

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293240

研究課題名(和文)細胞周期標識・放射線感受性小頭症遺伝子欠損マウスを用いた関連分子の動態・機能解析

研究課題名(英文)Cell kinetic as well as functional analyses on microcephaly-related gene knockout mice

研究代表者

伊東 恭子 (Itoh, Kyoko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：発生期脳特異的にAspm遺伝子を欠損するマウスを作製し、胎仔脳の形成、生後の脳成熟に及ぼすAspmの機能を解析した。胎生中・後期で、胎仔脳の脳室帯における細胞周期M期、S期細胞数は、Aspm欠損マウス、Aspm野生型で有意差がなかった。EdUパルスアッセイ法では、Aspm欠損マウスにおいて、EdU標識細胞総数が有意に減少しており、胎齢14.5日以降における新生神経細胞数減少によるものと考えられた。脳成熟期におけるMRI(拡散テンソル画像)から算出されたFA値は、Aspm欠損マウスの大脳皮質・白質で有意に低下し、組織学的に神経突起の性状(神経突起の縦横比率)の変動によるものと推測された。

研究成果の概要(英文)：CNS-targeted conditional Aspm-knockout (KO) mice were generated to investigate the significance of Aspm in developing brain from the viewpoint of cell kinetics and the formation of cortical structure. We first studied whether the cell number showing S-phase as well as M-phase may be altered in Aspm-KO mice and found that no increase or decrease in the number of cells assigned to either S- or M-phase was demonstrated in the forebrain from embryonic day (E) 12.5 through 16.5. EdU-pulse labelling studies revealed that the labeled cells were decreased in the intermediate zone of Aspm-KO mice, indicating the significant reduction of newly-born neurons after E14.5. MRI imaging studies of postnatal Aspm-KO mice demonstrated the significant alterations in FA value (calculated from the tensor imaging) in the KO cerebral cortex when compared to wild type cerebral cortex, which is likely to correlate with the changes of the neurite direction shown in histo-morphometric studies.

研究分野：発生神経生物学、神経病理学

キーワード：先天異常学 Aspm 細胞周期 小頭症 MRI

1. 研究開始当初の背景

(1) *ASPM* (abnormal spindle-like microcephaly associated) は、放射線曝露によって胎児脳で発現減少を示す遺伝子として見出され、しかも遺伝性小頭症 MCPH5 の原因遺伝子として同定された。本研究代表者らは、*ASPM* のマウス・オーソログである *Aspm* に関して、マウス胎仔発生過程に母体への X 線照射 (2Gy 以上) を行うと照射後、終脳のマトリックス細胞層において *Aspm* 発現が有意に低下することを明らかにした (Fujimori et al. BBRC, 2008)

(2) *ASPM* のマウス・オーソログである *Aspm* 欠損マウスでは、脳の容積ならびに重量の有意な減少、大脳皮質深層・白質の菲薄化に加え、胎生後期胎仔脳において大脳皮質層構造のマーカである転写因子の発現異常を伴うことが明らかになった。このことから、*Aspm* 分子は細胞増殖のみならず、細胞周期、細胞分化、細胞移動、シナプス機能などにも時空間軸で影響を与えることが推測された。そこで、我々は発生期中枢神経系特異的に *Aspm* 遺伝子を破壊できる条件的 *Aspm* 欠損マウスを作製し、疾患遺伝子 *Aspm* が細胞周期と細胞増殖、細胞移動、生後の脳発達に及ぼす影響を詳細に解析し、脳形成異常の発生メカニズムを明らかにする本研究を企図した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、放射線曝露によって胎児脳で発現減少を示す遺伝子として見出され、しかも遺伝性小頭症 MCPH5 の原因遺伝子として同定された *ASPM* の、脳形成・発達・成熟における機能的役割を細胞・分子レベルで解明することを目的として計画した。

(2) 発生期中枢神経系に局限した *Aspm* 遺伝子破壊マウスを作製することにより、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、ならびに成マウスにおける大脳皮質細胞構築、皮質遠心路・求心路形成を組織学的に解析する。さらに、成個体の評価として、学習・行動など高次脳機能に及ぼす *Aspm* 分子欠損の影響を明らかにするものである。

3. 研究の方法

(1) 既に作製されている *Aspm^{fllox}* マウスと Nestin プロモータ下に Cre を発現する TgNes-Cre マウスを交配し、発生期中枢神経系特異的に *Aspm* 遺伝子を欠損するマウス系統：TgNes-Cre-*Aspm^{fllox}* を作製した。

(2) 中枢神経系特異的 *Aspm* 欠損マウスの胎仔脳を用いて、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日において、BrdU あるいは EdU を投与し、各種細胞マーカー (神経幹細胞、未熟神経細胞、グリア細胞)、細胞周期マーカー、転写

因子などに関する免疫組織染色を施行し、胎仔脳における細胞増殖・分裂、細胞周期、細胞死、細胞分化、神経細胞移動を組織計測学的に解析した。

(3) 成マウスでは、離乳直後 (生後 3 週齢) と成熟期 (生後 10 週齢) において、*in vivo* MRI、ならびに脳の組織学的解析 (Bodian 染色、髄鞘染色など) を用いて、生後脳における時空間的な大脳皮質細胞構築、神経線維の走行や神経回路形成の変化を解析した。上記を総合し、脳形成期の様々な局面における *Aspm* 遺伝子の機能を解明するとともに、高次脳機能発達における役割について重要な示唆を得た。

4. 研究成果

(1) 脳特異的 *Aspm* 欠損マウスを用いた脳形成過程の解析

1 皮質サイズ

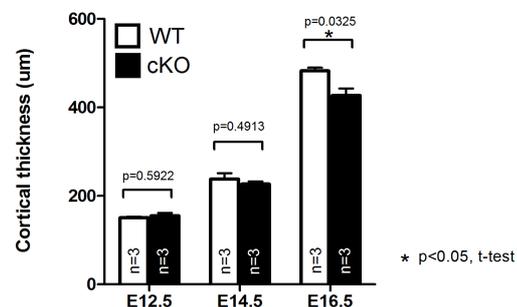


図 1. 大脳皮質の厚さ

大脳皮質の厚さは、胎齢 16.5 日でのみ *Aspm* 欠損マウスでは *Aspm* 野生型に比し、有意な減少がみられた (図 1)。層形成のマーカ (*Tbr1*, *Ctip2*, *Satb2*) によって構成を検証したところ深層ほど層厚が減少していた。胎齢 16.5 日には、*Aspm* 欠損マウスで脳室帯の減少も確認された。

2 細胞増殖・細胞周期

細胞周期における M 期 (リン酸化ヒストン) および S 期 (BrdU 投与 1 時間後の分布) の変化について検証した。胎齢 12.5 日、胎齢 14.5 日、胎齢 16.5 日において、*Aspm* 欠損マウスと *Aspm* 野生型マウスで脳室帯における M 期細胞数、S 期細胞数に有意差がなく、皮質形成期における細胞増殖・細胞周期に関して *Aspm* 欠損の影響は及ばないことが示唆された。

3 神経新生・細胞遊走

EdU パルスアッセイ法を用いて、神経細胞新生、細胞遊走に関して解析した。EdU 投与 2 日後 (胎齢 12.5 日/胎齢 14.5 日、胎齢 14.5 日/胎齢 16.5 日) に解析を行った。胎齢 12.5 日/胎齢 14.5 日では、EdU 標識細胞数、皮質板・中間帯における分布パターンに、両群間

に有意差はなかった(図2)。胎齢 14.5 日/胎齢 16.5 日では、*Aspm* 欠損マウスにおいて、*Aspm* 野生型に比し、EdU 標識細胞総数、中間帯における細胞数が有意に減少したが、これらは未熟なニューロンマーカー(DCX、Tuj1)陽性であることが判明した。この差異は、胎齢 14.5 日以降における新生神経細胞数の減少によるもので細胞遊走の影響は乏しいと考えられた。

