

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790756
 研究課題名 (和文) Rett 症候群モデル胚性幹 (ES) 細胞による病態解明と治療法の開発
 研究課題名 (英文) Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2-Null Embryonic Stem Cells
 :A System for Studing Rett Syndrome
 研究代表者
 岡部 恭典 (OKABE YASUNORI)
 久留米大学・医学部・助教
 研究者番号：00446098

研究成果の概要 (和文)：

これまで申請者の施設において、Rett 症候群 (RTT) モデルマウスを用いた遺伝子治療と再生医療法の開発を行ってきた。(論文準備中) また、ウイルスベクターを用いた Cre リコンビナーゼ処理によって RTT の原因遺伝子である MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2) 遺伝子を欠損させた RTT モデル ES 細胞を作製することに成功している。本研究課題では、RTT モデル ES 細胞を神経系細胞へと分化誘導し、分子生化学的・電気生理学的手法を用いる事によって MeCP2 遺伝子の変異が神経細胞の分化・成熟に対し与える影響を解析し、MeCP2 欠損による病態形成機構の解明を行った。

研究成果の概要 (英文)：

Mutations in methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) gene cause Rett syndrome (RTT), a neurodevelopmental disorder that is the leading cause of mental retardation in females. We have developed a novel RTT model system that enables examination of the role of MeCP2 throughout development at the cellular level. Our study examining MeCP2 null ES cells during *in vitro* neuronal differentiation showed that MeCP2 is not essential for the maintenance or growth of undifferentiated cells or for the progression of neurogenesis. However, MeCP2 is required for the maturation of ES cell-derived neurons and for normal voltage-gated Na⁺ currents and I_As. Furthermore, we showed that MeCP2 deficiency led to dramatically increased gliogenesis. Our novel experimental system has permitted us to address both important issues in MeCP2-related developmental biology and controversies regarding the pathogenesis of RTT, and may aid in the development of therapeutic strategies for RTT in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：再生医学、遺伝子疾患、脳神経疾患、胚性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群 (RTT) は主に女兒が罹患する先天性疾患であり、最終的には重篤な精神発達障害・呼吸を含む自律機能の失調を呈し、大多数は早期に死亡する。近年の研究により中枢神経における MeCP2 遺伝子の変異が原因として同定されたが、現在に至るまで病態メカニズムを十分に説明する事が可能な脳組織の構造上の欠陥や変性を示す病理学的所見、分子生化学学的な機能障害の特定には至っていない。進行性に miserable な転帰を持つ当該疾患に対し、疾患の治療法開発・病態形成機構の解明が急務とされている。

2. 研究の目的

申請者の施設において、ウイルスベクターを用いた Cre リコンビナーゼ処理によって RTT の原因遺伝子である MeCP2 遺伝子を欠損させた RTT モデル ES 細胞を作製することに成功している。本研究では、RTT モデル ES 細胞を神経系細胞へと分化誘導し、分子生化学的・電気生理学的手法を用いる事によって MeCP2 遺伝子の変異が神経細胞の分化・成熟に対し与える影響を解析し、MeCP2 欠損による病態形成機構の解明を目的としている。

3. 研究の方法

(1) RTT モデル ES 細胞/コントロール ES 細胞株の樹立と分化誘導系の確立

ES 細胞株に Cre 処理を行い、RTT モデル ES 細胞株を作成する。次に各種の神経系細胞分化誘導法により分化した神経系細胞を比較し、解析に最も適すると思われる分化誘導方法を決定する。

(2) 分化誘導した神経細胞の電気生理学

的・分子生化学的解析の実施

適切な神経系細胞分化誘導法を確立した後に、その神経細胞を用いた電気生理学的・分子生化学的な解析を行い、MeCP2 の変異が神経細胞の分化・機能成熟に与える影響を評価し、病態形成機構の解明を行う。

(4) 分化誘導した神経細胞の経時的な遺伝子発現の解析

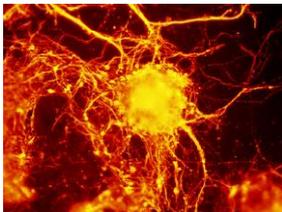
ES 細胞より神経細胞が分化する際には、多能性を司る遺伝子の抑制と神経特異的な遺伝子の発現が起こっていると考えられる。この遺伝子発現の変化に与える MeCP2 の影響を解析するため、ES 細胞より神経細胞が分化する期間の、複数の段階においてサンプルを採取し、マイクロアレイによる解析を行い経時的な遺伝子発現の変化に対する MeCP2 の影響について広範な解析を試みる。

