

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15898

研究課題名（和文）高等哺乳動物における進化的なoRG獲得の分子機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms underlying the evolution and development of oRG cells in higher mammals

研究代表者

松本 直之（Matsumoto, Naoyuki）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：20774756

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）：本研究では神経前駆細胞であるoRG細胞の分化制御機構を解析した。oRG細胞で発現が高い遺伝子を探索した結果、sonic hedgehog (Shh)シグナルがoRG細胞で活性化していることを発見した。フェレット大脳皮質でShhシグナルを活性化するとoRG細胞は増加し、逆に抑制すると減少した。Shhシグナルを活性化すると脳回が増加し、逆に抑制すると脳回形成が阻害されることも見いだした。さらにマウスよりもフェレットの大脳皮質でShhシグナルが強く活性化していた。この結果は、進化の過程で大脳皮質のShhシグナル活性が増加したことがoRG細胞増加と脳回形成につながったことを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトなどの高等哺乳動物の発達した大脳皮質には、外側放射状グリア(oRG)細胞と呼ばれる高等哺乳動物に特徴的な神経前駆細胞が存在しており、oRG細胞の進化的な増加が高等哺乳動物における大脳皮質の拡大及び高次脳機能の獲得基盤につながったと考えられている。本研究では、このoRG細胞の増加と脳回形成の分子機構を明らかにし、大脳の進化のメカニズムの一端を明らかにした。本研究で得られた成果は、高等哺乳動物に特徴的なoRG細胞の分化制御機構や大脳の進化機構の解明といった神経科学への貢献のみならず、脳異常疾患の病態解明にも発展するなど社会的波及効果も大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the mechanisms underlying the differentiation of oRG cells, which are neural progenitors. We searched for genes that were highly expressed in oRG cells and found that sonic hedgehog (Shh) signaling was activated in oRG cells. Activation of Shh signaling in the ferret cerebral cortex increased oRG cells, and conversely suppression of Shh signaling decreased oRG cells. We also found that activation of Shh signaling increased cortical folding, and conversely, suppressing it inhibited cortical folding. Furthermore, Shh signaling was more activated in the cerebral cortex of the ferret than in that of the mouse. These results indicate that increased Shh signaling activity in the cerebral cortex during evolution led to an increase in oRG cells and cortical folding.

研究分野：神経発生学

キーワード：神経前駆細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の大脳皮質は高次脳機能の基盤である。ヒトなどの発達した大脳皮質では、その形成期に神経前駆細胞領域である外側脳室下帯(OSVZ)が存在することが特徴である。OSVZは高等哺乳動物に特徴的な神経前駆細胞である外側放射状グリア(oRG)細胞で構成されている。この進化的なoRG細胞の増加は、高等哺乳動物の大脳皮質における神経細胞数の増加および高次脳機能の獲得に重要であったと考えられている。従って、oRG細胞の増殖や分化の制御機構およびその機能的意義の解明は重要研究課題のひとつである。

近年、oRG細胞の増殖や分化の制御に関わる遺伝子を同定するため、RNA-seqを用いた網羅的解析が行われ、oRG細胞に発現する遺伝子が報告されている。しかし、実際にoRG細胞の増殖・分化の制御に関わる遺伝子はあまり明らかになっていなかった。この主な理由として、oRG細胞をもつ高等哺乳動物では遺伝子操作が困難であり、遺伝子機能解析が困難であったことが挙げられる。このような背景から当研究室では、oRG細胞を持つ食肉類哺乳動物フェレットに着目し、世界に先駆けてフェレットに遺伝子操作技術を導入してきた(1, 2)。フェレット大脳皮質に子宮内電気穿孔法を応用することに成功し、フェレット大脳皮質で迅速かつ簡便に遺伝子操作をすることが可能となった。そこで我々はこれらの技術を用いてoRG細胞の増殖や分化を制御する分子メカニズムを解析することとした。

2. 研究の目的

上述のようにフェレット大脳皮質における遺伝子操作が可能となったことから、まずoRG細胞の増殖を制御する分子メカニズムを解析し、線維芽細胞増殖因子(FGF)シグナルがoRG細胞の増殖を制御していることを明らかにしてきた(3, 4)。発生期のフェレット大脳皮質にFGFを導入するとoRG細胞の増殖が促進され、逆に優性不能型FGFレセプターを導入するとoRG細胞の増殖が抑制された。さらにFGFシグナルが脳回形成に重要であることも明らかにした(3, 4)。oRG細胞の増殖の制御メカニズムが明らかとなったことから、次の重要な点はoRG細胞の分化の制御メカニズムである。そこで本研究課題では、我々の独自のフェレット遺伝子操作技術を駆使して、oRGの分化制御を司る分子基盤の解析を目的とした。我々の解析の結果、下記のようにoRG細胞に新しいサブタイプがあること、ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナルがoRG細胞の分化制御に重要であることが明らかとなった(5)。本研究で得られた成果は、高等哺乳動物に特徴的なoRG細胞の増殖や分化の制御機構の解明といった神経科学への貢献のみならず、巨脳症や小頭症などの脳異常疾患の病態解明にも発展するなど社会的な波及効果も大きい。

