

令和 2 年 4 月 13 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14812

研究課題名(和文) 大脳皮質の脳回形成を司る分子シグナル経路の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the folding of the cerebral cortex

研究代表者

松本 直之 (Matsumoto, Naoyuki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：20774756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトなどの高等哺乳動物にある大脳皮質の脳回は、大脳皮質の拡大と高次脳機能の獲得に重要と考えられるが、脳回形成の分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究課題では、脳回形成における内在的なFGFシグナルの重要性を検証した。フェレットの大脳皮質に優性不能型FGF受容体を発現させた結果、脳回形成が阻害された。組織レベルでの解析を行った結果、優性不能型FGF受容体により高等哺乳動物に特徴的な神経前駆細胞(oRG)が減少していた。これらの結果は、FGFがoRGの分裂を促進し、その結果として脳回が生じるとの仮説を支持している。我々の研究技術は、高等哺乳動物に特徴的な様々な脳構築の解析に有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られる成果は、高等哺乳動物に特徴的な脳回形成機構の解明といった神経科学への貢献のみならず、滑脳症や多小脳回症などの脳回形成異常の疾患病態の解明にも発展するなど臨床医学への貢献も大きく、社会的な波及効果も大きい。さらに脳回以外にも多く存在する高等哺乳動物に特徴的な様々な脳神経構築の解析にもつながるなど波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：The gyrus of the cerebral cortex found in higher mammals, such as humans, is thought to be important for cortical expansion and acquisition of higher brain functions. However, the molecular mechanisms of gyrus formation are still unclear. In this study, we examined the role of intrinsic FGF signaling in gyrus formation. Introduction of a dominant-negative FGF receptor in the ferret cerebral cortex markedly inhibited gyrus formation. Histological analyses showed that the dominant-negative FGF receptor reduced oRG cells. These results support the hypothesis that FGF promotes oRG cell proliferation, resulting in the formation of the gyrus. Our research techniques are useful for analyzing the various brain structures characteristic of higher mammals.

研究分野：神経科学

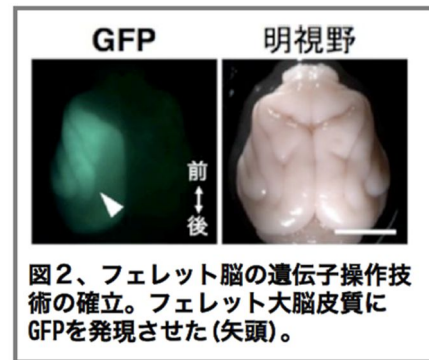
キーワード：大脳皮質

## 1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は知覚・思考・判断などの高次脳機能を司る基盤であり、その発生・発達機構の解明は脳機能の理解ならびに脳神経疾患の治療法開発にも繋がる最重要研究課題のひとつである。ヒトのような高度に発達した脳をもつ高等哺乳動物は、複雑に折りたたまれた大脳皮質をもつ(図1)。このシワ(脳回)形成の獲得は、大脳皮質の拡大とそれに伴う高次脳機能獲得の基盤になると考えられている。そのため、脳回形成の分子機構の解明は、高等哺乳動物における高次脳機能の獲得基盤の解明に繋がる重要な研究課題である。



このような重要性にもかかわらず、脳回の形成機構は未だに不明な点が多い。その主な理由として、遺伝子操作が容易なマウスの大脳皮質に脳回が存在しないこと(図1)さらには、ヒトやサルのような脳回をもつ高等哺乳動物では遺伝子操作が困難であることが挙げられる。そこで我々の研究室ではこれまでに、脳回をもつ哺乳動物フェレットを採用し、世界に先駆けてフェレットでの遺伝子操作技術を確立してきた(図2)(Molecular Brain, 2012; Biology Open, 2013)。さらにこの遺伝子操作技術と CRISPR/Cas9 を組み合わせることにより、フェレット大脳皮質における遺伝子ノックアウトに成功した(Cell Reports, 2017)。これらの技術は脳回形成機構を解明する上で非常に強力なアドバンテージとなる。



この技術を用いて当研究室では以前に、フェレット大脳皮質を用いて FGF シグナルの人為的な活性化が脳回形成に十分であることを明らかにした(Scientific Reports, 2015)。この際に、高等哺乳動物に特徴的な神経前駆細胞(oRG)の増加と、大脳皮質の表層側の優先的拡大が脳回形成に重要である可能性を見いだした(Scientific Reports, 2015)。そこで、本研究課題では脳回形成における内在性の FGF の重要性を検討した。「脳回をもつ高等哺乳動物の大脳皮質では内在的な FGF シグナルが活性化しており、大脳皮質の脳回形成を制御している」との仮説を立て、その検証を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、当研究室の技術的蓄積を活用して大脳皮質の脳回形成における内在性 FGF シグナルの重要性を検討することである。当研究室では、子宮内電気穿孔法を用いてフェレットの大脳皮質への遺伝発現技術を世界に先駆けて確立した(図2)(Molecular Brain, 2012; Biology Open, 2013)。さらに CRISPR/Cas9 を組み合わせることにより、フェレット大脳皮質で遺伝子ノックアウトを実現するなど(Cell Reports, 2017)、高等哺乳動物の脳神経系を用いた分子遺伝学的研究を牽引している。実際に、当研究室ではこれまでに、転写因子 Tbr2 が脳回形成に重要であること(Scientific Reports, 2016)、FGF が脳回形成に十分であることを示した(Scientific Reports, 2015)。また、我々は上述の技術を用いた脳形成異常疾患の病態解析に関する論文を報告している(Matsumoto et al., Human Molecular Genetics, 2017)。従って、我々は世界的にみても本研究課題を推進する上で非常に有利な立場にあることから、脳回形成の分子機構の解明を世界に先駆けて行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 発生期フェレット大脳皮質における FGF 受容体の発現解析

