

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06741

研究課題名(和文) Toll様受容体を介した脳室下帯神経幹細胞の発生制御の脳溝・脳回形成への寄与

研究課題名(英文) Contributions of Toll-like receptor-mediated regulations of proliferation and differentiation of subventricular zone neural stem cells on sulcogyrogenesis

研究代表者

澤田 和彦 (Sawada, Kazuhiko)

つくば国際大学・医療保健学部・教授(移行)

研究者番号：10284324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生後6,7日齢のフェレット仔に500 µg/g 体重のリポポリサッカリド(LPS)を投与した。LPS投与直後の7日齢では、大脳皮質の脳室下帯においてbasal radial glia(神経幹細胞)およびintermediate progenitors(IPs; 神経前駆細胞)の増殖がLPS曝露により促された。また、LPS曝露によりIPsから皮質ニューロンへの分化も促進された。20日齢の仔の脳は固定後にMRI計測し、脳溝形成の定量評価を行った。LPS曝露により前頭領域と頭頂領域の脳溝形成頻度が対照群に比べて低くことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポポリサッカリド(LPS)はグラム陰性菌の内毒素で、動物を用いた胎生期/新生仔期の曝露実験は、仔動物の自閉スペクトラム症(ASD)様行動異常を引き起こす。本研究では、新生仔期のLPS曝露が大脳皮質の発生においてintermediate progenitors(神経前駆細胞)からの皮質ニューロンの産生を促し、脳溝形成に影響を及ぼすことが明らかにした。この結果は、ASD様行動異常に関連した大脳皮質の形態異常がLPSによる皮質ニューロンの発生異常に起因することを示唆し、細菌感染による自然免疫の賦活化が脳発達障害を引き起こす可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Ferret pups were given a subcutaneous injection of lipopolysaccharide (LPS) at 500 µg/g of body weight on postnatal days (PDs) 6 and 7. Furthermore, EdU and BrdU were administered on PDs 5 and 7, respectively, to label the post-proliferative and proliferating cells in the subventricular zone (SVZ) of the developing cerebral cortex. LPS exposure facilitated the proliferation of SVZ progenitors, which consisted of the basal radial glia and intermediate progenitors (IPs), and the differentiation of IPs into immature cortical neurons on PD 7. T1-weight MR images were acquired from the fixed brains of LPS-exposed ferrets. LPS exposure decreased the degree of cortical infolding in the frontal and parietal cortical regions. The findings revealed that neonatal LPS exposure alters the sulcogyrogenesis in the cortex. This may be an outcome of LPS-mediated the differentiative division of intermediate progenitors during the cerebral corticohistogenesis.

研究分野：解剖学

キーワード：大脳皮質 脳溝 脳回 神経発生 リポポリサッカリド MRI

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

一部の哺乳動物では大脳皮質が著しく発達し、複雑な脳溝・脳回を形成する。発生過程の大脳皮質には脳室下帯(SVZ)が一時的に出現し、神経幹細胞(basal radial glial; bRG)や神経前駆細胞(intermediate progenitors; IPs)が存在し、その後の皮質の急激な拡張においてニューロンの供給源となることが知られている。とくにSVZの外層(oSVZ)では自己複製を繰り返すbRGが豊富にみられ、ヒトやサル、フェレットなどの高等哺乳動物において認知や社会性など高度な脳機能を支える発生基盤であると考えられている。我々はbRG由来ニューロンが大脳皮質の進化的拡張に関与することをフェレットを用いて明らかにした[1]。更に、大脳皮質の神経発生後期におけるバルプロ酸(VPA; ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤)の曝露により進化的拡張を示す皮質領域においてbRG由来ニューロンの増加と皮質の肥厚化に伴う脳溝の低形成を報告し[2]、脳溝・脳回の形成および形態的多様性に大脳皮質の神経発生が深く係わっていることを示した。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、脳溝・脳回の形成および形態的多様性の出現への自然免疫の関与を、Toll様受容体4型(TLR4)リガンドであるリポポリサッカリド(LPS)の大脳皮質神経発生に及ぼす影響から明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

妊娠フェレット10例を購入し、14例の雄仔を得た。このうち7例には生後6日齢と7日齢に500 mg/kg体重のLPSを腹腔内投与した。LPS投与の24時間前に新生する細胞をEdUにより、投与直後に新生する細胞をBrdUにより標識した。また、対照としてLPS非投与(EdUとBrdUのみ投与)の子7例を用意した。各群3例ずつについては、BrdU投与の2時間後(7日齢)に動物を4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。残りの動物(各群4例ずつ)については、一次脳回の形成が完了する20日齢に灌流固定した。

7日齢に採取した脳は、100 μm厚の凍結切片とし、抗BrdU抗体と神経発生(Pax6, Tbr2, Olig2, Cux1, Ctip2)、細胞周期・細胞増殖(Ki67, PH3, PCNA)およびアポトーシス(cleaved caspase 3)に対するマーカー抗体の免疫蛍光二重染色とClick-TによるEdU蛍光標識を組み合わせた蛍光多重染色を行った。セクショニング顕微鏡を用いて蛍光画像を取得し、Disector法により脳室下帯におけるEdU標識細胞、BrdU標識細胞、EdU/BrdU二重標識細胞の密度と各マーカー抗体に対する陽性率を計測・算出した。

20日齢に採取した脳については、7-tesla MRI装置を用いてT1強調MR画像を*ex vivo*で取得した。MR画像から画像解析ソフトを用いて大脳皮質の容積、大脳半球の前頭後頭極長、

大脳皮質の表面積、大脳皮質の厚さ、大脳皮質全体の脳回形成頻度(global-gyrification index; global-GI)、脳領域の脳溝形成頻度(regional-GI)を計測した。

### 4. 研究成果

7日齢では、EdU標識細胞は脳室下帯下層(iSVZ)に豊富に存在し、脳室下帯外層(oSVZ)では散在していた(図1)。BrdU標識細胞は、iSVZからoSVZにかけて散在していた(図1)。これらの細胞の大部分はEdUまたはBrdUで単独標識されていたが、一部はEdUとBrdUとで二重標識されていた。LPS投与群ではiSVZにおいてBrdU標識細胞の密度が有意に高かった(図2)。BrdU標識細胞の88%以上はPax6陽性であったため、LPSによりiSVZにおいてbRGおよびIPsの増殖促進が示唆された。LPS投与群では対照群に比べてBrdU標識細胞のPCNA陽性率とTbr2陽性率は有意に低く、逆にCtip2陽性率は有意に高く、LPSによりIPsからの皮質ニューロンへの分化が促されることが示唆された。

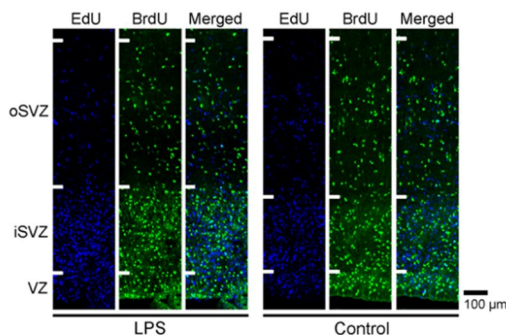


図1. 7日齢のLPS曝露フェレットおよび対照フェレットの脳室下帯におけるEdUとBrdUの蛍光標識[発表論文1のFigure 2Aを掲載].

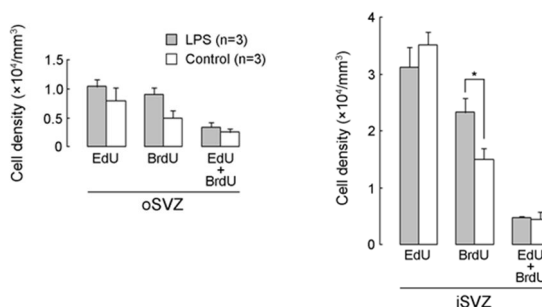


図2. 7日齢のLPS曝露フェレットおよび対象フェレットの脳室下帯内層(iSVZ)と外層(oSVZ)におけるEdU標識細胞とBrdU標識細胞の密度[発表論文1のFigure 3を掲載].

20日齢におけるT1強調画像を図3に示した。LPS曝露群では、対照群に比べて脳溝の位置が全体的に前方にシフトしていた。regional-GIは前頭領域と頭頂領域でLPS曝露群において有意に低く(図4)、前頭溝、外側溝、シルビウス上溝吻側部などこれらの領域を横断する脳溝の形成が甘くなっていることが示唆された。一方で大脳皮質の体積、大脳半球の前頭後頭極長、皮質厚、皮質表面積、global-GIはLPS曝露群と対照群とで有意な差はみられなかった(図5)。

以上の結果から、新生仔期のLPS曝露は、iSVZにおけるIPsからのニューロン新生を促し、脳溝形成に影響を及ぼすことが明らかになった。

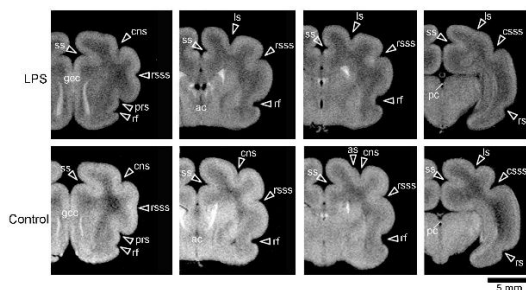


図3 .20日齢のLP曝露フェレットおよび対照フェレットの大脳の前頭断T1強調画像[未発表データ]。ac,前交連; cns,前頭溝; csss,シルビウス上溝吻側部; gcc,脳梁膝; ls,外側溝; pc,後交連; prs,前シルビウス溝; rf,嗅裂; rs,嗅溝; rsss,シルビウス上溝吻側部; ss,板状溝

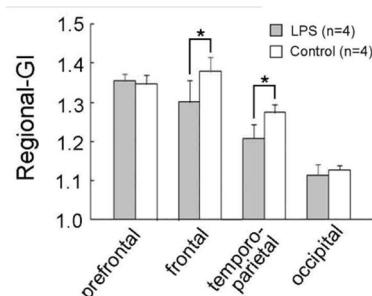


図4 .20日齢のLP曝露フェレットおよび対照フェレットの大脳各領域におけるregional-GI[未発表データ]。\*  $p < 0.05$  (Scheffe's test)

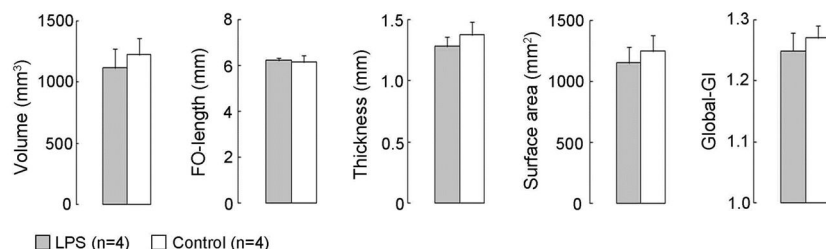


図4 .20日齢のLP曝露フェレットおよび対照フェレットの大脳皮質の体積、大脳半球の前頭後頭極長、皮質厚、皮質表面積、global-GI[未発表データ]。

#### <引用文献>

1. Sawada K (2019) Follow-up study of subventricular zone progenitors with multiple rounds of cell division during sulcogyrogenesis in the ferret cerebral cortex. IBRO Reports 7: 42-51.
2. Sawada K, Kamiya S, Aoki I (2021) Neonatal valproic acid exposure produces altered gyrification related to increased parvalbumin-immunopositive neuron density with thickened sulcal floors. PLoS One 16: e025026.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sawada K, Kamiya S, Kobayashi T	4. 巻 24
2. 論文標題 Neonatal exposure to lipopolysaccharide promotes neurogenesis of subventricular zone progenitors in the developing neocortex of ferrets.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 14962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241914962	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤田和彦、神谷汐里、小林哲也
2. 発表標題 Effect of neonatal exposure to lipopolysaccharide on neurogenesis of subventricular zone progenitors in the developing ferret neocortex
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澤田和彦、領家梨恵、野中博意、川島隆太、住吉晃
2. 発表標題 新生仔期にリポポリサッカリド曝露されたフェレットの脳皮質の形態異常：MRIに基づく形態計測
3. 学会等名 第18回日本分子イメージング学会学術集会
4. 発表年 2024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	小林 哲也 (Koabayashi Tesuya) (00195794)	埼玉大学・理工学研究科・教授  (12401)	

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