

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14828

研究課題名(和文)脳室帯外神経幹細胞を誘導したマウスにおけるMCPH遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of MCPH genes in mice with induced outer radial glia

研究代表者

藤田 生水(Fujita, Ikumi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：80615138

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究によって,Aspmの機能欠損が発生期大脳皮質において染色体分配異常を引き起こし,細胞死を増加させることによって脳サイズを減少させることが分かった。LGN変異によってoRGを増加させることによりAspm変異による細胞死が増加したことから,oRGを生じる発生様式がAspm変異による紡錘体形成不全に脆弱であることが示唆された。oRGの誘導による細胞死の増加は神経産生期中期以降に観察されたが,その理由として,増殖期から神経産生期初期にかけては神経幹細胞の上皮形態再生能によりoRGの産生が抑制されることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Aspm遺伝子変異は,ヒトでは重篤な小頭症を引き起こすものの,マウスにおいてはわずかな表現型しか示さないことから,モデル動物を用いた小頭症の研究には困難が伴っていた。本研究では,LGN変異マウスを用いて人工的にoRG幹細胞を誘導することでAspm変異が重篤な小頭症を引き起こす現象を発見し,小頭症の発症機序を解明するために有用なモデル系であることを示した点で意義がある。また,oRGの発生時期特異的な誘導機構の研究を通して,神経幹細胞が発生初期には形態再生能を持つことを発見し,脳発生研究に新たな視点をもたらした。

研究成果の概要(英文):In this study, we showed that the loss of the Aspm function causes chromosome mis-segregation in the developing cortex, which increases cell death and decreases brain size. Cell death by the Aspm mutation was increased by artificial induction of oRG by using the LGN mutant mice, suggesting that developing scheme with oRG is susceptible to the spindle malformation by the Aspm mutation. Increase of cell death by the oRG induction was observed during the mid and late neurogenic stages. We revealed that induction of oRG is repressed by the regeneration ability of the epithelial structure in neural stem cells during the proliferative to early neurogenic stages.

研究分野:発生生物学

キーワード:小頭症 Aspm oRG OSVZ 細胞分裂 染色体分配

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト家族性小頭症は、発生期における脳の発達異常により脳サイズが小さくなる遺伝性疾患である。その原因遺伝子(MCPH 遺伝子)群の欠損は、ヒトで重篤な小頭症を引き起こす一方、マウスにおいてはわずかな脳サイズの減少しか示さないことが知られている。このことは、MCPH 遺伝子群がヒトの脳、とりわけ大脳皮質の拡大のために特異的な役割を担っていることを示唆する。主要な MCPH 遺伝子の一つである *ASPM* 遺伝子は、細胞分裂期における二極紡錘体の形成に重要な働きを持つことが知られている。しかし、その普遍的な機能がなぜヒトとマウスの脳発生において異なる度合いの表現型を呈するのかという理由については解明されていない。この問いに答えることで、MCPH 遺伝子がヒトの巨大な脳の発生を保障する仕組みを解明することができると期待される。

(2) ヒトとマウスにおける大脳皮質の発生様式は、発生初期においては基本的に共通である。神経幹細胞である放射状グリア(RG)が、始めに自己複製的対称分裂によって増殖し、やがて非対称分裂に移行してニューロンや中間前駆細胞を生み出す。RG は組織の頂端・基底に突起を接着させた上皮構造を持ち、頂端側の脳室帯に核を局在させて分裂する。マウスにおいては、神経発生後期まで、この RG が主要な神経幹細胞として働く。一方、ヒト脳の発生後期には、上皮の頂端構造を失った異なるタイプの幹細胞 outer RG (oRG) が生じ、大脳皮質の基底側に新たな幹細胞層を形成するようになり、後期神経産生の主役となる。基底側の幹細胞層は「外側脳室帯(OSVZ)」と呼ばれ、“しわ”のある巨大な大脳皮質を持つ哺乳類の発生後期で顕著に見られる組織構造であることが知られている。

(3) RG の頂端構造は、細胞分裂時に分裂面が頂端面を二分するように形成されることで、両娘細胞に受け継がれる。マウスにおいてこの分裂面の角度を擾乱すると、頂端構造を失った神経幹細胞を生じさせることができる。頂端構造を失った神経幹細胞は、ヒトにおける oRG のように、脳室帯から脱して組織の基底側で分裂を繰り返す。紡錘体角度を制御する *LGN* の変異マウスにおいては、分裂面角度の制御が失われてランダムになり、神経発生後期になるとヒト脳の発生後期のように多数の oRG が生じる。野生型と *LGN* 変異マウスの比較は、oRG の有無による発生の違いを研究するために有用なモデル系である。

