様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成　24 年　5 月　25 日現在

機関番号：３７１０４
研究種目：若手研究（B）
研究期間：２０１０～２０１１
課題番号：２２７９１００９
研究課題名（和文）
Rett 症候群モデル iPS 細胞による病態メカニズムの解明と移植再生治療法の開発
研究課題名（英文） Pathologic analysis of Rett syndrome with the model induced pluripotent stem cells for development of treatment method
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。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 モデル動物体細胞より iPS 細胞を作成し、神経系細胞へと分化誘導を行い、分子生化学的・電気生理学な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。さらに、前回 ES 細胞を用いた解析により RTT での病態形成にグリア細胞が関わるとの知見が得られたため、これを解析するため RTT モデルマウスよりグリア細胞を単離、その特性の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

In applicant's facilities, the regenerative medicine method and gene therapy in Rett syndrome (RTT) has been developed with the model mouse .Moreover, it has been successful with the establishment of RTT model embryonic stem cells that is knocked out the RTT causative gene MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2). In this research, we established the RTT model induced pluripotent stem cells (iPS cells) and analyzed the influence of the MeCP2 mutation for the differentiation and the maturity of the neuronal cells by analysis of the neural cells differentiated from RTT model iPS cells. And, We found the relationship between RTT pathogenesis and the function of glial cells. Therefore, We analyzed the properties of RTT model glial cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：小児神経学・iPS 細胞

１．研究開始当初の背景

Rett 症候群(RTT)は主に女児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充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

申請者の施設では、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、上記遺伝子操作技術を応用し RTT モデル iPS 細胞を作成し、神経系細胞へと分化誘導を行い、分子生化学的・電気生理学な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、MeCP2 欠損による病態形成機構の解明を目的としている。

また、我々の研究結果(2010.Brain Res. Y Okabe. Neural development of methyl - CpG - binding protein 2 null embryonic stem cells: a system for studying Rett syndrome.)から、RTT の病態形成機構とグリア細胞の機能には密接な関係があると考えられ、RTT モデルマウスより単離されたグリア細胞の機能を解析する事により、その病態への関わりと治療の可能性を検討する。

３．研究の方法

(1)RTT モデル動物由来 iPS 細胞株(RTT モデル iPS 細胞株)の樹立、神経細胞への分化誘導系の確立

山中四因子を RTT モデルマウスより採取された細胞株に導入し、MeCP2 遺伝子の変異を有する RTT モデル iPS 細胞株を樹立する。次に、MeCP2 機能解析に適した RTT モデル iPS 細胞株を用いた神経系細胞分化誘導法を確立させる。

(2)RTT モデル iPS 細胞より分化誘導させた神経細胞の特性解析

RTT モデル iPS 細胞より分化を誘導した神経系細胞を用い、電気生理学的手法による膜特性の測定、分子生科学的な手法を用いた遺伝子発現状態の解析を行い、MeCP2 の変異による分化過程・機能成熟への影響について評価する。

(3)RTT モデルマウスからのグリア細胞の単離とその特性解析

出生直後の RTT モデルマウスよりグリア細胞を単離培養し、増殖能や様々な因子に対する耐性能、神経伝達物質の代謝能等に関し解析を行う。

① RTT モデルマウスからのグリア細胞の単離と培養

出生直後の RTT モデルマウスよりグリア細胞を単離し、経代培養を行う。増殖能について RTT･コントロール細胞間での比較を行う。また、正常細胞の単離培養では経代とともに増殖能が低下する事が一般的だが、その減少の程度についても比較検討を行う。

② MeCP2 蛋白およびグリア細胞マーカー遺伝子の発現状態の解析

近年ではグリア細胞にも MeCP2 蛋白が発現しているとの報告が見られるが、以前の報告ではグリア細胞には MeCP2 蛋白は発現

していないとの報告が多い。今回の培養細胞において MeCP2 蛋白が発現している事を確認し、RTT の病態解析に適した実験系である事を確認する。また、RTT 患者およびモデルマウスの解剖学的検討および我々の以前の研究では、RTT モデルにおいてある種のグリア細胞のマーカー遺伝子・蛋白の発現状態が亢進している事が確認されており、今回の実験系における発現状態を確認する。

③ グリア細胞における神経伝達物質代謝の検討

近年、神経細胞のシナプス回路形成においてグリア細胞が果たす役割が注目されている。特にグリア細胞が持つシナプス間隙からの神経伝達物質の除去・代謝能は神経機能形成において重要な意義を持っていると考えられる。また、RTT における病態としてシナプス機能やその可塑性の障害の可能性が報告されている。今回のグリア細胞培養系において、神経伝達物質の除去・代謝能を解析し、その病態形成との関わりを検討する。

４．研究成果

(1) RTT モデル iPS 細胞の樹立と特性解析

RTT モデルマウス由来の体細胞より iPS 細胞を樹立、その特性解析を行った。RTT モデル iPS 細胞は RTT モデル ES 細胞と類似の分化特性を持ち、iPS 細胞由来の神経細胞においても MeCP2 遺伝子がその分化能および機能成熟に関わっており、病態解析のための有用な実験系である事が確認された。(論文作成中)

(2)RTT モデルマウスからのグリア細胞の単離とその特性解析

① RTT モデル・コントロールグリア細胞の単離および増殖

出生直後のマウスより単離されたグリア細胞を数代に渡り培養を行った。経代とともにその増殖能の減少が認められたが、RTT・コントロール間での違いは認められなかった。

② MeCP2 蛋白およびグリア細胞マーカー蛋白の発現

培養されたグリア細胞の MeCP2 蛋白及びグリア細胞蛋白の発現状態を調べた。コントロール細胞には MeCP2 蛋白の発現が認められたが、RTT モデルには認められなかった。また、グリア細胞マーカー蛋白の発現では有意に RTT モデル細胞における発現が亢進されていた。この結果はヒト・マウスの組織学的検討の結果と一致し、この実験系が RTT 病態解析に有用である事が示された。

③ 神経伝達物質の代謝能および代謝関連遺伝子・蛋白の発現状態の解析

コントロール・RTT モデル培養グリア細胞における興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の代謝能およびその関連遺伝子・蛋白の発現状態を調べた。RTT モデル細胞において有意に細胞外からのグルタミン酸の取り込み能が亢進していた。遺伝子・蛋白の発現解析において、グルタミン酸代謝酵素である glutamine synthetase の発現が亢進しており、また、コントロールと比較し輸送体であるグルタミン酸トランスポーター（EAAT1、EAAT2）の発現抑制が減少している事が確認された。

(2012.PLoS ONE.Y Okabe. Alterations of Gene Expression and Glutamate Clearance in Astrocytes Derived from MeCP2-Null Mouse Model of Rett Syndrome)

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）

Okabe Y, Takahashi T, Murai Y,Tanaka E, Matsuishi T
Neural development of methyl - CpG - binding protein 2 null embryonic stem cells: a system for studying Rett syndrome.
Brain Res. 2010 Nov 11;1360:17-27.

〔学会発表〕（計１件）

Okabe Y, Takahashi T, Murai Y,Tanaka E, Matsuishi T
Electrophysiological analysis of RTT model ES cell-derived neurons
第８８回日本生理学会大会（誌上開催）
2011.3.28-30.

〔図書〕（計０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
久留米大学医学部生理学講座
脳・神経機能部門
http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol1/index.html

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