

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791076

研究課題名(和文) 超微形態と独創的実験系によるRTT症候群の脳ならび他臓器の病態解明

研究課題名(英文) The original experiment system elucidates the cause of a patient of RTT syndrome with brain or other organs

研究代表者

入江 理恵 (Irie, Rie)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：90381178

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)：Rett症候群(RTT)のモデルマウスであるMeCP2遺伝子欠損マウスで観察された、ある臓器の形態変化の原因について生体内の生理活性物質分泌異常が原因ではないかと推察し、今回の研究で、その臓器の培養細胞を用いたin vitroでの再現を試みた。具体的には対象細胞へshRNAを搭載したレンチウイルスベクターを導入しMeCP2遺伝子のノックダウンを成功させた。MeCP2ノックダウン細胞の性状ならびに機能解析を行い、in vivoで見られた生理活性の分泌異常を再現することができた。

研究成果の概要(英文)：The form change of a certain organ was observed in the MeCP2 gene deficiency mouse as a model mouse of Rett syndrome (RTT). I guessed that bioactive substance secretion abnormality was a cause. In this study, I tried the in vitro production using the cultured cell of the organ. I let I introduced the lentiviral vector which carried shRNA into a target cell, and the knockdown of the MeCP2 gene succeed. I performed the analysis of the property and the function of the MeCP2 knockdown cells and was able to duplicate bioactive secretion abnormality seen in in vivo.

研究分野：組織形態学

キーワード：脳・神経 脳・神経疾患 細胞・組織 生理活性 解剖学 超微形態学

1. 研究開始当初の背景

Rett 症候群(RTT)は女児のみが罹患する進行性の神経発達障害疾患であり、生後6ヶ月~18ヵ月位の女児の1万~1万5千人に一人の割合で発症し、女性精神遅滞疾患の中では最大の割合である。この疾患は、一見正常に出生した後に退行に気づかれるというエピジェネティクスな特徴を持つ。1999年にX染色体上にあるメチル CpG 結合蛋白である methyl-CpG binding protein 2(MeCP2) 遺伝子の変異が RTT 患者の約 80%に認められ、主な原因であることが分かっているものの、病態の詳細は未だ不明である。

2010年、共同研究者(本申請の研究協力者である小賤健一郎)らにより MeCP2 欠損 ES 細胞による *in vitro* 神経分化系の研究システムが確立され、「MeCP2 は ES 細胞の未分化維持・神経発生には不可欠ではなく、グリア形成を阻害する機能を持ち、RTT では MeCP2 の変異により異常に増加・発達したグリアにより、間接的にニューロンの成熟変化が起こる可能性がある」と報告された(引用文献)。また、近年「MeCP2 は視床下部で転写の活性化と抑制を行う」内容の論文が発表された(M.Chahrouf et al., Science, 2008)。視床下部が全身の内分泌系の最高中枢器官であることから、視床下部あるいは下垂体が関与する末梢の器官においても MeCP2 遺伝子発現、あるいは形態的な変化が起こっている可能性が類推された。今回の研究では、細胞の形態及び器官形成への関与という視点で、再生医学から組織解剖学へ研究を展開させて RTT 症候群の神経組織ならびに他の器官系への全病態解析を行うという着想に至った。

引用文献;筆者らのグループ

Neural Development of Methyl-CpG-Binding Protein 2 Null Embryonic Stem Cells: A System for Studying Rett Syndrome. Okabe Y et al Brain Research (2010)

2. 研究の目的

我々は既に雄の MeCP2 遺伝子欠損マウス (MeCP2-/-) を多数繁殖させて様々な研究シ

ステムも確立させている(研究協力者の久留米大学高次脳疾患研究所)。ヒトの場合、RTT 男性は胎生致死で解析不能だが、MeCP2-/- マウスは正常に出生の後3~5週頃よりヒト RTT 類似の自発運動や足すくめ等の運動能低下、姿勢異常等の症状を呈した後、生後80日以内に前例死亡するという、症状の典型性と MeCP2 の完全欠損という2点で「最適の *in vivo* 解析モデル」である。さらに脳において「光学顕微鏡レベル」(電顕ではない)の組織学的解析にほとんど異常が見られないという RTT の特徴も併せ持っている。

