

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19376

研究課題名（和文）フェレットの脳皮質形成機構の解明とその破綻による疾患病態の解析

研究課題名（英文）Developmental mechanisms of the cerebral cortex in ferrets

研究代表者

新明 洋平（Shinmyo, Yohei）

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00418831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：脳回の獲得は脳機能の発達の基盤であると考えられており、従ってその形成メカニズムの解明は神経科学の重要研究課題の一つである。本研究では、発達した脳回をもつフェレットを用いて脳回形成機構の解明を目指した。ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られているCdk5遺伝子のノックアウトを行った。Cdk5に対するCRISPR/Cas9プラスミドを導入した結果、神経細胞の放射状移動が障害され、さらに脳回の低形成が観察された。これらの結果から、神経細胞の放射状移動が脳回形成に必須であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、脳回形成機構の解明のみならず、臨床脳医学にも大きく貢献できる。ヒト脳回形成異常に見られるてんかんや発達遅滞の発症メカニズムには不明な点が多く、根本的な治療法は確立されていないのが現状である。本研究成果は、脳回異常による脳機能障害の発症メカニズムの解明に繋がる有益な知見である。さらに、本研究で作成した脳回形成異常フェレットが、今後の治療法開発において有用なモデル動物になることも期待できる。

研究成果の概要（英文）：Folds in the cerebral cortex in mammals are believed to be key structures for accommodating increased cortical neurons in the cranial cavity. However, the mechanisms underlying cortical folding remain largely unknown. By combining in utero electroporation and the CRISPR/Cas9 system, we succeeded in efficient gene knockout of Cdk5, which is mutated in some patients with classical lissencephaly, in the gyrencephalic brains of ferrets. We show that Cdk5 knockout in the ferret cerebral cortex markedly impaired cortical folding. Furthermore, the results obtained from the introduction of dominant-negative Cdk5 into specific cortical layers suggest that Cdk5 function in upper-layer neurons is more important for cortical folding than that in lower-layer neurons. Cdk5 inhibition induced severe migration defects in cortical neurons. Taken together, our findings suggest that the appropriate positioning of upper-layer neurons is critical for cortical folding.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：大脳皮質 フェレット 脳回 Cdk5

1. 研究開始当初の背景

ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ(脳回)を形成する。進化における脳回の獲得は高次脳機能の発達の基盤であり、脳回異常疾患では著しい脳機能障害を呈することから、脳回の形成メカニズムおよび疾患病態の解明は神経科学の重要研究課題である。実際、脳回形成が障害され平滑な脳表面を示す疾患であるヒト滑脳症では、乳児期早期より難治性てんかんと重度の精神発達遅滞を伴う。このように、脳回形成とその異常により生じる脳機能障害に関する研究は、基礎神経科学のみならず臨床脳医学へも波及効果が大きい研究課題である。しかし分子遺伝学的研究に用いられるマウスの脳には脳回は存在せず、マウスを用いた解析が困難であるために脳回形成に関する研究は遅れている。

イタチ科に属するフェレットは、脳回や眼優位性カラムなど高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究は解析手法が確立されておらず遅れていた。我々は、フェレットでの分子遺伝学的解析を可能とするために、子宮内電気穿孔法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入法を確立している。さらに我々はこの技術を用いて大脳皮質に FGF8 を導入することにより、多小脳回症をもつ疾患モデル動物の作成に成功している。さらに、脳回形成に FGF シグナルや転写因子である *Tbr2* が重要な役割を果たすことを明らかにしている。次の大きな課題は、loss-of-function 実験を行うための遺伝子ノックアウト技術の開発である。ZFN や TALEN に続く第三世代のゲノム編集ツールとして、近年、CRISPR/Cas9 システムが大きな注目を集めている。我々は最近、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、マウス大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法を確立した。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いた手法をフェレットへ応用することにより、フェレット大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。さらに本研究では、その手法を用いて脳回形成機構の解明を目的とした。ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られている *Cdk5* 遺伝子のノックアウトを行った。*Cdk5* に対する CRISPR/Cas9 プラスミド (pX330-Cdk5) を導入した結果、EGFP 陽性細胞の約半数で、*Cdk5* の機能が喪失し放射状移動が障害されていた。次に、フェレット脳回形成において *Cdk5* が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。その結果、pX330-Cdk5 を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、*Cdk5* が脳回形成に必須であることが明らかとなった。

