

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19307

研究課題名（和文）アストロサイト数の制御メカニズムの解明と脳回形成におけるその役割

研究課題名（英文）Regulatory mechanisms of astrocyte number and its role in cortical folding

研究代表者

新明 洋平（Shinmyo, Yohei）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00418831

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ（脳回）を形成する。この進化の過程で大脳内の神経細胞とグリア細胞の数が増大したことは自明であるが、神経細胞よりもグリア細胞の一種であるアストロサイトがより顕著に増加したことは注目すべき事実である。本研究では、次世代シーケンサーによる解析に加え、*in vitro*および*in vivo*の実験系を駆逐することにより、進化におけるアストロサイトの数の増大に関わる分子機構の一端を明らかにした。FGFシグナルのポジティブフィードバックループによる増殖制御がアストロサイト数の決定に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皺脳動物でのアストロサイト研究の重要性は世界的に注目されていたが、その研究は遅れていた。この主たる原因は、皺脳動物の脳内のアストロサイトでの遺伝子操作が困難なためであった。重要なことに私たちは、子宮内エレクトロポレーション法、piggyBacシステム、細胞種特異的プロモーターを組みわせることにより、フェレット大脳においてアストロサイト選択的な遺伝子発現システムを確立した。その手法を用いて、アストロサイトの数の制御メカニズムの一端を明らかにした。このように、独自技術を利用して皺脳動物でのアストロサイトの解析を行った本課題は学術的に重要性の高い研究であると言える。

研究成果の概要（英文）：While it is obvious that the number of neurons and glial cells in the cerebrum increased during mammalian evolution, it is a remarkable fact that astrocytes, a type of glial cell, increased more significantly than neurons. Therefore, it is extremely important to understand the molecular mechanism of the increase in the number of astrocytes during evolution. In this study, we have elucidated molecular mechanisms involved in the increase in the number of astrocytes. We found that regulation of proliferation by a positive-feedback loop of FGF signaling is important in determining astrocyte number in the cortex. Furthermore, we found that FGF1 expression was 10-fold higher in ferret astrocytes than in mouse astrocytes. These results suggest that differences in FGF1 expression in astrocytes may determine differences in astrocyte number among animal species.

研究分野：神経発生学

キーワード：フェレット アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

ヒトなどの高等哺乳動物では大脳皮質は特に発達しており、発達期にその組織構築がダイナミックに変化しシワ(脳回脳溝)を形成する。この進化の過程で大脳内の神経細胞とグリア細胞の数が増大したことは自明であるが、神経細胞よりもグリア細胞の一種であるアストロサイトがより顕著に増加したことは注目すべき事実である。実際、アストロサイトは脳内で最も多く存在する細胞で、血液脳関門の形成、細胞外環境の恒常性維持、神経伝達物質の取り込みなど数多くの重要な役割を持つ。さらに、アストロサイトの機能不全が、レット症候群や脆弱X症候群などの神経発達障害に関連することが示唆されている。また興味深いことに、ヒトのアストロサイトを過剰供給したマウスでは認知機能が向上する。このように進化におけるアストロサイト数の増大が高次脳機能の発達の基盤であると考えられるが、これらの現象を制御する分子メカニズムは不明であった。

イタチ科に属するフェレットは、脳回脳溝などの高等哺乳動物に特徴的な発達した脳神経構築を持つことから形態学および生理学的研究に多く用いられてきたが、分子遺伝学的研究手法は確立されていなかった。我々は、子宮内エレクトロポレーション法を用いてフェレット大脳皮質において遺伝子機能解析技術を開発してきた。我々はこれらの独自技術を用いて脳回脳溝形成機構に切り込み、下層神経細胞に対する上層神経細胞の産出数の増大と上層神経細胞の脳表への移動が脳回脳溝形成に重要であることなど、脳回脳溝形成における神経細胞の役割を明らかにしてきた。本研究では、フェレットを用いて進化におけるアストロサイト数の増大の分子メカニズムの解明を目指した。

