

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10387

研究課題名(和文) 自閉症児由来乳歯歯髄幹細胞を活用した酸化ストレスとミトコンドリアとの関係解明

研究課題名(英文) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neuropathology of ASD

研究代表者

増田 啓次 (Masuda, Keiji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：60392122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉スペクトラム症(ASD)とダウン症候群(DS)は、酸化ストレスとドーパミン作動性システムおよびミトコンドリア機能の不全を含む多くの神経病理において重複している。一方で、DSは、ASDとは異なり、遺伝的要因が明確である。この研究では、DS患児由来の乳歯歯髄幹細胞から誘導したドーパミン作動性ニューロンを解析した。その結果、ドーパミン再利用の調節不全が、ダウン症候群におけるドーパミン作動性システムの酸化ストレスおよびミトコンドリア機能障害に寄与すると結論づけられた。この成果は、多因子性疾患であるASDのドーパミン作動性システム障害の病態解明に結び付くと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの脳を広範囲に解析することには多くの制限がある。患者由来の幹細胞は、疾患の神経細胞表現型のいくつかの側面をモデル化することができる有用な代替手段である。本研究の成果は、九州大学病院小児歯科・スペシヤルニーズ歯科部門に来院した神経発達障害の患児から供与された乳歯の幹細胞を、基礎研究に活用することによって得られた。様々な神経発達障害児に対する歯科臨床は、障害児の歯科口腔領域の保健衛生と発達支援を主目的とする。一方、歯科医学分野の基礎研究として脱落乳歯を活用した脳の病態解明研究は、障害児が抱える全身疾患への理解を深め、安全な歯科診療マネジメントの確立と小児医学の進歩に貢献することができる。

研究成果の概要(英文)：Autism spectrum disorder (ASD) and Down syndrome (DS) overlap in many neuropathology, including oxidative stress and dysfunction of the dopaminergic system and mitochondria. On the other hand, genetic abnormality is clear in DS, unlike ASD. In this study, dopaminergic neurons induced from deciduous teeth-derived dental pulp stem cells of children with DS were analyzed. The data support that dysregulation of intracellular dopamine recycling contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction of the dopaminergic system in Down syndrome. These results will lead to a better understanding of the pathogenesis of dopaminergic system dysfunction in ASD, a multifactorial disease.

研究分野：小児口腔医学分野

キーワード：乳歯歯髄幹細胞 酸化ストレス ミトコンドリア 自閉スペクトラム症 ダウン症候群 ドーパミン作動性ニューロン

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

(1) 自閉スペクトラム症(ASD)の要因

自閉スペクトラム症(ASD)は、ニューロン発達やシナプス形成などに異常をきたす神経発達障害であり、多くの関連遺伝子が推定されているが原因や発症機序は解明されていない。近年の急激な ASD 発症率の増加は、遺伝的要因だけでは説明ができず、環境要因が大きく関与すると考えられている。酸化ストレス障害は、神経発達に悪影響を及ぼす可能性のある環境因子の一つであり、様々な神経発達障害の要因となり得る。

(2) 酸化ストレス障害とミトコンドリア

酸化ストレス障害は、過剰に生成された活性酸素種(ROS)によるタンパク、核酸、脂質など細胞成分の障害であり、ROS 産生と抗酸化能との不均衡に起因する。ミトコンドリアは、酸化的リン酸化を介した主要な ROS 発生源であり、過剰な ROS 産生を回避するための抗酸化能も合わせ持つ。これまでの研究では、ASD 患者由来の血液細胞において抗酸化能の異常とミトコンドリア障害が示されている。しかし、ASD 病態の本体であるヒトの脳を研究するためには多くの制限があるため、酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害が ASD の神経発達病理にどのように寄与しているかは十分に解明されていない。

