

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860832

研究課題名(和文) レット症候群モデル動物及びES/iPS細胞による自律神経システム異常の研究

研究課題名(英文) The study of impaired autonomic nerve system in Rett syndrome model mice and ES/iPS cells derived from them

研究代表者

原 宗嗣 (HARA, MUNETSUGU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群(RTT)はMeCP2遺伝子変異が主因の女兒で発症する発達障害である。しかし、QT延長などの不整脈が約3割で認められ、本研究ではMecp2欠損ES細胞やマウスにおいてMeCP2が心筋分化や心臓機能に及ぼす影響を解析した。その結果、Mecp2欠損ES細胞における心筋幹細胞の発生や分化の異常やMecp2欠損マウスで心機能と関連不明の心電図異常、介在板構造の異常を見出し、潜在的な不整脈を明らかにした。更に、DNAメチル化解析やクロマチン免疫沈降法により、MeCP2は心筋分化に必須のTbx5遺伝子の発現調節に関わる可能性を示し、心臓における新たなMeCP2機能を発見した。

研究成果の概要(英文)：Rett Syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder predominantly affecting females. Most cases of RTT are caused by de novo mutations in methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) gene on X chromosome. Several studies found the prolonged QT interval and lethal cardiac arrhythmias in RTT patients and Mecp2-deficient animal disease models. In this study, we investigated the contribution of MeCP2 to cardiac development, structure, and function using an in vitro ES cell model system and an in vivo mouse model for RTT. Our results demonstrate that MeCP2 deficiency impairs the development and further cardiac differentiation of cardiac progenitor cells. We also show that MeCP2 is involved in maintaining normal cardiac gene expression and cardiomyocyte structure in the adult mouse heart. Moreover, we found that MeCP2 may regulate the gene expression of Tbx5, a transcriptional factor essential to cardiac development and function.

研究分野：小児科学

キーワード：Rett症候群

1. 研究開始当初の背景

1966年に Andreas Rett によって報告されたレット症候群(RTT)は、主に女児で発症する発達障害で、X染色体上の Methyl-CpG 結合蛋白(MECP2)遺伝子変異が同定されている (Amir RE, et al., 1999)。MeCP2 はメチル化遺伝子領域の転写調節に関与しており、様々な遺伝子発現の調節を介して多様な病態に関わると考えられている。実際に、RTT は乳児期以降の運動能力や言語能力の停滞や減退、小頭、低身長などの成長障害、知的障害、自閉性行動を特徴とし、摂食障害、常同行動、てんかん、異常呼吸パターン、睡眠障害、便秘などの自律神経障害も伴う。また、重要な問題として約3割のRTTで突然死に関わるQT延長などの不整脈が確認されている。しかしながら、未だRTT病態に対する運動機能の維持や治療・介入が困難であり、病態解明とそれに基づく新規治療法の確立が切望されている。

本研究では、RTTの心臓病態の発症メカニズムを解析することで、臨床現場で役立つRTTの新たな治療・介入法の開発を目指すことを目的としている。

2. 研究の目的

RTTは、MeCP2 遺伝子変異を主因とする女児に発症する進行性神経疾患である。しかし、一定の割合で、不整脈を呈することが報告されており、突然の原因不明死との関係など、その発症機構の解明や治療法の確立が切望されている。これまでRTT病態は中枢神経障害に関する研究が主で、実際、RTTモデル(Mecp2欠損)マウスでも、神経系の異常を主な原因としたQT延長や不整脈が認められることが報告されている。本研究では、RTTモデルマウス、ES細胞研究を足がかりに、RTTの心臓病態に着目した発病メカニズムの解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) MeCP2 欠損が心筋分化及ぼす影響の解析：本施設では、MeCP2 欠損マウスを作成したMecp2欠損ES細胞、およびマウス由来のRTTモデルiPS細胞を樹立し、培養維持している。そこで、まずはMeCP2欠損(Mecp2^{-/-})及びコントロール wild-type (WT) ES細胞を用いて、胚様体形成法により心筋分化誘導を行い、MeCP2欠損がES細胞の心筋分化に及ぼす影響を調べた。心筋分化は、心筋分化マーカーの発現を定量PCR (qRT-PCR)、フローサイトメトリー、DNAマイクロアレイ解析によって評価した。

(2) MeCP2 欠損マウスの心機能評価：本施設では、Bird-AらにRTTモデル動物として樹立されたことによってMeCP2欠損マウスを維持している (Guy-J, et al., Nat Genetics '01)。MeCP2欠損マウスは、生後4週間目までは、小さいもののほぼ正常に生育するが、6週間頃より行動が減少するなど症状が認められ、8-10週間までに多くが死亡する。そこで、心エコー、心電図の測定により、8週目のMeCP2欠損及びコントロールWTマウスの心機能評価を行った

