

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08089

研究課題名(和文) 拡散テンソルMRIと共焦点顕微鏡画像3次元構築による神経回路形成異常のマッピング

研究課題名(英文) Mapping of abnormal neural circuit formation by diffusion tensor MRI and 3D construction of confocal microscope images

研究代表者

ケレベール オレリアン (Kerever, Aurelien)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：70623594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、近年提案されている革新的な脳透明化技術と最先端のMRI技術を組み合わせることにより、軸索誘導におけるスルファターゼの機能を解明するだけでなく、微細な構造異常を伴う新たな精神神経疾患を解明する。われわれは、放射線学および組織学的方法を用いて、Sulf1/2 DKO マウスの脳における交連線維の障害を報告した。トラクトグラフィー分析を使用して、交連線維系のうち、脳梁 および 背側海馬交連の異常を発見し。これらの結果は、Sulf1/2 が交連線維の正常な発達において重要な役割を果たしていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

This study not only elucidated the role of Sulf1/2 in commissure formation but also contributed to the search for new surrogate markers for psychiatric and neurological disorders associated with structural abnormalities.

研究成果の概要(英文)：We mapped neural circuit dysplasia by next-generation diffusion MRI analysis including diffusion tensor and three-dimensional construction of confocal images of transparent brain. By combining the innovative brain clearing technology and cutting-edge MRI technology proposed in recent years, this research has not only elucidated the function of sulfatase in axon guidance, but also a new neuropsychiatric disorder with minute structural abnormalities. We reported impaired commissural fibers in the brains of Sulf1/2 DKO mice using radiological and histological methods. Using fiber tractography analysis, we found abnormalities in the commissural fiber system of the corpus callosum and dorsal hippocampal commissure and confirmed these histological abnormalities by FluoroMyelin staining and anterograde tracing of the DHC fibers. These results indicate that Sulf1/2 play an important role in the normal development of commissural fibers.

研究分野：Neurosciences

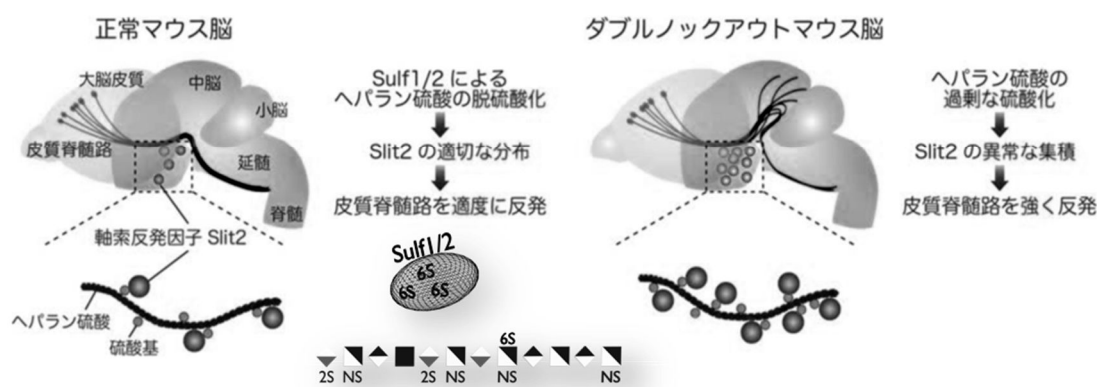
キーワード：endosulfatase heparan sulfate MRI axon guidance

1. 研究開始当初の背景

自閉症スペクトラム障害や統合失調症を含む精神・神経疾患の発症には、神経回路の発達に関連することが知られる。神経回路の異常は、神経細胞の適正な分化、移動、配置、シナプス形成、軸索ガイダンス(誘導)による精緻な回路網形成等の各段階でのエラーに起因するが、その分子機構解明は不十分である。さらに、構造的変化は微細で、これまでの画像診断技術では検出が極めて困難である。