我々はすでに MeCP2 欠損マウスである他臓器での新規の表現型異常を見出した(未発表)。よって本研究で、脳ならびにこの候補の他臓器に関し、超微構造・分子解析によりその全貌を明らかにする。また、対象臓器の細胞について *in vitro* で MeCP2 ノックダウンを再現させ、生理活性物質の合成機能などの評価を行う。最終的には真のヒト RTT のモデルマウスとも言える雌の MeCP2+/- マウスで確認する。

3. 研究の方法

MeCP2-/- 雄マウスと野生型マウスの表現系(諸臓器の組織形態)を比較する(*in vivo*)。MeCP2-/- 雄マウスは、雄野生型(X+/Y)と雌 Hetero(X+/X-)を交配・維持している。雄野生型、雄 Hemi(X-/Y)、雌野生型(X+/X+)、雌 Hetero が、いずれも1/4の確立で生じる。まず雄 Hemi(X-/Y)マウスの脳あるいは他臓器を採取し、各臓器の肉眼的所見や重量の他、凍結固定後に臓器特異的な蛋白あるいは遺伝子発現について光顕的、免疫電顕的あるいは免疫組織化学的、分子生物学的に解析し、MeCP2 遺伝子が組織形成に関してどのような役割を持つのか、あるいは他の蛋白や産生物質への影響を *in vivo* で比較した(図1)。

次に、今回 *in vivo* の結果から予想されたある種の細胞にレンチウィルスベクターを利用した RNAi 法により MeCP2 をノックダウンし(図2)、形態形成及び生理活性への関与を比較した(*in vitro*)。具体的には、表現系に超微構造的な差異が見られた臓器の培

養細胞レベルでの、臓器特異的な産生物質(物質 X とする)あるいは生理活性について調べた。RNAi 法により MeCP2 をダウンレギュレートさせたことによる MeCP2 遺伝子の、細胞あるいは臓器特異的な機能への関与を *in vitro* で免疫組織細胞化学的・超微形態的に、及び生理活性について ELISA または LS/MS 等で定量し比較した。

図 1 本研究の計画・方法の概要

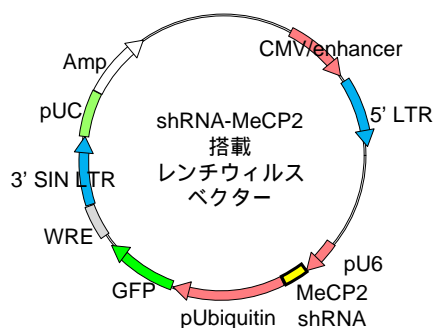
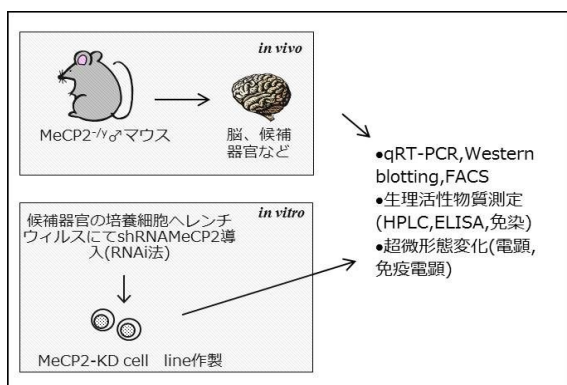


図 2 MeCP2 遺伝子のノックダウンを目的とした、MeCP2 遺伝子に対する shRNA を搭載したレンチウイルスベクター。

目的細胞に高効率で導入することができ、感染細胞内のゲノムに組み込まれることにより、恒常的に MeCP2 がノックダウンされた細胞をえることが可能。また、GFP を搭載することで、遺伝子が導入された細胞を可視化することができた。

4. 研究成果

RTT のモデルマウスである MeCP2 遺伝子欠損マウスで観察された、ある臓器の形態変化の原因を解明するために、超微形態観察、

免疫染色および ELISA を用いて評価した。電子顕微鏡による観察により、その細胞の超微形態的变化を見出したことから、その臓器を誘導する臓器および生理活性物質とその産生細胞についても同様に超微形態観察、免疫染色を行った。予想通り、その細胞に光顕レベルではなく、超微形態レベルで初めて認められた形態異常が観察された。そのため生体内の生理活性物質分泌異常が原因ではないかと推察し、MeCP2 遺伝子欠損マウス生体内でのこの細胞の産生する生理活性物質を ELISA にて評価したところ、有意に生体内濃度が低下していたことが明らかとなった。

