

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06680

研究課題名(和文) 低酸素シグナルによる抑制性神経の発生制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of interneuron development via hypoxia signaling

研究代表者

酒井 大輔 (SAKAI, Daisuke)

金沢医科大学・一般教育機構・講師

研究者番号：90632646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内の低酸素環境と哺乳類大脳新皮質発生との関係を解析するために、低酸素応答因子Hif1の神経前駆細胞特異的なノックアウトマウスを作成した。そして、Hif1ノックアウトマウスの大脳腹側で抑制性神経が異所的に誘導されていることを見出した。Hif1の欠損により大脳で発現が変動する遺伝子を探し、Fgf15とGm10046を同定した。Fgf15の強制発現系の確立とGm10046のノックアウトマウスの作成により、抑制性神経発生におけるこれら遺伝子の機能解析の基盤作りが完了した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
形態形成という発生イベントは遺伝的プログラムによって進行するが、環境要因も関与することが知られている。本研究では、哺乳類胚を取り巻く低酸環境が大脳発生の遺伝的プログラムを修飾し、大脳発生を制御する可能性を検討した。本研究の成果により、子宮内の低酸素環境が攪乱されることで、仔の抑制性神経の数が変化する可能性が示唆された。てんかんや自閉症スペクトラム症は抑制性神経の数が変化することで発症することが示されている。このことから、本研究結果は精神疾患の発症機構の解明や治療法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of hypoxia in the development of cerebral cortex in mammalian embryos, we generated neural progenitor-specific Hif1 knockout mice. We found that LGE-derived interneurons were ectopically induced at ventral side of Hif1 knockout brain. We further explored genes in which expression is changed by the loss of Hif1, and identified Fgf15 and Gm10046. We established a basis of functional analysis of those genes, such as the overexpression system of Fgf15 and the generation of Gm10046 knockout mice.

研究分野：発生生物学

キーワード：低酸素 抑制性神経 マウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類胚は子宮内膜内に着床し、低酸素環境下で胚発生を進行させる。そのため、哺乳類胚は、遺伝的な発生プログラムの他に、低酸素環境下で発動する発生プログラムを有していると考えた。それを支持する報告として、低酸素応答因子 *Hif1* の全身性ノックアウトマウスは、神経管閉鎖不全、鰓弓や心臓、血管などの発生異常を示し、胎生致死となることが知られている。また、近年、低酸素による胚発生制御の例がいくつか報告されている。例えば、*Hif1* が Notch シグナルと協調的に神経前駆細胞のアストロサイトへの分化を促進すること等が報告されている。研究代表者は、神経上皮細胞特異的な *Hif1 $\alpha$*  欠損マウス (*Hif1 $\alpha$* -cKO) を作製し、*Hif1 $\alpha$* -cKO 胚の脳腹側に CGE 由来の抑制性神経が異所的に誘導されることを発見した。抑制性神経は脳腹側に存在する MGE と CGE から主に産生される。CGE は前方に存在する LGE と連続した構造をとるが、LGE からは主に線条体ニューロンが産生される。しかし、連続した組織構造から前後軸(吻尾軸)で異なる細胞種が産生されるメカニズムはほとんど不明である。また、LGE と CGE は形態的に連続した組織であり、それぞれで特異的に発現する遺伝子はこれまでに見つかっていない。

### 2. 研究の目的

上述の知見から、研究代表者は、*Hif1 $\alpha$*  依存的な低酸素シグナルが CGE 由来抑制神経への分化を抑制、もしくは線条体神経への分化を促進しているという仮説を立てた。すなわち、脳組織内に生理的な酸素濃度の勾配が前後軸に形成されており、*Hif1 $\alpha$*  の活性依存的な遺伝子発現によって LGE と CGE がそれぞれ形成されると考えた。そこで本研究課題では、(1) *Hif1 $\alpha$*  の欠損によって発現が変動する遺伝子の同定、(2) 脳組織内の低酸素領域の可視化、(3) 脳内酸素濃度勾配の攪乱による抑制性神経発生への影響、の3点について解析を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Hif1 $\alpha$* の欠損によって発現が変動する遺伝子の同定

