

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791094

研究課題名(和文)レット症候群モデル iPS 細胞及び動物におけるグレリンによる新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for Rett syndrome model iPS cells and mouse by recombinant Ghrelin

研究代表者

原 宗嗣 (Hara, Munetsugu)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30389283

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：ES細胞の胚様体分化過程において、グレリンとグレリンレセプターが発現することを明らかにした。また、グレリン添加によるRTTモデル(MeCP2)欠損ES細胞とコントロールES細胞の分化過程における影響を調べたが、2群間で変動の異なる因子は未だ同定できていない。一方、RTTモデルES細胞とコントロールES細胞の分化過程で発現の異なる分化因子を見出し、その分化因子の関わる組織における、MeCP2の役割の解析を始めた。

また、RTT患者における成長障害、てんかん、知的障害と成長関連因子との関連性を調べるために、血中グレリン、GH、IGF-1濃度、各種身体(体重、身長、BMI、頭囲)測定を行った。

研究成果の概要(英文)：We revealed the gene expressions of ghrelin and ghrelin receptor during the differentiation of embryonic stem cells (ESCs) into embryoid body formation. We examined the effect of treatment with ghrelin during ESCs differentiation between the MeCP2-null ESCs and control wild-type ESCs. We remain no identification of the distinction between two ESCs groups on the factors affected by the treatment with ghrelin during ESCs differentiation. On the other hand, we found the distinct gene expressions of differentiation factors between two ESCs groups. Herein, we focused on the analysis of the roles of MeCP2 in the tissue influenced by the differentiation factors.

Moreover, we measured the concentrations of plasma ghrelin, serum GH, serum IGF-1, and the anthropometries (weight, height, BMI, and head circumference) to investigate the relationship between the symptoms (failure of growth, epilepsy, and intellectual disability) and growth factors in the patients with Rett syndrome.

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児神経学

キーワード：レット症候群 グレリン

1. 研究開始当初の背景

レット症候群 (RTT) は MeCP2 遺伝子変異を主因とする小児の中脳神経障害であり、その発症機構の解明や治療法の開発が切望されている。これまで申請者らは、診断マーカーを探索する過程で、RTT 患者では、神経内分泌ペプチドホルモンであるグレリン血中濃度が、健常者との比較、食行動や排便障害に相関して低下することを見出した (Hara et al., Int J Dev Neurosci '11)。しかし RTT 患者におけるグレリン低下の原因や病態との関わりは不明である。

人工誘導多能性幹 (iPS) 細胞技術は、山中 4 因子の導入により体細胞から胚性幹 (ES) 細胞と同等の多能性幹細胞を誘導する技術である (Takahashi-K & Yamanaka-S, Cell '06, '07)。近年、この応用により患者と同じ遺伝情報を持つ神経細胞や心筋細胞などを作り出すことが可能であり、病態解明、薬効検査や移植治療などへの応用が期待されている。

2. 研究の目的

申請者らは、診断マーカーを探索する過程で、RTT 患者では、神経内分泌ペプチドホルモンであるグレリン血中濃度が、健常者との比較、食行動や排便障害に相関して低下することを見出した。グレリンは、視床下部の食欲中枢を刺激して摂食を促進させ、エネルギーを調節する。しかし RTT 患者におけるグレリン低下の原因や病態との関わりは不明である。一方、グレリンは、胃から分泌される成長ホルモン (GH) 分泌ホルモンとして発見され、グレリン/GH/IGF-1 軸は個体の発生や発達、成体における神経細胞の増殖・維持に作用し、身体や脳の成長に深く関わることが予想される。しかし、これまでレット症候群における成長障害、てんかん、知的障害などの病態とグレリン、GH、IGF-1 との関わりは示されていない。

そこで本研究は、RTT 病態モデル動物や

ES/iPS 細胞モデルの利用により、発生・発達過程におけるグレリンの機能的役割を解析し、RTT 病態メカニズムの解明や新規治療法を開発することを目標としている。

3. 研究の方法

1) ES 細胞の分化過程におけるグレリン及びグレリンレセプターの発現: ES 細胞は LIF 非存在下で浮遊培養することで、胚様体 (EBs) 形成を介した分化を開始する。EBs は血清存在下で、3 胚葉に分化し、胚発生を模倣する。この過程におけるグレリンとレセプターの発現を RT-PCR 法によって調べるために 10 日目まで分化誘導を行った EBs の RNA を経時的に抽出し、cDNA を合成した。

2) グレリン添加による MeCP2 欠損 ES 細胞の分化過程に及ぼす影響の解析: リコンビナントグレリン (0, 10, 100 nM) を MeCP2 欠損 ES 細胞または、コントロール (wild-type) ES 細胞の分化培地中に添加し、LIF 非存在下、分化誘導後、それぞれ 10 日目の EBs の RNA を抽出し、RT-PCR の鑄型とした。RT-PCR は、神経系などの外胚葉、消化器・内臓系などの内胚葉、心筋などの由来となる中胚葉マーカー分子を含む 20 種類以上の遺伝子を標的に行った。

