

令和元年5月31日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01722

研究課題名(和文) 脳のアンチエイジングを目指した小頭症責任遺伝子ASPMの神経幹細胞活性化機能解明

研究課題名(英文) The functional significance of ASPM, responsible gene for human microcephaly, in the activation of adult neural stem cells - a new approach to brain anti-aging

研究代表者

丹藤 創 (Tando, So)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80423870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト小頭症モデルであるAspm KOマウスを用い、ASPMの脳成熟・老化における機能的役割を包括的に理解することを目的に行った。In vivo MRI及び組織学的解析により、ASPMが、脳成熟過程における神経線維発達に重要な役割を担っていることを見出した。また、ASPMの成体海馬神経細胞新生における機能を加齢という時間軸で解析し、Aspm KOマウスにおいて、加齢とともに顕在化する海馬神経細胞新生低下を明らかにした。その原因として、神経幹細胞から神経細胞への分化過程の異常が示唆された。現在、Aspm KOに伴う行動表現型の解析により、脳の形態表現型との関連性について検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、小頭症原因遺伝子ASPMの生後の脳発達や加齢における機能的意義については、殆ど解析されてこなかった。今回、我々は、ASPMが脳成熟過程における神経線維の分化や伸長に関与することを明らかにした。また、老化Aspm KOマウスにおける海馬神経細胞新生の低下を見出した。ASPMが、脳形成期のみならず、生後の脳成熟や老化にも深く関与することを世界に先駆けて示した成果である。今後、ASPM遺伝子活性化により神経線維の構造的異常や加齢に伴う神経細胞新生低下の改善が可能となれば、小頭症患者の脳機能改善への道を開く意義のある結果と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of our study is to elucidate the role of ASPM gene in brain maturation and the hippocampal adult neurogenesis with aging.

MRI analysis showed that the fractional anisotropy (FA) values were significantly lower in both the cortex and white matter, and developmental changes in the FA values were less remarkable in the Aspm KO mice as compared with the controls. Histopathological analyses revealed that the ratios of the horizontal to vertical neurites were altered in the KO mice, suggesting that abnormal neurite outgrowth and differentiation in Aspm KO mice. Next, we examined adult hippocampal neurogenesis with aging. The number of BrdU- and DCX-positive cells in the dentate gyrus showed a significant decrease with age in Aspm KO mice as compared to the controls. However, the number of nestin-positive cells was not changed, suggesting that Aspm might be involved in the differentiation process of hippocampal neural stem cells to young neurons with aging.

研究分野：神経病理学

キーワード：加齢・老化 ASPM 神経幹細胞 MRI 行動表現型

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

1. 研究開始当初の背景

(1) ASPM 遺伝子は、遺伝性小頭症の中で最も頻度の高い MCH5 の原因遺伝子として同定され、ヒト脳の進化に伴う脳サイズの増大に関わる遺伝子として、ゲノム進化の観点から注目が集まっている。特に、神経幹細胞分裂時の紡錘体形成に関与し、対称・非対称分裂を制御することが知られている。国内外の研究は、脳形成期に焦点を当てた小頭症発症メカニズムの解明を目指したものが主体であり、ASPM の生後の脳発達や老化における機能に着目した研究に乏しい。

(2) 我々のグループは、ASPM が胎生期放射線関連小頭症に関与していることを報告した (Fujimori et al. 2008)。その後、ASPM のマウス・オースログである *Aspm* に関して、*loxP*、*Cre* リコンビナゼ発現系が発生期脳特異的に誘導される C57BL/6J 系統マウスで *Aspm* 欠損マウス (*Aspm*^{fllox} Tg-Nes-Cre) を作製し、その表現型を解析した。このマウスの表現型として、脳の容積及び重量の有意な減少 (-15%)、大脳皮質深層 (V 層、VI 層) の菲薄化、加齢とともに進行する脳室拡大、海馬、嗅球の萎縮が明らかになった (Fujimori et al. 2014)

(3) MCH5 遺伝性小頭症患者はてんかん、言語発達遅延、注意欠陥、低 IQ など様々な精神神経症状を示す。これら臨床症状の重症度は、軽症から重症まで幅が広く、脳発生前のみならず、生後の白質成熟過程の障害による可能性も示唆されている。ASPM の生後の脳発達への関与を解析することは、小頭症の病態解明、治療法探索に必須と考えた。

(4) 成体海馬神経細胞新生低下と老化に伴う認知機能低下やうつ、アルツハイマー病などの精神神経疾患との関連が報告されており、神経細胞新生の改善による脳のアンチエイジング、精神神経症状緩和のターゲットとなりうる可能性が示唆されている。老化 *Aspm* KO マウスの海馬神経細胞新生の動態を解析することにより、海馬神経細胞新生における ASPM の機能解明と内在性神経幹細胞を利用した脳のアンチエイジング、脳機能改善へと展開しうる基礎研究となりうることを当該研究の着想に至った。

