

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390295

研究課題名（和文）

エピゲノム情報を基盤とした小児自閉症患者の病態把握と治療法の確立

研究課題名（英文）

Understanding of pathogenesis of autism and development of its therapeutic way based on epigenomic information

研究代表者

久保田 健夫（KUBOTA TAKEO）

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：70293511

**研究成果の概要（和文）**：遺伝病の原因として DNA の配列異常が知られてきたが、これに加え、DNA 修飾（エピゲノム）の異常も原因となることが判明した。このような背景の下、われわれは、エピゲノム因子（MeCP2）の異常で生じる小児自閉症疾患（レット症候群）の病態の解明研究を行った。その結果、脳内で MeCP2 によって神経細胞接着因子が調節されていることを明らかにし、合わせて栄養素やゲノム標的薬物を用いた治療法の基礎となる知見を得た。

**研究成果の概要（英文）**：Epigenetic abnormalities, as well as genetic mutations, are now considered to be causes of genetic diseases. One of those is an autistic disorder, Rett syndrome, which is caused by *MECP2* gene mutations. In this study, we found new *MECP2* target genes, which is involved in neuronal cell adhesion. Furthermore, we obtained some knowledge of the therapeutic methodology for epigenomic diseases with nutritional factors and gene-targeting epigenomic reagents.

**交付決定額**

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児、自閉症、エピゲノム、病態、治療法

**1. 研究開始当初の背景**

1990年代に行われたゲノム解読計画の恩恵により、今日まで、疾患の遺伝学的原因である遺伝子変異（DNA 配列変化）が多数明らかにされてきた。

一方、DNA 配列や DNA によって取り巻かれ

ているヒストン蛋白質上の化学修飾が遺伝子の機能に影響を与えるメカニズムであるエピジェネティクスの詳細が明らかにされ、これに基づいて、最近、ゲノム全体に亘る修飾（エピゲノム）の解読も開始された。

エピゲノムは、ゲノムに比べて、環境（各種栄養素、薬物、ストレスなど）の影響を受け変化しやすい。したがって、環境変化によってエピゲノム変化が生じ、その結果、遺伝子機能が変化し最終的に疾患に至ることが想定される。

小児においても、従来の先天性の遺伝性疾患の他、子供を取り巻く環境に起因する後天性の遺伝性疾患の存在が想定されるようになってきた。この観点から、エピゲノム因子の先天異常で生ずる自閉症疾患のレット症候群と同様の病態が、後天的なエピゲノム異常でも生ずると考えられるようになってきた。

これを受け、エピゲノムは環境の影響を受けやすい反面、可逆性（治療回復性）を有することから、エピゲノム修復に根ざした新しい遺伝子治療法の研究も検討され始めた。

## 2. 研究の目的

研究の目的は、自閉症病態におけるエピゲノム異常を明らかにし、その治療法確立にむけた知見を獲得することである。係る目的のため、以下の3つの研究課題を本研究期間内の具体的な目的とした。

### (1) MeCP2 蛋白質の標的遺伝子の特定

レット症候群は単一遺伝子の異常で発症する代表的な自閉症疾患である。この原因が MeCP2 蛋白質 (MeCP2) をコードする遺伝子の異常であることと、この蛋白質が脳細胞内の遺伝子のエピジェネティックな発現調節を行っていることが判明した。以上の知見から、自閉症の神経病態に脳内のエピジェネティックな遺伝子調節の破綻が想定されるようになった。

しかしながら、具体的に MeCP2 によって調節をうける遺伝子と自閉症病態との関連性は明らかにされていなかった。そこでわれわ

れは、自閉症の神経病態に関係する MeCP2 によって神経細胞内で調節を受けている遺伝子を探索した。

### (2) エピゲノム治療栄養素（葉酸）の血中濃度測定法としての質量分析法の検証

MeCP2 蛋白質の遺伝子調節作用は遺伝子 DNA 上のメチル化に依存している。したがって MeCP2 蛋白質の遺伝子変異（先天的異常）や後天的なメチル化の低下の際は、メチル化の基質である栄養素（葉酸）の補充が有効と考えられており、一部の自閉症児への有効性が報告されている。

しかしながら、「葉酸の補充投与が、神経機能に関わる標的遺伝子のメチル化を改善させ、MeCP2 による適正な調節の回復を経て、症状緩和に貢献している」との直接的証拠はなかった。そこでわれわれは、これを証明する研究の関連研究として、葉酸の適正な投与を血中でモニター可能な方法の開発を行った。

