

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18382

研究課題名(和文) フェレットをモデルとした複雑脳発生分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Study of molecular mechanism of complex brain by ferret

研究代表者

恒川 雄二 (Yuji, Tsunekawa)

国立研究開発法人理化学研究所・多細胞システム形成研究センター・研究員

研究者番号：80733352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト型の皺を持つ複雑な大脳皮質の発生分子メカニズムを明らかにする事を目的に、研究を進めて来た。典型的なほ乳類大脳皮質発生のモデル動物であるマウスは、脳にしわを持たず、また発生期においても脳室帯の外側にヒトで顕著である細胞分裂層を持たない。そのため、本研究では皺のある大脳皮質を持つフェレットをモデルとして使い研究を進めている。フェレットは小型の肉食類で、扱いやすいモデル動物であるが、遺伝子改変を行う事が困難である。そのため申請者はフェレットにおいて電気穿孔法を用いた2つの遺伝子改変法を開発し、報告した。このことにより、今後さらなる複雑脳の発生分子メカニズムが明らかになると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to understand molecular mechanism of development of the complex gyrencephalic brain. Mice, which is most used model animals to study neural development but they don't have gyri in their brain. Because of this fact, I used the ferret as the model animal of this study. Ferret is a small handy animals which have gyrencephalic brain, however, it is still difficult to apply genome editing technology to ferret. To solve this problem and progress this project, I reported novel de novo targeted gene knock-in techniques mediated by in utero electroporation and Adeno-associated virus (AAV) into the developing and developed complex brain. Further study to understand molecular mechanism of development of the complex gyrencephalic brain will be required by these newly developed technology.

研究分野：神経発生学

キーワード：複雑脳発生

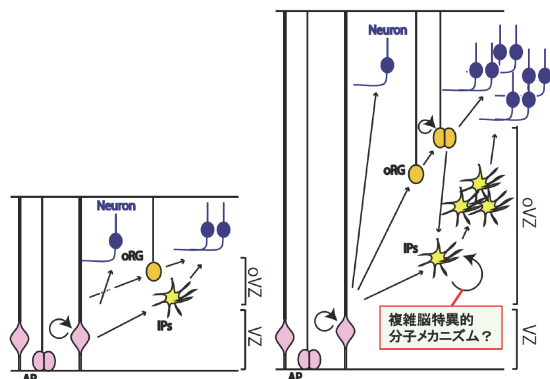


図1、単純脳と複雑脳の違い

左) 齧歯類などの単純な大脳皮質。神経幹細胞 (AP) はほとんど脳室帯 (VZ) で増殖し、その外側 (oVZ) ではあまり増殖しない。右) 霊長類や食肉類の複雑脳。VZのみでなくoVZでも神経幹/前駆細胞 (oRG/IPs) が盛んに増殖し、最終的に多くのニューロンを生み出す。そこに関わる複雑脳特異的な分子メカニズムは未だ謎である。

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトをはじめとする高等ほ乳類の大脳新皮質は、複雑脳と呼ばれげっ歯類などに比べ大きく複雑であり、より高次の機能を持っている事が知られている。このような複雑脳が形成される分子メカニズムは、マウスなどの単純な脳を持つモデル動物で明らかにするのが困難であり、未だ多くの事が謎に包まれている。現在明らかになっているげっ歯類と高等ほ乳類の大脳新皮質発生における大きな違いの一つは、高等ほ乳類の発生中期以降に脳室帯 (Ventricular zone (VZ)) の外側 (oVZ) に見られる神経幹/前駆細胞の増殖である。高等ほ乳類のoVZでは、脳室下帯 (Sub ventricular zone (SVZ)) からさらにその外側に広く存在する外側脳室下帯 (outer Sub ventricular zone (oSVZ)) にかけて、げっ歯類でほとんど存在しない outer radial glia (oRG) と呼ばれる神経幹細胞が存在し、非対称分裂をする事により最終的に生み出すニューロンの数を増やしている<sup>1</sup>。さらに、げっ歯類の神経前駆細胞である Basal progenitor (BPs) はそのほとんどが一回の対称分裂を行い2つのニューロンを生み出すが、高等ほ乳類では複数回対称分裂によりBPsを生み出し、最終的に多くのニューロンが生み出される事が報告されている<sup>2</sup>。ヒトにおいては分裂する全神経幹/前駆細胞のうち6-7割がoVZで分裂すると予想されており、種間の比較においてoVZで分裂する神経幹/前駆細胞の全体に占める割合と認知能力や知能が正の相関を示す事から、複雑で機能的な大脳新皮質発生形成においてoVZの肥大は重要であると考えられている (図1)。

