

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2005～2008  
 課題番号：18390304  
 研究課題名（和文）メチル化結合タンパク MeCP2 の機能障害からみたレット症候群の発症病態の解明  
 研究課題名（英文）A molecular study of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) dysfunction led to Rett syndrome phenotype  
 研究代表者  
 伊藤 雅之（ITO MASAYUKI）  
 国立精神・神経センター神経研究所疾病研究第二部・室長  
 研究者番号：50243407

## 研究成果の概要：

レット症候群（RTT）は主に女兒にみられる自閉性発達障害で、病態としてモノアミン系神経細胞の障害などがある。RTT の原因遺伝子は、DNA メチル化による転写抑制機構の中核である MeCP2 であり、この遺伝子発現抑制機構の破綻が病態形成の第一段と考えられている。RTT の症状の多様性や遺伝様式の複雑な部分を説明するのに、X 染色体上にある MeCP2 のインプリンティングと X 染色体不活化の関与を明らかにした。

我々が開発した遺伝子改変マウスと人工染色体を組み込んだ A9 細胞を用いて、X 染色体のエピジェネティック制御機構の関与する疾患の病態解明と MeCP2 isoform の研究を行った。その結果、親アレルの違いによる胎仔発生率の違いを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
平成 19 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
平成 20 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,900,000	3,570,000	15,470,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：

キーワード：メチル化結合タンパク 2、レット症候群、エピジェネティック

## 1. 研究開始当初の背景

レット症候群は主に女兒にみられる自閉性発達障害であり、その発症率は約 0.007% で民族間の違いはなく、病理学的に乳幼児期から頭が小さいこと、シナプスが少ないこと、モノアミン系神経細胞の減少などが知られている。我々はヒト脳幹及び大脳基底核に周産期から生後数カ月にカテコールアミン及びサブスタンス P の発現異常を見だし、症

状が顕在化する以前から病気がおこっていることを報告している。また、マウスのカテコールアミン作動性神経細胞の発達の分布と MeCP2 発現から、出生前後の脳幹の神経細胞、特に中脳ドーパミン作動性神経細胞が初期の病態の責任部位であることを明らかにした。一方、レット症候群の原因遺伝子として、DNA メチル化による転写抑制機構の中核であるメチル化 CpG 結合タンパク 2 (MeCP2)

が報告されている。この遺伝子発現抑制機構の破綻が、病態形成の第一段と考えられている。しかし、MeCP2 と結合しているいくつかの遺伝子が報告されているが、その生物学的役割を解明するには至っていない。

近年の胚操作技術の進展でクローン生物が作製され、個体発生にエピジェネティック機構の関与がかなり大きいことが分かってきた。X 染色体上の遺伝子ではインプリンティングと不活化現象がある。例えば、レット症候群の双生児発症で同じ遺伝子変異を持ちながら症状の異なる症例は少なくない。これは、Skewed X inactivation の関与が想定されている。レット症候群の病態の多様性や遺伝様式の複雑な部分を説明するのに、エピジェネティック制御機構の関与が強く疑われている。

また、我々は独自に遺伝子改変マウスを作製し、X 染色体のエピジェネティック制御機構を想定する表現系を確認している。これは、レット症候群のみならず、新たな発生異常を呈する疾患の病態の解明につながるものと期待できる。さらに、国内はもとより、国外においても MeCP2 isoform の研究はほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

近年のゲノム研究と分子生物学的研究から、インプリンティング遺伝子やゲノムメチル化の異常が胎性致死や一部の精神遅滞疾患の原因であることが分かってきた。MeCP2 は、遺伝子のプロモーターに結合し転写を抑制する。臨床的には、この遺伝子変異は発達性精神遅滞の代表的疾患であるレット症候群の原因である。MeCP2 遺伝子は4つのエクソンからなり、2つの isoform をつくる。MeCP2A は旧来から知られるもので、その変異型は見つかっていない。これには胎性致死が推察されているが、その証明はまだない。一方、MeCP2B の変異型は多くの症例でみつきり、変異部位と表現型の関係や活性欠損などが報告されている。これらの事実から、2つの isoform は生理作用の異なることが推察できる。そこで、われわれは MeCP2A 欠損マウスを作製し、MeCP2A の生体内での機能解析を行い、表現型解析や発現解析などの様々な解析を通して、個体発生に大きく影響を及していることを明らかにする。さらに、その分子機構を解明する。

