

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 6 月 2 6 日現在

機関番号：8 7 1 2 2

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：2 0 K 1 8 7 6 1

研究課題名（和文）ヒト脱落乳歯由来幹細胞を用いたRett症候群の骨表現型の病態解明研究

研究課題名（英文）Elucidation of the bone pathogenesis of Rett syndrome using stem cells derived from human deciduous teeth

研究代表者

廣藤 早紀（Hirofuj i, Saki）

地方独立行政法人福岡市立病院機構福岡市立こども病院（臨床研究部）・臨床研究部・医師

研究者番号：5 0 8 0 8 1 3 6

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）：本研究では、レット症候群と診断された患児から得られたMeCP2欠損乳歯幹細胞を骨芽細胞に誘導し、その細胞表現型を正常乳歯幹細胞から分化した骨芽細胞と比較し、解析した。MeCP2欠損群では、骨芽細胞への分化障害を認め、これにはWnt/ カテニン経路の障害およびミトコンドリア機能の低下が関与することが明らかとなった。したがって、MeCP2は、脳の発達に重要であるだけでなく、末梢組織では骨芽細胞分化の制御にも関与していると考えられる。本研究により、レット症候群のMeCP2関連骨症状の分子機序解明とともに、Wnt/ カテニン経路やミトコンドリアを標的とした新規治療薬開発のための基礎データを提示できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レット症候群の研究は、これまで脳を対象にしたものが主体であった。しかし、骨粗鬆症や側弯症などの骨症状も、患児の生活の質を下げる重要な症状である。本研究では、レット症候群の患児から提供された脱落乳歯に含まれる幹細胞を用いて、MeCP2欠損により骨芽細胞分化がどのように障害されるかを調べた。本研究は、脱落乳歯の医学研究への利用可能性を示し、レット症候群の骨症状の発生機序解明と治療薬の開発に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, deciduous tooth-derived stem cells were obtained from children diagnosed with Rett syndrome caused by MeCP2-deficiency. They were induced into osteoblasts, and their cellular phenotype was analyzed, in comparison with that of osteoblasts differentiated from normal deciduous tooth-derived stem cells. In the MeCP2-deficient group, osteoblast differentiation was impaired in association with the impaired Wnt/ -catenin pathway and mitochondrial dysfunction. MeCP2 is not only important for brain development, but also may be involved in the regulation of osteoblast differentiation in peripheral tissues. This study provides basic evidence for elucidating the molecular mechanisms of bone symptoms as well as for developing new therapeutic agents targeting the Wnt/ -catenin pathway and mitochondria in Rett syndrome associated with MeCP2-deficiency.

研究分野：小児口腔医学

キーワード：レット症候群 乳歯幹細胞 MeCP2 骨芽細胞分化 骨粗鬆症

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

< Rett 症候群と MeCP2 遺伝子変異 >

Rett 症候群 (RTT) は、X 連鎖優性遺伝性の神経発達障害の一つであり患者の大部分は女性である。原因は、X 染色体上にある methyl-CpG binding protein 2 タンパク (MeCP2) をコードする遺伝子の変異である。MeCP2 は、メチル化 CpG に結合して数多くの遺伝子発現を調節する。MeCP2 が脳で高発現しており、患者の主症状が脳の発達障害であることから、これまで主に神経表現型に関する研究が行われてきた。

< Rett 症候群とミトコンドリア機能障害 >

RTT 患者の死後脳やモデルマウスの解析では、MeCP2 欠損により核にコードされたミトコンドリア関連因子の発現変化が認められた。したがって、RTT の脳の発達障害にはミトコンドリア機能異常が関与する可能性がある。申請者は、MeCP2 遺伝子の欠失を持つ RTT 患者の脱落乳歯から神経堤由来の間葉系幹細胞を回収した。これを疾患特異的細胞モデルとしてニューロンに誘導し、MeCP2 欠損によるミトコンドリア機能低下が、RTT の神経表現型の一つであるドーパミン作動性ニューロンの発達異常と関連することを明らかにした (参考文献 1)。

