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。

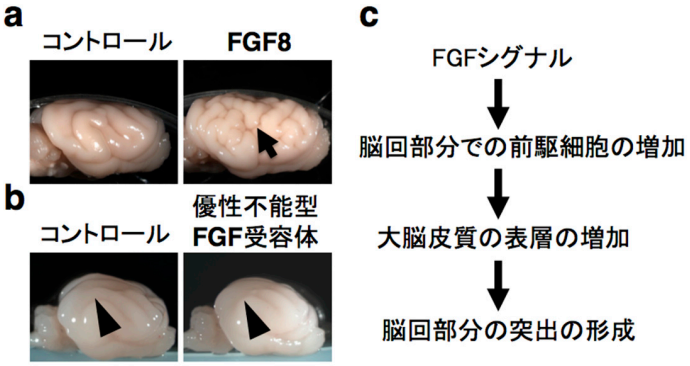
【方法】子宮内電気穿孔法は以下の手順で行った。深麻酔をかけたのちに皮膚を切開した。子宮筋を経由して胎仔の側脳室へガラスキャピラリーでプラスミドを注入した。プラスミドには FastGreen を入れて色を付けておき、注入が確実に行われていることを確認した。その後、ECM830 を用いて 50〜100V，50 ms の電気パルスを 1 秒間隔で 5 回与えた。処置中は組織が乾かないように PBS を持続的に滴下した。皮膚を縫合し麻酔より回復させた。

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℃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グラスで封入した。

【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。

脳回形成に関わる分子メカニズム



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

金沢大学 医薬保健研究域 医学系 脳神経医学研究分野

Key words：大脳皮質，脳回，高等哺乳動物，形成メカニズム，フェレット

緒　言

高等哺乳動物の大脳皮質には脳回（大脳皮質表面のシワ）が多く存在している。進化の過程で脳回を獲得したことにより、一定容積の頭蓋内で大脳皮質の表面積を増やすことができ、多くの神経細胞を持つことが可能になったと考えられている。従って、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。また脳回の形成異常である多小脳回症（polymicrogyria）や滑脳症（lissencephaly）などでは重篤な脳機能障害が見られることから、発生・発達期における脳回の形成メカニズムおよびその形成異常による疾患の病態解明は非常に重要な研究課題のひとつである。しかし、高等哺乳動物に用いることができる分子生物学的解析技術があまり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。そこで我々はこれまでに高等哺乳動物フェレット（*Mustela putorius furo*）に注目して研究を進めてきた[1]。フェレットは平均体長約 50 cm で体重は 1～2 kg、平均寿命は 6～8 年であり、ヨーロッパケナガイタチが家畜化したものだと言われている。

我々は脳回研究の突破口とするために、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［2, 3]。マウスで多く使われてい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［2, 3]。その結果、神経前駆細胞や大脳皮質のほぼ全ての層の神経細胞へ効率よく遺伝子導入が可能となった。この特徴として、短時間で遺伝子を発現させることができ、また様々な実験条件を容易に組み合わせることができる。このような技術整備の結果、フェレットでの脳回形成機構の解析が可能となった。

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。発生過程の大脳皮質に存在する神経前駆細胞には脳室帯 (VZ) に存在する放射状グリア (RG)、脳室下帯 (SVZ) に存在する outer RG (oRG) および中間前駆細胞 (IPC) の３種類が存在する。我々はこれらの神経前駆細胞の発生期フェレット大脳皮質における分布を解析した。その結果、oRG および IPC は将来、脳回になる部分に多く集積していることが分かった［4]。続いて、oRG や IPC の脳回形成における重要性を検討するため、子宮内電気穿孔法を用いてフェレット大脳皮質へ、IPC に選択的に発現する転写因子 Tbr2 の優性不能型を導入した。その結果、優性不能型 Tbr2 により oRG と IPC が減少し、さらに脳回形成が阻害されることを見いだした。この結果は oRG もしくは IPC が脳回形成に重要であることを初めて実験的に証明したものである［4]。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［5]。

方　法

1. 子宮内電気穿孔法

深麻酔をかけたのちに皮膚を切開した。子宮筋を経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 50～100 V，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。

2. 免疫組織染色法

固定したのちに 30%スクロース処理を行い、OCT に包埋した。クリオスタットを用いて 14〜50 μm の切片を作成した。2% skimmilk でブロッキングしたのちに 1 次抗体を滴下し 4℃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グラスで封入した。

結果および考察

1. 神経前駆細胞から脳回形成に至るメカニズム

優性不能型 Tbr2 の導入により脳回の形成が阻害された大脳皮質の切片を作成し詳細に検討すると、表層側の 2/3 層の厚さが選択的に減少していた［4］。この結果から、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。この仮説を検証するため、リン酸化酵素 Cdk5 を用いた実験を行うこととした。Cdk5 はヒト滑脳症の原因遺伝子であり、脳回形成に重要な遺伝子である。その実験を行うために、まず我々はゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 と子宮内電気穿孔法を組み合わせてみたところ、マウスおよびフェレットの大脳皮質で遺伝子ノックアウトができることを見いだした［6, 7］。そこで実際にフェレット大脳皮質で Cdk5 をノックアウトしたところ、予想通り脳回形成が阻害された［7］。続いて、大脳皮質のどの層の Cdk5 が脳回形成に重要か検討するために、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。その結果、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［7］。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

次の重要な点は、神経前駆細胞を制御する上流の分子機構である。この制御機構の解明の契機はヒトの脳回形成異常疾患の情報から得られた。タナトフォリック骨異形成症は骨形成異常と多小脳回症などの脳形成異常が見られる先天性疾患である。その原因は FGF 受容体 3（FGFR3）の活性化型変異であることが報告されていた。そこで FGFR3 のリガンドである FGF8 をフェレット大脳皮質に発現させたところ脳回の数が著しく増加することを見いだした（図 1a）［8］。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（図 1b）［9］。さらに FGF シグナルにより、oRG や IPC 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［8, 9］。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。

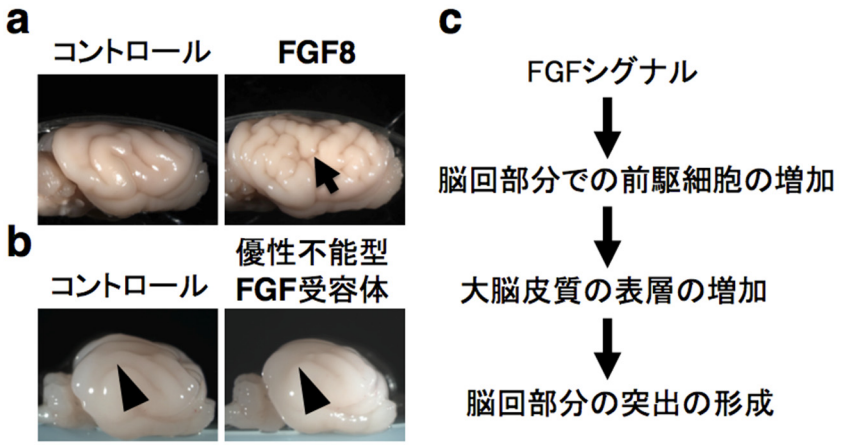


図 1. 脳回形成に関わる分子メカニズム

a）FGF シグナル活性化により脳回が増加する。FGF8 を発現させると脳回が増加した（矢印）。b）FGF シグナル活性は脳回形成に必須である。優性不能型 FGF 受容体を発現させると脳回形成が阻害された（矢印）。c）脳回形成の分子機構の仮説。

3. 今後の展望

大脳皮質の脳回は以前より多くの研究者の関心を引き続けてきたが、その形成機構は長い間の謎であった。フェレットを用いた我々の研究により、脳回形成の分子メカニズムの一端が明らかになってきた（図 1c）。今後はフェレットを使用することで、ヒトの脳で見られる様々な脳構築の形成機構、機能やその異常による疾患病態の理解が進むことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学医学系革新ゲノム情報学研究分野の田嶋敦教授、細道一善准教授である。また本研究に多大な貢献をした金沢大学医学系脳神経医学研究分野のメンバーに感謝したい。

文　献

1) Kawasaki H, Crowley JC, Livesey FJ, Katz LC. Molecular organization of the ferret visual thalamus. J Neurosci. 2004;24(44):9962-9970. PubMed PMID: 15525781.
2) Kawasaki H, Iwai L, Tanno K. Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation. Mol Brain. 2012;5:24. PubMed PMID: 22716093.
3) Kawasaki H, Toda T, Tanno K. In vivo genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using in utero electroporation. Biol Open. 2013;2(1):95-100. PubMed PMID: 23336081.
4) Toda T, Shinmyo Y, Dinh Duong TA, Masuda K, Kawasaki H. An essential role of SVZ progenitors in cortical f olding in gyrencephalic mammals. Sci Rep. 2016;6:29578. doi: 10.1038/srep29578. PubMed PMID: 27403992.
5) Kawasaki H. Molecular investigations of development and diseases of the brain of higher mammals using the ferret. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2017;93(5):259-269. doi: 10.2183/pjab.93.017. PubMed PMID: 28496051; PubMed Central PMCID: PMCPMC5489433.
6) Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S, Hosomichi K, Tajima A, Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. Sci Rep. 2016;6:20611. doi: 10.1038/srep20611. PubMed PMID: 26857612; PubMed Central PMCID: PMCPMC4746659.
7) Shinmyo Y, Terashita Y, Dinh Duong TA, Horiike T, Kawasumi M, Hosomichi K, et al. Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. Cell Rep. 2017;20(9):2131-2143. doi: 10.1016/j.celrep.2017.08.024. PubMed PMID: 28854363.
8) Masuda K, Toda T, Shinmyo Y, Ebisu H, Hoshiba Y, Wakimoto M, et al. Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. Sci Rep. 2015;5:15370. doi: 10.1038/srep15370. PubMed PMID: 26482531.
9) Matsumoto N, Shinmyo Y, Ichikawa Y, Kawasaki H. Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. eLife. 2017;6:e29285. doi: 10.7554/eLife.29285. PubMed PMID: 29132503; PubMed Central PMCID: PMCPMC5685484.