

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25年 5月24日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791156

研究課題名（和文）エピジェネティクス発現調節機構の破綻に基づく自閉症病態の解明

研究課題名（英文）Epigenetic mechanism in autism disorder

研究代表者

三宅 邦夫（MIYAKE KUNIO）

山梨大学・医学工学総合研究部・助教

研究者番号：60550712

研究成果の概要（和文）：レット症候群は自閉症やてんかんなどを主徴とする進行性の精神・神経疾患である。この疾患の原因として *MECP2* 遺伝子変異であることが明らかになっているが、自閉症病態の解明に結びつく標的遺伝子は見つかっていない。本研究で我々はマイクロアレイを用いた網羅的解析により、新たな MeCP2 標的分子として3つのシナプス関連遺伝子（*LIN7A*、*PCDH1*、*PCDH7*）を同定した。これらの分子の発現調節異常を介したシナプス機能異常が自閉症病態に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Rett syndrome is a neurodevelopmental and autistic disease caused by mutations of *Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2)* gene. MeCP2 protein binds to methylated gene promoters to suppress their expression, indicating that Rett syndrome is caused by the deregulation of target genes. However, it is likely that there are more unidentified neuronal MeCP2-targets associated with the neurological features of RTT. Using a genome-microarray approach, we found 22 genomic regions that contain sites potentially regulated by MeCP2. Within these regions, Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis revealed that MeCP2 binds to the upstream regions of the *LIN7A*, *PCDH1* and *PCDH7*. Since these genes are generally essential for brain development, aberrant regulation of these molecules may contribute to the pathogenesis of the neurological features observed in Rett syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：エピジェネティクス、遺伝子発現、レット症候群、自閉症

## 1. 研究開始当初の背景

(1) MeCP2 は脳発達過程において遺伝子発現調節を行う重要な転写因子であり、これまで MeCP2 蛋白の標的遺伝子は神経栄養因子の *BDNF* や GABA 合成酵素の 1 つである *GAD* の発現誘導に関与する *DLX5* など約 20 種の遺伝子が報告されていた。

(2) 一方で、自閉症疾患を始めとした神経発達障害がシナプス形成や機能異常と関連があることが報告されているが、シナプス機能に関連した MeCP2 の標的遺伝子はまだ見つかっていない。

(3) MeCP2 はメチル化 DNA に結合し、転写抑制複合体を形成することで遺伝子の発現を抑制することが報告されてきたが、近年、MeCP2 が転写抑制だけでなく、転写の促進にも関与していることが報告された。

## 2. 研究の目的

(1) シナプス形成・機能に関連した MeCP2 の新規標的遺伝子を明らかにし、新たな自閉症（レット症候群）病態メカニズムを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞を用いて、抗 MeCP2 抗体、抗メチルシトシン抗体及び抗ヒストン H3K27 トリメチル化抗体でそれぞれクロマチン免疫沈降（ChIP）を行い、マイクロアレイにより網羅的解析を行った。

(2) 3 種類のマイクロアレイの結果から共通する遺伝子を見出し、ChIP-PCR で確認した。

(3) それぞれの遺伝子のプロモーター領域のメチル化をバイサルファイトシーケンス法で解析した。

(4) MeCP2 による遺伝子発現が調節されているかをレポーターアッセイ法、MECP2 ノック

ダウン法及び *Mecp2* ノックアウトマウスを用いて定量 RT-PCR 法で解析した。

## 4. 研究成果

(1) 3 種類のマイクロアレイの結果から、2 2 染色体領域が同意された。その中から神経関連遺伝子を 4 種類選択し、マイクロアレイの結果が妥当かどうかを ChIP 法で確認した（図 1）。その結果、*LIN7A*、*PCDHB1*、*PCDH7* の 3 つの遺伝子で MeCP2 と結合していることがわかった。

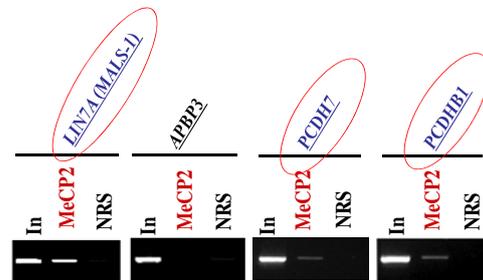


図 1. クロマチン免疫沈降法による MeCP2 の標的遺伝子領域への結合

(2) 3 つの遺伝子のうちプロトカドヘリンファミリーである *PCDHB1* 及び *PCDH7* についてプロモーター領域のメチル化を解析した（図 2）。その結果、*PCDHB1* は高メチル化、*PCDH7* は低メチル化であった。

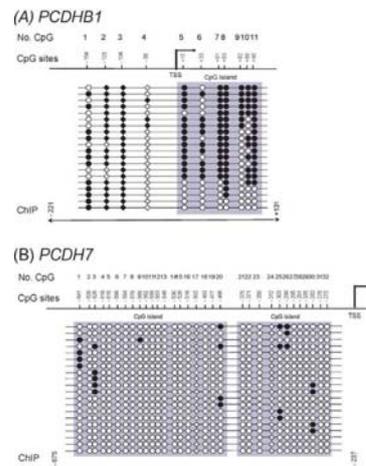


図 2 プロモーター領域のメチル化

(3) MeCP2 によって各遺伝子が発現調節を受けているかをルシフェラーゼアッセイにより解析した。各遺伝子のプロモーター領域のルシフェラーゼコンストラクト及び MECP2 発現、MBD 欠損ベクターをコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を測定した(図3)。その結果、どちらの遺伝子も正常 MeCP2 蛋白では発現を抑制し、異常 MeCP2 では抑制効果が解除されたことから、これらの遺伝子は MeCP2 により発現抑制を受けていることがわかった。