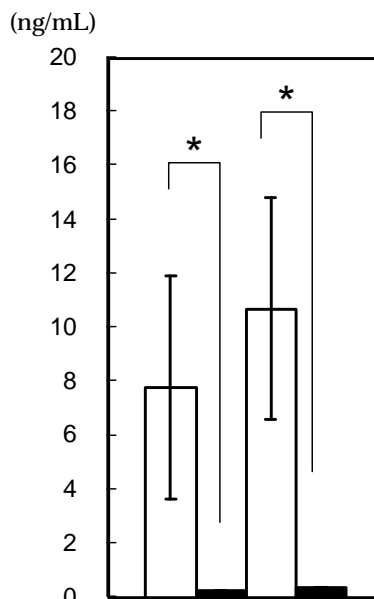


図 3 物質 X の生体内濃度

MeCP2 遺伝子欠損マウスではある物質の産生量が有意に低下していたことが明らかとなった

さらに、その臓器の培養細胞を用いた *in vitro* での再現を試みた。具体的には対象細胞へ shRNA を搭載したレンチウイルスベクターを導入し MeCP2 遺伝子のノックダウンを成功させた。MeCP2 ノックダウン細胞の性状ならびに機能解析を行い、*in vivo* で見られた生理活性の分泌異常を再現することができた(図 4)。この結果から、RTT モデルマウスで見られた物質 X の減少が、MeCP2 遺伝子のノックダウン(ノックアウト)によるもので

あると示唆された。

この成果について研究期間中に論文投稿、学会発表などにより社会に発信することを目指したが、今回得られた結果のみならずそのメカニズムの解明(MeCP2 遺伝子と、物質 X の合成系に関わる遺伝子の特定と関与)まで研究を進める必要性が生じたため、論文投稿、学会発表には間に合わなかった。

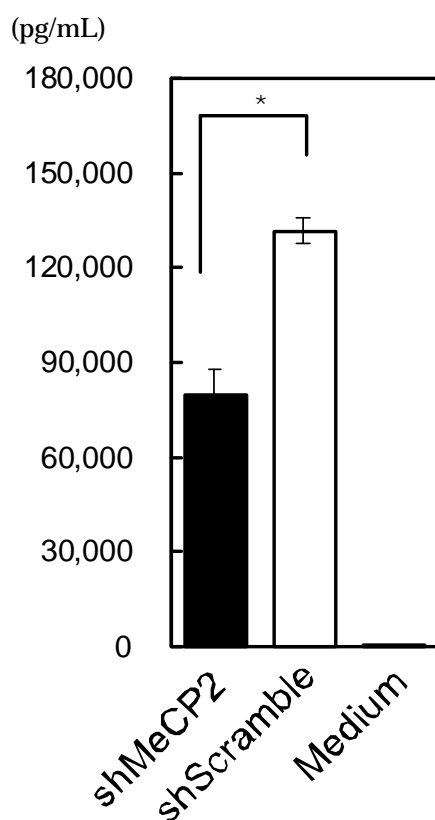


図4 物質 X の培養細胞レベルでの濃度
MeCP2 遺伝子をノックダウンした細胞ではでは、物質 X の産生量が有意に低下しており、生体内での現象を再現することができた。

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2件)

Tanoue K., Wang Y., Ikeda M.,

Mitsui K., Irie R., Setoguchi T., Komiya S., Natsugoe S. and Kosai K. Survivin-responsive Conditionally replicating adenovirus kills rhabdomyosarcoma stem cells more efficiently than their progeny. Journal of Translational Medicine, 2014, 12(27).査読あり

Irie-Maezono R. and Tsuyama S. Immunohistochemical analysis of the acid secretion potency in gastric parietal cells., Open journal of Cell biology., 2013, 2 179-185.査読あり

〔学会発表〕(計1件)

入江(前衛)理恵・津山新一郎「胃底腺壁細胞の腺内分布と酸分泌能の関与」第69回日本解剖学会九州支部学術集会(鹿児島)2013年11月

〔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.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~anatomy2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

入江 理恵 (Irie Rie)

鹿児島大学学術研究院 医歯学域医学系
運動機能修復学講座 遺伝子治療・再生医学
分野 助教

研究者番号：90381178

(2)研究分担者

なし

(3)研究協力者

小賤健一郎(Kosai Ken-ichiro)

鹿児島大学学術研究院 医歯学域医学系
運動機能修復学講座 遺伝子治療・再生医学
分野 教授

研究者番号：90301663