4. 研究成果

(1) RTT モデル ES 細胞を用いた神経細胞分化誘導法の開発。

従来からの ES 細胞からの神経系細胞の分化誘導法には胚様体 (embryoid body: EB) を用いた方法、レチノイン酸を用いた方法等が存在する。しかし、EBs を用いた方法では神経細胞の分化効率は低く、多様な分化細胞が共存するため神経細胞単独を標的とした解析が困難とされている。また、レチノイン酸には催奇性が認められ、分化した神経細胞の性状に対し疑問符が呈されている。これらの従来の方法が持つ問題に対し、今回我々が採用した特定の間質細胞との共培養系を用いた分化誘導法は、非常に高効率で中枢神経系に存在する神経細胞に性質が近似した神経細胞の分化を誘導する事ができる。また、分子生化学的・電気生理学的

な解析からも分化した神経細胞に正常な神経マーカーの発現と活動電位の誘導を認め、この分化誘導の方法が中枢神経細胞に変異が存在すると想定される RTT の病態を解析するのに最も適した分化誘導系である事が示された。



共培養系分化誘導法を用いて神経細胞へ分化した RTT モデル ES 細胞

(2) 共培養系分化誘導法を用いた神経細胞の分子生化学的解析

分子生化学的手法を用いて、上記の間質細胞との共培養系により分化誘導された神経細胞の分化マーカー発現時期および発現量に対して MeCP2 欠損が与える影響の評価を行った。結果として ES 細胞から神経細胞の分化が開始する時期および分化頻度については RTT モデル ES 細胞とコントロール ES 細胞との間に明らかな差異は認められなかった。しかし、特定の脳組織構成細胞において RTT モデル ES 細胞の著明な分化亢進が認められた。

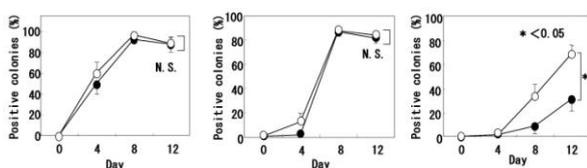


図 2：神経系分化誘導した RTT/コントロール ES 細胞の細胞特異的のマーカー蛋白質発現の経時的変化 (左：神経細胞マーカー 中：神経細胞機能マーカー 右：特定脳組織構成細胞マーカー) (○：RTT モデル ES 細胞 ●：コントロール ES 細胞)

(3) 共培養系分化誘導法を用いた神経細胞の分子生化学的解析

RTT モデル ES 細胞、コントロール ES 細胞

由来の神経細胞に対し、電気生理学的な膜特性の解析を行った。いずれの由来神経細胞においても、与えられた電気刺激に反応した活動電位の発生を認め、神経細胞としての機能を所有した細胞の分化が確認された。更なる解析によって、活動電位の形状に差異を認め、活動電位を形成するイオンチャンネルの成熟度に差が存在する事が判明した。

(4) RTT の病態機構形成解析に用いる新たな解析系の開発

特定の間質細胞を用いた分化誘導法を用いる事により、RTT モデル ES 細胞とコントロール ES 細胞の両方から正常な分化マーカーを持つ神経細胞を高率に、分化時期・頻度に明らかな差異を生じる事なく誘導する事が可能である事が確認された。さらに、電気生理学的な解析により、この誘導法により分化誘導された RTT モデル ES 細胞由来の神経細胞は神経細胞としての性状を保持しているものの、イオンチャンネルの成熟度に変化が生じる事が確認された。以上の結果より、本研究により RTT の病態形成機構を解析するのに適した ES 細胞を用いた神経系細胞の分化誘導系を確立することができ、今後の RTT の病態解明・治療法の開発に関し重要な研究と位置づけられる。

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 1 件) (査読あり)

Eiichiro Tanaka, Toshiyuki Tobita, Yoshinaka Murai, Yasunori Okabe, Aya Yamada, Tatsuhiko Kano, Hideho Higashi, Koki Shimoji

Thiamylal antagonizes the inhibitory effects of dorsal column stimulation on dorsal horn activities in humans

Neuroscience Research 64, 391-396 (2009)

〔学会発表〕（計0件）

〔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.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡部 恭典 (OKABE YASUNORI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：00446098