

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K17163

研究課題名(和文) レット症候群におけるミトコンドリア機能に焦点をあてた病因究明及び新規治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation of pathogenesis and development of novel therapies focusing on mitochondrial function in Rett syndrome

研究代表者

廣藤 雄太 (Hirofujii, Yuta)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：80759746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はRTT患児から得た乳歯歯髓由来幹細胞(SHED)から分化させたMeCP2欠損ドーパミン作動性ニューロン(DN)を活用し、その病理学的機序を解明することを目的とする。そこで正常MeCP2発現SHEDと患児由来MeCP2欠損SHEDを用いて解析したところ、MeCP2欠損DNに見られる神経突起発達不全はミトコンドリア機能活性化薬であるBDNFを添加すると改善した。また、MeCP2欠損DNではBDNFのmRNAの発現が亢進しているにもかかわらず、細胞外BDNFタンパク質レベルは低下していることもわかった。このことからMeCP2欠損DNではBDNFの細胞外分泌が障害されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天異常における詳細な発症機序の解明と根本的な治療法の開発には、互いに補完し合う多種多様な疾患モデルが必要である。本研究の学術的意義として、Rett症候群患者由来の脱落乳歯歯髓幹細胞が、脳内ドーパミン作動系の病態モデル細胞の1つとなり得ることを示した。さらに既知のミトコンドリア機能活性化薬を用いて、ミトコンドリア機能の観点からRett症候群の病態解析を行うことで、ミトコンドリア標的薬開発へと展開できる可能性について示した。また社会的意義として、小児歯科医療が、先天異常に罹患した小児の健全な口腔発育のサポートだけでなく、脱落乳歯を活用した先天異常の病態解明研究にも貢献し得るという価値を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the pathological mechanisms of MeCP2-deficient dopaminergic neurons (DNs) differentiated from stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHEDs) obtained from Rett syndrome (RTT) patients. We analyzed normal MeCP2-expressing SHEDs and MeCP2-deficient SHEDs derived from RTT affected children, and found that the neurite outgrowth defects observed in MeCP2-deficient DN were ameliorated by the addition of BDNF known as mitochondria activator. We also found that extracellular BDNF protein levels were decreased in MeCP2-deficient DN, despite increased BDNF mRNA expression. This suggests that extracellular secretion of BDNF may be impaired in MeCP2-deficient DN.

研究分野：口腔科学分野 成長および発育系歯学関連

キーワード：Rett症候群 MeCP2 乳歯歯髓由来幹細胞 ドーパミン作動性ニューロン ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群 (RTT) は乳幼児期の女兒に発症する X 連鎖性優性遺伝病であり、生後 6 か月から 1 歳半より主に自閉症状、特有の手もみ動作 (常道運動)、失調性歩行や不随意運動を呈する。本症候群の主な原因は、X 染色体長腕 (Xq28) に位置し、メチル化 DNA に結合して転写を調節する MeCP2 (Methyl CpG binding protein 2) 遺伝子の変異による機能喪失であり、MeCP2 遺伝子を改変した RTT モデルマウスや RTT 患者由来細胞を用いた研究により、MeCP2 変異がニューロンの発達不全を引き起こすことが報告されている。

中枢神経系は大脳、中脳、小脳、視床や線条体など多様な組織から構成され、それらの組織中には様々なサブタイプの神経細胞が存在する。これまでの研究から、MeCP2 は神経細胞の種類によって異なる遺伝子発現制御を行うことが分かっており、脳組織全体を対象とした解析では MeCP2 欠損の影響が十分に特定できないことが示されている。したがって、Rett 症候群の病態解明には、神経細胞のサブタイプ特異的な解析も重要であると考えられている。しかし、多様な神経サブタイプ個別の解析は、神経幹細胞や iPS 細胞から多様な異なる神経を分化誘導する実験系の確立が必要であり、現在のところ研究モデルに限界があり、未だ発展途上である。

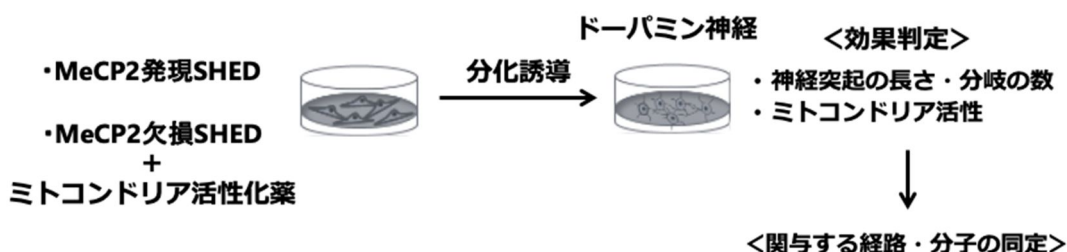
申請者は、Rett 症候群患児から提供された脱落乳歯歯髓由来幹細胞 (SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) を疾患特異的細胞モデルとして活用し、Rett 症候群の運動・認知障害および自閉症様行動と関連するドーパミン作動性神経 (DN: Dopaminergic Neuron) に分化誘導する実験系を確立し、MeCP2 欠損ドーパミン作動性神経では神経突起の伸長と分岐が障害され、さらにミトコンドリア機能 (膜電位及び ATP 産生能) が低下することを過去に報告した。この知見は、RTT の患者の脳内ドーパミン系の神経学的病理とミトコンドリアの機能障害に関連がある可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究では、「MeCP2 欠損 DN において、ミトコンドリアの機能低下による神経突起発達障害の病理学的機序を、疾患特異的細胞モデルである Rett 患者由来 SHED とミトコンドリア機能活性化薬を組み合わせ、細胞生物学的に明らかにすること」を目的とする。

