

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03351

研究課題名(和文) 軸索ガイダンスを切り口とした脳回形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of cortical folding focusing on axon guidance

研究代表者

新明 洋平 (Shinmyo, Yohei)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00418831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：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。私たちは発達した脳構造を持つフェレットを用いてシワの形成機構を明らかにしてきた。次の重要な課題は、シワのパターンが作られる仕組みを理解することである。本研究では、脳回パターン形成における神経前駆細胞、神経細胞、軸索投射、グリア細胞などの重要性を検証した。その結果、グリア細胞の一種であるアストロサイトが脳溝に比べて脳回に多く存在することを見出した。さらに、フェレットを用いた機能解析を行った結果、将来の脳回での局所的なアストロサイトの産生がシワ形成に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皺脳動物でのアストロサイト研究の重要性は世界的に注目されていたが、その研究は遅れていた。この主たる原因は、皺脳動物の脳内のアストロサイトでの遺伝子操作が困難なためであった。重要なことに私たちは、子宮内エレクトロポレーション法、piggyBacシステム、細胞種特異的プロモーターを組みわせることにより、フェレット大脳においてアストロサイト選択的な遺伝子発現システムを確立した。その手法を用いて、脳回形成におけるアストロサイトの重要性を明らかにした。このように、独自技術を利用して皺脳動物でのアストロサイトの解析を行った本課題は学術的に重要性の高い研究であると言える。

研究成果の概要(英文)：Folding and expansion of the cerebral cortex during mammalian evolution are considered to be crucial advances in acquiring higher brain functions. We have elucidated the mechanism of cortical folding using ferrets with well-developed brain structures. The next important task is to understand the mechanism of pattern formation of cortical folds. In this study, we examined the importance of neural progenitor cells, neurons, axon projections and glial cells in the pattern formation of cortical folds. We found that astrocytes are more abundant in the gyrus than in the sulcus of the ferret brain. Furthermore, we demonstrated that this local production of astrocytes in the gyrus is important for cortical folding.

研究分野：神経発生学

キーワード：フェレット 脳回脳溝形成

1. 研究開始当初の背景

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(脳回脳溝)を形成する。進化における脳回脳溝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、脳回脳溝の形成メカニズムの解明は神経科学の重要研究課題である。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脳溝は存在せずに、マウスを用いた解析が困難であるために脳回脳溝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、脳回脳溝などの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、分子遺伝学的研究手法は確立されていなかった。我々は、子宮内エレクトロポレーション法を用いてフェレット大脳皮質において遺伝子機能解析技術を開発してきた。我々はこれらの独自技術を用いて脳回脳溝形成機構に切り込み、下層神経細胞に対する上層神経細胞の産出数の増大と上層神経細胞の脳表への移動が脳回脳溝形成に重要であることなど、脳回脳溝形成における神経細胞の役割を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

脳回脳溝形成における次の本質的な重要 question として、脳回脳溝の凹凸の場所の空間分布を規定する(脳回脳溝パターン形成)機構が世界的にも注目されているが、その分子メカニズムは全くわかっていなかった。本研究では、脳回脳溝パターン形成における神経前駆細胞、神経細胞、軸索投射、グリア細胞などの重要性を検証した。その結果、グリア細胞の一種であるアストロサイトが脳溝に比べて脳回に多く存在することを見出した。さらに、フェレットを用いた機能解析を行った結果、将来の脳回での局所的なアストロサイトの産生が脳回脳溝形成に重要であることを明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 脳回脳溝形成におけるアストロサイトの分布

脳回脳溝形成期におけるアストロサイトの分布を調べるために、出生後 16 日目のフェレット大脳においてアストロサイトのマーカーである S100 と GFAP に対する免疫染色を行った。

(2) フェレット大脳においてアストロサイトの破壊

フェレット大脳においてアストロサイトを選択的に破壊するために gfa2 プロモーターの下流にジフテリア毒素 A 鎖(DTA)を発現する piggyBac プラスミドを作成した。そのコンストラクトをフェレット大脳皮質内に子宮内エレクトロポレーション法により導入した。できるだけ多くのアストロサイトを破壊するためには、より早い時期にこのコンストラクトを導入した方が良く考え、子宮内エレクトロポレーションには妊娠 31 日目のフェレットを用いた。出生後 16 日目に脳を固定し、脳回脳溝の形成異常を調べるために組織学的解析を行った。また、アストロサイト産生への影響を調べるために、S100 と GFAP に対する免疫染色を行った。

(3) マウス大脳において局所的なアストロサイトの産生実験

マウス大脳においてアストロサイトを増加させるために CAG プロモーターの下流に FGF8 を発現する piggyBac プラスミドを作成した。アストロサイト産生期に FGF シグナルを活性化するために、CreERT2 を利用して出生後のマウス大脳に FGF8 を発現させた。出生後 30 日目に脳を固定し、大脳皮質の構造に変化があるかを調べた。

4. 研究成果

哺乳動物の進化の過程で、神経細胞に加えてグリア細胞の一種であるアストロサイトの数が増大したことは知られていたが、脳回脳溝形成におけるその重要性については全く分かっていなかった。そこで、フェレット大脳の脳回脳溝形成におけるアストロサイトの重要性を検証した。最初に、フェレットの大脳発生過程におけるアストロサイトの分布をアストロサイトのマーカーである S100 と GFAP に対する免疫染色により調べた。その結果、白質アストロサイトが脳

