

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成 25年 5月 23日現在

機関番号 : 12501

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2011~2012

課題番号 : 23700410

研究課題名(和文) 脳の形態形成と神経回路形成におけるFGFシグナルの役割

研究課題名(英文) The role of FGF signal in brain development

研究代表者

佐藤 達也(SATO TATSUYA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号 : 00568222

研究成果の概要(和文) : マウスElectroporation法と最新のTet-Onのシステムを組み合わせることにより、大脳皮質の錐体細胞などの様々な神経細胞において、発生後期や成体の任意の時期に遺伝子発現を制御することに成功した。また、Fgf8発現細胞の系譜の解析を行ったところ、Fgf8発現細胞は小脳へと分化し、早い発生段階で標識すればするほど、より後方部/側方部の広い範囲にわたって小脳が標識されることがわかった。

研究成果の概要(英文) : It was shown that the combination of *in vivo* electroporation and the newest version of the tetracycline (Tet)-controlled gene regulatory (Tet-On) system efficiently can induce gene expression in various types of neurons such as cerebral pyramidal neurons in mouse embryonic and postnatal tissues. Fate map analysis showed that the *Fgf8*-expressing cells differentiate into the cerebellum. The marked cells are detected in more posterior and lateral part of the cerebellum when the *Fgf8*-expressing cells are marked in earlier developmental stage.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野 : 神経解剖学

科研費の分科・細目 : 脳神経科学、神経解剖学・神経病理学

キーワード : 神経発生、形態形成、神経回路形成

1. 研究開始当初の背景

複雑な形態をもつ視蓋と小脳は、比較的単純な構造をした神経管の一部である中脳胞と後脳胞からそれぞれ分化する。研究代表者は、*Fgf8*の「シグナルの強弱」と「シグナルの持続時間」がこの領域の形態形成の鍵であることを明らかにしてきた。

中脳と後脳の境界部では、*Fgf8*のアイソフォームのうち、*Fgf8a*と*Fgf8b*が発現していることを見出した。これらはalternative splicingにより生じる。*Fgf8a*をエレクトロポレーション法を用いてニワトリ胚で強制発現させると、視蓋が肥大化するのに対し、

*Fgf8b*を強制発現させると、中脳胞背側はその発生運命を変えて小脳になった(図1)。また、強制発現させる*Fgf8b*の量を低下させると、*Fgf8a*の強制発現と同一の表現型を示した。つまり、*Fgf8a*と*Fgf8b*の違いは「シグナルの強弱」の違いに帰着し、「シグナルの強弱」が視蓋と小脳という全く異なる形態の組織を制御していることが初めて明らかとなった(Sato et al., 2001)。

次に、研究代表者は、*Fgf8*コンディショナルノックアウトマウス(*Fgf8* flox)とCreERシステムを用い、*Fgf8*の機能を様々な発生段階において欠損させる実験を行った。すると、*Fgf8*を遅い時期に機能欠損すればするほど、中脳後脳境界部に近い領域だけが欠損した。境界部に近い領域ほどその分化には長い時間の*Fgf8*シグナルが必要であると考えられた(図2, Sato & Joyner, 2009)。

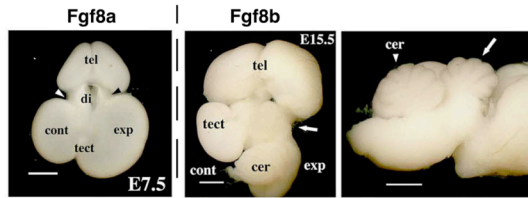


図1 *Fgf8a*または*Fgf8b*を強制発現させたときの形態変化。右側(exp側)に*Fgf8a*または*b*を強制発現させた。白矢印は、異所的な小脳を示す。tel:終脳、di:間脳、tect:視蓋、cer:小脳

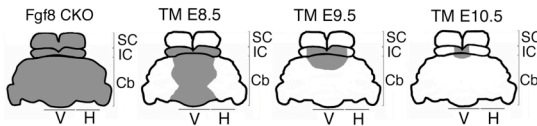


図2 *Fgf8*を様々な発生段階で機能欠損したときの生後21日(P21)での形態変化。灰色は欠損した領域を示す。TM E8.5, TM E9.5, TM E10.5はタモキシフェンを8.5日胚、9.5日胚、10.5日胚に与えたことを意味する。*Fgf8* CKOは、*Fgf8*を中脳後脳境界部特異的に はじめから欠損させた場合で、中脳/小脳の組織全てが欠損する(Chi et al., 2003)。SC:上丘、IC:下丘、Cb:小脳、V:小脳虫部、H:小脳半球

