

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主査) 教授 篠田 雅路

(副査) 教授 白川 哲夫

教授 浅野 正岳

教授 小林 真之

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、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失調性歩行、手の常同運動、消化管運動異常や便秘、咀嚼機能の低下、歯列不正などが認められる。歯髄組織には幹細胞を含む多種の細胞が存在しており、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。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。

RTT 患者では消化管蠕動運動障害や便秘が高頻度にみられ、原因として内臓の運動を制御している迷走神経背側運動核 (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 欠損雄モデルマウス (*Mecp2*^{-y}) の 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 (Wt) マウスと *Mecp2*^{-y} マウスで比較した。また DMV での TH と ChAT の共存についても調べた。

実験 I では、同意を得た 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、間葉系幹細胞用培地または 20% fetal bovine serum を含む α -MEM を用いて継代培養を行った。RT-PCR にて未分化マーカーの遺伝子発現を調べ、CONT および RETT で *c-Myc*, *Sox2*, *Oct4*, *Klf4* の発現を認めた。続いて両細胞を 8 well Lab-Tek Chamber Slide 上で 24 時間培養後、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 では細胞質と核にほぼ同レベルで免疫陽性反応を示した細胞が 26.6%認められた。また増殖能のマーカーである 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 および間葉系幹細胞マーカーである STRO-1 の発現は両細胞で違いはみられなかった。

続いて実験 II では 8 週齢の *Mecp2*^{-y} および Wt マウスの脳を摘出し、連続冠状切片を作製し、浮遊法にて免疫組織化学染色を行った。DMV の TH-IR ニューロンの数は Wt マウスと比較して *Mecp2*^{-y} マウスの方が多く、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、両マウスで ChAT-IR ニューロンの数に違いはなかった。*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た。一方、Wt マウスの DMV では ChAT と TH の共発現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*^{-y} 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、共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 がほぼ核に局在したのに対し、RETT では核と細胞質にも免疫陽性反応を示した細胞を 26.6%認めた。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いた。
4. Wt マウスとの比較で、*Mecp2*^{-y} 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。

本研究結果は、RTT の病態解明および新規治療法の開発に寄与し、小児歯科学に貢献すること大である。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和5年3月9日