

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591531

研究課題名(和文) Rett 症候群の革新的病態マーカーと新規治療法開発の臨床的・基礎的研究

研究課題名(英文) Basic and clinical research for innovated biological marker and new treatment strategy in patients with Rett syndrome

研究代表者

松石 豊次郎 (Toyojiro, MATSUSHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：60157237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円

研究成果の概要(和文)：・レット症候群(RTT)では、典型例の約15%は遺伝子異常が同定できない。次世代シーケンサーを用いたて、SHANK3遺伝子変異が原因遺伝子の一つである事を発見した。

・Mecp2欠失マウスES細胞を用い、MeCP2は、心臓の種々の遺伝子の発現に関わることが判明し、特に、Tbx5については、ES細胞や心臓においても高度にCpGメチル化され、MeCP2がその発現を直接制御している可能性が示唆された。一方、モデル動物では、心臓の介在版の未熟な形成が認められ、チャンネル遺伝子の発現変化とともに不整脈の素因となる証明された。・グレリンは一部のRTT患者で臨床症状を改善させることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We established three basic and clinical research in Rett syndrome (RTT). We firstly demonstrated the De Novo SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3 (SHANK3) mutation causes RTT. We also revealed that loss of MeCP2 lead to dysregulation of endogeneous cardiac genes and myocardial structure alterations. Furthermore, we detected methylation of the CpG islands in the Tbx5 locus, suggest MeCP2 is an important regulator. Taken together, these results suggest that MeCP2 is an important regulator of the gene-expression program responsible for maintaining normal cardiac development and cardiomyocyte structure. We also confirmed intravenous ghrelin administration ameliorate the clinical symptom in patients with RTT.

研究分野：小児神経学

キーワード：レット症候群 SHANK3遺伝子 ES細胞 モデル動物 不整脈 心臓分化 グレリン

1. 研究開始当初の背景

レット症候群 (RTT) の有病率は、女児1万人に0.9人で発達障害の代表疾患であり、精神遅滞、低身長、小頭症などの成長障害、自律神経障害、睡眠障害、および突然死など多彩な症状を示すが病態は不明で未だ有効な治療法はない。本研究は以下の3点を明らかにする事を目指す。

1. 典型的なRTTでは、Methyl CpG binding protein2 (MECP2)の変異が8割に認められる事が証明され、非典型例ではforkhead box G1 (FOXP1), cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5) 遺伝子が原因遺伝子である事が報告されてきたが患者に占める割合は1%以下にも満たず、残り約2割のRTTの患者の遺伝子探索は依然として不明である。そこで、従来の3候補遺伝子変異の認められないRTT患者で新たな原因遺伝子を探索する事を計画した。

2. また、上記原因遺伝子発見後も、レット症候群の病態は依然として不明な点が多い。RTT児・者は対照の同年代の女性に比べて生命予後が悪く、早く死亡する事がオーストラリア、米国、その他の国から報告されている。毎年、RTT児・者の1.2%が亡くなり、26%は予期せぬ突然死である。その原因は不明であるが、その一つに、QT延長などの不整脈による突然死が報告されているが、詳細な機序は依然として不明である。

3. 更に、RTTでは未だ症状の根治、症状改善の有効な治療法は確立されていない。諸外国で基礎-臨床研究を元に新規治療法の開発にしのぎを削られているが、未だヒトのRTTで有効な治療法レット症候群は確立されていない。

2. 研究の目的

1. RTTの患児・者のうち、従来報告されたMECP2、FOXP1、CDKL5の3つの既知の遺伝子異常が見つからない患者さんで、新規遺伝子異常を明らかにする。MECP2変異が確認されたRTT患者ではGenotype-phenotype correlationを調べる。

2. モデル動物のMECP2 null mutationのES細胞、iPS細胞を用いて、突然死の原因を探索する。原因となるMECP2に制御される心臓発現の遺伝子の同定、変動しているイオンチャンネル、および心臓の刺激伝道系の形態異常を明らかにする。

