

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

岩 佐 聰 子

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻
(指導: 白川哲夫 教授)

要旨: レット症候群は MeCP2 をコードする遺伝子 *MECP2* の異常が原因で発症する。レット症候群児は生後 12 ~ 18 カ月以降に退行、呼吸異常、てんかん発作、自閉症状、手の常用運動などを呈するが、これらがどのような機序で発現するかについては明らかでない。今回、*Mecp2* を欠損した雄仔(hemi)マウスについて、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬であるバルプロ酸ナトリウム(VPA)を幼若期に投与し、呼吸機能ならびに呼吸中枢でのヒストンアセチル化レベルへの影響を検討した。Hemi マウスおよび野生型雄仔(wild)マウスに VPA を腹腔内投与した後、無呼吸回数をカウントした。また延髄呼吸中枢の神経細胞について、リジン残基(H3K9, H3K14, H4K5, H4K8)でのヒストンアセチル化について検討した。その結果、VPA の投与により hemi マウスの無呼吸回数は減少した。また呼吸中枢でのヒストンアセチル化レベルは、H3K14 と H4K8 では VPA 投与後も影響を受けなかったが、H3K9 と H4K5 で wild マウス、hemi マウスともにアセチル化レベルが上昇した。

以上の結果より、hemi マウスの生後発達の早期における VPA の投与が無呼吸の改善に効果があることが示され、その効果は VPA による延髄呼吸中枢ニューロンにおける H3K9 と H4K5 でのアセチル化レベルの上昇と関連していることが示された。

キーワード: レット症候群、MeCP2、無呼吸、バルプロ酸ナトリウム、ヒストンアセチル化

緒 言

レット症候群は約 1 万人に 1 人の確率で主に女児に発症する、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¹⁻³⁾。*MECP2* の異常は自閉症など他の発達障害でもみられることがあり、*MECP2* がヒトの精神機能の発達にも何らかの役割を果たしていることが示されている⁴⁾。これまでに *MECP2* と高い相同性を示す *Mecp2* を欠失させたモデルマウスが作られ、レット症候群の患者と類似した症状がみられることが報告されている^{5,6)}。モデルマウスを用いた研究で、*Mecp2* の欠損が MeCP2 によって転写の制御を受ける遺伝子の発現を変化させ、神経発達障害を引き起こすことが報告されており⁷⁾、またモデルマウスに正常量の MeCP2 を発現させると神経症状が改善したとの研究報告もある⁸⁾。しかし、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。

バルプロ酸ナトリウム(VPA)は臨床において、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^{9,10)}。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いるが¹¹⁾、レット症候群のモデルマウスで VPA の効果を調べた研究に関しては、既に症状が顕著に現れている 6 ~ 8 週齢マウスについて行われた一報のみで¹²⁾、発達期のマウスで VPA の効果を調べた研究はまだない。臨床においては、レット症候群の患者の約 60% にてんかん発作がみられるといわれており¹³⁻¹⁵⁾、それらの患者に対するてんかん発作の治療薬として VPA が高い頻度で使われている⁹⁾。さらに発達遅滞に随伴して間歇性過剰呼吸と無呼吸を呈する Pitt-Hopkins 症候群の患者に対しては、VPA が呼吸異常の改善に効果的であったとする報告もある¹⁶⁾。

VPA の薬理作用として、脳内の GABA 量を増加させることで神経細胞の過剰な興奮を抑制し神経症状を改善すると報告されている¹⁷⁾が、その機序については不明な点も多い。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¹⁸⁾。しかしながら、現在のところ VPA が *Mecp2* を欠損した発達期のマウスにどのような効果を發揮するのかについては明らかにされていない。

本研究では、*Mecp2* を欠損した 2 週齢のマウスに対する VPA の効果を、無呼吸回数を指標とする呼吸異常の

(受付: 平成 28 年 1 月 20 日)

