

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08198

研究課題名(和文) レット症候群における睡眠障害の病態解明と治療 ―睡眠・覚醒制御システムの役割―

研究課題名(英文) Analysis of sleep disorder phenotypes in mouse models of Rett Syndrome for drug discovery

研究代表者

高橋 知之 (Takahashi, Tomoyuki)

久留米大学・高次脳疾患研究所・教授

研究者番号：20332687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群(RTT)は、MeCP2遺伝子変異を主因する神経発達障害で、患者の80%以上で合併する睡眠障害は臨床上的問題の一つである。本研究課題では、RTTモデルマウスの概日リズムや睡眠・覚醒状態、視床下部でそれらを制御する遺伝子の発現を解析した。その結果、RTTモデルマウスでは活動量が低下するが、概日リズムは維持されていた。一方、RTTモデルマウスでは、睡眠の断片化が認められ、特異な睡眠構造を示した。また、視床下部領域で発現の低下が認められたオレキシン受容体に着目して解析を進めたところ、オレキシン情報伝達システムの異常が RTTモデルマウスの睡眠・覚醒病態の原因の一つである可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レット症候群(RTT)は、主に女児で発症する重度の神経発達症である。一遺伝子の変異によって引き起こされるRTTは、神経発達症の病態メカニズムを解析する上で良いモデルとなるとして注目されている。このことから、本研究課題における RTTの睡眠障害をはじめとする様々な病態メカニズムの研究は、神経発達症をはじめとする様々な神経精神疾患への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder mainly caused by mutations in the gene encoding the transcriptional regulator Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2), located on the X chromosome. Many RTT patients have sleep problems, such as insomnia characterized by difficulties initiating and maintaining sleep, prolonged night awakenings, and circadian sleep disorders. However, little is known about neural mechanisms underlying the sleep-wake problems of RTT. In this study, we found that *Mecp2*-null mice have sleep problems such as fragmented sleep and abnormal sleep structure. In addition, MeCP2 deficiency affected the expression of several neuromodulator genes in the hypothalamus. Among them, expression of *Hcrt*/orexin receptors gene was reduced in *Mecp2*-null brain and hypocretin/orexin signals were attenuated in *Mecp2*-null mice. These findings suggest that alteration of orexin signal transduction in *Mecp2*-null mice may be one of the causes of sleep problems in *Mecp2*-null mice.

研究分野：細胞生物学、分子生物学、発生生物学

キーワード：レット症候群

## 1. 研究開始当初の背景

レット症候群 (RTT) は、X 染色体上にコードされる MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) 遺伝子変異を主因とする神経発達障害である。主に女児で発症するが、出生時は正常、しかし数ヶ月後、発達停滞、1-3 歳頃より急速な言語や運動機能の退行を示し、失調性歩行、自閉性行動、てんかん、自律神経障害など多様な臨床症状を特徴とする。とりわけ RTT では、夜間の不眠と昼間の傾眠傾向を伴う睡眠障害を合併する患者が多く、本人の Quality of Life (QOL) のみならず、介護者の負担も増加させるために臨床上の大きな問題となっている。

RTT における睡眠障害は、一部でメラトニン投与により改善が認められることや、MeCP2 欠損した RTT 疾患モデルによる研究から、概日リズムの異常がその原因の一つと考えられてきた。しかし、我々の MeCP2 欠損マウスや ES 細胞を用いた研究では、時計中枢における時計遺伝子の発現リズムの減弱を認めたものの、活動量評価における明らかな概日リズムの異常は認められなかった。最近になって、申請者は、MeCP2 欠損マウスの視床下部領域の解析から、概日リズムの統合や睡眠制御に関わるいくつかの遺伝子の発現異常を見出し、本研究課題では、睡眠・覚醒の制御に関わるいくつかの遺伝子の発現異常と睡眠障害の関係に着目した研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

レット症候群 (RTT) は、MeCP2 遺伝子変異を主因とし、主に女児で発症する神経発達障害で、多様な神経症状を特徴とする。中でも、80%以上の患者で合併する睡眠障害は、本人の QOL 低下に加え、介護者の負担を増加させ、臨床における問題の一つである。

本研究は、MeCP2 遺伝子を欠損した RTT モデルマウス、細胞を用いて、睡眠障害の病態における体内時計、概日リズム、睡眠・覚醒制御システムの役割を解明し、睡眠障害をはじめとする RTT の病態メカニズムに迫るとともに、睡眠・覚醒制御システムの調節による治療の可能性を調べることを目的としている

## 3. 研究の方法

### (1) RTT モデルマウスにおける概日リズムの解析

MeCP2 欠損 (RTT モデル) マウスにおける概日リズムを解析するために、暗箱における赤外線センサーや回転カゴ式活動測定装置を利用して、自発行動を測定する。また、明暗周期から恒常暗に固定し、内在性リズム形成や位相反応を野生型コントロール (WT) マウスと比較、評価する。

