

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) クロマチンリモデリング因子 ATRX タンパクの異常により発症する X連鎖 $\alpha$ サラセミア/精神遅滞症候群のアミノレブリン酸による治療法の開発  
(英語) Developing the treatment for patients with X-linked  $\alpha$ -thalassemia/ mental retardation (ATR-X) syndrome using 5-aminolevulinic acid.

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院 医学研究科・准教授・和田敬仁

所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University Graduate School of Medicine, Associate Professor, Takahito WADA

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

分担研究  
開発課題名： (日本語) ATR-X 症候群に対するアミノレブリン酸による治療法の開発  
(英語) Developing the treatment for patients with X-linked  $\alpha$ -thalassemia/ mental retardation (ATR-X) syndrome using 5-aminolevulinic acid.

研究開発分担者 (日本語) 岐阜薬科大学・准教授・塩田倫史

所属 役職 氏名： (英語) Gifu Pharmaceutical University, Associate Professor, Norifumi SHIODA

分担研究 (日本語) 発達障がいにおけるエピジェネティクスと CaMKII との  
関連性

開発課題名: (英語) Role of CaMKII in epigenetic regulation in  
neurodevelopmental disorders

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 大学院薬学研究科・  
教授・福永 浩司

所属 役職 氏名: (英語) Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical  
Science, Professor Kohji FUKUNAGA

分担研究 (日本語) G-quadruplex 構造に関連する遺伝子発現のゲノムレベルでの解析

開発課題名: (英語) Genome analysis of gene expression relating with G-  
quadruplex structures

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院理学研究科・教授・杉山 弘

所属 役職 氏名: (英語) Kyoto university, professor, Hiroshi SUGIYAMA

分担研究 (日本語) ATR-X 症候群における染色体・クロマチン・遺伝子領域の空間  
配置に関する研究

開発課題名: (英語) Study of chromosome territory, chromatine structure and  
gene expression in ATR-X syndrome

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人総合研究大学院大学 先端科学研究科・  
准教授・田辺秀之

所属 役職 氏名: (英語) The Graduate University for Advanced Science,  
Associate professor, Hideyuki TANABE

分担研究 (日本語) X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群 (ATR-X 症候群) の自  
然歴の検討

開発課題名: (英語) Study of Clinical history for patients of ATR-X syndrome

研究開発分担者 (日本語) 大阪母子医療センター・主任部長 岡本伸彦

所属 役職 氏名 (英語) Osaka Women's and Children's Hospital, Director of  
Research Institute, Nobuhiko OKAMOTO

分担研究 (日本語) X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群 (ATR-X 症候群) の遺  
伝子診断と治療法開発のための評価法の検討

開発課題名: (英語) Clinical evaluation and molecular diagnosis for X-linked  
alpha-thalassemia/mental retardation syndrome

研究開発分担者 (日本語) 神奈川県立こども医療センター・部長・黒澤健司  
所属 役職 氏名 : (英語) Kanagawa Children's Medical Center, Director, Kenji  
KUROSAWA

分担研究 (日本語) X連鎖 $\alpha$ サラセミア・精神遅滞症候群 (ATR-X 症候群) の分  
子遺伝学的診断の検討

開発課題名 : (英語) Study of molecular genetic diagnosis for patients of ATR-X  
syndrome

研究開発分担者 (日本語) 神奈川県立こども医療センター臨床研究所・  
臨床研究員・新保裕子

所属 役職 氏名 : (英語) Kanagawa Children's Medical Center, Clinical Research Institute,  
Clinical Researcher, Hiroko SHIMBO

## II. 成果の概要（総括研究報告）

和田（研究代表；京都大学大学院医学研究科・准教授）は、研究全体の総括とともに、ATR-X 症候群のモデルマウス（Atrx マウス）で証明された、ALA（アミノレブリン酸）のプロドラッグとしての G4 結合能を介した遺伝子発現調節という新しい薬理作用を応用し、ATR-X 症候群の患者に投与する臨床試験を進めるために、患者レジストリー制度を整えた。

塩田研究者（岐阜薬科大学・准教授）は、Atrx マウスに対して、ALA をプロドラッグとして用いることにより、体内でポルフィリン化合物に代謝され、G4 に結合し、薬理作用を示し、認知機能を改善させることを明らかにした。ATR-X 患者由来 iPS 細胞から分化させた神経細胞を用いて、ALA によるシナプス関連遺伝子の発現異常の改善を示した。また、Atrx マウスにおいて、その認知機能に関わる遺伝子として、母由来刷り込み遺伝子 *Xlr3b* を同定した。[投稿中]

