欠損雄マウス *Mecp2*(-/y) では中枢性の呼吸機能の異常とともに摂食機能の低下がみられ、成長抑制も著しい。これらの症状は Rett 症候群のうちの重症例に類似しており、

Rett 症候群の病態の解明にこの遺伝子変異マウスが有用であることが明らかになっている。

一方、MeCP2 ヘテロ接合雌マウス Mecn2(+/-)では、一部にてんかん発作を生じる例があるものの成長抑制はみられず、むしろ高い割合で著しい肥満を呈するという特徴がある。これは症状が比較的軽度のヒトの MeCP2 遺伝子変異症例に類似している。

そこで本研究では Mecn2(-/y)雄ならびに Mecn2(+/-)雌マウス(ジャクソンラボより購入)を Rett 症候群モデルとして用い、中枢および顎口腔機能異常の発症メカニズムを明らかにすることを目的に研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) Mecn2 変異マウスの自発行動

自発行動の測定には、小動物用自発行動測定装置を用いた。4 週以上連続記録したデータについて、行動パターンならびに行動リズムを長期活動データ・リズム解析ソフトによって解析した。

Mecn2(-/y)マウスと野生型(Wild)雄マウスについて 7 時から 19 時までを明期として行動リズムを観察した後、恒暗条件にして同様に行動リズムを調べた。

また生後 10 週から 40 週の Mecn2(+/-)マウスと Wild 雌マウスについて行動リズムを観察した後、明暗周期の位相を 8 時間前進させた。リズムが同調した後、8 時間後退させて再同調するまでの日数を測った。

(2) 摂食行動異常の検出

Mecn2(-/y)マウスと Wild 雄マウスの体重変化を一週間ごとに記録した。4 台の CCD カメラを備えた行動計測装置を用い、マウスの画像を連続的に記録した後、異常行動の有無を調べた。

また「むせ」や無呼吸発作時の動きについてはハイビジョンビデオカメラで撮影、記録した。

(3) 孤束核、A1/C1、青斑核での MeCP2 陽性細胞の染色と細胞数の比較

孤束核、A1/C1、青斑核での MeCP2 陽性細胞の数と分布を、生後 20 週から 30 週の Mecn2(+/-)マウスと Wild 雌マウスについて、厚さ 30 μ m の切片上で、抗 MeCP2 抗体を用いた免疫組織染色(DAB 法)により調べ比較した。一次抗体にはウサギ抗 MeCP2 抗体

(Affinity BioReagent 社、および Epigentek 社)を用いた。

また tyrosine hydroxylase (TH) との共存を免疫二重染色法により調べた。二重染色にはウサギ抗 MeCP2 抗体およびマウス抗 TH 抗体(Boehringer Mannheim 社)を用いた。

(4) 肥満を呈した Mecn2(+/-)マウスについて

の三次元画像解析

小動物用エックス線マイクロ CT を用い、肥満を呈した Mecn2(+/-)マウスについて胸腹部の三次元計測を行い、野生型マウスと比較した。また画像解析ソフトウェアにより画像上の脂肪の分布を検討した。

(5) 肥満を呈した Mecn2(+/-)マウス脳についてのマイクロアレイ解析

肥満を呈した(体重 50g 以上)生後 30 週~50 週齢の Mecn2(+/-)マウス 3 匹ならびに同年齢の Wild 雌マウス 3 匹の脳より mRNA を抽出し、アジレント社のマイクロアレイを使用して遺伝子発現の網羅的解析を行った。解析部位は孤束核を含む延髄背側部ならびに弓状核を含む視床下部腹側部とした。