3. さらに、将来の新規治療法開発のため、我々が着目しているグレリンの中樞神経系、自律神経、摂食-嚥下機能に関する基礎的-臨床研究を進め、将来の治療介入に役立てるトランスレーショナル研究の礎を見つける。

3. 研究の方法

1. 当院でフォローアップしているRTTの患者の約70家系うち、既知の遺伝子異常が見つからない患者さん10人、および両親からIC取得後にヘパリン加で採血をおこない、次世代シーケンサーを用いて、Sanger Sequencing, Multiple Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA法)、Whole Exon Sequencing法 (WES法)を用い、得られた情報を元にパイオインフォマティクスの手法を用い新規遺伝子探索を行った。

2. モデル動物、およびモデル動物から得られたES細胞、iPS細胞を樹立し、突然死の原因となる心筋の構造や機能を支える骨格蛋白や分泌ペプチド、不整脈に関連するイオンチャンネルの遺伝子発現を解析した。最初に wild type (Mecp2^{flox/y}) と Mecp2-null (Mecp2^{-/-}) のES細胞で心筋分化を比較したが、サイズ、形態の異常は見つからなかった。次に、Mecp2-null ES細胞から得られた progenitor cell の転写プロファイル、心筋への分化、心筋構造の変化、Mecp2欠損マウ

ス心臓の内因性の遺伝子発現の変化、心臓の遺伝子のDNAメチル化とMecp2結合を観察した。

3. ヒトでの研究ではグレリンを治療の候補薬として、基礎臨床面から効果を検討し Preliminary data を集めた。

4. 研究成果

1. 典型的なRTT患児・者ではMECP2の異常が8割に認められ、T158M変異は典型例の重症例に、R133C変異は比較的軽症例に認める事を確認した。次にMECP2、FOXP1、CDKL5遺伝子変異が無かった患者の両親を含めた解析を行った。レット症候群 (RTT) の新規遺伝子探索では、次世代シーケンサーを用いて、MECP2、FOXP1、CDKL5の異常が見つからなかった25歳のRTTの典型例の女児で、WES法で、239の稀な蛋白変異とスプライトサイトの変異を患者で発見した。次にコモンなSingle nucleotide polymorphism (SNPs) を用いて、絞込み、de novo、compound heterozygous、変異、homozygous mutationを調べた。ホモの変異は同定されなかったが、Sanger Sequencingで5個の候補遺伝子が候補に挙がり、最終的に、自閉症スペクトラム症、学習障害、統合失調症の原因遺伝子として報告されている、SHANK3遺伝子 (SH3 and multiple ankyrin repeat domain 3) 変異が新たな原因遺伝子であることを発見した (Am J Med Genet, Part A in press)。

2. MECP2は脳の正常発達に必要な不可欠なepigenetic regulatorである。MECP2の変異は、神経機能の変化をおこし、レット症候群をおこすことが知られている。現在までの報告で、MECP2変異はヒト、およびモデルマウスで不整脈をきたすことが報告されていた。しかし心臓の発達におよぼす機序は不明であり、詳細はわからなかった。われわれは、Mecp2欠損マウスES細胞を用い研究を行い、以下の事を新たに証明した。Mecp2欠損マウスでも心筋細胞に分化はできるが、心臓血管系のprogenitorへの更なる分化、発達は障害されていた。MECP2の異常は、内因性の心臓の種々の遺伝子の発現の異常を引き起こし、心筋の構造変化をもたらす。更に、MECP2、変異では、Tbx5部位のCpG islandのメチル化障害が確認され、MECP2がその発現を直接制御している可能性が示唆された。一方、モデル動物では、心臓の介在版の未熟な形成が認められ、チャンネル遺伝子の発現変化と共に不整脈の素因となる可能性が証明された。詳細は現在、論文化しており、近いうちに報告予定である。

3. グレリンは、一部のRTT患者で摂食行動の改善、神経症状、その他の臨床症状を改善させることのPreliminary resultが得られた。

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20件)

2014年

1. Okamura H, Kinoshita M, Saito H, Kanda H, Iwata S, Maeno Y, Matsuishi T, Iwata O. Non-invasive surrogate markers for plasma cortisol in newborn infants: Utility of urine and saliva samples and caution for venipuncture blood samples. *JCI in Endocrinol Metab* 2014, in press (査読有、第7番目)
2. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, -- Matsuishi T. Relation between circulating GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett Syndrome.

