

令和元年6月17日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14338

研究課題名(和文) 神経の微細観察系を新たに構築し、アンジェルマン症候群の病理解明を目指す研究

研究課題名(英文) The research for Angelman syndrome pathology by construct a new observation system of fine neuronal structure.

研究代表者

海老原 達彦 (Ebihara, Tatsuhiko)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ付

研究者番号：00344119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンジェルマン症候群は、重篤な発達遅滞を伴う先天性疾患であり、その原因遺伝子と発病に至る染色体や遺伝子の異常は既に知られている。一方で分子レベルの病理解析は送れている。この疾患の病態は重篤であり、少しでも効果的な治療が行えれば患者と家族のQOL向上が大いに見込める状況にある。本研究は分子レベルの病理機構を解明を最終目標として、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)を用いた実験系の構築を目指した。

ASEMを用いて、神経の微細構造を観察するために染色条件を検討した結果、一定の観察系を構築できた(発表済み)。更にこの観察に適した病理モデルマウスを遺伝子改変にて作製している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)は、産総研と日本電子によって開発された、水中のサンプルを直接観察できる電子顕微鏡である。アンジェルマン症候群の神経微細構造への影響を調べるためにASEMは有用と考えられるが、この観察系用に細胞の調整・染色方法を新に開発する必要があった。本研究にてASEMでの神経の微細構造観察を実現した。今後、核内の遺伝子局在や原因タンパク抑制時の海馬初代培養神経の構造異常を解析する。

また、病理モデルマウスの作製も継続して行っており、系統樹立次第、上記の観察に供せるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Angelman Syndrome is a congenital disease accompanied by severe developmental delay, and its causative gene and chromosomal and gene abnormalities leading to the onset of disease are already known. Molecular aspect of pathological analysis is in around of starting line yet. As the condition of this disease is severe, any small effective treatment can be performed, the QOL of patients and their families can be greatly improved. This study aimed to construct an experimental system using an atmospheric scanning electron microscope (ASEM) with the final goal of elucidating the molecular level pathological mechanism. I examined the staining conditions for observing the fine structure of the neuron using ASEM, and constructed observation system (published). Furthermore, a pathological model mouse suitable for this observation is created by genetic modification.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：神経発生 神経病理学 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アンジェルマン症候群に関する知見は、臨床上所見が知られつつあった。例えば重篤な発達遅滞・学習障害・てんかん発作や嘔吐の他、運動障害や多幸感、色素が少なく似たような表情である、といったことである。国内でこの疾患が知られるようになったのは、最近のことであり、発生頻度は1万人に一人といわれているが、県によっては極端に低いところもあり、診断できずに病名不明の発達遅滞とされている本患者がまだ多いものと想像される。

患者の海馬及び大脳皮質に限って、ube3a 遺伝子が発現していないことが知られている。母由来の遺伝子の欠損または異常が原因であり、脳の上記部位に限って父由来の ube3a 遺伝子が発現できないことが知られており、この部位特異的に神経細胞内のタンパク代謝に異常が発生して学習を阻害すると共に脳の萎縮を起こしていると推定されている。しかし具体的な病理機構が解明できておらず、そのため脳のダメージを改善することが出来ていない。

上記の通り、病理機構不明のため根治療法は見つかっておらず、治療は抗てんかん薬をてんかんが抑制できる量まで常用し、車いすなどの装具を用いるといった、対症療法が行われている。てんかんは重篤であり抗てんかん薬によって抑えきれない患者も多い、重度の学習障害による各種障害と合わせて、嘔吐発作による死亡例も多発している。

病理機構解明が送れているとはいっても、原因遺伝子単一と分かっている以上、適切な観察・解析系を確立できれば、他の先天疾患(例えばダウン症)よりもその解析は容易であると期待され、先天性の遺伝疾患の最初の根本治療例に、本疾患がなり得るとも期待できる。

我々の研究部門にて大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)が開発された。私もこの開発に、培養細胞の観察に関わっていた。顕微鏡の特性上、アンジェルマン症候群の神経病理を解析するのにこの電子顕微鏡が有用であると期待された。

2. 研究の目的

- (A) ASEM を用いた神経細胞の微細構造を解析するために、染色等の条件を確定する。
- (B) この観察系にて原因遺伝子の核内局在を観察し、父母系ごとの遺伝子発現機構を推定する。また、病態を培養細胞上にて再現し、培養条件下での微細構造の異常を検索する。
- (C) この系にて病理機構を解析し、治療法を推定する。

3. 研究の方法

2-(A)について、先行して培養細胞の染色条件を検討していた。培養海馬神経細胞についても、先行する染色方法を検証すると共に、タングステンやウラン染色及びその補助剤について、各種条件検討を進める。

-(B)について、上記で確立された染色方法を用いて、神経細胞核内の、Ube3a 遺伝子部位の局在及び周辺環境を解析する。父系の Ube3a 遺伝子の不動化と、母系遺伝子の活発な翻訳が見られるものと期待される。

RNi、アンチセンスオリゴを投与して、Ube3a 翻訳を不活化して、培養神経細胞の構造異常を検索する。シナプス形成異常、その他構造的な異常を解析する。

-(C)について、遺伝子改変マウスを作製する。IRES で蛍光タンパクを発現させることで、Ube3a 領域の発現活性を可視化した、本解析に最適なマウスを作製する。

4. 研究成果

培養細胞に加えて、神経細胞についても検討・観察し、大気圧走査電子顕微鏡(ASEM:図1)の蛍光観察機能を併用することで、神経部位の同定も行いつつ、微細構造を観察することが出来た。培養細胞にて、色素胞を染色する条件、ミトコンドリアを染色する条件を、光学顕微鏡による観察と並行しつつ検討した。