(3) ヒト乳歯髄幹細胞(SHED)の脳研究への活用

ヒト乳歯髄幹細胞(SHED)は、間葉系幹細胞として骨、軟骨、脂肪だけでなく、ドーパミン作動性ニューロン(DN)にも分化誘導できる。脳のドーパミン作動系は、報酬、動機付け、学習および記憶など、多様な精神活動に関与し、多くの神経発達障害において、その機能異常が示唆されている。これまで、申請者らは、様々な神経発達障害児由来の SHED を DN に誘導し、酸化ストレスとミトコンドリアに焦点を当てて病態解明研究に取り組んできた。ASD の症状はドーパミン作動系の機能低下とも関連することから、ASD 児由来の SHED から誘導した DN は、疾患特異的細胞モデルとなり得る。

(4) ダウン症候群(DS)の神経病理と ASD

ダウン症候群(DS)は、配偶子形成の重要期に余分な 21 番染色体が生じることによって引き起こされる遺伝性疾患である。DS と診断された患者の主な併存症の 1 つに ASD が知られている。また、DS の病態には酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害が関与するとされるが、その機序は完全に解明されていない。したがって、DS と ASD との間には、未解明な共通の神経病理学的機序が存在すると推定される。DS は、ASD とは異なり、遺伝的要因が明確であるため、ASD の酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害の遺伝学的モデルとなり得る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ASD 患者由来 SHED を用いて、DN の発達障害の病理学的機序を、酸化ストレスとミトコンドリアに焦点を当てて明らかにしようとした。

ただし、ASD は、遺伝的要因と環境要因が発症に関与する多因子疾患である。本研究計画においても、各患児の症状・遺伝的背景の不均一性が解析結果に反映され、ばらつきの原因となる可能性が予想された。実際に、得られた実験データは予想通り、かなりのバラツキを示した。そこで、ASD の代替モデルとして、あらかじめ準備・計画していた DS 患児由来 SHED の解析を並行して実施し成果を得た。以下にその概略を述べる。

3. 研究の方法

(1) SHED から DN への誘導

DS 患児由来 SHED と対照群として定型発達児由来 SHED をそれぞれ DN に誘導した(それぞれ DS-DN と Ctrl-DN)。SHED から DN への誘導は、申請者が所属する研究室で使用されている 2 段階法で行った。第 1 ステップでは、上皮成長因子、塩基性線維芽細胞成長因子および N2 補充液を中心とした培養液で培養を行い、第 2 ステップでは、B27 サプリメントを中心とした神経基礎培地に交換し DN へ分化誘導した。

(2) SHED から誘導した DN の形態学的研究

最大神経突起長および神経突起分岐の総数を測定するために、 α -tubulin III および DAPI で染色した写真を取得し、DS-DN と Ctrl-DN の各 30 個の細胞を、MetaMorph ソフトウェアの Neurite Outgrowth モジュールで解析した。

(3) リアルタイム定量 PCR を用いた遺伝子発現解析

細胞から RNA を抽出し、1st strand cDNA 合成しリアルタイム定量 PCR を行った。標的遺伝子の相対的発現レベルは、ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 の発現に正規化し、比較閾値サイクル法を用いて解析した。

(4) small interfering RNA (siRNA)を用いた遺伝子ノックダウン

DN 誘導の第一ステップで、Lipofectamine を用いて標的遺伝子およびネガティブコントロールに対する siRNA をトランスフェクションした。予め設計された siRNA は Sigma-Aldrich 社か

ら購入した。ノックダウン効率は、標的遺伝子の mRNA 発現量を RT-qPCR により評価した。

(5) ドーパミン量の測定

細胞内ドーパミン量は、ドーパミンと TH (細胞面積として) の免疫染色画像を取得し、DS-DN と Ctrl-DN の各 30 個の細胞について、ドーパミンのシグナル強度を TH 染色された面積で割って、単位面積当たりのドーパミンシグナル強度を評価した。

細胞外ドーパミンは、ELISA 法を用いて測定した。KCl 刺激条件下で細胞外ドーパミンを測定するために、細胞を 50 mM KCl で 37 °C、1 分間処理した後、培地を採取した。