2. 研究の目的

上記のように進化におけるアストロサイトの数の増大の分子機構を知ることは、進化における高次脳機能の発達のメカニズムの理解につながるため極めて重要である。本研究では、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析に加え、*in vitro* および *in vivo* の実験系を駆使することにより、進化におけるアストロサイトの数の増大に関わる分子機構の一端を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 次世代シーケンサーを用いたアストロサイトにおける遺伝子発現解析

マウスに比べて、フェレット大脳のアストロサイトで高い発現を示す分子を同定するために、両者のアストロサイトを単離・培養し、RNAseq解析により遺伝子発現の比較解析を行った。

(2) RNAscope *in situ* hybridization (ISH)を用いた FGF1 の発現解析

フェレットとマウスのアストロサイトにおける FGF1 の発現量を比較するために、マウス(出生後 18 日)とフェレット大脳(出生後 36 日)を切片化し、RNAscope ISH 法を用いて FGF1 の発現量を定量化した。

(3) アストロサイト増殖における FGF の役割解明

最初にアストロサイトの増殖における FGF シグナルの重要性を調べるために、アストロサイトの初代培養系に FGF リガンドを加えて培養を行った。アストロサイトの増殖への影響を評価するために、培養 48 時間後にアストロサイトを固定し、細胞増殖のマーカーである Ki-67 とアストロサイトのマーカーである GFAP に対する二重免疫染色を行った。

次に、アストロサイトから分泌される FGF がアストロサイトの増殖に重要な役割を調べるために、FGF シグナルの阻害剤である BGJ398 を培地に添加して無血清培地で培養した。アストロサイトの増殖への影響を評価するために、培養 48 時間後にアストロサイトを固定し、細胞増殖のマーカーである Ki-67 とアストロサイトのマーカーである GFAP に対する二重免疫染色を行った。

4. 研究成果

我々は、出生後のマウス大脳皮質において FGF シグナルを活性化するとアストロサイト数が著しく増加することを見出していた。この結果から、FGF シグナルによるアストロサイトの増殖

制御が脳皮質内のアストロサイトの数を決定する重要なメカニズムであると考えられた。そこで、既存の細胞種別の遺伝子発現データベースを用いてマウス脳皮質における FGF リガンドの発現を調べた結果、他の細胞（神経、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなど）に比べてアストロサイトで FGF リガンドが高発現することが分かった。次に、RNAseq 解析の結果を用いてフェレットとマウスのアストロサイトにおける FGF リガンドの発現比較を行った。その結果、フェレットアストロサイトにおいて全ての FGF リガンドの中で FGF1 が高発現すること、マウスアストロサイトに比べてフェレットアストロサイトにおいて FGF1 の発現が 10 倍以上高いことを見出した。次に、RNAscope ISH 法を用いてアストロサイトにおける FGF 1 の発現量を比較すると、RNAseq 解析の結果と一致してマウスに比べてフェレットアストロサイトで FGF1 の発現が顕著に高いことが分かった。これらの結果から、フェレットとマウスのアストロサイト間での FGF1 の発現量の違いが、種間のアストロサイト数の違いを決めている可能性が示唆された。

アストロサイトの増殖における FGF シグナルの重要性を検証した。最初に、アストロサイトの初代培養系に FGF リガンドを加えて培養を行った結果、アストロサイトの増殖が亢進した。次に、アストロサイトの初代培養系を用いてアストロサイトから分泌される FGF がアストロサイトの増殖に重要であるかを検討した。その結果、FGF シグナルの阻害剤である BGJ398 の濃度依存的にアストロサイトの増殖が阻害された。これらの結果から、FGF シグナルのポジティブフィードバックループによる増殖制御がアストロサイト数の決定に重要であると考えられた（図）。

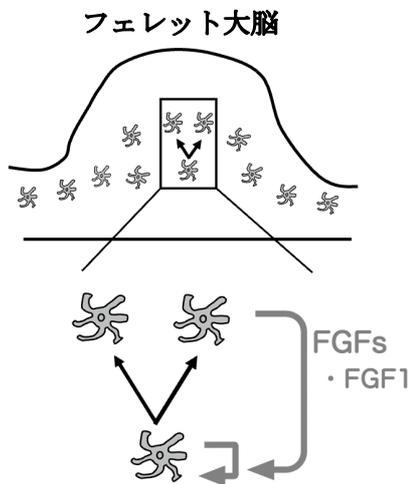


図 FGF シグナルによるアストロサイトの増殖制御

FGF シグナルのポジティブフィードバック機構により、アストロサイトの増殖が制御されている。FGF リガンドの中で FGF 1 の発現が特に重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Edwards-Faret Gabriela, de Vin Filip, Slezak Michal, Gollenbeck Lennart, Karaman Ruchan, Shinmyo Yohei, Batiuk Mykhailo Y., Pando Carmen Menacho, Urschitz Johann, Rincon Melvin Y., Moisyadi Stefan, Schnutgen Frank, Kawasaki Hiroshi, Schmucker Dietmar, Holt Matthew G.	4. 巻 508
2. 論文標題 A New Technical Approach for Cross-species Examination of Neuronal Wiring and Adult Neuron-glia Functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 40~51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2022.11.029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Nguyen Dinh Thi, Ishii Hiroshi, Takarada-Iemata Mika, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Maejima Takashi, Saito Kengo, Shinmyo Yohei, Mieda Michihiro, Tajima Atsushi, Kawasaki Hiroshi, Hori Osamu	4. 巻 16
2. 論文標題 Isolation of ferret astrocytes reveals their morphological, transcriptional, and functional differences from mouse astrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 877131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2022.877131	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 Shinmyo Yohei, Saito Kengo, Hamabe-Horiike Toshihide, Kameya Narufumi, Ando Akitaka, Kawasaki Kanji, Duong Tung Anh Dinh, Sakashita Masataka, Roboon Jureepon, Hattori Tsuyoshi, Kannon Takayuki, Hosomichi Kazuyoshi, Slezak Michal, Holt Matthew G., Tajima Atsushi, Hori Osamu, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Localized astrogenesis regulates gyrification of the cerebral cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabi5209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abi5209	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 Shinmyo Yohei, Hamabe-Horiike Toshihide, Saito Kengo, Kawasaki Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Investigation of the Mechanisms Underlying the Development and Evolution of the Cerebral Cortex Using Gyrencephalic Ferrets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 847159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.847159	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 Toshihide Hamabe-Horiike, Kanji Kawasaki, Masataka Sakashita, Chihiro Ishizu, Tomokazu Yoshizaki, Shin-Ichi Harada, Keiko Ogawa-Ochiai, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Glial cell type-specific gene expression in the mouse cerebrum using the piggyBac system and in utero electroporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 4864
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84210-z.	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 Hiroki Maeyama, Yohei Shinmyo, Hiroshi Kawasaki	4. 巻 26
2. 論文標題 The expression of aristaless-related homeobox in neural progenitors of gyrencephalic carnivore ferrets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Rep	6. 最初と最後の頁 100970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Naofumi Ito, M Asrafuzzaman Riyadh, Shah Adil Ishtiyahq Ahmad, Satoko Hattori, Yonehiro Kanemura, Hiroshi Kiyonari, Takaya Abe, Yasuhide Furuta, Yohei Shinmyo et al	4. 巻 13
2. 論文標題 Dysfunction of the proteoglycan Tsukushi causes hydrocephalus through altered neurogenesis in the subventricular zone in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Transl Med	6. 最初と最後の頁 7896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aay7896.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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 Shinmyo Y and Kawasaki H
2. 発表標題 A positive feedback loop of FGF signaling induces astrocyte expansion and folding of the cerebral cortex in gyrencephalic animals
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinmyo Y, Saito K, Hamabe-Horiike T, Kameya N, Hattori T, Kannon T, Hosomichi K, Tajima A, Hori O and Kawasaki H
2. 発表標題 A positive feedback loop of FGF signaling induces astrocyte expansion and folding of the cerebral cortex in gyrencephalic animals
3. 学会等名 NEURO2022
4. 発表年 2022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	河崎 洋志 (Kawasaki Hiroshi) (50303904)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	

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		
ベルギー	VIB center		