- Brain Dev* 2014;36:794-800. doi: 10.1016/j.braindev. (査読有、第10番目)
3. Yanagi T, Mizuochi T, Homma K, Ueki I, Seki Y, Hasegawa T, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Matsuishi T, Kimura A, Distinguishing primary from secondary 4-3-oxosteroid 5-reductase (SRD5B1, AKR1D1) deficiency by urinary steroid analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2014 Aug 22. doi: 10.1111/cen.12596. [Epub ahead of print] (査読有、第10番目)
 4. Matsuoka M, Nagamitsu S, Iwasaki M, Iemura A, Yamashita Y, Maeda M, Kitani S, Kakuma T, Uchimura N, Matsuishi T: High incidence of sleep problems in children with developmental disorders: Results of a questionnaire survey in a Japanese elementary school. *Brain Dev* 2014 36: 35-44 (査読有、第10番目)
 5. Ohya T, Morita K, Yamashita Y, Egami C, Ishii Y, Nagamitsu S, Matsuishi T: Impaired exploratory eye movements in children with Asperger's syndrome. *Brain Dev* 2014;36:241-247 (査読有、第7番目)
 6. Iwata S, Tachtsidis I, Takashima S, Matsuishi T, Robertson N J, Iwata O: Dual role of cerebral blood flow in regional brain temperature control in the healthy newborn infant. *Int J Devl Neuroscience* Oct;37:1-7. doi: 10.1016/j.ijdevneu. 2014.05.010. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24907512 (査読有、第4番)

2013年

1. Miyake N, Koshimizu E, ---Matsuishi T---, Niikawa N. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2013;161:2234-2243. (査読有、第14番目)
2. Matsuoka M, Nagamitsu S, Iwasaki A, Iemura A, Yamashita Y, Maeda M, Kitani S, Kakuma T, Uchimura N, Matsuishi T: High incidence of sleep problems in children with developmental disorders: Results of a questionnaire survey in a Japanese elementary school. *Brain Dev* 2014; 36: 35-44 (査読有、第10番目)
3. Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, Morimura T, Ohno Y, Hoshina T, Ihara K, Takei H, Nittono H, Kurosawa T, Homma K, Hasegawa T, Matsuishi T. Two neonatal cholestasis patients with mutations in the *SRD5B1 (AKR1D1)* gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxy cholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis* 2013;36:565-573. (査読有、第16番目)
4. Iwata O, Okamura H, Saitsu H, Saikusa M, Kanda H, Eshima N, Iwata S, Maeno Y, Matsuishi T. Diurnal cortisol changes in newborn infants suggesting entrainment of peripheral circadian clock in utero and at birth. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Jan;98(1): E25-32. doi:10.1210/jc.2012-2750. (査読有、第9番目)
5. 岩田欧介, 岩田幸子, 大矢崇志, 浦田千穂子, 神田洋, 田中恭子, 渡辺とよ子, 中澤潤, 前野泰樹, 松石豊次郎: ハイリスク児の発達評価法発達評価バッテリー プロダト発信から見た比較.