(6) ROS レベルの測定

細胞内およびミトコンドリアの ROS レベルは、それぞれ CellROX Green および MitoSOX red によって染色した。フローサイトメーターを用いて蛍光シグナルを測定した。これ加えて、ミトコンドリア ROS レベルの解析には、共焦点顕微鏡も用いた。細胞を MitoSOX Red および MitoTracker Green FM で染色し、取得した蛍光画像の蛍光強度を測定した。MitoSOX Red の蛍光強度を MitoTracker Green FM の蛍光強度で割って、DS-DN と Ctrl-DN のミトコンドリア量の違いを正規化した。

(7) ミトコンドリア機能の測定

ミトコンドリア膜電位 (MMP) は、JC-1 を用いて測定した。細胞を JC-1 で処理した後、フローサイトメーターで JC-1 の赤と緑のシグナルを測定した。JC-1 の赤と緑の蛍光強度の幾何平均を計算し、赤/緑の蛍光の比率を算出した。

細胞内 ATP レベルは、CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて測定した。

細胞内ミトコンドリア量は、Tom20 (ミトコンドリア領域) および TH (細胞領域) を免疫染色し、Tom20 染色面積を TH 染色面積で割って、細胞面積当たりの総ミトコンドリア量とした。

神経突起におけるミトコンドリア分布は、DS-DN と Ctrl-DN の各 30 個の細胞を蛍光画像からランダムに選び、少なくとも 1 つの Tom20 染色領域を持つ神経突起数および全神経突起数を手作業で数えた。その後、前者の数を後者の数で割って、ミトコンドリアを含む神経突起の割合を決定した。

4. 研究成果

(1) DS-DN の分化、形態および ROS レベルの解析

DS-DN の神経突起の成長は、Ctrl-DN と比較して低下していた。DN の分化マーカー発現については、DS-DN では神経伝達物質ドーパミンの再利用に關与する DAT1 が上昇し、VMAT2 は低下していた。これらの発現変化の機序について解析を進めた。過去の研究では、DAT1 の発現は DLK1 によって抑制され、VMAT2 の発現はプロモーター領域の高 CpG メチル化によって抑制されることが知られている。そこで、まず DLK1 の発現レベルを調べたところ、DS-DN では DLK1 の発現が低下していた。また、Ctrl-DN の DLK1 遺伝子をノックダウンしたところ、ノックダウン群では DAT1 が上昇した。次に、VMAT2 のプロモーター領域の CpG メチル化レベルを調べたが、DS 群と Ctrl 群の間に違いはなかった。詳細な分子機序は完全に解明されていないが、DS 群では、細胞内ドーパミンのホメオスタシス制御に關与する DAT1 および VMAT2 の発現が変化しており、これが DN の神経突起の成長に悪影響を与えることが示唆された。また、21 トリソミーは、DN において DLK1 の発現低下を介して DAT1 の発現を上昇させることがわかった。

(2) DS-DN の DAT1 発現上昇と細胞内ドーパミン蓄積との関連性

DAT1 は、細胞外に放出されたドーパミンを再利用するために、ドーパミンを細胞内に取り込むトランスポーターである。VMAT2 は、サイトゾルの遊離ドーパミンを分泌小胞に取り込むトランスポーターである。両者の働きのバランスが崩れると、サイトゾルの遊離ドーパミンが増加する。この遊離ドーパミンは、容易に酸化されて様々な有害なフリーラジカルに変換され、細胞に酸化ストレス障害を与え得る。DS-DN で観察された DAT1 の高発現と同時に VMAT2 の低発現は、細胞内の遊離ドーパミンを増加させ、酸化ストレス障害となる可能性がある。この可能性を検証するために、まず細胞内ドーパミンレベルを調べた。DS-DN では、無刺激時 (基底状態) の細胞内ドーパミンレベルが Ctrl-DN よりも高かった。ただし、ドーパミン分泌を誘導するために KCl で刺激すると、両群の細胞内ドーパミンレベルは一旦、同レベルまで減少し、その後、再びそれぞれの基底レベルまで回復した。次に、DS-DN における細胞内ドーパミン蓄積における DAT1 の役割を、DAT1 遺伝子ノックダウンによって評価した。この処理により、DS-DN の細胞内ドーパミンレベルが減少した。逆に、Ctrl-DN では、DLK1 をノックダウンすると DAT1 の発現が上昇し、細胞内ドーパミンの蓄積を引き起こした。