(6) マイクロアレイ解析により遺伝子発現量に変化が認められた MCH および TH についての免疫組織学的検討

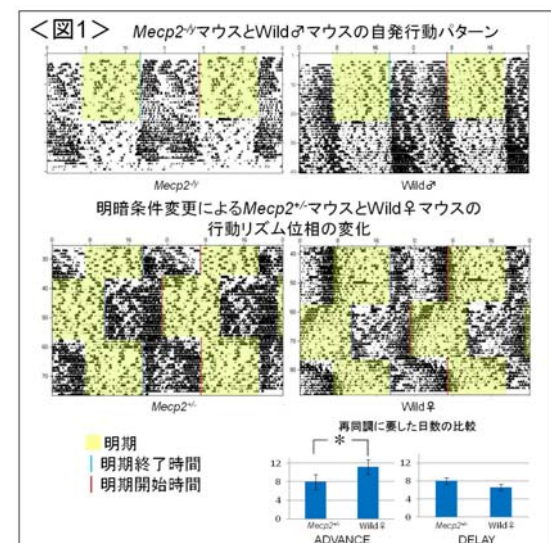
孤束核での TH 陽性細胞の分布および弓状核での melanin concentrating hormone (MCH) 陽性細胞の分布を、生後 30 週~50 週の Mecn2(+/-)マウスと Wild 雌マウスについて、厚さ 30 μ m の切片上で DAB 法により調べた。一次抗体には前述のマウス抗 TH 抗体ならびにウサギ抗 MCH 抗体(Phoenix Pharmaceuticals Inc.)を用いた。

4. 研究成果

(1) Mecn2(-/y)マウスの自発行動

Mecn2(-/y)マウスの行動リズムは 24 時間周期のリズムを示したが、行動量は Wild 雄に比べ少なく、毎日の行動開始時間にばらつきが認められた。

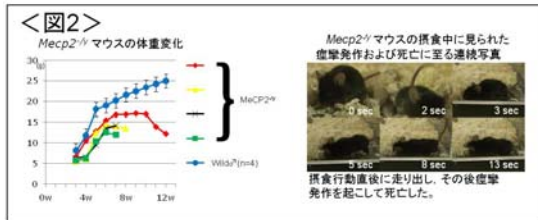
また Mecn2(+/-)マウスと Wild 雌マウスについて明暗周期を 8 時間位相前進させた場合の再同調には、Wild 雌マウスの方がより多くの日数を必要とした(図 1)。



(2) 摂食行動異常の検出

Mecp2(-/y)マウスでは、生後 40 日以降で体重の増加がみられなくなり、死亡のおよそ 2 週間前から体重はむしろ減少した。

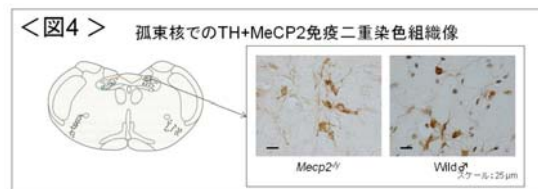
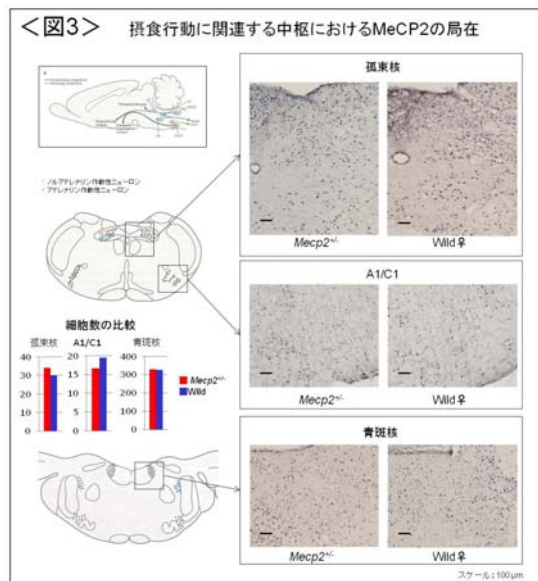
また餌の摂取中に痙攣発作を起こし死亡する個体もみられた (図 2)。



(3) 孤束核、A1/C1、青斑核での MeCP2 陽性細胞の染色と細胞数の比較

孤束核、A1/C1、青斑核での MeCP2 陽性細胞数を *Mecp2*(+/-)マウスと Wild 雌マウスで比較したところ、いずれの部位においても細胞数に差は見られなかった(図 3)。