### (2) RTT モデルマウスにおける睡眠・覚醒状態の解析

WT 及び RTT モデルマウスにおいて、小動物用無侵襲睡眠・覚醒計測システム (PiezoSleep) や脳波の測定による睡眠・覚醒状態の解析を行う。

### (3) RTT モデルマウスの体内時計、睡眠・覚醒を制御する視床下部の解析

Zeitgeber time (ZT) 5, 11, 17, 23 時点の組織 (視床下部、脳幹、胃、肝臓、心臓) における時計遺伝子 (Clock, Per1,2,3, Cry1,2, Arntl) の発現を解析し、MeCP2 遺伝子の欠損が体内時計に及ぼす影響を調べる。また、睡眠・覚醒に関連する様々な脳領域の睡眠・覚醒制御因子、ホルモンなどの発現に及ぼす影響を定量 PCR や免疫染色などにより解析する。

### (4) 睡眠・覚醒病態メカニズムの解析

1)~3) で得られた情報を基に、病態に関連する神経ネットワークを同定し、マイクロダイアリシス法によって種々の神経伝達物質の測定することで、病態における役割を解明する。

## 4. 研究成果

(1) 暗箱内で 12 時間の明暗周期における自由活動量を解析することによって、WT 及び、RTT モデルマウスにおける概日リズムや明暗条件への同調能を調べた。その結果、RTT モデルマウスは、WT マウスと同様に、休息期の明期に比べて、活動期の暗期における活動量が高く、明らかな明

暗周期の切り替わりが認められた。この事から、RTT モデルマウスでは、明暗環境への同調能力を維持していることが示された。一方、WT マウスに比較して、RTT モデルマウスの暗期における活動量が有意に低く、RTT モデルマウスにおける活動量の低下を定量的に評価できることが示された。同様に、回転カゴによる自発運動量を調べたところ、RTT モデルマウスは、明暗周期への同調能が維持される一方、WT マウスと比較して、暗期の運動量が低く、暗箱における観察と同様の結果が得られた。また、恒常暗条件下での体内時計による周期性、周期長を評価したところ、WT マウスと同様に、RTT モデルマウスでも概日リズムは維持され、周期長に有意な差は認められなかった。その一方で、WT マウスの周期長は、明暗条件下より若干短くなるのに対して、RTT モデルマウスでは、平均して短くなるものの周期長の長短のばらつきが大きく、概日リズムの微細な調整に問題がある可能性が示唆された。

(2) まず、簡易的に WT 及び、RTT モデルマウスの睡眠・覚醒状態を評価するために PiezoSleep システムによる解析を行った。その結果、WT と RTT モデルマウスにおいて、24 時間を通しての総睡眠時間と覚醒時間における有為な差は認められなかった。また、暗期、明期それぞれにおける、睡眠・覚醒時間にも違いは認められず、睡眠の時間に大きな問題は認められなかった。一方、持続睡眠時間 (<30、<60、<120、<240、<480、>960 秒) ごとの測定 24 時間に対する睡眠時間の割合を比較したところ、WT マウスでは、>960 秒以上の睡眠時間の割合が有意に高いのに対して、RTT モデルマウスでは、<30、<60、<120 秒の睡眠時間の割合が有意に高く、睡眠の断片化が示唆された。また更に、この傾向は、活動期である暗期で強く認められた。以上の事から、RTT モデルマウスは WT マウスと同等の睡眠時間を維持するものの、持続時間の短い睡眠が多く、断片化が認められ、睡眠の質が低下している可能性が示唆された。

そこで、更に詳細な睡眠・覚醒(ステージ)状態を解析するために脳波ロガーによる WT 及び、RTT モデルマウスの脳波測定を行った。その結果、WT マウスと比較すると、24 時間における総睡眠時間では、RTT モデルマウスの NREM (non-rapid eye movement) 睡眠の割合が僅かに高い傾向、REM (rapid eye movement) 睡眠時間の割合が低い傾向が認められた。その一方で、明期のみで評価すると NREM 睡眠及び、覚醒(Wake)時間の割合に有意な違いが認められ、RTT モデルマウスでは、それぞれ有意な NREM 睡眠時間の割合の増加、覚醒時間の割合の低下が認められた。また、統計解析において有意な差は認められなかったが、RTT モデルマウスでは、REM 睡眠の時間の割合が低下する傾向が認められた。以上の結果から、RTT モデルマウスは、WT マウスと異なる特徴的な睡眠構造を有していることが明らかとなった。

