

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10386

研究課題名(和文)性染色体数異常における発達障害機序の解析 ～乳歯歯髄幹細胞による橋渡し研究～

研究課題名(英文) Etiological research of developmental disorders in sexual chromosome abnormalities

研究代表者

佐藤 浩 (Sato, Hiroshi)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00421313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体を複数持つ男性に発症するクラインフェルター症候群(KS)では、生殖不全を始め発達障害等の症状が見られる。しかし、過剰なX染色体を起因とする発達障害の発生機序は不明のままである。今回、発達障害を持つKS患児よりヒト脱落歯髄幹細胞(SHED)が分離できた。分化誘導したKS-SHEDは神経分化に異常を示すことが分かった。神経の分化に影響するミトコンドリアの解析を行い、ミトコンドリアのタンパク質の減少と膜電位の低下を明らかにした。一方でSIRT1遺伝子の発現低下が観察され、KSにおけるミトコンドリア活性の低下や神経分化異常への関連が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

調整や神経分化が容易なSHEDを染色体の異常を保ったままクラインフェルター患児から分離できたことは、発達障害の病態解明の資源としての役割は大きい。また、本実験ではこれを用いてクラインフェルター症候群の神経において、発達の異常とタンパク質減少を伴うミトコンドリア活性の低下を始めて明らかとした。さらに、ミトコンドリアと関係のあるSIRT1を始めとするいくつかの遺伝子の発現の変化を明らかとしており、病態の解明と薬剤の選択の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Klinefelter's syndrome (KS), develops in men with extra X chromosomes, presents with hypogonadism and cognitive impairment. However, the etiology behind cognitive impairment is as yet not well understood. In this study, stem cells from human exfoliated deciduous tooth (SHED) harboring extra X chromosomes were prepared from dental pulp of KS children with cognitive impairment. Neurons induced from KS-SHED showed impaired neuronal differentiation. Analysis of mitochondria, which affect neural differentiation, revealed reduced mitochondrial protein levels and lower membrane potentials in KS compared to controls. Decreased expression of SIRT1 gene in KS-SHED might be related with lower mitochondrial activity and abnormal neuronal differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：歯髄幹細胞 染色体異常 クラインフェルター症候群 神経分化 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの性は一对の性染色体によって決定し、男性はXY、女性はXXである。クラインフェルター症候群は本来1本である男性のX染色体が過剰になること(XXY、XXXY)に起因する疾患である。頻度は男性500-1000人に1人と報告されており、最も高発な性染色体異常である。高身長、四肢細長、精巣委縮、無精子症、不妊、女性化乳房、骨粗鬆症などを呈するが、これらはX染色体の過剰による遺伝子量的な異常と、さらに性腺機能低下症からのホルモンの(低テストステロン)因子に関係すると考えられる。

加えて患者は精神障害や発達障害(特に言語機能の遅れ)を呈する。過剰なX染色体の本数が増加するほどIQが15~16ポイント低下するという報告があることから、発達障害は遺伝子量的な変化が原因と考えられる。しかし、このような疫学的調査や組織学的調査によりクラインフェルター症候群と発達障害の関連性は示唆され、脳の病理学的な解析や、網羅的な遺伝子発現の変化の解析は行われているものの、現在のところ発達障害に関わる神経細胞異常やその発症機序についてはほとんど分かっていない。

永久歯との交換により自然脱落する乳歯の未分化な細胞(ヒト脱落乳歯由来幹細胞)(SHED; Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth)を使用する(Miura M, et al. PNAS. 2003)。このSHEDは1)多分化能を有しており、特に神経細胞に容易に分化させる方法が確立されており、2)調製は初期化を必要とせず、歯髄組織細胞を数回継代するのみで作成可能であり、3)培養にはフィーダー細胞やマトリクスなども不要なため、簡便かつ低コストであり、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であるなど極めて有用である。

申請者は21番染色体の過剰が原因で発症するダウン症や、X染色体上の遺伝子変異により起こるレット症候群の神経疾患の病態を、乳歯歯髄幹細胞を使った神経細胞分化系を活用して明らかにしてきた。この手法を応用して本研究の研究課題の学術的「問い」である「過剰なX染色体による発達障害の細胞生物学的及び分子生物学的な発症機構」の解明を目指す。研究成果は、症状の緩和や有効な治療法の開発、早期診断のマーカーの探索などに役立ち、クラインフェルター症候群の患者にとって非常に有効な情報となる。

2. 研究の目的

染色体数の過剰により引き起こされる神経発達異常の分子機構を解明し、症状の緩和・治療や治療薬の標的分子の同定に役立てる事である。そのために、クラインフェルター症候群患者の細胞を用いて、X染色体過剰により引き起こされる神経細胞の異常を解析し、疾患の発症機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)クラインフェルター患児よりSHEDの調製

発達障害を持つクラインフェルター患児の乳歯より歯髄組織を採取し、酵素処理により細胞を分散させた。それらを培養培地を入れたディッシュに播種することでSHEDを培養、単離した。採取したSHEDはX染色体を認識するプローブを用いたFluorescence in situ hybridization (FISH)により、X染色体数を確認した。

(2)SHEDの神経分化

ディッシュ上で培養したSHEDを、2段階の神経誘導培地で処理することで、ドーパミン作動性ニューロンへ分化を誘導した。

(3)神経細胞の形態的な比較

-Tubulin III抗体で免疫染色後、共焦点顕微鏡で樹状突起の伸長と分岐を観察しMetaMorphソフトウェアを用いて定量化を行った。

(4)遺伝子発現の解析

神経分化マーカー遺伝子などの発現を、抽出RNAより逆転写したcDNAを基に、リアルタイムPCR法を用いて定量し比較検討した。

(5)タンパク質の発現解析

神経分化マーカータンパク質やミトコンドリアタンパク質をウエスタンブロット法によって解析した。

(6)ミトコンドリア形態・活性の比較解析

S H E D を神経に分化誘導し、ミトコンドリアタンパク質である Tom20 を免疫染色することで、ミトコンドリア形態を可視化した。また、ミトコンドリア膜電位に反応し蛍光波長の変化する JC-1 色素を使用しミトコンドリアの膜電位を計測した。

