

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10172

研究課題名(和文) ヒト歯髄由来幹細胞から神経系細胞への分化誘導と特性解析

研究課題名(英文) Characterization of neuron-like cells differentiated from human dental pulp stem cells

研究代表者

白川 哲夫 (SHIRAKAWA, Tetsuo)

日本大学・歯学部・特任教授

研究者番号：00187527

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)：レット症候群女児および健常女児の歯髄由来の間葉系幹細胞(MSCs)について、幹細胞専用培地を用いて培養したのち細胞表面抗原の発現を調べた。88種の抗原のうちCD69のみがレット症候群女児由来MSCsに強発現していた。CD69mRNA量はTNF-刺激に対し濃度依存的に増加した。レット症候群女児由来MSCsの不死化ならびに神経細胞への分化誘導を目的としてhTERT遺伝子導入を試みた。健常女児由来MSCsについてG418耐性のhTERT遺伝子導入細胞を得ることができた一方で、レット症候群女児由来MSCsでは同遺伝子導入の過程で細胞の活性が著しく低下し神経細胞への分化誘導には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レット症候群女児歯髄由来の間葉系幹細胞(MSCs)について、健常女児歯髄由来のMSCsと比較して明らかに増殖能が低くまた老化が早いことに加えて、Lipofectamineによる遺伝子導入処理に脆弱であることが判明した。レット症候群女児由来MSCsに強発現していたCD69はリンパ球の早期活性化マーカーとして知られているが、レット症候群の症状や遺伝子導入処理での細胞脆弱性との関連は不明である。CD69については近年、脳常在性の制御性T細胞での発現が報告されており、制御性T細胞が脳内での過剰な炎症反応を抑制していることが示唆されることから、レット症候群の病態解明における標的分子の1つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the dental pulp of a girl with Rett syndrome and healthy girls were cultured in a stem cell-specific medium. Among the 88 cell surface antigens examined, only CD69 was strongly expressed in MSCs derived from the Rett girl. The expression of CD69 mRNA increased in a concentration-dependent manner upon TNF- stimulation. Subsequently, hTERT gene transfection was attempted to immortalize the MSCs derived from the Rett girl as a necessary step for their differentiation into neurons. While the transfection of G418-resistant hTERT gene using Lipofectamine into MSCs from the healthy girls was successfully achieved, the same process was not completed in the MSCs from the Rett girl because of a serious decline of cell activity during the hTERT gene transfection. As a result, differentiation of MSCs derived from the Rett girl into neurons was not achieved.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ヒト歯髄 エピジェネティクス 間葉系幹細胞 神経細胞 レット症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系の異常に起因する疾患について治療法を検討する場合、研究方法の一つとして、対象となる神経細胞を入手して薬物応答性などを調べることが考えられるが、患者の神経細胞を直接採取することは倫理的観点から通常認められない。この問題はヒト由来 iPS 細胞から神経細胞を分化誘導することで克服されつつあるが、患者から採取した細胞から iPS 化するまでの効率に課題があり、準備に多くの時間や労力を要する。それに対して、医療上の必要性があつて患者から抜去した歯から分離培養した間葉系幹細胞(以下、MSCs)を用いる場合は、iPS 化における時間的な問題を回避することが可能で、短期間で神経系細胞に分化させることができれば疾患発症に関わっている異常の探索に効率よく活用できる。

本研究では、中枢性無呼吸などの症状を呈するレット症候群患者から採取した歯髄 MSCs を神経系細胞に分化誘導して分子生物学的、および神経生理学的な解析を行うことを企図した。方法として、まず間葉系幹細胞専用培地を用いてレット症候群患者 1 名から得られた歯髄細胞群から MSCs のコロニーを分離し、続いて FGF2 を含む神経系細胞への分化誘導培地で MSCs を培養して、神経細胞の性質を有する細胞に分化誘導することを計画した。なおレット症候群患者由来の MSCs について増殖能ほか細胞活性に何らかの問題が確認された場合は、hTERT 遺伝子導入による不死化を達成して、研究遂行に必要な細胞数を確保することを計画に含めた。