本研究では小型の食肉類であるフェレットを用いて研究を進めて行く。フェレットは小型の食肉類で、扱いやすく、産子数が多く、比較的容易に入手出来るモデル動物である。さらに重要な事に、フェレットは皺のある複雑な大脳皮質を持っており、電気穿孔法を用いる事により簡便な遺伝子導入も可能である (図2)。

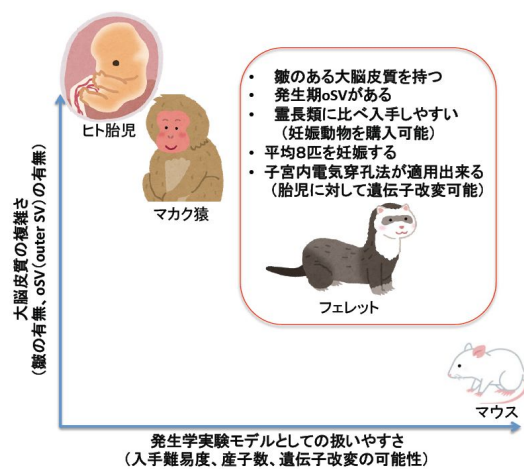


図2、複雑脳を研究する上でのフェレットの有用性

### 2. 研究の目的

本研究課題を始める前に申請者は、マウスでは主に終脳腹側に発現している遺伝子群が複雑脳を持つフェレットの大脳皮質に発現しており、その中の一つ、Ascl1が複雑脳形成に重要な役割を持っている知見を得ていた。本研究では、高等ほ乳類においてこれらの遺伝子群の発現調節機構をはじめとして、内在的、外因的にどのような分子メカニズムが働いて複雑脳が形成されていくかを明らかにすることを目的とし、研究を進めて来た。

### 3. 研究の方法

・抗体染色によるステージ別の遺伝子発現解析

フェレット大脳皮質をそれぞれの発生ステージで固定し、抗体染色法を用いて遺伝子発現パターンが発生の過程でどのように変化するかを解析する。

・子宮内電気穿孔法による遺伝子カスケードの解析

フェレットは遺伝子改変技術の適用が難しいモデル動物である。そのため、子宮内電気穿孔法を用いる事により野生型の胎児大脳皮質にたいして直接遺伝子導入を行い、複雑脳の発生に関わる遺伝子の機能を解析する。具体的には、遺伝子を過剰に発現させ、遺伝子機能を解析する。siRNAやCas9を細胞に導入し遺伝子機能を欠失させる事により遺伝子機能を解析する。EGFPやmCherryなどの蛍光タンパク質を発現させる事により細胞の形態などを可視化する。

・長期タイムラプスイメージングによる細胞の振る舞いの解析

大脳皮質を薄くスライスしてフィルターの上におくと、特殊な培地の中で培養する事が出来る。さらに上記子宮内電気穿孔法で細胞を蛍光タンパク質でラベルしておく事により、細胞が大脳皮質発生の最中にどのように

振る舞うかを解析する事が出来る。

#### 4. 研究成果

・CRISPR/Cas9 を用いた 2 つの遺伝子改変技術の開発

上記子宮内電気穿孔法は非常に簡便な遺伝子カスケードの解析を可能とするが、発現量のコントロールが出来ない、細胞種特異的な発現のコントロールが出来ない、細胞分裂に応じて細胞内のプラスミド濃度が低下するため永続的な遺伝子発現が出来ない、などの問題がある。遺伝子改変動物の作成が困難なフェレットで分子メカニズムの詳細を明らかにするため、申請者は以下二つの遺伝子改変技術を開発し、報告した。

1. 電気穿孔法で CRISPR/Cas9、ガイド RNA(gRNA)、ホモロジドナーベクターを神経幹細胞に導入し、増殖中の細胞に遺伝子を高効率で欠失/挿入させる技術 (*de novo* knock-In 法) (Tsunekawa et al., 2016 *Development*、主な発表論文等参照)。

