

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22665

研究課題名（和文）新規遺伝スイッチを用いた鳥類大脳神経回路形成機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Avian Cortical Neural Circuit Formation Using a Novel Genetic Switch

研究代表者

隈元 拓馬（KUMAMOTO, Takuma）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・主席研究員

研究者番号：10570880

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は生物種特異的な大脳外套構造を生み出す発生学的基盤を明らかにするため、研究代表者が開発したiOnスイッチの改良と鳥類脳の時空間的イメージングの整備に取り組んだ。iOnスイッチの改良では、5色のバージョンと細胞内局在タグを付加したiOnスイッチも作製した。イメージングに関しては、Scale法を用いてクローン標識鳥類脳スライス及び全脳を透明化し、共焦点顕微鏡を用いて1細胞レベルで撮影することに成功した。また、全脳透明化脳の光シート顕微鏡撮影法の条件検討と、脳スライスを用いたタイムラプスイメージングを行った。これらの検討から、iOnスイッチが従来のツールよりも正確なデータが取れることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

異なる生物種の脳構築を比較し、生物種間共通もしくは生物種特異的なメカニズムを同定することは、脳進化を知る上で必要不可欠である。これまで遺伝子改変生物の充実しているマウスでは詳細な脳発生メカニズムの解析が行われてきているが、鳥類など遺伝子改変生物樹立の難しい生物では困難であった。近年研究代表者の開発したiOnスイッチは、非モデル生物における詳細な発生解析を可能にするツールであるが、未だ発展途上であった。本研究ではiOnツールの拡充と、鳥類脳研究におけるiOnスイッチを用いた条件検討を行った。本研究はiOnスイッチを用いた脳進化発生研究を進める上で重要な情報を網羅した結果となるだろう。

研究成果の概要（英文）：In this study, I have improved the iOn switch, a genome integration-dependent genetic switch, and developed a spatiotemporal imaging method for the avian brain model. The aim was to understand the developmental process involved in the generation of species-specific pallium structures. For the improved iOn tools, I have produced iOn switches with 5 different colors, with or without a subcellular localization tag. For the imaging part, I successfully made thick brain slices of clonally labeled chick brains transparent using the Scale method. These slices were then imaged at the single-cell level by confocal microscopy. Additionally, we investigated the conditions for light-sheet microscopy of the whole-brain transparency of iOn-labeled chick brain, and time-lapse imaging using brain slices. These results indicate that the iOn switch can acquire more accurate data than the conventional methods.

研究分野：脳進化発生

キーワード：遺伝スイッチ 鳥類脳 神経発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は脊椎動物において感覚情報の処理や、それに応じた判断や行動、ヒトにおける精神活動などのあらゆる認知活動を支えている。脊椎動物の進化の過程で、特に哺乳類と鳥類では大脳が発達して肥大化し、高次脳機能を担ってきた。一方で大脳における神経細胞の配置様式は、哺乳類と鳥類では大きな違いがあることもわかっている。では、それぞれの種の大脳はどのように進化してきたのだろうか？比較進化発生学的観点からこの問いに取り組むことは、最終的にはヒト脳の成り立ちや由来に対する新知見をもたらす、様々な脳先天疾患の原因究明や治療法開発への貢献が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では哺乳類と非哺乳類の大脳の発生過程の比較解析を行うことで、生物種に特異的な大脳外套構造を生み出す発生学的基盤を明らかにすることを目的とした。哺乳類の大脳皮質は、神経細胞の放射状の移動を介して「インサイドアウト」型の6層構造を有し、膨大な数の神経細胞が整然と配置される。一方鳥類の大脳皮質相同領域である「外套」は、哺乳類と同じ機能を持つ神経細胞が空間的に配置される核型の大脳構造をとる。このような構造の違いはあるが、神経回路の入出力部位に関しては哺乳類と鳥類で共通性が確認されている。例えば、哺乳類では末梢からの感覚入力が視床を介して第4層へ入り、情報処理を第2・3層、そして第5・6層から出力する神経回路が存在する。一方、鳥類では、哺乳類での第4層特異的遺伝子の発現が鳥類大脳の入力処理部位とされる内外套に、また第5層特異的遺伝子の発現が出力処理部位とされる高外套にみられる。又、興味深いことに、神経幹細胞に関しても鳥類と哺乳類は同じ分化能が備わっていることが報告された。そのような共通性があるにもかかわらず、なぜ大脳の構造には大きな隔りがあるのか？哺乳類の大脳新皮質構築過程に比べ、鳥類の大脳の構築メカニズムに関しては、その移動様式も含めてほとんどわかっていない。この問題を解明するためには、遺伝子改変生物レベルの精度が高く、クローン単位かつ全脳データを統合した「細胞系譜解析」が必要である。しかしながら、遺伝子改変が一般的でないニワトリの場合、正確な系譜解析はこれまで不可能であった。

本研究は、技術的に不可能であったニワトリ胚における精密な系譜解析を、近年研究代表者が開発したゲノム挿入依存的遺伝スイッチ (iOn スイッチ) と最新のイメージング技術を用いて、大脳外套細胞の核型配置機構を解明していくという独自性を有する。

3. 研究の方法

上記目的を遂行するため、(1) 部位誕生日特異的細胞系譜のデータベース化を、全脳レベルで進める。さらに発展研究として、神経細胞の移動規則性を明らかにするため、(2) 多重クローンをリアルタイムに追跡できる、ニワトリ大脳ライブイメージング法をあらたに確立し、細胞分化と移動パターンを解明する。

(1) ニワトリ大脳背側外套細胞系譜のデータベース化

ニワトリ胚大脳神経細胞を標識するため、マルチカラー iOn プラスミド (BFP/CFP/YFP) を新たに作製する。また核局在ヒストン H2B タグをつなげた RFP (H2BRFP) プラスミドを作製し、iOn

プラスミドと共導入する。H2BRFP は細胞分化ごとに蛍光強度が半減し、最大で4分裂まで把握できる。H2BRFP を i0n と共導入することで、クローン内細胞の誕生時期も同時に解析する。

マルチカラー i0n プラスミドと核局在型 RFP プラスミドの作製

原理上最大で5色 (BFP/CFP/YFP/RFP/IRFP) まで同時イメージングが可能なので、i0n-BFP/CFP/YFP プラスミドを新たに作製する。RFP/IRFP はすでに作製済みである。並行して、核局在型 RFP (*CAG::H2BRFP*) も作製する。

ニワトリ胚大脳への遺伝子導入と細胞標識

i0n プラスミドをニワトリ胚へ電気穿孔法により導入する。また導入部位を細胞分化速度の違う4箇所 (M/DM/ML/L)、困難な場合は2箇所 (M/L) にわけ、部位由来の異なるクローン形成パターンを可視化する。

ニワトリ胚大脳の固定と組織透明化 (CUBIC もしくは SeeDB2 法)

ニワトリの神経細胞は前後に広く移動すると考えられている。クローン構成細胞を全て可視化するため、通常よりも厚いスライスを準備し、作動距離の長いレンズを用いてイメージングを行う。場合により組織透明化法で深部観察を容易にし、イメージングの漏れがない様にする。

神経細胞サブタイプの遺伝子マーカーを用いた免疫染色

配置後の細胞機能を評価するため、層マーカー遺伝子 *RoRb/Etv1/Fezf2/Satb2* などを用いて、固定後染色を行う。i0n 3色 + H2BRFP + マーカー発現の5色の組み合わせは可能である。

共焦点顕微鏡を用いた大規模イメージングと3次元再構築

- で準備した半球脳サンプルのイメージングを行い、再構成して3次元画像にする。

画像の定量解析と系譜細胞データベース化

画像データが揃ったら、その分布から起点となる幹細胞領域、産生細胞数と誕生日、移動パターンそして配置後の細胞の遺伝子発現をまとめ、データベース化する。

(2) ライブイメージングを用いた細胞移動規則性の解析

次にニワトリ神経細胞の細胞移動規則性を探るため、多色クローン標識した大脳スライスを用いてライブイメージングを行う。そこでこれまでの経験をもとに、マルチカラー i0n プラスミドで標識したニワトリ大脳外套スライスを用いて、2日程度のライブイメージングを行う。i0n プラスミドは DNA 発現量のばらつきを抑えることができ、ライブイメージング実験に有効である。計画(1)のデータの進展をみてライブイメージングの条件検討を始め、期間内に可能な限りデータを取得する。

4. 研究成果

(1) ニワトリ大脳背側外套細胞系譜のデータベース化を行うための i0n プラスミドの拡充。本研究開始時までに作っていた i0n プラスミドは3色 (GFP/RFP/IRFP) しかなかったため、新たに CFP/YFP の作製を行った。さらに細胞内局在によって遺伝子発現を識別するために核局在型 i0n プラスミドを5色、膜局在型、ミトコンドリア局在型などの i0n プラスミドも作製した。

(2) ニワトリ胚大脳への遺伝子導入は、場所特異的に遺伝子導入をできるように手技の工場を行った。また背側と腹側の導入を正確に行うため、それぞれ特異的なプロモーターを持つ Cre プラスミドを用いた部位特異的遺伝子導入法を確立した。

(3) 大きな鳥類脳においてクローン細胞全系譜を一度に撮影するため、透明化脳全脳イメージングを行った。透明化には CUBIC 法を用い、透明化した脳を研究所にある光シート顕微鏡で撮影した。しかし、当研究所の光シート顕微鏡ではサイズの問題で不具合が生じたため、途中から東京都健康長寿医療センターの西宗博士・豊田博士と共同で、健康長寿医療センターの Zwiss Lightsheet7 を用いた撮影を試みている。その条件検討は現在進行中である。

(4) 全脳透明化と並行して、500um 厚の極厚スライスを、Scale 法により透明化し、共焦点顕微鏡を用いて、シングルセルレベルの解像度で且つ可能な限り全ての系譜が収まるように画像取得を行う方法を確立した。その後 3 次元構築することで、系譜間の細胞がどのような細胞で構成されているのか形態レベルでの判別が可能となった。しかしながらこの手法では、抗体染色を行うことができないので、その点を改良する必要がある。

(5) ニワトリ発生脳を用いたタイムラプスイメージングの条件検討を行い、iOns スイッチを用いた希釈標識、多色標識の条件を決め、3 日間程度のイメージングを行えるようになった。iOn スイッチを用いることで、既存のプラスミドよりも鮮明な画像を撮ることができ、様々なステージのデータを取得することに成功した。

当該研究期間内にニワトリ脳背側外套細胞系譜のデータベース化を作製することはできなかったが、それを可能にする遺伝ツールの拡充と、技術の確立は終えることができた。本研究内容は現在国際雑誌投稿に向けての準備の最終段階に入っており、2023 年度中の雑誌掲載を目指している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kumamoto T, Tsurugizawa T. | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Potential of Multiscale Astrocyte Imaging for Revealing Mechanisms Underlying Neurodevelopmental Disorders. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci. | 6. 最初と最後の頁 10312 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms221910312 | 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 Kumamoto T, Ohtaka-Maruyama C. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Visualizing Cortical Development and Evolution: A Toolkit Update | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Front. Neurosci. | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.876406 | 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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuma Kumamoto, Xianghe Song, Chiaki Ohtaka-Maruyama |
| 2. 発表標題 Analysis of the timing and distribution of glial cells in the developing chick pallium |
| 3. 学会等名 Neuro2022（国際学会） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takuma Kumamoto, Kyosuke Wada, Chiaki Ohtaka-Maruyama |
| 2. 発表標題 iOn switch is a novel neural lineage tracing tool in the chick cortex |
| 3. 学会等名 第44回日本神経科学大会・CJK第1回国際会議（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 隈元 拓馬 |
| 2. 発表標題 新規トランスポゾンベクターの開発 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>研究者個人のホームページ https://takumakumamoto.wixsite.com/mysite 脳神経回路形成プロジェクトホームページ https://www.igakuken.or.jp/regeneration/</p> |
|--|

| | | | |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 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 |
|---------|---------|