

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15839

研究課題名(和文)乳歯で染色体異常疾患を克服するトランスレーショナル研究

研究課題名(英文)Translational research to overcome chromosomal abnormality using deciduous teeth

研究代表者

野中 和明(Nonaka, Kazuaki)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90128067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：過剰21番染色体により発症するダウン症候群について、患児より採取・調製したヒト脱落乳歯由来幹細胞(SHED)を用いたダウン症候群の病態解明と、ゲノム編集技術による過剰21番染色体除去法の開発を行った。患児由来SHEDを神経細胞に分化させた結果、健常児SHEDと比較して神経発達能が低下していることを明らかにすることができた。また、ゲノム編集技術を用いて選択的に21番染色体を除去する方法を確立することができた。

研究成果の概要(英文)：We examined the pathology of down syndrome using stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) derived from a patient with down syndrome. Furthermore, we attempted to develop a system to eliminate excess chromosome 21 by genome editing. We revealed that neurodevelopment ability of SHED derived from a patient was lower than SHED derived from a typically developing child. In addition, we established a system to eliminate a targeted chromosome.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ダウン症 ゲノム編集 乳歯由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

永久歯との生え変わりにより脱落した乳歯から、ヒト脱落乳歯由来幹細胞 (SHED; Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) と呼ばれる幹細胞が調製できる。この SHED は次の点において極めて有用である。

- 1) 多分化能を有しており、神経細胞、骨芽細胞、肝細胞等に分化可能である。
- 2) SHED の調製は初期化を必要とせず、歯髄組織から細胞を回収後、数回継代するのみで作成可能である。
- 3) 培養には高価な培地を必要とせず、フィーダー細胞やマトリクスなども不要ため、簡便かつ低コストで研究を行える。
- 4) 乳歯は自然脱落する組織であるため、SHED 組織採取が比較的非侵襲的ある点で、乳歯からの細胞の調製法は社会的にも受け入れやすい方法である。

我々は疾患モデルマウスに SHED を移植し、SHED が肝細胞に分化し肝機能障害を改善すること、さらに、骨欠損部での骨新生や免疫担当細胞、特に T リンパ球に対し分化や機能を調節し、腎機能の回復、全身性エリテマトーデスの著しい再生治療効果を持つ有用な細胞源であることを報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は過剰 21 番染色体により発症するダウン症候群について、患児より採取・調製した SHED を用いたダウン症における神経精神疾患の病態解明と、ゲノム編集技術を活用した過剰 21 番染色体の除去による治療法の開拓を目的とした。

3. 研究の方法

(1) SHED 培養

健常児およびダウン症患者乳歯より歯髄を単離し、SHED を調製した。SHED は 15% ウシ胎児血清、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、250 µg/mL ファンギゾンを含む αMEM 培地で培養した。実験には 10 継代以内の SHED を用いた。

(2) 神経細胞への分化

SHED を 20 ng/mL EGF と 20 ng/mL bFGF、1% N2 サプリメントを含む DMEM 培地で 2 日間培養した。その後、2% B27 サプリメント、1 mM ジブチリル-cAMP、0.5 mM IBMX、200 µM アスコルビン酸を含む Neurobasal 培地で 5 日間培養した。

(3) 神経細胞の発達解析

神経細胞へ分化させた SHED を、4% パラホルムアルデヒドで固定し、β-Tubulin III 抗体で蛍光免疫染色を行った。Zeiss LSM700 confocal scanning microscope (Zeiss) または Nikon C2 confocal microscope (Nikon) で細胞形態を撮影した。撮影した画像を用いて、神経突起の長さと同分岐を MetaMorph ソフト

ウェア (Molecular Devices) の neurite outgrowth module と multi-wavelength cell scoring module で解析した。

(4) 過剰 21 番染色体の除去

過剰染色体の除去方法として、2 本の姉妹染色分体を融合させ動原体を二つ持つ染色体 (ダイセントリック染色体) を形成する方法を試みた。

21 番染色体の一本に、逆向きに 2 つの loxP 配列を含むカセットを CRISPR/Cas9-nickase を使って挿入する。

Cre 組換え酵素発現による loxP での組換えにより染色体の融合・除去する。

薬剤感受性マーカーや GFP の蛍光を指標に過剰染色体除去細胞を選択する。

FISH 法で染色体除去を確認する。

4. 研究成果

(1) ダウン症患者から単離した SHED の特徴
ダウン症および健常児の乳歯から SHED を調製した。ダウン症患者由来 SHED (DS-SHED) は紡錘形であり、健常児由来 SHED (Ctrl-SHED) と同様に線維芽細胞様細胞形態を有していた (図 1)。

