

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16849

研究課題名(和文) 高等哺乳動物を用いた胎児脳回形成異常に関与するシグナル経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of signaling pathways involved in fetal abnormal cortical folding using ferrets.

研究代表者

水口 敬司 (Mizuguchi, Keishi)

金沢大学・附属病院・臨床検査技師

研究者番号：40844345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに発達した脳を持つ哺乳動物フェレットを用いて脳回形成にFGFシグナルが重要であることを世界に先駆けて見出してきていた。そこで本研究ではフェレットとFGFを突破口として、高等哺乳動物に特徴的な大脳皮質の特性やその異常疾患病態の解明を行うこととした。FGF受容体の下流で活性化されるシグナルを検討するために、フェレット大脳皮質の切片を作成し、免疫組織染色およびin situ hybridization法を用いて解析した。FGFシグナルを活性化するとoRG神経前駆細胞やアストロサイトが著しく増加することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質は高次脳機能の中核であり、脳神経系のなかでも特に重要である。高等哺乳動物の大脳皮質は肥大化しており、また表面にはシワ(脳回)が存在するなど発達しており、高次脳機能の基盤となっている。我々の研究室では、発達した脳を持つ哺乳動物フェレットに着目して、フェレットの大脳皮質での遺伝子操作技術を子宮内電気穿孔法やゲノム編集技術を用いて独自に確立してきた。これらの技術的優位性を生かして、脳回形成にFGFシグナルが重要であることを世界に先駆けて見出してきた。本研究の成果は脳回形成に重要なシグナルを明らかにしたものであり、さらにフェレットが発達した脳の研究に有用であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have uncovered that FGF signals are important for the formation of cortical folds using ferrets, which are carnivorous mammals with well-developed brains. In this study, we investigated the features of the cerebral cortex characteristic to higher mammals and pathophysiological mechanisms of brain diseases using ferrets and FGF signaling. Sections of the ferret cerebral cortex were prepared and analyzed using immunohistochemical staining and in situ hybridization. We found that oRG neural progenitor cells and astrocytes were markedly increased by the activation of FGF signaling.

研究分野：分子神経科学

キーワード：大脳皮質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳は高次脳機能の中核であり、脳神経系のなかでも特に重要である。ヒトに至る長い進化の歴史のなかで、脳神経系、特に大脳は大きく発達してきた。体積が大きくなり、さらに様々な発達した脳構築を獲得してきた。これらの脳構築は、高次脳機能の基盤となったと考えられている。

ヒトやサルなど高等哺乳動物の大脳皮質の表面には、脳回と脳溝から構成される皺が存在する。大脳皮質が脳回を獲得したことにより、頭蓋の限られた容積のなかで、より多くの神経細胞を持つことが可能となり、脳機能の発達が可能になったと考えられている[1]。また、脳回形成が障害された患者では強い脳機能障害をきたすことが知られている。従って、脳回形成機構およびその異常疾患病態の解明は神経科学の最重要研究課題の一つであるが、これまでその分子メカニズムはほとんど分かっていなかった。

