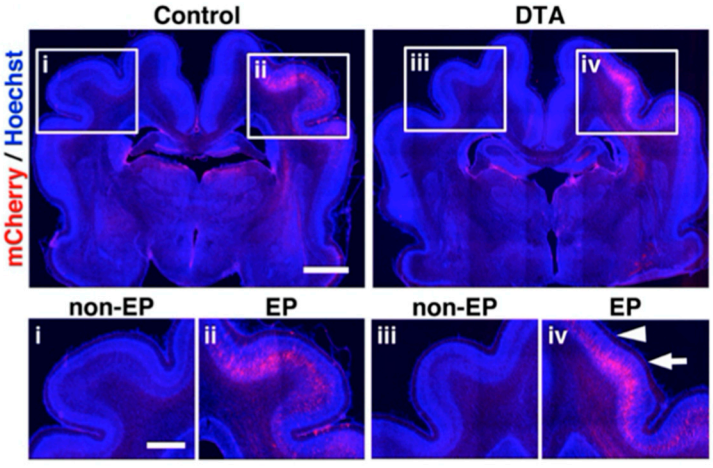
32　フェレットを用いた大脳の形成と進化の分子機構の解明	河﨑　洋志

【目的】ヒトに至る哺乳類の進化の歴史のなかで大脳は著しく発達してきた。大脳は巨大化し、表面には多くの脳回（表面の皺）が形成された。神経細胞が増加したのみならず、アストロサイトなどのグリア細胞も増加してきた。このような発達した大脳の形成機構や大脳の進化の分子機構の解明は重要な研究課題のひとつであるが、マウスよりも大脳が発達した哺乳動物を用いた分子生物学的研究技術があまり整備されていなかったことから、これらの研究は遅れていた。そこで我々は、サイズが大きく脳回を持つなど大脳が発達した食肉類哺乳動物フェレット（*Mustela putorius furo*）に着目して研究を進めてきた。我々はフェレットを用いた研究を推進するために、フェレットに使用可能な分子生物学的研究技術を独自に確立してきた。これらの技術を用いて我々は、大脳皮質神経細胞の増加と脳回形成に線維芽細胞増殖因子（FGF）シグナルとソニックヘッジホッグ（Shh）シグナルが重要であることを報告してきた。本研究ではグリア細胞であるアストロサイトに焦点を絞り、進化の過程でアストロサイトを著しく増加させてきた分子機構を解析した。
【方法】子宮内電気穿孔法は以下の手順で行った。深麻酔したのちに胎仔の側脳室へプラスミド溶液を注入した。エレクトロポレーターECM830 を用いて 50～100 V、50 ms の電気パルスを 1 秒間隔で 5 回、胎仔に処置した。電気穿孔が終了した後に、胎仔を腹腔内に戻した。免疫組織染色法は以下の手順で行った。組織を固定し 30%スクロースで処理し、OCT compound に包埋した。クリオスタットを用いて切片を作製した。ブロッキングののちに 1 次抗体を 4℃で一晩反応させた。洗浄したのちに、蛍光物質で標識した 2 次抗体で室温 2 時間反応させた。洗浄したのちにカバーグラスで封入した。
【結果】1. フェレットとマウスの大脳皮質アストロサイトにおける遺伝子発現の比較解析：公開データベースで解析した結果、FGF1 がマウスのアストロサイトで多く発現していることがわかった。マウスと同様にフェレットのアストロサイトでも FGF1 が高発現していた。さらにフェレットのアストロサイトに FGF 受容体 FGFR2 と FGFR3 が発現していた。おもしろいことに、マウスに比べて、フェレットのアストロサイトで FGF1 の発現量が著しく多いことがわかった。2. アストロサイトの増殖における FGF の重要性：これらの結果から我々は、アストロサイトから分泌される FGF1 がアストロサイトの分裂を促進するという autocrine 的なメカニズムがあると仮説を立てた。この仮説に一致して、フェレット大脳皮質アストロサイトを FGF1 で処理したところ、Ki-67 陽性率が増加した。逆に FGFR 阻害剤である BGJ398 で処理したところ、Ki-67 陽性率が減少した。3. 脳回形成におけるアストロサイトの重要性：脳回を持つ動物ではアストロサイトが多い傾向にあることから、アストロサイトの増加が脳回形成に重要であると仮説を立てた。子宮内電気穿孔法を用いて、フェレット大脳皮質で選択的にアストロサイトを減少させたところ、脳回形成が阻害された（下図）。本研究よりアストロサイトの数の制御機構と、脳回形成におけるアストロサイトの重要性が明らかとなった。

