

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：32104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08144

研究課題名(和文) 脳回形成における脳室下帯神経幹細胞の役割

研究課題名(英文) Contribution of neuronal stem cells in the subventricular zone to sulcogyrogenesis in the ferret cerebral cortex

研究代表者

澤田 和彦 (Kazuhiko, Sawada)

つくば国際大学・医療保健学部・教授(移行)

研究者番号：10284324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：フェレットにおいて5～7日齢(神経新生後期)にバルプロ酸(VPA)を投与し、脳回形成が完了する20日齢に脳を取り出した。MRI画像解析から大脳皮質の体積と表面積は2群間で差はなかった。しかし、脳溝形成頻度(GI)はVPA投与群で低く、とくに内側面と前頭領域の脳溝のGIが小さかった。皮質厚はVPA投与群でGIが低値を示した領域で厚くなっていた。また、免疫蛍光多重染色解析から自己複製後に分化したニューロンの密度は前頭前領域、帯状領域、頭頂後頭領域で高かった。以上よりフェレットでは神経新生後期の曝露によって一部領域で皮質が厚くなることで折り畳みが(脳回の形成)が甘くなることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Ferrets were received ip injection of valproic acid (VPA) on postnatal days (PDs) 5 to 7. Brains were removed on PD 20 and T1W-MRI was acquired ex vivo. By MRI-based morphometry, both volumes and surface areas of the cerebral cortex did not differ on PD 20 between VPA-treated and control ferrets. The degree of gyrification was significantly lesser in VPA-treated ferrets. In particular, sulcal infolding was smaller in the cingulate and frontal cortical regions of VPA-treated ferrets. In those regions, a significantly greater cortical thickness was obtained in VPA-treated ferrets. By immunofluorescence analysis, late-generated neurons undergoing multiple rounds of cell divisions were densely distributed in the upper cortical layers of the prefrontal, cingulate and parietooccipital regions of 20-day-old ferrets. The present results suggest that the folding of particular cortical regions is reduced by thickening the cortex by exposure to VPA during late neurogenesis in ferrets.

研究分野：解剖学

キーワード：cerebral cortex subventricular zone neural stem cells basal radial glia ferret sulcus gyrus MRI

1. 研究開始当初の背景

脳回形成メカニズム解明の研究は、ヒトを中心に霊長類で行われ、様々な仮説が提唱されている。近年、高等哺乳動物のSVZには自己複製能を有する神経幹細胞(basal radial glial)の存在が明らかにされた。SVZ神経幹細胞の脳回形成への関与が示唆されているが、これを直接的に示した実験的研究は未だない。本研究では出生後に脳回を形成するフェレットをモデルとして、バルプロ酸投与によりSVZ神経幹細胞をニューロンに分化させることによりその自己複製を妨げ、その結果生じる脳回の形成異常を免疫組織化学およびMRIを用いて定量評価する。SVZ神経幹細胞の脳回形成への関与を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は、発生過程の大脳皮質において一時的に出現する脳室下帯(SVZ)神経幹細胞の脳回形成への寄与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

脳回形成が最も盛んになる直前(5~7日齢)の雄フェレット(7例)に200mg/kg体重のバルプロ酸(VPA)を毎日腹腔内投与した。VPA投与の直前に新生する細胞をEdUにより、投与期間中に新生する細胞をBrdUにより標識した。また、対照としてバルプロ酸非投与(EdUとBrdUのみ投与)の雄(7例)を用意した。各群3例ずつについては、BrdU投与の2時間後(7日齢)に動物を4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。残りの動物(各群4例ずつ)については、一次脳回の形成が完了する20日齢に灌流固定をした。固定後、脳を取り出し7-tesla MRI装置を用いて脳のT₁強調MR画像をex vivoで取得した。

MR画像から画像解析ソフトを用いて大脳皮質の容積、大脳半球の形状(前頭後頭極長および大脳半球幅)、大脳皮質の表面積、大脳皮質の厚さ、脳回形成頻度(gyrification index; GI)を計測した。その後、大脳の凍結組織切片を作成し、抗BrdU抗体および抗NeuN抗体(ニューロン・マーカー)による免疫蛍光二重染色とClick-TによるEdU蛍光染色の組み合わせ染色(蛍光多重染色)を行った。セクショニング顕微鏡を用いて蛍光画像を取得し、Disector法により脳溝および脳回領域におけるEdU標識ニューロン、BrdU標識ニューロン、EdU/BrdU二重標識ニューロンの密度を計測した。