2. 研究の目的

レット症候群は MeCP2 の遺伝子変異が原因で発症する疾患であり、現在のところ治療法はない。今回のヒト歯髄 MSCs の神経系細胞への分化誘導プロジェクトについて、分化誘導に成功すれば、その性質を電気生理学的手法により解析することが可能となり、これまでに主に実験動物で得られた知見との比較も可能となる。また呼吸機能や自律神経機能調節に関わっているモノアミン作動性神経細胞への分化誘導が可能になれば、中枢性無呼吸を主要な臨床症状の一つとするレット症候群について、病態の一端を解明できる可能性がある。

考慮すべき点として、申請者が保有している MeCP2 の遺伝子変異を有する歯髄細胞のドナーは 1 名であり、そのドナーの MSCs から神経系細胞への分化誘導が達成された場合でも、そこからの知見のみで MeCP2 の遺伝子変異と分化誘導後の神経系細胞の特性との関連付けを行うことについては限界があることが挙げられる。そこで、MeCP2 をノックアウトしたレット症候群のモデルマウスを用いた実験も平行して実施することとし、ヒト歯髄 MSCs とモデルマウスについてそれぞれ特性の解析を行うこととした。

本報告でのヒト歯髄由来細胞を用いた実験は日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施し(倫許 EP18D011)、モデルマウスを用いた実験については日本大学遺伝子組換え実験安全委員会(2020 歯 004-2)ならびに日本大学動物実験委員会(AP22DEN018-1)の承認を得て実施した。

3. 研究の方法

【実験 1】歯髄由来 MSCs の特性解析

(1) 細胞培養

10 代のレット症候群女兒 (MeCP2 遺伝子の exon4 c.473C>T、 p.T158M 変異)および健常女兒の抜去歯から採取した歯髄組織について、間葉系幹細胞専用培地 (Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium、タカラバイオ) にて継代培養することで MSCs を分離した。

(2) 未分化マーカーの発現確認

健常女兒歯髄由来細胞(CONT)、およびレット症候群女兒歯髄由来細胞(RETT)から mRNA を抽出し、未分化マーカーである c-Myc、Sox2、Nanog、Oct4、Klf4 について RT-PCR 法を行った。

(3) MeCP2 と幹細胞マーカーの発現確認

MeCP2 タンパクの発現と局在、ならびに幹細胞としての性質を調べる目的で、チャンバースライド上で細胞を 24 時間培養後、4%パラホルムアルデヒドで固定し、MeCP2 および幹細胞のマーカーである Ki-67、STRO-1、SSEA3 について免疫蛍光染色を行った。

(4) 細胞表面抗原の発現検索

Gene Query Human Cell Surface Markers qPCR Array Kit(ScienCell 社)を用いて、CONT に対して RETT で発現率の高い細胞表面抗原を検索した。

(5) TNF- 刺激による CD69 発現の変化

ヒト胎児線維芽細胞(OUMS)、CONT および RETT について、TNF- で刺激した際の CD69 の発現変化を RT-qPCR 法にて検討した。

(6) 培養細胞における CD69 の免疫蛍光染色

チャンバースライド上で細胞を 24 時間培養後、3%グリオキサール溶液で固定し、CD69 抗体による免疫蛍光染色を行い、CONT と RETT における CD69 の局在について検討した。

(7) 統計処理

結果は平均値 ± SE で表した。2 群間の比較は Mann-Whitney U Test、多群間の比較は Bonferroni/Dunn 法を用いた。

【実験 2】 歯髄由来 MSCs への hTERT 遺伝子導入

(1) 遺伝子導入準備

RETT ならびに CONT について、100 mm 径の培養ディッシュに播種したのち 2×10^6 個に増殖した段階で遺伝子導入に供した。培養液として 10% FBS を含む MEM を用いた。