これらの結果から、DS-DN では、刺激による一過性のドーパミン分泌能に明らかな欠陥はな

いが、DAT1 の高発現により細胞内ドーパミンの構成的な蓄積をもたらす可能性がある。

(3) DS-DN のドーパミン蓄積による酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害

DS-DN における細胞内ドーパミンの蓄積が、活性酸素レベルの上昇に参与している可能性を検討した。DS-DN では、細胞内およびミトコンドリア分画の ROS はともに上昇していた。DAT1 遺伝子ノックダウンにより細胞内ドーパミンが減少した DS-DN では、ROS が減少した。逆に、DLK1 遺伝子ノックダウンにより DAT1 が上昇した Ctrl-DN では、ROS が上昇した。細胞内の遊離ドーパミンレベルを直接測定することは技術的制限のためにできなかったが、これらの結果は、細胞内のドーパミンの蓄積が DS-DN の ROS 上昇に参与している可能性を示している。

次に、神経突起の成長に重要であり、酸化ストレス障害に敏感なミトコンドリア機能を解析した。DS-DN では、ミトコンドリアの酸化的リン酸化活性を示す MMP と ATP レベルがともに Ctrl-DN に比べて低下していた。21 番染色体にコードされるミトコンドリア生成の抑制因子である NRIP1 の発現は、DS-DN で上昇していた。ミトコンドリア生成のマスターレギュレーターである PGC-1 の発現は、DS-DN で減少していた。細胞面積あたりのミトコンドリア量とミトコンドリアを含む神経突起の割合は、DS-DN で減少していた。したがって、DS-DN におけるミトコンドリアの酸化的リン酸化と生成の障害を示唆した。

(4) 研究成果のまとめ

DS 患児由来 SHED から誘導した DS-DN は、形態学的に神経突起の成長障害を示した。DS-DN では、DLK1 の発現低下を介した DAT1 の発現上昇が、細胞内ドーパミンの蓄積と活性酸素の上昇に参与している可能性を明らかにした。DS-DN における細胞内ドーパミンレベルの調節障害は、酸化ストレスおよびミトコンドリア機能障害を引き起こし、ドーパミン作動性システムの発達障害をもたらす可能性がある。DS 患児由来 SHED は、DS の神経病態を解析するための細胞モデルとして有用であることを示した。

(5) 今後の展望

DS は、21 番染色体のトリソミーを原因とする。主な機序は、21 番染色体上に存在する遺伝子量の増加によると考えられてきた。しかし、最近の知見では、DS 患者の全ゲノムには、細胞型特異的なエピジェネティック変化、特に DNA メチル化の差異も報告されている。したがって、発現が変化する遺伝子は、極めて多数に上ると考えられる。これらの遺伝子の中には、ASD の神経病態に参与するリスク遺伝子も含まれる可能性がある。本研究成果は、ASD における酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害の発生機序の手がかりとして活用する予定である。さらに、ASD 症状を合併する他の神経発達障害として Rett 症候群がある。これは、MECP2 の単一遺伝子異常を原因とする。Rett 症候群も、数多くの遺伝子発現が影響を受け、酸化ストレス障害とミトコンドリア機能障害も示す 1 例である。これらの遺伝子型が異なる神経発達障害において、酸化ストレスとミトコンドリアの障害が共通の表現型であることは、いくつかの病理学的機序を共有している可能性がある。本研究は、DS にとどまらず、他の神経発達障害の病態解明への展開も期待される。