3. 研究の方法

(1) フェレットにおける大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立

マウス大脳皮質の発生期に、*Cdk5* は分裂後の神経細胞に強く発現し、その放射状移動に必須であることが知られている。実際、*Cdk5* ノックアウトマウスの大脳皮質では、神経細胞の移動障害により正常な層構築が形成されない。フェレット大脳皮質における *Cdk5* の機能阻害においても神経細胞の移動障害が起こると予想された。マウス大脳皮質におけるノックアウトでは、

hCas9 (human codon optimized Cas9)とガイド RNA を同時に発現できるプラスミド (pX330) が有用であったので、フェレットにおいてもこのプラスミドを使用した。標的配列が異なる 5 種類の pX330-Cdk5 を作成し、それぞれのコンストラクトを pCAG-EGFP と混合し、妊娠 31 日目のフェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法を用いて導入した。8 日後の妊娠 39 日目に胎仔を固定し、EGFP 陽性細胞の分布を調べた。

(2) *Cdk5* ノックアウトフェレットにおける脳回形成異常

フェレット脳回形成において *Cdk5* が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。フェレット脳の発生において、出生約一週間後に大脳表面に凹凸構造が観察され始め、出生 16 日後にははっきりとした脳回が観察される。そこで、妊娠 31 日目のフェレット大脳皮質に pX330-Cdk5 を子宮内電気穿孔法により導入した。生後 16 日目で脳を固定し、形態学的に脳回に異常があるかどうかを調べた。

(3) 上層神経細胞の移動が脳回形成に重要である

脳回を持たない齧歯類の大脳皮質に比べて脳回を持つ霊長類の大脳皮質では、下層の神経細胞数に対する上層の神経細胞数が大きく増大したことが知られている。そのため、この上層神経細胞数の増大による脳表面の拡大が脳回の出現に重要であったとする可能性が提唱されている。つまり、上層神経細胞の脳表への移動が脳回形成に重要であると考えられる。そこで、大脳皮質の層特異的に *Cdk5* の機能を阻害し、どの層の神経細胞の移動が脳回形成に重要であるかを調べた。層特異的に *Cdk5* を機能阻害するために、優性不能型 *Cdk5* (Dn-*Cdk5*) を発現するプラスミドを用いた。重要なことに、異なる時期に Dn-*Cdk5* を子宮内電気穿孔法により導入すれば、大脳皮質層特異的に *Cdk5* の機能を阻害できる。実際、妊娠 31 日目では 5/6 層、34 日目では 4 層、37 日目では 2/3 層の神経細胞に Dn-*Cdk5* を導入できる。それぞれの時期に Dn-*Cdk5* を導入し生後 16 日目で脳を固定し、組織学的解析を行った。

4 . 研究成果

(1) フェレットにおける大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立

Cdk5 に対する標的配列を持たない pX330 を導入したコントロールでは、EGFP 陽性細胞は皮質板に移動していた。一方、pX330-Cdk5 を導入した個体では 5 種類すべてにおいて、EGFP 陽性細胞の約半数が移動障害を示した (図 1)。次に、移動障害を示した神経細胞において *Cdk5* の発現が消失しているかを *Cdk5* に対する抗体を用いた免疫染色により調べた。その結果、正常に移動した GFP 陽性細胞では *Cdk5* の発現が観察されたが、移動障害を示した GFP 陽性細胞では *Cdk5* の発現が完全に消失していた。これらの結果から、pX330-Cdk5 の導入された EGFP 陽性細胞の約半数で、*Cdk5* の機能が喪失し放射状移動が障害されたと考えられた。このように、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、フェレット大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法の確立に成功した。