日周産・新生児誌 2013;49: 115-118 査読有、第10番目)

6. 松石豊次郎: レット症候群研究の現況と展望. **日本臨床** 2013;71(11): 2043-2053,

2012年

1. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, Tanaka E, Matsuishi T: Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from an MeCP2-Null Mouse Model of Rett Syndrome. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35354-【Epub】(査読有、第6番目)
2. Mizuochi T, Kimura A, ---Matsuishi T. Characterization of urinary bile acids in a pediatric BRC-1 patient: Effect of rifampicin treatment. *Clinica Chimica Acta* 2012;413:1301-1304. (査読有、第11番目)
3. Fujimaru C, Okamura H, Kasaki M, Kakuma T, Yoshii C, Matsuishi T: Self-perceived work-related stress and its relation to salivary IgA, cortisol and 3-methoxy-4-hydroxyl phenyl glycol levels among neonatal intensive care nurses. *Stress & Health* 2012;28:171-174(査読有、第6番目)
4. Okabe Y, Takahashi T, Mitsumasu C, Kosai K, Tanaka E, Matsuishi T: Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *PLoS One* 2012;7: e35354 (査読有、第6番目)
5. Yatsuga S, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Kakimoto N, Matsuishi T, Kakuma T, Koga Y; Matsuoka T for MELAS Study Group in Japan: MELAS: A nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim Biophys Acta* 2012;1820:619-624(査読有、第6番目)
6. Eshima N, Tokumaru O, Hara S, Bacal K, Korematsu S, Karukaya S, Uruma K, Okabe N, Matsuishi T: Age-specific sex-related differences in infections: A statistical analysis of national surveillance data in Japan. *PLoS One* 2012;7:e42261, (査読有、第6番目)
7. Iwata S, Nakamura T, Hizume E, Kihara H, Takashima S, Matsuishi T, Iwata O. Qualitative brain MRI at term and cognitive outcomes at 9 years after very preterm birth. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1138-47. doi:10.1542/peds.2011-1735. 22529280(査読有、第6番目)
8. Koga Y, Povalko N, Nishioka J, Katayama K, Yatsuga S, Matsuishi T. Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1820(5):551-552. doi:10.1016/j.bbagen.2012.01.008. PMID:22469458 (査読有、第6目)

[学会発表](計21件)

2014年

1. 松石豊次郎. 発達障がいが増えているのか?脳科学、睡眠からのチャレンジ. 第37回香川発達神経研究会・学術講演会. 2014.3.1(香川)
2. Yamashita Y, Fujita F, Tada Y, Anai C, Mukasa A, Egami C, Okamura H, Yage K, Ohya T, Iemura A, Nagamitsu S, Matsuishi T: Quality of life

(QOL) reported by children with ADHD and their mothers participated in summer treatment program. PAS/ASPR Joint Meeting, 2014. 5 (Vancouver)

3. 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, 2014. 6 (Chantilly, Washington, USA)
4. 松石豊次郎. 新生児～学童期の睡眠は発達障害の指標になるか? 日本睡眠学会第 39 回定期学術集会特別講演. 2014.7.3 (徳島)
5. 松石豊次郎. レット症候群の謎に挑戦する - 基礎・臨床研究の進歩と今後の展望 -. 第 21 回パーキンソン病及び類縁疾患研究会. 2014.11.12 (久留米)

2013 年

1. Iwata O, Iwata S, Matsuishi T: Developing cot-side biomarkers for acute cerebral injury. 15th International Symposium on Neonatal Seizures and Related Conditions, 2013. 4 (Tokyo)
2. 平田留美子, 西芳寛, 御船弘治, 細田洋司, 寒川賢治, 児島将康, 田中永一郎, 原宗嗣, 山下裕史朗, 松石豊次郎: 生後発達に伴うマウス脳内でのグレリン含量の変動に関する検討. 第 116 回日本小児科学会総会 2013.4.21 (広島)
3. 大矢崇志, 岩田欧介, 山下裕史朗, 生野貴洋, 伊良皆啓治, 松石豊次郎: 睡眠中の脳の神経活動が NIRS の変動に及ぼす影響の臨床的意義の検討. 第 55 回日本小児神経学会総会 2013.5.30 (大分)
4. 松石豊次郎: シンポジウム 「発達障害児の早期発見、対応」 - 脳科学、睡眠からのアプローチ. 第 62 回 (公社) 全日本鍼灸学会学術大会九州大会 2013.6.7 (福岡)
5. 松石豊次郎: 教育講演「発達障害児の早期発見、対応」 - 脳科学、睡眠からのアプローチ. 第 23 回日本外来小児科学会年次集会 2013.9.1 (福岡)
6. 松石豊次郎: 教育講演 脳科学、睡眠からみた発達障害児の早期発見、対応. 第 2 回日本発達神経科学学会 2013.9.9 (神戸)
7. 松石豊次郎: 発達障害児は増えているのか? - バイオマーカー、睡眠からのチャレンジ. 第 4 回「発達脳」レクチャー講演会広島大学霞キャンパス 2013.10.22 (広島)
8. 松石豊次郎: 教育講演 「発達障害の新しい概念と療育・支援」. 福岡県作業療法協会筑後ブロック分野別研修 2103.12.1 (福岡)

