

**研究者：石山 未紗**（所属：日本大学歯学部小児歯科学講座）

**研究題目：レット症候群の病態解明に向けての呼吸・嚥下機能の動物モデルによる解析**

**目的：**

レット症候群は約1万人に1人の確率で主に女兒に発症する遺伝性疾患で、早期の成長は外見上正常であるが、生後12~18ヵ月以降に退行し、呼吸異常や嚥下障害、運動異常などが現れる。しかしこれらがどのような機序で発現するかについてほとんど解明されていない。レット症候群モデルマウスは、呼吸異常や運動失調、摂食障害など人と類似した症状を示すことが分かっている。そこで本研究ではレット症候群モデルマウスを用いて無呼吸の発生機序と嚥下機能障害を解明する目的で実験を行う。

**対象および方法：**

実験動物として *Mecp2* ヘテロ欠損雌マウス (B6; 129P2(C)-*Mecp2*<sup>tm1.1Bird</sup>/J, STOCK#003890: Jackson Laboratory, Bar Harbor) ならびに C57BL/6J 野生型雄マウス (オリエンタル酵母, 東京) を購入後、交配を行い *Mecp2* 欠損雄マウス (hemi) を得た。コントロールとして、C57BL/6J 野生型雌マウスから生まれた野生型雄仔マウス (wild) を用いた。

2, 3, 5, 7 週齢の hemi と wild を一匹ずつ全身型プレチスモグラフ (Biosystem XA, Buxco Electronics, NY) のチャンバー内に入れ、空気圧センサーにより呼吸波形を検出した。吸気の開始点 (下向き波形が 0 を横切った点) から次の吸気の開始点までの時間が 1 秒以上の場合を無呼吸とし、その回数を自動計測した。測定開始の 1 時間前にマウスをチャンバー内に入れて測定環境に馴化したのち、10:00~11:00 までの 1 時間、呼吸波形を連続的に記録した。

生後 2 週における延髄腹側の呼吸関連ニューロン群 (ventral respiratory group, VRG) での *Gad1* mRNA の発現量、ならびに *Gad1* プロモーター上の CpG のメチル化をリアルタイム PCR およびバイサルファイトシーケンス法により調べ、それらの関連性について検討した。また、HDAC inhibitor のバルプロ酸 (valproate, VPA, 2 mmol/kg, i.p.) と L-カルニチン (0.2 mmol/kg, i.p.) を生後 8 日から 14 日まで 1 週間投与後、*Gad1* mRNA の発現量を調べた。

**結果および考察：**

2 週齢での無呼吸回数の平均は hemi で 117 回、wild で 58 回となり、生後 2 週以降いずれの週齢においても、hemi は wild と比較し有意に無呼吸回数が多いという結果を得た。

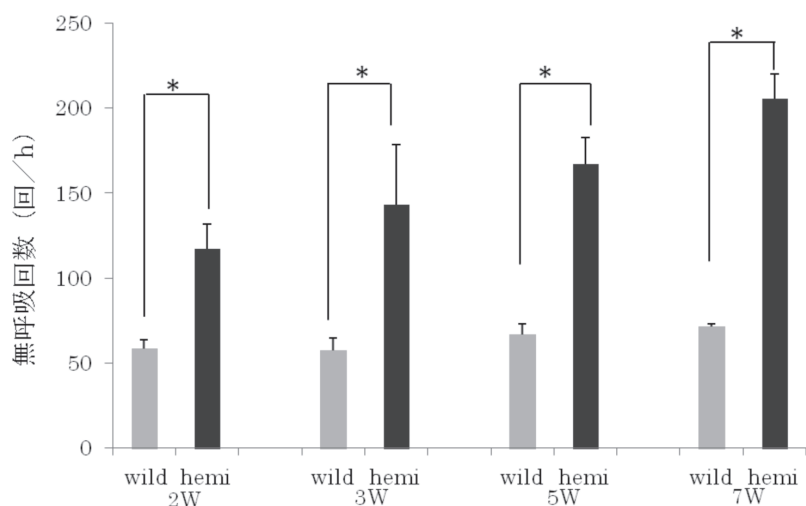


図1 無呼吸回数の比較 (\* $P < 0.01$ )  
2, 3, 5, 7週のhemiとwildの10時~11時までの1時間の無呼吸回数 (mean ± SEM) を示す. (n = 6: 各群の匹数)

*Gad1* mRNA の発現量を GAPDH を基準として比較したところ, hemi では wild と比較して有意に *Gad1* mRNA の発現量が低下していた。

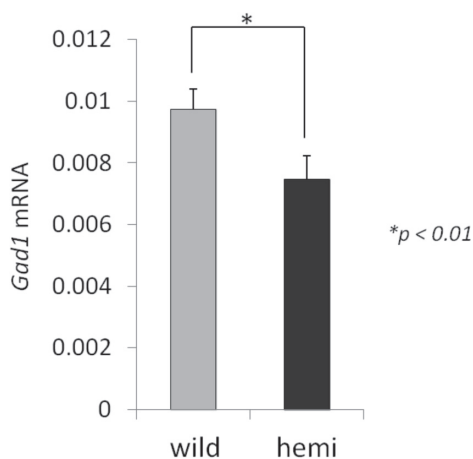


図2 VRGにおける *Gad1*mRNA の発現量  
(*GAPDH* mRNA に対する比率 n = 10: 各群の匹数)

