

30 脳神経系の形成機構とその異常による疾患病態の解明	河崎 洋志
-----------------------------	-------

**【目的】** 高等哺乳動物の大脳皮質には脳回（大脳皮質表面のシワ）が存在しており、脳回は大脳の高機能化の鍵となった重要な構造と考えられている。従って発生・発達期における脳回の形成メカニズムの解明は非常に重要な研究課題のひとつである。しかし、高等哺乳動物の分子生物学的解析技術が整備されていなかったことから脳回の解析は遅れていた。そこで我々は高等哺乳動物フェレット（*Mustela putorius furo*）に注目して、フェレットの脳神経系に使用可能な分子生物学的技術を独自に確立してきた。子宮内電気穿孔法を高等哺乳動物に応用することに初めて成功し、フェレット大脳皮質への遺伝子導入を可能とした。そこで我々は脳回形成における神経前駆細胞の役割を解析した結果は、外側放射状グリア（oRG）もしくは中間前駆細胞（IPC）が脳回形成に重要であることを実験的に証明した。本研究ではこの研究の流れを引き継ぎ、神経前駆細胞を制御する上流の分子機構、および神経前駆細胞の下流で脳回という形態形成に至る機構を解析した。

**【方法】** 子宮内電気穿孔法は以下の手順で行った。深麻酔をかけたのちに皮膚を切開した。子宮筋を經由して胎仔の側脳室へガラスキャピラリーでプラスミドを注入した。プラスミドには FastGreen を入れて色を付けておき、注入が確実に行われていることを確認した。その後、ECM830 を用いて 50~100V, 50 ms の電気パルス を 1 秒間隔で 5 回与えた。処置中は組織が乾かないように PBS を持続的に滴下した。皮膚を縫合し麻酔より回復させた。

また免疫組織染色法は以下の手順で行った。固定の後に 30% スクロース処理を行い OCT に包埋した。クリオスタットで 14~50 μm の切片を作成した。1 次抗体を滴下し 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄したのちに、蛍光標識した 2 次抗体で室温 2 時間反応させた。PBS で洗浄したのちにカバーガラスで封入した。

**【結果】** 1. 神経前駆細胞から脳回形成に至るメカニズム。我々は、脳回形成には大脳皮質の表層側と深層側の量比が重要であると仮説を立てた。この検証を行うために、まず我々は CRISPR/Cas9 と子宮内電気穿孔法を組み合わせ、マウスおよびフェレットの大脳皮質での遺伝子ノックアウト技術を確立した。フェレット大脳皮質で *Cdk5* をノックアウトしたところ脳回形成が阻害された。続いて、大脳皮質の表層側もしくは深層側のいずれか一方に優性不能型 *Cdk5* を発現させた結果、表層側に優性不能型 *Cdk5* を発現させた場合にのみ脳回形成が阻害された。この結果は、大脳皮質の深層側に対して相対的に表層側が増加することが脳回形成に重要であるとの仮説を支持している。

2. 神経前駆細胞の増殖を制御する上流分子機構。FGF8 をフェレット大脳皮質に発現させたところ脳回数の数が著しく増加することを見いだした。逆に、優性不能型 FGF 受容体をフェレット大脳皮質へ発現させたところ、脳回形成が抑制された。さらに FGF シグナルにより、oRG や IPC 神経前駆細胞の細胞分裂と細胞数が制御されていることも見いだした。従って、FGF シグナルが、oRG や IPC などの神経前駆細胞の数の制御や脳回形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