申請者は、大学病院において小児・障害児の歯科臨床に従事している。歯科臨床における障害児の安全管理は、障害児が抱える全身疾患に対する深い専門的理解を必要とする。しかし、原因遺伝子や発生機序が不明で、有効な治療法も確立されていない疾患も数多く存在する。障害児の疾患の本質を理解するために、様々な取り組みがなされている。その中で、疾患の病態解明を目的とした基礎研究は、有効な取り組みの 1 つである。そのために、遺伝子改変マウスやノックアウト細胞株は、重要な研究材料であるが、その作製には多大な費用と時間を要する。一方、歯科臨床の過程で障害児から供与された歯髄幹細胞は、それ自体で疾患の遺伝型を再現する優れた細胞モデルである。また、保存不可能と診断され抜去された歯の多くは医療廃棄物となる。引き続き、これらを病態解明研究に有効活用することは、障害児に対する安全な歯科診療環境を整備・確立するための基盤となるとともに、広く小児医療の発展に貢献すると期待される。

< 引用文献 >

Xiao Sun, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Xu Han, Yuta Hirofuji, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda; Dopamine-related oxidative stress and mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from deciduous teeth-derived stem cells of children with Down syndrome, FASEB BioAdvances. 2022. DOI: 10.1096/fba.2021-00086

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Xiao Sun, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Xu Han, Yuta Hirofuji, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda	4. 巻 -
2. 論文標題 Dopamine-related oxidative stress and mitochondrial dysfunction in dopaminergic neurons differentiated from deciduous teeth-derived stem cells of children with Down syndrome	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FASEB BioAdvances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fba.2021-00086	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 Xiao Sun, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Michiko Torio, Xu Han, Yu Zhang, Yuta Hirofuji, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda	4. 巻 26
2. 論文標題 Impaired neurite development and mitochondrial dysfunction associated with calcium accumulation in dopaminergic neurons differentiated from the dental pulp stem cells of a patient with metatropic dysplasia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100968	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 Keiji Masuda, Xu Han, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Yu Zhang, Xiao Sun, Yuta Hirofuji, Haruyoshi Yamaza, Aya Yamada, Satoshi Fukumoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells for Modeling Genetic Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052269	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 Huong Thi Nguyen Nguyen, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Haruyoshi Yamaza, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Kazuaki Nonaka, Keiji Masuda	4. 巻 513
2. 論文標題 Positive effect of exogenous brain derived neurotrophic factor on impaired neurite development and mitochondrial function in dopaminergic neurons derived from dental pulp stem cells from children with attention deficit hyperactivity disorder	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1048-1054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuangshan Dong, Takashi Kifune, Hiroki Kato, Xiao Sun, Xu Han, Yu Zhang, Hiroshi Sato, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda
2. 発表標題 メラトニンは自閉症スペクトラム障害児の乳歯由来幹細胞の神経発達を改善する
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xiao Sun, Hiroki Kato, Xu Han, Yu Zhang, Hiroshi Sato, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda
2. 発表標題 ダウン症候群の乳歯歯髄幹細胞から分化したドーパミン作動性ニューロンにおける神経突起発達とドーパミン調節障害
3. 学会等名 第63回日本小児神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Xiao Sun, Hiroki Kato, Hiroshi Sato, Michiko Torio, Xu Han, Yu Zhang, Yuta Hirofuji, Takahiro A. Kato, Yasunari Sakai, Shouichi Ohga, Satoshi Fukumoto, Keiji Masuda,
2. 発表標題 Impaired neurite development and mitochondrial dysfunction associated with calcium accumulation in dopaminergic neurons differentiated from the dental pulp stem cells of a patient with metatropic dysplasia
3. 学会等名 第42回日本生物学的精神医学会年会（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究分担者	加藤 大樹 (Kato Hiroki) (30452709)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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