3) RTT モデル iPS 細胞の樹立: Bird-A らによって樹立された MeCP2 欠損マウス (Mecp2^{-/-}) 及びコントロール wild-type (Mecp2^{flx/y}) マウスの新生仔の尾部線維芽細胞の初代培養に対して、山中 4 因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc) をレトロウイルスベクターにて導入することによって MeCP2 欠損 iPS 細胞の樹立を行った。未分化維持フィーダー細胞上で LIF 存在下、5-10 日後出現した iPS 細胞コロニーは、顕微鏡下でクローニングし、継代・増幅後、それぞれの iPS 細胞クローンにおいて、

RT-PCR、免疫染色による未分化マーカーの発現、アルカリフォスファターゼ染色ならびに、胚様体 (EBs) 形成による iPS 細胞としての性質を評価した。

4)RTT 患者における成長関連因子の測定 : RTT の成長障害、てんかん、知的障害とグレリン/GH/IGF-1 カスケードの関連を調べるために、本学でフォローアップしている RTT の 43 家系を中心に、22 症例の MeCP2 遺伝子変異をもつ RTT 女兒 (RTT-Ep/ID : 4 歳 - 37.5 歳) とコントロールとして年齢が適合する 14 女兒 (non-RTT-Ep/ID : 3.3 歳 - 23.9 歳) の早朝空腹時の採血を実施した。また、調査票を用いて上記の RTT 症例の身体所見(身長,体重,BMI,頭囲)を集計し、各身体測定値と血中グレリン, GH, IGF-1 濃度との関連について比較検討した。血漿中のグレリン濃度について RIA (N-RIA: Active ghrelin, C-RIA: Total ghrelin) を用いて測定、血中 GH, IGF-1 濃度については RIA あるいは IRMA 法を用いて測定した (学内倫理委員会承認研究課題)。

4 . 研究成果

1)RTT モデル ES 細胞におけるグレリンとレセプターの発現

グレリンは胎盤や胎生初期から発現しているものの発生過程における役割に付いては不明である。そこで、胚発生過程を模倣する良い系である ES 細胞やその分化過程におけるグレリンならびに、レセプター発現を RT-PCR によって解析した。その結果、グレリンとレセプターは、RTT モデル ES 細胞とコントロール ES 細胞で同様に発現し、胚様体分化過程を通して発現していることを見出した。

2)RTT モデル ES 細胞の胚様体形成過程におけるグレリン添加の影響

RTT モデル ES 細胞は、胚様体形成により発

生過程を模倣した内、外、中胚葉に発生・分化する。まず、三胚葉の形成過程にグレリンを添加し、RT-PCR 法にて各種マーカー発現(20 遺伝子以上)を調べた。その結果、グレリン添加により、大きく変化する分化マーカーの同定にはこれまでのところ至っていないものの、RTT モデル ES 細胞とコントロール ES 細胞の分化過程で発現の異なる幾つかの分化マーカーを見出した。

3) RTT モデル (MeCP2 遺伝子変異) マウス由来 iPS 細胞の樹立

また、当科で維持している RTT モデルマウスの尾部線維芽細胞を単離・培養後、山中4因子を導入して MeCP2 を欠損する iPS 細胞の樹立を試みた。その結果、種々の未分化マーカーを発現する WT と MeCP2 欠損 iPS 細胞クローンをそれぞれ数クローン得る事に成功した。現在、RTT モデル ES 細胞とコントロールで発現の異なる遺伝子を中心とした病態メカニズムの解析や、ES 細胞と同様に、RTT モデル iPS 細胞におけるグレリンやレセプターの発現を解析し、グレリン添加の分化へ及ぼす影響を解析している。

4) RTT 患者におけるグレリン/GH/IGF-1 と病態の関連性の解析

身体測定値を比較検討した結果、RTT-Ep/ID 群は non-RTT-Ep/ID 群よりも BMI, 身長が有意に低かった。また、血中グレリン、GH、IGF-1 を測定比較した結果、血中グレリン O/T 比は、RTT-Ep/ID 群の方が non-RTT-Ep/ID 群よりも有意に高値だった。0-10 歳までの RTT-Ep/ID 群血中 GH 濃度は、non-RTT-Ep/ID 群よりも低値を示したが、血中総グレリン、活性型グレリン、GH、IGF-1 濃度は、RTT-Ep/ID 群、non-RTT-Ep/ID 群両群間での有意な相違は認めなかった。また、RTT-Ep/ID 群、non-RTT-Ep/ID 群両群間において血中総グレリン濃度は年齢、体重、頭囲の Z 値と有意な