更に細胞膜を染色する方法として、タングステン及びウラン染色について、pH や濃度、タンニンなどの前処理条件を検討し、培養神経細胞にて明瞭な画像を得られる条件を見いだした。(図2)。ASEM は同視野にて蛍光観察が可能であり、電顕画像と重ね合わせることで、神経部位を同定することが可能である(図3、ポストシナプス部位の同定)。この状態で、シナプス近傍の構造的特徴も観察することが出来た(図4)。

次に病理再現条件を検討しつつ、以上部位を発見すべく、観察を進めている。核について、Ube3a 存在箇所同定の条件を検討している。

遺伝子改変動物も作製を進めている。

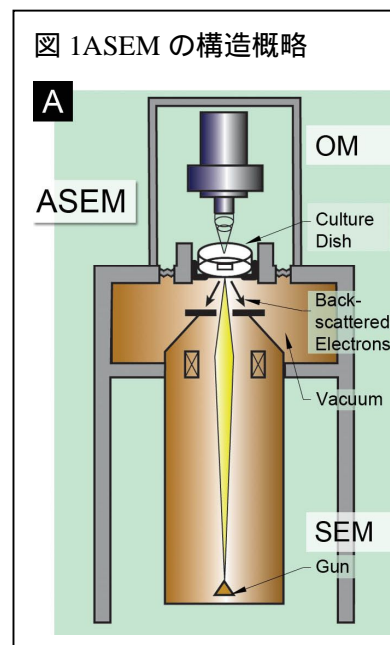


図2 ウラン染色による細胞膜構造の明瞭化

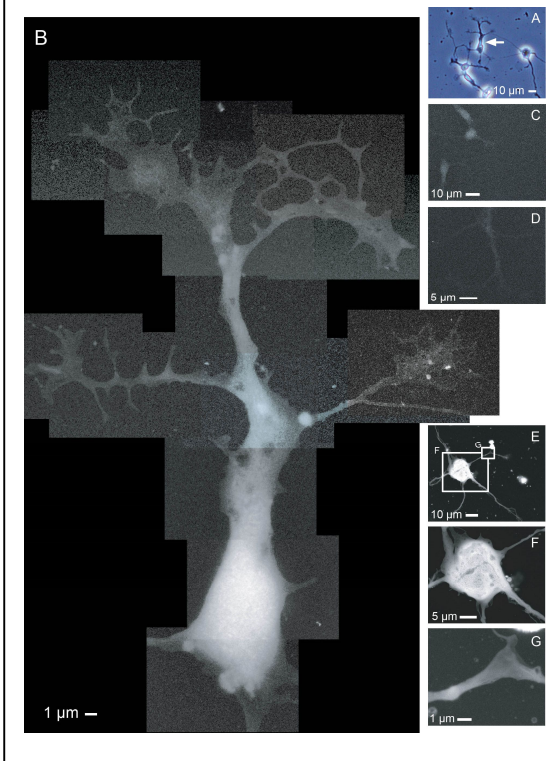


図3 ポストシナプス部(緑蛍光)画像との重ね合わせ

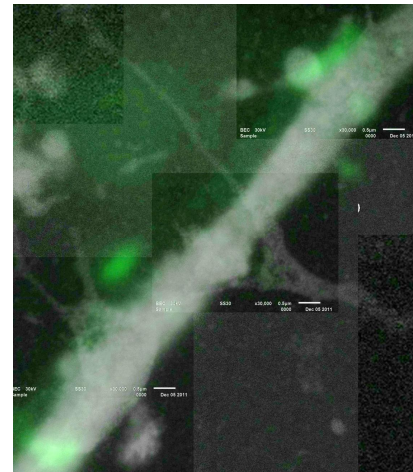
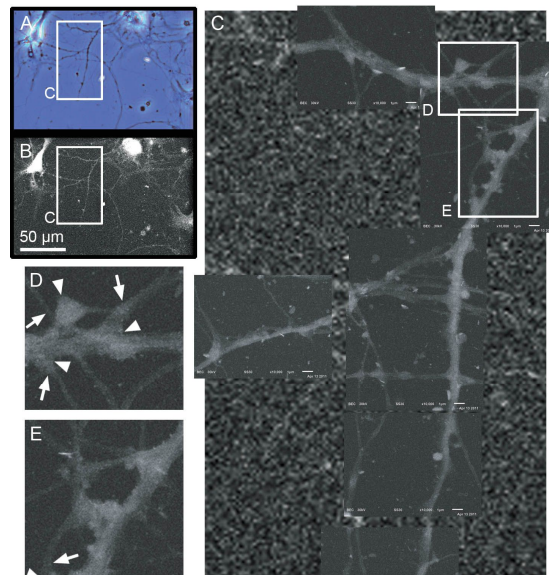


図4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sato, C., Yamazawa, T., Ohtani, A., Maruyama, Y., Mementily, N., Sato, M., Hatano, Y., Shiga, T., Ebihara, T.: Primary cultured neuronal networks and type 2 diabetes model mouse fatty liver tissues in aqueous liquid observed by atmospheric SEM (ASEM): Staining preferences of metal solutions. *Micron*, 118, 9-21 (2019).

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 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:
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:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

分担者:なし

(1)研究分担者

研究分担者氏名:
ローマ字氏名:
所属研究機関名:
部局名:
職名:
研究者番号(8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:佐藤主税
ローマ字氏名: SATO, Chikara
ASEM 観察系について、培養細胞の染色条件開発にて協力。
(本研究課題では、その情報を参考にした)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。