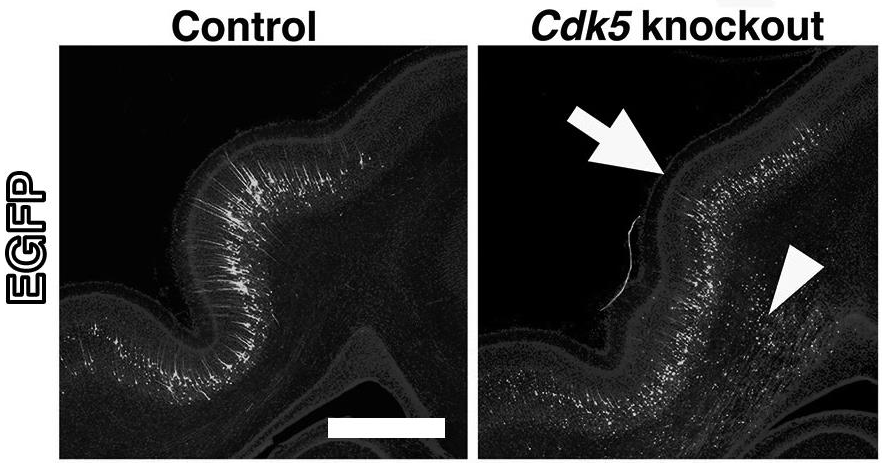
39　脳神経系の形成機構の解明	新明　洋平

【目的】ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ（脳回）を形成する。進化における脳回の獲得は高次脳機能の発達の基盤であり、脳回異常疾患では著しい脳機能障害を呈することから、脳回の形成メカニズムおよび疾患病態の解明は神経科学の重要研究課題である。実際、脳回形成が障害され平滑な脳表面を示す疾患であるヒト滑脳症では、乳児期早期より難治性てんかんと重度の精神発達遅滞を伴う。このように、脳回形成とその異常により生じる脳機能障害に関する研究は、基礎神経科学のみならず臨床脳医学へも波及効果が大きい研究課題である。しかし分子遺伝学的研究に用いられるマウスの脳には脳回は存在せずに、マウスを用いた解析が困難であるために脳回形成に関する研究は遅れている。イタチ科に属するフェレットは、脳回や眼優位性カラムなど高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学的および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究は解析手法が確立されておらず遅れていた。我々は、フェレットでの分子遺伝学的解析を可能とするために、子宮内電気穿孔法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入法を確立している。次の大きな課題は、loss-of-function 実験を行うための遺伝子ノックアウト技術の開発である。ZFN や TALEN に続く第三世代のゲノム編集ツールとして、近年、CRISPR/Cas9 システムが大きな注目を集めている。

【方法】本研究では、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られている *Cdk5* 遺伝子のノックアウトを行った。

【結果】*Cdk5* に対する CRISPR/Cas9 プラスミド（pX330-Cdk5）を導入した結果、EGFP 陽性細胞の約半数で、Cdk5 の機能が喪失し放射状移動が障害されていた。次に、フェレット脳回形成において Cdk5 が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。その結果、pX330-Cdk5 を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、Cdk5 が脳回形成に必須であることが明らかとなった。

Cdk5 ノックアウトによる脳回形成異常



39. 脳神経系の形成機構の解明

新明　洋平

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：フェレット，大脳皮質，脳回，CRISPR/Cas9

緒　言

ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ（脳回）を形成する。進化における脳回の獲得は高次脳機能の発達の基盤であり、脳回異常疾患では著しい脳機能障害を呈することから、脳回の形成メカニズムおよび疾患病態の解明は神経科学の重要研究課題である。実際、脳回形成が障害され平滑な脳表面を示す疾患であるヒト滑脳症では、乳児期早期より難治性てんかんと重度の精神発達遅滞を伴う。このように、脳回形成とその異常により生じる脳機能障害に関する研究は、基礎神経科学のみならず臨床脳医学へも波及効果が大きい研究課題である。しかし分子遺伝学的研究に用いられるマウスの脳には脳回は存在せずに、マウスを用いた解析が困難であるために脳回形成に関する研究は遅れている。

イタチ科に属するフェレットは、脳回や眼優位性カラムなど高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学的および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究は解析手法が確立されておらず遅れていた。我々は、フェレットでの分子遺伝学的解析を可能とするために、子宮内電気穿孔法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入法を確立している［1］。さらに我々はこの技術を用いて大脳皮質にFGF8を導入することにより、多小脳回症をもつ疾患モデル動物の作製に成功している［2］。さらに、脳回形成にFGFシグナルや転写因子であるTbr2が重要な役割を果たすことを明らかにしている［3，4］。次の大きな課題は、loss-of-function実験を行うための遺伝子ノックアウト技術の開発である。ZFNやTALENに続く第三世代のゲノム編集ツールとして、近年、CRISPR/Cas9システムが大きな注目を集めている。我々は最近、子宮内電気穿孔法とCRISPR/Cas9システムとを組み合わせることにより、マウス大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法を確立した［5，6］。そこで本研究では、この方法をフェレットへ応用することにより、フェレット大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。そして、ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られている *Cdk5* 遺伝子のノックアウトを行った。*Cdk5* に対するCRISPR/Cas9プラスミド（pX330-Cdk5）を導入した結果、EGFP陽性細胞の約半数で、Cdk5の機能が喪失し放射状移動が障害されていた。次に、フェレット脳回形成においてCdk5が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5を導入した個体の組織学的解析を行った。その結果、pX330-Cdk5を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、Cdk5が脳回形成に必須であることが明らかとなった。

方法および結果

1.　フェレットにおける大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立

マウス大脳皮質の発生期に、Cdk5は分裂後の神経細胞に強く発現し、その放射状移動に必須であることが知られている。実際、*Cdk5* ノックアウトマウスの大脳皮質では、神経細胞の移動障害により正常な層構築が形成されない。フェレット大脳皮質におけるCdk5の機能阻害においても神経細胞の移動障害が起こると予想された。マウス大脳皮質におけるノックアウトでは、hCas9（human codon optimized Cas9）とガイドRNAを同時に発現できるプラスミド（pX330）が有用であったので、フェレットにおいてもこのプラスミドを使用した。標的配列が異なる5種類のpX330-Cdk5を作製し、それぞれのコンストラクトをpCAG-EGFPと混合し、妊娠31日目のフェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法を用いて導入した。8日後の妊娠39日目に胎仔を固定し、EGFP陽性細胞の分布を調べた。

Cdk5 に対する標的配列を持たない pX330 を導入したコントロールでは、EGFP 陽性細胞は皮質板に移動していた。一方、pX330-Cdk5 を導入した個体では 5 種類すべてにおいて、EGFP 陽性細胞の約半数が移動障害を示した（図 1）。次に、移動障害を示した神経細胞において Cdk5 の発現が消失しているかを Cdk5 に対する抗体を用いた免疫染色により調べた。その結果、正常に移動した GFP 陽性細胞では Cdk5 の発現が観察されたが、移動障害を示した GFP 陽性細胞では Cdk5 の発現が完全に消失していた。これらの結果から、pX330-Cdk5 の導入された EGFP 陽性細胞の約半数で、Cdk5 の機能が喪失し放射状移動が障害されたと考えられた。このように、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、フェレット大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法の確立に成功した。