2. 研究の目的

以上のように、脳の形態形成において*Fgf8*が鍵となっている分子であることがわかってきた。しかし、*Fgf8*を発現する細胞の系譜や、*Fgf8a*と*Fgf8b*の*in vivo*での使い分けの意味はわかっていない。また、*Fgf8*は発生後期や成体でも発現しており、何らかの機能を果たしていると考えられる。そこで、本研究では、*Fgf8*を発現する細胞の系譜や*Fgf8*アイソフォームの存在意義を明らかにするとともに、発生後期や成体において遺伝子発現を制御する新しい実験系を構築して*Fgf8*の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Fgf8*発現細胞の発生運命を明らかにするため、*Fgf8*-CreERノックインマウスとR26Rリポーターマウスを用いて、胎生8.5日(E8.5)からE12.5まで一日おきの異なった時期に薬剤タモキシフェンを与え、*Fgf8*発現細胞を標識する。

(2) *Fgf8a*と*Fgf8b*の存在意義を調べるため、*Fgf8a*もしくは*Fgf8b* cDNAを*Fgf8*遺伝子座にノックインし、*Fgf8a*または*Fgf8b*だけを発現

するマウスを作製してその表現型を解析する。

(3) マウスの*in vivo* electroporation法と、Tet-Onのシステムを組み合わせ、発生後期や成体の任意の時期において遺伝子発現を操作することができる新しい手法を開発する。さらにこの手法を用いて、*Fgf8*シグナルなどの脳形成に関わる因子の強制発現実験を行って、大脳皮質神経細胞の形態が変化するかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1) *Fgf8*-CreERノックインマウスとR26Rリポーターマウスを用いて、胎生8.5日(E8.5)からE12.5まで一日おきの異なった時期に薬剤タモキシフェンを与え、*Fgf8*発現細胞を標識した。すると、*Fgf8*発現細胞は小脳へ分化することが明らかとなった。早い発生段階で標識すればするほど、より後方部・側方部の広い範囲にわたって小脳が標識された。この結果は、より前方部・正中部の領域ほどその分化には長い時間の*Fgf8*シグナルが必要であるというloss of functionの結果に符号する。各種マーカーを用いた解析により、*Fgf8*発現細胞は、小脳を構成する多様な細胞種に分化することがわかった。現在、この結果に関して論文を執筆中である。

(2) *Fgf8a*もしくは*Fgf8b* cDNAを*Fgf8*遺伝子座にノックインしたマウスを用いて、*Fgf8a*または*b*のアイソフォームだけを発現させたところ、どちらの場合も中脳および小脳が欠損することを組織学的に確認した。*Fgf8*および中脳・後脳で発現する遺伝子の*Engrailed1*と*Engrailed2*の発現をwhole mount in situ hybridization法で調べたところ、これらの遺伝子発現は正常に開始するが、維持されず、通常よりはやく消失することがわかった。また、*Fgf8a*または*Fgf8b*のヘテロマウスの中脳/小脳の形態は、正常胚のそれと変わらなかった。ホモ変異マウス、ダブルヘテロ変異マウスの表現型を解析しようとしたが、遺伝子型を決定するためのPCRがうまく機能せず、解析ができなかった。現在、PCRの条件の改善を試みている。

(3) マウスの*in vivo* electroporation法と、Tet-Onのシステムを組み合わせることにより、大脳皮質錐体細胞や、小脳にプルキンエ細胞、脊髄神経細胞において、発生後期や成体の任意の時期に遺伝子発現を制御することに成功した。この結果は、国際誌であるJournal of Neuroscience Methodsに掲載された。以下に研究成果を詳しく報告する。

はじめに、pCAG-rtTA、pTRE-mCherry、pCAG-EYFPの3種のプラスミドを混合したDNA

溶液を胎生14.5日 (E14.5) のマウス胚の脳室に注入し、*in vivo* electroporation法によって大脳皮質に遺伝子を導入した。rtTAはCAGによって恒常的に発現し、薬剤ドキシサイクリンと結合すると、核内へ移行しDNAのTRE配列に結合してその下流遺伝子*mCherry*の発現が誘導される(図3)。ドキシサイクリンが存在しないときには、TRE配列に結合せず、*mCherry*の発現が誘導されない。pCAG-EYFPを混合して、EYFPの発現を指標に遺伝子の導入効率を確認した。rtTAとTREは、最新のものをを用いた(Clontech, #631165)。