(4) 研究代表者らは本研究に先立ち、*Aspm* 変異マウスが *LGN* 変異の背景で重篤な小頭症となることを見出ししていた。これは、*Aspm* の表現型が oRG の存在する発生様式において強く現れる可能性を示唆する。*Aspm* 単独変異マウスにおいてはわずかな、*Aspm* *LGN* 二重変異マウスにおいては多数の細胞死が観察されたことから、*Aspm* の機能欠損による脳サイズの縮小は、発生期における細胞死が直接の原因であることが推測されていた。*Aspm* は二極紡錘体の形成に関与することが知られていたため、染色体分配異常が細胞死を引き起こしている可能性が考えられたが、具体的な証拠は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、主に *LGN* 変異によって oRG を誘導したマウスを用いて、*Aspm* 変異が小頭症を引き起こす原因を解明することを目的とする。研究開始当初は以下の点に着目していた。

(1) *Aspm* の機能欠損により引き起こされる紡錘体形成異常が細胞死を引き起こす過程を明らかにする。

(2) *Aspm* の機能欠損が引き起こす細胞死の分子機構を解明する。

(3) 発生期に多数の oRG が観察されるモデル動物であるフェレットを用いて、*Aspm* 変異の表現型を解析する。

(4) *LGN* 変異により oRG を誘導したマウスを用いて他の MCPH 遺伝子群の表現型を解析する。

3. 研究の方法

(1) 本研究で用いた *Aspm* 変異マウス及び *Cdk5rap2* 変異マウスは、CRISPR/Cas9 システムを用いて作出した。

(2) 神経幹細胞の分裂動態を解析するため、子宮内電気穿孔法を用いてマウス胎仔脳に各種蛍光標識を導入し、スライス培養を作製して、二光子顕微鏡を用いてタイムラプス観察を行った。

(3) フェレット胎仔脳において *Aspm* 遺伝子をノックアウトするため、CRISPR/Cas9 システム及び蛍光標識を子宮内電気穿孔法により導入した。

(4) 細胞死の解析、神経幹細胞の分布等は、免疫組織化学的手法により解析した。

(5) シングル・セル遺伝子発現解析は、10X Chromium を用いた。

(6) ヒト iPS 細胞由来大脳オルガノイドは、SFEBq 法を用いて作製し、免疫組織化学的手法により解析した。

4. 研究成果

(1) *Aspm* 変異が *LGN* 変異の遺伝的背景で重篤な小頭症を引き起こす原因の究明

(1)- *Aspm* と *LGN* の機能的相互作用の検討

LGN の分子機能は RG の細胞分裂時に星状微小管を細胞表面で牽引することで紡錘体が水平方向に向くよう制御することであると分かっている。 *Aspm* LGN の二重変異における重篤な表現型が、これら分子の機能的相互作用に起因する可能性も考えられた。

まず、紡錘体角度について調べたところ、 *Aspm* 変異は紡錘体角度には影響せず、 *Aspm* LGN 二重変異体における角度分布は LGN 単独変異におけるランダムな分布と変わらなかったことから、 *Aspm* は紡錘体角度制御には寄与しないと考えられた。

LGN 変異マウスは、神経発生初期から後期までを通して、分裂軸の角度がランダムになるが、oRG は神経発生後期にならないと出現しない。 *Aspm* LGN 二重変異マウスにおける大量の細胞死は、発生初期の増殖期には見られず、発生後期の神経産生期中期以降に観察された。これは LGN 変異によって oRG が誘導されるタイミングと一致しているが、LGN の機能喪失とは一致しない。したがって、 *Aspm* LGN 二重変異における重篤な表現型は、 *Aspm* と LGN の機能的相互作用であるという解釈は成り立たないと考えられた。

(1)- LGN 変異による oRG の誘導が神経産生期中期以降にのみ見られる原因の解明

LGN 変異による紡錘体角度の擾乱によって oRG を誘導することができるが、その効果は神経産生期中期以降に限定され、発生初期の増殖期から神経産生初期にかけては見られない。