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

改善の有無によって確認するとともに、ヒストンH3およびH4のリジン残基のアセチル化への影響についても検討した。

材料および方法

1. 実験動物

Mecp2 ヘテロ欠損雌マウス(B6;129P2(C)-*Mecp2*^{tm1.1Bird}/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)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 野生型雌マウスと同様に交配して野生型雄仔(wild)マウスを得た。飼育環境は、明期 7:00 ~ 19:00、暗期 19:00 ~ 7:00、室温 24±1°C、湿度 50±5%とした。出産後、飼育ケージ内で母親に授乳させ、生後 21 日で母仔を分離した。出生した仔の遺伝子型の判定は Jackson Laboratory プロトコールに従い生後 7 日に PCR 法にて行った。PCR プライマーは、forward, 5'-ggtaaagacccatgtgaccc-3'; reverse, 5'-tccaccttagcctgcctgtac-3'を使用した。食餌にはマウス・ラット・ハムスター用飼料 MF(オリエンタル酵母)を用い、水と餌を自由に与えた。なお、本研究は日本大学遺伝子組換え実験安全委員会及び日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得て実施し、実験動物の取扱いは同委員会の指針に従って行った(承認番号、2014 歯 001, AP13D026-1)

2. VPA の腹腔内投与

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, Sigma) と L-カルニチン(0.2 mmol/kg, Wako) を生理食塩水(saline)に溶解し、生後 8 日から 14 日まで毎日 18:00 に wild ならびに hemi マウスに腹腔内投与した(VPA 群)。マウスの体重当たりの溶液量は 1.0 µl/g とした。またコントロールのマウスには同量の saline を腹腔内投与した(saline 群)。なお L-カルニチンは VPA 投与によって引き起こされることが知られているカルニチン欠乏による高アンモニア血症を予防する目的で用いた。

3. 無呼吸回数の測定

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マグラフ(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 の 1 時間、呼吸波形を連続的に記録した。呼気の開始点(下向き波形がゼロレベルを横切った点)から次の呼気開始点までの時間を呼吸間隔とし、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。

4. 延髓腹側呼吸中枢(VRG)でのヒストンアセチル化レベルの測定

VPA あるいは saline を 7 日間投与した wild ならびに hemi マウスに sodium pentobarbital(50 mg/kg, i.p.)で全身麻酔を施し、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。そののち脳を摘出し、15%および 30%スクロース液にてスクロース置換を行い -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 種について、クリオスタット(Leica, CM1850)にて 25 µm の厚さで前頭断連続切片を作製し 0.01 M 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入れ、室温で 60 分間、浮遊法でインキュベートしブロッキングを行った。その後、アセチル化されたリジ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 にて一晩インキュベートした。用いた抗体と希釈率は第 1 表に示した。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(Fluoroshield with DAPI, ImmunoBioScience)とカバーガラスにて封入した。

マウスの脳アトラス¹⁹⁾に基づき、延髓腹側呼吸中枢

第 1 表 蛍光免疫組織染色に使用した抗体リスト

抗原	免疫種	メーカー	製品番号	希釈率
アセチル化H3K9	rabbit-poly	Epigentek	A-4022	1 : 1000
アセチル化H3K14	rabbit-poly	Epigentek	A-4023	1 : 1000
アセチル化H4K5	rabbit-poly	Epigentek	A-4027	1 : 1000
アセチル化H4K8	rabbit-poly	Epigentek	A-4028	1 : 1000
NeuN	mouse-mono	Millipore	MAB377	1 : 1000
Alexa Fluor488	rabbit IgG	Abcam	ab150081	1 : 200
Alexa Fluor546	mouse IgG	Abcam	ab60316	1 : 200

(VRG)を落射蛍光顕微鏡(Eclipse 80i, Nikon)で観察し、第1図に示すVRG内の縦(背腹方向)420 μm、横(左右方向)520 μmの範囲を高感度CCDカメラで画像撮影した。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、それらについてDAPIの輝度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。

5. 統計処理方法

データは平均値と標準誤差で示した。ANOVAにて有意差の検定を行った後、Bonferroni法により群間比較を行った。 P 値が0.05未満の時に有意差ありとした。

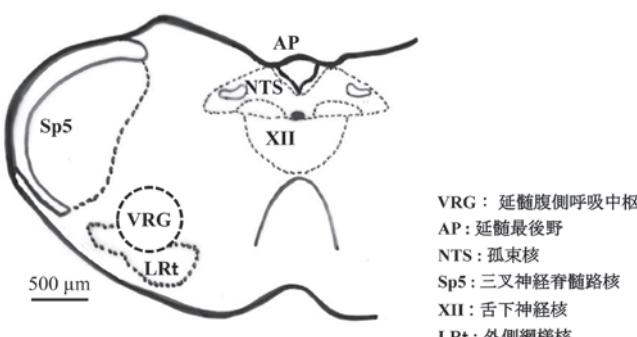
結 果

1. 2週齢のwildならびにhemiマウスの無呼吸回数へのVPAの影響

Wildマウスとhemiマウスの呼吸波形を第2図に示した。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(第3図)。