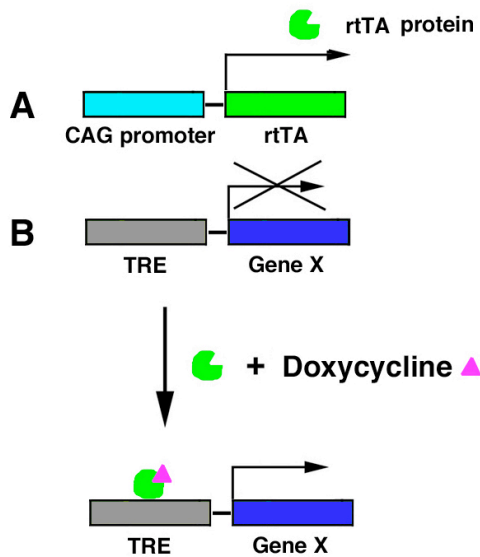


図3

E14.5で遺伝子導入を行った後、生後14日 (P14) の時にドキシサイクリンを腹腔内投与した。マウス体重30gあたり10、100、1000 μ gのドキシサイクリンを投与した。24時間後 (P15) に脳を摘出し、切片を作製して*mCherry*の発現を調べた。すると、*mCherry*が大脳皮質錐体細胞で誘導されていた(図4B-B'', C-C'', D-D'')。ドキシサイクリンを与えなかった時には、*mCherry*の発現が見られなかった(図4A-A'')。 *mCherry*陽性細胞の数ならびに*mCherry*の蛍光輝度は、ドキシサイクリンの投与量に依存していた。次に、ドキシサイクリンを投与してから2週間後 (P28) と4週間後 (P42) の*mCherry*の発現を調べた。すると、2週間後では蛍光輝度は弱くなってはいたがまだ発現がみられた(図4E-E'')。4週間後では、かなり発現が弱かった(図4F-F'')。 *mCherry*のmRNAの発現を調べてみると、2週間後と4週間後ともに*mCherry*のmRNAが検出されなかった(data not shown)。 *mCherry*のタンパク質は、神経細胞においてかなり安定であることが示唆された。

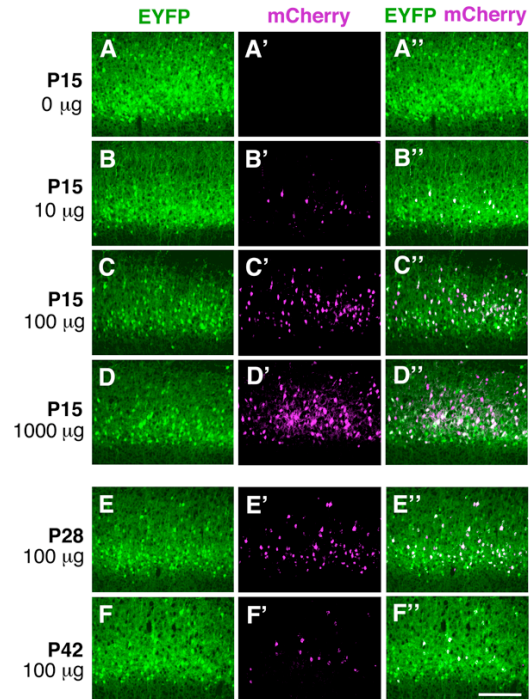


図4 大脳皮質錐体細胞におけるドキシサイクリンに依存した遺伝子発現の誘導。ドキシサイクリン投与してから1日後 (P15)、14日後 (P28)、28日後 (P42) の大脳皮質。ドキシサイクリンの投与量はマウス体重30gあたり、A-A'' : 0 μ g、B-B'' : 10 μ g、C-C'' : 100 μ g、D-D'' : 1000 μ g、E-E'' : 100 μ g、F-F'' : 100 μ g。スケールバー: 200 μ m。

次に、胎仔の時期でもTet-Onによる遺伝子発現誘導システムが働くかどうかを調べた(図5)。E14.5の大脳皮質に遺伝子を導入し、3日後のE17.5でドキシサイクリンを母親マウスに投与した。24時間後 (E18.5) において*mCherry*の発現を調べた。ドキシサイクリンを投与したときには、効率よく*mCherry*の発現が誘導された(図5D-F)。ドキシサイクリンを投与しなかったときには、*mCherry*が全く誘導されなかった(図5A-C)。よって、生後だけではなく胎仔の時期でもこのシステムがうまく機能することがわかった。

他の神経細胞でもTet-Onによる遺伝子発現誘導システムが機能するかどうかを調べた(図6)。E11.5の小脳原基に対して遺伝子導入し、P4でドキシサイクリンを投与した。5日後 (P9) に切片を作製してみると、小脳のプルキンエ細胞において*mCherry*の発現が誘導されていた。3日後 (P7) および10日後 (P14) においても同様に*mCherry*の発現が誘導された。ドキシサイクリンを投与しないときには、*mCherry*が全く誘導されなかった。脊髄神経細胞でもこのシステムがうまく機能するこ