(2) hTERT 遺伝子導入手順

neomycin 耐性遺伝子配列を含む pBABE-neo-hTERT 発現プラスミド (addgene 社) を Lipofectamine LTX with PLUS reagent によりトランスフェクションした。続いて hTERT 遺伝子の導入に成功した細胞の選別を目的として 10% FBS と G418 (200 μ g/ml) を含む MEM 培地にて 12-15 日間培養を継続した。生き残った細胞について Single-cell cloning を計画した。

【実験 3】 レット症候群モデルマウスの延髄呼吸中枢での遺伝子発現に対するバルプロ酸ナトリウム投与の影響

(1) 実験動物

ヘテロ接合型 MeCP2 欠損雌マウス (Jackson Laboratory) を野生型雄マウスと交配することにより、無呼吸発作などのレット症候群女兒に類似した症状を呈する MeCP2 欠損雄マウス (Mecp2- /y) を得た。またコントロールとして野生型雄マウス (Wt) を使用した。Mecp2- /y および Wt とともに生後 15 日齢のマウスを実験に供した。

(2) 薬物投与

Mecp2- /y および Wt に対して、生後 8 日から 14 日まで毎日 18 : 00 にバルプロ酸ナトリウム (VPA : 300 mg/kg、シグマアルドリッチ) を溶解した生理食塩水を腹腔内投与した (実験群)。また対照として Mecp2- /y および Wt に生理食塩水単独の投与を行った (対照群)。

(3) 延髄腹側呼吸中枢からの RNA の抽出と RT-qPCR

15 日齢マウスをイソフルランにて深麻酔したのち脳を摘出し、ただちに液体窒素にて冷却して脳スライスを作製し、延髄腹側呼吸ニューロン群の領域をパンチアウトした。この試料について通法に従って RNA を抽出したのち RT-qPCR 法によりチロシン水酸化酵素 (Th)、ノルアドレナリントランスポーター (Slc6a2)、および小胞モノアミントランスポーター 2 (Vmat2) の発現量を調べ、4 群間で比較した。

4 . 研究成果

【実験 1】 歯髄由来 MSCs の特性解析

(1) 培養 MSCs における未分化マーカーの発現

CONT および RETT とともに c-Myc、sox2、oct4、Klf4 の発現を認め、ともに MSCs としての特徴を有していることを確認した (図 1)。

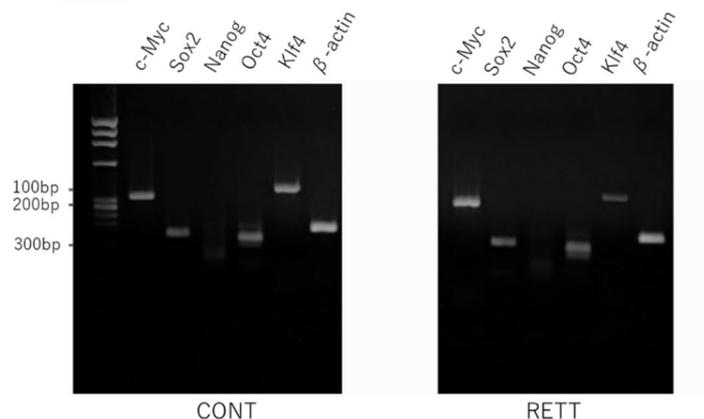


図 1

(2) 培養 MSCs での MeCP2 と幹細胞マーカー Ki-67、STRO-1、SSEA3 の発現

CONT では全細胞で MeCP2 がおもに核に局在していたのに対し、RETT では細胞質と核がほぼ同強度で陽性反応を示した細胞が 25%認められた(図 2A、B)。