4. 研究成果

大脳皮質の体積および表面積はVPA投与群と対照群とで有意な差はみられなかった(図1A,B)。大脳皮質の形状は、前頭後頭極長については両群の間で差はみられなかったが、尾側半の大脳半球幅がVPA投与群で有意に小さかった(図1C,D)。大脳皮質の脳溝形成頻度(global-GI)は、VPA投与群で有意に小さく

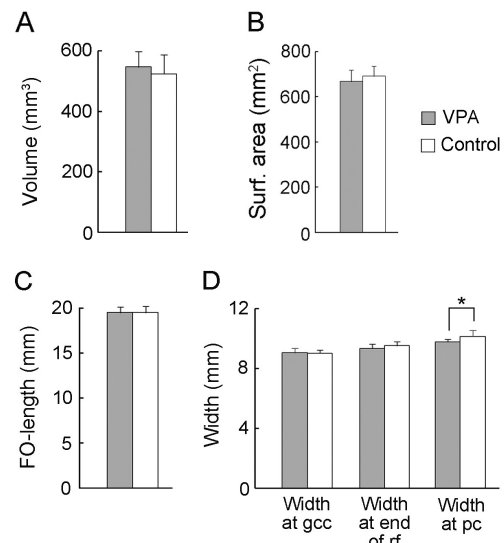


図1 新生時期VPA投与フェレット大脳のMRI定量解析の結果。A. 大脳皮質の容積。B. 大脳半球の表面積。C. 大脳半球の前頭後頭極長。D. 大脳半球幅。脳梁膝(gcc)および嗅裂の尾側端(end of rf)が半球吻側半の幅を、後交連(pc)が半球尾側半での幅を示す。*: $P < 0.001$ (Scheffe's test)

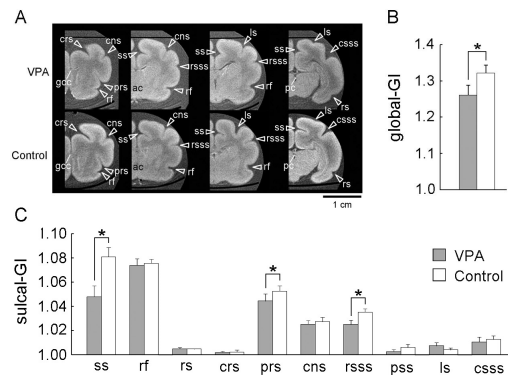


図2 新生時期VPA投与フェレット大脳のMR画像と脳溝形成頻度。A. 前頭断MR画像。B. 大脳皮質の脳溝形成頻度(global-GI)。C. 大脳各溝の形成頻度(sulcal-GI)。板状溝(ss)、前シルビウス溝(prs)、シルビウス状溝吻側部(rsss)におけるsulcal-GIがVPA投与群で有意に小さかった。*: $P < 0.001$ (Scheffe's test)

(図2B)、これは内側面の板状溝および前頭領域の一次運動野周辺の脳溝(シルビウス上溝吻側部、前シルビウス溝)のsulcal-GIがとくに低いことに起因していた(図2C)。皮質厚は、前頭前領域の前S字回の冠部で対照群に比べてVPA投与群で有意に大きかった(図3)。また、VPA投与群では板状溝や上溝吻側部の底部の皮質も厚く、これらはVPA投与群においてsulcal-GIが小さい溝と一致した。

