

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390270

研究課題名(和文) エピゲノム機構の異常が関与する遺伝性発達障害の発症病態の解明

研究課題名(英文) A study for molecular pathomechanism of neurodevelopment disorders causing epigenetic dysfunction

研究代表者

伊藤 雅之 (Masayuki, Itoh)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第二部・室長

研究者番号：50243407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性発達障害には、エピゲノム機構の異常が関与する疾患が少なくない。精神活動は脳内において、このエピゲノム機構が重要な役割を演じている。MECP2の遺伝子異常は、Rett症候群(RTT)とAngelman症候群の二つの異なる疾患をもたらす。また、MECP2と15番染色体のインプリンティング領域には高い関連性が報告され、RTTとPrader-Willi症候群にも共通の病態があることが窺える。

本研究では、RTTの原因遺伝子であるMeCP2の遺伝子変異による脳発達障害の発症の分子機序の解明と軽症化分子の同定とMecp2発現コントロールマウスを作成し、多角的に解析し回復治療の臨界期を解明した。

研究成果の概要(英文)：Neurodevelopmental disorders contain many systemic-epigenome disrupted diseases, like Rett syndrome (RTT). As well-known, epigenome-system in brain plays an important role in control of mental state. On the other hand, the abnormality of MECP2 gene, that is major causative gene of RTT and its product mainly works transcription repressor, presents two different phenotypes of RTT and Angelman syndrome. Moreover, it has been reported strongly functional relationship of MECP2 gene and chromosome 15q11-q13 (AS-PWS imprinting region).

In the present study, we performed MeCP2 functional analyses and recovery study, using original mecp2-expression control mice and multiple approaches. As the results, we revealed that molecular pathophysiology of abnormal MeCP2 gene and discovered some candidate factors to be mild phenotypes of RTT and critical period for any treatment. From the study, we could learn the important factors of epigenome system in developmental disorders.

研究分野：発達病態学

キーワード：エピゲノム 発達障害 レット症候群 MeCP2 IGFBP3

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム機構は、特定の遺伝子発現を組織特異的かつ時間特異的に制御する高度にプログラムされたシステムで、これにより高次な生命活動が保証されている (Metabolism 2008, Nat Rev Genet 2008)。特に精神活動は脳内において、このエピゲノム機構が重要な役割を演じている (Biochem J 2008)。一方、この機構の障害により発達障害が引き起こされる (Br Med Bull 2008)。発達障害とは、胎生期からの発達過程で生じる様々な精神活動の障害を包括し、知的活動や社会性の異常を臨床的特徴とする。我々は、比較的頻度が高い Rett 症候群 (RTT) を中心にエピゲノム機構の異常による遺伝性発達障害の発症病態の分子メカニズムの解明とそれに基づいた治療法の開発を行なう。

エピゲノム制御機構の中心は、インプリンティング遺伝子の発現制御と DNA メチル化による転写抑制である。これらの制御機構は個体発生において非常に重要な役割を演じている (Reproduction 2008, Nat Rev Genet 2008)。DNA メチル化による転写抑制機構を司る *MECP2* の遺伝子変異は、RTT と Angelman 症候群 (AS) の二つの異なる疾患をもたらす。また、*MECP2* と 15 番染色体のインプリンティング領域には高い関連性が報告され (Hum Mol Genet 2005, Hum Mol Genet 2005, Semin Pediatr Neurol 2007:)、RTT と AS、Prader-Willi 症候群 (PWS) に共通の病態があることが窺える。従来より、RTT の症状の多様性は、*MECP2* の X 染色体不活化の違いによると考えられてきた。しかし、MeCP2 のメチル化 DNA 結合領域 (MBD) 内のアミノ酸置換変異が heterochromatin の構造を変え、症状の軽重をもたらすことを見つけ、症状の多様性に X 染色体不活化以外の関与を明らかにしてきた。