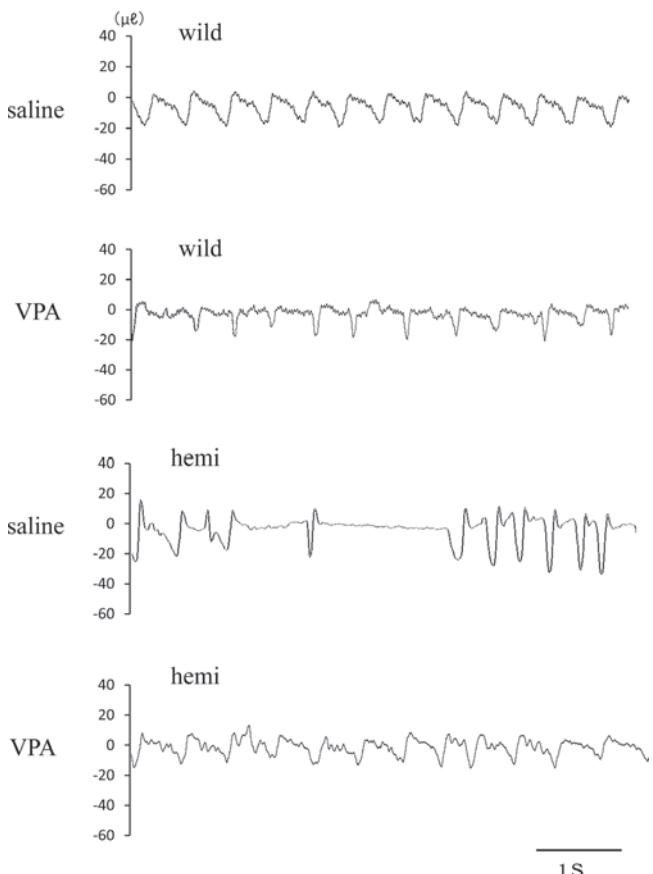
2. VRGニューロンのヒストンアセチル化に対するVPAの影響

VRGニューロンにおけるヒストンアセチル化について、蛍光免疫組織染色により個々の細胞レベルで検討した。測定対象にしたアセチル化リジン残基のヌクレオソーム上の位置、およびリジン残基のアセチル化と脱アセチル化の模式図を第4図に示した。アセチル化されたリジン残基の量的な違いを顕微鏡画像上で蛍光強度の変化として比較する際には、染色操作、プレパラート作製および観察時の条件を可能な限り一定にする必要があ