またWild雄マウスではTH陽性細胞の 76% でMeCP2 との共存が観察されたが、Mecp2(-/y) マウスではMeCP2 陽性細胞は認められなかった(図4: THは茶色に、MeCP2 は紺色に発色)。



(4) 肥満を呈した *Mecp2* (+/-) マウスについての三次元画像解析

肥満を呈した *Mecp2* (+/-) マウスでは、胸腔、肝臓、脾臓などの内臓周囲に著明な脂肪の蓄

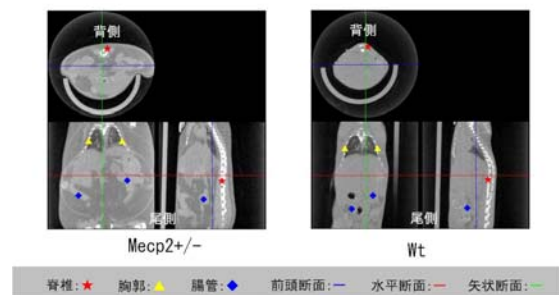
積を認めた。一方、皮下脂肪についてはその量に関し、Mecp2(+/-)マウスと Wild 雌マウスで差は見られなかった (図 5-7)。



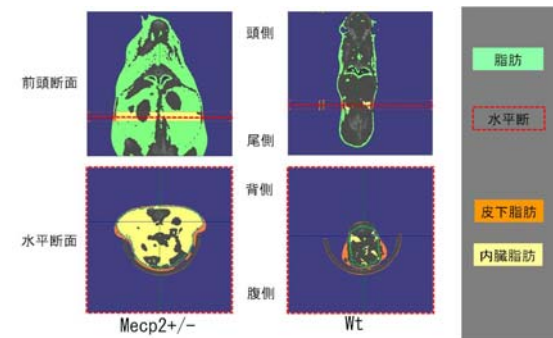
<図 5>

実験動物用マイクロCT撮影

三次元的解析



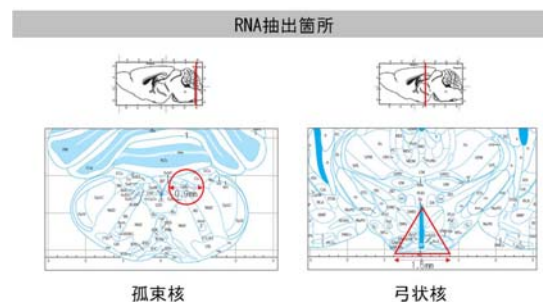
<図 6>



〈図 7〉

(5) 肥満を呈した *Mecp2*(+/-) マウス脳についてのマイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析を行った脳部位（孤束核、弓状核）と組織を採取した範囲を図8に示す。



<图 8>

マイクロアレイ解析の手順を図9に示す。



〈図9〉

マイクロアレイによる主要な解析結果を表1, 2に示す。

マイクロアレイ解析(1)				
孤束核を含む延髄背側部におけるmRNAの発現比較				
		normalized expression level		ratio
		MeCP2 +/- (mutant)	Wt	mutant/Wt
モノアミン合成酵素	tyrosine hydroxylase (Th)	0.06	1.45	0.04
	dopamine beta hydroxylase (Ddh)	0.07	1.78	0.04
	vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2)	0.13	4.85	0.03
モノアミントランスポーター	noradrenalin transporter, member 2	0.05	4.21	0.01
酸化ストレス抑制物質	transthyretin (Tr)	1.09	23.35	0.05
	folate receptor 1 (adult) (Folr1)	0.41	8.65	0.05
	klotho	0.13	4.43	0.03
摂食亢進に働くペプチドとその受容体	melanin-concentrating hormone receptor 1 (Mchr1)	1.54	0.51	3.02
	neuropeptide Y (Npy)	0.05	0.32	0.16
	neuropeptide Y receptor Y1 (Npy1r)	0.03	0.03	1.00
	neuropeptide Y receptor Y2 (Npy2r)	0.10	0.16	0.63
	hypoocretin (orexin) receptor 1 (Hcrtr1)	0.14	0.44	0.32
	hypoocretin (orexin) receptor 2 (Hcrtr2)	0.05	0.05	1.00