### (3) 遺伝子特異的エピゲノム治療法の基礎的知見の獲得

葉酸は DNA メチル化強化効果を有する栄養素である。したがって後天的に MeCP2 蛋白質の標的（被調節）遺伝子の DNA メチル化低下に対し、その修復（エピゲノム修復）に貢献する物質といえる。

しかしながら、栄養素である葉酸は、特定の標的遺伝子領域の DNA のメチル化を強化するだけでなく、ゲノム全体にグローバルに効果を発揮する可能性が強い。そこでわれわれは、DNA 配列特異的にデザイン可能でその領域のエピゲノム修復機能を有するピロールイミダゾール(PI)・ポリアミドを用いた治療戦略をスタートさせた。具体的には、レット症候群で低下している MeCP2 遺伝子の発現回復が期待される PI ポリアミドを設計した。

## 3. 研究の方法

(1) MeCP2 蛋白質の標的遺伝子の特定

種々の分子遺伝学的手法を用いた。具体的には、クロマチン免疫沈降法、バイサルファイトシーケンス法、ルシフェラーゼアッセイ、siRNA による遺伝子発現抑制、定量 RT-PCR 法を用いた。

(2) エピゲノム治療候補栄養素（葉酸）の血中濃度測定法としての質量分析法の検証

新しい質量分析法（プローブエレクトロスプレー法を用いた。

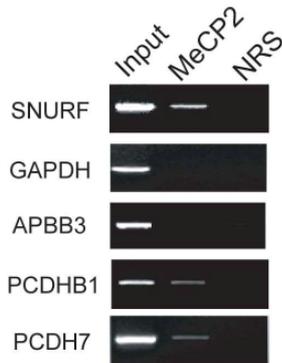
(3) 遺伝子特異的エピゲノム治療法の礎的知見の獲得

MECP2 遺伝子配列上の PI ポリアミドのデザインに、ゲノムデータベースを用いた。

4. 研究成果

(1) MeCP2 蛋白質の標的遺伝子の特定

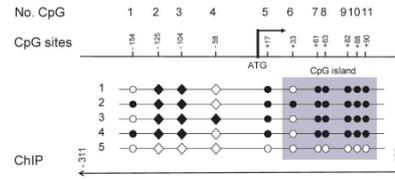
①クロマチン免疫沈降法による結合遺伝子の同定：ChiP and chip スクリーニング法によって得られた MeCP2 結合遺伝子候補領域のうち、*PCDHB1* と *PCDH7* において MeCP2 タンパク質の結合が確認された。



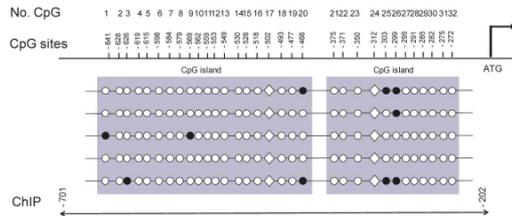
なお、SNURF は既知の結合領域、GAPDH は既知の非結合領域。APBB3 遺伝子では結合が確認ができなかった（スクリーニング時の偽陽性と判断）。

②バイサルファイトシーケンス法による結合遺伝子のメチル化の把握：*PCDHB1* では高度の、*PCDH7* では軽度のメチル化を認めた。

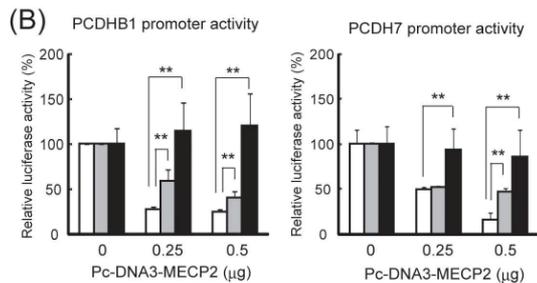
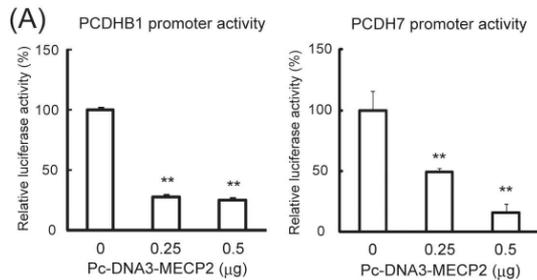
(A) *PCDHB1*



