

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19272

研究課題名(和文) Rett症候群に対するヒト乳歯由来幹細胞を活用した病態解明及び創薬基盤の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology and development of drug discovery platform using human deciduous tooth-derived stem cells to Rett syndrome

研究代表者

廣藤 雄太 (Hirofujii, Yuta)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80759746

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)：レット症候群(RTT)は、MeCP2の機能喪失による神経発達障害であるが、発症の分子機序は未解明である。本研究では、RTTの脳内ドーパミン作動系の欠陥要因のうち、ミトコンドリア機能に関連する因子に焦点を絞って解析した。RTT患者由来の乳歯歯髄幹細胞をドーパミン作動性ニューロンに分化誘導して分子生物学的解析を行い、ミトコンドリア生合成の必須因子であるPGC-1の発現低下を見出した。本研究により、RTTの脳内ドーパミン作動系の欠陥には、MeCP2の機能喪失によるPGC-1を介したミトコンドリア活性化経路の欠陥が関与する可能性が示唆され、この経路に関連する新規治療標的の発見に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの先天異常において原因が特定されつつあるが、詳細な発症機序の解明と根本的な治療法の開発には必ずしも至っていない。理由として、研究に利用される様々な疾患モデルには利点と欠点があり、病態の包括的理解が容易でないことが挙げられる。したがって、互いに補完し合う多種多様な疾患モデルが必要と考えられる。本研究の学術的意義として、RTT患者由来の脱落乳歯歯髄幹細胞が、脳内ドーパミン作動系の病態モデル細胞の1つとなり得ることを示した。社会的意義として、小児歯科医療が、先天異常に罹患した小児の健全な口腔発育のサポートだけでなく、脱落乳歯を活用した先天異常の病態解明研究にも貢献し得るという革新的価値を示した。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder caused by loss of function of MeCP2, however, its molecular mechanism remains unclear. In this study, we investigated the mitochondrial factors related to the developmental defects of the dopaminergic system in RTT. Stem cells in patient-derived deciduous teeth were used for differentiation into dopaminergic neurons and for molecular biological analysis. We found that PGC-1 was clearly downregulated in RTT-derived neurons. Dopaminergic dysregulation in the brain of RTT may be associated with defects of PGC-1-mediated mitochondrial activation pathway that can provide the potential therapeutic targets of RTT.

研究分野：口腔科学分野 成長および発育系歯学関連

キーワード：乳歯歯髄由来幹細胞 レット症候群 ミトコンドリア ドーパミン作動性神経細胞

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群 (RTT) は、乳幼児期に発症する神経発達障害である。本症候群の主な原因は、X 染色体長腕 (Xq28) に位置し、メチル化 DNA に結合して転写を調節する MeCP2 (Methyl CpG binding protein 2) をコードする遺伝子の機能喪失変異である。MeCP2 遺伝子を改変した RTT モデルマウスや RTT 患者由来細胞を用いた研究により、MeCP2 変異によるニューロンの発達不全が示されている。しかし、MeCP2 によって発現調節を受ける遺伝子は膨大な数に上り、ニューロンの正常な発達は、各遺伝子産物固有の機能と相互作用によって複雑に制御されている。MeCP2 の機能喪失に起因する RTT の発症機序も、まだ完全に解明されていない。

RTT は、X 染色体の不活化現象によって、MECP2 変異アレルのヘテロ接合体である女性が主に発症する。女性患者では、野生型 MeCP2 が発現する正常細胞と MeCP2 が機能喪失した変異細胞が混在する。一方、男性患者では変異 MeCP2 アレルのヘミ接合体となり、全細胞が MeCP2 変異細胞となり、ほとんどが周産期に死亡する。申請者は、MeCP2 遺伝子の大部分が欠失した RTT の女兒から脱落乳歯歯髓由来幹細胞 (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) の提供を受け、MeCP2 発現 SHED と MeCP2 欠損 SHED を分離することに成功した (hirofuji et al. Biochem Biophys Res Commun. 2018)。

申請者は、RTT の脳内ドーパミン作動系の欠陥を明らかにする目的で、これらの SHED をドーパミン作動性ニューロン (DN: dopaminergic neuron) に分化させ、細胞生物学的解析を行った。その結果、MeCP2 欠損 DN では、神経突起の伸長と分岐が低下し、さらにミトコンドリアの活性も低下することが明らかとなった (hirofuji et al. Biochem Biophys Res Commun. 2018)。この知見は、RTT の女性患者の脳内ドーパミン系の神経学的病理とミトコンドリアの機能障害との関連性を裏付ける証拠と考えられる。さらに、患者由来 SHED が、RTT の神経病態解明に役立つ疾患モデル細胞となり得ることも明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、上記の研究をもとに、MeCP2 欠損 DN の発達障害と関連するミトコンドリア機能障害の分子機序の詳細を解明し、新規治療法の開発に繋がる分子基盤を形成することを目指す。