また、Wake、REM、NREM ステージそれぞれの持続時間 (<30、<60、<120、<240、>240 秒) における 1 時間あたりのエピソード回数を調べたところ、RTT モデルマウスでは、覚醒状態の <60 秒持続時間及び、NREM の <30 持続時間のエピソード回数の増加、NREM 及び、REM と NREM を合わせた睡眠ステージの >240 秒持続時間のエピソード回数の有意な低下が認められた。また更に、ステージ遷移について解析したところ、RTT モデルマウスでは、暗期における Wake NREM (W NR) の遷移と NREM Wake (NR W) 遷移回数が多く、頻繁に NREM と覚醒の遷移を繰り返していることが示された。また、明暗期とも NREM REM (NR R) の遷移回数が少なく、REM への移行に問題がある可能性が示唆された。その一方で、ナルコレプシーなどで観察される Wake REM (W R) の遷移は認められなかった。このことから、RTT モデルマウスでは、特に暗期において睡眠及び覚醒の遷移回数が多く、睡眠及び覚醒ステージにおける断片化が示唆された。

(3) 次に、MeCP2 遺伝子欠損が、概日リズムや睡眠・覚醒の制御メカニズムに及ぼす影響を解析するために、WT 及び、RTT モデルマウスの視床下部領域における様々な制御因子の遺伝子発現を解析した。まず、体内時計の制御に関わる時計遺伝子 (Clock、Per1,2,3、Cry1,2、Arntl) の 12 時間の明暗条件下における発現パターンを定量性 PCR によって解析し、WT マウスと比較した。その結果、WT マウスにおいて、Per1 遺伝子の発現は、ZT11 でピークを迎え、ZT17 では低下、ZT23 で若干上昇するような発現パターンを示すのに対して、一部のタイムポイントでは発現の強さが異なるものの、RTT モデルマウスでも同様の発現パターンが認められた。また、その他の時計遺伝子も明暗条件下の 4 ポイントにおいて、WT と RTT モデルマウスで同様の発現パタ

示すことが明らかとなった。このことから、RTT モデルマウスでは、時計遺伝子の発現における概日リズムは維持されており、概日リズムの制御そのものには大きな問題がない可能性が示された。

そこで次に、MeCP2 遺伝子欠損の睡眠・覚醒メカニズムへ及ぼす影響を解析するために、WT 及び、RTT モデルマウスにおいて、睡眠・覚醒の制御に関わる様々な遺伝子の発現を解析した。その結果、WT マウスに比較して、RTT モデルマウスの視床下部領域では、Tac1、Oxt、Pomc、Hcrtr1 遺伝子の発現が有意に低いことが示された。また、Th、VIP 遺伝子の発現の低い傾向が認められた。以上のことから、MeCP2 遺伝子の欠損は、視床下部領域における様々な遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかとなった。

ところで、Hcrtr1 は、摂食や睡眠・覚醒を制御することで知られる Hypocretin/Orexin (オレキシン) の受容体遺伝子である。そこで、オレキシンシステムの病態への関与を調べるため、視床下部領域に加えて、前頭前野、脳幹、脳全体におけるオレキシン及び、その受容体の遺伝子発現を調べた。その結果、脳全体では、Hcrt、Hcrtr1、Hcrtr2 遺伝子のいずれの発現も、RTT モデルマウスで有意に低いことが明らかとなった。その一方で、前頭前野、脳幹部分では、Hcrtr1、Hcrtr2 の二つの受容体遺伝子のみ、RTT モデルマウスで有意に低いことが示された。以上の結果から、RTT モデルマウスの脳では、睡眠・覚醒を制御するオレキシン受容体遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。このことから、オレキシンシグナル伝達の異常が、RTT モデルマウスの睡眠・覚醒病態に関わる可能性が示唆された。

(4) 先の結果から、RTT モデルマウスでは、睡眠・覚醒状態の断片化、更にはオレキシン受容体遺伝子の発現低下により、オレキシンシグナル伝達の異常が推測された。そこで、マイクロダイアリシス法を利用して RTT モデルマウスにおけるオレキシンシグナル伝達能を評価した。その結果、WT マウスでは、オレキシン受容体アゴニストを前頭前野に挿入したカニューレを介して投与することで、投与後 20 分より、前頭前野のカニューレより回収された細胞外液中におけるノルアドレナリン (NA) 及び、ドーパミン (DA) の濃度の上昇を認めた。これに対して、RTT モデルマウスでは、オレキシン受容体アゴニストに対する NA、DA の有意な反応性が認められず、オレキシン受容体を介したシグナル情報伝達に異常があることが明らかとなった。

