

平成 30 年 4 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06822

研究課題名(和文) 大脳皮質と視床との相互関連機構の解明

研究課題名(英文) Developmental interaction between the thalamus and the cerebral cortex

研究代表者

蛭子 はるか (Ebisu, Haruka)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：40780226

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)：我々はマウスの視床を用いて神経核パターン形成メカニズムを明らかにした。Foxp2 (R552H) ノックインマウスを用いた解析の結果、Foxp2は後方の視床分化に必要なことがわかった。子宮内電気穿孔法を用いて視床特異的にFoxp2機能喪失実験を行ったところ、Foxp2は視床自律的に重要であることがわかった。軸索トレーサーを注入した結果、視床皮質投射もFoxp2によって制御されていることが明らかとなった。これらの結果は、Foxp2が視床核パターン形成の重要な遺伝子であることを意味している。

研究成果の概要(英文)：We uncovered the mechanism underlying pattern formation of the mouse thalamus. Our analysis using Foxp2 (R552H) knock-in mice revealed that Foxp2 is necessary for posterior thalamic differentiation. Thalamus-specific loss-of-function studies using in utero electroporation showed that Foxp2 is important thalamus-autonomously. Injection of neuronal tracers revealed that the thalamocortical projection was also controlled by Foxp2. These results indicate that Foxp2 is an important regulator for pattern formation of the thalamus.

研究分野：脳神経科学

キーワード：視床

1. 研究開始当初の背景

高次脳機能の基盤である脳神経構築の形成制御メカニズムの解明は、神経科学分野における最重要課題の1つである。脳神経系の構築には、大脳皮質に代表される「層構造」と大脳深部に存在する「神経核構造」の2つがあり、脳神経系の形成メカニズムの統合的理解には、この両者の理解が必須である。

従来、「層構造」の形成過程については神経細胞の移動様式や細胞の運命決定機構など、多くの分子制御メカニズムが明らかにされてきた(Bielas et.al, 2004; Molyneux et.al, 2007)。一方、「神経核構造」の形成過程については、各視床亜核を構成する細胞の birth-date の報告や、shh、FGF8 などの分泌性因子の重要性が報告されているが(Altman et al., 1988; Vue et al., 2009; Szabo et al., 2009; Kataoka et al., 2008)、実際に視床の内部で多様な視床亜核の形成を制御する分子メカニズムはあまりわかっていなかった。そこで私はマウス視床を用いて神経核構造の形成メカニズムを解明することを目標とした。

2. 研究の目的

視床は脳の深部の間脳に存在する神経核群で、感覚情報の主要な中継核である。視床は感覚情報処理に極めて重要であり、その構造的基盤として視床の内部に存在する視床亜核群(VB核、LGN核など)が知られている。視床亜核群の形成には2段階あると考えられる。まず第1には各々の視床亜核群の個性が決定される視床パターン形成、第2には個性決定とともに生じる3次元的な核構造の形成過程である。そこで私は視床の内部において各々の視床亜核の個性決定を制御する視床パターン形成の分子メカニズムを研究することとした。

私はこれまでに、視床パターン形成を制御する遺伝子を同定するため、遺伝子発現分布のデータベース(Allen Brain Atlas)を用いて下記の条件を満たす遺伝子を探索した。

- i) 視床形成時期(胎生10日齢~16日齢)で視床に発現が見られること
- ii) 予定視床領域の内部で前後軸方向もしくは背腹軸方向に発現勾配を示すこと
- iii) 転写因子であること

その結果、フォークヘッド型転写因子 *Foxp2* が上記に該当することを見出した。胎生13.5日齢の予定視床領域において、*Foxp2* は前側から後側にかけて発現が強くなることを見出した。実際に *in situ* hybridization 法と抗体染色法を用いて、*Foxp2* の前後軸方向への発現勾配を確認することができたことから(図1)、視床パターン形成における *Foxp2* の機能解析を行うこととした。