すでに我々は MeCP2A 欠損マウスを作製し、胎仔の欠損アレルの由来が父母の違いにより胎生後期の生存率が極端に異なっ

ていることを明らかにしている。しかし、出生後のマウスには明らかな症状はみられない。これは MeCP2A が胎仔期の特定の時期に、X 染色体上の遺伝子のインプリンティングの関与か imprinted chromosome X inactivation (胎盤などの胎仔外組織で、父由来の X 染色体が選択的に不活化を受ける現象) を介して、胎児発生に重要な役割を果たしていることが示唆される。本研究では、X 染色体のエピジェネティック制御と MeCP2 遺伝子の胎仔発生に関わる分子機構に関して、染色体工学技術を用いて作られた試材とマウスを用いてその分子病態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) MeCP2A 欠損マウスの解析

- ① 由来親アレルの違いによる個体発生の検討：発生率の違いを胎生 12 日、16 日、生後 0 日について検討する。
  - ② 臨床症状・行動解析の検討：MeCP2A 欠損マウスの行動解析、恐怖・ストレス試験を行う。
  - ③ 病理学的・生化学的検討：組織形態学的に大脳皮質構築、シナプス形成を調べる。MeCP2A 欠損マウスを環流固定後ただちに凍結切片を作製し、免疫組織化学的検索を行う。また、HPLC を用いて、モノアミンの濃度を測る。
  - ④ 胎盤機能の検討：MeCP2A は胎盤で高い発現を呈している。父親由来 MeCP2A 欠損 (p-def) マウスと母親由来 MeCP2A 欠損 (m-def) マウスの胎盤における MeCP2A、MeCP2B の発現を real-time PCR で調べる。
- ### (2) A9 細胞による X 染色体インプリンティング・不活化を受ける遺伝子の解析
- ① A9 細胞による MeCP2A, B 発現解析：父母由来の異なるヒト X 染色体(不活化を受けていない X 染色体)を有する A9 細胞において、MeCP2A, B の各 isoform の発現パターンを精査する。
  - ② インプリンティング遺伝子のエピジェネティック制御機構の検証：①の遺伝子発現制御領域に関して、5-Aza-2'-deoxycytidine のメチル化阻害剤の効果、methylation-specific PCR 法および bisulfite sequencing 法を用いて検索する。その領域のクロマチン修飾に関して、TSA、FK228 などのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤での発現パターンの変化を観察するとともに、クロマチン免疫沈降法 (Chip アッセイ) を用いて検討する。
  - ③ マウス個体における MeCP2 の発現のイン

プリンティング・不活化の確認：マウス JF と C57B1/6 を掛け合わせて、X 染色体上の遺伝子多型を用いて父母由来の違いによる発現量の差を調べる。

- ④ 組織による MeCP2 発現の解析：③のマウスから、種々の異なる発生時期の胎児と胎盤を分離し、MeCP2 のアイソフォームごとの発現パターンを、父母由来を分けて調べる。MeCP2 の正常胎児組織での発現パターンを検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) MeCP2A 欠損マウスの解析

MeCP2 exon2 を LoxP ではさみ、Nestin-Cre マウスと交配させることにより MeCP2A 欠損マウスを作出した。バッククロスにより F10 を得て、解析に用いた。

- ① 変異アレルの由来親による生存数の違い：父親由来 MeCP2A 欠損アレルを有する生存数では有意差が得られなかった ( $n=105$ ,  $p>0.05$ ) が、母親由来 MeCP2A 欠損アレルを有する生存数は有意に低下していた ( $n=192$ ,  $p<0.0001$ )。
- ② 胎生期の解析：胎生 13.5 日で発生個体数に有意差があった。この違いは、この時期のみで確認できた。
- ③ 胎生 13.5 日の解析：定量 PCR の結果、母親由来遺伝子 *pegs* で有意な発現低下が認められた。
- ④ 臨床・行動解析：出生後、症状を呈することなく、野生型と同様の臨床経過を示した。Open field 試験、迷路試験においても野生型と差はなかった。

##### (2) A9 細胞による X 染色体インプリンティング・不活化を受ける遺伝子の解析

- ① A9 細胞による MeCP2 の発現解析：由来親の違いによる MeCP2 発現には有意な差が得られなかった。
- ② MeCP2 欠損マウスの大脳組織から DNA を抽出し、5-methylcytidine 抗体による Chip アッセイを行った。その結果、複数個の遺伝子を確認し、さらに組織内発現の検索を行い、プロモーター領域の MeCP2 結合能を解析中である。今後、この中から病態に関与する遺伝子を拾い出す。