RTT の発生率は女児の 0.01%、AS と PWS の発生率はともに小児の 0.01~0.02% であり、決して少なくない。しかし、いまだ有効な治療法がなく、経験による療育が行われている。1999 年に X 染色体上にある *MECP2* が RTT の原因遺伝子として報告され、エピゲノム機構の異常が発達障害を呈する初めての例として注目された。我々はこれまで、RTT の機能形態学的、分子生物学的に病態解明を行ってきた (J Neuropathol Exp Neurol 2007, Neurosci Lett 2005, J Neuropathol Exp Neurol 2005)。最近、我々は同じ変異を持つ *Mecp2* 欠損重症化マウスと *Mecp2* 欠損軽症化マウスを得ることに成功した (J Cell Mol Med 2008)。これは、エピゲノム機構が症状の軽重に関わる世界初のモデル動物として国内外の注目を集めている。

2. 研究の目的

遺伝性発達障害の中には、Rett 症候群 (RTT)、Angelman 症候群 (AS)、Prader-Willi 症候群 (PWS) などのようにエピゲノム機構の異常

が関与する疾患が少なくない。しかし、その複雑な分子機構と多彩な症状のため、これら疾患の病態解明が十分ではない。本研究では、① RTT の原因遺伝子である MeCP2 の遺伝子変異による脳発達障害の発症の分子機序の解明と軽症化分子の同定、② *mecp2*-欠損マウスと MeCP2 下流遺伝子 IGFBP3、③ これらの成果に基づいた治療法の開発を行なう。

これら in vivo 研究と in vitro 研究の結果から RTT の軽症化の分子機序を解明する。さらに、*Mecp2* 欠損マウスの発症時期の特定と治療の臨界期を求めめるため、既存の *Mecp2* 欠損マウスに加えて ROSA26 発現制御システム (Nat Genet 1999, Biochem Biophys Res Commun 2005) を用いた新規 *Mecp2* 遺伝子改変マウスを作製する。さらに、我々が発見した *MeCP2* 下流遺伝子 *IGFBP3* の遺伝子改変マウスを作製し、MeCP2 の分子機構を中心に多方面からエピゲノム機構の障害による発達障害の発症病態を解明し、治療法開発の基盤を作る。

3. 研究の方法

本研究では、エピゲノム機構が関与する遺伝性発達障害として、Rett 症候群 (RTT) を中心に、その責任遺伝子および責任領域の分子機構を解明し、治療法への応用をはかる。

我々が開発した軽症化 *MeCP2* 欠損マウスを活用し、軽症化因子を探求する。さらに、RTT の軽症患者に MBD の特定のミスセンス変異が多くみられることから、細胞における機能障害と症状の関係を評価し、治療法開発の可能性を探る。また、ROSA26 法による発現コントロール可能なマウスを作製し、発症・治療の臨界期を求めめる。

また、我々が発見した MeCP2 の下流遺伝子である *IGFBP3* の遺伝子改変マウスの解析を行い、その症状再現性から MeCP2 と発達障害の分子機構を解明する。

① MeCP2 の分子機構に基づく RTT の病態の解明と治療法の開発。

(a) 軽症化因子の探求と実用化：軽症化マウスと変異 MBD の分子生物学的解明と治療への応用。5 種類の MBD 内のミスセンス変異発現ベクターを作成し、L929 培養細胞へ導入し、100% 導入細胞から mRNA を抽出し、網羅的 RNA 発現解析 (GeneChip) を行った。これらのデータ比較と軽症化 RTT モデルマウスの同様の網羅的発現解析の検討から軽症化因子を探求する。

(b) HDAC 阻害剤 (Valproic acid など) などの *Mecp2* 欠損マウス個体への治療への応用。エピゲノム機構を応用した HDAC 阻害剤を *Mecp2* 欠損マウス腹腔内投与により、行動量、特有の症状、生存率からその効果を評価した。

② RTT 発症ならびに回復治療の臨界期に関する研究。

ROSA26 法による *Mecp2* 発現コントロールマウスを作製し、その表現型と発症・治療の臨界期の解析した。ROSA26 領域に Tet-on システムによる *mecp2* 発現コンストラクトを有するマウスを作成し、*mecp2*-ヘテロ接合体メスマウスと交配し、*mecp2*-欠損/ROSA26-tet-on *mecp2*-マウス雄を作成した。その後、この個体を用いて、生後 2 週齢から 8 週齢まで各週齢ごとに Dox を腹腔内投与した。生後 8 週齢で、行動解析と発現解析のための検体採取を行った。