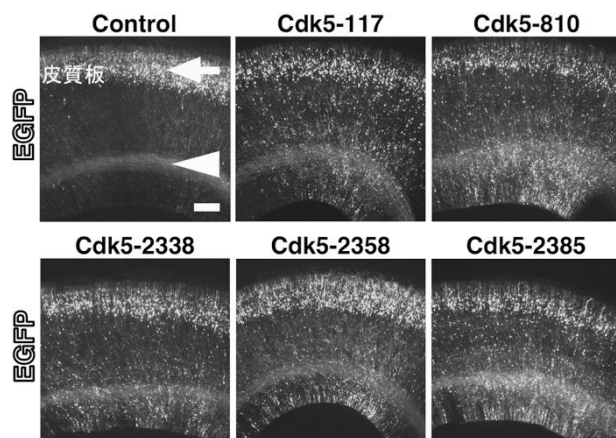


図 1. 大脳皮質における *Cdk5* のノックアウト

pX330-Cdk5-2385 を子宮内電気穿孔法により大脳皮質に導入にした。コントロールサンプルにおいて *EGFP* 陽性細胞は正常に皮質板に移動し、脳回形成に異常は見られなかった。一方、*pX330-Cdk5-2385* を導入した個体では、神経細胞の移動障害（矢尻）に加えて脳回の低形成が観察された（矢印）。矢尻は、*GFP* 陽性の神経軸索を示す。スケールバー：0.2 mm。

(2) *Cdk5* ノックアウトフェレットにおける脳回形成異常

コントロール個体では、脳回形成には異常が見られなかった。一方、*pX330-Cdk5* を導入した個体では脳回の低形成が観察された（図 2）。これらの結果から、*Cdk5* が脳回形成に必須であることが明らかとなった。*pX330-Cdk5* を導入した個体では、*Cdk5* の機能不全により正常に灰白質に移動できなかった神経細胞が白質に集積していた。一方、グリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトの分布には異常が見られなかった。以上の結果から、神経細胞の正常な移動が脳回形成に必須であると考えられた。

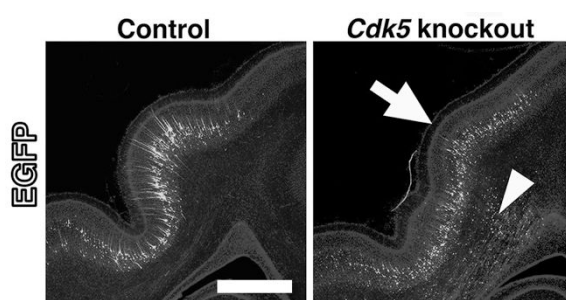


図 2 *Cdk5* ノックアウトによる脳回形成異常

pX330-Cdk5-2385 を子宮内電気穿孔法により大脳皮質に導入にした。コントロールサンプルにおいて *EGFP* 陽性細胞は正常に皮質板に移動し、脳回形成に異常は見られなかった。一方、*pX330-Cdk5-2385* を導入した個体では、神経細胞の移動障害（矢尻）に加えて脳回の低形成が観察された（矢印）。スケールバー：1 mm。

(3) 上層神経細胞の移動が脳回形成に重要である

全てのサンプルにおいて神経細胞の移動障害が観察された。つまり、*Cdk5* は 2-6 層の神経細胞の移動に必要不可欠であることが分かった。次に、これらのサンプルについて脳回形成に異常があるかを調べた結果、2/3 層の神経細胞に *Dn-Cdk5* を導入した個体において脳回の低形成が見られた。一方、*Dn-Cdk5* を 5/6 層もしくは 4 層に導入した個体では脳回形成に顕著な異常は見られなかった。これらの結果から、2/3 層の神経細胞の移動が脳回形成により重要であることが示

