様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：１７７０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2017
課題番号：２６８６０８１３

研究課題名（和文）超微形態と独創的実験系によるＲｅｔｔ症候群の「非」神経器官の解析による全病態解明

研究課題名（英文）Pathogenesis by the analysis of "non" nerve organ of Rett syndrome by the original experimental system with ultrastructure.

研究代表者
入江　理恵（Irie, Rie）

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：９０３８１１７８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,800,000円

研究成果の概要（和文）：Rett症候群(RTT)のモデルマウスであるオスのMeCP2遺伝子欠損マウスで観察された、非神経系臓器の形態的変化は、ある生理活性物質分泌異常が原因であると推察し、今回その臓器の培養細胞を用い、再現性に成功した。具体的にはRNAiを用いてMeCP2遺伝子ノックダウン細胞を作製し、生化学的解析により、in vivoでみられた結果を再現できた。この物質の生合成に関与する遺伝子を定量PCRにより解析し、発現変動遺伝子を抽出できた。定量PCRによる解析を網羅的に行わなければならず、最終目標であった真のRTTモデルマウスであるMeCP2遺伝子欠損雌マウスの解析の十分なデータを集めるまでには至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We found that morphological changes in non-neuronal organs observed in male deficient MeCP2 gene mice, Rett syndrome (RTT) model mouse, are due to abnormal secretion of certain physiologically active substances. In the cultured cells that MeCP2 gene knockdown cells using RNAi and reproduced the results seen in vivo by biochemical analysis. The genes involved in the biosynthesis of this substance were analyzed by quantitative PCR and we could extract the expression variable gene. Analysis by quantitative PCR must be performed comprehensively and it was not possible to collect sufficient data for analysis of female mice deficient in MeCP 2 gene which is a true RTT model mouse which was the final target.

研究分野：組織形態学

キーワード：脳・神経　脳・神経疾患　細胞・組織　生理活性　解剖学　超微形態学

１．研究開始当初の背景

Rett 症候群(RTT)は女児のみが罹患する進行性の神経発達障害疾患であり、生後6ヶ月～18ヵ月位の女児の１万～1万5千人に一人の割合で発症し、女性精神遅滞疾患の中では最多の割合である。この疾患は、一見正常に出生した後に退行に気づかれるというエピジェネティクスな特徴を持つ。1999年にX染色体上にあるメチル CpG 結合蛋白である methyl-CpG binding protein 2(MeCP2)遺伝子の変異が RTT 患者の約 80%に認められ、主な原因であることが分かってはいるものの、病態の詳細は未だ不明である。

2010年、共同研究者（本申請の研究協力者である小戝健一郎）らにより MeCP2 欠損 ES 細胞による *in vitro* 神経分化系の研究システムが確立され、「MeCP2 は ES 細胞の未分化維持・神経発生には不可欠ではなく、グリア形成を阻害する機能を持ち、RTT では MeCP2 の変異により異常に増加・発達したグリアにより、間接的にニューロンの成熟変化が起こる可能性がある」と報告された (引用文献)。また、近年「MeCP2 は視床下部で転写の活性化と抑制を行う」内容の論文が発表された(M.Chahrour et.al.,Science,2008)。視床下部が全身の内分泌系の最高中枢器官であることから、視床下部あるいは下垂体が関与する末梢の器官においても MeCP2 遺伝子発現、あるいは形態的な変化が起こっている可能性が類推された。今回の研究で、我々は MeCP2 遺伝子をノックアウトしたマウスでみられた「非」神経組織での形態形成異常に注目し、この形態形成異常が MeCP2 の欠損とどのように関係しているのかを、細胞の形態及び器官形成への関与に焦点を当て、再生医学から組織解剖学へ研究を展開させて RTT 症候群の神経組織ならびに他の器官系への全病態解析を行うという着想に至った。

引用文献;筆者らのグループ
Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. Okabe Y et.al Brain Research (2010)

２．研究の目的

我々は既に雄の MeCP2 遺伝子欠損マウス（MeCP2-/y）を多数繁殖させて様々な研究システムも確立させている(研究協力者の久留米大学高次脳疾患研究所)。ヒトの場合、RTT 男性は胎生致死で解析不能だが、MeCP2-/y マウスは正常に出生の後3～5週頃よりヒト RTT 類似の自発運動や足すくめ等の運動能低下、姿勢異常等の症状を呈した後、生後 80 日以内に前例死亡するという、症状の典型性と MeCP2 の完全欠損という 2 点で「最適の *in vivo* 解析モデル」である。さらに脳において「光学顕微鏡レベル」（電顕ではない）の組織学的解析にほとんど異常が見られないという RTT の特徴も併せ持っている。