近年の進歩：スリット(Slit)をはじめとする軸索誘導因子とそれらの受容体が同定されたことにより軸索誘導の分子基盤があきらかになりつつある。また、これらの分子の拡散や受容体活性化等を外から細やかに調整する要素としてヘパラン硫酸等プロテオグリカン(HSPG)のような細胞外因子も着目されてきた。例えば、スリット(Slit)は、ロボ(robo)ファミリーのタンパク質を受容体として用いる分泌タンパク質であり脳梁の軸索の正中交差を制御する機構として発見されたが、この機構における誘導は、軸索および成長円錐の表面上のHSPGの存在によって影響される。分担研究者榊らは、神経発生において中心的な役割を持つ新しい脱硫酸化酵素(Sulf1およびSulf2)を発見し、ヘパラン硫酸(HS)鎖の機能調節における脱硫酸化の重要性を示した(図1)。最近になりこれらSULF遺伝子と統合失調症、自閉症スペクトル障害との関連性が報告されている(Narayan et al 2008, Diaz-Beltran et al 2016)。一方、放射線学領域においては、脳構造の微細な変化をin vivoで評価するツールとして、種々の拡散MRI解析が近年に提案され、脳の微細構造や神経ネットワークの変化を検出することが可能となってきた。拡散MRIは、組織内の水分子拡散を通して、脳白質・灰白質の微細構造を定量化することが可能であり、神経軸索や樹状突起の密度、方向分散の程度も定量可能となってきている。誘導の分子基盤の進歩と拡散MRI解析の進歩を併せることにより、精緻な回路網形成等の各段階でのエラーを診断することが可能になりつつある。

図1 Sulf1とSulf2によるHS鎖の脱硫酸化による制御
筑波大学プレスリリースより (Scientific Reports 2017)



2. 研究の目的

本研究の目的は、脱硫酸化酵素の遺伝的欠損マウスの脳を用いて拡散MRI解析と共焦点顕微鏡画像3D構築による神経回路形成異常のマッピングを精緻に行い、Sulfataseの機能解明に加え、微細な構造異常を伴う精神神経疾患のサロゲートマーカーの探索に寄与することである。

神経科学者として軸索ガイダンス分子(榊研究室)とDTI研究(青木研究室)の代表的研究室

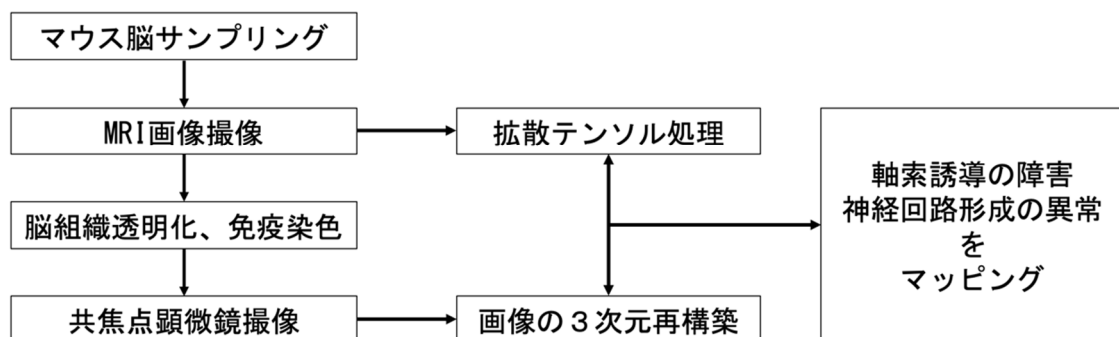
との議論のもと、神経ネットワークの正しい回路形成における細胞外マトリックス、特に HS 鎖の理解を深め、自閉症スペクトラム障害や統合失調症などの神経発達障害の生理学、病理学的理解を深める新しい知見を加える。

3. 研究の方法

野生型マウスと *Sulf1/2* 欠損マウスの神経線維束走行を定量的かつ視覚的に評価するため、各種 MRI 定量マップ (FA、MD など) および全脳トラクトグラフィを実施した。MRI 解析後、CUBIC プロトコルと SCALE プロトコルを組み合わせることで脳組織のクリアランスを行いました。これにより、共焦点顕微鏡による高解像度の脳深部構造の解析が可能となった。そして、顕微鏡データは、IMARIS ソフトウェアを用いて 3 次元的に再構成された。つまり、MRI 解析で特定された神経線維束の異常がある領域を共焦点顕微鏡で組織検査することで、マウス全脳における軸索低形成の巨視的・微視的解析を行った。