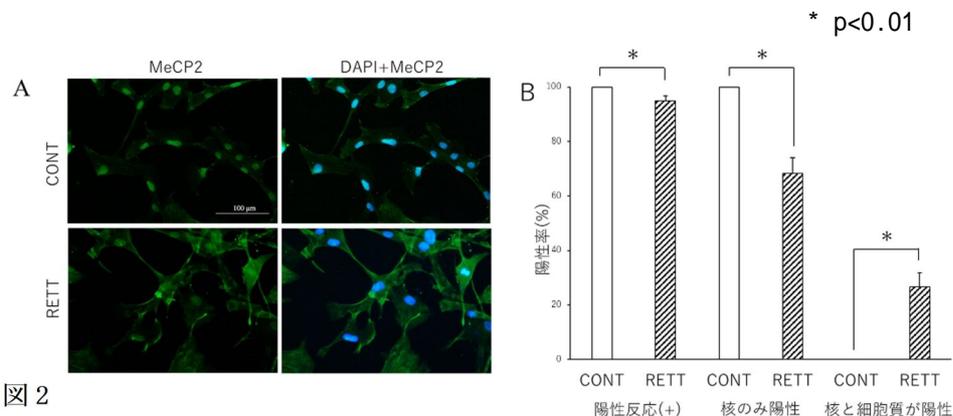


図 2

Ki-67 発現は核内に局限しており、核内陽性率は CONT に比べ RETT で低く、RETT は増殖能が低い可能性が考えられた(図 3A、B)。なお SSEA3、STRO-1 の発現については、CONT と RETT で差異はみられず、いずれも発現強度が低かった(データは表示せず)。

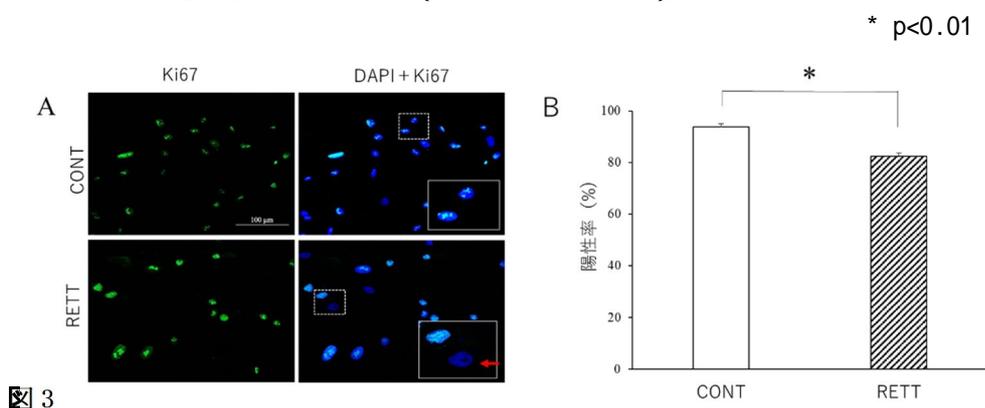


図 3

(3) 細胞表面抗原の発現解析

Human Cell Surface Markers qPCR array にて測定した細胞表面抗原 88 種とそれらの発現比率を下表に示す。これらの細胞表面抗原のうち、CD69 は CONT に比べ RETT で極めて高い発現比率を示し、また発現量も多かった(表 1)。

細胞表面抗原

ALCAM	CD2	CD37	CD6	CD79B	COL1A1	EPCAM	HLA-DRA	ITGA2B	KRT8	NTSE
C5AR1	CD209	CD38	CD63	CD80	COL1A2	FAS	ICAM2	ITGA3	MCAM	PECAM1
CD160	CD22	CD3D	CD69	CD83	CR1	FCER1A	IL12RB1	ITGAX	MS4A1	SELP
CD163	CD24	CD3G	CD7	CD86	CR2	FCER2	IL1R2	ITGB3	MYH10	TEK
CD19	CD244	CD4	CD70	CD8A	CSF1R	FCGR1A	IL2RA	KLRB1	MYH9	TNFRSF4
CD1A	CD247	CD40	CD72	CD8B	CTLA4	FCGR2A	IL3RA	KLRC1	MYOCD	TNFRSF8
CD1C	CD28	CD40LG	CD74	CD96	DPP4	FCGR3A	ITGA1	KLRD1	NCAM1	VCAM1
CD1D	CD33	CD5	CD79A	CEACAM8	ENG	HLA-A	ITGA2	KRT18	NOS3	VWF