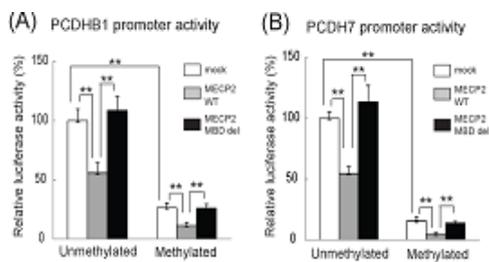


図3 レポーターアッセイ

(4) 内因性の遺伝子発現の影響を解析するため、神経芽細胞腫 SHSY-5Y 細胞を用いて、MECP2siRNA によるノックダウン法による定量 RT-PCR 法を行った(図4)。その結果、MECP2 をノックダウンすると、どちらの遺伝子も遺伝子発現が増加することがわかった。

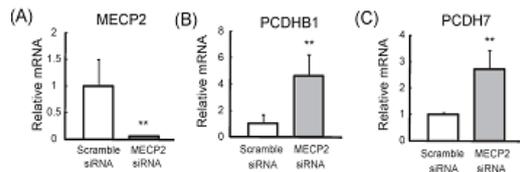


図4 MECP2 ノックダウンにおける遺伝子発現解析

(5) Mecip2 ノックアウトマウスを用いて定量 RT-PCR を行った(図5)。その結果、ノックアウトマウスで有意に遺伝子発現が増加していることがわかった。

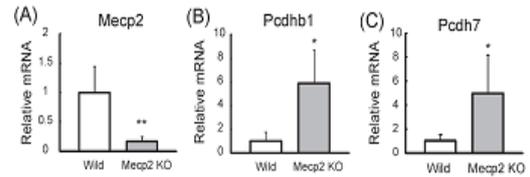


図5 Mecip2 ノックアウトマウスにおける遺伝子発現解析

(6) Neuro2a 細胞を用いて、Mecip2siRNA によるノックダウン法による *Lin7a* 遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で行った(図6)。その結果、これまでの2つの遺伝子とは逆に遺伝子発現が減少していることがわかった。LIN7A はこれまでの MeCP2 による遺伝子発現抑制ではなく、促進に作用することが示唆される。

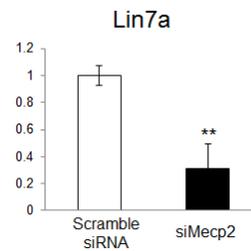


図6 Mecip2 ノックダウンにおける *Lin7a* 遺伝子発現解析

(7) これまで MeCP2 の標的遺伝子としてレット症候群の病態を解明できるようなものは見つかっていなかった。本研究で我々は新たな MeCP2 の標的遺伝子を発見した。PCDHB1 と PCDH7 はプロトカドヘリンファミリーに属し、細胞接着分子でありシナプス間の接着に重要である。LIN7A はシナプスの足場形成に重要な分子である。これらのシナプス形成・機能に関する分子の発現調節異常がレット症候群を含む自閉症の病態の一端であることが示唆される。今後さらなる機能解析を進めていくことで新たな自閉症病態メカニズムの解明、治療薬の開発につながる事が期待される。

## 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3件)

- (1) Kubota, T., Miyake, K. and Hirasawa, T. Epigenetic understanding of gene-environment interactions in psychiatric disorders: a new concept of clinical genetics. Clin. Epigenetics 査読有、4、2012、 e1. DOI: 10.1186/1868-7083-4-1.
- (2) Kubota, T, Hirasawa, T. and Miyake, K. Epigenetic Mechanisms and Therapeutic Perspectives for Neurodevelopmental Disorders. Pharmaceuticals 査読有、5、2012、369-383. DOI:10.1007/978-1-4614-0653-2\_7.
- (3) Miyake, K., Hirasawa, T., Soutome, M., Itoh, M., Goto, Y., et al. The protocadherins, *PCDHB1* and *PCDH7*, are regulated by MeCP2 in neuronal cells and brain tissues: implication for pathogenesis of Rett syndrome. BMC Neurosci. 査読有、12、2011、 e81. DOI: 10.1186/1471-2202-12-81

[学会発表] (計2件)

- (1) Miyake K., Hirasawa T, Taira T, Kubota T. Identification of MeCP2-target synaptic molecules associated with pathogenesis of Rett syndrome. 23th Biennial Meeting, International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neuroscience, 2011年8月 Athens, Greece
- (2) Hirasawa T, Endo A, Miyake K.

Koizumi S, Kubota T, Corticosterone facilitates the synchronized calcium oscillation in hippocampal neurons, 23th Biennial Meeting, International Society for Neurochemistry jointly with the European Society for Neuroscience, 2011年8月 Athens, Greece

[図書] (計3件)

- (1) 三宅邦夫、久保田健夫、精神疾患のエピジェネティクス：メチル化 CpG 結合蛋白 (MeCP2) 研究の最近の動向、先端医学社、2011、6-11
- (2) 三宅邦夫、久保田健夫、精神発達遅滞・自閉症の分子医学 既知の遺伝子異常による発達障害・精神遅滞の分子医学 6. レット症候群の分子医学)、医学のあゆみ、2011、 pp639-644
- (3) Miyake K., Hirasawa T, Koide T, Kubota T. Chapter7: Epigenetics in autism and other neurodevelopmental diseases. In "Neurodegenerative Diseases" (Madae Curie Bioscience Databases)、ISBN 978-953-307-259-3、Landes Bioscience, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.epigenetmed.com/>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

三宅 邦夫 (MIYAKE KUNIO)  
山梨大学・医学工学総合研究部・助教  
研究者番号：60550712

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし