

令和元年5月31日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19689

研究課題名(和文) 遺伝性小頭症責任遺伝子ASPMの脳の生涯を通じての分子機能解明

研究課題名(英文) Analysis of lifelong molecular function of ASPM, responsible gene for human hereditary microcephaly, in the brain

研究代表者

外崎 円 (Tonosaki, Madoka)

京都府立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70745637

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)：脳形成過程から成体において、ASPMが脳に及ぼす影響を明らかにするため、本研究ではAspm(マウスオルソログ)を脳特異的にノックアウトしたマウスを作製した。胎生16日目に大脳皮質の低形成がみられたが、細胞増殖、細胞移動に異常はなかった。脳形成過程で、Aspmをノックアウトした神経幹・前駆細胞では、神経分化制御の異常や脳室帯の未分化細胞、ニューロンを含めた分裂終了細胞のアポトーシスが有意に増加していた。これらの観察結果から、Aspmは神経幹・前駆細胞の形態の維持および分化後のニューロンの生存に必須であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウス大脳皮質脳形成過程において、神経幹細胞でAspmを欠損することがアポトーシスの増加につながることを時空間的解析を駆使して明らかにした。この研究結果は、神経系発生において、Aspmが及ぼす影響を示した新たな知見であり、ASPM遺伝子が責任遺伝子であるヒト遺伝性小頭症MCPH5の発症機序の解明につながる可能性がある。また、本研究成果は、脳科学分野における基礎的知見を提供し、多くの脳形成異常・神経変性疾患の治療戦略探究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：To evaluate molecular mechanisms of ASPM in the brain, we developed conditional knock-out (cKO) mice, in which Aspm, murine orthologous gene, was lost specifically in neural stem cells. The fetal cerebral cortex showed hypoplastic at embryonic day 16 (E16) in Aspm cKO mice; however, cell proliferation and cell migration showed normal as compared with control mice. On the other hand, cell differentiation was dysregulated and an increased number of apoptosis was observed in neural stem/precursor cells in the ventricular zone as well as in young neurons in the intermediate zone and cortical plate in Aspm cKO mice brains. The results suggested that Aspm molecule might have an important role in maintenance of neural stem/precursor cells and in survival of post-mitotic neurons.

研究分野：神経発生学

キーワード：先天異常学 細胞周期 ASPM

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

1. 研究開始当初の背景

ASPM は、ヒトの常染色体劣性伝性小頭症(MCPH)の中で、もっとも高頻度で遺伝子変異を生じている MCPH5 の原因遺伝子として同定された。また、電離放射線によって発症する小頭症の病態とも関連するといわれていた(Fujimori A et al., 2008)。そのタンパク質は、細胞分裂中期に中心体周囲に強く集積し、発現抑制されると紡錘体形成異常を引き起こす。すなわち、細胞分裂での紡錘体調節の役割を担うことが示唆されている。しかし、ヒトを含む哺乳類の脳組織において、その形成過程を通じた時空間的影響および、その分子メカニズムについては十分に理解されていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は、MCPH5 の原因遺伝子であるヒト *ASPM* のマウスオルソログである *Aspm* をノックアウトしたマウス(*Aspm*-null)を作製し、その表現型を解析してきた。その結果、成マウスにおいて大脳サイズの低下、大脳皮質の菲薄化を生じることを明らかにした。しかし、その発症メカニズムは不明であった。そこで、本研究では、脳特異的に *Aspm* 遺伝子を破壊する *NesCre*;*Aspm*^{fllox/fllox} を作製し、胎仔脳の形成・発達過程における細胞周期、細胞分化、細胞移動に及ぼす影響を組織学的に解析し、時空間的な視点から、脳における *Aspm* 分子の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【タモキシフェン誘導型 Fucci 発現 *Aspm* ノックアウトマウスの作製 (*Fucci*-*NesCre*ERT2;*Aspm*^{fllox/fllox})】

まず、*Fucci* トランスジェニックマウス、*Aspm*^{fllox} マウスおよび *NesCre*ERT2 マウスから *Fucci*-*Aspm*^{fllox/fllox} ホモ親と *Fucci*-*NesCre*ERT2;*Aspm*^{fllox/+}ヘテロ親マウスを作製し、系統維持した。ついで、それらを交配し、膣栓確認後、胎生 9.5 日または 10.5 日にタモキシフェン投与により、*Aspm* ノックアウトを誘導した。

【脳特異的 *Aspm* ノックアウトマウス(*NesCre*;*Aspm*^{fllox/fllox})の作製】

Aspm^{fllox/fllox} ホモ親と *NesCre*;*Aspm*^{fllox/+}ヘテロ親マウスを交配し、胎生 12.5、14.5、16.5 日の胎仔脳および、生後 7 日目の新生仔脳を得た。胎仔の尾より遺伝子型を調べ、*NesCre*;*Aspm*^{fllox/fllox} を脳特異的ノックアウト(*Aspm* cK0)とし、*Aspm*^{fllox/fllox} または *Aspm*^{fllox/+}をコントロール(WT)とした。これらの改変マウスの脳をとりだし浸漬固定もしくは新鮮凍結脳を作製し、クライオスタットによる凍結切片を免疫組織化学により層構築を解析した。

【*Fucci* 発現脳特異的 *Aspm* ノックアウトマウス(*Fucci*-*NesCre*;*Aspm*^{fllox/fllox})の作製】
Fucci-*Aspm*^{fllox/fllox} ホモ親と *NesCre*;*Aspm*^{fllox/+}ヘテロ親マウスを交配し、胎生 14.5 日の胎仔脳をとりだし、蛍光レーザー顕微鏡下に設置したインキュベータで脳スライスを培養しながら、*Fucci* を発現する神経幹・前駆細胞の挙動を経時的に観察した。

【分子マーカーを利用した改変マウス脳の組織学的解析】

「層構造の解析」 大脳新皮質の各層に特異的に発現する多くの分子マーカーが見ついている。たとえば、*Satb2* (第 2-3 層)、*Ctip2* (第 5 層)、*Tbr1* (第 6 層)、*Tbr2* (脳室下帯)、*Sox2* (脳室帯)である。これらの抗体を用いて、胎生前期から後期各時期における改変マウスの大脳新皮質の層形成を調べた。

「細胞増殖の解析」 増殖細胞は細胞周期にあり、その各相の同定には様々な方法が利用されている。例えば、リン酸化ヒストン(pHH3 : M 期)、BrdU または EdU (S 期)である。これらに対する抗体または染色試薬を用いて、神経幹・前駆細胞の増殖活性について調べた。

「神経分化の解析 (Birth dating アッセイ)」 神経幹・前駆細胞は分裂を繰り返しながら、神経産生期になると徐々に細胞周期を離脱し神経細胞へと分化する。この最終分裂した細胞は、離脱直前に取り込んだ BrdU や EdU はそのまま残っているため、神経細胞への分化のタイミングの指標となる。この方法を用いて、神経幹・前駆細胞からの神経細胞産生数、細胞遊走を調べた。

「細胞死の解析」 DNA が修復できないほどの損傷を受けると、アポトーシスが誘導され細胞死に至る。これらの過程で特異的に発現する分子マーカーが見ついている。H2AX (二本鎖 DNA 損傷)、アポトーシス関連タンパク質 (CC3)、断片化 DNA (TUNEL) などである。これらの抗体および染色法を用いて、胎生前期から後期各時期における改変マウスの大脳新皮質のアポトーシスの発生を調べた。

4. 研究成果

【脳特異的 *Aspm* ノックアウトマウス (*Aspm* cK0) を作成と層構造解析】

当初計画していたタモキシフェン誘導型 *Fucci* 発現 *Aspm* ノックアウトマウス (*Fucci*-*NesCre*ERT2;*Aspm*^{fllox/fllox}) は、ノックアウト条件 (タモキシフェン量、回数、投与経路) を検討したが、目的とした抑制誘導が効果的に行えているかどうか断定することができなかった。

そこで、組織学的に、*Aspm* を欠損した神経幹・前駆細胞が脳形成過程において、どのような影響をうけるのか調べるために、新たに脳特異的 *Aspm* ノックアウトマウス (*NesCre; Aspm^{fllox}(Aspm cKO)*) を作製した。このマウスでは、胎生 16.5 日に有意な大脳壁低形成が観察された。

まず、「神経幹・前駆細胞の増殖活性」に関して、細胞周期 S 期にある細胞をラベルして胎生 12.5 日から 16.5 日まで経時的に解析したが、*Aspm cKO* とコントロールで有意差は認められなかった。次に「神経分化の解析 (Birth dating アッセイ)」を利用し、胎生 12.5 日から 16.5 日まで細胞遊走動態を解析したが、*Aspm cKO* とコントロールで有意差はなかった。そこで、層構造異常を調べるため、胎生 16.5 日の冠状断切片を作成し遺伝子発現を調べた。正常な胎生 16.5 日の皮質板では、*Satb2* が表層(第 2 - 3 層)、*Ctip2* が深層(第 5 層)、*Tbr1* がさらに深層(第 6 層からサブプレート)において強く発現する。これらの遺伝子の発現に関して、*Aspm cKO* とコントロール脳と比較した(図 1)。いずれの遺伝子発現パターンも有意な差異は見られなかった。なお、胎生 12.5 から 14.5 日の大脳皮質を経時的に観察すると大脳皮質の厚さは、発生段階が進むにつれて有意な減少を示し、特に深層ほどその減少傾向は強くなっていた。このことは、大脳皮質の低形成は、層構築の異常を伴わない深層ニューロンの減少が原因であることを示唆する。