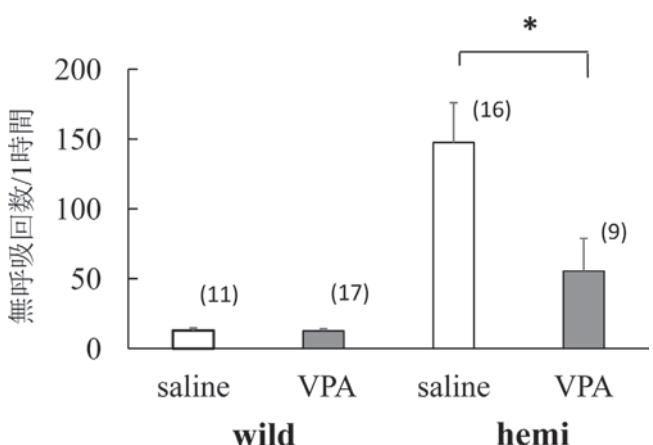


第1図 延髄腹側呼吸中枢(VRG)の解剖学的位置

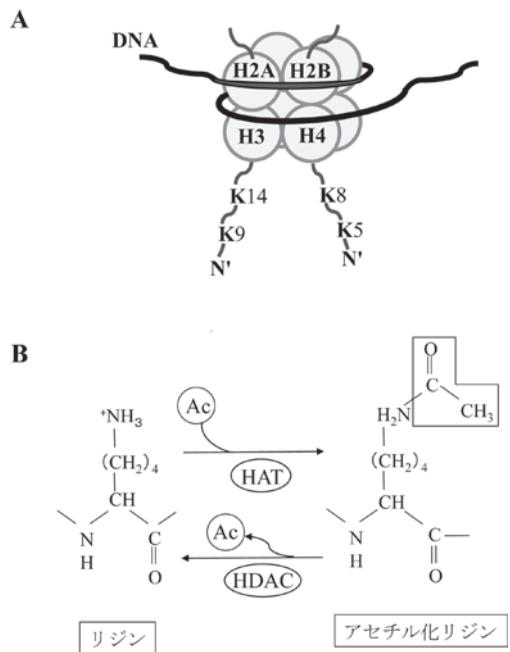
る。そこで比較するマウスの脳組織切片の作製と染色はそれぞれ同日に同一条件で行い、スライドガラスへの切片の貼り付けと封入、ならびに画像撮影もそれぞれ同日に行った。



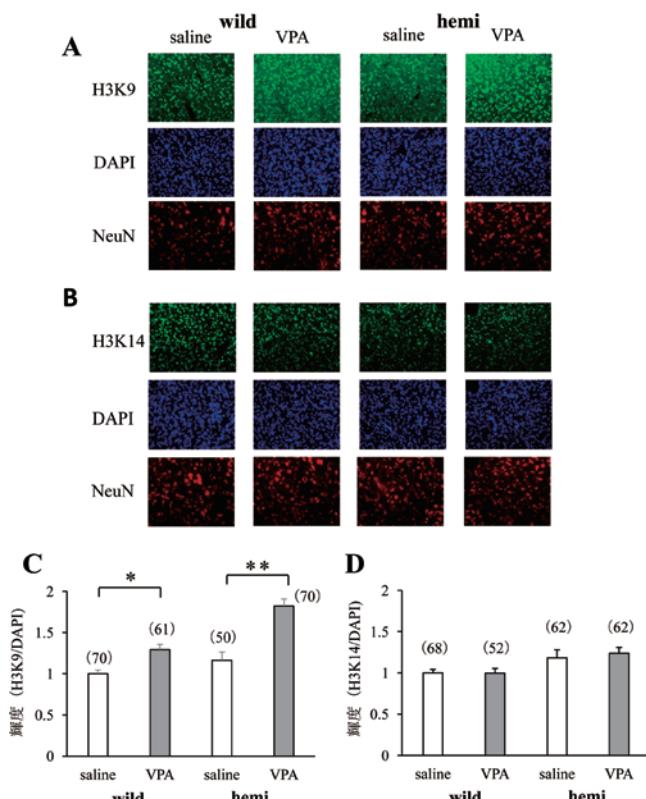
第2図 2週齢のwildならびにhemiマウスの呼吸に及ぼすVPAの影響(代表例)



第3図 VPAあるいはsalineを投与した2週齢のwildならびにhemiマウスの1時間の無呼吸回数(mean ± SEM)
()内は各群の匹数、 $*P < 0.05$



第4図 A：ヌクレオソームの模式図
B：リジン残基のアセチル化と脱アセチル化
HAT：ヒストンアセチル基転移酵素
HDAC：ヒストン脱アセチル化酵素
Ac：アセチル基

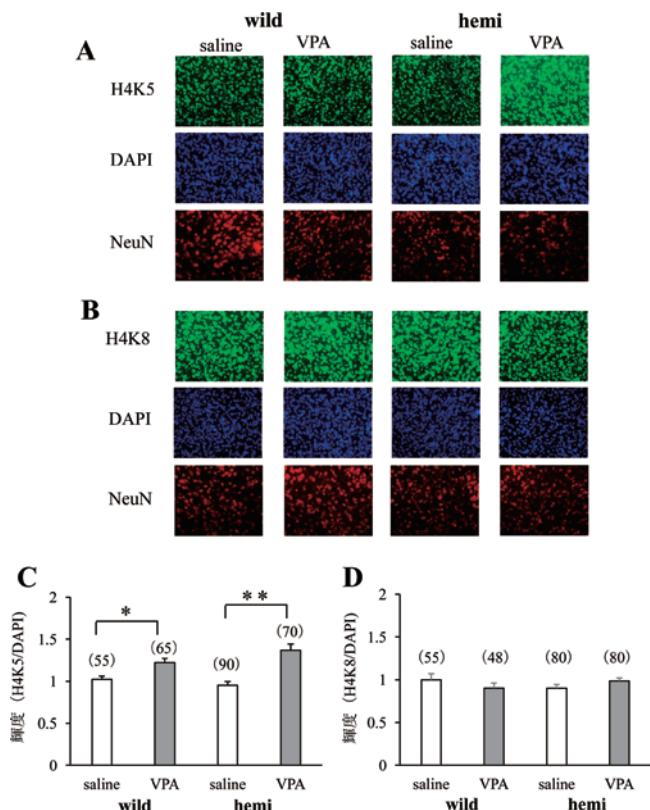


第5図 A, B : アセチル化 H3 K9, H3 K14 の蛍光免疫組織染色
 (代表例)
 C, D : H3 K9, H3 K14 のアセチル化レベル
 ()内は細胞数 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