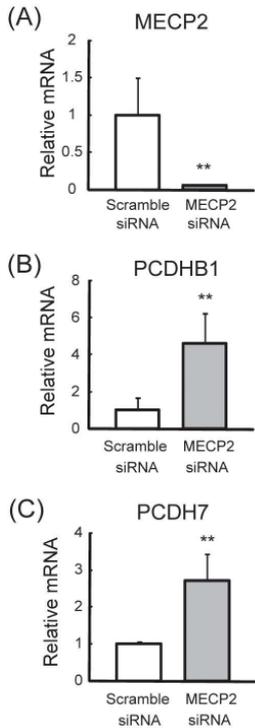
(B) *PCDH7*



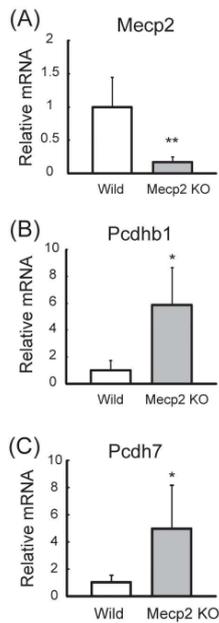
③MeCP2 による遺伝子発現低下の確認：ルシフェラーゼアッセイの結果、*PCDHB1* と *PCDH7* は、神経培養細胞内において、両依存的に MeCP2 によって発現が抑制されることがわかった(A)。また、患者変異を導入した MeCP2 や欠失を生じさせた MeCP2 では、抑制が生じないか、著しい抑制不全を認めた(B)。



④siRNA 発現抑制による *MECP2* 発現低下時の 2 遺伝子の発現上昇確認（ヒト）：*MECP2* の発現を特異的に低下させる siRNA をヒト神経培養細胞内に導入したところ(A)、*PCDHB1*(B)、*PCDH7*(C) ともに発現上昇を示した。このことから *MECP2* によって発現抑制がなされていることが支持された。

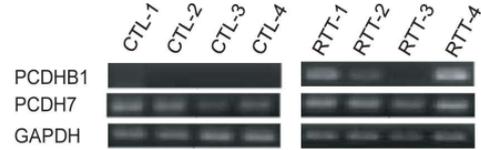


⑤ siRNA 発現抑制による *Mecp2* 発現低下時の 2 遺伝子の発現上昇確認 (マウス): *MECP2* の発現を特異的に低下させる siRNA をマウス神経培養細胞内に導入したところ (A)、*Pcdhb1* (B)、*Pcdh7* (C) とともに発現上昇を示した。このことからマウス神経系細胞においても *MECP2* によって発現抑制がなされていることが支持された。



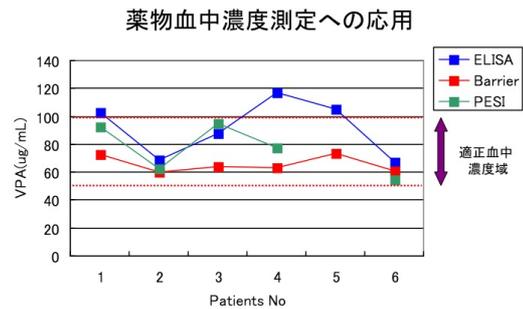
## ⑥ ヒトレット症候群患者死後脳における 2 遺伝子の過剰発現の確認

一部の患者脳で *PCDHB1* の過剰発現が確認された



## (2) エピゲノム治療候補栄養素 (葉酸) の血中濃度測定法としての質量分析法の検証

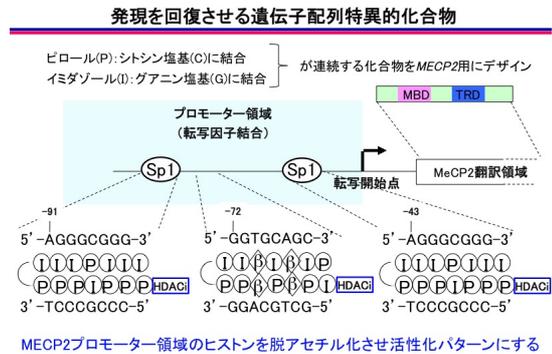
レット症候群の治療に用いられる抗てんかん薬の血中濃度を測定したところ、従来の ELISA 法とほぼ同様の数値を示した。なお、質量分析法では、ELISA 法に比べ、安価、迅速に測定が行えた。