これまで分かっていなかった理由として1) 現在、分子遺伝学的解析に用いられているマウスの大脳には脳回が存在せず、マウスを用いた脳回の解析が困難であること、2) 脳回を持つ高等哺乳動物に使用可能な遺伝子操作技術が整備されていなかったことが挙げられる。これらの問題点を解決するために、私が所属する金沢大学 医学系 河崎洋志教授の研究室では脳回を持つなど脳神経系が発達した食肉類哺乳動物フェレットに着目して、フェレット大脳での遺伝子操作技術を世界に先駆けて確立してきた[2-4]。フェレットは中型食肉類哺乳動物で、体長約 50cm、体重約 1-2kg、平均寿命は 6-8 年、ヨーロッパケナガイタチが家畜化したものと言われている。我々は、フェレットの大脳に遺伝子操作技術を導入できれば、発達した大脳を用いた遺伝子レベルでの脳研究の突破口となると考えた。マウスの遺伝子操作方法として広く用いられていた子宮内電気穿孔法をフェレットに応用することにより、フェレット大脳への遺伝子導入に成功し、さらにゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 と組み合わせることによりフェレット大脳での遺伝子ノックアウトに成功した[2-5]。これらの技術的優位性を活用して、これまでに線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナル、ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナル、転写因子 Tbr2 および大脳皮質表層の増加などが脳回形成に重要であることを報告してきた[4, 6-9]。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では研究室における技術的なアドバンテージを最大限に活用し、脳回形成の分子メカニズムを解析することとした。特に脳回形成に重要であることが判明した FGF シグナルを切り口として、その下流のシグナルを検討することとした。FGF 受容体は受容体型チロシンキナーゼに属することから、その下流では MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ/Akt 経路が活性化することが予想された。そこで、子宮内電気穿孔法を用いてフェレットの大脳に FGF を発現するプラスミドを導入した後に、組織切片を作成して、MAP キナーゼ活性化の指標となるリン酸化 MAP キナーゼ、PI3 キナーゼ/Akt 活性化の指標となるリン酸化 4E-BP1 を免疫組織染色法で検討することとした。さらに MAP キナーゼ経路活性化および PI3 キナーゼ/Akt 経路活性化により発現量が上昇する Sprouty や Gli1 の発現量を in situ hybridization で検討することとした。

また発生期の脳皮質には、脳室帯に存在する radial glia (RG)細胞、脳室下帯に存在する intermediate progenitor (IP)細胞、および外側脳室下帯に存在する outer radial glia (oRG)細胞とう 3 種類の神経前駆細胞が存在することが知られている。そこでそれぞれの細胞のマーカーである Pax6、Tbr2、HOPX、リン酸化ビメンチンを免疫組織染色法で同定することにより、MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ/Akt 経路の活性化により増加している神経前駆細胞の種類を同定することとした。

3. 研究の方法

(1)免疫組織染色法

4%パラホルムアルデヒド(PFA)で還流固定した大脳を OCT compound に包埋し、凍結した。クリオスタットを用いて厚さ 20-50 μ m の切片を作成し、浮遊切片もしくは付着切片を作成した。切片を 2%ウシ血清アルブミン/0.3% Triton X-100/PBS でブロッキングした後に、一次抗体を含むブロッキング液と 4 $^{\circ}$ Cで一晩反応させた。PBS で洗浄した後に、Cy3 や Alexa488 などの蛍光を標識した 2 次抗体および Hoechst 33342 と室温で 3 時間反応させた。PBS で洗浄した後にカバーガラスで包埋した。なおいくつかの抗体を用いる際には、あらかじめクエン酸バッファーと電子レンジを用いて抗原賦活化を行った。蛍光写真は蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡を用いて撮影を行った。

(2)In situ hybridization

作成した切片を 4%PFA で 10 分間固定したのちに、proteinase K で 10 分間タンパク分解処理を行い、0.25%無水酢酸で 10 分間処理した。ハイブリダイゼーション液になじませた後に、ジゴキシゲニン標識 RNA プローブを含むハイブリダイゼーション液で一晩処理した。そのあとで SSC を用いて洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と反応させた後に NBT/BCIP で発色した。

(3) ウェスタンブロット

脳組織を取り出し、サンプル処理液で処理した。SDS-PAGE で電気泳動した後に、PVDF 膜へと転写した。ブロッキングをした後に 1 次抗体を含んだブロッキング液で一晩反応させた。TBS で洗浄した後に、2 次抗体を含んだブロッキング液と反応させた。TBS で洗浄した後で、ECL Plus キットで発色し、写真撮影を行った。

(4) RT-PCR

QIAGEN のキットを用いて脳組織より RNA を抽出した後に、DNase I でゲノム DNA を除去した。Superscript III で逆転写を行い cDNA を作成したのちに、この cDNA をテンプレートとして各遺伝子特異的なプライマーを用いて PCR を行った。アガロース電気泳動を行い、PCR 産物を検討した。

(5) 子宮内電気穿孔法

プラスミドは過去の論文で用いた pCAG-EGFP および pCAG-FGF8 を用いた[8]。プラスミドは Endofree Plasmid Maxi Kit を用いて精製し、5 mg/ml に調整したものをを用いた。適切な最終濃度になるようにプラスミドを混ぜた後に 0.5% Fast Green を添加してプラスミド液に色を付けた。ガラス針を用いて側脳室にプラスミド液を注入した後に、100 V, 10 ms の矩形波を 5 回与えることにより遺伝子導入を行った。矩形波を与えるときには PBS を多く滴下することにより乾燥を防いだ。数日後に 4%PFA で還流固定を行った後に、上述の方法で脳を中心に関免疫組織学的解析を行った。

4. 研究成果

脳回形成期のフェレット脳において子宮内電気穿孔法でプラスミドを導入し、FGF シグナルを活性化させた。MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ/Akt 経路が活性化しているかを免疫組織染色およびウェスタンブロット、RT-PCR などで検討した。フェレット脳の組織切片を作成し、免疫組織染色を用いて解析した結果、リン酸化 MAP キナーゼのシグナルおよびリン酸化 4E-BP1 のシグナルが亢進していることを見いだした。さらに Sprouty や Gli1 の発現も亢進していた。この結果は MAP キナーゼ経路および PI3 キナーゼ/Akt 経路が活性化していることを示唆している。

Pax6、Tbr2 や HOPX、リン酸化ビメンチンなどの発現を免疫組織染色で検討し FGF シグナルの活性化により増加している細胞を解析したところ、脳が発達した高等哺乳動物に特徴的とされる oRG 細胞が著しく増加していることを見いだした。おもしろいことに GFAP 陽性細胞も増加していたことから、アストロサイトも増加していることが示唆された。この結果は、脳回形成に oRG 細胞やアストロサイトも関与している可能性を提起している。

<引用文献>

1. Sun, T. and R.F. Hevner, Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2014, **15**, 217-232.
2. Kawasaki, H., L. Iwai, and K. Tanno, Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. **Mol. Brain**, 2012, **5**, 24.
3. Kawasaki, H., T. Toda, and K. Tanno, *In vivo* genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. **Biol. Open**, 2013, **2**, 95-100.
4. Shinmyo, Y., et al., Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. **Cell Rep.**, 2017, **20**, 2131-2143.
5. Shinmyo, Y., et al., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. **Sci. Rep.**, 2016, **6**, 20611.
6. Matsumoto, N., et al., Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. **eLife**, 2017, **6**, e29285.
7. Toda, T., et al., An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals. **Sci. Rep.**, 2016, **6**, 29578.
8. Masuda, K., et al., Pathophysiological analyses of cortical malformation using

gyrencephalic mammals. **Sci. Rep.**, 2015, **5**, 15370.

9. Kalebic, N., et al., Neocortical expansion due to increased proliferation of basal progenitors is linked to changes in their morphology. **Cell Stem Cell**, 2019, **24**, 535-550.