画像解析の結果、H3K14 と H4K8 では VPA 投与を行った場合でも wild マウス、hemi マウスとともに蛍光強度に変化はみられなかった(第 5 図 B, D および第 6 図 B, D)が、H3K9 と H4K5 では wild マウス、hemi マウスと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 VPA 群で有意な上昇を示した(第 5 図 A, C および第 6 図 A, C)。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($P < 0.001$)。

考 察

レット症候群の主症状の一つである呼吸異常は、呼吸リズムを形成している VRG を含む延髄の呼吸中枢、ならびに橋に位置し呼吸機能を調節している Kölliker-Fuse 核などの中核の異常が原因と考えられている²⁰⁾。心臓と横隔膜を保存した状態で作製された脳幹灌流標本を用いた実験で、Stettner ら²¹⁾は hemi マウスにみられる無呼吸が、吸気活動後の Kölliker-Fuse 核の神経興奮に伴って発生していることを報告し、hemi マウスでの著明な無呼吸が吸気後のシナプス伝達とそれに関連する神経ネットワークの異常に起因するとの仮説を提唱している。また Medrihan²²⁾らは 7 日齢の hemi マウスの VRG



第6図 A, B : アセチル化 H4K5, H4K8 の蛍光免疫組織染色
 (代表例)
 C, D : H4K5, H4K8 のアセチル化レベル
 ()内は細胞数 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

において、すでに興奮性シナプスと抑制性シナプスの活動バランスが障害されていることを報告しており、このシナプス伝達のバランスの乱れがシナプス前 GABA 放出量の減少に起因すると結論づけている。

MeCP2 の欠損が延髄の呼吸中枢にどのような病的変化を生じさせているかについて、hemi マウスの VRG を対象に、GABA の合成酵素である GAD1 の遺伝子発現変化と無呼吸との関連を検討した研究がある²³⁾。GABA は抑制性神経伝達物質として呼吸リズムの調節に深く関与しており²⁴⁾、*Gad1* mRNA の発現量は 2 週齢の hemi マウスで有意に低下していることが報告されている²³⁾。Hemi マウスの無呼吸回数の増加が VRG の *Gad1* mRNA の発現量の低下に起因する GABA 産生の低下によるものだとすると、本研究で認めた 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²⁵⁾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いくつかの報告があるが不明な点も多い¹⁷⁾。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¹⁸⁾。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 のアセチル化を促進し、核内クロマチン構造を変化させたことで *Gad1* などの遺伝子の転写を活性化させたことを示唆する。

ヒストンでのリジンのアセチル化反応は、アセチル基をアセチル CoA からリジン残基に転移する反応であり、ヒストンアセチル基転移酵素(HAT)によってヒストンの N 末端テール領域のリジンで起こることが明らかになっている。ヒストンテール上のリジンがアセチル化されると、リジン残基の正の電荷が弱るためにヒストン-DNA 間の相互作用が減弱し、ヘテロクロマチン構造が緩むことで DNA 結合性転写因子が DNA 上に結合しやすくなり遺伝子発現が活性化される²⁶⁾。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。なお本研究では H3K14, H4K8 については wild マウス、hemi マウスいずれにおいても VPA 群、saline 群でアセチル化レベル

に違いがみられなかった。このことは、必ずしも H3K14, H4K8 においてアセチル化反応が起きにくいことを意味しない。それぞれのアセチル化ヒストン抗体を用いた本研究での免疫蛍光染色の結果から、H3K14, H4K8 についても免疫陽性細胞が多数認められており、哺乳動物細胞のリジン残基でのヒストンアセチル化の順序から推測すると²⁷⁾、H3K14, H4K8 では saline 群において既に高いレベルでアセチル化されていると考えられる。