3. 研究の方法

(1)免疫組織染色法

還流固定した脳からクリオスタットを用いて厚さ20-50 μ mの切片を作成した。切片を2%ウシ血清アルブミン/0.3% Triton X-100/PBSでブロッキングした後に、一次抗体と4 $^{\circ}$ C一晩反応させた。洗浄した後に蛍光標識2次抗体およびHoechst 33342と室温3時間反応させた。洗浄した後に包埋した。なお抗Ki-67抗体を用いる際には、あらかじめクエン酸バッファーと電子レンジを用いて抗原賦活化を行った。

(2)EdU 標識

まずEdUを1mg/mlの濃度でPBSに溶解した。腹腔内に10mg/kg体重のEdUを注入した28時間後にサンプリングを行った。Click-iT EdU Alexa Fluor Imaging Kitを用いてEdUを可視化した。

(3)In situ hybridization

作成した切片を4%PFAで10分間、proteinase Kで10分間、0.25%無水酢酸で10分間処理した。ジゴキシンゲニン標識RNAプローブで一晩処理した後に洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシンゲニン抗体と反応させた後にNBT/BCIPで発色した。

(4)ウエスタンブロット

SDS-PAGEで電気泳動した後に、PVDF膜へと転写した。1次抗体で一晩反応させた後に洗浄し、2次抗体と反応させ、ECL Plusキットで発色した。

(5)RT-PCR

脳組織よりRNAを抽出した後に、DNaseIでゲノムDNAを除去した。Superscript IIIでcDNAを作成したのちに、各遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRを行った。大脳における発現量は、小脳での発現量で正規化したのちに定量に用いた。

(6)プラスミド

pCAG-EGFP, pCAG-Hhip Δ C22, pCAG-Shh-N を用いた。プラスミドは Endofree Plasmid Maxi Kit を用いて精製した。子宮内電気穿孔法には、プラスミドを混ぜた後に 0.5% FastGreen を添加して用いた。

4. 研究成果

(1) oRG 細胞は HOPX 陽性および HOPX 陰性の 2 群に分けられる。

oRG 細胞に発現する遺伝子を詳細に解析したところ、転写因子 HOPX が一部の oRG 細胞でのみ発現していることを見いだした。HOPX 陽性および HOPX 陰性 oRG 細胞の特性を解析したところ、細胞増殖の頻度はほぼ同じだが、未分化性の維持能が HOPX 陽性 oRG 細胞で高いことが分かった。また HOPX 陽性 oRG 細胞は将来脳回になる部位にとくに集積していることを見いだした。これらの結果から、oRG 細胞のなかにも性質の異なる 2 群のサブタイプが存在することが分かった。

(2) Shh シグナルが HOPX 陽性 oRG 細胞の分化を抑制している。

HOPX 陽性 oRG 細胞で発現が高い遺伝子を探索したところ、Gli1 が強く発現していることを見いだした。Gli1 は、Shh シグナルの活性化によりその発現が誘導されることが知られていることから、この結果は HOPX 陽性 oRG 細胞で Shh シグナルが活性化していることを示唆している。そこで Hhip Δ C22 をフェレット大脳皮質に発現させて Shh シグナルを阻害したところ、HOPX 陽性 oRG 細胞の未分化維持能が低下したが、増殖には影響がないことがわかった。また Hhip Δ C22 により HOPX 陽性 oRG 細胞は減少し、逆に Shh リガンドを大脳皮質に導入すると HOPX 陽性 oRG 細胞は増加していた (図 1)。これらの結果は、Shh シグナルは HOPX 陽性 oRG 細胞の未分化性を維持しており、その結果として HOPX 陽性 oRG 細胞の数を増やしていることを示唆している。