てんかん患者6名における抗てんかん薬  
バルプロ酸ナトリウムの血中濃度測定結果

## (3) 遺伝子特異的エピゲノム治療法の礎的知見の獲得

ヒト *MECP2* 遺伝子上流プロモーター領域に、エピゲノム修飾を変化させることで発現上昇が期待される PI ポリアミドをデザインした。



## 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 20 件)

- ① Kubota T: Epigenetics in congenital diseases and pervasive developmental disorders. *Environ Health Prev Med* 13:3-7, 2008 (査読あり).
- ② Ehrlich M, Sanchez C, Shao C, Nishiyama R, Kehrl J, Kuick R, Kubota T, Hanash SM. ICF, an immunodeficiency syndrome: DNA methyltransferase 3B involvement, chromosome anomalies, and gene dysregulation. *Autoimmunity* 41:253-271, 2008 (査読あり).
- ③ Gono T, Yazaki M, Agematu K, Matuda M, Yasui K, Yamaura M, Hidaka F, Mizukami T, Nunoi H, Kubota T, Ikeda S. Adult onset X-linked chronic granulomatous disease in a female patient caused by a de novo mutation in paternal-origin CYBB gene and skewed inactivation of normal maternal X chromosome. *Intern Med* 43:1053-1056, 2008 (査読あり).
- ④ Chen LC, Nishidate K, Saito Y, Mori K, Asakawa D, Takeda S, Kubota T, Terada N, Hori H, Hiraoka K. Application of probe electrospray to the real-world samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:2366-2374, 2008 (査読あり).
- ⑤ Chen LC, Nishidate K, Saito Y, Mori K, Asakawa D, Takeda S, Kubota T, Terada N, Hori H, Hiraoka K. Characteristics of probe electrospray generated from solid needle. *J Phy Chem* 112: 11164-11170, 2008 (査読あり).
- ⑥ 久保田健夫: 特集 エピジェネティクス - 最近の動向と疾患-「神経疾患におけるエピジェネティックな異常」最新医学 63: 826-832, 2008 (査読なし).
- ⑦ 久保田健夫: 今月の主題” エピジェネティクスと臨床検査” 研究の世界「精神発達障害とエピジェネティクス」臨床検査 52: 669-673, 2008 (査読なし).
- ⑧ 久保田健夫: 特集” 広がるエピジェネティクス疾患” 研究の世界「精神発達障害疾患におけるエピジェネティックな異常-概念は遺伝から環境へ」医学のあゆみ 225: 570-574, 2008 (査読なし).
- ⑨ Hiraoka K, Chen LC, Asakawa D, Takeda S, Kubota T. Direct and real-time surface analysis and imaging of biological samples by probe electrospray. *J Surf Anal* 15: 279-282, 2009 (査読あり).
- ⑩ Kurosawa H, Okuya M, Matsushita T, Kubota T, Endoh K, Kuwashima S, Hagiwara S, Sato Y, Fukushima K, Sugita K, Okada Y, Park MJ, Hayashi Y, Arisaka O. JAK2V617F mutation-positive childhood essential thrombocythemia

associated with cerebral venous sinus thrombosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 31:678-680, 2009 (査読あり).

- ⑪ 久保田健夫、伏木信次: シンポジウム VII: 小児神経疾患とエピジェネティクス「エピジェネティクスのオーバービュー」脳と発達 41: 203-207, 2009 (査読なし).
- ⑫ 久保田健夫: 小児神経とエピジェネティクス - “後天性小児遺伝性疾患” 概念の創設. 児会誌 113: 1071-1078, 2009 (査読なし).
- ⑬ Kubota T, Miyake K, Hirasawa T, Nagai K, Koide T. Novel etiological and therapeutic strategies for neurodiseases: Epigenetic understanding of gene-environment interactions. *J Pharmacol Sci* 113:3-8, 2010 (査読あり).
- ⑭ Okuya M, Kurosawa H, Kubota T, Endoh K, Ogiwara A, Nonoyama S, Hagiwara S, Sato Y, Matsushita T, Fukushima K, Sugita K, Sato T, Arisaka O. Hematopoietic stem cell transplantation for X-linked thrombocytopenia from mild symptomatic carrier. *Bone Marrow Transplant* 45:607-609, 2010 (査読あり).
- ⑮ Akahane K, Inukai T, Zhang X, Hirose K, Kuroda I, Goi K, Honna H, Kagami K, Nakazawa S, Endoh K, Kubota T, Yagita H, Koyama-Okazaki T, Sugita K. Resistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis. *Exp Hematol* 38(10):885-895, 2010 (査読あり).
- ⑯ 久保田健夫: 特集 小児の発達の診かた一障害の早期発見と対応「自閉症障害・アスペルガー障害と遺伝子の異常」小児内科 42: 421-425, 2010 (査読なし).
- ⑰ 久保田健夫: 特集 臨床遺伝学の進歩と日常診療 ひとくちメモ「エピジェネティクス」日本医師会雑誌 139: 572, 2010 (査読なし).
- ⑱ 久保田健夫: 胎生期環境と生活習慣病「胎生期環境と発達障害 -生物学的メカニズムとしてのエピジェネティクス」. 医学のあゆみ 235:838-843, 2010 (査読なし).
- ⑲ 久保田健夫: 特集” エピゲノム研究最前線” 「エピゲノムに基づく” 後天性小児遺伝性疾患 “概念の創設」医学のあゆみ 235: 1069-1074, 2010 (査読なし).
- ⑳ 久保田健夫: 総説「エピジェネティクス臨床検査の展望」. 臨床化学 40: 54-60, 2011