2. 研究の目的

ASPM 遺伝子は、脳形成期における脳のサイズの制御のみならず、脳成熟・老化において必須の機能を有しているとの仮説のもと、ASPM が、生後の皮質・白質形成や加齢に伴う海馬神経細胞新生に果たす役割を明らかにすることを実験の目的とした。

(1) *in vivo* MRI や組織学的手法を用い、神経突起の走行、突起形状、束形成に着目して、*Aspm* が生後の皮質、白質の成熟過程に果たす役割を解明する。

(2) *Aspm* 遺伝子の成体海馬神経細胞新生における機能を解明する。特に、加齢・老化という時間軸の中で、*Aspm* が、神経幹細胞から神経細胞へ分化する過程において、どのように関与しているのかを明らかにする。

(3) *Aspm* WT、*Aspm* KO マウスにおいて、高架式十字迷路、IntelliCage を用いて、学習機能、社会行動、不安行動を解析し、*Aspm* KO に伴う行動表現型を抽出し、(1)、(2)の解析で得られた形態表現型との対応を検証する。

3. 研究の方法

(1) *in vivo* MRI による脳の時空間的变化と組織学的検証

in vivo MRI と画像解析の手法を組み合わせ、*Aspm* KO マウスの生後の脳の発達を検索した。*Aspm* WT、*Aspm* KO マウス雌雄 4 群を用い、生後 3 週齢、10 週齢で *in vivo* MRI (T2 強調画像、拡散テンソル画像) を施行した。拡散テンソル画像から算出された FA 値 (fractional anisotropy: 異方性比率) の時空間的变化を解析した。さらに、生後 5 週齢、13 週齢で脳を摘出し、Bodian 染色、MBP (myelin basic protein: ミエリン塩基性タンパク) に対する免疫化学染色を行い、組織学的定量解析を行った。特に大脳皮質の層ごとに、垂直方向の突起断片長の総和に対する水平方向の突起断片長の総和の比 (horizontal ratio) を算出し、神経突起の走行性状に着目して解析した。

(2) 成体神経幹細胞活性における *Aspm* 機能解析

生後 10-20 週齢、40-50 週齢、70-80 週齢雌雄の *Aspm* WT、*Aspm* KO マウスを用い、海馬歯状回顆粒細胞下帯 (SGZ) 全領域における神経細胞新生の動態を解析した。細胞増殖の指標として BrdU ラベル、細胞種・細胞分化の指標として免疫染色 (Doublecortin: DCX, nestin) を用いた組織学的定量解析を行った。

(3) 行動表現型解析

生後 15 週齢、生後 50 週齢の *Aspm* KO、*Aspm* WT マウスにおいて、高架式十字迷路、IntelliCage を用いて、学習機能、社会行動、不安行動などを解析した。

4. 研究成果

(1) *In vivo* MRI 解析と組織学的解析

Aspm KO マウスは、生後 3 週齢、10 週齢において、WT マウスと比較して、平均 8.6%の脳サイズの減少と平均 136.4%の脳室拡大を認めた。拡散テンソル画像から算出された FA 値は、生後 3 週齢、10 週齢の *Aspm* KO マウスの皮質・白質で、WT マウスと比較して有意な低下を認めた (図 1)。生後 3 週から 10 週までの発達に伴う FA 値の変化は、WT マウスにおいて、皮質で減少し、白質で増加したが、*Aspm* KO において、その変化は顕著ではなかった (図 2)。また、Bodian 染色を用いた画像解析により、垂直方向の突起に対する水平方向の突起長の比 (horizontal ratio) を算出した。この比は、WT マウスの大脳皮質 IV, V, VI 層において、成熟とともに上昇し、生後 13 週齢において、有意に高値を示した。しかし、*Aspm* KO マウスでは、大脳皮質 6 層において、この比は減少していた (図 3)。さらに、生後 5 週齢において、白質における MBP の免疫染色性は、有意に減少していた。即ち、*in vivo* MRI と組織学的解析により、*Aspm* KO マウスの生後の脳成熟に伴う神経線維の構造的異常が明らかになった。

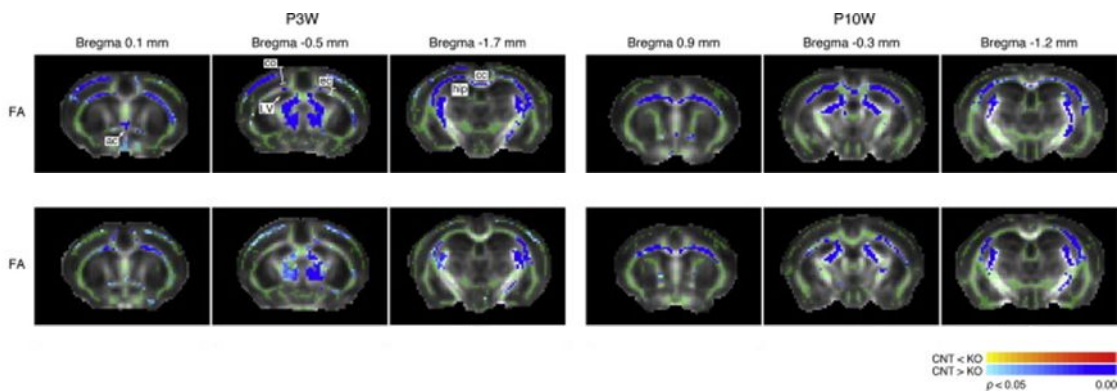


図 1 拡散テンソル画像による生後 3 週齢 (P3W)、10 週齢 (P10W) 雌雄マウスの FA (fractional anisotropy) 値 (上段が female 下段が male) *Aspm* KO マウスの皮質、白質 (脳梁や外包) で、FA 値は低下 (青色)

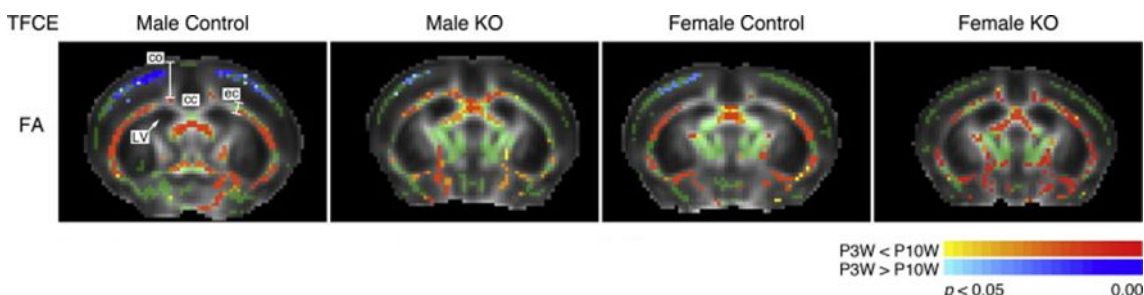


図 2. 拡散テンソル画像による生後 3 週齢と 10 週齢雌雄マウスの FA 値の変化 *Aspm* WT の FA 値は、皮質で減少し (青)、白質で増加したが (赤)、*Aspm* KO において、その変化は顕著ではない。

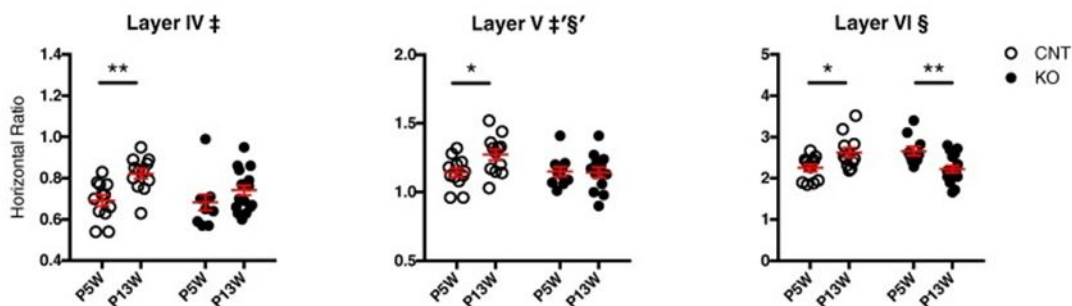


図 3 組織学的解析による大脳皮質における horizontal ratio の変化 垂直方向の突起断片長総和に対する水平方向の突起断片長総和の比 (horizontal ratio) は、*Aspm* WT マウスの大脳皮質 IV, V, VI 層において、成熟とともに上昇し、生後 13 週齢において、有意に高値を示した。しかし、*Aspm* KO マウスの大脳皮質 VI 層において、この比は減少した。CNT: control animal, KO: knockout animal. Bars represent mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