③ IGFBP3 の RTT 発症病態への関与に関する研究。

Igfbp3-欠損マウス、及び *Igfbp3*-TG (トランスジェニック) マウスを作成し、形態学的解析と発現解析、行動解析を行った。これらのマウスは、従来の方法で作成した。上記と同様の解析に加えて、*Mecp2* 欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスを作成し、*igfbp3* の *Mecp2* との関連性を *in vivo* の状況で調べ、検討した。

4. 研究成果

① RTT の病態の解明と治療法の開発。

(a) 軽症化因子の探求と実用化では、軽症化因子を同定することができた。軽症化マウスと変異 MBD の分子生物学的解析の結果、MBD 内のミスセンス変異がクロマチン構造変化と症状の重症度との相関を明らかにすることができた。この結果と網羅的発現解析の結果から、軽症化に関わる分子を特定することができた (論文執筆中)。

(b) HDAC 阻害剤 (Valproic acid など) の細胞、*Mecp2* 欠損マウス個体への治療への応用について、通常量では行動量、特有の症状、生存率にその有効性を明らかにすることができなかった。個体における脳細胞への移行とこれら HDAC 阻害剤による MeCP2 機能への影響の程度に問題があることと考えられた。現在、HDAC 阻害剤の過剰投与による影響と脳内 DOPA 作動薬などによる効果評価を行い、治療候補薬 (化合物) の探求を行っている。

② *MeCP2* 遺伝子の発現と RTT 発症ならびに回復治療の臨界期に関する研究。

ROSA26 法による *Mecp2* 発現コントロールマウスを作成した。*Mecp2* 欠損マウスの個体発生が困難を極め、5 匹の *Mecp2* 発現コントロールマウスの確保ができた。Dox 投与は、通常量を生後 4 週齢より行うことができた。これらのマウスの行動解析では、行動量の増加と生存率の向上が期待できたが、数的問題により統計学的解析までは至らなかった。脳組織の発現解析では、*mecp2* の回復がみられた。これにより、発症後の治療にも効果が期待できるものと考えられた。今後、さらに個体数の確保を図りながら、解析を進め、より厳密な治療の臨界期を明らかにする必要がある。

③ IGFBP3 の RTT 発症病態への関与に関する研究。

Igfbp3-欠損マウス、及び *Igfbp3*-TG マウスを作成した。*Igfbp3*-欠損マウスでは、明らかな形態学的異常はなく、有意な行動量の増加と IGF-1 の低下を認めた。*Mecp2* 欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスでは、これらの変化はさらに有意に変化していた。これらの結果から、IGFBP3 は行動異常、とりわけ多動や自閉性障害に関与していることが明らかになった (論文投稿中)。

Igfbp3-TG マウスでは、IGF-1 の発現低下がみられたが、明らかな形態学的異常や行動解析上の異常がなかった。また、*Mecp2* 欠損マウスとの二重遺伝子改変マウスにおける解析でも有意な変化は明らかでなかった。これらのことから、IGFBP3 の過剰は IGF-1 の低下をもたらすが、RTT の表現形には関与していないものと考えられた。

本研究では、当初予定していた遺伝子工学的研究は、その遂行上困難を極めたため、MeCP2 の分子動態と RTT の発症病態機序の解明、自閉性障害の新たな分子の関与について研究を行うことができた。この成果は、今後の遺伝性発達障害の根本的な治療法開発への基盤になるものと期待される。