とを確認した。

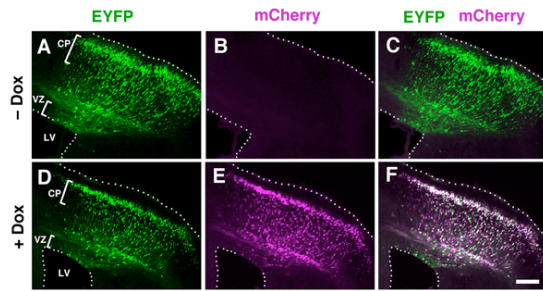


図5 胎仔期の脳皮質におけるドキシサイクリン依存的な遺伝子発現の誘導。ドキシサイクリンをE17.5において投与し、24時間後(E18.5)でmCherryの発現を調べた。(A-C)ドキシサイクリン非投与。(D-F)ドキシサイクリン投与。CP: cortical plate、VZ: ventriculata zone、LV: lateral ventricle。スケールバー: 200 μm。

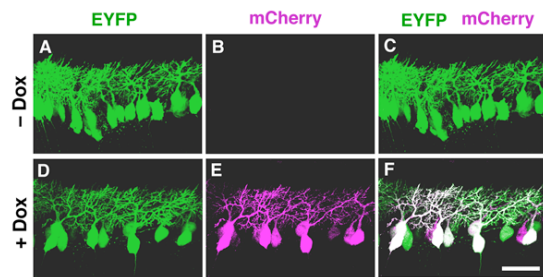


図6 小脳プルキンエ細胞におけるドキシサイクリン依存的な遺伝子発現の誘導。P4でドキシサイクリンを投与し、5日後(P9)でmCherryの発現を調べた。(A-C)ドキシサイクリン非投与。(D-F)ドキシサイクリン投与。スケールバー: 50 μm。

ホメオボックス遺伝子の*Mbh1*は胎生期の脊髄交連神経細胞で発現し、その運命を制御することが知られている。*In vivo* electroporation法によって、*Mbh1*をCAGを使って脊髄背側において強制発現させると、脊髄背側の細胞は交連神経へと分化転換する。Tet-Onによる遺伝子誘導システムでも、同様の結果が得られるかどうかを検証した。pCAG-rtTA、pTRE-Mbh1、pTRE-EYFPの3種のプラスミドを混合し、E11.4(9 a.m.)に*in vivo* electroporation法により遺伝子導入を行った。E11.7(5 p.m.)にドキシサイクリンを投与した。すると、E13.4(9 a.m.)において、CAGを使って*Mbh1*を強制発現させた場合と同様に、EYFP陽性の交連繊維が多数観察された(図7B)。これに対し、pCAG-rtTAとpTRE-EYFPの2種のプラスミドだけをトランスフェクト

した場合には、EYFP陽性の交連繊維はみられなかった(図7A)。Tet-Onと*in vivo* electroporation法を組み合わせた遺伝子発現誘導システムは、特定の発生段階において目的遺伝子の機能を解析するのに、非常に有効であると考えられる。現在、このシステムを用いて*Fgf*の発生後期における役割を解析中である。

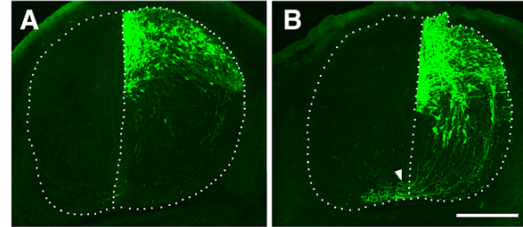


図7 脊髄におけるドキシサイクリン依存的な*Mbh1*の強制発現。(A)pCAG-rtTAおよびpTRE-EYFPをトランスフェクトしたE13.4の脊髄。(B)pCAG-rtTA、pTRE-EYFPおよびpTRE-Mbh1をトランスフェクトしたE13.4の脊髄。矢頭は底板を示す。スケールバー: 200 μm。

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)

Sato, T., Muroyama, Y. and Saito, T. Inducible gene expression in postmitotic neurons by an *in vivo* electroporation-based tetracycline system. *Journal of Neuroscience Methods* 214, 170-176, 2013
DOI : 10.1016/j.jneumeth.2013.01.014
査読あり

[学会発表] (計2件)

1. Muroyama, Y., Sato, T. and Saito, T. Nepro is required for the maintenance of neural progenitor cells in the early neocortex. *Neocortical Organization, 1st International Symposium/59th NIBB Conference*, 2012年3月12日
岡崎カンファレンスセンター、岡崎

2. Sato, T., Muroyama, Y. and Saito, T. Functional analysis of Nepro, a gene required for the maintenance of neocortex neural progenitor cells.

第34回日本神経科学大会、2011年9月16日
パシフィコ横浜、横浜

6. 研究組織

研究代表者

佐藤 達也 (SATO TATSUYA)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：00568222