< Rett 症候群患者の骨症状 >

MeCP2 は、脳だけでなく全身の組織で発現し遺伝子発現調節に関与する。したがって、MeCP2 欠損は、神経系に限らず、全身組織の発達と機能にも影響する可能性がある。骨格系においては、約 50% の患者に脊柱側弯症、骨密度低下、易骨折性、骨疼痛などの症状を認め、これらは運動制限による生活の質低下の一因となっている。脆弱な骨質の改善は、RTT の重要な治療標の一つであり、したがって、RTT 骨表現型の病態解明は、より有効な治療薬開発のために不可欠である。しかし、神経表現型研究と比較して、骨表現型に焦点を当てた基礎研究は少数で発症機序はほとんど解明されていない。

< Rett 症候群患児由来の乳歯幹細胞の研究活用 >

申請者が神経表現型解析に用いた MeCP2 欠損乳歯幹細胞は、骨芽細胞にも効率的に分化する。したがって、RTT 患児由来乳歯幹細胞は、MeCP2 欠損と骨表現型との関連を細胞生物学的に解析するための材料としても有用である。また、ミトコンドリアは全身の細胞に存在し、ATP 産生、活性酸素種の生成と除去、 Ca^{2+} 調節など、骨形成においても不可欠である。したがって、RTT の骨表現型において、MeCP2 欠損と関連するミトコンドリア機能異常がその根底にあると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、MeCP2 欠損がどのような機序で RTT の骨表現型に関与するのかを、RTT 患児由来乳歯幹細胞を用いて明らかにすることを目的とした。

骨の形成とリモデリングは、主に骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収とによって制御される。低骨密度は、骨芽細胞機能の低下、破骨細胞機能の亢進または両者の混在によってもたらされる。RTT の場合、モデルマウスの解析から主に骨芽細胞の障害が示唆されている。申請者は、ヒトにおいても MeCP2 欠損による骨芽細胞の分化障害とミトコンドリア機能障害を仮定し、患者由来乳歯幹細胞を用いてこれを検証した。

3. 研究の方法

RTT と診断された女児 (MeCP2 遺伝子に欠損を持つ: 図 1) の脱落乳歯から幹細胞を回収した。この段階では、X 染色体不活化の影響により MeCP2 欠損細胞と MeCP2 発現細胞の両方がモザイクで含まれている。MeCP2 欠損細胞は限界希釈法によってさらに分離できる。

この方法で分離された MeCP2 欠損細胞を骨芽細胞に誘導し、骨芽細胞分化マーカーの発現およびミトコンドリア活性を指標とし、どのような障害があるかを調べた (図 2)。本研究では、正常コントロール細胞として、定型発達児から回収された乳歯幹細胞を用いた。

乳歯幹細胞から骨芽細胞への誘導は、過去に報告された方法に準じて行われた (参考文献 2)。要点は、以下のとおりである。乳歯幹細胞を 6 ウェルプレートに播種し、 α MEM でコンフルエントになるまで培養した。次に、 α MEM にリン酸二水素カリウムおよびデキサメタゾンを補充し、28 日間の培養により骨芽細胞に誘導した。

骨芽細胞の石灰化能は、アリザリンレッド染色により評価した。骨芽細胞分化マーカーの発現レベルは、定量的 RT-PCR により解析した。 β カテニンの発現は、非リン酸型 β カテニンに対する抗体を用い、ウエスタンブロットにより解析した。ミトコンドリア機能の評価のために、蛍光色素 JC-1 を用いてフローサイトメーターで膜電位を測定した。