#### (5) まとめ

本研究課題では、RTT における睡眠障害の病態メカニズムを解析するために RTT モデルマウスを利用して暗箱や回転かごによる活動量、自発運動量の評価、Piezosleep システムや脳波測定による睡眠・覚醒状態に加え、概日リズム、睡眠・覚醒制御に関わる遺伝子発現の解析を行った。その結果、RTT モデルマウスでは、概日リズムには大きな異常は認められない一方、睡眠構造の変化に加えて、睡眠の断片化が認められ、睡眠の質が低下している可能性が考えられた。また、睡眠の断片化の裏表として、覚醒状態の断片化が予想され、これがヒトにおけるうたた寝に相当している可能性が推察された。更に、概日リズムや睡眠・覚醒制御に関わる視床下部領域における遺伝子発現を調べたところ、時計遺伝子の発現パターンに大きな異常は認められなかったのに対して、睡眠・覚醒の制御に関わるいくつかの遺伝子発現の低下が明らかとなった。このことから、RTT モデルマウスでは、概日リズムに大きな問題があるというよりはむしろ睡眠・覚醒の制御そのものが問題となっている可能性が考えられる。実際、いくつかの遺伝子の中でも睡眠・覚醒を制御するオレキシン受容体遺伝子の発現低下に着目して、マイクロダイアリシス法による解析を行ったところ、RTT モデルマウスではオレキシンシグナル伝達能が低下していることが明らかとなった。オレキシンシグナルは、その異常によってナルコレプシーを引き起こすように、覚醒状態の維持に関わることから、RTT モデルマウスにおけるオレキシンシグナル伝達能の低下は覚醒状態の断片化、即ち、うたた寝に繋がると考えられる。このように本研究課題による成果は、RTT モデルマウスの睡眠・覚醒病態においてオレキシンシグナル伝達異常の関与を示す重要な知見であり、RTT の睡眠・覚醒病態における創薬ターゲットの同定から新たな治療法の開発につながるものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fukui K, Takahashi T, Matsunari H, Uchikura A, Watanabe M, Nagashima H, Ishihara N, Kakuma T, Watanabe Y, Yamashita Y, Yoshino M	4. 巻 46(6)
2. 論文標題 Moving towards a novel therapeutic strategy for hyperammonemia that targets glutamine metabolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Inherit Metab Dis	6. 最初と最後の頁 1059-1069
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jimd.12540. Epub 2022 Aug 4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 4.Yoshida S., Amamoto M., Takahashi T., Tomita I., Yuge K., Hara M., Iwama K., Matsumoto N., Matsuishi T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Perampanel markedly improved clinical seizures in a patient with a Rett-like phenotype and 960-kb deletion on chromosome 9q34.11 including the STXBP1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Case Rep	6. 最初と最後の頁 e5881
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.5811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saikusa T, Kawaguchi M, Tanioka T, Nabatame S, Takahashi S, Yuge K, Nagamitsu S, Takahashi T, Yamashita Y, Kobayashi Y, Hirayama C, Kakuma T, Matsuishi T, Itoh M.	4. 巻 42(10)
2. 論文標題 Meaningful word acquisition is associated with walking ability over 10 years in Rett syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Dev	6. 最初と最後の頁 705-712
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.braindev.2020.06.012. Epub 2020 Jul 17.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui K., Takahashi T., Ide K., Matsuda E., Kosai K.	4. 巻 541
2. 論文標題 Optimization of Adenoviral Gene Transfer in Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 78-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.01.009. Epub 2021 Jan 19.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kotaro Yuge, Munetsugu Hara, Tomoyuki Takahashi, Toyojiro Matsuishi, Yushiro Yamashita
2. 発表標題 Study of Sleep Disturbances In Rett Syndrome By Mecp2-Deficient Mice
3. 学会等名 17th International child Neurology Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福井 香織、高橋 知之、松成 ひとみ、内倉 鮎子、渡邊將人、長嶋 比呂志、石原 直忠、角間 辰之、山下 裕史朗、渡邊 順子、芳野 信
2. 発表標題 グルタミンリシスを標的とする高アンモニア血症の新規治療戦略
3. 学会等名 125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋知之
2. 発表標題 レット症候群モデルマウスを用いた病態解明と治療応用への展望
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 弓削康太郎、高橋知之、松石豊次郎、山下裕史朗
2. 発表標題 MeCP2欠損マウスによるレット症候群の睡眠障害に関する研究
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井 香織、高橋 知之、渡邊 順子、芳野 信
2. 発表標題 ジメチル -ケトグルタル酸はグルタミン酸デヒドロゲナーゼのフラックス抑制によりアンモニアを低下させる
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福井 香織、高橋 知之、松成 ひとみ、内倉 鮎子、長嶋 比呂志、石原 直忠、角間 辰之、山下 裕史朗、渡邊 順子、芳野 信
2. 発表標題 A NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY FOR HYPERAMMONEMIA TARGETING GLUTAMINOLYSIS
3. 学会等名 5th International Symposium on Urea Cycle Disorders (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	河原 幸江  (Kawahara Yukie)  (10279135)	久留米大学・医学部・准教授   (37104)	
研究 分担者	佐藤 貴弘  (Sato Takahiro)  (50368883)	久留米大学・付置研究所・教授   (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------