福永研究者（東北大学大学院薬学研究科・教授）は知的障害や発達障害におけるカルシウムカルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ(CaMKII)の発現調節とエピジェネティクスの関連について解析した。

杉山研究者（京都大学大学院理学研究科・教授）は、次世代シーケンサーとマイクロアレイを用いて、G4 構造形成と ATR-X 症候群との関連性を実験データに基づいて詳しく解析した。ATR-X タンパクの標的遺伝子群を探索し [ChemBioChem. 2016, 17, 928-935]、また、新しい G-quadruplex 構造結合分子を開発した [ChemBioChem. 2016, 17, 1317-1322]。

田辺研究者（総合研究大学院大学・准教授）は、3D-FISH 法を用いて、ATR-X 症候群の発症における細胞核高次構造や染色体配置の関与を解析した。ATR-X 症候群患者由来の細胞および正常ヒト繊維芽細胞（健常者細胞）を用いて、アミノレブリン酸（5-ALA）の投与による影響を解析した。

岡本（大阪府立母子保健総合医療センター・部長）は ATR-X 症候群 7 症例において、詳細な臨床評価を行い、アミノレブリン酸投与時の効果判定基準として、行動異常、発達状況の改善、消化管機能異常の改善、てんかん発作への効果などが指標となることを示した。

黒澤（神奈川県立こども医療センター・部長）は、ATR-X 症候群 6 家系家系 7 症例の分子遺伝学的解析を行い、臨床症状と遺伝学的情報の関連を明らかにした。詳細な家族歴聴取と適切な遺伝カウンセリングの重要性が再確認された。ATR-X 症候群の迅速かつ適切な診断のための遺伝子解析体制を確立した。

新保（神奈川県立こども医療センター・臨床研究員）は ATR-X 症候群が疑われる症例の確定診断として、ATR-X 遺伝子解析を行った。特に、従来はミスセンスと考えられた一塩基置換変異のスプライシングに対する影響を解析した。

ATR-X syndrome is caused by mutations in *ATRX*, which encodes a chromatin-remodeling protein. *ATRX* protein predominantly binds to DNA G-quadruplex (G4), regulating transcription. Recently, the loss of function of *ATRX* to bind G4 can lead to aberrant expression of many genes. We have already found that a G-binding porphyrin compound, PMPyP4, improved the cognitive function of *Atrx* mouse. But chronic use of PMPyP4 has severe toxicity. The purpose of this research group is to develop the treatment for ATR-X syndrome patients with 5-aminolevulinic acid, or 5-ALA, which is a natural amino acid and is metabolized into porphyrin in vivo.

Dr Wada (Kyoto Univ.) is the research group leader, and have integrated the basic and clinical research. For the clinical study in the near future, the registry system of ATR-X patients have been established.

Prof. Shioda (Gifu Pharmaceutical Univ.) is the leading researcher of this group, and found that ALA can improve the abnormal cognitive function of *Atrx* mouse, and normalized the aberrant expression of synapse-related genes by its ability of binding to G4 in the neuron developed from iPS cell of a ATR-X patient. He has also found that an imprinted gene, *Xlr3b*, is the key target gene of *ATRX* protein for cognitive function of ATR-X syndrome.

Prof. Fukunaga (Tohoku Univ.) have analyzed the abnormal expression of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase gene and its effect on epigenetics, which is involved in intellectual disability and developmental abnormality.

Prof. Sugiyama (Kyoto Univ.) has analyzed the relationship between G-quadruplex formation and gene expression, using next generation sequencing system and microarray analysis. He has found several targeting genes regulated by *ATRX* protein [*ChemBioChem*. 2016, 17, 928-935], and developed a new G-quadruplex binding ligand [*ChemBioChem*. 2016, 17, 1317-1322].

Prof. Tanabe (Graduate Univ. Advanced Science) has analyzed the relationship between chromatin territory, gene expression and epigenetic state, and the effect of ALA on them, using 3D-FISH technique for fibroblasts from healthy controls and ATR-X patients.

Dr Okamoto (Osaka Women's and Children's Hosp.) has evaluated seven ATR-X syndrome patients, and suggested that their abnormal behavior, developmental level, digestive tract function, epileptic attack frequency could work as biomarkers for evaluating the effect of ALA for ATR-X patients in the clinical study in the near future.