溝よりも脳回でより多く存在することが分かった。この結果から、脳回における局所的なアストロサイトの産生が脳回脳溝形成に重要である可能性が示唆された。

次に、上記の仮説を検証するために、フェレット大脳において DTA を発現するコンストラクトを用いてアストロサイトの破壊実験を行った。コントロールのコンストラクトを導入した個体の大脳では、反対側の脳に比べて脳回脳溝形成に顕著な異常は観察されなかった。一方、DTA を導入した大脳領域において脳回の形成が阻害された。さらに組織学的解析を行った結果、神経細胞の数には大きな影響はなかったが、アストロサイトの数が大脳白質において著しく減少していた。

次に、局所的なアストロサイトの産生が脳回形成に十分であるかを調べるために、出生後のマウス大脳皮質において FGF シグナルを活性化した。その結果、アストロサイト数が選択的に著しく増加すると共に脳回様構造が誘発された。以上の結果から、大脳白質における局所的なアストロサイトの産生が脳回形成に重要であることを示唆された。現在、我々は、神経細胞とアストロサイトが段階的に脳回脳溝形成に関わるという Two-step モデルを提唱している（図）。

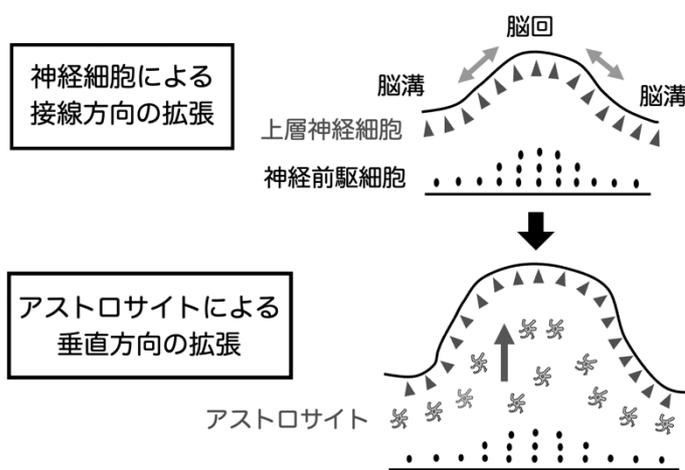


図 脳回脳溝形成における Two-step モデル

脳回形成には二つの重要なプロセスがある。最初に、神経前駆細胞から上層神経細胞が多く産生されることにより、脳表の接線方向の拡張がおきる。次に、脳回において多くのアストロサイトが産生されることにより、垂直方向の拡張が起こり脳回が発達する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Edwards-Faret Gabriela, de Vin Filip, Slezak Michal, Gollenbeck Lennart, Karaman Ruchan, Shinmyo Yohei, Batiuk Mykhailo Y., Pando Carmen Menacho, Urschitz Johann, Rincon Melvin Y., Moisyadi Stefan, Schnutgen Frank, Kawasaki Hiroshi, Schmucker Dietmar, Holt Matthew G.	4. 巻 508
2. 論文標題 A New Technical Approach for Cross-species Examination of Neuronal Wiring and Adult Neuron-glia Functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 40~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2022.11.029	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 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Nguyen Dinh Thi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Maejima Takashi, Saito Kengo, Shinmyo Yohei, Mieda Michihiro, Tajima Atsushi, Kawasaki Hiroshi, Hori Osamu	4. 巻 16
2. 論文標題 Isolation of ferret astrocytes reveals their morphological, transcriptional, and functional differences from mouse astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 877131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.877131	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 Shinmyo Yohei, Hamabe-Horiike Toshihide, Saito Kengo, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigation of the Mechanisms Underlying the Development and Evolution of the Cerebral Cortex Using Gyrencephalic Ferrets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 847159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.847159	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 Shinmyo Yohei, Saito Kengo, Hamabe-Horiike Toshihide, Kameya Narufumi, Ando Akitaka, Kawasaki Kanji, Duong Tung Anh Dinh, Sakashita Masataka, Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Slezak Michal, Holt Matthew G., Tajima Atsushi, Hori Osamu, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Localized astrogenesis regulates gyrification of the cerebral cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabi5209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abi5209	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

1. 著者名 Toshihide Hamabe-Horiike, Kanji Kawasaki, Masataka Sakashita, Chihiro Ishizu, Tomokazu Yoshizaki, Shin-Ichi Harada, Keiko Ogawa-Ochiai, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Glial cell type-specific gene expression in the mouse cerebrum using the piggyBac system and in utero electroporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84210-z.	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 Hiroki Maeyama, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki	4. 巻 26
2. 論文標題 The expression of aristaless-related homeobox in neural progenitors of gyrencephalic carnivore ferrets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100970	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 Naofumi Ito, M Asrafuzzaman Riyadh, Shah Adil Ishtiyahq Ahmad, Satoko Hattori, Yonehiro Kanemura, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Yasuhide Furuta, Yohei Shinmyo et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of the proteoglycan Tsukushi causes hydrocephalus through altered neurogenesis in the subventricular zone in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Transl Med	6. 最初と最後の頁 7896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aay7896.	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Shinmyo Y and Kawasaki H
2. 発表標題 A positive feedback loop of FGF signaling induces astrocyte expansion and folding of the cerebral cortex in gyrencephalic animals
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinmyo Y, Saito K, Hamabe-Horiike T, Kameya N, Hattori T, Kannon T, Hosomichi K, Tajima A, Hori O and Kawasaki H
2. 発表標題 A positive feedback loop of FGF signaling induces astrocyte expansion and folding of the cerebral cortex in gyrencephalic animals
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022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
研究分担者	河崎 洋志 (Kawasaki Hiroshi) (50303904)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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		
ベルギー	VIB Center		