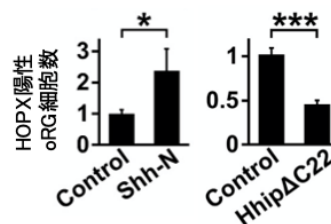


図1. ShhシグナルのHOPX陽性oRG細胞数に与える影響。Shh-Nにより増加し(左)、Hhip Δ C22により減少した(右)。* p <0.05, *** p <0.001

(3) Shh シグナルは脳回形成を制御している。

進化における oRG 細胞の増加が、脳回の形成につながったと考えられている。我々の解析の結果、Shh シグナルが HOPX 陽性 oRG 細胞数を増加させていたことから、Shh シグナルが脳回形成を制御しているか検討した。Shh リガンドをフェレット大脳皮質に導入して Shh シグナルを活性化すると脳回の数が増加した (図 2)。逆に Hhip Δ C22 を導入して Shh シグナルを抑制すると、脳回形成が阻害されることが分かった (図 2)。これらの結果は、Shh シグナルが脳回形成を制御することを示唆している。

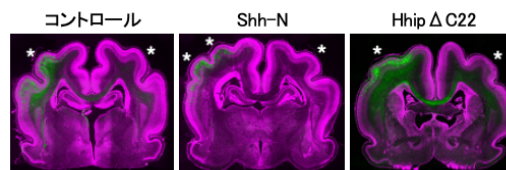


図2. Shhシグナルの脳回形成に与える影響。冠状断切片を示す。Shh-Nにより脳回は増加し(中)、Hhip Δ C22により減少した(右)。

(4) Shh シグナルはマウスよりもフェレットで強く活性化している。

マウスに比べてフェレットの大脳皮質では oRG 細胞数は著しく増加しており、またマウスには脳回はないがフェレットには多くの脳回がある。Shh シグナルが oRG 細胞数および脳回形成を制御していたことから、Shh シグナル活性がマウスとフェレットで異なる可能性が考えられた。そこで、Shh シグナルによって発現が高まる Gli1 の発現を検討したところ、in situ hybridization および RT-PCR で Gli1 mRNA がフェレット大脳皮質で多く発現していることを見いだした。またウエスタンブロットで検討したところ、Shh リガンドの量がマウスよりもフェレットの大脳皮質で多いことを見いだした (図 3)。これらの結果は、Shh シグナルはマウスよりもフェレットで強く活性化しており、それが oRG 細胞の増加と脳回形成につながっている可能性が示唆された。

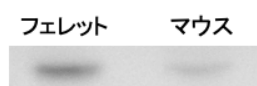


図3. 大脳皮質におけるShhの発現量。ウエスタンブロットの結果を示す。

<引用文献>

1. Kawasaki H, Iwai L, Tanno K. Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. Mol Brain. 2012;5:24.
2. Shinmyo Y, Terashita Y, Dinh Duong TA, Horiike T, Kawasumi M, Hosomichi K, et al. Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. Cell Rep. 2017;20(9):2131-2143.
3. Masuda K, Toda T, Shinmyo Y, Ebisu H, Hoshiba Y, Wakimoto M, et al. Pathophysiological analyses of

cortical malformation using gyrencephalic mammals. *Sci Rep.* 2015;5:15370.

4. Matsumoto N, Shinmyo Y, Ichikawa Y, Kawasaki H. Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. *eLife.* 2017;6:e29285.

5. Matsumoto N, Tanaka S, Horiike T, Shinmyo Y, Kawasaki H. A discrete subtype of neural progenitor crucial for cortical folding in the gyrencephalic mammalian brain. *eLife.* 2020;9:e54873.

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 3件）

1. 著者名 Morita K., Matsumoto N., Saito K., Hamabe-Horiike T., Mizuguchi K., Shinmyo Y. and Kawasaki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 BMP signaling alters aquaporin-4 expression in the mouse cerebral cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10540
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Matsumoto Naoyuki, Tanaka Satoshi, Horiike Toshihide, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 9
2. 論文標題 A discrete subtype of neural progenitor crucial for cortical folding in the gyrencephalic mammalian brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e54873
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.54873	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 Kagami Kyosuke, Ono Masanori, Iizuka Takashi, Matsumoto Takeo, Hosono Takashi, Sekizuka-Kagami Naomi, Shinmyo Yohei, Kawasaki Hiroshi, Fujiwara Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel third mesh-like myometrial layer connects the longitudinal and circular muscle fibers - A potential stratum to coordinate uterine contractions-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65299-0	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本 直之, 田中 智, 堀池 俊秀, 新明 洋平, 河崎 洋志
2. 発表標題 フェレット大脳皮質の外側放射状グリア増加と脳回形成におけるShhシグナルの役割
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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