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Chen LC, Nishidate K, Saito Y, Mori K, Asakawa D, Takeda S, Kubota T, Terada N, Hori H, Hiraoka K. Characteristics of probe electrospray from solid needle. 第 56 回質

量分析学会(筑波)、2008. 5. 15.

(2)Chen LC, Nishidate K, Saito Y, Mori K, Asakawa D, Takeda S, Kubota T, Terada N, Hori H, Hiraoka. K. Application of probe electrospray to biological samples. 第56回質量分析学会(筑波)、2008. 5. 15.

(3)久保田健夫、伊藤雅之、後藤雄一、稲澤譲治. Rett 症候群の責任蛋白質 MeCP2 の標的遺伝子探索 -自閉症マーカー遺伝子の同定に向けて-. 第50回日本小児神経学会総会(東京)、2008. 5. 28-31.

(4)浅川大樹、橋本 豊、陳 力勤、竹田扇、久保田健夫、平岡賢三. エレクトロスプレー帯電液滴衝撃質量分析法による薬物の定量分析. 日本質量分析学会 BMS 討論会 (福島) , 2008. 7. 8.

(5)久保田健夫、五月女雅樹、平 敬宏、伊藤雅之、遠藤和志、楊 春妹、大堀健太、横井左奈、井本逸勢、後藤雄一、稲澤譲治. レット症候群の自閉症状の要因としてのシナプス関連分子のエピジェネティックな制御異常. 第31回日本神経科学大会 (東京)、2008. 7. 9-11.

(6)Kubota T, Endoh K, Ohori K, Koyama K. DNA methylation plasticity in the muscle tissue under disuse stress. The American society of Human Genetics 58th Annual Meeting (Philadelphia), 2008. 11. 13.

(7)Sakazume S, Sohma R, Harada N, Endo K, Ohashi H, Nagai T, Kubota T. Effect of X-chromosome inactivation in an autosome: Implication for clinical features in an unbalanced translocation t(X;15) case. The American society of Human Genetics 59th Annual Meeting (Hawaii), 2009. 10. 23.

(8)Kubota T, Ishida S, Miyake K, Nakane T, Saitoh S, Hirasawa T. Development of ICON probe based rapid diagnostic assay for imprinted diseases. The American society of Human Genetics 60th Annual Meeting (Washington DC), 2010. 11. 13.

(9)Miyake K, Hirasawa T, Soutome M, Itoh M, Goto Y, Endoh K, Kudo S, Yokoi S, Taira T, Inazawa J, Kubota T. Identificaiton of MeCP2-target synaptic molecules associated with pathogenesis of Rett syndrome. 第33回日本分子生物学会年會・第83回日本生化学会大会(合同大会) . 2010. 12. 8.

[図書] (計3件)

(1)久保田健夫、遠藤和志 :12. エピジェネティクスとDOHaD. DOHaD (ドーハッド) その基礎と臨床(板橋家頭夫、松田義雄編)、金原出版、東京、pp83-pp89、2008

(2)久保田健夫: 遺伝子診断入門. 小児神経学(有馬正高・加我牧子・稲垣真澄編). 診断と治療社、東京、pp515-pp517、2008.

(3)三宅邦夫、久保田健夫: エピジェネティクス. 増刊号: 遺伝子診療学-遺伝子診断の進歩とゲノム治療の展望、日本臨床、東京、pp87-92、2010

[その他]

ホームページ:<http://www.epigenetmed.com/>  
(研究代表者の所属機関の環境遺伝医学講座ホームページ)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

久保田 健夫 (KUBOTA TAKEO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号: 70293511

### (2)研究分担者

平岡 賢三 (HIRAOKA KENZO)

山梨大学・クリーンエネルギー研究センター・教授

研究者番号: 80107218

手塚 英夫 (TEZUKA HIDEO)

山梨大学・総合分析実験センター・准教授  
研究者番号: 70155456

### (3)連携研究者

岡本 伸彦 (OKAMOTO NOBUHIKO)

地方独立法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター・企画調査部参事  
研究者番号: 30416242