〈表1〉

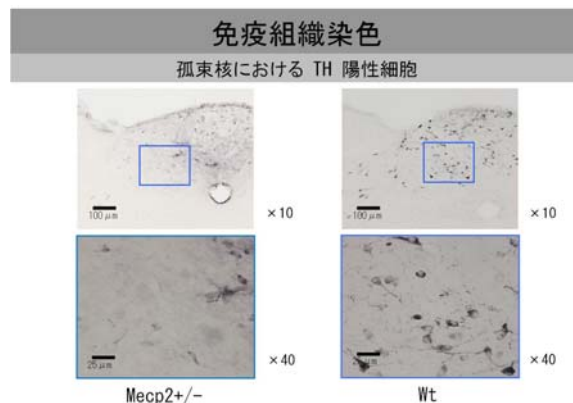
マイクロアレイ解析(2)				
弓状核を含む視床下部腹側部におけるmRNAの発現比較				
		normalized expression level		ratio
		MeCP2 +/- (mutant)	Wt	mutant/Wt
摂食亢進に働くペプチドとその受容体	pro-melanin-concentrating hormone (Pmch)	24.18	2.91	8.31
	melanin-concentrating hormone receptor 1 (Mchr1)	2.62	0.80	3.30
	neuropeptide Y (Npy)	2.94	8.10	0.36
	neuropeptide Y receptor Y1 (Npy1r)	0.19	0.25	0.76
	neuropeptide Y receptor Y2 (Npy2r)	1.32	1.44	0.92
	agouti related protein (Agrp)	2.09	6.46	0.32
	forkhead box O1 (Foxo1)	3.54	3.74	0.95
	hypoocretin (orexin) receptor 1 (Hcrtr1)	0.25	0.24	1.05
	hypoocretin (orexin) receptor 2 (Hcrtr2)	0.03	0.04	0.80
		normalized expression level		ratio
		mutant	Wt	mutant/Wt
摂食抑制に働くペプチドとその受容体	pro-opiomelanocortin-alpha (Pomc1)	45.76	91.42	0.50
	CART prepropeptide (Cartpt), transcript variant 1	35.29	20.58	1.71

〈表2〉

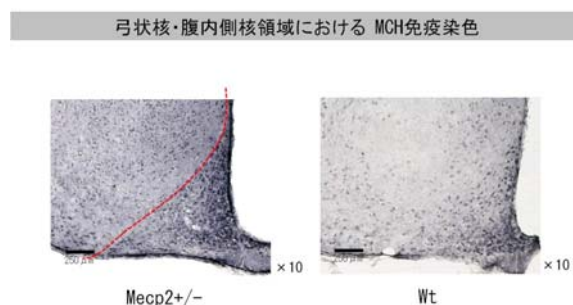
マイクロアレイ解析の結果、孤束核領域では TH、dopamine-β hydroxylase、vesicular monoamine transporter 2 など、モノアミン性神経伝達に関与する蛋白をコードする遺伝子の発現の低下が認められた。また、transthyretin、folate receptor 1、klotho など酸化ストレス抑制に働く蛋白をコードする遺伝子の発現の低下が認められた。一方、メラニン凝集ホルモン (MCH) 受容体 1 については遺伝子発現の上昇が認められた。

弓状核、腹内側核の一部を含む視床下部腹側部では、MCH の前駆体である pro-MCH をコードする遺伝子の著明な発現上昇が認められた。また、MCH 受容体 1 についても発現量の上昇がみられた。

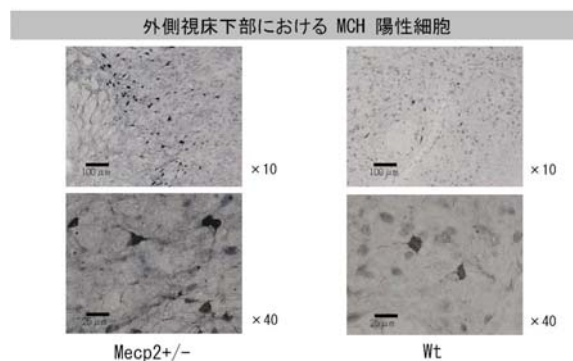
(6) マイクロアレイ解析により遺伝子発現量に変化が認められた MCH および TH についての免疫組織学的検討