3. 研究の方法

申請者が所属する研究室が保存している 3 名の健常女兒由来の MeCP2 正常発現 SHED と、ミトコンドリア活性化薬として知られる BDNF (脳由来神経栄養因子) を添加した Rett 症候群患児由来の MeCP2 欠損 SHED をそれぞれ DN に分化させ、神経突起の伸長・分岐の改善を指標に、MeCP2 欠損 DN に対するミトコンドリア活性化薬の効果を判定し、関与する経路や分子の同定を行う。



4 . 研究成果

(1) MeCP2 欠損 DN の神経突起発達不全に対するミトコンドリア機能活性化薬である BDNF の添加による効果の解析

Rett 症候群患児由来の MeCP2 欠損 SHED に BDNF を添加し DN に分化させたところ、MeCP2 欠損 DN に見られた神経突起の伸長・分岐の障害が改善した。このことから、ミトコンドリア機能活性化薬である BDNF の添加は MeCP2 欠損 DN の神経突起発達不全を改善する効果を示すことが分かった。

(2) MeCP2 欠損 SHED から分化した DN の遺伝子発現変化を網羅的に調べるために RNA-Seq 解析

転写因子である MeCP2 の機能が欠損した DN における遺伝子発現変化を網羅的に調べるため、RNA-Seq により MeCP2 欠損 DN の遺伝子発現データベースを作成し、リアルタイム PCR と併せて遺伝子発現解析を行った。まず、MeCP2 欠損 DN の MeCP2 の mRNA の発現が低下していることを確認した。また、MeCP2 欠損 DN では神経突起発達不全が見られたため BDNF の mRNA の発現について確認したところ、BDNF の mRNA の発現は亢進していることが分かった。これらのことから、MeCP2 は BDNF の遺伝子発現を抑制的に調節し、MeCP2 欠損 DN の神経突起発達不全は BDNF の mRNA 発現低下に起因せず、他の原因から引き起こされている可能性が示唆された。

(3) MeCP2 欠損 DN における BDNF の細胞外分泌に関する解析

MeCP2 欠損 DN は BDNF の mRNA の発現が亢進するにも関わらず神経発達不全が見られることから、BDNF の細胞外タンパク質分泌量について解析したところ、MeCP2 欠損 DN では細胞外の BDNF タンパク質分泌量が低下していた。したがって、MeCP2 欠損 DN では BDNF タンパク質の生合成が障害されるのではなく生合成後の細胞外分泌の過程が障害され、神経突起発達不全を引き起こしている可能性が示唆された。

そこで、BDNF の細胞外分泌に必要な、シナプス小胞と細胞膜の膜融合を誘導する SNARE タンパク質 (STX1, VAMP2, SNAP-25) の mRNA の発現について解析したところ、MeCP2 欠損 DN では SNARE タンパク質の mRNA の発現量に変化が見られた。この結果より、DN において、MeCP2 は直接あるいは間接的に SNARE タンパク質の遺伝子発現を調節しており、MeCP2 が欠損すると SNARE タンパク質の遺伝子発現が調節され、BDNF の神経外分泌が阻害され、細胞外 BDNF タンパク質レベルが低下することで神経突起発達不全を引き起こす可能性が示唆された。現在は RNAi により MeCP2 のノックダウンさせた細胞を用いて、患者由来の細胞の結果と同様の表現系が見られるかどうかをより詳細なメカニズムと併せて確認解析中である。

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 4件）

1. 著者名 Sun Xiao, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Torio Michiko, Han Xu, Zhang Yu, Hirofuji Yuta, Kato Takahiro A., Sakai Yasunari, Ohga Shouichi, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	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 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100968 ~ 100968
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 Masuda Keiji, Han Xu, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Zhang Yu, Sun Xiao, Hirofuji Yuta, Yamaza Haruyoshi, Yamada Aya, Fukumoto Satoshi	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 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2269 ~ 2269
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 Sun Xiao, Dong Shuangshan, Kato Hiroki, Kong Jun, Ito Yosuke, Hirofuji Yuta, Sato Hiroshi, Kato Takahiro A., Sakai Yasunari, Ohga Shouichi, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Mitochondrial Calcium-Triggered Oxidative Stress and Developmental Defects in Dopaminergic Neurons Differentiated from Deciduous Teeth-Derived Dental Pulp Stem Cells with MFF Insufficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1361 ~ 1361
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox11071361	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 Sun Xiao, Kato Hiroki, Sato Hiroshi, Han Xu, Hirofuji Yuta, Kato Takahiro A., Sakai Yasunari, Ohga Shouichi, Fukumoto Satoshi, Masuda Keiji	4. 巻 4
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 454 ~ 467
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------