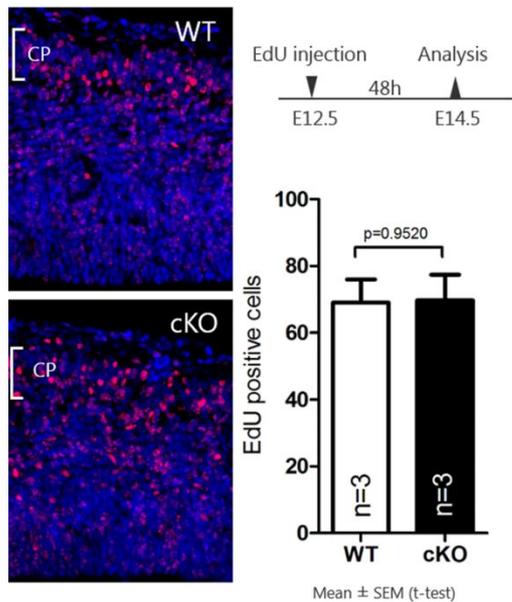


図 2. 胎齢 12,5/14.5 の EdU 標識細胞数

(2) *Aspm* 欠損マウスの生後における脳発達・成熟の解析

1 *in vivo* MRI による脳の時空間的变化と組織学的検証

Aspm 欠損マウス、*Aspm* 野生型マウス、雌雄の 4 群で MRI (T2 強調画像、拡散テンソル画像) を生後 3 週齢、10 週齢で施行した。T2 強調画像で、*Aspm* 欠損マウスでは *Aspm* 野生型マウスに比し、雌雄ともに有意な非進行性脳室拡大、脳容積減少がみられた(図 3, 4)。

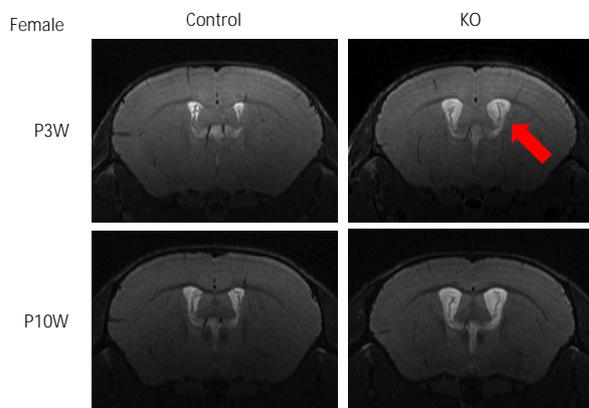


図 3. 脳室の拡大 (T2 強調画像)

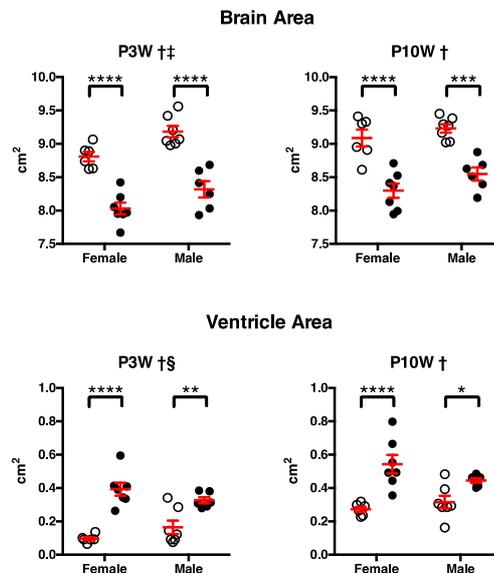


図 4. 脳実質面積と脳室面積

拡散テンソル画像から算出された FA 値は、生後 3 週齢、10 週齢において、*Aspm* 欠損では、*Aspm* 野生型に比し、大脳白質、外包、内包、海馬采で有意な低下をみた。*Aspm* 野生型では、脳成熟とともに大脳皮質の FA 値は減少したが、*Aspm* 欠損で変化はみられなかった。

生後 5 週齢、13 週齢において、脳組織の Bodian 染色、髄鞘染色を用いて、大脳皮質各層の厚さ (I 層、II/III 層、IV 層、V 層、VI 層) 各層における細胞密度、神経突起の性状 (神経突起の縦横比率) に関して、組織計測学的画像解析を施行した。*Aspm* 欠損マウスにおいて、大脳皮質 IV 層、V 層、VI 層の皮質層厚、皮質細胞数は有意に減少するとともに、神経突起の縦横比に有意な変動がみられ、神経線維構築異常を示唆した。神経突起の走行 (垂直方向・水平方向) 突起形状、束形成などの変化が FA 値に影響を与えることが明らかになり、論文作成中である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

1 荻寛志、新田展大、柴田さやか、丹藤創、藤森亮、青木伊知男、伏木信次、伊東恭子 他 「遺伝性小頭症 MCPH5 モデルマウス脳の *in vivo* MRI と病理の相関」 第 58 回日本神経病理学会総会学術研究会 2017 年 6 月 2 日 (金) 学術総合センター 一橋講堂 (東京都・千代田区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊東 恭子 (ITOHO, Kyoko)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 80243301

(2) 研究分担者

伏木 信次 (FUSHIKI, Shinji)
京都府立医科大学・医学研究科・特任教授
研究者番号： 80150572

藤森 亮 (FUJIMORI, Akira)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・放
射線防護研究センター、リスク低減化研究プ
ログラム、感受性モデル動物研究チーム・チ
ームリーダー
研究者番号： 50314183