

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15683

研究課題名(和文) 遺伝性小頭症責任遺伝子ASPMは神経発生過程において細胞周期と細胞死を制御するか

研究課題名(英文) Does hereditary microcephalic responsible gene ASPM control a cell cycle and cell death in the neurogenesis process?

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ASPM欠損によって細胞死が誘導される原因を明らかにすることを目的とし、本研究ではFucci (Fluorescent ubiquitination cell cycle indicator) 標識遺伝子を、中枢神経系神経幹細胞でAspm (マウスオルソログ)遺伝子を破壊したノックアウトマウスを作製した。細胞動態解析の結果、Aspm cKO神経幹細胞において細胞死の発生が細胞分裂頻度に相関し、特異な細胞分裂形態が多く観察されたが、細胞周期時間に有意差はなかった。このことから、ASPM欠損による細胞死の増加は、細胞増殖や細胞周期制御ではなく細胞分裂時態の制御因子の異常による可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Aspmの欠損によるアポトーシス発生が、細胞分裂を重ねることが関連していることを明らかにしたが、細胞増殖や細胞周期の長さなどの細胞周期制御には影響を及ぼしていないことが示唆された。この研究結果は、神経系発生において、Aspmがおよぼす影響を理解するための新たな知見であり、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への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：To evaluate molecular mechanisms of apoptosis in the ASPM knockout brain, we developed Fucci expressing and conditional knock-out (cKO) mice, in which Aspm, murine orthologous gene, was deleted specifically in neural stem cells. As a result of timelapse imaging, apoptosis was found depending on the number of the cell cycle, however the cell cycle length was not differed. And more abnormal shaped cells were observed at the mitosis in the cKO cells. The results suggested that apoptosis in Aspm cKO cells might occur due to the disfunction related to a cell shape, not cell cycle length.

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 (共通)

1. 研究開始当初の背景

常染色体劣性遺伝小頭症 5 (MCPH5)は、ASPM 遺伝子を責任遺伝子とする脳形成異常で、詳細な発症機序は不明である。私たちは、ASPM のマウスオーソログである *Aspm* をノックアウトした MCPH5 モデルを用いて脳形成過程での動態を組織学的に検証してきた結果、胎仔脳の神経幹細胞の細胞増殖・神経分化、細胞移動に異常をきたさず、時期・脳領域特異的に細胞死: アポトーシスが増加することを見出した。しかし、*Aspm* がアポトーシス誘導にどのように作用しうするのか、*Aspm* の新規分子機能については明らかとなっていない。

2. 研究の目的

これまでに、*Aspm* KO マウスの組織学的解析により、神経幹細胞の細胞増殖および神経新生に異常をきたすという従来の報告とは異なり、時期特異的、脳領域特異的に細胞死が増加することを見出していたが、細胞死の発生過程については不明であった。脳形成過程における、ASPM 欠損によって細胞死(アポトーシス)が誘導される原因を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

脳特異的 *Aspm* 欠損 Fucci 発現マウス: Fucci-NesCre;*Aspm*^{fllox/fllox} の作製

当該マウスの作製条件を検討し、Fucci-NesCre;*Aspm*^{fllox/fllox} ホモ親と NesCre;*Aspm*^{fllox/+} ヘテロ親の組み合わせにより、発生期の脳特異的に *Aspm* 遺伝子を欠損するマウス系統「Fucci-NesCre;*Aspm*^{fllox/fllox}(*Aspm* cKO)」を作製した。

細胞動態解析: タイムラプスイメージング

胎齢 12.5 日の胎仔脳から神経幹細胞が集積する大脳皮質領域から神経幹細胞を回収した。増殖培養液 (EGF,FGF2 含有 DMEM/F12) で浮遊培養を行い、ニューロスフェアとして培養維持を 2 回繰り返した神経幹細胞を解析に使用した。この神経幹細胞をポリ L リジンコートしたガラスボトムディッシュ上で増殖培養液を用いて低密度分散培養を行った。この培養ディッシュを共焦点レーザー顕微鏡に設置した CO2 細胞培養チャンバーに移し、タイムラプスで一細胞レベルにおける S/G2/M 期(緑)、G1 期(赤)の変化および細胞形態を最大 5 日間観察した。取得した画像を基にして、細胞系譜を作成し、蛍光変化と細胞分裂そして細胞死の発生のタイミングを評価した。

