

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640028

研究課題名(和文)ゲノム置換による大脳皮質形成機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism of the cerebral cortical formation by genome replacement

研究代表者

岡戸 晴生 (OKADO, Haruo)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：60221842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RP58遺伝子を含んだヒトBacクローン(204 kbp)のトランスジェニックマウスを5系統作製した。RP58のヘテロマウスと交配して、マウスのRP58を欠落させ、ヒトRP58遺伝子と置換することを試みた。5系統作製したが、どの系統もマウスRP58を欠損させると、出生後、発育が困難であった。そこで、大脳皮質でのみRP58を欠落させるためにEmxCre、RP58Floxマウスと交配させた。現在、すべての系統でヒトRP58を保有し、マウスRP58を欠損した大脳皮質を持ったマウスを作製した。現在行動解析を開始しており、その後組織学的解析を予定している。

研究成果の概要(英文)：We generated the transgenic mice with human Bac clone containing RP58 gene (204 kbps). By mating them with RP58 hetero mice, we generated the mice with human Bac of RP58 gene lacking mouse RP58. These mice show severe motor uncontrolled, suggesting that the function of cerebellum is impaired. Therefore, we tried to generate the mice lacking mouse RP58 only in cerebral cortex with RP58 flox mice and EmxCre mice. We generated the five strains of mice with RP58 negative, but human RP58 positive in the cerebral cortex. We are analyzing behavior of the mice, and plan to perform histological analysis.

研究分野：神経生物

キーワード：脳形成 RP58 大脳皮質 OSVZ ゲノム置換

### 1. 研究開始当初の背景

霊長類を含む高等ほ乳類では、大脳皮質におけるニューロン数が飛躍的に増加している。このニューロン数の増大が、高等ほ乳類の知能の向上をもたらすことが示唆されている (Roth & Dicke, 2005)。しかし、実験的な検証はない。そこで、本研究では、マウス大脳新皮質のニューロン数を増加させ、それによって、学習記憶を含む脳機能の変化を明らかにすることで、大脳皮質ニューロン数が脳機能を規定しているか否かを明らかにすることを目的とする。

マウスでは、新皮質には、脳室帯と脳室下帯という2つの増殖層が同定されている。近年、霊長類を含む高等ほ乳類では、さらに第3の増殖層として、外側脳室下帯(OSVZ)が発見された。

われわれは、転写抑制因子 RP58 の欠損マウスの解析で、通常マウスではみられない OSVZ を発見した。これまでの研究から、RP58 は Id1-4 の転写を抑制することによって、細胞周期離脱を促進する事 (Hirai et al., 2012) から、RP58 欠損により細胞周期から離脱できず結果的に増殖層を形成したと考えた (図1)。

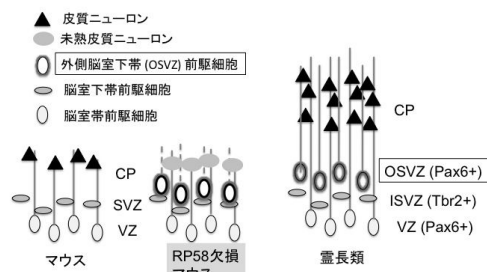


図1 RP58欠損マウスで霊長類のOSVZ(外側脳室下帯)様構造がみられる。CP: 皮質板、SVZ: 脳室下帯、OSVZ: 外側脳室下帯、ISVZ: 内側脳室下帯、VZ: 脳室帯

ところで、RP58 は、放射状移動にも必須である (Ohtaka-Maruyama et al., 2013, Heng et al., 2015)。従って、RP58 欠損により形成下 OSVZ において増殖したニューロンは、放射状に移動することができない。そこで適切なタイミングで RP58 の補充を試みる。これまで、子宮内エレクトロポレーションにより適切な時期に RP58 を補充すると、OSVZ 様構造を形成していた細胞が、放射状移動により脳表に到達することを見出した。これは、RP58 の発現を調節することにより、ニューロン数を増加させることができることを示唆している。しかし、子宮内エレクトロポレーションでは、脳の一部分で RP58 を補充するために、個体としての高次機能への関与は解析できない。そこで、本研究では、いくつかの方法を試み、大脳皮質全般でニューロン数を増加させることを試みる。成功したマウスは、行動解析を行い、学習記憶能その他の能

力が向上するか否か検討する。もしニューロン数の増加によって、学習記憶の成績が亢進することがあれば、「大脳皮質のニューロン数増加が高次機能を向上させる」という仮説を実証できることになる。

### 2. 研究の目的

本研究は、マウス脳を霊長類型脳に変換する試みを通して、脳の進化メカニズム解明の糸口を得る試みである。霊長類での高次機能の担い手は、大脳新皮質の飛躍的なニューロン数の増加であると推察されるが、実証はされていない。申請者らは転写抑制因子 RP58 の欠損により、マウス新皮質において、霊長類で特徴的な、細胞増殖層(OSVZ)が見出した。RP58 の欠損は、細胞周期離脱を遅延させることから、「細胞周期離脱を抑制することが、神経前駆細胞の著明な増加を惹起する」という仮説をたて検証する。さらに、脳機能を解析することにより、「大脳皮質ニューロン数の増加が、脳機能向上をもたらす」という仮説を検証する。

### 3. 研究の方法

RP58 の発現を抑制し、OSVZ 構造を形成させ、ニューロン分化後に RP58 の発現を再開させる。そのために、RP58 の遺伝子改変マウスを作製し、RP58 の発現を操作することで、皮質のニューロン数を飛躍的に増加させる。そのマウスの行動解析をすることにより、大脳皮質のニューロン数と脳機能の関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