我々は既に得ている MeCP2 欠損マウスである他臓器での新規の表現型異常(未発表)に関し、肉眼所見では得られない超微構造・分子解析によりその全貌を明らかにする。また、対象臓器の細胞について *in vitro* で MeCP2 ノックダウンを再現させ、生理活性物質 X の合成機能などの評価を行い、MeCP2 遺伝子に伴う関連遺伝子の変動とこの生理活性物質 X の分泌異常を明らかにする。最終的には真のヒト RTT のモデルマウスとも言える雌の MeCP2+/-マウスで確証する。

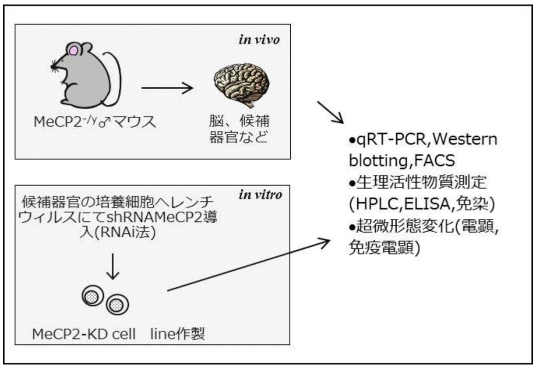
３．研究の方法

MeCP2-/y 雄マウスと野生型マウスの表現系(諸臓器の組織形態)を比較する(*in vivo*)。MeCP2-/y 雄マウスは、雄野生型(X+/Y)と雌 Hetero(X+/X-)を交配・維持している。雄野生型、雄 Hemi(X-/Y)、雌野生型(X+/X+)、雌 Hetero が、いずれも 1/4 の確立で生じる。まず雄 Hemi (X-/Y)マウスの脳あるいは他臓器を採取し、各臓器の肉眼的所見や重量の他、凍結固定後に臓器特異的な蛋白あるいは遺伝子発現について光顕的、免疫電顕的あるいは免疫組織化学的、分子生物学的に解析し、MeCP2 遺伝子が組織形成に関してどのような役割を持つのか、あるいは他の蛋白や産生物質への影響を *in vivo* で比較した(図 1)。

次に、今回 *in vivo* の結果から予想され

たある種の細胞にレンチウィルスベクターを利用したRNAi法によりMeCP2をノックダウンし(図2,4)、形態形成及び生理活性への関与を比較した(*in vitro*)。具体的には、表現系に超微構造的な差異が見られた臓器の培養細胞レベルでの、臓器特異的な産生物質(物質Xとする)あるいは生理活性について調べた。RNAi法によりMeCP2をダウンレギュレートさせたことによるMeCP2遺伝子の、細胞あるいは臓器特異的な機能への関与を *in vitro* で免疫組織細胞化学的・超微形態的に、及び生理活性についてELISAまたはLS/MS等で定量し比較した。表現型に差異が見られた細胞よりRNAを抽出し、定量PCRにより変動遺伝子を抽出した(未発表)。

図1　本研究の計画・方法の概要



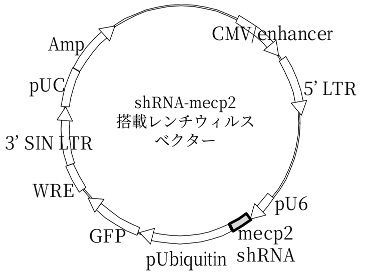


図2　MeCP2遺伝子のノックダウンを目的とした、MeCP2遺伝子に対するshRNAを搭載したレンチウィルスベクター。

目的細胞に高効率で導入するこができ、感染細胞内のゲノムに組み込まれることにより、恒常的にMeCP2がノックダウンされた細胞を得ることができた。また、GFPを搭載することで、遺伝子が導入された細胞を可視化することができた。

４．研究成果

RTTのモデルマウスであるMeCP2遺伝子欠損マウスで観察された、ある臓器の形態変化の原因を解明するために、超微形態観察、免疫染色およびELISAを用いて評価した。電子顕微鏡による観察により、その細胞の超微形態的変化を見出したことから、その臓器を誘導する臓器および生理活性物質Xとその産生細胞についても同様に超微形態観察、免疫染色を行った。予想通り、その細胞に光顕レベルではなく、超微形態レベルで初めて認められた形態異常が観察された。そのため生体内の生理活性物質X分泌異常が原因ではないかと推察し、MeCP2遺伝子欠損マウス生体内でのこの細胞の産生する生理活性物質XをELISAにて評価したところ、有意に生体内濃度が低下していたことが明らかとなった(図3)。