#### 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 8 件)

- ① Saitoh M, Itoh M, Takashima S, Mizuguchi

M, Iwamori M. Phosphatidyl ethanolamine with increased polyunsaturated fatty acids in compensation for plasmalogen defect in the Zellweger syndrome brain. *Neurosci Lett* 449, 164-167, 2009. 査読有

- ② Itoh M, Suzuki Y, Ohsawa, M, Ozuka N, Sugai K, Otsuki T, Goto Y. Aluminum accumulation in myelin sheath of progressive leukoencephalopathy. *J Child Neurol* 23, 938-943, 2008. 査読有

- ③ Saitoh M, Sakakihara Y, Mizuguchi M, Itoh M, Takashima S, Iwamori M, Kamoshita S, Igarashi T. Increase of ceramide monohexoside and dipalmitoyl glycerophospholipids in the brain of Zellweger syndrome. *Neurosci Lett* 417, 165-170, 2007. 査読有

- ④ Itoh M, Ide S, Takashima S, Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Kubota T, Mori H, Tanaka S, Horie H, Tanabe Y, Goto Y. Methyl CpG-binding protein 2 (a mutation of which causes Rett syndrome) directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse and human brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 117-123, 2007. 査読有

- ⑤ Nishijima I, Yamagata T, Spencer CM, Weeber EJ, Alekseyenko O, Sweatt JD, Momoi M, Ito M, Armstrong D, Nelson D, Paylor R, Bradley A. Secretin receptor deficient mice exhibit impaired synaptic plasticity and social behavior. *Hum Mol Genet* 15, 3241-3250, 2006. 査読有

- ⑥ 久保田健夫、伊藤雅之 疾患解明 Overview Rett 症候群 エピジェネティクスの理解を進展させた精神発達障害疾患 実験医学 25, 423-428, 2007. 査読無

- ⑦ Tomimatsu N, Tahimic CG, Otsuki A, Burma S, Fukuhara A, Sato K, Shiota G, Oshimura M, Chen DJ, Kurimasa A. Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem* 282, 10138-10145, 2007.

- ⑧ Ren X, Tahimic CG, Katoh M, Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M. Human artificial chromosomevectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev* 2, 43-50, 2006.

[学会発表] (計 7件)

- ① Itoh M, Ide S, Takashima S, Kudo S, Nomura Y, Segawa M, Kubota T, Mori H, Tanaka S, Horie H, Tanabe, Goto Y. MeCP2 directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression in brains. The tenth International Child Neurology Congress. Montreal, Canada, June 11-16, 2006.
- ② Itoh M. MeCP2 directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression. The 6th World Rett Syndrome Congress – A Hand Link from Gene to Care. Paris, October 10-13, 2008
- ③ Itoh M. Delayed Synaptic Maturation of Rett Syndrome model mice brain. The 9th Annual Rett Syndrome Symposium. Chicago, IL June 24, 2008
- ④ Itoh M. MeCP2 directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 expression in brains. The 8th Annual Rett Syndrome Symposium. Chicago, IL June 26, 2007.
- ⑤ Itoh M. Pathogenesis of Rett syndrome, advance study of MeCP2 molecular mechanism. Symposium IV, Brain Development Disorders, The 4th Congress of Federation of Asian-Oceanian Neuroscience Societies. Hong Kong, Nov. 30, 2006.
- ⑥ Itoh M, Takashima S. A histopathological study of premature and mature infants with pontosubicular neuron necrosis. Developmental/Pediatric Workshop. The 16th. International congress of Neuropathology, San Francisco, Sep. 12, 2006.
- ⑦ Itoh M. エピジェネティクスが関与する自閉症疾患レット症候群の発症機転 (Pathogenesis of Rett syndrome, an epigenetic autistic disease) . エピジェネティック神経科学シンポジウム, 第29回日本神経科学会議, 京都, 7月12日, 2006年.

[図書] (計 2件)

- ① 伊藤雅之. 小児大脳変性疾患の病理. 小児神経学. 診断と治療社. 東京. 171-200, 2008
- ② 伊藤雅之. 大脳の発達過程と障害. ことばとこころの発達と障害. 永井書店. 東京. 3-20, 2007.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅之 (ITO MASAYUKI)  
国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第2部・室長  
研究者番号: 50243407

(2) 研究分担者

栗政 明弘 (KURIMASA AKIHIRO)  
鳥取大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号: 80343276

(3) 連携研究者

井手 秀平 (IDE SHUUHEI)  
国立精神・神経センター・神経研究所疾病研究第2部・研究生  
研究者番号: 80425701