FGF シグナルの機能的な重要性を解明するために、脳回形成時期のフェレット大脳皮質に発現する FGF 受容体を解析した。FGF 受容体は FGF 受容体 1~4 が存在することから、まずそれぞれの大脳皮質での発現を RT-PCR で解析した。発現が確認できたものに対して、フェレット用の in situ プローブを作成し、発現の空間分布を検討した。

### (2) 脳回形成における FGF シグナルの必要性の解析

当研究室ではすでに FGF を過剰発現することにより脳回を増やすことに成功しており、FGF シグナルが脳回形成に十分であることを示した(Scientific Reports, 2015)。そこで、内在性 FGF シグナルの必要性を検討した。FGF シグナルの阻害は、複数種類の FGF 受容体を全て抑制できる優性不能型 FGF 受容体を用いた。

さらに免疫組織学的に Pax6, Sox2 や Tbr2 などの抗体を用いて神経前駆細胞の増減を、Ki-67 やリン酸化ヒストン H3 を用いて細胞分裂を、さらに大脳皮質の各層の厚さを検討し、脳回形成阻害に至るメカニズムの解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 内在性 FGF シグナルは脳回形成に必要である。

フェレット大脳皮質に子宮内電気穿孔法で優性不能型 FGF 受容体を発現させて、FGF シグナルを抑制したところ、脳回の形成が阻害されることを見出した。この結果は、内在性 FGF シグナルが脳回形成に必要であることを意味している。

(2) FGF 受容体は oRG に発現している。

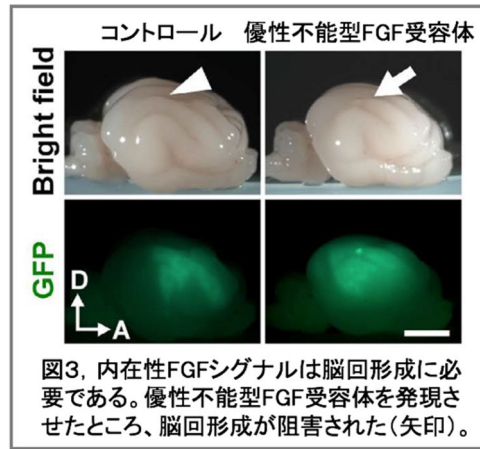
FGF 受容体の発現分布を解析するために、フェレット大脳皮質に発現する FGF 受容体 1、2、3 の 3 種類のプローブを作成し、*in situ* hybridization を行った。その結果、いずれも Pax6 陽性および Tbr2 陰性の oRG に多く発現していることを見いだした。

(3) FGF シグナルは oRG の増殖に必要である。

優性不能型 FGF 受容体を発現させたフェレット大脳皮質を解析したところ、oRG が減少していることを見出した。さらに細胞分裂も抑制されていたことから、FGF シグナルは oRG の細胞増殖を制御していることが示唆された。

(4) FGF シグナルは大脳皮質表層の厚さを制御している。

優性不能型 FGF 受容体を発現させたフェレット大脳皮質を解析したところ、表層側の厚さが減少していた。この結果は、FGF シグナルは大脳皮質の表層を増やすことにより、外向きへ凸の脳回を形成することを示唆している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Naoyuki, Kobayashi Naoki, Uda Natsu, Hirota Miwako, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Pathophysiological analyses of leptomeningeal heterotopia using gyrencephalic mammals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 985 ~ 991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hmg/ddy014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumoto Naoyuki, Yamamoto Nobuhiko	4. 巻 133
2. 論文標題 Visualization of Thalamocortical Axon Branching and Synapse Formation in Organotypic Cocultures	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments	6. 最初と最後の頁 e56553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/56553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuguchi Keishi, Horiike Toshihide, Matsumoto Naoyuki, Ichikawa Yoshie, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 43
2. 論文標題 Distribution and Morphological Features of Microglia in the Developing Cerebral Cortex of Gyrencephalic Mammals	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1075 ~ 1085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11064-018-2520-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Dinh Duong Tung Anh, Hoshiba Yoshio, Saito Kengo, Kawasaki Kanji, Ichikawa Yoshie, Matsumoto Naoyuki, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 39
2. 論文標題 FGF Signaling Directs the Cell Fate Switch from Neurons to Astrocytes in the Developing Mouse Cerebral Cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 6081 ~ 6094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2195-18.2019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Naoyuki Matsumoto
2. 発表標題 Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Matsumoto
2. 発表標題 Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Matsumoto
2. 発表標題 Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain
3. 学会等名 New frontier in Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----