RG の分裂において、紡錘体角度が頂端面に対して水平に形成されることで、両娘細胞が頂端面を受け継ぐことができ、RG の上皮構造が保たれる。LGN 変異によって紡錘体角度が擾乱されると、一部の娘細胞が頂端面を失い、oRG へと転じることが分かっていた。

発生期大脳皮質のタイムラプス観察により、LGN 変異マウスの増殖期においても RG の紡錘体角度は擾乱され、頂端面の喪失が起きていることが確認された。ところが、増殖期において頂端面を失った細胞は、新たに頂端側に突起を伸ばし、頂端構造を再形成した。新たに伸張する突起の先端には周囲の細胞との間に接着結合が見られたため、周囲の細胞を足場として頂端面まで到達していることが示唆された。増殖期の RG は、この頂端構造の再生能を持つことで、紡錘体角度が擾乱されても oRG に転じないと考えられた。発生ステージを追ってこの現象を観察したところ、頂端構造の再生能は発生が進むにつれて減弱することが分かった。これは oRG が大脳皮質発生期中期以降に産生される理由の一つと考えられる。

(1)- 神経幹細胞の分散培養による検証

Aspm LGN 二重変異による大量の細胞死が、oRG が存在するという細胞形態・組織構造に依存する現象か否か検証を行った。大量の細胞死が観察される神経発生中期の大脳皮質から細胞を回収して in vitro で分散培養を行なった。ディッシュ上で分裂した細胞ペアのみ解析し、細胞死の割合を計測したところ、 *Aspm* 単独変異細胞と *Aspm* LGN 二重変異細胞の間に差は検出されなかった。これは in vivo における細胞死の割合と大きく異なることから、二重変異体における細胞死の増加は、組織中に特異的な現象であることが示唆された。

(2) 細胞死を引き起こす原因の究明

(2)- 染色体分配異常の解析

大脳皮質のスライス培養をタイムラプス観察したところ、 *Aspm* の欠損によりおよそ 10% の細胞で M 期の遅延が見られたものの、二極紡錘体の形成異常はそれほど顕著ではなく、ほとんどの細胞は最終的に分裂を完了していた。ゆえに染色体分配異常が細胞死の原因であると断定することは困難であった。

そこで発生期大脳皮質から細胞を回収し、シングル・セル解析によって大量の細胞の染色体数を分析した。標準化した遺伝子発現量から染色体の倍数性を推定する手法を導入し、神経発生後期の LGN 変異マウスと *Aspm* LGN 二重変異マウスの細胞で染色体数異常の出現頻度を比較した。すると *Aspm* LGN 二重変異は LGN 単独変異のおよそ 8 倍の頻度で染色体分配異常が検出された。これら異常な染色体数の細胞の遺伝子発現を解析したところ、p53 経路の活性化が見られた。一方、全体の遺伝子発現には、大きな差は見られなかった。

(2)- DNA 損傷応答の解析

Aspm 変異による細胞死は、p53 を欠損した遺伝的背景で見られなくなった。また、 *Aspm* 変異においては、DNA 損傷応答のマーカーであるリン酸化 H2A.X が検出された。以上の結果から、 *Aspm* 変異による細胞死の誘導は、染色体分配異常に起因するものであると推察された。

(3) oRG を持つモデルにおける検証

(3)- フェレットにおける *Aspm* 機能阻害

電気穿孔法を用いてフェレット胎仔脳に CRISPR/Cas9 システムを導入し、 *Aspm* 遺伝子を破壊して、その細胞系譜の表現型を調べた。

Aspm ノックアウト群では、およそ 40% の細胞で *Aspm* のシグナルが消失していた。細胞を疎に蛍光ラベルして個々の幹細胞から生じたクローン系譜を 6 日後に解析したところ、 *Aspm* ノックアウト群における細胞系譜は対照群に比べてクローンサイズが平均でおよそ 20% 減少しており、特にニューロンの産生数が減少していた。しかしながら、細胞死に至った細胞を検出することが技術的に困難であったことから、細胞死の割合や細胞死が起きる細胞種については判別できなかった。