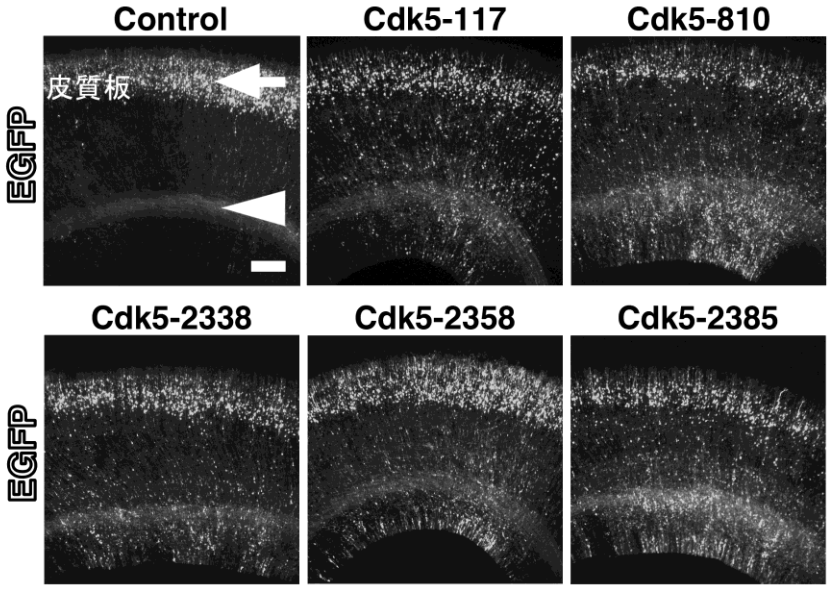


図 1. 大脳皮質における *Cdk5* のノックアウト

標的配列が異なる 5 種類の pX330-Cdk5 を子宮内電気穿孔法により大脳皮質に導入にした。コントロールサンプルにおいて EGFP 陽性細胞は皮質板に移動していたが（矢印）、pX330-Cdk5 を導入した個体の場合 5 種類すべてにおいて、EGFP 陽性細胞の約半数が移動障害を示した。pX330-Cdk5-2385 が他のコンストラクトと比べてノックアウトの効率が良いと思われたので、これ以降の実験では pX330-Cdk5-2385 を使用した。矢尻は、GFP 陽性の神経軸索を示す。スケールバー : 0.2 mm。

2. *Cdk5* ノックアウトフェレットにおける脳回形成異常

フェレット脳回形成において Cdk5 が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。フェレット脳の発生において、出生約一週間後に大脳表面に凹凸構造が観察され始め、出生 16 日後にはっきりとした脳回が観察される。そこで、妊娠 31 日目のフェレット大脳皮質に pX330-Cdk5 を子宮内電気穿孔法により導入した。生後 16 日目で脳を固定し、形態学的に脳回に異常があるかどうかを調べた（図 2）。その結果、コントロール個体では、脳回形成には異常が見られなかった。一方、pX330-Cdk5 を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、Cdk5 が脳回形成に必須であることが明らかとなった。pX330-Cdk5 を導入した個体では、Cdk5 の機能不全により正常に灰白質に移動できなかった神経細胞が白質に集積していた。一方、グリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトの分布には異常が見られなかった。以上の結果から、神経細胞の正常な移動が脳回形成に必須であると考えられた。

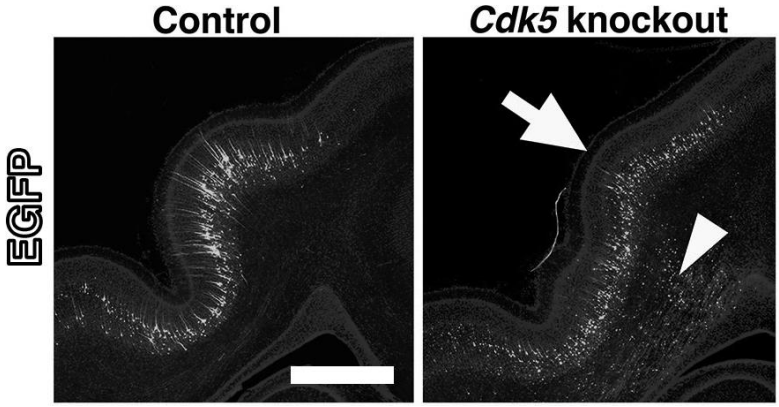


図 2. *Cdk5* ノックアウトによる脳回形成異常

pX330-Cdk5-2385 を子宮内電気穿孔法により大脳皮質に導入にした。コントロールサンプルにおいて EGFP 陽性細胞は正常に皮質板に移動し、脳回形成に異常は見られなかった。一方、pX330-Cdk5-2385 を導入した個体では、神経細胞の移動障害（矢尻）に加えて脳回の低形成が観察された（矢印）。スケールバー：1 mm。