フェレットを用いた脳回形成におけるアストロサイトの重要性の解析



32. フェレットを用いた大脳の形成と進化の分子機構の解明

河﨑　洋志

金沢大学 医薬保健研究域 医学系 脳神経医学分野

Key words：大脳皮質，脳回，高等哺乳動物，フェレット，アストロサイト

緒　言

ヒトに至る哺乳類の進化の歴史のなかで、脳神経系は著しく発達してきた。大脳は巨大化し、表面には多くの脳回（大脳表面の皺）が形成された。大脳の巨大化および脳回の獲得により、一定容積に頭蓋内で大脳皮質の表面積を増やすことができ、大脳皮質の神経細胞を多く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。さらに神経細胞が増加したのみならず、アストロサイトなどのグリア細胞も増加してきた。このような神経細胞やグリア細胞の増加を制御する分子機構、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重要な研究課題のひとつである。しかし、マウスよりも大脳が発達した哺乳動物を用いた分子生物学的研究技術があまり整備されていなかったことから、これらの研究は遅れていた。そこで我々は、サイズが大きく脳回を持つなど大脳が発達した食肉類哺乳動物フェレット（*Mustela putorius furo*）に着目して研究を進めてきた［1］。成体のフェレットは体長が約 50 cm、体重は約 1～2 kg、平均寿命は 6～8 年くらいで、ヨーロッパケナガイタチが由来だと考えられている。

我々はフェレットを用いた研究を推進するために、フェレットに使用可能な分子生物学的研究技術を独自に確立してきた［2～4］。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［3］。この技術を用いることにより、フェレット大脳皮質の神経前駆細胞やほぼ全ての層の興奮性神経細胞へ迅速かつ簡便に遺伝子を導入することが可能となった。さらに CRISPR/Cas9 と組み合わせることにより、フェレット大脳皮質神経細胞での遺伝子ノックアウトも可能とした［4］。このような技術開発の結果、フェレットを用いた大脳皮質の形成過程の分子メカニズムの解析が可能となってきた。

これらの技術を用いてこれまでに我々は、大脳皮質神経細胞の増加と脳回形成を司る分子メカニズムを明らかにしてきた。線維芽細胞増殖因子（FGF）シグナルが oRG 神経前駆細胞の増殖を促すこと、ソニックヘッジホッグ（Shh）シグナルが oRG 神経前駆細胞の未分化性を維持することを見いだした［5～7］。またその結果として大脳皮質表層の神経細胞が増え、脳回が形成されてくることを見いだした［4］。さらに脳回形成に関わる oRG 神経前駆細胞の新たなサブタイプを見いだすなど［7］、高等哺乳動物の大脳の発生と進化のメカニズムについて、世界に先駆けて研究を推進してきた。このようにこれまでは神経細胞を中心に研究を進めてきたが、本研究ではグリア細胞であるアストロサイトに焦点を絞り、進化の過程でアストロサイトを著しく増加させてきた分子機構を解析し、FGF シグナルが重要であることを見いだした［8］。

方　法

1. 子宮内電気穿孔法

深麻酔で処置したのちに皮膚と腹筋を切開した。ガラスキャピラリーで子宮壁ごしに胎仔の側脳室へプラスミド溶液を注入した。プラスミド溶液には FastGreen を添加して色を付け、注入が問題なく行われていることを確認した。その後、エレクトロポレーターECM830 を用いて 50～100 V、50 ms の電気パルスを 1 秒間隔で 5 回、胎仔に処置した。電気穿孔が終了した後に、胎仔を腹腔内に戻し皮膚と腹筋を縫合した。

2. 免疫組織染色法

組織を固定したのちに 30%スクロースで 2〜3 日処理し、OCT compound に包埋した。クリオスタットを用いて 14〜50 μm の切片を作製した。ブロッキングののちに 1 次抗体を 4℃で一晩反応させた。洗浄したのちに、蛍光物質で標識した 2 次抗体で室温 2 時間反応させた。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. フェレットとマウスの大脳皮質アストロサイトにおける遺伝子発現の比較解析

