

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461568

研究課題名(和文) レット症候群モデルES/iPS細胞のグリア細胞分化と病態メカニズムの解明

研究課題名(英文) Glial cells differentiation of MeCP2 deficient ES/iPS cells and pathophysiology of Rett syndrome

研究代表者

高橋 知之 (TAKAHASHI, TOMOYUKI)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20332687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：レット症候群(RTT)は、X染色体上のMeCP2遺伝子変異が主因の女兒で発症する発達障害である。本研究ではRTTモデル(Mecp2欠損)ES細胞から様々なグリア細胞を分化誘導後、そのグリア細胞の機能評価を行った。Mecp2欠損ES細胞は、それぞれの分化マーカーを発現するアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアに分化した。特にES細胞から効率良く分化するミクログリアにおけるマーカー分子やサイトカインの発現を調べた結果、いくつかの遺伝子発現がMeCP2の有無で変化することを見出した。更に、種々の活性化刺激に対する反応性や食食能を解析し、Mecp2欠損ミクログリアの性状を評価した。

研究成果の概要(英文)：Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder associated with mutations in the methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) gene. Mecp2-deficient ES/iPS cells provide a powerful research tool for disease mechanism studies of RTT. In this study, we found that RTT model (Mecp2-null) ESCs could differentiate into astroglia, oligodendrocyte, and microglia. These results suggest that MeCP2 is not essential for induction of glial cell differentiation. Quantitative RT-PCR analysis revealed that some of microglia marker and cytokine signal genes were lower in Mecp2-null mice than in wild-type mice. These results indicate that loss of MeCP2 leads, either directly or indirectly, to transcriptional dysregulation of these genes in the differentiating microglia. In addition, to confirm the effects of MeCP2 deficiency on microglia function, we investigated the cytokine response and the phagocytic activity of the microglia derived from the wild-type or Mecp2-null cultures.

研究分野：小児神経学

キーワード：レット症候群

1. 研究開始当初の背景

レット症候群 (RTT) は、X 染色体上の転写調節遺伝子である MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2) 遺伝子変異を主因とする主に女児で発症する進行性精神発達障害である。典型的 RTT では出生時は正常、しかし数ヶ月後、発達停滞、1-3 歳頃より急速な言語や運動機能の退行を示し、失調性歩行、てんかん発作や呼吸を含む自律機能の失調を呈し多くは若くして死亡する。2001 年に単一遺伝子変異による発達障害モデルとして Mecp2 欠損マウス (Guy-J, et al., Nat Genetics '01) が作出されて以降、世界中で病態解析が行われており、中枢神経系の Mecp2 欠損が RTT 発症の主因とされている。しかし国内外の RTT 患者、又は Mecp2 欠損マウスの詳細な生理、病理学的な解析や MeCP2 標的遺伝子の同定にも関わらず、未だ RTT 病態発症メカニズムは不明で、治療法の開発も急務である。

これまでの研究から、主な RTT 病態はニューロンにおける Mecp2 欠損による細胞自律的な中枢神経系の異常が原因とされてきた。しかし近年、Mecp2 は脳組織を構成するニューロン以外のグリア細胞においても発現し、ニューロンの細胞非自律的なメカニズムが病態に関わるとする報告が蓄積されつつある。実際、我々も、Mecp2 欠損 ES 細胞やマウスを利用した研究から、Mecp2 欠損はアストログリアの分化やグルタミン代謝に影響し、病態に関わる可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究は MeCP2 欠損した RTT モデル (Mecp2 欠損) ES/iPS 細胞から様々なグリア細胞を分化誘導し、分化誘導したグリア細胞の機能評価を行うことで、MeCP2 欠損によるグリア細胞を介した RTT 発症メカニズムを解明し、治療薬探索による新規治療法の開発を目的としている。

3. 研究の方法

(1) Mecp2 欠損 ES 細胞によるグリア細胞の分化誘導法の確立: Mecp2 欠損 (Mecp2 lox-Stop/y) ならびにコントロール野生型 (Mecp2 lox-Stop/y, Cre; Mecp2 +/y) ES 細胞を以下の方法でそれぞれ、培養することで分化誘導を行った。8 日間の無血清培地にて胚様体 (EBs) 形成により神経幹細胞を誘導後、アストロサイトの分化のために、血清添加培地で培養した。オリゴデンドロサイトは EBs 形成後、ITS 添加培地で 8 日間、その後、N2、bFGF、PDGF 添加培地で 12 日間培養した。一方、ミクログリアは、分化支持細胞と共培養することで分化誘導を行った。それぞれのグリア細胞の分化は、PCR および免疫染色によりマーカー分子の発現解析により評価した。

