

論文の内容の要旨

氏名：星 まなみ

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：MeCP2 変異ヒト歯髄細胞および MeCP2 欠損マウス迷走神経背側運動核ニューロンについての免疫組織化学的研究

X 染色体上にあつてメチル化 CpG 結合タンパク質 2 (MeCP2) をコードする遺伝子 *MECP2* の変異は、重度の発達異常を呈するレット症候群 (RTT) を引き起こす。RTT の主要な病態として、精神発達遅滞に加えて合目的な手の機能の喪失、音声言語コミュニケーションの喪失、失調性歩行、手の常同運動、消化管運動異常や便秘、歯科領域では咀嚼機能の低下、歯列不正が高率で認められる。歯髄組織には幹細胞を含む多種の細胞が存在することから、患者の抜去歯から得られた歯髄の細胞を活用する研究は、RTT の病態を細胞レベルで解明するうえで大きな意義がある。しかし現在のところ、RTT 患者の永久歯の歯髄を用いた研究は見当たらない。そこで本研究では実験 I として、*MECP2* の 1 塩基変異により発症した RTT 女児の永久歯から幹細胞を分離し、特性の解析を試みた。

MeCP2 をコードする遺伝子 *Mecp2* を欠失させたモデルマウスでは、ヒトと同様な神経発達障害が引き起こされることが報告されており、とくに MeCP2 を完全に欠損している雄モデルマウス (*Mecp2^{-y}*) は RTT にみられる病態の原因を探索するうえで有用である。*Mecp2^{-y}* の脳幹では、孤束核ならびに青斑核でのノルアドレナリン神経伝達の異常が報告されているが、内臓の運動を制御している迷走神経背側運動核 (DMV) でのモノアミンならびにアセチルコリン神経系の変化については明らかにされていない。RTT 患者の症状として消化管蠕動運動障害や便秘が高頻度に見られ、その原因として DMV の機能異常が疑われる。そこで本研究では実験 II として、8 週齢の *Mecp2^{-y}* マウスについて、DMV でのチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 免疫陽性 (IR) ニューロンおよびコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) IR ニューロンの数と分布を調べ、野生型マウスと *Mecp2^{-y}* マウスと比較した。また DMV ニューロンでの TH と ChAT の共存についても調べた。

実験 I では、歯髄組織の供与について同意の得られた 10 代の RTT 女児 1 名、および同年代の健常女児 1 名より抜去された永久歯計 2 歯を用いた。アウトグロース法によって得られた RTT 女児歯髄由来細胞 (RETT) および健常女児歯髄由来細胞 (CONT) について、間葉系幹細胞用に開発された Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium または 20% fetal bovine serum を含む α -MEM を培地として用い、37°C、5% CO₂ にてインキュベーター内で継代培養を行った。RT-PCR により、未分化マーカー 5 種の遺伝子発現を CONT および RETT で調べたところ、両細胞で c-Myc, Sox2, Oct4, Klf4 の発現が認められたが、Nanog の発現はいずれについても認められなかった。続いてこれらの細胞を 8 well Lab-Tek Chamber Slide 上で 24 時間培養したのち、MeCP2 ならびに幹細胞マーカーである Ki-67, SSEA3, STRO-1 の発現を免疫蛍光染色にて調べた。その結果、CONT では全細胞で MeCP2 がほぼ核に局在していたのに対し、RETT では細胞質と核がほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が 26.6%認められ、CONT と RETT の比較で、核のみが免疫陽性の細胞の比率、ならびに核と細胞質ともに免疫陽性の細胞の比率について有意差が認められた。また増殖能のマーカーである Ki-67 についての免疫蛍光染色で、Ki-67 は核内に限局して陽性反応を示し、陽性率は CONT に比べ RETT で低かった。多能性幹細胞マーカーである SSEA3 の発現は、CONT および RETT ともに弱く、両細胞で違いはみられなかった。間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 については、CONT および RETT ともほとんど発現がみられなかった。

続いて実験 II では *Mecp2^{-y}* および Wt マウスを用いて実験を行った。8 週齢の両マウス脳を摘出し、連続冠状切片を作製し、浮遊法にて免疫組織染色を行った。DMV の TH-IR ニューロン数は Wt マウスと比較して *Mecp2^{-y}* マウスの方が多かった。*Mecp2^{-y}* マウスにおいて、TH-IR ニューロンは主に DMV の中央から内側に位置していた。また ChAT-IR ニューロンは DMV 全体に分布しており、*Mecp2^{-y}* マウスと Wt マウスとの比較で、ChAT-IR ニューロンの数に違いはみられなかった。*Mecp2^{-y}* マウスの DMV では ChAT と TH の共陽性ニューロンが多く確認され、それらは DMV の中央から内側に分布していることが明らかになった。一方、Wt マウスの DMV では ChAT と TH の共陽性ニューロンはほとんど認められなかった。

実験 I にて、継代培養した CONT および RETT の特性を解析するとともに、実験 II にて、*Mecp2*^{-/-} マウスと Wt マウスの DMV における TH-IR および ChAT-IR ニューロンの発現を検討した結果、以下の結論を得た。

1. CONT および RETT では、ともに未分化マーカー遺伝子の *c-Myc*, *Sox2*, *Oct4*, *Klf4* の発現を認めた。
2. CONT では全細胞で MeCP2 がほぼ核に局在していたのに対し、RETT では核に加えて細胞質にも免疫陽性反応を示した細胞が 26.6%認められた。また Ki-67 の陽性率は CONT に比べ RETT で有意に低かった。
3. RETT では変異 *MECP2* が活性化した細胞が一定の割合で存在しており、*MECP2* の変異が MeCP2 の細胞内局在に影響を及ぼすと同時に細胞の増殖能を低下させている可能性が示された。
4. Wt マウスとの比較で、*Mecp2*^{-/-} マウスの DMV では ChAT-IR ニューロンの数に差はみられなかったが TH-IR ニューロンの数が有意に多く、また ChAT および TH を共発現するニューロンが多く認められた。

以上より、*MECP2* の変異が RETT の増殖能を低下させていること、MeCP2 の欠損が DMV ニューロンの活動を変化させ、消化管運動を調節している副交感神経の働きに影響を及ぼしていることが示唆された。