**技術の特徴:** ノックインに相同組換え修復経路を使うため、増殖中の細胞のみに適用可能。非常に高効率(導入された細胞の最大 60%超の効率)、比較的長いホモロジーアームが必要(200-1kbp)。

2. アデノ随伴ウイルスや電気穿孔法で CRISPR/Cas9、gRNA、ドナーベクターを導入し、増殖中/終末分化した細胞に遺伝子を挿入する技術 (homology-independent targeted integration: HITI 法) (Suzuki & Tsunekawa et al., 2016 *Nature*、\*同等貢献 主な発表論文等参照)。

**技術の特徴:** ノックインに非相同末端結合修復経路を使うため、増殖中/終末分化済みの細胞両方に適用可能。ノックイン効率は上記 *de novo* knock-In 法より下がる(導入された細胞の最大 20%の効率)、非相同末端結合修復経路を用いるためホモロジーアームを必要としない(23bp の配列のみ必要)。

・フェレットにおいて *Ascl1* をノックアウトした細胞の振る舞いを解析

子宮内穿孔法により *cas9* を細胞に導入し *Ascl1* の欠失細胞を作成、同時に細胞を蛍光タンパク質でラベルした。その 4 日後に細胞を抗体染色し、*Ascl1* 欠失細胞がどのような細胞に分化するかを野生型のコントロールと比較した。胎生期の様々なステージにおいて同様の実験を行い、*Ascl1* が欠失される事により細胞の振る舞いにどのような影響が出るかが詳細に明らかにされた。

・フェレットにおける転写因子 *Ascl1* の発現解析

上記 *de novo* knock-In 法を用いてフェレット *Ascl1* 遺伝子に蛍光タンパク質をフュージョンさせるようにノックインし、タイムラプ

スイメージングにより *Ascl1* の発現と細胞運命の関係を詳細に明らかにした。

#### 参考文献

1. Fiez et al., 2010. 2) Huttner et al., 2014.

#### 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 2 件)

Suzuki K\*, Tsunekawa Y\*, Hernandez-Benitez R\*, Wu J\*, Zhu J, Kim EJ, Hatanaka F, Yamamoto M, Araoka T, Li Z, Kurita M, Hishida T, Li M, Aizawa E, Guo S, Chen S, Goebel A, Soligalla RD, Qu J, Jiang T, Fu X, Jafari M, Esteban CR, Berggren WT, Lajara J, Nuñez-Delgado E, Guillen P, Campistol JM, Matsuzaki F, Liu GH, Magistretti P, Zhang K, Callaway EM, Zhang K, Belmonte JC. \*同等貢献  
*Nature*. 2016 Dec 1;540(7631):144-149. doi: 10.1038/nature20565. (査読あり)

Developing a *de novo* targeted knock-in method based on in utero electroporation into the mammalian brain.

Tsunekawa Y\*, Terhune RK\*, Fujita I, Shitamukai A, Suetsugu T, Matsuzaki F. \*同等貢献  
*Development*. 2016 Sep 1;143(17):3216-22. doi: 10.1242/dev.136325. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

Yuji Tsunekawa, Raymond Kunikane Terhune, Keiichiro Suzuki, Euseok J. Kim, Edward M. Callaway, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Fumio Matsuzaki.  
Developing *de novo* gene targeting systems. *ConBio* 2017

Yuji Tsunekawa, Raymond Kunikane Terhune, Keiichiro Suzuki, Euseok J. Kim, Edward M. Callaway, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Fumio Matsuzaki.  
Developing *de novo* gene targeting systems. 10<sup>th</sup> Neurodevelopmental meeting Creta 2017

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

国内外の別: 国外

US provisional application 62/363,164  
Title: "Methods and Compositions for Genome Editing in Non-Dividing Cells"  
Filing date: Jul 15, 2016

Inventors: Reyna Hernandez-Benitez, Juan Carlos Izpisua Belmonte, Yuji Tsunekawa, Keiichiro Suzuki, Jun Wu

US provisional application 15/130,891  
Title: "Mitochondrial genome editing"  
Filing date: Apr 15, 2016  
Inventors: Juan Carlos Izpisua Belmonte, Pradeep Reddy Dubbaka Venu, Alejandro Ocampo, Keiichiro Suzuki, Yuji Tsunekawa

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

恒川 雄二 ( Yuji Tsunekawa )  
理化学研究所生命機能科学研究センター  
研究員  
研究者番号 : 80733352

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

### (4) 研究協力者

( )