3. 上層神経細胞の移動が脳回形成に重要である

脳回を持たない齧歯類の大脳皮質に比べて脳回を持つ霊長類の大脳皮質では、下層の神経細胞数に対する上層の神経細胞数が大きく増大したことが知られている。そのため、この上層神経細胞数の増大による脳表面の拡大が脳回の出現に重要であったとする可能性が提唱されている。つまり、上層神経細胞の脳表への移動が脳回形成に重要であると考えられる。そこで、大脳皮質の層特異的に Cdk5 の機能を阻害し、どの層の神経細胞の移動が脳回形成に重要であるかを調べた。層特異的に Cdk5 を機能阻害するために、優性不能型 Cdk5 (Dn-Cdk5)を発現するプラスミドを用いた。重要なことに、異なる時期に Dn-Cdk5 を子宮内電気穿孔法により導入すれば、大脳皮質層特異的に Cdk5 の機能を阻害できる。実際、妊娠 31 日目では 5／6 層、34 日目では 4 層、37 日目では 2／3 層の神経細胞に Dn-Cdk5 を導入できる。それぞれの時期に Dn-Cdk5 を導入し生後 16 日目で脳を固定し、組織学的解析を行った。その結果、全てのサンプルにおいて神経細胞の移動障害が観察された。つまり、Cdk5 は 2〜6 層の神経細胞の移動に必要不可欠であることが分かった。次に、これらのサンプルについて脳回形成に異常があるかを調べた結果、2／3 層の神経細胞に Dn-Cdk5 を導入した個体において脳回の低形成が見られた。一方、Dn-Cdk5 を 5／6 層もしくは 4 層に導入した個体では脳回形成に顕著な異常は見られなかった。これらの結果から、2／3 層の神経細胞の移動が脳回形成により重要であることが示唆された。

考　察

本研究において、我々はフェレット大脳皮質において遺伝子ノックアウト法を確立した。今後、本手法を用いて様々な遺伝子の機能解析が可能となるため、フェレットを用いた脳回形成研究が飛躍的に進むと考えられる。さらに我々は、この独自手法を用いて神経細胞に発現する Cdk5 が脳回形成に必須であることを示した。*Cdk5* ノックアウトフェレットにおいて観察される脳回の低形成は、ヒト滑脳症に見られる脳回異常に類似することから、フェレットとヒトの脳回形成機構に共通の分子メカニズムが存在すると考えられる。我々の実験結果から、大脳皮質下層の神経細胞よりも上層の神経細胞の移動が脳回形成により重要であることが明らかとなった。上層の神経細胞の移動による脳表面の拡張が脳回形成に重要なプロセスであると考えられる。今後は、脳回形成機構において最も重要な点である脳表面の凹凸の場所を規定するメカニズムの解明を目指したい。本研究の成果は、脳回形成機構の解明のみならず、臨床脳医学にも大きく貢献できる。ヒト脳回形成異常に見られるてんかんや発達遅滞の発症メカニズムには不明な点が多く、根本的な治療法は確立されていないのが現状である。本研究成果は、脳回異常による脳機能障害の発症メカニズムの解明に繋がる有益な知見である。さらに、本研究で作製した脳回形成異常フェレットが、今後の治療法開発において有用なモデル動物になることも期待できる。

共同研究者・謝辞

上原記念生命科学財団からの本研究に対するご支援に深謝申し上げます。また、本研究の共同研究者である金沢大学の河崎洋志教授をはじめとする脳神経医学研究分野の方々に感謝致します。

文　献

1) H. Kawasaki, L. Iwai, K. Tanno, Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation. Mol. Brain 5, 24 (2012). PMID: 22716093.

2) K. Masuda et al., Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. Sci. Rep. 5, 15370 (2015). PMID: 26482531. DOI: 10.1038/srep15370.

3) N. Matsumoto, Y. Shinmyo, Y. Ichikawa, H. Kawasaki, Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. Elife 6, e29285 (2017). DOI: 10.7554/eLife.29285.

4) T. Toda, Y. Shinmyo, T. A. Dinh Duong, K. Masuda, H. Kawasaki, An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals. Sci. Rep. 6, 29578 (2016). DOI: 10.1038/srep29578.

5) Y. Shinmyo et al., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation. Sci. Rep. 6, 20611 (2016). DOI: 10.1038/srep20611.

6) Y. Shinmyo et al., Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. Cell Rep. 20, 2131-2143 (2017). DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.024.