唆された。

(4) 考察

本研究において、我々はフェレット大脳皮質において遺伝子ノックアウト法を確立した。今後、本手法を用いて様々な遺伝子の機能解析が可能となるため、フェレットを用いた脳回形成研究が飛躍的に進むと考えられる。さらに我々は、この独自手法を用いて神経細胞に発現する *Cdk5* が脳回形成に必須であることを示した。*Cdk5* ノックアウトフェレットにおいて観察される脳回の低形成は、ヒト滑脳症に見られる脳回異常に類似することから、フェレットとヒトの脳回形成機構に共通の分子メカニズムが存在すると考えられる。我々の実験結果から、大脳皮質下層の神経細胞よりも上層の神経細胞の移動が脳回形成により重要であることが明らかとなった。上層の神経細胞の移動による脳表面の拡張が脳回形成に重要なプロセスであると考えられる。今後は、脳回形成機構において最も重要な点である脳表面の凹凸の場所を規定するメカニズムの解明を目指したい。本研究の成果は、脳回形成機構の解明のみならず、臨床脳医学にも大きく貢献できる。ヒト脳回形成異常に見られるてんかんや発達遅滞の発症メカニズムには不明な点が多く、根本的な治療法は確立されていないのが現状である。本研究成果は、脳回異常による脳機能障害の発症メカニズムの解明に繋がる有益な知見である。さらに、本研究で作成した脳回形成異常フェレットが、今後の治療法開発において有用なモデル動物になることも期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshino M, Saito K, Kawasaki K, Horiike T, Shinmyo Y, Kawasaki H.	4. 巻 13
2. 論文標題 The origin and development of subcortical U-fibers in gyrencephalic ferrets.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-020-00575-8.	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 Tawarayama H, Yamada H, Amin R, Morita-Fujimura Y, Cooper HM, Shinmyo Y, Tanaka H, Ikawa S.	4. 巻 431
2. 論文標題 Draxin-mediated Regulation of Granule Cell Progenitor Differentiation in the Postnatal Hippocampal Dentate Gyrus.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 184-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2020.02.005.	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 Saito K, Mizuguchi K, Horiike T, Dinh Duong TA, Shinmyo Y, Kawasaki H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Characterization of the Inner and Outer Fiber Layers in the Developing Cerebral Cortex of Gyrencephalic Ferrets.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cereb Cortex.	6. 最初と最後の頁 4303-4311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/cercor/bhy312.	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 Dinh Duong TA, Hoshiba Y, Saito K, Kawasaki K, Ichikawa Y, Matsumoto N, Shinmyo Y, Kawasaki H.	4. 巻 39
2. 論文標題 FGF Signaling Directs the Cell Fate Switch from Neurons to Astrocytes in the Developing Mouse Cerebral Cortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurosci	6. 最初と最後の頁 6081-6094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1523/JNEUROSCI.2195-18.2019	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 Kagami K., Shinmyo Y., Ono M., Kawasaki H. and Fujiwara H.	4. 巻 16
2. 論文標題 Three-dimensional evaluation of murine ovarian follicles using a modified CUBIC tissue clearing method.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Reproductive Biology and Endocrinology	6. 最初と最後の頁 72
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12958-018-0381-7	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 Tawarayama H., Yamada H., Shinmyo Y., Tanaka H. and Ikawa S.	4. 巻 500
2. 論文標題 The chemorepellent draxin is involved in hippocampal mossy fiber projection.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 217-223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.043.	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 Sato Y., Matsuo A., Kudoh S., Fang L., Hasegawa K., Shinmyo Y., and Ito T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Expression of Draxin in lung carcinomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 53-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.17035.	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 Mizuguchi K., Horiike T., Matsumoto N., Ichikawa Y., Shinmyo Y. and Kawasaki H.	4. 巻 43
2. 論文標題 Distribution and morphological features of microglia in the developing cerebral cortex of gyrencephalic mammals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 1075-1085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-018-2520-0.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Shinmyo, Y. Terashita, T.A. Dinh Duong, T. Horiike, M. Kawasumi, K. Hosomichi, A. Tajima, H. Kawasaki.
2. 発表標題 Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Shinmyo, Y. Terashita, T.A. Dinh Duong, T. Horiike, M. Kawasumi, K. Hosomichi, A. Tajima, H. Kawasaki.
2. 発表標題 Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals
3. 学会等名 2nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	河崎 洋志 (Kawasaki Hiroshi) (50303904)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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