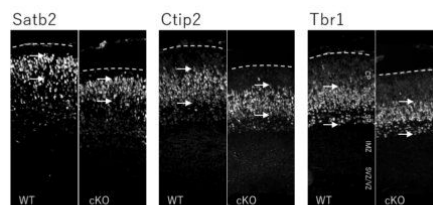


図1：胎生16.5日目における大脳皮質の転写因子発現解析
矢印は、核転写因子が発現する細胞の集積している層の境界を示す。
破線は、大脳皮質の最表面を示す。

【大脳皮質形成過程の *Aspm* の機能 (組織学的観察)】

大脳皮質の低形成の原因を調べるために、脳形成過程の *Aspm cKO* マウスの神経幹・前駆細胞における神経細胞分化、アポトーシスを経時的に調べた。胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日の増殖細胞数に違いはなかったが、神経幹・前駆細胞が分布する脳室帯の厚さは 16.5 日で有意に減少していた。

さらに、胎仔脳では、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日において、脳室帯の未分化な神経幹・前駆細胞および、中間帯から皮質板に存在する分化後ニューロンにおいて、アポトーシス (CC3 陽性、TUNEL 陽性) が多数認められた(図 2)。一方、生後脳ではアポトーシスはほとんど見られなかった。これらの観察結果から、*Aspm* は大脳皮質発生における神経幹・前駆細胞の形態の維持および分化後のニューロンの生存に必須であることが示唆された。

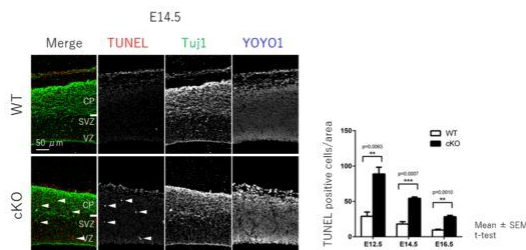


図2：大脳皮質におけるアポトーシスの発生
E14.5の大脳皮質のTUNEL染色像(左図)および、TUNEL陽性細胞数の計測結果(右図)

【大脳皮質形成過程の *Aspm* の機能 (タイムラプス観察)】 つぎに、細胞周期動態に連動した情報を基に *Aspm* の機能を解析するため、*Fucci* を発現し神経幹細胞特異的に *Aspm* がノックアウトされる *Fucci-NesCre; Aspm^{fllox/fllox}* を作製した。対象は、観察する脳室面の調節が可能な脳スライスを得るために、胎生 14.5 日とした。最終目的とした神経幹細胞の動態変化の有無を評価することができなかったが、以下に観察されたいくつかの現象を記す。

Fucci は、細胞周期の S/G2/M 期の核を緑色、G1/G0 期を赤色の蛍光タンパク質で可視化する。実際、マウス胎仔脳において、脳室帯では緑色、中間帯および皮質板では赤色の細胞が明瞭に観察された(図 3)。

まず、エレベータ運動について下降・上昇する細胞を追跡した。S/G2/M 期である下降する細胞では緑色の細胞が観察されたが、G1 期である赤色の細胞は蛍光強度が極めて弱く、上昇する動きははっきりと観察されなかった。また、アポトーシスを起こす細胞では、*Fucci* は赤色に変化する。組織学的観察で明らかにした *Aspm cKO* 細胞で増加するアポトーシスの発生タイミングを知るために、赤色に変化する細胞に注目したが、今回の研究で捉えることができなかった。

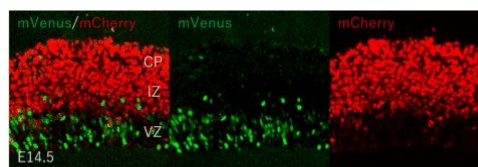


図3：マウス大脳皮質におけるFucciの発現
mVenusは脳室帯(VZ)、mCherryは中間帯(IZ)から皮質板(CP)の細胞で明瞭な発現を示す。

以上、本研究課題で得られた結果から、大脳皮質発生において、神経幹細胞が *Aspm* を欠損することで惹起される神経分化制御の異常やアポトーシスは、*in vivo* においては胎生早期から中期まで時空間的に連続して起こる現象で、その結果大脳皮質低形成に至ることが示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Madoka Tonosaki, Akira Fujimori, Takeshi Yaoi and Kyoko Itoh: Presumptive function of microcephaly related gene Aspm during murine brain development, ICN2018, 京王プラザホテル(東京都新宿区), September 24, 2018

〔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：
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

6 . 研究組織

(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： 藤森 亮

ローマ字氏名： FUJIMORI AKIRA

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。