

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19379

研究課題名(和文) 白質内の神経細胞における分子的变化に注目した新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Investigation of molecular change in the white matter neurons

研究代表者

久保 健一郎(Kubo, Ken-ichiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：20348791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：白質内の神経細胞を効率よくラベルするために、これまでに確立した子宮内電気穿孔法を用いた部位特異的神経細胞ラベル法に加えて、フラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を確立した。この手法を用いて、脳内の異なる領域の細胞移動を同時に可視化したところ、これまで均一であると考えられていた新皮質における細胞移動が、脳の領域によって、違いが大きいことを見出した。この違いが認められる時期と、さほど違いがない時期があることも新たに見出した。また、ヒトの大脳新皮質における白質神経細胞の解析を行うために、倫理委員会による承認を得た上で、ヒトの死後脳組織を用いて、白質内の神経細胞に注目した組織学的な解析を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

フラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を確立したことで、子宮内電気穿孔法よりも簡便で、かつ、より広い範囲で神経細胞をラベルすることができるようになった。また、この手法を用いて、これまで均一であると考えられていた新皮質における細胞移動が、脳の領域によって、違いが大きいことを見出した。これらの新しい手法や所見は、同じ研究分野の他の研究者にとっても有用で、解析の基盤となる所見であると考えられる。また、白質神経細胞は、ヒトを始めとする霊長類に特徴的であるため、ヒトの脳を用いた解析が必須となる。ヒトの死後脳組織を用いた解析を開始したため、最終的な目的である病態の解明への第一歩が踏み出せた。

研究成果の概要(英文)：To efficiently label neurons in the white matter, we modified the recently reported FlashTag technology and labeled different brain regions of developing mouse cerebral cortex. During the investigation, we found a regional difference in the migratory profiles of neurons that is dependent on developmental stage, whereas migrations of neurons in the developing mouse cerebral cortex were thought to progress evenly across different brain regions. Furthermore, to analyze the white matter neurons that are abundant in the human neocortex, we obtained approval of the ethics committee and have started histological analysis of the white matter neurons of human postmortem brains.

研究分野：神経科学

キーワード：神経細胞 フラッシュ・タグ法 子宮内電気穿孔法 死後脳 白質

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症や自閉症の脳病理所見として、大脳皮質の微細な組織構築の異常が以前から指摘されている。なかでも、本来は神経細胞の線維が主に存在する、大脳新皮質の白質における神経細胞の増加は、統合失調症と自閉スペクトラム症の脳で繰り返し報告されている。これまで、この白質内神経細胞の異所性の増加は、大脳新皮質の神経細胞の細胞移動の障害を反映しており、大脳新皮質の神経細胞が灰白質に移動する際に白質に取り残された結果生じると考えられてきた。すなわち、白質内神経細胞の増加は、あくまで大脳新皮質の形成障害に付随的に生じたに過ぎないと捉えられ、白質内神経細胞が積極的に病態へ関与するとは想定されていない。また、現在のところ、白質神経細胞の増加がどのように生じるのか、そのメカニズムについては不明である。そもそも、増加している白質神経細胞がどのような性質を持った細胞なのか、詳細は明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

応募者は、最近の自身の実験結果から、逆に、この白質内神経細胞の増加それ自体が病態に関わる可能性があると考えに至った。実際に、人為的方法を用いてマウス大脳新皮質の白質内神経細胞を増加させたところ、意外なことに、その増加部位から離れた脳部位である前頭前皮質の機能に影響が生じ、動物行動の異常が観察された (Ishii\*/Kubo\*, J. Neurosci., 2015)。この白質内神経細胞の精神神経疾患の病態への関与は、これまでに提唱されていない独自の仮説である。本研究ではこの独自の仮説に基づいて、白質内の神経細胞に生じる分子的变化を明らかにすることを目的に、研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 子宮内電気穿孔法による神経細胞ラベル