遺伝子発現を制御しているエピジェネティックなメカニズムには、ヒストンのアセチル化あるいはメチル化による転写調節のほかに DNA のメチル化修飾が知られている³⁾。MeCP2 はメチル化した DNA に結合して下流に位置する DNA の転写を主に抑制することが知られているが、MeCP2 のほかに methyl CpG binding domain protein 1 などの DNA 結合タンパクが DNA 上のメチル化した CpG に結合して転写制御複合体を形成し、遺伝子発現を制御していることが分かっている²⁸⁾。*Gad1* のプロモーター領域の CpG メチル化に関して、バイサルファイトシークエンス法を用いた研究により、hemi マウスでは wild マウスに比べ多くの CpG がメチル化されていることが報告されている²³⁾。このことは、hemi マウスの無呼吸回数の増加に *Gad1* プロモーター領域のメチル化レベルの上昇が関与していることを示唆している。今回の結果と合わせると、HDAC の阻害薬である VPA の働きによって *Gad1* プロモーター近傍のクロマチン構造が変化し、それにより CpG が脱メチル化される方向に反応が進んだ、あるいは *Gad1* プロモーター領域のメチル化 CpG での転写抑制複合体の形成が阻害されて転写が亢進したことが無呼吸の改善につながった可能性がある。これらについては *Gad1* の転写活性調節に関わる分子メカニズムのさらなる研究が必要であり、*Gad1* プロモーターでの DNA 脱メチル化とヒストンアセチル化の相互作用についても検討する必要がある。

現在のところレット症候群の病態そのもの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や自律神経機能を改善する働きのある薬物などによる対症療法が行われている²⁹⁾。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。現在のところ VPA の中枢作用の詳細なメカニズムについてはいくつかの説があり見解が必ずしも一致していない¹⁰⁾。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レベルを上昇させることで呼吸を安定化させることができたことから、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。

結 論

Hemi マウスの呼吸異常に対する VPA の効果を無呼吸の改善の有無によって確認するとともに、ヒストンのリジン残基でのアセチル化への VPA の影響について検討する目的で、VPA を 7 日間投与した 15 日齢の hemi マウスの無呼吸回数、VRG ニューロンにおけるヒストニアセチル化レベルを wild マウスと比較検討し、以下の知見を得た。

1. Saline 群の hemi マウスでは wild マウスと比較し無呼吸回数が有意に多かったが、VPA 群の hemi マウスではその回数が有意に減少した。
2. VRG ニューロンにおけるヒストニアセチル化レベルは、H3K9 と H4K5 について VPA 群の hemi および wild マウスで有意に上昇し、hemi マウスではより著明な上昇を示した。

以上の結果より、hemi マウスの生後発達の早期における VPA の投与が無呼吸を改善することが示され、その効果は VPA による延髄呼吸中枢ニューロンにおける H3K9 と H4K5 でのアセチル化レベルの上昇と関連していることが示された。

本研究遂行にあたり、格別なる御指導御鞭撻を賜りました、日本大学歯学部小児歯科学講座の白川哲夫教授ならびに同病理学講座の浅野正岳教授に謹んで感謝申し上げます。また、本研究にご協力いただきました小児歯科学講座ならびに病理学講座の皆様に感謝いたします。