公開されているデータベースで、マウスの大脳皮質の神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなどの遺伝子発現を比較検討した結果、FGF ファミリーのなかで特に FGF1 がアストロサイトで多く発現していることがわかった。そこで、フェレットのアストロサイトの初代培養を作製し RNA-seq で遺伝子発現を解析した結果、マウスと同様にフェレットのアストロサイトでも FGF1 が選択的に高発現していることを見いだした（図 1a）。*in situ* hybridization を行った結果、やはり FGF1 がアストロサイトで高発現していた。さらに FGF 受容体（FGFR）の発現を *in situ* hybridization で解析した結果、フェレットのアストロサイトに FGFR2 と FGFR3 が発現していた。おもしろいことに、FGF1 の発現量をマウスとフェレットのアストロサイトで比較したところ、フェレットのアストロサイトで FGF1 の発現量が著しく多いことがわかった（図 1b）。この FGF1 の発現量の増加が、進化におけるアストロサイトの増加に繋がっている可能性が示唆された。

a)

Gene	Expression (FPKM)
FGF1	268.3
FGF2	17.9
FGF4	0.0
FGF5	0.5
FGF6	0.0
FGF7	0.2
FGF8	0.0
FGF9	0.4
FGF10	0.1
FGF16	0.0
FGF17	0.2
FGF18	0.2
FGF19	0.0
FGF20	0.0
FGF21	0.0
FGF22	0.3
FGF23	0.0

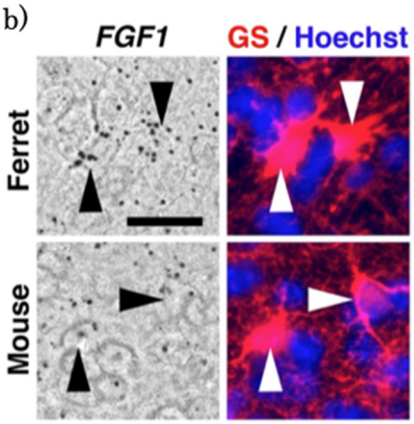


図 1. アストロサイトにおける FGF の発現

a) フェレットのアストロサイトにおける FGF の発現量を RNA-seq で解析した結果、FGF1 が多く発現していることがわかった。

b) フェレットとマウスのアストロサイトにおける FGF1 の RNAscope *in situ* hybridization。マウスに比べてフェレットで FGF1 の発現量が多いことがわかった（スケールバー：20 μm）。

2. アストロサイトの増殖における FGF の重要性

これらの結果から我々は、アストロサイトから分泌される FGF1 がアストロサイトの増殖を促進するという autocrine 的なメカニズムがあると仮説を立てた。この仮説に一致して、フェレット大脳皮質由来の培養アストロサイトに FGF1 を添加したところ、Ki-67 陽性率が増加した（図 2a）。逆に FGFR 阻害剤である BGJ398 で処理したところ、Ki-67 陽性率が減少した（図 2b）。さらに子宮内電気穿孔法で大脳皮質に FGF を発現させたところアストロサイトは増加し、優性不能型 FGFR で FGF シグナルを阻害したところアストロサイトは減少したことから、FGF シグナルはアストロサイトの増加に重要であることが明らかとなった。

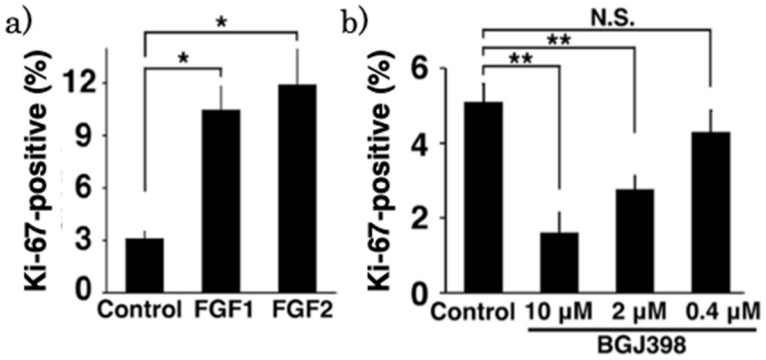


図 2. アストロサイトの増殖に対する FGF と FGF 受容体阻害剤の効果

a) 培養フェレットアストロサイトに対する FGF の効果。FGF1、FGF2 いずれもアストロサイトの増殖を促進した。

b) 培養フェレットアストロサイトに対する FGF 受容体阻害剤 BGJ398 の効果。BGJ398 はアストロサイトの増殖を抑制した。

Welch's t-test、*p＜0.05、**p＜0.01。

3. アストロサイトの増加が脳回形成に寄与している

脳回を持つ動物ではアストロサイトが多い傾向にあることから、アストロサイトの増加が脳回形成に重要であると仮説を立てた。子宮内電気穿孔法を用いて、フェレット大脳皮質で選択的にアストロサイトを減少させたところ、脳回形成が阻害された（図 3）。これらの結果はアストロサイトの増加が脳回形成に重要であることを示唆している。

