

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593045

研究課題名(和文) エピジェネティック制御異常による嚥下障害と呼吸不全の発症機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the epigenetic mechanism of swallowing and respiratory disturbances

研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00187527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群のモデルであるMeCP2欠損雄マウスでは摂食障害ならびに呼吸障害がみられる。本研究ではMeCP2欠損マウスを対象に、GABAの合成酵素GAD1のプロモーターのメチル化とGAD1遺伝子発現との関連について調べた。延髄腹側部の呼吸中枢でのGAD1 mRNA量は、野生型マウスに比べMeCP2欠損マウスで有意に減少していた。またGAD1遺伝子プロモーター上に位置するCpGのメチル化レベルは、同じ2週齢の野生型マウスに比べMeCP2欠損マウスの方が高かった。この結果は、プロモーター上のCpGの高メチル化によりGAD1の転写が抑制されたことでGAD1 mRNA量が減少した可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is caused by mutations in the gene encoding methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2). Mecp2-null mice exhibit frequent apnea similar to that seen in RTT, but epigenetic mechanisms underlying the respiratory disturbances are not well known. Because GABAergic neurotransmission has been reported to be impaired in the brain of Mecp2-null mice, we measured glutamate decarboxylase 1 (GAD1) mRNA expression in the respiratory nuclei in the medulla oblongata, and found that GAD1 mRNA was significantly reduced in Mecp2-null mice compared to wild-type mice at 2 weeks of age ($p < 0.05$). Methylation analysis of CpGs in the GAD1 proximal promoter revealed differences of the sites of methylated CpG between Mecp2-null mice and wild-type mice, and highly methylated CpGs in the GAD1 promoter of Mecp2-null mice. These results indicate that the altered GAD1 expression in the respiratory nuclei in the medulla may be responsible for the respiratory disturbances in Mecp2-null mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：呼吸 嚥下 延髄 呼吸中枢 GABA GAD1 MeCP2 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) エピジェネティック制御異常に基づく遺伝性疾患としてレット症候群がある。本疾患では知的障害に加えて運動障害、呼吸障害、摂食機能障害、嚥下障害などが認められ、複数の筋の協調活動にも異常がみられる。

(2) レット症候群は DNA 上の CpG 配列のメチル化部位に結合して遺伝子発現を抑制する機能を持つ MeCP2 の変異によって発症することが知られているが、MeCP2 の変異に起因するエピジェネティック制御異常の詳細は十分には明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) MeCP2 を欠損している雄マウスでは、生後 7-8 週を境に体重が増加から減少に転じ、摂食および消化吸収能力の急激な低下が生じ、それとほぼ同時期に無呼吸発作の頻度も増加する。延髄の呼吸中枢の機能低下による無呼吸発作の著しい増加、橋から延髄にかけて存在する顎・舌運動や嚥下の制御に関わる中枢の機能低下が考えられることから、延髄の神経機能に焦点を当てて研究を行った。

(2) MeCP2 の異常によって生じるエピジェネティックな変化が、GAD1 遺伝子発現制御にどのように関連しているのか、またどのような経路を経て筋の協調不全に至るのかが不明であることから、本研究では発達期の MeCP2 欠損マウスについて、MeCP2 の欠損が延髄の GAD1 mRNA 発現ならびに GAD1 プロモーター領域の CpG メチル化をどのように変化させるのかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) 実験動物 Mecp2 ヘテロ欠損雌マウスならびに C57BL/6J 野生型マウス(wild)を本学動物実験施設にて飼育し、両者を交配することで Mecp2 欠損雄マウス(hemi)を得た。

(2) 延髄での GAD1 mRNA 量と無呼吸発作頻度との関連性 生後 2 週 of hemi および wild について、ペントバルビタールの腹腔内注入による深麻酔下で脳を取り出し、延髄腹側呼吸中枢の組織をパンチアウト法で取り出し、通常に従い RNA および DNA を抽出した。GAD1 mRNA の量をリアルタイム PCR 法によって測定した。

生後 2 週 of hemi ならびに wild を一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (PLY4211; Buxco Electronics) のチャンパー内に入れ、10:00-11:00 の 1 時間、呼吸波形を測定・記録したのち、1 秒以上の無呼吸発作の発生回数を調べた。明暗条件は 07:00-19:00 を明期とした。

(3) GAD1 近位プロモーター上の CpG のメチル化レベルの測定 抽出した DNA について、

イサルファイトシーケンス法により、GAD1 プロモーター上に位置する 23 箇所の CpG について、シトシンのメチル化の程度をクローン単位で個別に調べメチル化率を算出した。この操作を wild および hemi について生後 2 週で行い、メチル化レベルを比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は日本大学歯学部実験動物委員会の承認を得て実施し、実験動物の取扱いは同委員会の指針に従って行った。(承認番号 2013-歯-001, AP10D008)

4. 研究成果

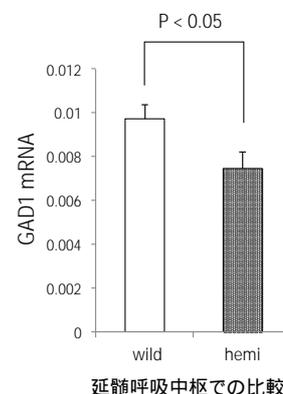
(1) 生後 2 週 of wild および hemi に関して、成長発達に相違は認められず、体重にも差はなかった。遺伝子型の判定には尾先部から抽出したゲノム DNA を用いた。mecp2 遺伝子の一部を含む、配列の異なるプライマーを用いた PCR 法により、遺伝子型の判定は容易かつ正確であった。

