

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20876

研究課題名（和文）神経幹細胞のミトコンドリア脂質膜代謝に着目した脳回形成制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of gyration control mechanism focusing on mitochondrial lipid membrane metabolism in neural stem cells

研究代表者

中村 勇治（Nakamura, Yuji）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・臨床研究医

研究者番号：60788024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、小頭症、単純脳回を含む大脳皮質形成異常を示す複数家系において、患者が共通してPNPLA8遺伝子の両アレルにナンセンス変異やフレームシフト変異などの短縮型変異を有することを見いだした。iPS細胞を用いて脳オルガノイドを作成したところ、PNPLA8機能を喪失した脳オルガノイドではbasal radial glia (bRG)と、大脳皮質上層のニューロンの数が減少していることが分かった。また、空間トランスクリプトーム解析により、PNPLA8機能喪失脳オルガノイドのapical radial gliaではbRGに関連した遺伝子発現が有意に減少していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは進化の過程で大脳皮質のサイズを増大させてきた。これに寄与するメカニズムの一つとして、豊富な増殖能を持ち、ヒト脳に豊富に存在する一方でマウスに殆ど認めないbasal radial gliaの存在が挙げられる。しかし、basal radial gliaの豊富さを制御する因子は十分に解明されていなかった。我々の結果は、これまでに注目されていなかったリン脂質代謝がヒトのbasal radial gliaの豊富さに重要な役割を持つ可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：We found that patients with microcephaly and simple gyrus share the truncating mutations such as nonsense and frameshift mutations in both alleles of the PNPLA8 gene. We found that loss of PNPLA8 reduces the number of basal radial glia and upper-layer neurons in cerebral organoids. Spatial transcriptome analysis also revealed that gene expression associated with bRG was significantly decreased in apical radial glia of PNPLA8-deficient cerebral organoids.

研究分野：神経科学

キーワード：PNPLA8 脳オルガノイド basal radial glia

1. 研究開始当初の背景

ヒトは進化の過程で大脳皮質のサイズを増大させてきた。これに寄与するメカニズムの一つとして、豊富な増殖能を持ち、ヒト脳で豊富に存在する一方でマウスには殆ど認めない外側放射状グリアの存在が挙げられる。しかし、外側放射状グリアの豊富さを制御する因子は十分に解明されていなかった。

PNPLA8 はミトコンドリアに局在するホスホリパーゼの一種で、リン脂質のリモデリングによりミトコンドリア機能維持に作用することが知られている。しかし、Pnpla8 ノックアウトマウスに顕著な脳発生異常が見られないことから、これまで脳発生とは特に関係がないと考えられてきた。

申請者はこれまでの研究で、脳回の低形成を特徴とする「単純脳回型小頭症」の患者(図1)に PNPLA8 両アレル性機能喪失変異を同定した。また、皮膚線維芽細胞を用いたミトコンドリア解析で、患者では酸素消費能が低下していることを見いだした(図2)。ミトコンドリアの形態や機能変化は、神経幹細胞の増殖や分化を制御する(Iwata et al. Science 2020)ため、この結果は疾患メカニズムを考える上で興味深い。しかし、PNPLA8 がどのようにヒトの脳形成を制御しているのかについては未だ不明点が多い。

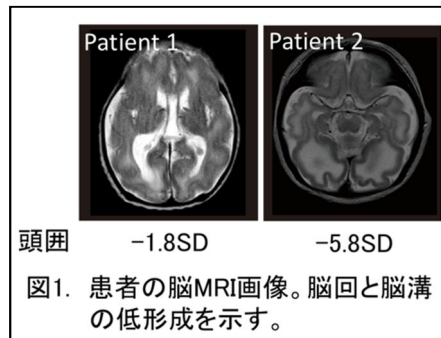


図1. 患者の脳MRI画像。脳回と脳溝の低形成を示す。

2. 研究の目的

先天性小頭症の患者に同定した PNPLA8 遺伝子の脳発生における機能を明らかにする。

3. 研究の方法

患者由来 iPS 細胞と、正常 iPS 細胞から CRISPR/Cas9 法で PNPLA8 をノックアウトした iPS 細胞を用いて脳オルガノイドモデルを作製する。免疫染色で表現型を観察する。また脳オルガノイドに対して空間トランスクリプトーム解析を行い、メカニズムを調べる。次に、iPS 細胞から神経幹細胞を作製し、ミトコンドリア機能を解析する。

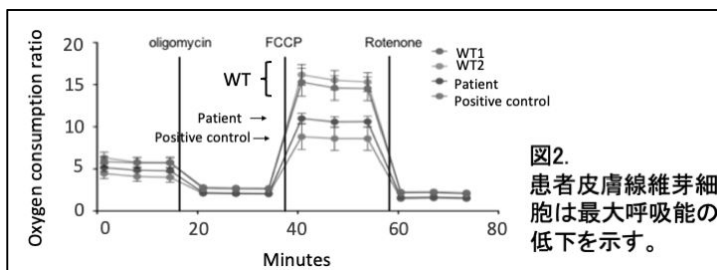


図2. 患者皮膚線維芽細胞は最大呼吸能の低下を示す。

4. 研究成果

まず、PNPLA8 機能を喪失した脳オルガノイドでは、外側放射状グリアの数が著明に減少し、同時に外側放射状グリアが分布する脳室下帯のサイズが減少していることが分かった。さらに、外側放射状グリアに由来する表層ニューロンの数が著明に減少していることが分かった。この結果から、PNPLA8 機能を喪失すると外側放射状グリアが減少し、その結果先天性小頭症となることが証明された(図3)。

次に、空間トランスクリプトーム解析では、PNPLA8 機能喪失脳オルガノイドの頂端側放射状グリアでは外側放射状グリアに関連した遺伝子発現が有意に減少していることが分かった。また、神経発生に関わるパスウェイの発現が上昇していることが分かった。この結果から、PNPLA8 機能を喪失した頂端側放射状グリアでは細胞の運命決定が変化し、外側放射状グリアへと分化しにくく、神経細胞へと分化しやすくなる可能性が示唆された(図3)。

次に、PNPLA8 を欠損した iPS 由来神経幹細胞では、ミトコンドリアの形態や機能に明らかな異常を認めないことが分かった。この結果から、PNPLA8 はミトコンドリアにより制御される神経幹細胞の運命決定機構を介さず何らかの形で神経細胞の運命を決定し、外側放射状グリアの産生を制御していることが示唆された。

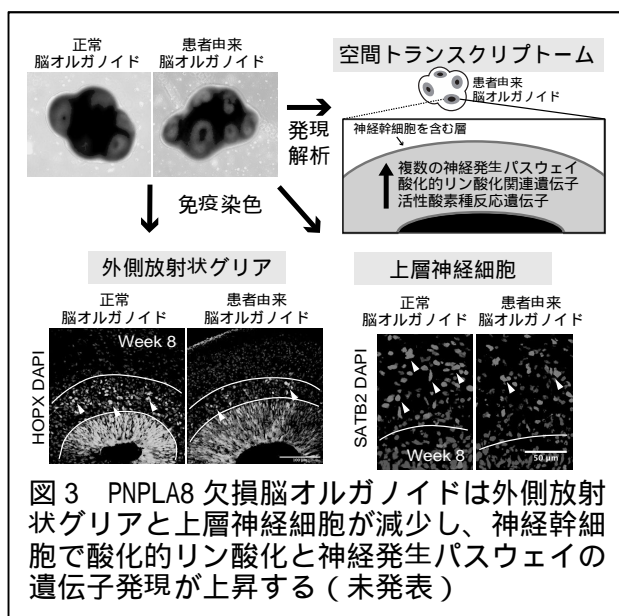


図3 PNPLA8 欠損脳オルガノイドは外側放射状グリアと上層神経細胞が減少し、神経幹細胞で酸化的リン酸化と神経発生パスウェイの遺伝子発現が上昇する(未発表)

以上の結果から、今までに注目されてこなかったリン脂質代謝が外側放射状グリアの豊富さ

に重要な役割を持つ可能性が示唆された。また、外側放射状グリアの産生にはミトコンドリア機能とは直接関わらない何らかのリン脂質代謝が関わっていると考えられた。そのため、今後は脂質解析を重点的に行い、PNPLA8 による外側放射状グリアの制御機構を明らかにする。

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 中村勇治 |
| 2. 発表標題 Biallelic variants in PNPLA8 disrupt cortical gyrification through aberrant mitochondrial dynamics |
| 3. 学会等名 第64回日本小児神経学会学術集会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|