Dr Kurosawa (Kanagawa Child. Med. Center) has analyzed the relationship between their clinical and genetic information, and established the system of diagnosing ATR-X syndrome patients rapidly and adequately.

Ms Shimbo (Kanagawa Child Med. C) has analyzed many ATR-X patients for their diagnosis, and suggested some apparent missense mutations should be evaluated carefully, as if they should affect their splicing.

During these three years of this research, we have been doing our study almost on schedule and gathered enough information of basic research for clinical study of ALA-treatment for ATR-X syndrome patients. We are now preparing to start the clinical study in the near future.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 4 件）

1. Shimbo H, Ninomiya S, Kurosawa K, Wada T. A case report of two brothers with ATR-X syndrome due to low maternal frequency of somatic mosaicism for an intragenic deletion in the ATRX. *J Hum Genet.* 2014, 59, 408-10.
2. Shioda N, Fukunaga K. Molecular mechanisms of synapse pathology in ATR-X syndrome. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2015,145,174-177.
3. 黒澤健司次世代シーケンサーを利用した遺伝性疾患のパネル解析 ますます臨床利用が進む遺伝子検査（総説）*遺伝子医学 MOOK* 28:38-42, 2015. 国内
4. Li, Y.; Syed, J.; Suzuki, Y.; Asamitsu, S.; Shioda, N.; Wada, T.; Sugiyama, H. Effect of ATRX and G-quadruplex Formation by the VNTR Sequence on  $\alpha$ -globin Gene Expression. *ChemBioChem.* 2016, 17, 928-935.査読有
5. Asamitsu, S.; Li, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H. Ligand-mediated G-quadruplex Induction in a Double-stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide. *ChemBioChem.* 2016, 17, 1317-1322.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Molecular genetic study of 75 patients with ATR-X syndrome in Japan, ポスター, Hiroko Shimbo, Kenji Kurosawa, Nobuhiko Okamoto, Shinsuke Ninomiya, Takahito Wada. The 64th American Society of Human Genetics 2014. October 18-22 in San Diego, USA 海外
2. ATR-X 症候群における分子病態の解明と治療薬開発, 口頭, 塩田倫史, 和田敬仁, 福永浩司 第 36 回グアニジノ化合物研究会 2015/8/8 国内
3. 日本における ATR-X 症候群研究, 口頭, 和田敬仁, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
4. ATR-X 症候群の臨床, 口頭, 岡本伸彦, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
5. ATR-X 症候群の日本人症例の遺伝学的解析, 口頭, 新保裕子, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
6. ATR-X 症候群における認知機能障害機構の解明と治療薬開発, 口頭, 塩田倫史, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
7. ゲノムの後天的修飾の先天異常症, 口頭, 黒澤健司, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
8. ATRX と遺伝子発現のケミカルバイオロジー, 口頭, 杉山弘, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
9. ATR-X 症候群の病態に関連する遺伝子・染色体の細胞核内空間配置について, 口頭, 田辺秀之, 第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内

10. 発達障がいにおけるエピジェネティクスと CaMKII との関連性、口頭、福永浩司、第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム in Kyoto、国立京都国際会議場、2016/4/2、国内
11. Molecular genetic study of 80 patients with ATR-X syndrome in Japan. ポスター、Shimbo H, Kurosawa K, Okamoto N, Wada T. The 13<sup>th</sup> International Congress of Human Genetics 2016.4.3-7 Kyoto 国内
12. Global Radial Distribution of Chromosome Territories and its Characteristics in relation to Nuclear Architecture. 口頭、H Tanabe, BIT's 6<sup>th</sup> Annual World Congress of Molecular and Cell Biology 2016 Dalian International Conference Center, Dalian, China, 2016/4/26、国外
13. ATR-X 症候群の臨床研究、口頭、和田敬仁、第 58 回日本小児神経学会学術集会、京王プラザホテル新宿、2016/6/4、国内
14. グアニン四重鎖を標的とした神経疾患における病態解析と治療薬開発、口頭、塩田倫史、第 7 2 回 関西ディスモルフォロジー研究会、大阪市立総合医療センター、2016/9/10、国内
15. ATR-X 症候群における知的障害の分子機構解析、口頭、塩田倫史、和田敬仁、李岳、杉山弘、福光秀文、福永浩司、第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター、2016/5/20
16. DNA G-quadruplex を標的にした ATR-X 症候群治療薬の開発、口頭、塩田倫史、和田敬仁、李岳、杉山弘、福光秀文、福永浩司、ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、京都テルサ、2016/6/15、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高等学校生物授業支援；和田敬仁、大阪府立枚方高等学校（枚方市）、2014/6/10、国内
2. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2014、和田敬仁、平成 26 年度ひらめきときめきサイエンス（日本学術振興会）、京都大学医学部、2014/7/26、国内
3. 「DNA や染色体の観察を通して遺伝の不思議にせまろう！」、和田敬仁、平成 26 年度「未来のサイエンティスト養成事業」夏期講座（京都市青少年科学センター）、京都大学博物館、2014/8/1、国内
4. 「いのちのバトン 2014」、和田敬仁、京都大学アカデミックデイ 2014、京都大学、2014/9/28、国内
5. 「DNA や染色体の観察を通して遺伝の不思議にせまろう！」、和田敬仁、平成 26 年度「未来のサイエンティスト養成事業」秋冬講座（京都市青少年科学センター）、京都大学、2014/12/23、国内
6. 「葵サイエンス講座；みんなちがって、みんないい」、和田敬仁、堀江理恵、京都市立葵小学校、2015/3/6、国内

7. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2015、和田敬仁、平成 27 年度ひらめきときめきサイエンス（日本学術振興会）、京都大学医学部、2015/7/25、国内
8. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2015、和田敬仁、平成 27 年度「未来のサイエンティスト養成事業」夏期講座（京都市青少年科学センター）、京都市青少年科学センター、2015/7/30、国内
9. 高等学校生物授業支援；和田敬仁、大阪府立枚方高等学校（枚方市）、2015/9/11、国内
10. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2015、和田敬仁、平成 27 年度「未来のサイエンティスト養成事業」秋冬講座（京都市青少年科学センター）、京都大学、2015/11/21、国内
11. 「発達に関わる遺伝要因と環境要因」 岡本伸彦 日本小児保健協会 市民公開セミナー、2016/4/24 大阪市
12. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2016、和田敬仁、平成 28 年度ひらめきときめきサイエンス（日本学術振興会）、京都大学医学部、2016/7/23、国内
13. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2016、和田敬仁、平成 28 年度「未来のサイエンティスト養成事業」夏期講座（京都市青少年科学センター）、京都市青少年科学センター、2016/7/27、国内
14. 高等学校生物授業支援；和田敬仁、大阪府立枚方高等学校（枚方市）、2016/8/26、国内
15. 「いのちのバトン 2016」、和田敬仁、京都大学アカデミックデイ 2016、京都大学、2016/9/18、国内
16. ATR-X 症候群ネットワークジャパンの取り組み、和田敬仁、第 5 回 ATR-X 症候群患者さんに関わる皆さんのための勉強会、神奈川県立こども医療センター、2016/9/19、国内
17. ATR-X 症候群に対するアミノレブリン酸による治療、塩田倫史、第 5 回 ATR-X 症候群患者さんに関わる皆さんのための勉強会、神奈川県立こども医療センター、2016/9/19、国内
18. ATR-X 症候群の健康管理、黒澤健司、第 5 回 ATR-X 症候群患者さんに関わる皆さんのための勉強会、神奈川県立こども医療センター、2016/9/19、国内
19. ATR-X 症候群の遺伝カウンセリング、西川智子、第 5 回 ATR-X 症候群患者さんに関わる皆さんのための勉強会、神奈川県立こども医療センター、2016/9/19、国内
20. ATR-X 症候群の消化管運動と外科治療、渡部稔彦、第 5 回 ATR-X 症候群患者さんに関わる皆さんのための勉強会、神奈川県立こども医療センター、2016/9/19、国内
21. 「遺伝子からみた子どもの病気」-原因究明と治療への展望- 岡本伸彦、難病親の会 講義 2016/9/24 大阪市
22. 「おもしろ理科実験講座；DNA って何だろう」、和田敬仁、堀江理恵、鳥嶋雅子、京都市立葵小学校、2016/12/17、国内



23. 「学校ではきっと教えてくれないヒトの遺伝」白熱教室 2016、和田敬仁、平成 28 年度「未来のサイエンティスト養成事業」秋冬講座（京都市青少年科学センター），京都大学、2016/12/23、国内

（4）特許出願