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) Dai H, Nabatame S, Goto Y, Itoh M. Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 Deficiency Leads to Autistic Behavior Through Monoaminergic Synaptic Dysfunction. *Am J Pathol* (submitted). (査読有り)
- (2) Iwasa S, Wada T, Ishiyama M, Takei H, Kondo M, Iwata K, Asano M, Itoh M, Shirakawa T. Altered expression of catecholaminergic neurons and reduced monoaminergic innervation in the caudal medulla of *Mecp2*-null mice. *Biochem Biophys Res Commu* (submitted). (査読有り)
- (3) Tsujimura K, Irie K, Nakashima H, Egashira Y, Fukao Y, Fujiwara M, Itoh M, Uesaka M, Imamura T, Nakahata Y, Yamashita Y, Abe T, Takamori S, Nakashima K. miR-199a Links MeCP2 with mTOR Signaling and Its Dysregulation Leads to Rett Syndrome Phenotypes. *Cell Reports* 2015;12:1887-1901. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.028. (査読有り)
- (4) 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. doi: 10.1111/jnc.12505. (査読有り)
- (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;8(6):e66729. doi: 10.1371/journal.pone.0066729. (査読有り)
- (6) Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859-13867. doi: 10.1074/jbc.M111.309864. (査読有り)
- (7) 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. (査読無し)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) Itoh M, Nabatame S, Tachimori T, Matsuishi T. Study of Rett syndrome epidemiology and database in Japan. The 4th European Rett syndrome Conference, Rome, Italy, 30 Oct.-1, Nov., 2015.
- (2) Itoh M, Nabatame S, Matsuishi T. Epidemiological study of Japanese Rett syndrome. Pathways of Neurodevelopmental Disorders. Keystone Symposia Conference. Granlibakken Resort, Tahoe City, California, USA. 16-20, March, 2015.
- (3) 伊藤雅之. レット症候群研究班のこれまでの活動と今後の展望. レット症候群シンポジウム 2014. 学術総合センター. 東京. 平成 26 年 4 月 19 日
- (4) 伊藤雅之. レット症候群- 基礎的生物学から研究の最前線まで -. レット症候群研修会 2014. こどもの城. 東京. 平成 26 年 11 月 30 日
- (5) 辻村 啓太, 入江 浩一郎, 中嶋 秀行, 江頭 良明, 深尾 陽一郎, 藤原 正幸, 伊藤雅之, 高森 茂雄, 中島 欽一. レット症候群原因因子 MeCP2 による興奮性シナプス伝達制御の分子基盤. シンポジウム S3-F-1 (神経発達障害と正常脳形成: 神経分化と移動による脳機能の運命決定). 第 37 回日本神経科学大会. 2014 年 9 月 13 日. 横浜
- (6) 伊藤雅之. 自閉症の神経科学研究: レット症候群の治療に向けた生物学的研究. 第 55 回日本小児神経学会学術集会. 大分. 平成 25 年 5 月 31 日, 2013.
- (7) 伊藤雅之. レット症候群のすべて. 第

15 回小児神経わかつて会. 東京. 8 月 31 日. 2013.

- (8) 伊藤雅之. 脳の発達と小児神経疾患. 島田療育センター八王子 2012 講演会 八王子. 9 月 7 日, 2012.
- (9) Itoh M, Kurimasa A. MeCP2_e2 is required for placenta development. The FEBS-EMBO 2014 Conference. Paris, France, 30 August - 4 September, 2014.
- (10) Itoh M, Tahimic CGT, Goto Y, Kurimasa A. MeCP2_e2 Is Dispensable for Rett Syndrome Phenotypes but Essential for Placenta Development. The 7th World Rett Syndrome Congress. New Orleans, LA, USA, 22-26, June, 2012.

[図書] (計 2 件)

- 青天目信, 伊藤雅之. レット症候群 診療ガイドブック. 大阪大学出版会. 大阪. 2015.
- 伊藤雅之. 病理解剖検査. 小児神経科診断・治療マニュアル (改訂第 3 版). 診断と治療社. 東京. 236-240pp, 2015.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)
なし。

○取得状況 (計 0 件)
なし。

[その他]

ホームページ等
<http://www.ncnp.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅之 (ITO Masayuki)
国立研究開発法人 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
研究者番号: 5 0 2 4 3 4 0 7

(2) 研究分担者

松田 潤一郎 (MATSUDA Junichirou)
国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所・難病・疾患資源研究部・研究リーダー
研究者番号: 6 0 1 8 1 7 3 1

高橋 悟 (TAKAHASHI Satoshi)
国立大学法人 旭川医科大学・医学部小児科学・講師
研究者番号: 1 0 4 3 1 4 0 4

(3) 連携研究者

なし。