本研究は、日本大学大学院歯学研究科研究費(学生研究費)により実施しました。

文 献

- 1) Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999) Rett syndrome is caused by mutation in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein2. *Nat Genet* 23, 185-188.
- 2) Amir RE, Zoghbi HY (2000) Rett Syndrome: Methyl-CpG-Binding Protein 2 Mutations and Phenotype-Genotype Correlations. *Am J Med Genet* 97, 147-152.
- 3) Kriaucionis S, Bird A (2003) DNA methylation and Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 12, 221-227.
- 4) Neul JL (2012) The relationship of Rett syndrome and MECP2 disorders to autism. *Dialogues Clin Neurosci* 14, 253-262.
- 5) Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001) A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-326.
- 6) Shahbazian MD, Young JI, Yuva-Paylor LA, Spencer CM, Antalffy BA, Noebels JL, Armstrong DL, Paylor R, Zoghbi HY (2002) Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histonH3. *Neuron* 35, 243-254.
- 7) Smrt RD, Eaves-Egenes J, Barkho BZ, Santistevan NJ, Zhao C, Aimone JB, Garge FH, Zhao X (2007) *Mecp2* deficiency leads to delayed maturation and altered gene expression in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis* 27, 77-89.
- 8) Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb Stuart, Bird A (2007) Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143-1147.
- 9) Faulkner MA, Singh SP (2013) Neurogenetic disorders and treatment of associated seizures. *Pharmacotherapy* 33, 330-343.
- 10) Chiu CT, Wang Z, Hunsberger JG, Chuang DM (2013) Therapeutic potential of mood stabilizers lithium and valproic acid beyond bipolar disorder. *Pharmacol Rev* 65, 105-142.
- 11) Grozinger GM, Schreiber SL (2002) Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chern Biol* 9, 3-16.
- 12) Guo W, Tsujimura K, Otsuka IM, Irie K, Igarashi K, Nakashima K, Zhao X (2014) VPA alleviates neurological deficits and restores gene expression in a mouse model of Rett syndrome. *PLoS ONE* 9, e100215.
- 13) Huppke P, Köhler K, Brockmann K, Stettner GM, Gärtner J (2007) Treatment of epilepsy in Rett syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 11, 10-16.
- 14) Glanze DG, Percy AK, Skinner S, Motil KJ, Neul JL, Barrish JO, Lane JB, Geerts SP, Annese F, Graham J, McNair L, Lee HS (2010) Epilepsy and the natural history of Rett syndrome. *Neurology* 74, 909-912.
- 15) Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Matrisiano F, Pinna G, Satta R, Sharma RP, Tremolizzo L, Tueting P (2011) Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 60, 1007-1016.
- 16) Maini I, Cantalupo G, Turco EC, Paolis FD, Magnanni C, Parrio L, Terzano MG, Pisani F (2012) Clinical and polygraphic improvement of breathing abnormalities after Valproate in a case of Pitt-Hopkins syndrome. *J Child Neurol* 27, 1585-1588.
- 17) Guidotti A, Auta J, Chen Y, Davis JM, Dong E, Gavin DP, Grayson DR, Matrisiano F, Pinna G, Satta R, Sharma RP, Tremolizzo L, Tueting P (2011) Epigenetic GABAergic targets in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropharmacology* 60, 1007-1016.
- 18) Dong E, Guidotti A, Grayson DR, Costa E (2007) Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutaminic acid decarboxylase promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4676-4681.
- 19) Franklin BJ, Paxinos G (2008) The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed, Elsevier's Science & Technology, London, 88.
- 20) Katz DM, Dutschmann M, Ramirez JM, Hilaire G (2009) Breathing disorders in Rett syndrome: Progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respir Physiol Neurobiol* 168, 101-108.
- 21) Stettner GM, Huppke P, Brendel C, Richter DW, Gärtner J, Dutschmann M (2007) Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in *Mecp2*-/- knockout mice. *J Physiol* 579, 863-

- 876.
- 22) Medrihan L, Tantalaki E, Aramuni G, Sargsyan V, Dudanova I, Missler M, Zhang W (2008) Early defects of GABAergic synapses in the brain stem of a MeCP2 mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 99, 112-121.
 - 23) 西山未紗(2014)レット症候群モデルマウスにおける無呼吸に対する延髄GABA神経系の関与. *日大歯学* 88, 21-27.
 - 24) Kuwana S, Okada Y, Sugawara Y, Tsunekawa N, Obata K (2003) Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience* 120, 861-870.
 - 25) Miyazaki C, Matsuyama K, Ichikawa M, Goto S (1988) Effect of sodium valproate (VPA) on cerebral acids: mechanism of γ -aminobutyric acid (GABA) elevation and possible causal relation of VPA-induced encephalopathy and glutamine level. *Chem Pharm Bull*. 36, 3589-3594.
 - 26) 堀越正美(2000)ヒストンアセチル化酵素およびヒストン脱アセチル化酵素を介したクロマチン機能活性制御機構. 転写因子の機能 蛋白質核酸酵素 45, 38-56.
 - 27) Turner BM (2001) Chromatin and gene regulation. Blackwell Science, Oxford: 堀越正美訳(2005)クロマチンエピジェネティクスの分子機構. シュプリンガー・フェアラーク, 東京, 61-63.
 - 28) Baubec T, Ivánek R, Lienert F, Schübeler D (2013) Methylation-dependent and -independent genomic targeting principles of the MBD protein family. *Cell* 153, 480-492.
 - 29) 青天目 信, 伊藤雅之(2015)レット症候群診療ガイドブック. 初版, 大阪大学出版社, 大阪, 51-227.