(2) 加齢に伴う成体海馬神経細胞新生の変化

Aspm KO マウス、*Aspm* WT マウスともに、海馬歯状回の BrdU 陽性新生細胞数および DCX 陽性の

幼弱神経細胞数は加齢とともに減少した。しかし、70-80 週齢の老化 *Aspm* KO マウス雄において、BrdU 陽性細胞数は、WT に比較し、有意に減少した (図 4)。また、40-50 週齢、70-80 週齢の *Aspm* KO マウスにおいて、DCX 陽性細胞数は、WT マウスに比較して有意に減少しており、老化 *Aspm* KO マウスの神経細胞新生は低下していると考えた。一方、Nestin 陽性の神経幹細胞数は、WT、KO 間で有意な変化は認めなかった。*Aspm* KO マウスにおいては、神経幹細胞から神経細胞への分化過程に異常があり、加齢とともにその異常がより顕在化することが示唆された。

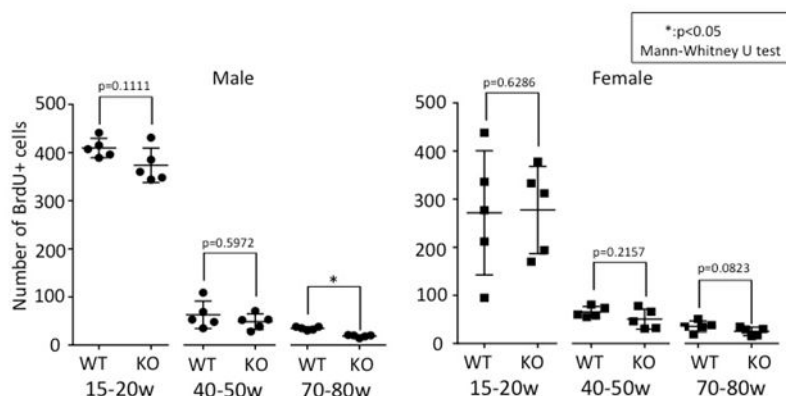


図 4 *Aspm* KO マウス海馬歯状回 BrdU 陽性細胞の変化

BrdU 陽性細胞は、*Aspm* WT、*Aspm* KO マウスともに加齢とともに減少したが、70-80 週齢の *Aspm* KO マウス雄では、*Aspm* WT に比較して、有意に減少した。

(3) 行動表現型解析

生後 15 週齢、生後 50 週齢 *Aspm* WT、*Aspm* KO マウスを用い、高架式十字迷路、IntelliCage を用いた行動解析を行った。高架式十字迷路テストでは、*Aspm* KO マウス雄において、不安様行動が増加する傾向があることが明らかになった。現在、IntelliCage による行動実験を行い、形態学的異常との関連を検索している。

<引用文献>

Ionizing radiation downregulates ASPM, a gene responsible for microcephaly in humans. A. Fujimori, T. Yaoi, H. Ogi, B Wang, K. Suetomi, E. Sekine, D. Yu, T. Kato, S. Takahashi, R. Okayasu, K. Itoh, S. Fushiki *Biochem Biophys Res Commun*, 369 (2008), pp.953-957

Disruption of *Aspm* causes microcephaly with abnormal neuronal differentiation. Fujimori A, Itoh K, Goto S, Hirakawa H, Wang B, Kokubo T, Kito S, Tsukamoto S, Fushiki S. *Brain Dev.* 2014 Sep;36(8):661-9. doi: 10.1016/j.braindev.2013.10.006. Epub 2013 Nov 9

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Ogi H, Nitta N, Tando S, Fujimori A, Aoki I, Fushiki S, Itoh K. Longitudinal Diffusion Tensor Imaging Revealed Nerve Fiber Alterations in *Aspm* Mutated Microcephaly Model Mice. *Neuroscience*, 査読有, 371, 2018, pp. 325-336. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.12.012. Epub 2017 Dec 16

〔学会発表〕(計 4 件)

Takahashi H, Fujimori A, Tando S, Mori M, Fushiki S, Itoh K. Hippocampal adult neurogenesis is perturbed in microcephaly model mice with aging. 19th International Congress of Neuropathology, September 23-27, 2018

Ogi H, Nitta N, Tando S, Fujimori A, Aoki I, Fushiki S, Itoh K. Longitudinal diffusion tensor imaging and neuropathology revealed nerve fiber alterations in hereditary microcephaly model mice. 19th International Congress of Neuropathology, September 23-27, 2018

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, 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 6/1-3

Ogi H, Nitta N, Shibata S, Tando S, Fujimori A, Aoki I, Fushiki S, Itoh K. Longitudinal diffusion tensor imaging revealed nerve fiber alterations in *Aspm* mutated microcephaly model mice. 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience. Development of circuits, functions, and disorders in the nervous system, May 22-25 2018

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊東 恭子

ローマ字氏名：Itoh Kyoko

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学(系)研究科(研究院)

職名：教授

研究者番号(8桁): 80243301

(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。