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaneda Misako, Yagi-Nakanishi Sayaka, Ozaki Fumi, Kondo Satoru, Mizuguchi Keishi, Kawano Mitsuhiro, Malissen Marie, Malissen Bernard, Yamada Kazunori, Yoshizaki Tomokazu	4. 巻 49
2. 論文標題 Olfactory dysfunction in LATY136F knock-in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 209 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2021.07.009	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 Morita K., Matsumoto N., Saito K., Hamabe-Horiike T., Mizuguchi K., Shinmyo Y. and Kawasaki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 BMP signaling alters aquaporin-4 expression in the mouse cerebral cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10540
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-89997-5	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 Zoshima T, Suzuki K, Suzuki F., Hara S., Mizuguchi K., Ito K., Mizushima I., Fujii H., Nomura H., Kawano M.	4. 巻 24
2. 論文標題 ANCA-associated nephritis without crescent formation has atypical clinicopathological features: a multicenter retrospective study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 999-1006
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-020-01925-5.	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 Miyanaga T., Mizuguchi K., Hara S., Zoshima T., Inoue D., Nishioka R., Mizushima I., Ito K., Fuji H., Yamada K., Sato Y., Yanagita M., Kawano M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Tertiary lymphoid tissue in early stage IgG4-related tubulointerstitial nephritis incidentally detected with a tumor lesion of the ureteropelvic junction: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Nephrology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-021-02240-1.	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 Waseda Y., Yamada K., Mizuguchi K., Ito K., Watanabe S., Zuka M., Ishizuka T., Malissen M., Malissen B., Kawano M., Matsui S.	4. 巻 16
2. 論文標題 The pronounced lung lesions developing in LATY136F knock-in mice mimic human IgG4- related lung disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247173.	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 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 酒野香織、水口敬司、嶋口智恵、下田翼、藤田一希、森龍也、林万葉、岡室茉理恵、伊藤歩美、垣内寿枝子、阪口真希、吉村かおり、中田聡子、池田博子
2. 発表標題 当院における呼吸器領域のROSEの現状
3. 学会等名 第39回石川県臨床細胞学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水口敬司、齋藤健吾、堀池俊秀、亀谷匠郁、新明洋平、池田博子、中田光俊、河崎洋志
2. 発表標題 高等哺乳動物を用いた新規膠芽腫モデル
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森龍也、水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、下田翼、藤田一希、林万葉、岡室茉理恵、中田聡子、吉村かおり、阪口真希、野島孝之、池田博子
2. 発表標題 細胞診材料の固定条件におけるDNA品質の検討
3. 学会等名 第38回石川県臨床細胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下田翼、水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、森龍也、中田聡子、野島孝之、池田博子
2. 発表標題 尿細胞診におけるフラクタル解析の有用性
3. 学会等名 尿細胞診におけるフラクタル解析の有用性
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下田翼、水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、藤田一希、森龍也、阪口真希、吉村かおり、中田聡子、池田博子
2. 発表標題 尿細胞診におけるフラクタル解析の有用性
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森龍也、水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、下田翼、藤田一希、阪口真希、吉村かおり、中田聡子、池田博子
2. 発表標題 胸水細胞診材料で転移を推定し得た尿路上皮癌の1例
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、下田翼、森龍也、阪口真希、吉村かおり、中田聡子、野島孝之、原田憲一、池田博子
2. 発表標題 膵胆管領域のIgG4関連疾患における細胞診の可能性~膵病変を中心に~
3. 学会等名 第60回日本臨床細胞学会秋期大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水口敬司、嶋口智恵、酒野香織、下田翼、森龍也、阪口真希、吉村かおり、中田聡子、野島孝之、原田憲一、池田博子
2. 発表標題 胆管狭窄における炎症性疾患の細胞像-細胞診による鑑別診断の可能性-
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会秋期大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中愛衣、水口敬司、酒野香織、嶋口智恵、下田翼、浅村倫孝、藤田一希、玉野裕子、阪口真希、中田聡子、横山理菜、吉村かおり、野島孝之、池田博子
2. 発表標題 尿中に出現した腎ラブドイド腫瘍の1例
3. 学会等名 第36回石川県臨床細胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 嶋口智恵、水口敬司、田中愛衣、浅村倫孝、藤田一希、下田翼、酒野香織、玉野裕子、中田聡子、横山理菜、吉村かおり、阪口真希、野島孝之、池田博子
2. 発表標題 当院における尿細胞診疑陽性症例の検討-泌尿器科細胞診報告様式2015とthe paris systemとの比較-
3. 学会等名 第36回石川県臨床細胞学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 下田 翼、水口敬司、嶋口智恵、玉野裕子、酒野香織、田中愛衣、阪口真希、中田聡子、野島孝之、池田博子
2. 発表標題 胸水細胞診でCLL/SLLと肺腺癌の合併を診断しえた一例
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会総会(春期大会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 酒野香織, 水口敬司, 嶋口智恵, 下田 翼, 田中愛衣, 阪口真希, 中田聡子, 野島孝之, 池田博子
2. 発表標題 セルブロックが診断に有用であった膀胱原発形質細胞腫の1例
3. 学会等名 第59回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

河崎研究室 http://square.umin.ac.jp/top/kawasaki-lab/
--

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
---------	---------