DNA 損傷レベルの評価: 免疫染色

ポリ L リジンコートしたカバーガラス上に神経幹細胞を播種し、増殖培地で培養を最大 3 日間実施した。1 日おきに回収した細胞を PFA 固定し、 γ H2AX(DNA 損傷マーカー)に対する免疫染色を行った。

4. 研究成果

アポトーシスの発生頻度

細胞系譜(図 1A)を基に、細胞死の発生について、発生率(全体、分裂回数別)を検討した。全体(観察期間内)においては有意差がないものの、組織学的観察と同様にノックアウト細胞で高かった(図 1B)。細胞分裂の回数別に分けた世代間では、正常な幹細胞と比べノックアウト細胞では細胞死の発生率が高い状態で、維持されていた(図 1C)。さらに、分裂後の細胞死までの時間を調べた結果、ノックアウト細胞では、細胞分裂から細胞死までに至る時間が回数を重ねると短かった(図 1D)。この変化は、細胞分裂を重ねると「分裂後すぐに死滅しやすい」状態になると考えられ、ノックアウト細胞において「アポトーシスが発生すること」と「細胞分裂の回数」とのあいだになんらかの関連があることを示唆している。

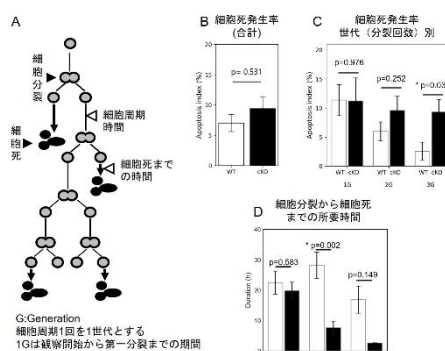


図1 細胞死(アポトーシス)の発生頻度評価

細胞周期長

細胞分裂と細胞分裂間を細胞周期「全長」として、さらに Fucci 蛍光(図 2A)をもとに、mCherry(赤)と mVenus(緑)を共発現(黄色)している「G1/S」として経過時間を測定した。いずれも変化が認められなかった(図 2B,2C)。

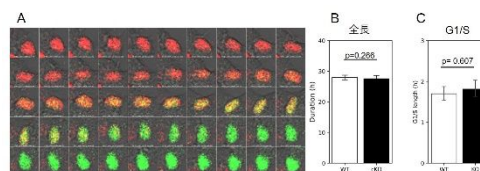


図2 細胞周期解析

細胞分裂時の形態

培養細胞を用いた細胞分裂角度の評価を行った。既報 (Gai M et al., EMBO reports, 2016) を基にして細胞分裂像を分裂軸の傾きを示す「Oblique division 傾斜分裂 (図 3B')」タイプと分裂軸が垂直な「Vertical division 垂直分裂 (図 3C')」タイプを分類した。さらに、これらに分類されない異常な形態が多く認められたタイプを「Other division (図 3A')」とした。それぞれ割合を計測したところ、傾斜分裂の割合は変わらないが、垂直分裂が減少し、異常な形態タイプ (3A') の増加が確認された。

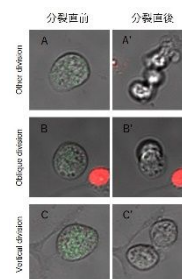


図3 細胞分裂時の形態

DNA 損傷

神経幹細胞の増殖培養下における培養日数の増加を、細胞分裂回数の増加と仮定し、DNA 損傷の指標である二本鎖切断 (DSB) の程度変化を評価した。その結果、一細胞あたりの γ H2AX foci 数には、有意な差は認められなかった。

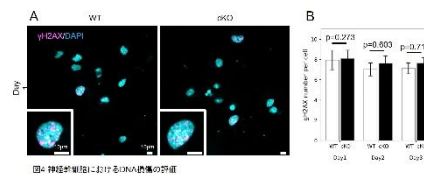


図4 神経幹細胞におけるDNA損傷の評価

以上、本研究課題で得られた結果から、ASPM 欠損による細胞死 (アポトーシス) の増加は、細胞増殖や細胞周期制御ではなく、細胞分裂時形態の制御因子の異常による可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 外崎 円, 藤森 亮, 藤本隆宏, 矢追 毅, 伊東恭子
2. 発表標題 ヒト先天性小頭症 (MCPH5) モデルマウス (Aspmコンディショナルノックアウト) の解析
3. 学会等名 第63回日本神経病理学会総会学術研究会
4. 発表年 2022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
---------	---------