(7) 遺伝子の高発現実験による神経変性の再現実験

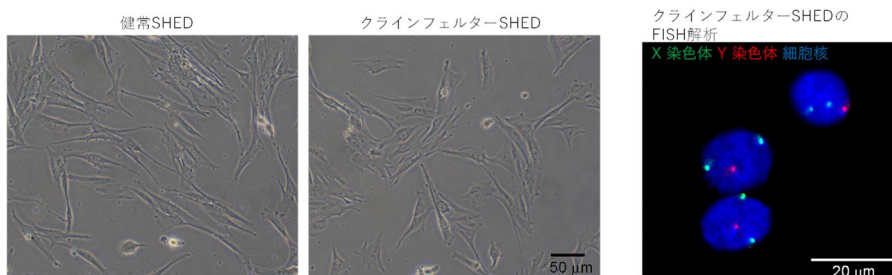
X 染色体にコードされた遺伝子などを、高発現プラスミドを用いて S H E D に発現し、神経分化誘導を行った。分化誘導した神経のミトコンドリア形態やマーカー遺伝子の発現を、高発現を行っていない細胞と比較解析した。

(8) 過剰 X 染色体の除去

がん細胞において成功している、ゲノム編集と分子生物学的手法を用いた染色体除去法を行ったが、初代細胞である S H E D においてはうまくいかなかった。

4. 研究成果

(1) 発達障害の症状を持つクライフェルター症候群患児より得た乳歯を用いて、SHED の分離ができ、分離されたクライフェルター患者の SHED (KS-SHED) は、FISH 解析によって 2 本の X 染色体と 1 本の Y 染色体を保持していることが示された (図)。このことは、容易に調整可能で多分化能を持つ SHED が、in vitro における細胞学的なクライフェルター症候群の病態解明の試料となりえることを示した。



(2) KS-SHED は形態的及び細胞の増殖において、健常児より分離された SHED と比較して有意な差異は認められなかった。さらに、これらの SHED をドーパミン作動性ニューロン (DN) へと分化誘導を行ったところ、軸索の長さや分岐の数の顕著な変化は示されなかった。一方で DN への分化状態を示すマーカーである MAP2 や α -tubulin III、Nurr1 といった遺伝子の発現は KS における DN において減少していた。このことから、クライフェルター症候群の神経においては形態的な変化以上に分化成熟の異常が起こることが考えられた。

(3) 神経分化に影響するミトコンドリア活性の解析を行った。ミトコンドリアにおける ATP 合成に必要な膜電位の計測により、KS-SHED において ctrl-SHED と比較して有意に減少していることが示された。また、神経への分化誘導を行うとミトコンドリアタンパク質が増加することが知られているが、ウエスタンブロット解析によりこのタンパク質の増加は KS-DN において健常児 SHED と比較して抑えられることが示された。そこで細胞に含まれるミトコンドリアの DNA 含有量を調べることで健常児 SHED と KS-SHED のミトコンドリアの量の比較を行ったところ、有意な違いは見られなかった。このことから、ミトコンドリアタンパク質の減少は細胞に含まれるミトコンドリア数が減少したためではなく、個々のミトコンドリアのタンパク質の減少が原因であることが示された。これらの結果はクライフェルター症候群の神経において、ミトコンドリアのタンパク質の減少により、ミトコンドリアの活性の低下が引き起こされている可能性が示唆された。

(4) 遺伝子の転写解析の結果は、ミトコンドリア DNA にコードされたミトコンドリアタンパク質の遺伝子発現は健常児とクライフェルターからの神経において顕著な違いは見られなかったが、核にコードされたミトコンドリアの遺伝子において発現が減少していることが示された。さらにミトコンドリア数の上昇に関連する PGC-1 の発現には変化がないものの、一方で遺伝子の転写やミトコンドリアの代謝に関する SIRT1 遺伝子の発現低下が確認された。

(5) X 染色体上にコードされた、ミトコンドリアや発達障害に関わることが示唆される遺伝子が KS-SHED において発現が上昇していることが示された。しかし、このうちのいくつかについて高発現実験を行ったが、SHED の神経分化等への顕著な影響は観察できなかった。

(6) KS-SHED における過剰な X 染色体の除去について、HeLa 細胞において確立したゲノム編集に

よる染色体への DNA カセットの挿入と、Cre/LoxP による組換えによる方法を試みたが、SHED においては DNA 挿入クローンの取得などがうまくいかなかった。SHED を含めた初代培養細胞においても応用できるような手法の開発が必要であることが判明し、改良を行っている。

このように、KS-SHED において神経分化の異常が起こることが判明し、ミトコンドリアタンパク質減少によるミトコンドリア活性の低下の関りが示唆された。一方で遺伝子発現や代謝に関わる SIRT1 の発現低下や、X 染色体上の特定の遺伝子の発現上昇も観察された。これら SIRT1 や X 染色体遺伝子がミトコンドリアの活性と直接関連するかは分からない。今後、これらの関連性を調べることで、クライフェルター症候群の発達異常の治療のターゲットの解明が期待される。現在、ミトコンドリア活性や SIRT1 の活性に関わる薬剤を用いて、KS-SHED のミトコンドリア活性や神経分化の正常化の検討を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 大樹 (Kato Hiroki) (30452709)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	増田 啓次 (Masuda Keiji) (60392122)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関