2012 年

1. 松石豊次郎: 発達障害の謎に挑戦する - バイオマーカーからのアプローチ -. 福井県発達障害研究会 2012.2.14 (福井)
2. 松石豊次郎: Rett 症候群とのあゆみ - 診断・治療の進歩と今後の展望 -. 第 115 回日本小児科学学術集会 2012.4.20 (福岡)
3. Hara M, Nishi Y, Yoh J, Takahashi S, Yamashita Y, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T: Plasma ghrelin and serum IGF-1 in patients with Rett syndrome and its relationship to the head growth. The 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asia and Ocesnian Congress

of Child Neurology 2012, 2012. 5 (Brisbane)

4. Matsuishi T: Rett syndrome: The state of clinical and basic research and future perspectives. The 8th Congress of ASPR, 2012. 5 (Seoul) Plenary lecture
5. 松石豊次郎: 脳科学、睡眠からみた発達障害児の早期発見、対応. 第 1 回日本発達神経科学学会「新学術領域としての発達神経科学の出航」 2012.9.9 (神戸)
6. 松石豊次郎: 発達障害児の早期発見、対応～脳科学、睡眠からのアプローチ～. 第 6 回柳川療育セミナー 2012.9.16 (柳川)
7. 松石豊次郎: レット症候群の最近の知見. 大阪発達総合療育センター講演 2012.10.21 (大阪)
8. 松石豊次郎: 日本でのレット症候群研究について. 2012 レット症候群シンポジウム in 大阪 2012.12.16 (大阪)

〔図書〕(計 3 件)

2014 年

1. 松石豊次郎, 弓削康太郎, 七種朋子, 山下裕史朗. Rett 症候群とてんかん. 頁 454-459. XIV てんかん症候群 その他の重要な病態. 新領域別症候群シリーズ No.31. 神経症候群(第 2 版)別冊日本臨床、2014 年、日本臨床社。
2. 松石豊次郎. PCD (一次性<全身性>カルニチン欠損症). 101-104. 杉江秀夫編、分担編集、福田冬季子、西野一三、古賀靖敏. 代謝性ミオパチー. 2014 年. 診断と治療社。

2013 年

1. 松石豊次郎: 27. Rett 症候群. 稀少難治てんかん診療マニュアル 疾患の特徴と診断のポイント 大槻泰介, 須貝研司, 小国弘量, 井上有史, 永井利三郎編 診断と治療社 84-87, 2013

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
無し
6. 研究組織
(1) 研究代表者

松石 豊次郎 (Toyojiro, MATSUIISHI)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：60157237

(2)研究分担者

山下 裕史朗 (Yushiro, YAMASHITA)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：90211630

高橋 知之 (Tomoyuki, TAKAHASHI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：20332687
久留米大学医学部小児科・准教授

西 芳寛 (Yoshihiro, NISHI)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：20352122

御船 弘治 (Hiroharu, MIFUNE)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号：70174117

松本 直通 (Naomichi, MATSUMOTO)
横浜市立大学・医学系研究科・教授
研究者番号：80325638

(3)連携研究者 無し
()

研究者番号：