(3) MeCP2 欠損マウスの心臓における遺伝子発現：6および8週目のMeCP2欠損及びコントロールWTマウスの心臓全体、または心室部位を摘出し、心臓特異的遺伝子の発現をqRT-PCRによって解析した。

(4) MeCP2 欠損マウス心臓の解剖学的解析：6および8週目のMeCP2欠損及びコントロールWTマウスの心臓の重量を測定し、それぞれの8週目心臓の心室領域を免疫染色、および電子顕微鏡により解析した。

(5) 心臓、心筋分化におけるMeCP2のターゲット分子の探索： 、 の解析で予想

される MeCP2 の標的遺伝子をピックアップし、DNA メチル化ならびに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析による MeCP2 の相互作用の有無を解析した。

4. 研究成果

(1) Mecp2 欠損、およびコントロール WT -ES 細胞を胚様体形成法にて分化誘導後、継時的な心筋分化マーカーの発現を RT-PCR で調べた結果、Nkx2.5 などの心筋特異的転写因子や MHC などの構造遺伝子は心筋分化とともに発現が上昇し、コントロール WT-ES 細胞と同様に、MeCP2 欠損した ES 細胞は心筋に分化することが明らかとなった。

さらに詳細に、解析するために、FLK1-PDGFR⁺-CXCR4 陽性の心筋幹細胞をソーティングにより回収し、その発生と心筋分化能を解析した。その結果、心筋分化誘導後、4 日目において、コントロール WT に比較して MeCP2 欠損 ES 細胞で心筋幹細胞の出現率は有意に高くなる一方、MeCP2 欠損心筋幹細胞は、その後の分化効率が低下することが明らかとなった。以上の結果から、MeCP2 欠損は、ES 細胞の心筋分化において、心筋幹細胞の発生やその後の分化に影響することが明らかとなった。

(2) 8 週目の Mecp2 欠損、および WT マウスの心エコーを行った結果、LVd、LVs はコントロール WT マウスに比較して、有意位に低値を示した。一方、%FS は、コントロール WT に比較して若干であるが、有意に高値を示した。以上の結果から、MeCP2 欠損マウスは、コントロール WT に比較して心臓が小さいため LVd、LVs は低くなるものの、心肥大などは認められず、心機能的にも病的な異常は認められなかった。

また、6 および 8 週目マウスの心電図を解析した結果、MeCP2 欠損マウスでは、コントロール WT に比較して心拍が早い傾向が認め

られた。また PQ、QRS 間隔が有意に短くなるものの、病的な心電図の異常は認められなかった。

(3) 6 および 8 週目の Mecp2 欠損、コントロール WT マウス心臓における心臓特異的な遺伝子の発現を比較した結果、心筋特異的転写因子 (Tbx5、Nkx2.5、Mef2c)、心筋構造遺伝子 (Myh7、My17)、Nppa は Mecp2 欠損マウスで発現が高くなる傾向が認められた。一方、QT 延長に関わるイオンチャネル分子 (Kcnq1、Kcnh2、Scn5a、Cacna1g、Hcn1,2,4) は低くなる傾向が認められた。以上の結果から、MeCP2 は、不整脈など心機能に関わる心筋特異的遺伝子の発現調節に関わる可能性が示された。

(4) Mecp2 欠損マウスの心臓は、その体重と相関して小さい以外にマクロでは異常は認められなかった。しかし、電子顕微鏡レベルで心室を解析したところ、細胞間接着や情報伝達に関わる介在板が、複雑に入組んだ構造を示すコントロール WT に比較して、Mecp2 欠損マウス心臓では、単調な構造を示し、未熟である可能性が考えられた。更に、介在板を構成する Cx43 に対する免疫染色を行った結果、Mecp2 欠損マウス心臓では、Cx43 染色の介在板へ集積が低く介在板の形成が未熟な状態であることが明らかとなった。

(5) MeCP2 欠損 ES 細胞の心筋分化や心臓における遺伝子発現解析から、Tbx5、HCN1-4、Cacna1g 遺伝子が心臓における MeCP2 の標的遺伝子候補として考えられた。候補遺伝子の CpG メチル化領域のメチル化状態を解析した結果、Tbx5 の CpG 領域が高度にメチル化されていることが明らかとなった。また、MeCP2 によるメチル化領域に対する ChIP 解析を行った結果、Tbx5 の CpG メチル化領域と相互作用する可能性が明らかとなり、Tbx5 は心臓に