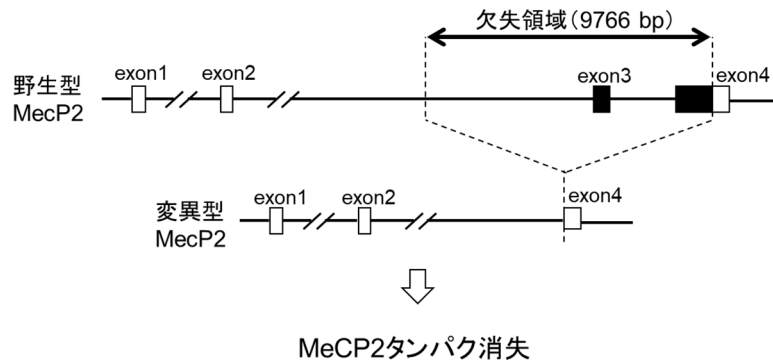


図1

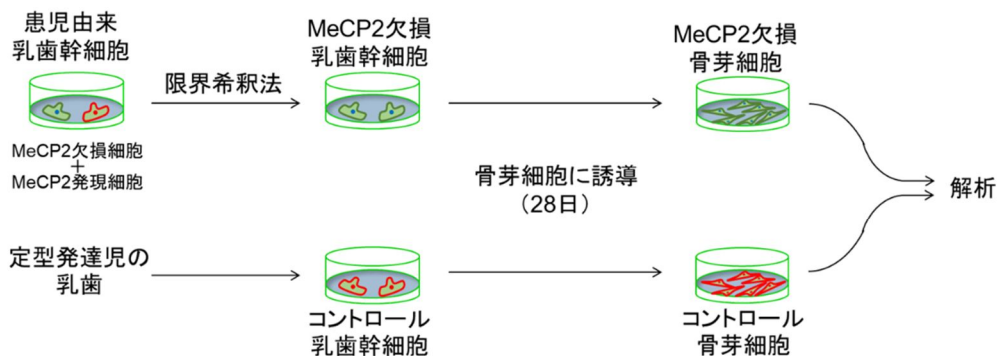


図2

4. 研究成果

(実験結果の要点)

1. 培養 28 日後のアリザリンレッド染色解析では、MeCP2 欠損群の染色強度が低下していた。この結果は、MeCP2 欠損骨芽細胞の石灰化能の低下を示しており、したがって、MeCP2 欠損は骨芽細胞分化の障害をもたらすことが示唆された。
2. これを裏付けるために、骨芽細胞分化マーカーの発現を定量的 RT-PCR により解析した。その結果、MeCP2 欠損群では骨芽細胞分化に必須の転写因子である RUNX2、および骨芽細胞の骨形成能と関連するアルカリフォスファターゼの発現が低下していた。
3. これらの遺伝子発現低下の機序を明らかにするために、骨芽細胞分化に重要なシグナル伝達経路に関与する β カテニンの発現を調べた。ウエスタンブロット解析では、MeCP2 欠損群において活性型 β カテニンの発現が低下していた。
4. 骨芽細胞分化におけるミトコンドリア機能に対する MeCP2 欠損の影響を明らかにするため、ミトコンドリア膜電位を調べた。MeCP2 欠損群では、ミトコンドリア膜電位の低下を認めた。また、MeCP2 欠損群ではミトコンドリア酸化ストレスの指標である活性酸素種の上昇を認めた。

(考察の要点)

1. MeCP2 欠損による骨芽細胞分化の障害機序

Wnt/ β カテニン経路の障害

間葉系前駆細胞から骨芽細胞への分化は、様々なシグナル伝達経路が関与しており、Wnt/ β カテニン経路はその一つである。この経路では、分泌型糖たんぱく質である Wnt リガンドが Frizzled 受容体に結合し、その下流で β カテニンのリン酸化が抑制されることにより活性化される。活性化された β カテニンは、核に移行して様々な遺伝子発現に関与する。骨芽細胞分化では、マスターレギュレーターである RUNX2 が β カテニンの転写標的因子の 1 つである。MeCP2 欠損群では、活性型 (非リン酸化型) β カテニンタンパク質の発現と RUNX2 遺伝子の発現がともに低下していた。したがって、MeCP2 は Wnt/ β カテニン経路の活性化を介して骨芽細胞分化に関与すると考えられ、これが RTT 患者の骨症状の一因となっている可能性がある。

現在、この結果をもとに、MeCP2 欠損に起因する Wnt/ β カテニン経路の障害の分子機序をさらに明らかにすることを目指している。

ミトコンドリア機能障害

ミトコンドリアは、ATP 産生、細胞内 Ca^{2+} 制御、レドックス調節、アポトーシスなど、多様

な機能に関与するため、その機能障害は多くの疾患に関連している。RTT では、MeCP2 欠損により核にコードされるミトコンドリア関連因子の発現変化がミトコンドリア機能障害を引き起こすと考えられる。申請者は、MeCP2 欠損乳歯幹細胞からドーパミン作動性ニューロンへの分化中に、ミトコンドリアの分裂促進因子である DRP1 の発現が低下し、これが神経突起へのミトコンドリア分布を妨げ、神経突起の伸長を障害することを報告した(参考文献 1)。本研究では、MeCP2 欠損骨芽細胞群のミトコンドリアの膜電位低下を明らかにした。ミトコンドリア膜電位は、ATP 生成および Ca^{2+} 移動と共役する電気化学的勾配である。したがって、MeCP2 欠損は、骨芽細胞分化に必要な ATP や石灰化能と関連するミトコンドリア機能を障害する可能性がある。