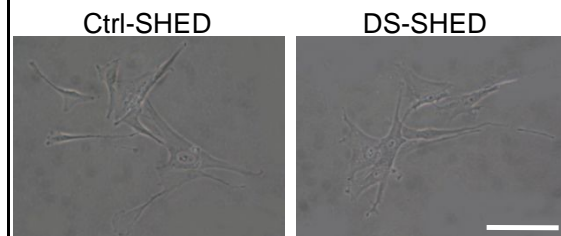


図1 調製したSHEDの細胞形態

FISH 解析の結果、DS-SHED の核内には 21 番染色体が 3 本あることを確認した (図 2)。

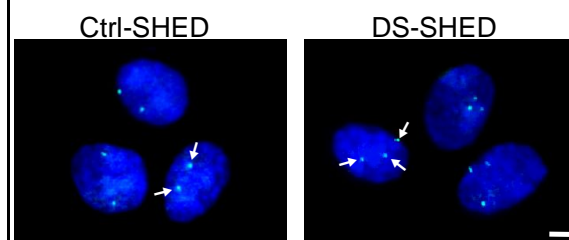


図2 SHEDのFISH解析(白矢: 21番染色体)

SHED は多分化能を有し、間葉系および神経系の幹細胞マーカーを発現する。DS-SHED の幹細胞能を調べるため、幹細胞マーカーの抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。DS-SHED および Ctrl-SHED は、間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 を発現した。一方で、神経幹細胞マーカーであるネスチンの発現は Ctrl-SHED と比較して DS-SHED で減少していた。さらにウエスタンブロッティングを用いてネスチンの発現を調べた結果、Ctrl-SHED と比較して、DS-SHED のネスチンの発現は有意に減少していた (図 3)。

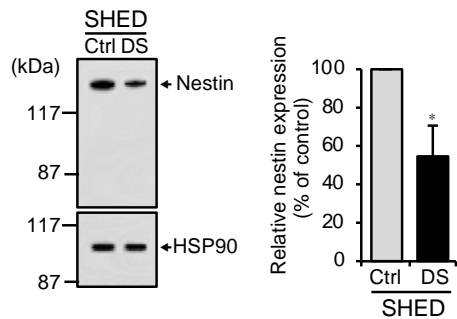


図3 DS-SHEDにおけるNestin発現低下

(2) DS-SHED 由来神経細胞の形態学的解析

Ctrl-SHED および DS-SHED を神経細胞へ分化させ、 β -Tubulin III (神経細胞マーカー) に対する抗体で免疫染色した。神経細胞へ分化させた DS-SHED は β -Tubulin III を発現したが、Ctrl と比較して神経突起の長さと分岐が減少していた(図4)。

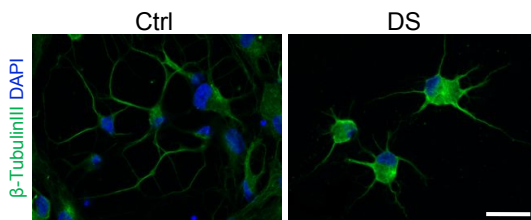


図4 神経細胞へ分化させたSHEDの細胞形態

神経突起の長さと分岐を定量的に解析した結果、神経突起の長さと分岐は有意に低下していた(図5)。

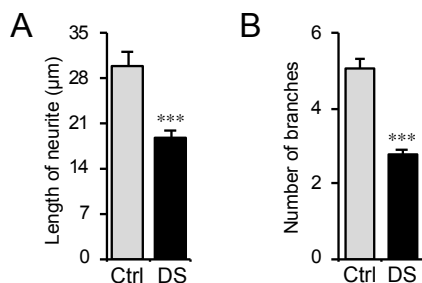


図5 ダウン症患者SHED由来神経細胞の発達低下

ダウン症患者より調製した SHED を神経細胞へ分化させた結果、神経細胞の発達異常が明らかになった。非侵襲的に調製可能な SHED は、ダウン症の病態モデルとして非常に有用な幹細胞源になると考える。

