

論文の内容の要旨

氏名：岩 佐 聡 子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬が幼若期の *Mecp2* 欠損マウスの呼吸中枢機能に及ぼす影響

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、呼吸異常を含む様々な症状を伴う遺伝性疾患であり、メチル化 CpG 結合タンパク 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の異常により発症することが知られている。*Mecp2* を欠失させたモデルマウスではレット症候群の患者と類似した症状がみられ、いくつかの薬物が症状を改善させる効果を有することが報告されている。しかしながらヒトにおいてレット症候群の病態を改善させる安全で効果的な治療法は今のところない。てんかん発作ならびにてんかん発作に伴う性格行動障害への治療薬として使用されているバルプロ酸ナトリウム (VPA) は、多くの遺伝子の発現を抑制するとされるヒストン脱アセチル化酵素に対して阻害薬として働くことが分かっており、約 60%にてんかん発作がみられるレット症候群の患者に対しても治療薬として高い頻度で使われている。VPA の薬理作用として、中枢神経細胞の過剰な興奮を抑制し症状を改善することが報告されているが、最近では VPA がヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬として様々な遺伝子の発現に影響することが明らかになっており、グルタミン酸脱炭酸酵素 1 (GAD1) や Reelin などがそのターゲットとして挙げられている。しかし、現在のところ VPA が *Mecp2* を欠損したマウスにどのような効果を発揮するのかについては明らかにされていない。今回の研究では、*Mecp2* を欠損した 2 週齢の幼若期マウスに対する VPA の効果を、呼吸異常の改善の有無によって確認するとともに、呼吸中枢におけるヒストンのリジン残基でのアセチル化への影響についても検討した。

実験動物として *Mecp2* ヘテロ欠損雌マウス (B6; 129P2 (C) - *Mecp2*^{tm1.1Bird/J}) ならびに C57BL/6J 野生型雄マウスを購入後、交配を行い *Mecp2* 欠損雄仔 (hemi) マウスを得た。また C57BL/6J 野生型雌マウスから生まれた野生型雄仔 (wild) マウスを使用した。Wild ならびに hemi マウスにヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬である VPA (sodium 2-propylpentanoate, 2 mmol/kg) を生理食塩水 (saline) に溶解し、生後 8 日から 14 日まで、体重当たりの溶液量 1.0 μ l/g で毎日 18:00 に腹腔内投与した (VPA 群)。コントロールのマウスには VPA 溶液と同量の saline を腹腔内投与した (saline 群)。

VPAあるいはsalineを投与したwildならびにhemiマウスを生後15日に一匹ずつ全身型プレチスモグラフィ (Biosystem XA, Buxco Electronics) のチャンバーに入れ、空気流量センサーにより呼吸波形を検出した。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。呼吸間隔が1秒以上の場合を無呼吸として、無呼吸の回数をカウントした。その結果、wildマウスはVPA群、saline群ともに安定した呼吸リズムを示し、無呼吸は比較的まれであったのに対し、saline群のhemiマウスでは高い頻度で無呼吸が出現していた。Saline群のhemiマウスはwildマウスよりも有意に無呼吸回数が多く ($P < 0.001$)、その平均はsaline群のwildマウスで13回/時間、hemiマウスで148回/時間であった。VPAの投与により、hemiマウスでは無呼吸回数が有意に減少した (55回/時間) が、wildマウスではVPA投与後も無呼吸回数に変化はみられなかった。

延髄腹側呼吸中枢 (VRG) でのヒストンアセチル化レベルを測定するために蛍光免疫組織染色を行った。VPA あるいは saline を 7 日間投与した wild ならびに hemi マウスを 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定したのち脳を摘出し、15%および 30%スクロース液にてスクロース置換を行ったのち -80°C で保存した。VPA あるいは saline を投与した wild ならびに hemi マウスの脳試料 4 種を同日に 25 μ m の厚さで薄切し 0.01M phosphate buffered saline (PBS) に回収した。浮遊標本を PBS で洗浄後、0.2% Triton X, 10% ヤギ血清を含むブロッキング溶液にてブロッキングを行った。その後、アセチル化されたヒストンに対するウサギ抗 H3K9, H3K14, H4K5, H4K8 抗体 (Epigentek) とマウス抗

NeuN 抗体 (Millipore) を含む反応液中で、4°Cで一晩インキュベートした。その後 PBS で洗浄し、蛍光標識ヤギ二次抗体 (抗マウス Alexa Fluor 546, 抗ウサギ Alexa Fluor 488, Abcam) を含む反応液中で、室温、遮光下で 1 時間インキュベートした。その後 PBS で洗浄し、スライドガラスに張り付け、DAPI を含む封入材にて封入した。落射蛍光顕微鏡で VRG を観察し、高感度 CCD カメラで画像撮影を行った。そのうち、画像解析ソフトウェア (ImagePro 7.0) を用いて NeuN 陽性細胞を選別し DAPI を基準に各細胞でのアセチル化ヒストンの輝度の比を算出した。その結果、H3K14 と H4K8 では VPA 投与を行った場合でも wild, hemi マウスともに蛍光強度に変化はみられなかったが、H3K9 と H4K5 では wild ならびに hemi マウスともにアセチル化レベルが上昇し、wild マウスでは H3K9 で $P=0.011$, H4K5 で $P=0.034$ といずれも有意な上昇を示した。さらに hemi マウスでは H3K9, H4K5 ともに VPA 群で著明なアセチル化レベルの上昇を認めた ($P<0.001$)。

本研究でみとめられた VPA 投与後の hemi マウスの無呼吸回数の減少は、VPA が VRG を含む脳内の GABA 作動性ニューロンでの GABA 合成あるいは放出量を増加させたことにより、呼吸中枢でのシナプス伝達のバランスが改善されたことが影響していると考えられる。VPA がどのようなメカニズムで脳内の GABA 量を増加させるのかについては不明な点も多いが、最近では、VPA が酪酸などと同様にヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬として働くことが明らかにされており、そのターゲット遺伝子として *Gad1* や *Reelin* などが挙げられている。本研究において、VPA を投与したマウスの呼吸中枢ニューロンでヒストンのリジン残基 H3K9 と H4K5 にアセチル化レベルの上昇を認めた。この結果は、腹腔内に投与された VPA が血液脳関門を通過し、延髄呼吸中枢のニューロンに作用して H3K9 ならびに H4K5 のアセチル化を介して核内クロマチン構造を変化させることで *Gad1* などの遺伝子の転写を活性化させたことを示唆する。すなわち、VPA 投与によって HDAC 活性が抑制されたことで HAT を介したアセチル化反応によりヒストンアセチル化が促進され、それにより呼吸中枢ニューロンでの *Gad1* などの遺伝子発現が増加したことが hemi マウスの無呼吸回数の減少に結びついたと考えられる。

現在のところ、レット症候群の病態を改善する治療薬はなく、それぞれの患者の症状に合わせて抗てんかん薬あるいは自律神経機能を改善する働きのある薬物による対症療法が行われている。VPA は抗てんかん薬としてレット症候群患者に限らず小児・成人ともに臨床で広く用いられている薬であるが、VPA の中枢作用の詳細なメカニズムについては諸説あるもの見解が必ずしも一致していない。しかし本研究で VPA が HDAC 阻害作用を通じてヒストンテール上の特定のリジン残基のアセチル化を上昇させることで呼吸を安定化させることが示されたことから、今後この機序をより詳細に検討することで、レット症候群患者の症状をより効果的に改善する薬物を見いだすことが可能になると考えられる。