現在、この結果をもとに、MeCP2 欠損下での骨芽細胞分化におけるミトコンドリア機能障害の分子機序をさらに明らかにすることを目指している。

2. RTT の病態解明研究における乳歯幹細胞の活用

遺伝性疾患の病態解明研究では、原因遺伝子を特定し、その機能解析のために、遺伝子改変生物を用いることが広く行われている。遺伝子ノックアウトマウスはその代表例である。RTT の場合は、主に MeCP2 遺伝子変異を原因とする。これまでに、MeCP2 遺伝子を改変した複数のマウスモデルが確立され、病態解明に重要な貢献をしてきた。一方で、ヒトの疾患の病態機序は、種特異的な要因も多く関与するため、ヒト由来の材料もまた不可欠である。

ヒトの乳歯には、多能性間葉系幹細胞が存在する。この乳歯幹細胞は、骨系統細胞への分化能だけでなく、神経堤起源であることと関連して神経可塑性も示されている。RTT と診断された患児の乳歯には、MeCP2 遺伝子変異を持つ乳歯幹細胞が含まれている。したがって、RTT 患児由来乳歯幹細胞は、神経発達の欠陥とともに骨症状の病態機序を研究するための細胞モデルとなり得る。

申請者は、この点に着目し RTT の神経病態とともに、末梢組織の病態の 1 つである骨症状の病態解明研究のために、乳歯幹細胞を活用することを着想した。また申請者は、小児の歯科口腔医療に従事しており、様々な遺伝性疾患に罹患した小児の乳歯を齲蝕や歯肉炎などの疾患から保護すると同時に、医療廃棄物となる脱落乳歯を得る機会にも恵まれている。本研究により、小児歯科医療が、広く小児の医学研究の進歩にも貢献し得ることを提示できた。

(結論)

本研究では、MeCP2 遺伝子欠損を持つ RTT 患児から得られた乳歯幹細胞を用いて、MeCP2 が骨芽細胞分化に果たす役割に対する新しい洞察が得られた。今後、さらに研究を進めることにより、RTT の骨症状の根底にある分子機序を明らかにし、新規治療薬開発に貢献することを目指す。

参考文献

1. Saki Hirofujii, Yuta Hirofujii, Hiroki Kato, Keiji Masuda, Haruyoshi Yamaza, Hiroshi Sato, Fumiko Takayama, Michiko Torio, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Tomoaki Taguchi, Kazuaki Nonaka. Mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from exfoliated deciduous tooth-derived pulp stem cells of a child with Rett syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Apr 15;498(4):898-904.
2. Hiroki Kato, Xu Han, Haruyoshi Yamaza, Keiji Masuda, Yuta Hirofujii, Hiroshi Sato, Thanh Thi Mai Pham, Tomoaki Taguchi, Kazuaki Nonaka. Direct effects of mitochondrial dysfunction on poor bone health in Leigh syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):207-212.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 山座治義、小笠原貴子、高山扶美子、廣藤雄太、廣藤早紀、木舩崇、佐藤綾子、香川由衣、福本敏	4. 巻 第41巻
2. 論文標題 病診連携によって施行できたNoonan症候群患児の心臓手術前の口腔内感染源への歯科治療の一例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本障害者歯科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 318 324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14958/jjsdh.41.318	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 廣藤 早紀、柳田 憲一
2. 発表標題 こども病院における5年間の全身麻酔下歯科治療の実態
3. 学会等名 日本障害者歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江野由紀子、野瀬可奈子、青木恵美、廣藤早紀、柳田憲一
2. 発表標題 自閉症スペクトラム児の個々の特性に合わせ改良した視覚支援素材
3. 学会等名 日本小児歯科学会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------