(3) 過剰 21 番染色体の除去

HeLa 細胞の 21 番染色体の一本に、逆向きに 2 つの loxP 配列を含むカセットを CRISPR/Cas9-nickase を使って挿入した。Cre 組換え酵素発現 loxP での組換えにより染色体の融合・除去した結果、HeLa 細胞から 21 番染色体を 1 本除去することに成功した(図 6,7 Sato et.al., Biomed Res Int. 2017)。現在 HeLa 細胞で確立した方法を用いて、DS-SHED での過剰染色体除去を行なっている。

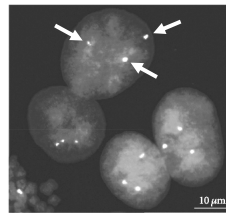


図6 21 番染色体(矢印)を 3 本持つ HeLa 細胞 (FISH 解析)

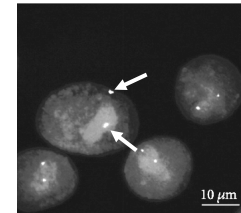


図7 余剰染色体を除去され 21 番染色体(矢印)が 2 本になった HeLa 細胞 (FISH 解析)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Hirofuji S, Hirofuji Y, Kato H, Masuda K, Yamaza H, Sato H, Takayama F, Torio M, Sakai Y, Ohga S, Taguchi T, Nonaka K. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of a child with Rett syndrome. (2018) Biochem Biophys Res Commun. 498(4):898-904

2. Kato H, Han X, Yamaza H, Masuda K, Hirofuji Y, Sato H, Pham TMT, Taguchi T, Nonaka K. Direct effects of mitochondrial dysfunction on poor bone health in Leigh syndrome. (2017) Biochem Biophys Res Commun., 493(1):207-212

3. Kato H, Pham TMT, Yamaza H, Masuda K, Hirofuji Y, Han X, Sato H, Taguchi T, Nonaka K. Mitochondria regulate the differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. (2017) Cell Structure and Function, 42(2):105-116.

4. Sato H, Kato H, Yamaza H, Masuda K, Nguyen HT, Pham TMT, Han X, Hirofuji Y, Nonaka K. Engineering of Systematic Elimination of a Targeted Chromosome in Human Cells. Biomed Res Int. 2017; 2017: 6037159.

[学会発表](計 5 件)

1. 佐藤 浩、加藤 大樹、山座 治義、増田 啓次、Huong Thi Nguyen Nguyen, Thanh Thi Mai Pham, 韓 旭、廣藤 雄太、野中 和明 HeLa 細胞における 21 番染色体トリソミーのダイソミー化 ConBio 2017 生命科学合同年次大会 2017.12 神戸

2. Thanh Thi Mai Pham, Hiroki Kato, Haruyoshi Yamaza, Keiji Masuda, Yuta Hirofuji, Hiroshi Sato, Huong Thi Nguyen Nguyen, Tomoaki Taguchi, Kazuaki Nonaka, Understanding of neuropathology in Down syndrome: An in vitro study

utilizing stem cells from human exfoliated deciduous teeth. The 28th Fukuoka International Symposium on Pediatric/ Maternal-Child Health Research, 2017.08 Fukuoka, Japan

3. Thanh Thi Mai Pham, Haruyoshi Yamaza, Yuta Hirofuji, Keiji Masuda, Kazuaki Nonaka, Impairment of dopaminergic neuronal development in down syndrome. 第 55 回小児歯科学会大会 2017.05 小倉

4. Thanh Thi Mai Pham., Kato, H., Yamaza, H., Masuda, K., Hirofuji, Y., Nguyen, H., Sato, H., Taguchi, T., Nonaka, K. (2017) Implication of Dopaminergic Neurodevelopment in the Pathophysiology of Down Syndrome. The Gordon Research Conference on Dendrites: Molecules, Structure & Function, 2017. 03 Barga, Italy

5. Sato H., Etiological research of congenital disorder with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. The 28th Fukuoka International Symposium on Pediatric/ Maternal-Child Health Research, 2016.08 Fukuoka, Japan

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中和明 (NONAKA KAZUAKI)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号 : 90128067

(2) 研究分担者

増田啓次 (MASUDA KEIJI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号 : 60392122

山座治義 (YAMAZA HARUYOSHI)
九州大学・歯学研究院・准教授
研究者番号 : 30336151

佐藤浩 (SATO HIROSHI)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号 : 00421313

加藤大樹 (KATO HIROKI)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号 : 30452709