おける MeCP2 のターゲット分子の一つであることが明らかとなった。

以上をまとめると、MeCP2 は、ES 細胞由来の心筋幹細胞の発生やその後の分化に関わることを明らかにした。また、MeCP2 欠損マウスでは、明らかな不整脈は認められなかったものの、心電図パラメーターが変化し、不整脈の素因となる心機能や構造に関わる遺伝子の発現や心筋細胞の超微細構造に異常が認められることを見出した。これらの成果は、RTT で認められる臨床症状が必ずしも神経系の異常のみが原因で引き起こされるわけではないことを示唆する重要な知見で、今後の RTT 病態の理解に役立つものと考えられる。

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)

(以下全て査読あり)

1. Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Minami T, Yasukawa H, S Okayama, Nakamura K, Okabe Y, Tanaka E, Takemura G, Kosai K, Yamashita Y, Matsuishi T.: Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes Mecp2-null mice to arrhythmias. **Sci Rep**15;5:11204(2015)
2. Hara M, Ohba C, Yamashita Y, Saitsu H, Matsumoto N, Matsuishi T.: De novo SHANK3 mutation causes Rett syndrome-like phenotype in a female patient. **Am J Med Genet A**167(7):1593-6(2015)
3. Ohya T, Yamashita Y, Shibuya I, Hara M, Nagamitsu S, Kaida H, Kurata S, Ishibashi M, Matsuishi T.: A serial ¹⁸FDG-PET study of a patient with SSPE who had good prognosis by combination therapy with interferon alpha and ribavirin. **Eur J Paediatr Neurol**18(4):536-9(2014)
4. Ohba C, Kato M, Takahashi N, Osaka H, Shiihara T, Tohyama J, Nabatame S, Azuma J, Fujii Y, Hara M, Tsurusawa R, Inoue T, Ogata R, Watanabe Y, Togashi N, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Saitsu H, Matsumoto N: De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. **Epilepsia** Sep;56(9):e121-e128(2015)
5. Takanashi J, Shiihara T, Hasegawa T, Takayanagi M, Hara M, Okumura A, Mizuguchi M.: Clinically mild encephalitis with a reversible splenic lesion (MERS) after mumps vaccination. **J Neurol Sci** 15;349(1-2):226-8(2015)
6. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu S, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T.: Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett syndrome. **Brain Dev**36(9):794-800(2014)
7. 原宗嗣;青天目信, 伊藤雅之 編著; 2-6 発育障害と小頭症、2-12 循環器の問題 心機能と血管調節障害、2-15 便秘・消化管運動異常、レット症候群診療ガイドブック: 大阪大学出版会. 大阪 2015

- 2-6 発育障害と小頭症 ; pp.95-pp.105
2-12 循環器の問題-心機能と血管調節障害 ;
pp.157-pp.164
2-15 便秘・消化管運動異常 ; pp.183-pp.188

〔学会発表〕(計 4件)

2015年

- 1) 高梨潤一、椎原隆、高柳勝、長谷川毅、寺井勝、水口雅、原宗嗣、奥村彰久：ムンブスワクチン後に発症する可逆性脳梁膨大部病変を有する軽症脳炎(MERS)の検討. 第118回日本小児科学会学術集会 2015.4.17(大阪)大阪国際会議場 / リーガロイヤルホテル大阪

- 2) 七種 朋子、弓削 康太郎、須田 正勇、下村 豪、平田 留美子、原宗嗣、大矢 崇志、永光 信一郎、山下 裕史朗、松石 豊次郎：Rett 症候群に併存するてんかんの特徴. 第118回日本小児科学会学術集会 2015.4.18(大阪)大阪国際会議場 / リーガロイヤルホテル大阪

- 3) Hara M, Takahashi T, Yamashita Y, Matsuishi T.: Change of gene expression is associated with arrhythmias and cardiac structure in mecp2-null mice. 2015 レット症候群シンポジウム 2015.4.26(大阪)千里ライフサイエンスセンター

- 4) Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Okabe Y, Tanaka E, Matsuishi T.: Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in Mecp2-null mouse. 13TH RETT SYNDROME SYMPOSIUM, June 24-26, 2015 (CHANTILLY, VA, U.S.A.) Westfields Marriott Washington Dulles

〔その他〕

- 1) 原宗嗣：第115回九州医師会医学会・第68回九州小児科学会優秀論文賞 2015.11.14-15(長崎)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原宗嗣 (HARA MUNETSUGU)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389203