(2) 2 週齢において、hemi は wild と比べ無呼吸頻度が高かった ($p < 0.01$)。一方、hemi と同じ母 (Mecp2 ヘテロ欠損雌マウス) から生まれた雄マウス (同腹雄) と hemi を比較した場合、無呼吸の頻度に有意差はみられなかった。平均値で比較した場合、wild に比べて Mecp2 ヘテロ欠損雌マウスから生まれた野生型雄の方が、無呼吸頻度が高かったが、統計的な有意差は無かった。

遺伝的には同じ野生型であっても、母の遺伝子型の違いによって仔の無呼吸頻度に違いが生じた理由は明確ではないが、何らかの胎内環境の違い、あるいは養育行動の違いが延髄機能の発達に影響を及ぼした可能性が考えられる。

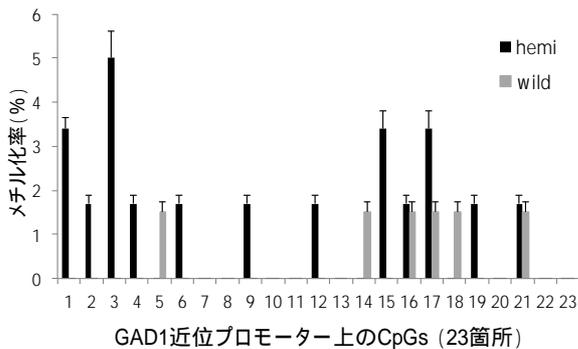
(3) 延髄腹側部に位置する呼吸中枢の、生後 2 週 of GAD1 mRNA 量は、wild に比べ hemi で有意に減少していた (図 1)。この GAD1 mRNA 発現の低下が呼吸中枢での GABA 合成量を減少させるとともに、神経終末から放出される GABA 量にも影響を及ぼし、神経伝達が低下したことで無呼吸発作の頻度を上昇させた可能性が示唆される。

【図 1】



(4) GAD1 遺伝子のプロモーター上に位置する CpG (23 箇所) のメチル化レベルについて、バイサルファイトシーケンス法により検討した。同じ 2 週齢の wild に比べ、hemi ではより多くの CpG 部位についてメチル化が確認され、特に CpG1 から CpG12 にかけて、wild ではほとんどメチル化されていないのに対し、hemi では数カ所でメチル化されており、特に CpG3 ではその率が高かった (図 2)。

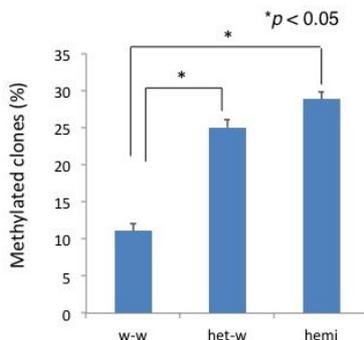
【図 2】



(5) Mecp2 ヘテロ欠損雌マウスから生まれた野生型雄マウス (het-w) も加え、hemi, wild の 3 種のマウスについて GAD1 遺伝子のプロモーター上の CpG (23 箇所) のメチル化レベルを総合的に比較した (図 3)。その結果、同じ 2 週齢の wild (図では w-w で示す) に比べ、hemi と het-w でメチル化レベルが高まっていることが明らかになった。この結果は、hemi および het-w において、GAD1 遺伝子プロモーター上の CpG の高メチル化によって延髄での GAD1 mRNA の転写が影響を受けていることを示している。

特に hemi については、CpG の高メチル化が GAD1 mRNA 量の減少に結びついていることが示唆され (図 1)、MeCP2 の欠損が直接 GAD1 遺伝子プロモーター上の CpG のメチル化に影響を与えている可能性、ならびに母マウスが妊娠期あるいは養育期に何らかのメカニズムを通じて仔の GAD1 遺伝子プロモーター上の CpG のメチル化に影響を及ぼしていることが考えられた。

【図 3】



(6) hemi に特徴的な無呼吸の増加に、延髄腹側呼吸群での GAD1 プロモーターの CpG 高メチル化、ならびにそれによる GAD1 mRNA 発現量の低下、および母マウスの遺伝子型の違いに基づく仔マウスの中枢発達への影響が関与している可能性が示された。今後、DNA のメチル化に関与している酵素である DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, ならびに脱メチル化に関与している酵素である TET1, TET2, TET3 の関与についても検討する必要があると考えられる。

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 1 件)

Histaminergic effects on the frequency of repetitive spike firing in rat insular cortex. Takei H, Song L, Ebihara K, Shirakawa T, Koshikawa N, Kobayashi M. *Neurosci Lett*, 査読有, Vol. 518, No.1, 2012, pp. 55-59

〔学会発表〕(計 2 件)

Nishiyama M, Asano M, Iwasa S, Suzuki A, Wada T, Takiguchi H, Shirakawa T. Diurnal increase of apnea and reduced GAD1 mRNA expression in respiratory nuclei of *Mecp2*-deficient mice. Neuroscience 2013, 9-13, Nov. 2013, San Diego, USA.

Nishiyama M, Wada T, Takiguchi H, Takamori K, Asano M, Iwasa S, Suzuki A, Shirakawa T. Abnormal breathing and occlusal disharmony in a mouse model of Rett syndrome. Congress of the International Association for Disability and Oral Health, 28-31, Oct. 2012, Melbourne, Australia.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00187527

(2) 研究分担者

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10231896

三枝 禎 (SAIGUSA, Tadashi)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：50277456

(3) 連携研究者

()

研究者番号：