VRG における *Gad1* 近位プロモーターのメチル化部位に関して hemi と wild の *Gad1* プロモーター領域の CpG において, 少なくとも 1 個所以上のシトシンにメチル化を確認したクローンの割合を比較したところ, hemi が wild より有意に高いレベルでメチル化 CpG を有するクローンの比率が高かった。また, メチル化 CpG の分布については, hemi と wild で大きく異なっていた。

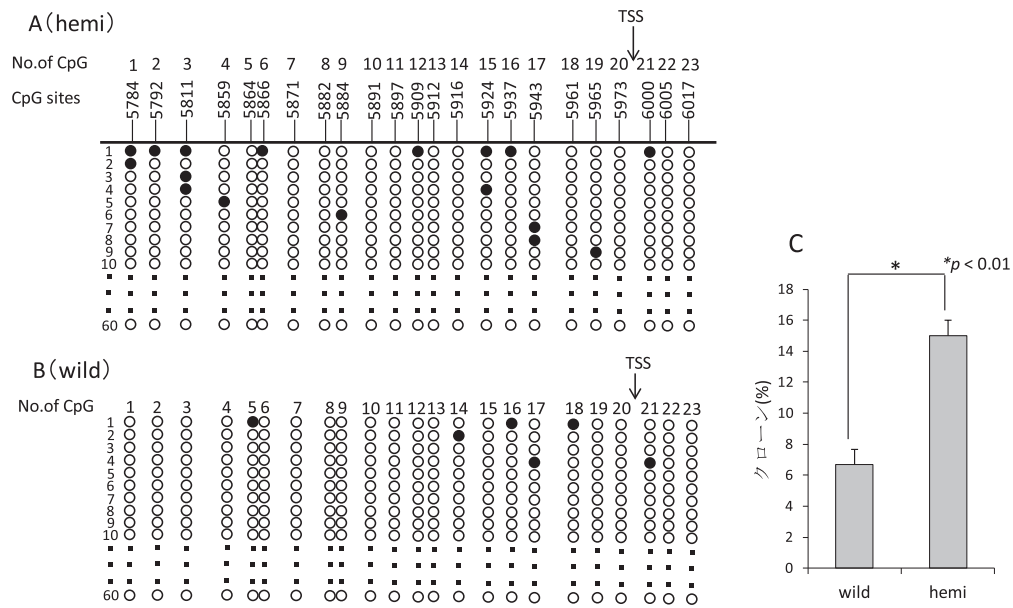


図3 *Gad1* 近位プロモーター領域のCpGのメチル化  
 Aはhemi, BはwildのVRGについての解析結果。●はメチル化CpG, ○は非メチル化CpGを表す。縦の数字はクローン番号を示す。  
 CpG sitesはNCBI accession No. NM\_008877での各CpGの位置を示す。  
 Cはメチル化されたCpGが1箇所以上みられたクローンの比率。(n=6:各群の匹数)

バルプロ酸 (valproate, VPA 2 mmol/kg, i.p.) とL-カルニチン (0.2 mmol/kg, i.p.) 投与後の *Gad1* mRNA の発現量はバルプロ酸投与前より有意に高い値という結果を得た。

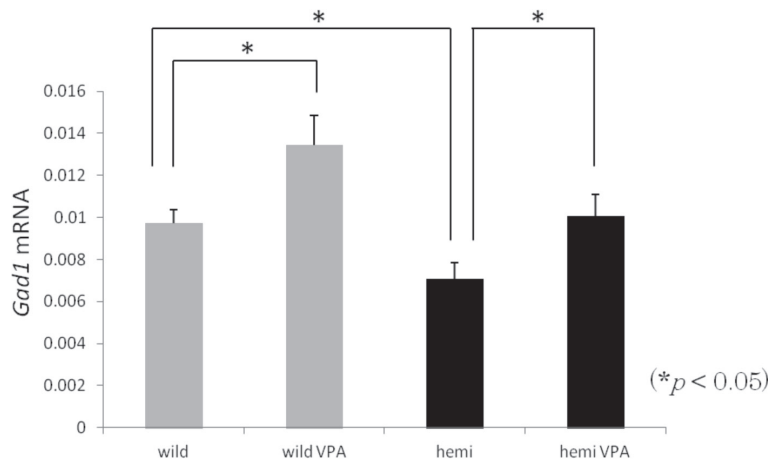


図4 *Gad1*mRNA 発現量

今回得られた hemi での結果から, *Gad1* プロモーター領域のシトシンの高メチル化によって *Gad1* mRNA の発現量の低下が生じたことが示唆され, 結果として GABA 産生の低下を招き無呼吸回数を増加させたものと考えられた。また, ヒストンの脱アセチル化酵素の阻害剤であるバルプロ酸が *Gad1* mRNA の発現量を増加させた。現時点においてレット症候群患者の治療薬はなく, また呼吸異常を改善する薬物についても効果が十分に確かめられたものはない。今後, 薬物投与による無呼吸の改善が可能かどうかを検討する必要があると考えられる。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

今後, 上記内容を含めて雑誌投稿予定である。