(2) Mecp2 欠損による ES 細胞のミクログリアの分化に及ぼす影響の解析: MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型 ES 細胞よりミクログリアを誘導後、定量 PCR によってマーカーならびに、刺激反応に関わる遺伝子の発現を解析した。

(3) Mecp2 欠損ミクログリアの機能解析: MeCP2 欠損、ならびにコントロール野生型 ES 細胞よりミクログリアを誘導後、蛍光ビーズの取り込みによる貪食能を比較検討した。

(4) Mecp2 欠損マウスの脳組織におけるミクログリア関連分子の発現解析: 8 週目の MeCP2 欠損、及びコントロール WT マウスの脳におけるミクログリア関連遺伝子の発現を定量 PCR によって解析した。

4. 研究成果

(1) 胚様体形成法により分化誘導後、8日目の胚様体の細胞を分散後、染色したところ Mesp2 欠損の有無にかかわらず、Nestin、A2B5 陽性細胞が観察され、グリア幹細胞が分化誘導できた事が確認された。また、それぞれ 10日、20日培養後、GFAP (アストロサイト)、O4 (オリゴデンドロサイト) のマーカーの発現が観察され、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが分化誘導されている事が確認された。

また、共培養により、分化誘導後、15日目には CD11b、Iba1 の発現が観察され、MeCP2 欠損 ES 細胞において、ミクログリアの分化誘導が確認できた。以上の結果から、MeCP2 欠損 ES 細胞は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアのいずれのグリア細胞にも分化可能であり、グリア細胞の発生・分化に MeCP2 は必須ではない事は明らかとなった。とりわけ、ミクログリアの分化に関しては、浮遊してくる細胞を回収することで、ほぼ 100%に近い純度の目的細胞が得られ、この後、分化誘導ミクログリアに関する解析を進めた。

(2) Mesp2 欠損および、コントロール WT-ES 細胞よりミクログリア分化誘導開始後、5日目、15日目の細胞を回収し、15種類のミクログリア特異的なマーカー遺伝子、免疫反応などに関わる遺伝子発現を定量 PCR によって解析した。その結果、CD11b などマーカー分子のほとんどでは発現が変わらず、免疫反応に関わる機能的な分子においても、MeCP2 欠損グループで若干発現が変わるものがある以外は、ほぼ同様に発現した。また、LPS や IL4 による刺激後の遺伝子発現についても調べたが、僅かに変化を示す遺伝子があるものの、Mesp2 欠損グループで大きく変化する遺伝子は同定されず、ここでも MeCP2 欠損にかかわらず ES 細胞はミクログリアに分化し、

機能的にも問題のないミクログリアが発生・分化している可能性が考えられた。

(3) Mesp2 欠損および、コントロール WT-ES 細胞よりミクログリア分化誘導開始後、15日目の細胞を回収し、蛍光ビーズを添加し、24時間後にそれぞれの細胞が取り込む蛍光ビーズを蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、蛍光ビーズの取り込み量は、Mesp2 欠損グループとコントロール WT で比較して僅かに変化するのは、有意な差はなく、大きな機能的な異常は認めなかった。

(4) Mesp2 欠損および、コントロール WT マウス脳における 25 種類のグリア細胞関連遺伝子の発現を定量 PCR で比較した。その結果、アストロサイトやミクログリアの機能に関わるいくつかの遺伝子で発現が有意に変化することが明らかとなった。

以上の結果から、Mesp2 の有無にかかわらず、ES 細胞は、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア細胞に分化し、MeCP2 はこれらの細胞種の発生・分化に必須でないことが明らかとなった。一方、Mesp2 欠損 ES 細胞由来ミクログリアは、コントロール WT 群に比較して、僅かであるが幾つかの遺伝子で発現変化が認められることから、Mesp2 はこれらの遺伝子の発現制御に関わる可能性が考えられる。

また、変化の認められる遺伝子の関連分子は MeCP2 欠損マウス脳においても発現変化が認められており、今後、これらの因子を足がかりに Mesp2 欠損による病態メカニズムの解明が期待される。