これまでに確立した子宮内電気穿孔法 (Kubo, et al. J. Neurosci., 2010、Kohno\*/Honda\*/Kubo\*, et al. J. Neurosci., 2015、Ishii\*/Kubo\*, et al., J. Neurosci., 2015) によって、発生過程における特定の時期に誕生した神経細胞に特異的に遺伝子導入を行った。また、これもこれまでに確立した部位特異的神経細胞ラベル法 (Niwa, et al., Neuron, 2010、Tomita\*/Kubo\*, et al., Hum. Mol. Genet., 2011) や、単一の神経細胞ラベル法 (Kitazawa\*/Kubo\*, et al., J. Neurosci., 2014) を用いて遺伝子導入を行った。その際に、蛍光タンパク質を導入することによって、神経細胞をラベルした。

### (2) フラッシュ・タグ法の確立とそれを用いた神経細胞ラベル

子宮内電気穿孔法に加えて、蛍光色素を脳室に注入することで、注入時刻前後において脳室面で分裂する将来の大脳皮質の神経細胞をラベルするフラッシュ・タグ (FlashTag) 法を、注入する蛍光色素の濃度の条件検討を行い、確立して報告した (Yoshinaga et al., *iScience*, 2021)。フラッシュ・タグ法は、子宮内電気穿孔法に比べて、ラベルされる神経細胞の蛍光は弱いですが、観察には十分な蛍光強度でラベルすることができた。しかも、脳室に面して分裂する細胞は、部位を問わずラベルされるため、電極の方向に依存する子宮内電気穿孔法よりも、より広い範囲で神経細胞をラベルすることができた。

## 4. 研究成果

### (1) フラッシュ・タグ法の確立とそれを用いた解析と成果

白質内の神経細胞をマウスにおいて作成するための条件検討を行うとともに、これまでに確立したマウス子宮内電気穿孔法を用いた部位特異的神経細胞ラベル法 (Tomita\*/Kubo\*, et al., Hum. Mol. Genet., 2011、Ishii\*/Kubo\*, et al., J. Neurosci., 2015) に加えて、最近開発されたフラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を用いて、脳内の異なる領域の細胞移動を同時に可視化するための条件検討を行った。その結果、従来用いられていた濃度よりも、より低い濃度に改変することで、細胞へのダメージを抑え、かつ広範囲において神経細胞をラベルすることができた (Yoshinaga et al., *iScience*, 2021)。

このフラッシュ・タグ法を改変した新たな手法を用いて、脳内の異なる領域の細胞移動を同時に可視化したところ、これまで均一であると考えられていた新皮質における細胞移動が、実は脳の領域によって、かなり違いが大きいことを見出した。当初予期していなかった、予想外の方向への研究の進展ではあるが、我々のみならず、この研究分野の他の研究者にとっても、基盤となる所見とデータを得ることができた。この差が大きい時期と、さほど違いがない時期があることも新たに見出した。このように、時期と脳の領域による神経移動について、新規手法を用いて詳細に観察し、その結果をまとめて、論文として発表した (Yoshinaga et al., *iScience*,

2021)。

加えて、迅速な遺伝子組換え動物を作成するための方法として、improved-Genome editing via Oviductal Nucleic Acids Delivery (iGonad)法を導入し、作成した遺伝子組換え動物における神経細胞移動の評価を、フラッシュ・タグ法を用いて行った(Yoshinaga et al., *iScience*, 2021)。これらのフラッシュ・タグ法やiGonad法を用いることで、今後、遺伝要因や環境要因による、白質内の神経細胞の増加などの、微細な神経細胞配置の変化を、鋭敏に検出することができると期待される。

## (2) 正常に灰白質へ移動した神経細胞の解析と成果

移動が障害される場合に、マウスにおいても白質内の神経細胞の増加が観察される(Tomita\*/Kubo\*, et al., *Hum.Mol. Genet.*, 2011、Ishii\*/Kubo\*, et al., *J. Neurosci.*, 2015、Kubo, et al. *JCI Insight*, 2017)のに対し、正常に灰白質へ移動した神経細胞は、移動の最終段階において、リーリン分子をはじめとする脳の最表層にしか存在しない分子に反応するため、その際に神経細胞の性質が大きく変わると考えられる。その際の神経細胞動態を明らかにするために、従来のマウス子宮内電気穿孔法を用いた神経細胞の可視化による解析を行ったところ、辺縁帯の直下に移動してきた神経細胞が哺乳類特異的なインサイドアウトパターン(遅生まれの細胞ほど最終的に深層に位置し、早生まれの細胞ほど浅層に位置する)の配列を行いながら、神経細胞同士が密に接着した凝集構造が形成されることを見出した。さらに電子顕微鏡を用いた解析を行うことにより、発生中の大脳新皮質における辺縁帯の直下では、比較的未成熟な神経細胞同士が直接その細胞体同士で密に接着した凝集構造が形成されることを明らかにして、報告した(Shin\*/Kitazawa\*, et al., *J. Comp. Neurol.*, 2019)。

## (3) 前障に移動する神経細胞の解析と成果

これまでマウス子宮内電気穿孔法ではラベルが難しかった脳領域であり、白質内の神経細胞が多いことでも注目される、前障について、時期による神経移動と配置について、フラッシュ・タグ法を改良した新たな手法を用いて、詳細に観察した。その結果、前障において、これまで明らかになっていなかった様式の細胞移動が存在することを見出したので、所見をまとめて学会発表を行った。また論文発表への準備を進めた。

## (4) 白質内神経細胞が増加する独自のモデルの解析と成果

以前に白質内神経細胞が増加する独自のモデルとして報告している、胎児期虚血のモデルマウスを用いて、移動の障害が生じる神経細胞の分子プロファイルの変化についての解析を進めた。実際には、マウス子宮内胎児電気穿孔法等を用いて、発達中のマウス胎仔脳の神経細胞に蛍光タンパク質を発現するプラスミドを導入することによって、あらかじめ神経細胞の可視化を行っていた。生後の胎児期虚血のモデルマウスと対照群のマウスの脳から、蛍光タンパク質を用いてセルソーターによって移動中の神経細胞を抽出したのち、それらの細胞からRNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。その結果についての解析と検証を進めた。

## (5) ヒトの大脳新皮質における白質神経細胞の解析と成果

ヒトにおいては、大脳新皮質における白質神経細胞の増加は、統合失調症に加えて、自閉スペクトラム症や双極性障害においても報告されており、種々の精神神経疾患における、疾患横断的な脳の組織構築の変化であると考えられる。この白質神経細胞の増加は、発生・発達の過程でなんらかの脳への障害が生じたことを示唆する痕跡であるとともに、それ自体が脳機能に影響することも想定されるため、疾患病態を理解する上で重要な手がかりとなる可能性がある。これまで、多くの研究者が、白質神経細胞の増加をはじめとする、白質神経細胞の密度の変化について報告してきたが、その部位や領域は研究によって異なる。また、解析に用いた神経細胞マーカーや、脳が由来するブレインバンク、対象とした疾患も異なる。これらの、これまでの報告の詳細についてまとめ、総説として報告した(Kubo, *Psychiatry Clin Neurosci.*, 2020)。この報告のなかで、併せて、現段階で想定されている、白質神経細胞の増加がどのように生じるのか、そのメカニズムについて、整理して発表した。