〈図10〉



〈図11〉



〈図12〉

孤束核においては TH 陽性細胞数の著明な減少がみられた。また、Wild マウスでは濃染した TH 陽性細胞が多く見られたのに対し、MeCP2 (+/-) マウスでは、淡く染色された細胞が比較的多くみられた。一方、弓状核、腹内側核の一部を含む視床下部腹側部については、MeCP2 (+/-) マウスで MCH に対する免疫陽

性反応がより強く認められた。これらは外側視床下部に存在する MCH 産生細胞から軸索を經由して MCH が運ばれたものと考えられるが、マイクロアレイの結果から判断して、Mecp2(+/-) マウスの弓状核あるいは腹内側核の近傍に、MCH 産生細胞がより多く存在している可能性も考えられる。これらの変化をより詳細に検討するため、今後、in situ hybridization 法あるいは定量的 PCR 法による検討が必要である。

摂食量が増加し肥満を呈した Mecp2(+/-) マウスでは、孤束核において、食欲や運動調節に関わる TH の著明な減少が認められ、弓状核、腹内側核および外側視床下部において、摂食亢進ペプチドである MCH の上昇が認められた。連続的な餌摂取量の測定結果から、この体重の異常増加は主として過食が原因であることが判明していることから、Mecp2(+/-) マウスの肥満には、延髄での TH の減少、および視床下部での MCH の上昇に関わっている可能性が高い。また延髄での TH の減少には、Mecp2 遺伝子変異に起因する酸化ストレスの関与も否定できない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① Pendergast JS, Nakamura W, Friday RC, Hatanaka F, Takumi T, Yamazaki S (2009) Robust Food Anticipatory Activity in BMAL1-Deficient Mice. PLoS ONE 4, e4860, 査読有り
- ② Mistlberger RE, Yamazaki S, Pendergast JS, Landry GJ, Takumi T, Nakamura W (2008) Comment on "Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms". Science 322, 675, 査読有り
- ③ Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T, Tanaka K, Watanabe M (2008) Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. J Neurosci 28, 4995-5006, 査読有り
- ④ Nakamura W, Yamazaki S, Nakamura TJ, Shirakawa T, Block GD, Takumi T (2008) In vivo monitoring of circadian timing in freely moving mice. Curr Biol 18, 381-385, 査読有り
- ⑤ Uchida A, Yoshida M, Araki H, Yamaguchi T, Nakamura S, Yoshida H, Nakajima I, Shirakawa T (2008) Relationship between reaction time for mandibular movement and

the level of muscular discharge of the masticatory muscles in a reaction time task in patients with cerebral palsy. Ped Dent J 18, 137-146, 査読有り

- ⑥ Yamaguchi T, Yoshida M, Nakamura S, Araki H, Uchida A, Yoshida H, Nakajima I, Shirakawa T (2008) Study on the relationship between sensation of the mandibular position and the oral dysfunctions in the cerebral palsy patients. Ped Dent J 18, 147-155, 査読有り

- ⑦ Sato K, Niikuni N, Nakajima I, Shirakawa T, Sakata H (2007) Surgical treatment for sleep apnea: changes in craniofacial and pharyngeal airway morphology in a child with achondroplasia. J Oral Sci 49, 173-177, 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 滝口旗一他、Rett 症候群モデルマウスにおける肥満および行動異常についての病態解析、第 47 回日本小児歯科学会大会、2009 年 5 月 15 日、吹田市
- ② 和田 崇他、Rett 症候群モデルマウスの摂食行動とその異常、第 46 回日本小児歯科学会大会、2008 年 6 月 13 日、さいたま市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA TETSUO)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：00187527

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

三留 雅人 (MITOME MASATO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号：50261318

本間 さと (HONMA SATO)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20142713

中村 渉 (NAKAMURA WATARU)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任准教授
研究者番号：60372257