*Hif1 $\alpha$* -cKO 胚の脳から RNA を調整し、DNA マイクロアレイ解析を行った。2 倍以上の発現変動が認められた遺伝子の内、血管形成や代謝などに関連する遺伝子以外を選別し、RT-qPCR 及び in situ hybridization による発現スクリーニングを行った。また、同定した遺伝子の機能解析を行った。

#### (2) 脳組織内の低酸素領域の可視化

低酸素応答性の蛍光プローブである Hypoxyprobe を妊娠母獣の尾静脈から注入し、胚組織内の低酸素領域の標識を行った。

#### (3) 脳内酸素濃度勾配の攪乱による抑制性神経発生への影響

血管形成を制御する *sFlt-1* 遺伝子を脳腹側にエレクトロポレーション法により導入し、脳内の血管形成を部分的に阻害した。これにより、局所的な低酸素環境を人為的に作り出し、抑制性神経発生への影響を解析した。

### 4. 研究成果

DNA マイクロアレイにより、*Hif1α*の欠損によって発現が変動する遺伝子が多数同定された。その中から、発現量が2倍以上変動していた遺伝子を *Hif1α*の標的遺伝子候補とした。その内、血管形成や代謝に関連する遺伝子を除外した50遺伝子について、RT-qPCRにより発現変動の確認を行った。そして、RT-qPCRにより発現の変化が確認された遺伝子の内、発現変動幅の大きい15遺伝子について、in situ hybridizationにより大脳内での発現パターンの変化を調べた(図1)。

その結果、*Hif1α*の欠損によって大脳腹側での発現が上昇する遺伝子として *Fgf15* (図2)、減少する遺伝子として *AP2δ*と *Gm10046*を同定した。*AP2δ*は、大脳新皮質と基底核隆起の境界部に発現していたため、解析対象からは除外した。*Fgf15*と

*Gm10046*が低酸素シグナル依存的に抑制神経の発生を誘導する分子であることが強く示唆されたため、これら遺伝子の機能解析実験を行った。*Fgf15*の発現上昇が異所的な抑制性神経誘導を引き起こすのか検討するために、*Fgf15*の発現ベクター

(*Fgf15*-pCAGGS)を構築し、in utero electroporation法により胎生14.5日目のLGEに導入した。しかし、異所的な抑制性神経は誘導されなかった。抑制性神経の発生開始が胎生13.0日目であることから、遺伝子導入のタイミングが遅いために誘導できなかった可能性が考えられた。そこで、胎生13.0日目のLGEへの遺伝子導入を試みたが、子宮壁越しでは脳室の位置が不明瞭で、プラスミドDNAの注入が困難であった。また、大

脳の構造上LGEへの遺伝子導入効率が低いことがわかった。今後は、胎生13.0日目またはそれ以前の大脳を胚より摘出した後に遺伝子導入し、大脳スライス培養を用いて抑制性神経の発生を解析する予定である。*Gm10046*に関しては、国立精神神経医療研究センターの井上高良博士、井上由紀子博士にご協力いただき、ゲノム編集による遺伝子欠損マウスの作成を行った。10世代のバッククロス後、*Gm10046*ホモ欠損マウスの繁殖能、仔の生存や形態異常について調べた。その結果、*Gm10046*ホモ欠損マウスは繁殖能、生存、形態形成のいずれも正常であることがわかった。次に、胎生14.5日目の大脳における抑制性神経の発生について解析を行ったが、抑制性神経の発生に異常は認められなかった。現在、胎生14.5日目以降での抑制性神経発生について解析を進めている。また、10世代のバッククロスで十分であると考えられるが、さらにバッククロスを重ねて表現型が出るのか調べる予定である。

大脳組織内の酸素濃度勾配をHypoxyprobeにより可視化することを試みた。Hypoxyprobeを妊娠母獣の尾静脈から注入し、胎盤を通して胎生14.5日目、16.5日目の胎児大脳の標識を行った。標識は既報の方法を用いたが、明瞭なシグナルを観察することができなかった。そこで、注入する時期、蛍光プローブの量などを詳細に検討したが、やはり明瞭なシグナルを得ることができなかった。最近、EF5を用いた低酸素領域の可視化法が報告されたので、今後はEF5による検出を試みる予定である。

大脳組織内の酸素濃度を人為的に攪乱する目的で、小型動物用の酸素ハウスを用いて、高濃

図1 DNAマイクロアレイによる発現変動遺伝子の同定

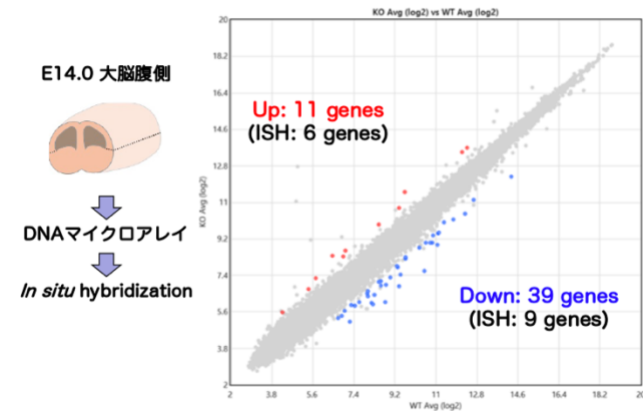
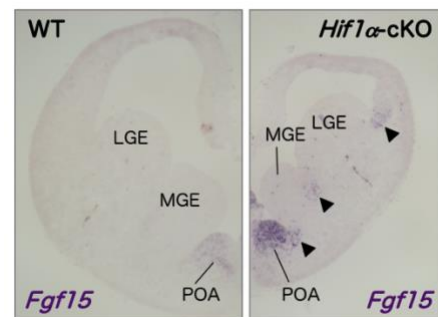


図2 *Fgf15* mRNAの発現パターンの変化



度条件下で妊娠母獣を飼育する計画であった。しかし、実際に使用した研究者と学会で情報交換したところ、使用予定であった酸素ハウスでは 60%以下の酸素濃度までしか上げられないことが判明した。密閉度の高い飼育ケージの導入を検討したが、非常に高価であることから、妊娠母獣の外環境酸素濃度変化によるアプローチは断念した。そこで、大脳組織内の酸素運搬を担う血管の形成を阻害することで、酸素濃度勾配の攪乱を試みた。sFt-1 の発現ベクターを金沢医科大学の池田博士よりご提供いただき、in utero electroporation 法により胎生 14.5 日目の大脳に導入した。その結果、*sFlt-1* の発現部位周辺での血管形成阻害は認められず、抑制性神経の発生異常も認められなかった。しかし、予想していなかった結果として、血管形成阻害により大脳新皮質神経の細胞死の誘導、と大脳新皮質層構造の形成異常が認められた。このことから、Vegf シグナルが神経細胞の生存を制御し、大脳新皮質形成に関与することが示唆された。この結果について、論文発表を行った。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakai Daisuke, Sugawara Takeru, Kurokawa Tomonori, Murakami Yuki, Tomosugi Mitsuhiro, Masuta Hiroko, Sakata-Haga Hiromi, Hatta Toshihisa, Shoji Hiroki	4. 巻 15
2. 論文標題 Hif1 -dependent hypoxia signaling contributes to the survival of deep-layer neurons and cortex formation in a mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13041-022-00911-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Yo, Tsukada Tsuyoshi, Sakata-Haga Hiromi, Sakai Daisuke, Shoji Hiroki, Saikawa Yutaka, Hatta Toshihisa	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 Exposure to Maternal Immune Activation Causes Congenital Unfolded Protein Response Defects and Increases the Susceptibility to Postnatal Inflammatory Stimulation in Offspring	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 355 ~ 365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JIR.S294238	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 Murakami Yuki, Imamura Yukio, Saito Kuniaki, Sakai Daisuke, Motyama Jun	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Altered kynurenine pathway metabolites in a mouse model of human attention-deficit hyperactivity/autism spectrum disorders: A potential new biological diagnostic marker	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60585-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 酒井大輔、坂田ひろみ、八田稔久、東海林博樹
2. 発表標題 生理的低酸素による抑制性神経分化制御機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第39回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 酒井大輔、東海林博樹
2. 発表標題 低酸素応答因子Hif1 による抑制性神経分化制御機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Sakai
2. 発表標題 Deregulation of histone methylation is implicated in the etiology of frontonasal dysplasia
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井大輔
2. 発表標題 哺乳類全胚培養法の実際
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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