免疫蛍光多重染色による解析では、20日齢のフェレットにおいてEdU/BrdU二重標識二

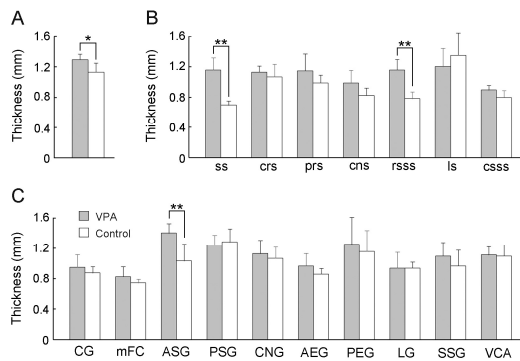


図3 . 新生時期 VPA 投与フェレットの脳皮質厚 . A. 脳皮質全体の平均厚 . VPA 投与群で有意に厚かった (*: $P < 0.01$, Scheffe's test). B. 各脳溝の底部での皮質厚 . VPA 投与群で板状溝(ss)底とシルビウス状溝吻側部(rsss)底の皮質が有意に厚かった (**: $P < 0.001$, Scheffe's test). C. 各脳回の冠部での皮質厚 . 前 S 字回の冠部の皮質厚が有意に厚かった (**: $P < 0.001$, Scheffe's test).

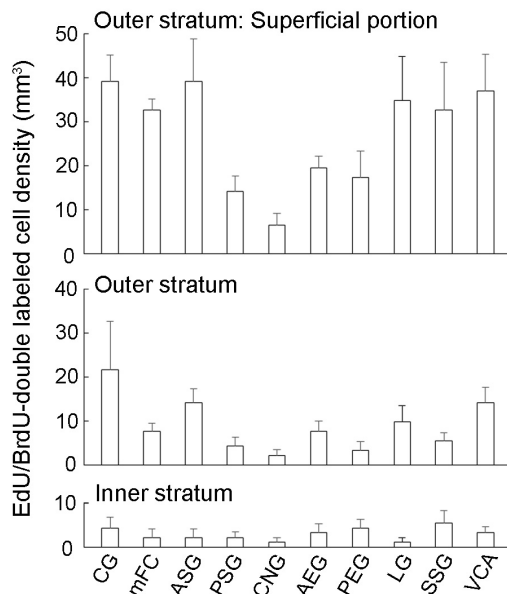


図4 . 20 日齢フェレットにおける脳皮質の EdU/BrdU 二重標識ニューロンの密度 . 上段 . 皮質 / 層の最上層 . 中段 . 皮質 / 層 . 下段 . 皮質 V-VI 層 . EdU/BrdU 二重標識ニューロンの密度は、前頭前領域(前 S 字回 ASG、内側前頭皮質 mFC)、頭頂後頭領域(外側回 LG、シルビウス上回 SSG、視覚皮質域 VCA)、帯状領域(帯状回 CG)で比較的高かった。

ニューロンは皮質上層(outer stratum)に多くみられ、その密度は脳溝底に比べて脳回冠で 1.7 倍大きかった。また、EdU/BrdU 二重標識ニューロンの密度は、前頭領域や側頭領域に比べて前頭前領域、頭頂後頭領域、帯状領域など系統発生的に新しい皮質領域(evolutionally-expanded cortex)で高かった。

以上より、神経新生後期の VPA 投与によって前頭前領域および前頭領域一次運動野の周辺で皮質が厚くなることで折り畳みが(脳回の形成)が甘くなることが明らかになった。また、前頭前領域における脳回形成には神経新生後期に神経幹細胞(basal RG)の自己複製によって産生したニューロンが関与する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Sawada K, Aoki I (2017) Biphasic aspect of sexually dimorphic ontogenetic trajectory of gyrification in the ferret cerebral cortex. *Neuroscience* 364: 71-81.

[学会発表](計 2 件)

澤田和彦、廣瀬美和 (2017) フェレットにおける脳溝・脳回領域での脳皮質組織構造の相違 . 第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会(長崎) 2017 年 3 月 28 ~ 30 日

Sawada K, Aoki I (2017) Developmental change in sulcal infolding of the ferret cerebrum. 第 40 回日本神経科学大会(千葉)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 和彦 (SAWADA, Kazuhiko)

つくば国際大学・医療保健学部・教授
研究者番号：10284324

(2)研究分担者

廣瀬 美和 (HORIUCHI-HIROSE, Miwa)
茨城キリスト教大学・看護学部・准教授
研究者番号：90381714

(3)連携研究者

青木 伊知男 (AOKI, Ichio)
量子科学技術研究開発機構・量子 MRI 研究
グループ・チームリーダー
研究者番号：10319519

(4)研究協力者