さらに、ミエリン染色により正中線で観察された交連線維の形態変化を探るため、海馬背側交連線維の前向きなトレースと 3D 再構成を行った。

図 2



4. 研究成果

本研究では、*Sulf1/2* DKO マウス脳の交連線維を放射線学的および組織学的手法で解析した。線維トラクトグラフィ解析により、脳梁と海馬背側交連線維の異常を発見し、ミエリン染色と海馬背側交連線維の前行性トレースにより組織学的異常を確認した。MRI 解析の結果、脳梁と海馬背側交連線維の両方で流線が有意に減少していることが判明した。共焦点顕微鏡による解析では、*Sulf1/2* DKO マウスでは交連線維の大きさが減少していることが確認された。MRI 解析では、海馬背側交連線維の交差線維の数が減少していることが示唆されたが、組織学的解析では、海馬背側交連線維の面積は変わらず、一部の線維がより吻側で正中線を横断しているように見えた。これらの結果は、*Sulf1/2* が交叉線維の正常な発達に重要な役割を果たしていることを示すものである。

自閉症スペクトラムや統合失調症などの精神・神経疾患は、細胞の分化、移動、配列、シナプス形成、軸索誘導分子による詳細なネットワーク形成など、神経発達のエラーに起因すると提唱されている。そのため、脳における連結性障害を検出することは極めて重要である。しかし、従来の組織学的手法で脳の微視的な異常を同定することは、依然として困難である。本研究では、DTI が全脳で目的の神経路を検出できることを利用し、*Sulf1/2* DKO の脳で新規の交連性異常を発見した。その後、海馬背側交連線維の詳細な組織学的解析を行った。その結果、*Sulf1/2* DKO マウスの脳には、脳梁と海馬背側交連線維の両方に異常があることが明らかになりました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsuji Yusuke, Kerever Aurelien, Furukawa Toshiki, Kamagata Koji, Saito Yuya, Aoki Shigeki, Hata Junichi, Okano Hideyuki, Kobayashi Kenta, Okada Takuya, Miya Ken, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 88
2. 論文標題 Diffusion magnetic resonance tractography-based evaluation of commissural fiber abnormalities in a heparan sulfate endosulfatase-deficient mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Magnetic Resonance Imaging	6. 最初と最後の頁 123 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mri.2022.01.017	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 Kerever Aurelien, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 15
2. 論文標題 Optimal Extracellular Matrix Niches for Neurogenesis: Identifying Glycosaminoglycan Chain Composition in the Subventricular Neurogenic Zone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 4 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnana.2021.764458	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 Kerever Aurelien, Nagahara Fumina, Keino-Masu Kazuko, Masu Masayuki, van Kuppevelt Toin H, Viv?s Romain R, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 31
2. 論文標題 Regulation of fractone heparan sulfate composition in young and aged subventricular zone neurogenic niches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glycobiology	6. 最初と最後の頁 1531 ~ 1542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/glycob/cwab081	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 該当する

1. 著者名 Nonaka Risa, Iesaki Takafumi, Kerever Aurelien, Arikawa-Hirasawa Eri	4. 巻 23
2. 論文標題 Increased Risk of Aortic Dissection with Perlecan Deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 315 ~ 315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010315	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aurelien Kerever, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, Toin van Kuppevelt, Romain R. Vives, Eri Arikawa-Hirasawa.
2. 発表標題 Sulf1 and sulf2 contribution to fractones heparan sulfate composition in the neurogenic niche.
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会 2020年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hinata Nishimura, Tatsuki Ono, Kazuteru Murakoshi, Ryusei Abe, Aurelien Kerever, Eri Arikawa-Hirasawa.
2. 発表標題 Culture of oligodendrocyte on decellularized tissue for the study of cell/ECM interaction.
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会 2020年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furukawa Toshiki, Yusuke Tsuji, Aurelien Kerever, Yuya Saito, Koji Kamagata, Kazuko Keino-Masu, Masayuki Masu, Junichi Hata, Shigeki Aoki, Eri Arikawa-Hirasawa
2. 発表標題 Evaluation of corpus callosum abnormalities in heparan sulfate endosulfatase Sulf1/2 deficient brain
3. 学会等名 第53回 日本結合組織学会学術大会 2020年
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻裕介
2. 発表標題 Abnormality of corpus callosum in Sulf1/2 brain evaluated by diffusion tensor imaging
3. 学会等名 日本神経学会2020
4. 発表年 2020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	榎 正幸 (Masu Masayuki) (20243032)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	榎 和子 (Masu Kazuko) (50344883)	筑波大学・医学医療系・講師 (12102)	
研究 分担者	鎌形 康司 (Kamagata Koji) (60568153)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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