発現比率 (CONTに対するRETTの比率)

1.23	0.99	1.75	10.78	2.01	3.90	1.84	0.91	0.62	0.20	0.66
1.23	2.85	0.09	1.21	9.06	3.45	2.50	7.62	1.51	4.26	0.24
0.45	0.99	0.85	22.94	0.45	1.65	0.99	0.61	6.32	7.36	0.21
0.99	0.50	0.99	0.35	0.99	0.99	0.99	0.27	10.21	0.19	2.07
0.99	1.24	0.59	0.38	0.99	5.39	0.99	0.38	0.99	0.51	0.99
0.99	0.99	8.05	21.26	2.06	0.07	8.41	1.12	0.17	0.99	0.09
0.99	0.99	0.99	0.46	0.76	0.05	2.97	2.62	0.99	0.09	6.34
0.81	0.99	0.99	0.99	0.99	1.18	0.99	0.34	0.06	0.99	3.71

表 1

(4) TNF- 刺激による CD69 発現の変化

TNF- 非刺激下および TNF- 刺激下において、OUMS では CD69 の発現は確認されなかった。一方、CONT および RETT では、TNF- 非刺激下でとも CD69 を発現していたが RETT での発現量が多かった。また両者とも TNF- 刺激で CD69 発現が増加した (図 4)。

** p<0.01、 * p<0.05

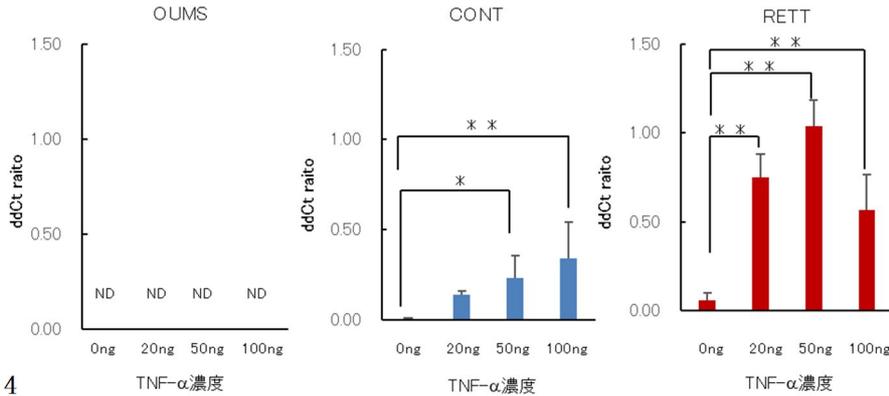


図 4

(5) 培養 MSCs における CD69 の発現

CONT および RETT において、いずれも細胞表面に CD69 陽性シグナルを認めた (図 5)。発現シグナル強度は RETT が高かった。

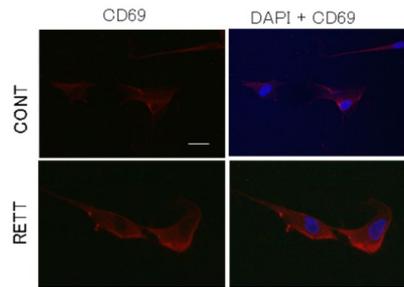


図 5

【実験 2】歯髄由来 MSCs への hTERT 遺伝子導入

CONT については、G418 耐性の hTERT 遺伝子導入細胞を得ることができたが、RETT については G418 含有の培養液にて約 2 週間培養したところ、ほぼすべての細胞が死滅し、生細胞のコロニー形成は確認できなかった。また RETT ではわずかに生き残った細胞についても増殖能が著しく低下しており、Single-cell cloning は実施できなかった。