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 6件)(全て査読あり)

1. Goto K., Takemura G., Takahashi T., Okada H., Kanamori H., Kawamura I., Watanabe T., Morishita K., Tsujimoto A., Miyazaki N., Ushikoshi H., Kawasaki M., Mikami A., Kosai K., Minatoguchi S.
Intravenous Administration of Endothelial Colony-Forming Cells Overexpressing Integrin $\beta 1$ Augments Angiogenesis in Ischemic Legs
Stem Cells Transl Med 5: 218-226 (2016) (also Cover & News in the issue of the Journal) doi: 10.5966/sctm.2015-0096
2. Tsuchiya Y., Minami Y., Umemura Y., Watanabe H., Ono D., Takahashi T., Honma S., Kondoh G., Matsuishi T., Yagita K.
Disruption of MeCP2 attenuates circadian rhythm in CRISPR/Cas9-based Rett syndrome model mouse.
Genes Cells 20(12):992-1005 (2015) doi: 10.1111/gtc.12305. Epub 2015 Oct 12.
3. Hara M., *Takahashi T., Mitsumasu C., Igata S., Takano M., Minami T., Yasukawa H., Okayama S., Nakamura K., Okabe Y., Tanaka E., Takemura G., Kosai K., Yamashita Y., Matsuishi T.
Disturbance of cardiac gene expression and cardiomyocyte structure predisposes *Mecp2*-null mice to arrhythmias.
Sci Rep 5:11204. (2015) doi: 10.1038/srep11204. (* Corresponding author)
4. Yuge K., Takahashi T., Khai N. C., Goto K., Fujiwara T., Fujiwara H., Kosai K. Intramuscular injection of adenoviral hepatocyte growth factor at a distal site ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis in mice.
Int J Mol Med 33(5):1064-1074 (2014) doi: 10.3892/ijmm.2014.1686
5. Suda K., Kishimoto S., Takahashi T., Nishino H., Okamura H., Teramachi Y., Yokoyama T., Yasukawa H., Ohbu K., Imaizumi T., Matsuishi T.
Circulating Myeloid Dendritic Cells is Decreased in the Acute Phase of Kawasaki Disease.
J Clin Exp Cardiol 4(10):1000272 (2013) doi: 10.4172/2155-9880.1000272
6. Seki, Y., Mizuochi, T., Kimura, A., Takahashi T., Ohtake, A., Hayashi, S., Morimura, T., Ohno, Y., Hoshina, T., Ihara, K., Takei, H., Nittono H., Kurosawa T., Homma K., Hasegawa T., Matsuishi T.
Two neonatal cholestasis patients with mutations in the *SRD5B1 (AKR1D1)* gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment.
J Inherit Metab Dis 36(3):565-573 (2013)

〔学会発表〕(計 3件)

2015年

- 1) Hara M, Takahashi T, Yamashita Y, Matsuishi T: Change of gene expression is associated with arrhythmias and cardiac structure in *mecp2*-null mice. 2015 レット症候群シンポジウム (大阪) 2015.4.26 千里ライフサイエンスセンター

2014年

- 2) 三井薫、高橋知之、井手佳菜子、小賤健一郎: アデノウイルスベクターでのヒト多能性幹細胞への高効率遺伝子導入技術の開発 第13回日本再生医療学会総会(京都) 平成26年3月4-6日 国立京都国際会館

- 3) Hara M, Takahashi T, Mitsumasu C, Igata S, Takano M, Okabe Y, Tanaka E, Matsuishi T: Analysis of cardiac arrhythmias and gene expression in *Mecp2*-null mouse. 13TH RETT SYNDROME SYMPOSIUM (CHANTILLY, VA, U.S.A.) June 24-26, 2015 Westfields Marriott Washington Dulles

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 知之 (TAKAHASHI TOMOYUKI)
久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 20332687

(2) 連携研究者

松石 豊次郎 (MATSUISHI TOYOJIRO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 60157237

田中 永一郎 (TANAKA EIICHIRO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 80188284

村井 恵良 (MURAI YOSHINAKA)

久留米大学・医学部・准教授
研究者番号: 20352122

岡部 恭典 (OKABE YASUNORI)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 00446098

國貞 隆弘 (KUNISADA TAKAHIRO)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 30205108