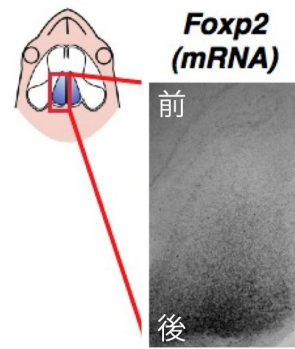


図1. 予定視床領域における *Foxp2* の発現
マウス胎生13.5日齢、水平断切片。
Foxp2 は前後軸方向への発現勾配を持っていた。

3. 研究の方法

予定視床領域の前側から後側にかけて *Foxp2* の発現が強くなっていったことから(図1)、*Foxp2* の前後軸方向への発現勾配が視床パターン形成を制御するという仮説を設定した。即ち *Foxp2* 発現量が少なければ前側の視床亜核になり、多ければ後側の視床亜核になるとの仮説を立てた(図2)。

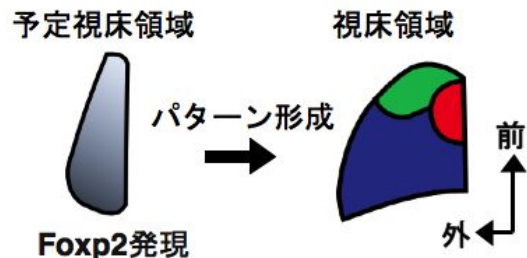


図2. [仮説] *Foxp2* の前後軸方向への発現勾配が視床パターン形成を制御する
Foxp2 発現量が少なければ前側の視床亜核に、発現量が多ければ後側の視床亜核になるとの仮説を立てた。

これらの仮説を検証するために、機能低下型 *Foxp2* を発現する *Foxp2*(R552H) ノックインマウス、子宮内エレクトロポレーション法による shRNA の視床への導入を行った。

さらに神経回路の投射パターンにも表現型があるか検討するために、後外側視床亜核群は体性感覚野に投射し、内側視床亜核群は前頭葉へ投射することを利用して、*Foxp2*(R552H) ノックインマウスの体性感覚野もしくは前頭葉に神経トレーサーを注入し視床神経細胞を逆行性にラベルした。

4. 研究成果

予定視床領域の前側から後側にかけて Foxp2 の発現が強くなっていったことから (図 1) Foxp2 の前後軸方向への発現勾配が視床パターン形成を制御するという仮説を設定した。即ち Foxp2 発現量が少なければ前側の視床垂核になり、多ければ後側の視床垂核になるとの仮説を立てた (図 2)

この仮説を検証するために、機能不全型 Foxp2 を発現する Foxp2(R552H) ノックインマウスを入手し、視床パターン形成を分子マーカーを用いて解析した。その結果、Foxp2(R552H) ノックインマウスで内側視床垂核群である Gbx2 陽性領域が拡大し、後外側視床垂核群である cadherin6 および PCP4 陽性領域が縮小していることを発見した (図 3)。この結果は、Foxp2 が視床垂核の個性決定を制御する重要な遺伝子であることを示唆している。