RETT の不死化および神経系細胞への分化誘導が達成できなかったことから、現在、健常女兒由来の MSCs に対して MeCP2 をターゲットとするゲノム編集を行うこと、またゲノム編集で増殖能が低下した場合には hTERT 遺伝子を導入することで不死化する実験を検討している。

【実験 3】レット症候群モデルマウス延髄呼吸中枢でのモノアミン神経伝達に対する VPA の効果

延髄腹側呼吸中枢における *Th*、*Slc6a2*、および *Vmat2* mRNA の発現を、*Mecp2*-/-y および Wt について VPA 投与群と生理食塩水投与群で比較した結果を図 6 に示す。

Mecp2-/-y で、7 日間の VPA の投与により *Th* のみ発現が増加した。

Th はノルアドレナリンやドパミンなどのモノアミンの合成を担っている酵素をコードしていることから、VPA の投与はヒストン修飾への脱アセチル化抑制作用を通じてモノアミン神経伝達を活性化した可能性が考えられる。

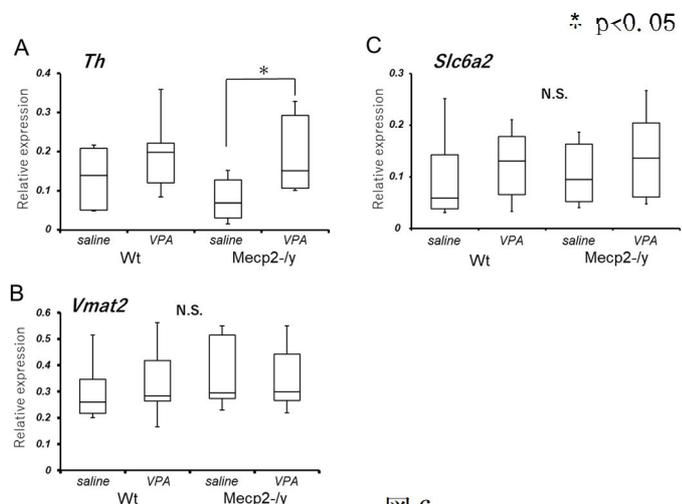


図 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hoshi Manami, Ishiyama Misa, Wada Takashi, Hase Kenchi, Itoh Masayuki, Kikuri Takashi, Shirakawa Tetsuo	4. 巻 65
2. 論文標題 Alteration of monoaminergic systems in the caudal medulla and its possible link to diurnal increase of apnea in a mouse model of Rett syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 96～101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.22-0474	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 Soma Kumi, Hitomi Suzuro, Hayashi Yoshinori, Soma Chihiro, Otsuji Jo, Shibuta Ikuko, Furukawa Akihiko, Urata Kentaro, Kurisu Ryoko, Yonemoto Mamiko, Hojo Yasushi, Shirakawa Tetsuo, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 519
2. 論文標題 Neonatal Injury Modulates Incisional Pain Sensitivity in Adulthood: An Animal Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 60～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2023.03.018	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 Soma Chihiro, Hitomi Suzuro, Oshima Eri, Hayashi Yoshinori, Soma Kumi, Shibuta Ikuko, Tsuboi Yoshiyuki, Shirakawa Tetsuo, Kikuri Takashi, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Involvement of oxidative stress in orofacial mechanical pain hypersensitivity following neonatal maternal separation in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-50116-1	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 -

〔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 星まなみ、石山未紗、菊入 崇、長谷賢知、相馬久実、白川哲夫
2. 発表標題 MECP2遺伝子変異を有するヒト歯髄幹細胞の特性解析
3. 学会等名 第37回日本小児歯科学会 関東地方大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷賢知、石山未紗、星まなみ、白川哲夫、菊入崇
2. 発表標題 株化ヒト歯根膜細胞の低酸素曝露とその後の酸素下が遺伝子発現に及ぼす影響について
3. 学会等名 第38回日本小児歯科学会関東地方会大会
4. 発表年 2023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