逆相関を認めたが、身長との相関関係は明らかではなかった。RTT-Ep/ID群において、血中IGF-1濃度は体重、BMI、頭囲のZ値と有意な正相関を、O/T比は頭囲のZ値と有意な正相関を示した。

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 7件)

1. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Hirata R, Takahashi S, Nagamitsu S, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T: Relation between circulating levels of GH, IGF-1, ghrelin and somatic growth in Rett Syndrome. **Brain Dev.** in press, 2014 (査読有)
2. Ohya, T, Yamashita, Y, Shibuya, I, Hara, M, Nagamitsu, S, Kaida, H, Kurata, S, Ishibashi, M, Matsuishi, T: serial 18FDG-PET study of a patient with SSPE who had good prognosis by combination therapy with interferon alpha and ribavirin. **Eur J Pediatr Neurol.** In press, 2014 (査読有)
3. Hara M, Inokuchi T, Taniwaki T, Otomo T, Sakai N, Matsuishi T, Yoshino M: An adult patient with mucopolidosis III alpha/beta presenting with parkinsonism. **Brain Dev.** 35(5):462-465, 2013 (査読有)
4. Ohya T, Yamashita Y, Shibuya I, Hara M, Nagamitsu S, Matsuishi T: Eyelid myoclonia with absences occurring during the clinical course of cryptogenic myoclonic epilepsy of early childhood. **Eur J Paediatr Neurol.** 16(4):399-401, 2012 (査読有)

5. Hara M, Nishi Y, Yamashita Y, Yoh J, Takahashi S, Nagamitsu S, Kakuma T, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T: Ghrelin levels are reduced in Rett syndrome patients with eating difficulties. **Int J Devl Neuroscience.** 29(8):899-902, 2011 (査読有)

6. Hara M, Mizuochi T, Kawano G, Koike T, Shibuya I, Ohya T, Ohbu K, Nagai K, Nagamitsu S, Yamashita Y, Nakayama T, Matsuishi T: A case of clinically mild encephalitis with a reversible splenic lesion (MERS) after mumps vaccination. **Brain Dev.** 33(10):842-4, 2011 (査読有)

7. Nagamitsu S, Araki Y, Ioji T, Yamashita F, Ozono S, Kouno M, Iizuka C, Hara M, Shibuya I, Ohya T, Yamashita Y, Tsuda A, Kakuma T, Matsuishi T. Prefrontal brain function in children with anorexia nervosa: a near-infrared spectroscopy study. **Brain Dev.** 33(1):35-44, 2011(査読有)

[学会発表](計 7件)

1. 齊木玲央、原宗嗣、今城透、澁谷郁彦、大矢崇志、永光信一郎、山下裕史朗、松石豊次郎：周期性嘔吐症を発症した精神遅滞、自閉症を有する奇形症候群の1例。第55回日本小児神経学会学術集会 2013.5.31 (大分)
2. 平田留美子、西芳寛、御船弘治、細田洋司、寒川賢治、児島将康、田中永一郎、原宗嗣、山下裕史朗、松石豊次郎：生後発達に伴うマウス脳内でのグレリン含量の変動に関する検討。第116回日本小児科学会学術総会 2013.4.19 (広島)

3. Hara M, Nishi Y, Yoh J, Takahashi S, Yamashita Y, Hosoda H, Kangawa K, Kojima M, Matsuishi T: Plasma ghrelin and serum IGF-1 in patients with Rett syndrome and its relationship to the head growth. The 12th International Child Neurology Congress and the 11th Asia and Oceanian Congress of Child Neurology2012 2012.5.27 ~ 6.1 (Brisbane, Australia)

4. 澁谷郁彦, 大矢崇志, 後藤憲次, 原宗嗣, 永光信一郎, 山下裕史朗, 松石豊次郎: 無症候性先天性サイトメガロウイルス感染症4例の臨床的検討. 第115回日本小児科学学術集会 2012.4.21 (福岡)

5. 大矢崇志, 澁谷郁彦, 原宗嗣, 永光信一郎, 山下裕史朗, 松石豊次郎: 脳葉切除を行った側頭葉てんかん症例における脳血流の検討. 第115回日本小児科学学術集会 2012.4.20 (福岡)

6. Nishi Y, Hara M, Matsuishi T.: Plasma concentration of ghrelin in patients with Rett syndrome together with their relationship to clinical manifestations. 第84回日本内分泌学会総会 (2011. 4.21-23)

7. 原宗嗣, 西芳寛, 山下裕史朗, 松石豊次郎: Mecp2 遺伝子変異をもつレット症候群患者の血漿中グレリン濃度の検討. 第53回日本小児神経学会総会 (2011.5.26)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
原宗嗣 (HARA MUNETSUGU)
久留米大学・医学部・助教
研究者番号: 30389283

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: