

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890046

研究課題名（和文） 大脳皮質における回路網形成機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of neural circuit formation in the cerebral cortex

研究代表者

徳永 暁憲 (AKINORI TOKUNAGA)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70549451

研究成果の概要（和文）：

発生過程において個々のニューロンがどのような分子メカニズムによって神経回路網を形成するのか?その形成過程の詳細は不明である。そこで局在化シグナルを付加した GFP トレーサーを子宮内電気穿孔法により胎児脳に導入し、発生期大脳皮質の神経細胞の可視化を行った。また子宮内電気穿孔法を用いて、神経分化や回路網形成に関わる事が予想された分化制御因子の強制発現及びノックダウン実験を行い、複数の機能的な制御因子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

The molecular mechanism of regulating the patterning of neural circuits in developing brain had remained unclear. Therefore we introduced the GFP tracer into developing mouse brain by in utero electroporation to visualize cerebrocortical neuronal cells and the circuits. This method was useful for analyzing the candidate genes concerned with neuronal differentiation and the circuitry formation. By using this method, we identified several functional genes and generated conditional knockout mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010 年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：神経発生，神経回路網，発生工学

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで神経幹細胞(Radial Glia)からの神経前駆細胞、ニューロンへの分化様式に関する研究を行ってきた。神経幹細

胞は複雑な中枢神経系を構築する上で基盤となる細胞であり、神経幹細胞からはニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト

といった中枢神経系を構成する細胞が産み出される。特にニューロンへの分化に関しては様々な転写因子の同定及びその解析から神経分化の制御機構が明らかにされつつある。特に解析の進んでいる大脳皮質は6層の神経層より構成されており、マウスでは胎生期 11.5-12.5 日の脳室周囲に存在する神経幹/前駆細胞より第6層を含む深層のニューロンが産み出され、その後第3-5層、第2, 3層のニューロンが産み出される。この分化機構には幹細胞/前駆細胞に発現している未分化維持や神経分化に働く転写因子及びLayer特異的発現を示す転写因子(Satb2, CTIP2 等)が働いており、経時的に発現する事でニューロンのサブタイプを制御すると考えられている。

しかしながら発生期に産み出されたニューロンがその後どのように回路網形成を行うのか?そのメカニズムは依然不明な点が多い。大脳皮質は外部からの情報を処理し記憶するために必要不可欠な領域である。また、その機能を果たす上で情報移送の中継地点としての役割を担う視床等を介して様々な脳領域と連絡しネットワークを形成して働いている。個々のニューロンが統合的に脳としての機能を発揮するためには適切な回路網形成が必須であり関連したニューロン同士が発生過程においてどのような時期にどのような機構で回路網を構築しているかを明らかにすることが重要な課題と考えられた。

2. 研究の目的

発生過程での神経回路網形成に関わる知見が乏しい現状から、申請者は特定のプロモーター制御下でGFP蛋白質を発現するベクターを構築し、子宮内電気穿孔法(In Utero Electroporation 法)を用いて胎生期大脳皮質の前駆細胞集団への遺伝子導入を行う事で、胎生期大脳皮質の神経回路網の可視化を試みた。また本研究で用いるIUE法により神経分化、

回路網形成に関わる事が予想された候補因子を胎児脳にGFPと共導入し、神経細胞の移動度を指標として、その神経分化に及ぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

本研究では、大脳皮質における神経ネットワークの可視化、および神経分化や回路網形成に関わる新規因子の同定を目的に実験を行った。

(1) ES 細胞から神経幹細胞、神経細胞への分化誘導実験 : In vitro においてES 細胞からEmbryoid Body 様の細胞塊を介して高効率に神経細胞へ分化誘導するSFEBq (Serum free embryoid body)法(Eiraku *et al.*, 2008)を用い検討した。またES細胞に神経分化に関わる候補因子を導入し、強制発現及びノックダウン実験を行い、その機能を検討した。

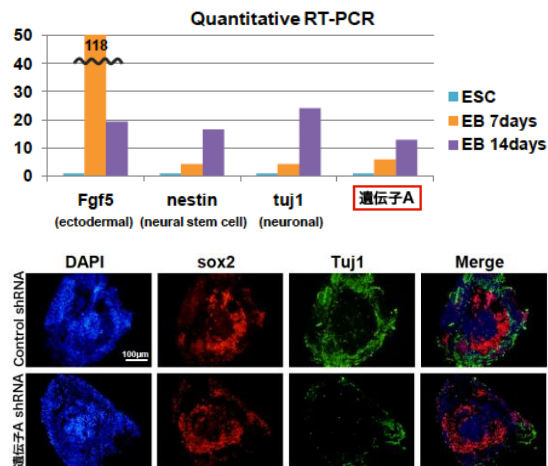
(2) 電気穿孔法による神経細胞の可視化
胎生期の脳においてニューロンは前駆細胞から分化すると特定の位置(層)へと移動し神経回路を形成する。そこで生体を用いた神経系の解析にはIUE法を用いて胎生期大脳皮質(胎生期13.5日胚)の前駆細胞集団へGFPトレーサーの遺伝子導入を行った。まず大脳皮質の神経回路の可視化を目的として恒常活性を示すCAG プロモーター制御下で局在化GFPを発現するコンストラクトを作製した。作製したGFPトレーサーを胎生期13.5 日の脳室へ電気穿孔法により導入しE16.5, 生後0日(P0), P10での解析を行った。またIUE法を用いて候補因子を共導入し解析を行った。

(3) 本研究より神経分化に関わる事が見出された遺伝子に関してコンディショナル KO マウスの作成を行った。

4. 研究成果

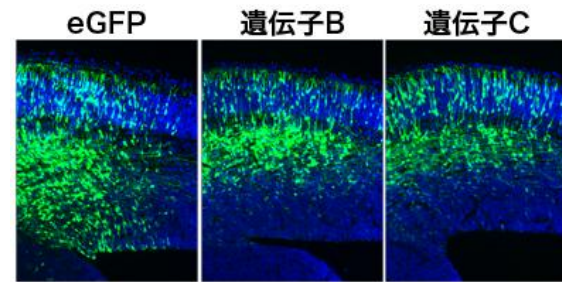
(1) In vitro において ES 細胞からの神経細胞への分化誘導実験を行い 10%, 15% KSR

(KnockOut Serum Replacement) を含む培養液中で ES 細胞から胚様体 (Embryoid body) を形成させ、次に B27/N2/bFGF を含む無血清培地に胚様体を移して神経系の細胞を内包する細胞塊を作成した。ほぼ全ての細胞が Nestin, Sox2 陽性の神経前駆細胞を経て TuJ1 陽性のニューロンへと分化しており、また BF1, Tbr2 陽性の脳皮質型ニューロンへと効率良く分化している事が観察された。ES 細胞は容易に遺伝子を導入する事が出来るため、本研究には ES 細胞からの神経誘導を用いた系は有用であった。マウス発生期の脳皮質に発現している候補因子の過剰発現、ノックダウン実験を行い神経分化制御に働く候補因子を同定した。ノックダウン実験から遺伝子 A が神経分化に必要な因子である事が見出された。



(図 1:ES 細胞及び EB での遺伝子発現)
 (図 2:遺伝子 A のノックダウンにより神経分化が抑制された。)
 (2) In vivo においては、CAG プロモーター制御下で GFP トレーサーを発現するベクターを構築し、子宮内電気穿孔法 (IUE: In Utero Electroporation 法) を用いて胎生期脳皮質 (胎生期 13.5 日胚) の前駆細胞集団への遺伝子導入を行った。その結果、脳室に存在する前駆細胞に効率よくトレーサーが導入され、4 日後 (胎生期 17.5 日胚) の脳組織切片上

で神経分化に伴う神経突起伸張及び投射経路が観察された。本実験系を用いて神経分化に関わる候補因子の強制発現を行った。



(図 3: IUE [E13.5-E16.5] 強制発現により遺伝子 B, C は神経分化を促進する)

(3) 個体レベルでの解析を目的に、遺伝子 A, B の conditional knockout マウスの作成を行った。その際には C57BL6 由来 ES 細胞を用いた。高効率での Germline transmission が確認された。C57BL6 由来 ES 細胞より作成された遺伝子改変マウスは遺伝子背景 (genetic background) が均一なため back-cross の必要がなく有用である。今後これらの改変マウスの解析を通して発生期の神経回路網形成に関わる分子機構の解析を進める。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Kohyama J, Sanosaka T, Tokunaga A, Takatsuka E, Tsujimura K, Okano H, Nakashima K. BMP-induced REST regulates the establishment and maintenance of astrocytic identity. *J Cell Biol.* 189(1): 159-170. (2010) 査読有
- (2) Shibayama M, Ohno S, Osaka T, Sakamoto R, Tokunaga A, Nakatake Y, Sato M, Yoshida N. Polypyrimidine tract-binding protein is essential for early mouse development and embryonic stem cell proliferation. *FEBS J.* 276(22): 6658-6668. (2009) 査読有
- (3) Murata J, Ohtsuka T, Tokunaga A, Nishiike S, Inohara H, Okano H, Kageyama R. Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the

transcriptional down-regulation of p27 (Kip1). J Neurosci Res. 87(16): 3521- 3534 (2009) 査読有

(2)研究分担者
なし

[学会発表] (計4件)

(3)連携研究者
なし

(1) 福田 剛、徳永 暁憲、吉田 進昭 Targeted disruption of Fbxl10 causes neural tube defects resulting in exencephaly 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月8日 神戸

(2) 柴寄 孝幸、徳永 暁憲、吉田 進昭 PTB deficiency in the brain disrupts dorsal neuroepithelium of the lateral ventricles and leads lethal hydrocephalus 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月8日 神戸

(3) 正木 信也、徳永 暁憲、吉田 進昭 Functional analysis of nPTB, nervous system specific RNA binding protein 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会大会 2010年12月7日 神戸

(4) 柴寄 孝幸、徳永 暁憲、吉田 進昭 Polypyrimidine tract binding protein regulates alternative splicing of Numb exon9 第32回日本分子生物学会 2009年12月11日 横浜

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○ 出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ

http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/cem_ger/HP/identshikinou/main.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳永 暁憲 (TOKUNAGA AKINORI)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70549451