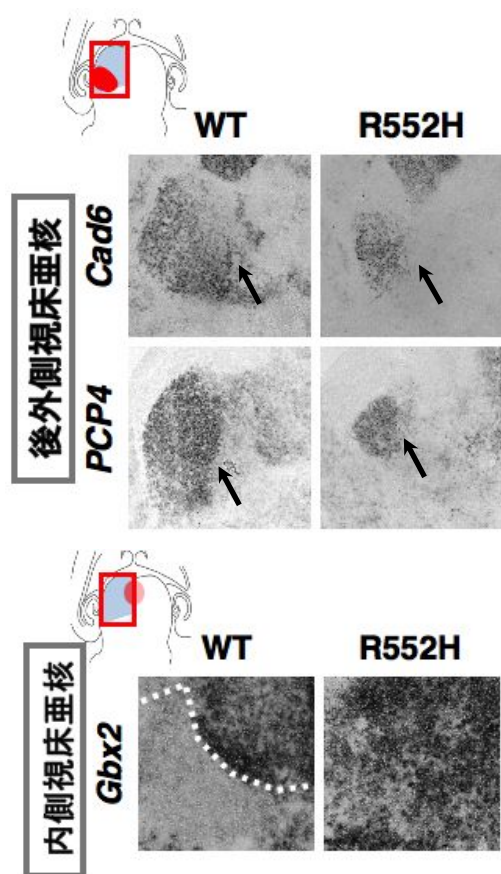


図3. Foxp2(R552H)ノックインマウスにおいて、後外側視床は縮小し、内側視床は拡大した生後2日齢、水平断切片。矢頭：後外側視床垂核群を示す。

さらに面白いことに、Foxp2(R552H) ノックインマウスでは機能不全型 Foxp2 が発現していることから、Foxp2 陽性細胞がどの視床垂核に分化しているか検討することが可能であることに気付いた。検討の結果、Foxp2

陽性細胞は野生型マウスでは cadherin6 陽性、PCP4 陽性、Gbx2 陰性であったのに対して、Foxp2(R552H) ノックインマウスでは cadherin6 陰性、PCP4 陰性、Gbx2 陽性であった。この結果は、Foxp2(R552H) ノックインマウスでは視床神経細胞の運命転換が生じていることを強く示唆している。

Foxp2(R552H) ノックインマウスを用いた上述の結果より視床パターン形成に Foxp2 が必要であることを見出した。ところが Foxp2 は視床のみならず他の脳領域でも発現していることから、Foxp2(R552H) ノックインマウスの表現型が Foxp2 の視床自律的な機能を反映していない可能性がある。そこで子宮内電気穿孔法と shRNA を組み合わせ視床特異的に Foxp2 機能喪失実験を行った。その結果、視床特異的な shRNA 導入によって、Foxp2(R552H) ノックインマウスと同様の結果を得ることができた。この結果は、Foxp2 が視床で働くことにより、視床神経細胞の運命決定を制御していることを意味している。

私はこれまで Foxp2(R552H) ノックインマウスを分子マーカーを用いて検討してきたが、神経回路の投射パターンにも表現型があれば、Foxp2 は分子マーカーだけではなく機能的にも後外側視床垂核群の運命決定に重要であると言える。そこで、後外側視床垂核群は体性感覚野へ投射し、内側視床垂核群は前頭葉へ投射することを利用して、Foxp2(R552H) ノックインマウスの体性感覚野もしくは前頭葉に神経トレーサーを注入し視床神経細胞を逆行性にラベルすることで、神経回路への影響を可視化し検討した。その結果、視床皮質投射も Foxp2 によって制御されていることが明らかとなった。これらの結果は、Foxp2 が視床核パターン形成の重要な遺伝子であることを意味している。

本成果は、視床下部などの神経核構造を持つ他の脳部位の理解などへの発展性が大きい。また、視床異常はてんかんと関連も指摘されており、本研究は基礎神経科学のみならず臨床脳医学的波及効果も大きい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Ebisu H., Iwai-Takekoshi L., Fujita-Jimbo E., Momoi T. and Kawasaki H., Foxp2 regulates identities and projection patterns of thalamic nuclei during development, *Cerebral Cortex*, 27, 3648-3659, 2017, 査読有, doi:10.1093/cercor/bhw187

Matsumoto N., Hoshiba Y., Morita K., Uda N., Hirota M., Minamikawa M., Ebisu H.,

Shinmyo Y. and Kawasaki H.,
Pathophysiological analyses of
periventricular nodular heterotopia using
gyrencephalic mammals, Human Molecular
Genetics, 26, 1173-1181, 2017, 査読有,
doi:10.1093/hmg/ddx038

Inoue N., Ikawa Y., Sato A., Yokoi A.,
Kuroda M., Nomura K., Sakai S., Tajima H.,
Ikeda H., Ebisu H., Kawasaki H., Ohta T.
and Yachie A., Immunostaining of
sulfatide-storing macrophages in
gallbladder of a patient with
metachromatic leukodystrophy, Pediatric
Neurology, 64, e3-e4, 2016, 査読有,
doi:10.1016/j.pediatrneurol.2016.08.006

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蛭子 はるか (EBISU, Haruka)

金沢大学・医学系・博士研究員

研究者番号：4 0 7 8 0 2 2 6