

平成28年度研究助成報告書

平成 29年 5月 26日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 日黒 牧子



1. 研究課題 レット症候群における側弯症の発症機序の解明 と LBX1 を介した治療法の開発

2. 研究期間 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

3. 研究（経過・成果）の概要

我々は、以前の研究でレット症候群の原因遺伝子である MeCP2 の作用機序の一つとしてクロマチンループ構造の形成を伴う転写抑制機構を見出してきた。(Nature Genetics, 2005) 一方、最近我々は思春期特発性側弯症(AIS)の研究の中で、AIS と強く相関する一塩基多型(SNP)rs11190870 を含むゲノム領域がクロマチンループ構造を介して約10kb離れた LBX1 遺伝子のプロモーターにはたらきかけて発現を上昇させることを明らかにした。(G.Long et al., 2016. PLOS Genetics)このことから、レット症候群における側弯症が MeCP2 によるクロマチンループ構造の破綻に起因することが示唆され、その発症機序の解明は、レット症候群の側弯症の治療法の確立に結びつくと考えられた。そこで、我々は本研究において LBX1 が真の MeCP2 のターゲット遺伝子の一つであるかどうか検討することとした。

① ChIP-qPCR 解析による LBX1 遺伝子プロモーター領域への MeCP2 の結合性の検討：
ヒトグリア芽腫 A172 細胞を用いて、MeCP2 の ChIP 解析を行ったところ、LBX1 遺伝子のプロモーター領域特異的に MeCP2 が非常に多くエンリッチすることが明らかとなった。また、LBX1 遺伝子のプロモーター領域は、高度にメチル化を受け、メチル化された CpG サイト近傍には、リピート配列が存在することから、MeCP2 の ChIP-qPCR 解析の結果と一致した。

② CRISPR/Cas9 遺伝子改変技術を用いた MeCP2 欠失 A172 細胞の樹立：ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 システムを用い、MeCP2 欠失 A172 細胞を樹立した。その上で、リアルタイム PCR 法により、LBX1 遺伝子の発現解析を行った結果、LBX1 遺伝子の著しい発現低下が認められた。LBX1 は神経発生において GABA 作動性ニューロンへの分化調節に極めて重要な働きをすることが知られている。さらに、GABA 作動

性ニューロンの機能障害が Rett 症候群発症の原因である可能性が報告されていることから、LBX1 は GABA 関連遺伝子の発現制御に関与している可能性が示唆された。

- ③ PCR Array を用いた MeCP2-LBX1 遺伝子パスウェイにより制御される分子の同定:
Human GABA & Glutamate RT2 Profiler PCR Array (QIAGEN) を用いて MeCP2 欠失細胞で発現に変化の認められる遺伝子をスクリーニングした結果、2倍以上発現が変化した遺伝子を9個同定した。そして、9個の遺伝子のうち、どの遺伝子が MeCP2-LBX1 遺伝子パスウェイにより制御されているか明らかにするため、MeCP2 欠失細胞に LBX1 をレスキューする実験を行なった。その結果、2つの遺伝子が LBX1 の発現を戻すことでレスキューされることが明らかとなった。現在、これらの遺伝子機能とレット症候群の関連を詳細に検討し、将来の創薬に繋がる可能性を検討している。

本研究成果は論文投稿準備中であり、謝辞に「NPO 法人レット症候群支援機構」に支援を受けた旨を記載する予定。

様式1

助成金収支報告書

平成 29年 5月26日

NPO 法人レット症候群支援機構

代表理事 谷岡 哲次 殿

氏名 目黒 牧子



1. 研究課題名 レット症候群における側弯症の発症機序の解明 と LBX1 を介した治療法の開発

2. 助成金交付額 1,000,000円

3. 費目別使用実績

(単位 円)

項目	金額	備考
物品費	862,980	PCR 酵素, PCR array 試薬, プラスチック消耗品, MeCP2 抗体など
その他	88,080	DNA シークエンス解析
旅費	48,940	学会参加費, 旅費
合計	1,000,000	

4. 平成29年3月31日時点で残高のある場合は今後の予定をご記入下さい。

項目	金額	備考