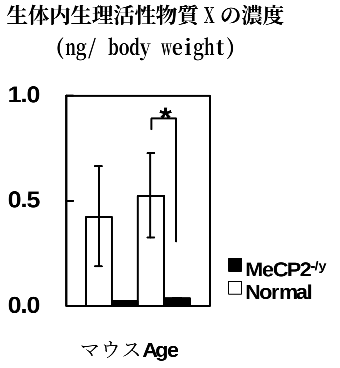


図3　生理活性物質Xの生体内濃度
MeCP2遺伝子欠損マウスではある物質Xの産生量が有意に低下していたことが明らかとなった

さらに、その臓器の培養細胞を用いた *in vitro* での再現を試みた。具体的には対象細胞へshRNAを搭載したレンチウィルスベクターを導入しMeCP2遺伝子のノックダウンを成功させた。MeCP2ノックダウン細胞の性状ならびに機能解析を行い、*in vivo* で見られた生理活性の分泌異常を再現することができた(図4)。この結果から、RTTモデルマウスで見られた物質Xの減少が、MeCP2遺伝子のノックダウン(ノックアウト)によるものであると示唆された。

当初は想定していなかったこの現象のメカニズム解析の必要が生じたため、MeCP2ノックダウン細胞よりRNAを抽出し、定量PCRを行い、生理活性物質Xの合成Pathwayに関与する遺伝子変動を網羅的に解析している段階で、研究機関が終了した。研究期間中に論文投稿、学会発表などにより社会に発信することを目指したが、論文投稿、学会発表には間に合わなかった。

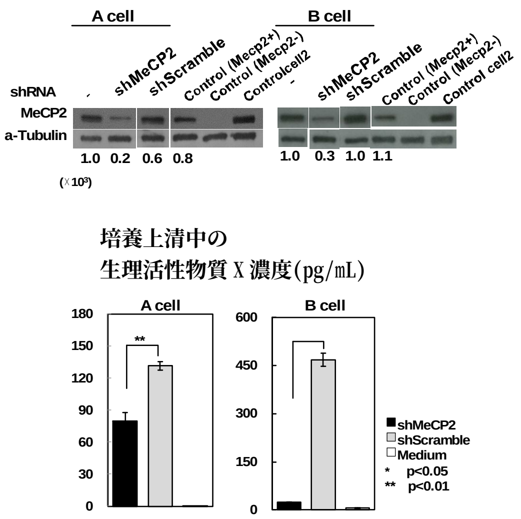


図4 物質Xの培養細胞レベルでの濃度
MeCP2遺伝子をノックダウンした細胞ではでは、物質Xの産生量が有意に低下しており、生体内での現象を再現することができた。同種の2つの細胞株(A細胞とB細胞)の両者で同じ結果を得ることができた。

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２件）

(1) Kaoru Mitsui, Kanako Ide, Akiko Takayama, Tadahisa Wada, Rie Irie and Ken-ichiro Kosai. Conditionally replicating adenovirus prevents pluripotent stem cell-derived teratoma by specifically eliminating undifferentiated cells. Molecular Therapy – Methods & Clinical Development (2015) 2:15026

(2) Kouichi Sakamoto, Ngin Cin Khai, Yuqing Wang, Rie Irie, Hideo Takamatsu, Hiroshi Matsufuji, Ken-ichiro Kosai. Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-Like Growth Factor and Hepatocyte Growth Factor Inhibit Cholestatic Liver Injury in Mice via Different Actions. International Journal of Molecular Medicine 38: 1673-1682 (2016).

〔学会発表〕（計１件）

入江理恵・坂本浩一・小戝健一郎「胆道閉塞性肝障害マウスモデルにおけるHB-EGFとHGFの異なる再生・治療作用の特性」第121回日本解剖学会総会全国学術集会(郡山市)2016年3月

〔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
http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/

6．研究組織

(1)研究代表者

入江　理恵　（ Irie Rie ）
鹿児島大学学術研究院　医歯学域医学系　運動機能修復学講座　遺伝子治療・再生医学分野　助教
研究者番号：90381178

(2)研究分担者
なし

(3)研究協力者

小戝健一郎(Kosai Ken-ichiro)

鹿児島大学学術研究院　医歯学域医学系
運動機能修復学講座　遺伝子治療・再生医学分野 教授
研究者番号：90301663