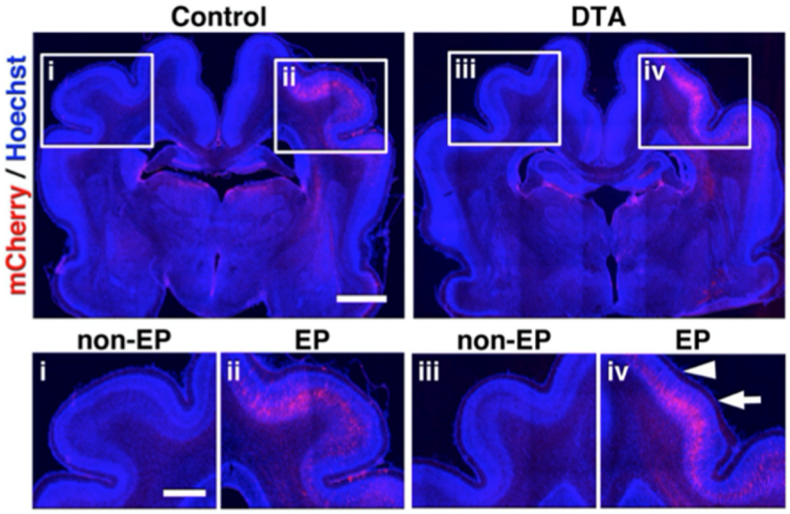


図 3. アストロサイトは脳回形成に必須である

アストロサイト特異的プロモータ制御下にジフテリア毒素（DTA）を発現するプラスミドと CAG-mCherry プラスミドを、子宮内電気穿孔法で胎生 31 日齢のフェレット大脳へ導入した。生後 16 日齢で冠状断切片を作製し、Hoechst33342 で染色した。コントロールでは左右対称に脳回が存在するが（i と ii）、DTA でアストロサイトを減少させると（iv）、反対側（iii）に比べて脳回（矢印）が小さくなり、脳溝（矢頭）が浅くなった（スケールバー：上段 2 mm、下段 1 mm）。

4. 今後の展望

我々はこれまでに主に神経細胞に注目して、その増加の分子機構や脳回形成における重要性を報告してきた。今回は本研究を通じて、これまで不明であった進化におけるアストロサイトの増加の分子機構が明らかとなった。さらに脳回形成におけるアストロサイトの重要性も明らかにすることができた。今後はさらにフェレットを用いて、発達した大脳の形成機構や進化の分子機構が解明されていくことが期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、金沢大学医学系神経解剖学分野の堀修教授、服部剛志准教授、Roboon 博士、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、觀音隆幸特任助教、ベルギーVIB センターの Holt 博士と Slezak 博士であり感謝したい。また本研究に多くの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も感謝したい。最後に本研究をご支援下さいました上原記念生命科学財団に深謝申し上げます。

文　献

1) Kawasaki H. Molecular investigations of development and diseases of the brain of higher mammals using the ferret. Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences. 2017;93(5):259-69. PMID: 28496051. DOI: 10.2183/pjab.93.017.

2) Kawasaki H, Crowley JC, Livesey FJ, Katz LC. Molecular organization of the ferret visual thalamus. Journal of Neuroscience. 2004;24(44):9962-70. PMID: 15525781. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2165-04.2004.

3) Kawasaki H, Iwai L, Tanno K. Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. Molecular Brain. 2012;5:24. PMID: 22716093. DOI: 10.1186/1756-6606-5-24.

4) 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 Reports. 2017;20(9):2131-43. PMID: 28854363. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.024.

5) Masuda K, Toda T, Shinmyo Y, Ebisu H, Hoshiba Y, Wakimoto M, et al. Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. Scientific Reports. 2015;5:15370. PMID: 26482531. DOI: 10.1038/srep15370.

6) Matsumoto N, Shinmyo Y, Ichikawa Y, Kawasaki H. Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. eLife. 2017;6:e29285. PMID: 29132503. DOI: 10.7554/eLife.29285.

7) Matsumoto N, Tanaka S, Horiike T, Shinmyo Y, Kawasaki H. A discrete subtype of neural progenitor crucial for cortical folding in the gyrencephalic mammalian brain. eLife. 2020;9:e54873. PMID: 32312384. DOI: 10.7554/eLife.54873.

8) Shinmyo Y, Saito K, Hamabe-Horiike T, Kameya N, Ando A, Kawasaki K, et al. Localized astrogenesis regulates gyrification of the cerebral cortex. Science Advances. 2022;8:eabi5209. PMID: 35275722. DOI: 10.1126/sciadv.abi5209.