3. 研究の方法

これまでに樹立した RTT 女兒由来 SHED を DN に分化誘導し、以下の実験を行った。

- 1) RTT の発症に関与するミトコンドリア機能を制御する新規因子を同定するために、MeCP2 欠損 DN におけるミトコンドリア関連遺伝子の発現レベルを定量 RT-PCR により調べた。
- 2) MeCP2 欠損 DN の細胞表現型を改善するために、脳由来神経栄養因子 (BDNF) によるミトコンドリア活性化効果を調べた。
- 3) MeCP2 欠損 DN の細胞表現型を改善するために、RTT 女兒由来 SHED の MeCP2 遺伝子欠損に対し、正常 MeCP2 タンパク質の発現を回復させ、遺伝学的手法の確立を試みた。

4. 研究成果

1) RTT の発症に関与するミトコンドリア機能を制御する新規因子の同定

ミトコンドリア機能の制御因子の発現量を定量的 RT-PCR で調べたところ、正常 DN と比較して、MeCP2 欠損 DN では、PGC-1 の発現量が有意に低下していた (図 1)。PGC-1 は、核内受容体ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 (PPAR) と相互作用する転写コアクチベーターとして、多くのミトコンドリア関連遺伝子の発現を制御する。その結果、ミトコンドリアの生合成を促進し、ミトコンドリアを活性化するマスターレギュレーターである。RTT モデルマウスや RTT 患者由来細胞を用いたこれまでの研究では、MeCP2 欠損ニューロンにおける PGC-1 の発現変化

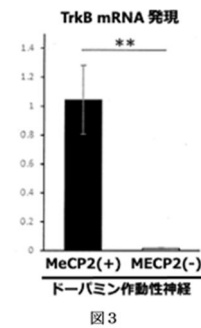
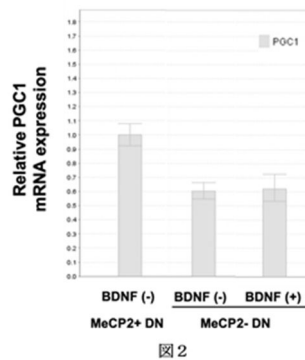
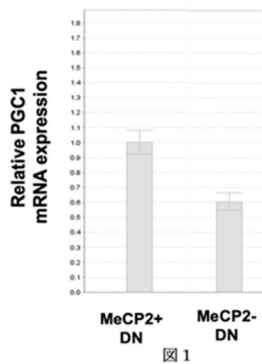
は明らかにされていない。PGC-1 は、MeCP2 の下流で転写制御を受けるミトコンドリア関連遺伝子であり、RTT の脳内ドーパミン作動系の異常に関与する新規因子の候補と考えられる。

2) BDNF によるミトコンドリア活性化効果

BDNF を培地に補充し、DN に分化誘導したところ、MeCP2 欠損 DN の神経突起の発達に明らかな改善は見られず、PGC-1 の mRNA 発現にも改善効果を示さなかった (図 2)。その原因を特定するため、BDNF の受容体である TrkB の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR で調べた。正常 DN と比較し、MeCP2 欠損 DN では、TrkB の発現量が有意に減少していた (図 3)。したがって、TrkB を介した BDNF シグナルが低下している可能性が示唆され、さらに TrkB もまた、MeCP2 により遺伝子発現制御を受ける可能性のある候補として同定された。

3) MeCP2 欠損細胞への遺伝学的手法による正常 MeCP2 タンパク質の発現回復

申請者が研究に用いた RTT の女児では、MeCP2 遺伝子の大部分が欠失しており、MeCP2 タンパク質の発現は完全に喪失している。正常な MeCP2 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを MeCP2 欠損 SHED に導入する方法を計画した。しかし、この方法では MeCP2 タンパク質の発現レベルを正常細胞と同程度にコントロールすることは容易ではない。導入した MeCP2 の発現が、生理的レベルを超えて過剰になると、重度の精神運動発達遅滞を特徴とする MeCP2 重複症候群様の異常な細胞表現型を示す可能性がある。したがって、現在、遺伝学的手法による正常 MeCP2 タンパク質の発現回復実験のプロトコールを慎重に検討しているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nonaka Kentaro, Han Xu, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Yamaza Haruyoshi, Hirofuji Yuta, Masuda Keiji	4. 巻 19
2. 論文標題 Novel gain-of-function mutation of TRPV4 associated with accelerated chondrogenic differentiation of dental pulp stem cells derived from a patient with metatropic dysplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100648 ~ 100648
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2019.100648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhang Yu, Sun Xiao, Han Xu, Sato Hiroshi, Hirofuji Yuta, Masuda Keiji	4. 巻 516
2. 論文標題 Protective effect of folic acid on vulnerability to oxidative stress in dental pulp stem cells of deciduous teeth from children with orofacial clefts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 127 ~ 132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.06.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Han Xu, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Hirofuji Yuta, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	4. 巻 523
2. 論文標題 Accelerated osteoblastic differentiation in patient-derived dental pulp stem cells carrying a gain-of-function mutation of TRPV4 associated with metatropic dysplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 841 ~ 846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------