実際に、ヒトの大脳新皮質における白質神経細胞についての解析を行うために、倫理委員会による承認を得た上で、ヒトの死後脳組織を用いて、白質内の神経細胞に注目した組織学的な解析を開始した。その結果、白質内の神経細胞は、白質内に均一に分布するのではなく、白質内に偏りを持って分布しており、白質内に神経細胞の密度が高い領域と低い領域が存在することを見出した。また、その背景として想定される、発生過程における神経細胞移動について、ヒトとマウスの比較を行いつつ、これまでに得られた知見を俯瞰した総説を執筆した(Kubo and Deguchi, *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 2020)。これらの知見は、今後の研究で、発生過程における障害が想定されている精神神経疾患の病態に、白質神経細胞の増加をはじめとする、微細な組織構築変化がどのように関与するかを理解する上で、有用であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kubo Ken ichiro	4. 巻 74
2. 論文標題 Increased densities of white matter neurons as a cross disease feature of neuropsychiatric disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 166 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Inoue Seika, Hayashi Kanehiro, Fujita Kyota, Tagawa Kazuhiko, Okazawa Hitoshi, Kubo Ken-ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 39
2. 論文標題 Drebrin-like (Dbnl) Controls Neuronal Migration via Regulating N-Cadherin Expression in the Developing Cerebral Cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 678 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.1634-18.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shin Minkyung, Kitazawa Ayako, Yoshinaga Satoshi, Hayashi Kanehiro, Hirata Yukio, Dehay Colette, Kubo Ken ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 527
2. 論文標題 Both excitatory and inhibitory neurons transiently form clusters at the outermost region of the developing mammalian cerebral neocortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Comparative Neurology	6. 最初と最後の頁 1577 ~ 1597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24634	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 該当する
1. 著者名 Kubo Ken ichiro, Deguchi Kimiko	4. 巻 46
2. 論文標題 Human neocortical development as a basis to understand mechanisms underlying neurodevelopmental disabilities in extremely preterm infants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2242 ~ 2250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jog.14468	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 Yoshinaga Satoshi, Shin Minkyung, Kitazawa Ayako, Ishii Kazuhiro, Tanuma Masato, Kasai Atsushi, Hashimoto Hitoshi, Kubo Ken-ichiro, Nakajima Kazunori	4. 巻 24
2. 論文標題 Comprehensive characterization of migration profiles of murine cerebral cortical neurons during development using FlashTag labeling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102277 ~ 102277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102277	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計12件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北澤 彩子、シン ミンギョン、林 周宏、大石 康二、久保 健一郎、仲嶋 一範
2. 発表標題 発生期の海馬と大脳新皮質における神経細胞の放射状グリア線維依存的な移動様式の違いについての解析
3. 学会等名 第54回TOKYOニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北澤彩子、シン ミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 マウス海馬CA1と大脳新皮質錐体細胞の放射状グリア線維依存的な移動様式の違いについての解析
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 周宏、井上聖香、仲尾信彦、久保健一郎、安達泰治、仲嶋一範
2. 発表標題 分泌性糖タンパク質ReelinによるN-cadherinの制御機構
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学学会大会合同大会 (Neuro2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名	Minkyung Shin, Ayako Kitazawa, Satoshi Yoshinaga, Kanehiro Hayashi, Colette Dehay, Ken-ichiro Kubo, and Kazunori Nakajima
2. 発表標題	Clustering of neurons within the outermost region of the developing mammalian neocortex: primitive neuronal clusters
3. 学会等名	11th Neurodevelopmental Biology Section of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology (KSMCB)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Ken-ichiro Kubo, Kimiko Deguchi, Ken Inoue, Kazunori Nakajima
2. 発表標題	Association of altered neuronal migration with cognitive deficits in a newly established mouse model of extremely preterm infants with brain injuries
3. 学会等名	LKC Medicine Neuroscience Seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	久保健一郎、出口貴美子、ハズラデバブラタ、吉永怜史、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題	マウスにおける神経発達障害モデルの作成と解析における進化
3. 学会等名	第40回日本生物学的精神医学会・第61回日本神経化学会大会 合同年会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	久保健一郎、出口貴美子、石井一裕、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題	神経発達症モデルマウスの作成とその神経回路の解析
3. 学会等名	2018年度生理学研究所研究会 (招待講演)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 久保健一郎、シン ミンギョン、北澤彩子、吉永怜史、林周宏、仲嶋一範
2. 発表標題 発生中の大脳新皮質において辺縁帯直下に認める比較的未成熟な神経細胞の凝集構造についての知見
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保健一郎、出口貴美子、ハズラ デバプラタ、吉永怜史、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 超早産児虚血性脳障害モデルマウスの解析と治療戦略
3. 学会等名 日本新生児生育医学会・学術集会サテライトセミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大島鴻太、吉永怜史、北澤彩子、仲嶋一範、久保健一郎
2. 発表標題 Analyses of migration profiles of the claustral neurons during mouse development
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会・第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北澤彩子、大石康二、吉永怜史、シンミンギョン、林周宏、久保健一郎、仲嶋一範
2. 発表標題 マウス大脳新皮質錐体細胞との比較による海馬CA1錐体細胞の移動制御要因の解明
3. 学会等名 日本解剖学会第108回関東支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保健一郎、出口貴美子、吉永怜史、野々村美康、大島鴻太、高杉聡、北澤彩子、井上健、仲嶋一範
2. 発表標題 発生段階における虚血等による脳傷害が脳の発達に与える影響の解析
3. 学会等名 第123回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	Korea Brain Research Institute			
米国	Beth Israel Deaconess Medical Center	Harvard Medical School		
フランス	Stem Cell and Brain Research Institute			