また、本研究を進める間に、フェレットの *Aspm* ノックアウト系統が樹立されたことが海外の研究グループから発表されたため、本実験の新規性は損なわれた。

(3)- ヒト iPS 細胞由来の脳オルガノイドによる *Aspm* の機能解析

ヒト脳組織における *Aspm* の機能を解析するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて *ASPM* ヘテロ変異体及びホモ変異体の iPS 細胞系統を新たに樹立した。それぞれの細胞から SFEBq 法によって脳オルガノイドを誘導し、免疫組織学的に解析した。*ASPM* ホモ変異体においては、ヘテロ変異体と比べて脳室帯が小さい傾向にあり、脳室帯の中で細胞死が起きていることが観察された。しかしながら、より基底側の脳室帯外領域においては、系の特性上、非常に多くの死細胞が存在し、細胞死の起きる割合の解析は困難であった。*ASPM* ホモ変異体は、ヘテロ変異体と比べて皮質板が顕著に薄く、ニューロンの産生が減少していると考えられた。

(4) CRISPR/Cas9 システムを用いて、MCPH 遺伝子のひとつ *Cdk5rap2* の変異マウスを新たに作製し、*LGN* 変異の遺伝的背景で細胞死が増加するかを調べた。*Cdk5rap2* 変異マウスでは神経産生期に細胞死はほとんど見られず、*Cdk5rap2 LGN* 二重変異マウスにおいても著しい増加は見られなかった。このことから、*Cdk5rap2* の表現型がマウスでほとんど見られないことは、*Aspm* とは異なる理由によるものであることが推察された。

(5) 結論

本研究によって、*Aspm* の機能欠損が染色体分配異常を引き起こし、細胞死を増加させることによって脳サイズを減少させることが分かった。*LGN* 変異によって oRG を増加させることにより *Aspm* 変異による細胞死が増加したことから、oRG を生じる発生様式が *Aspm* 変異による紡錘体形成不全に脆弱であることが示唆された。

oRG の誘導による細胞死の増加は神経産生期中期以降に観察されたが、その理由として、増殖期から神経産生期初期にかけては神経幹細胞の上皮形態再生能により oRG の産生が抑制されることが明らかとなった。

他の MCPH 遺伝子と oRG の関係や、フェレット及びヒトにおける *Aspm* の役割については、実験系に改良を加えて研究を続ける必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujita I, Shitamukai A, Kusumoto F, Suetsugu T, Mase S, Omori A, Kato K, Abe T, Shioi G, Konno D, Matsuzaki F	4. 巻 22
2. 論文標題 Endfoot regeneration restricts radial glial state and prevents translocation into the outer subventricular zone in early mammalian brain development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 26-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-019-0436-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kono K, Yoshiura S, Fujita I, Okada Y, Shitamukai A, Shibata T, Matsuzaki F	4. 巻 8
2. 論文標題 Reconstruction of Par-dependent polarity in apolar cells reveals a dynamic process of cortical polarization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e45559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.45559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藤田 生水, 松崎 文雄	4. 巻 50
2. 論文標題 哺乳類の発生期大脳における神経幹細胞の形態的恒常性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 375-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fujita I, Shitamukai A, Kusumoto F, Mase S, Suetsugu T, Kato K, Abe T, Shioi G, Konno D, Matsuzaki F
2. 発表標題 Regeneration of the epithelial structure in neural stem cells during mammalian brain development
3. 学会等名 Cell Bio Virtual 2020 Meeting (ASCB) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujita I, Shitamukai A, Kusumoto F, Mase S, Suetsugu T, Kato K, Abe T, Shioi G, Konno D, Matsuzaki F
2. 発表標題 Regeneration ability of the epithelial structure in neural stem cells during mammalian brain development
3. 学会等名 43rd Annual Meeting of MBSJ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fujita I, Shitamukai A, Kusumoto F, Mase S, Suetsugu T, Kato K, Abe T, Shioi G, Konno D, Matsuzaki F
2. 発表標題 Structural plasticity of neural stem cells in mammalian brain development
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB & 19th PSSJ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fujita I, Shitamukai A, Kusumoto F, Mase S, Suetsugu T, Konno D, Matsuzaki F
2. 発表標題 Regenerative plasticity of the epithelial structure in radial glia during the early mammalian brain development
3. 学会等名 ASCB EMBO 2018 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fujita I, Suetsugu T, Kishida C, Tsunekawa Y, Konno D, Fujimori A, Matsuzaki F
2. 発表標題 Induction of outer radial glia causes severe microcephaly in the Aspm mutant mice
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the ISDN (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------