ヒトの RP58 遺伝子を含んだ Bac クローン (11-1061117, chr1, 244058541-24426944, 204404bp, 1q44) を入手し、当研究所では B6 マウスで、および大阪大学微生物研究所では BDF1 マウス (B6xDBA) での作製を依頼し、トランスジェニックマウスを作製した。後者から得られたキメラマウス 6 匹 (# 2, 6, 10, 12, 17, 24) を B6 と交配し、# 24 を除く 5 系統を確立した。# 24 に関しては、交配を数回くりかへても子孫に伝わらず、キメラ率が低いと考え断念した。

5 系統各々、RP58 ヘテロマウス (RP58+/-) と交配を繰り返し、ヒト RP58 ゲノムを保有し、かつマウス RP58 を欠落したマウスの作製を試みた。しかし、そのタイプのマウスは、出生しても早期に死亡した。マウス RP58 欠損マウスが出生直後に呼吸不全で死亡することに比べると、数日は生きているものもあり、ヒト RP58 が機能していることは確かである。しかし、その発現は不十分であると考えられた。とくに小脳症状が強く、母乳やえさの獲得が困難と考えられた。また、ヒト RP58 の発現が不十分であることの原因として、トランスジェニックマウスの作製における、Bac クローンのゲノム挿入部位、また挿入のされ方に問題がある可能性もある。

しかし、5系統あるので、すべてが挿入位置や挿入のされ方の問題ではなく、ヒト RP58 遺伝子の発現制領域の特性の可能性も否定できない。そこで、これらの問題を解決するために、マウスの RP58 の欠落を大脳皮質に限定させる必要が生じた。

そこで、RP50Flox マウスと EmxCre マウスと交配することにより、大脳皮質でのみマウス RP58 が欠損し、ヒト RP58 を保有したマウスを作製することにした。大脳皮質で RP58 を欠落させたマウスは、大脳皮質形成のみ障害され、出生後離乳期間に死亡することも多い。そこで、えさを食べやすくする工夫をすることにより、成体まで育てることに成功した。このマウスの特性を調べるため、行動解析を行った。その結果、オープンフィールドテストでは、顕著な多動を示すことが判明した。図2の軌跡の図の上段はコントロールで、2時間で充分馴化するが、下段の RP58 を大脳皮質で欠損させた場合は、いつまでも馴化

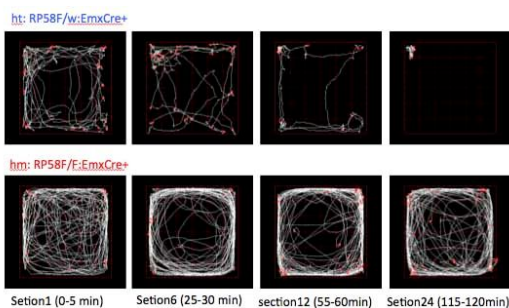


図2 オープンフィールドテストの軌跡

せず、多動も顕著である。そして、交配を繰り返し、すべての系統に関して、このマウスにヒト Bac クロンを保有したマウスを作製することに成功した。現在、一部、成体になったマウスが得られてきているので、今後行動解析を開始した。ヒト RP58 が導入されたマウスの、作業記憶、文脈記憶などを測定する。さらに、灌流固定して、大脳皮質の組織学的解析を行なう予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Heng JI, Qu Z, Ohtaka-Maruyama C, Okado H, Kasai M, Castro D, Guillemot F, Tan SS. (2015) (査読あり)

The Zinc Finger Transcription Factor RP58 Negatively Regulates Rnd2 for the Control of Neuronal Migration During Cerebral Cortical Development. *Cereb Cortex*. 25:806-16.

DOI: 10.1093/cercor/bht227.

DOI: 10.1093/cercor/bht227.

Maruyama-Ohtaka C., Okado H. (2015) (査読あり) Molecular pathway underlying projection neuron protection and migration during cerebral cortical development

Front Neurosci 2015, 9, 447.  
Doi: 10.3389/fnins.2015.00447

〔学会発表〕(計5件)

岡戸晴生 組織分化の複雑化にともな  
って発達した POK ファミリー分子群 第38  
回日本分子生物学会(神戸国際会議場、兵庫  
県神戸市)2015年、12月3  
日 ワークショップ

平井 志伸, 神寄 誠司, 岡戸 晴生  
大脳皮質の発生には RP58 による適切な転写  
抑制を必要とする 第38回日本分子生物  
学会(神戸国際会議場、兵庫県神戸市)2015  
年、12月3日 ワークショップ

Kanzaki Seiji, Hirai-Sakamoto Shinobu,  
Hirai Sayaka, Shinbo Hiroko,  
Okado Haruo  
Functional Analysis of Mutated  
RP58/ZNF238 Observed in Patients with  
Intellectual Disability 第38回日本神経  
科学学会(神戸国際会議場、兵庫県神戸市)  
2015年、7月29日

丸山千秋、岡本麻友美、岡戸晴生、宮田  
卓樹、前田信明 発生期サブプレートニュー  
ロンの神経活動は新生ニューロンの放射状  
移動に重要な役割をしている 第17回日  
本生物科学大会(パシフィコ横浜、神奈川県  
横浜市)2014年11月25日

Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Okado H,  
Maeda N, The subplate layer plays critical  
roles in the radial neuronal migration in  
the developing mouse neocortex 第37回  
日本神経科学大会(パシフィコ横浜、神奈川  
県横浜市横浜)2014年 9月12日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.igakuken.or.jp/differentiation/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡戸晴生 (OKADO, Haruo)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー  
研究者番号：60221842

(2)研究分担者

平井志伸 (HIRAI, Shinobu)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：00625189

平井清華 (HIRAI, Sayaka)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：80606434

(3)連携研究者

なし