

平成 29 年 4 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290013

研究課題名(和文) 高等哺乳動物を用いた脳神経系形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of brain formation in higher mammals

研究代表者

河崎 洋志 (Kawasaki, Hiroshi)

金沢大学・脳・肝インターフェースメディスン研究センター・教授

研究者番号：50303904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：高等哺乳動物に特徴的な脳神経構築の、発生・発達過程における形成メカニズムの解明は、脳神経医学における重要研究課題のひとつである。本研究課題では、フェレットを用いて高等哺乳動物に特徴的な脳神経構築の形成メカニズムの解明を行う。最近我々が開発したフェレット大脳皮質での遺伝子操作法を用いて解析したところ、脳回形成機構および多小脳回症に関する新たな知見を得た。本研究の成果は、高等哺乳動物における脳形成機構の解明という基礎神経科学にとどまらず、高等哺乳動物特有の脳神経疾患の病態解明など臨床脳医学への波及効果も大きい。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms underlying the formation of the brain of higher mammals have been of great interest. Here we examined the mechanisms of cortical folding using carnivore ferrets. We found that activation of FGF signaling resulted in polymicrogyria, and that SVZ progenitors mediated cortical folding. These results uncovered novel insights into the mechanisms of the formation of cortical folds and its diseases.

研究分野：神経科学

キーワード：大脳皮質 高等哺乳動物

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質は脳機能の中枢であり、様々な脳神経疾患や発達障害の首座であることから、大脳皮質の形成機構の解明は脳神経科学の最重要課題の一つである。

ヒトなどの高等哺乳動物の大脳皮質にはシワ(脳回)が存在する。脳回の獲得により大脳皮質の表面積が著しく増加し、多くの神経細胞を持つことが可能となった。従って、脳回は大脳皮質の高機能化の基盤となる重要な構造と考えられている。さらに滑脳症や多小脳回症など脳回異常疾患の病態解明も必要であり、また自閉症や統合失調症での脳回異常も報告されていることから、脳回の形成原理の解明は極めて重要である。

このように脳回形成機構への関心は高いが、その解明はこれまで困難であった。その理由として、以下の2点が挙げられる。

i) 現在の脳研究には分子遺伝学的解析が容易なマウスがよく用いられるが、マウスの大脳には脳回は存在しないことから、マウスを用いた脳回の解析は困難である。

ii) 脳回を持つ高等哺乳動物では、解析に必要な分子遺伝学的技術が整備されていなかった。

そこで本研究では脳回を持つ高等哺乳動物フェレットを突破口とし、脳回の形成原理を解明を進めた。我々はこれまでに、本研究に必要なフェレットの分子遺伝学的技術を独自に確立してきた。フェレット用マイクロアレイを作成し、高等哺乳動物で特徴的な発現分布を示す遺伝子を同定した(Journal of Neuroscience 2004)。さらにフェレット大脳皮質での遺伝子操作法を世界に先駆けて確立した(Molecular Brain 2012)。

本研究では、フェレットに関する我々の独自技術によって可能となった脳回形成の分子機構の解析を行った。本研究の成果は、脳回形成原理の解明といった基礎神経科学への貢献のみならず、滑脳症や多小脳回症などの病態解明といった臨床脳医学に関する社会的インパクトも大きい。さらに脳回以外にも、ヒトなど高等哺乳動物に特有な様々な脳神経構築の研究への突破口となるなど波及効果が大きい。

2. 研究の目的

本研究では脳回を持つ高等哺乳動物フェレットを突破口とし、フェレットに関する我々の独自技術によって可能となった脳回の形成原理の解明を進めた。

3. 研究の方法

1) 子宮内電気穿孔法を用いたフェレット大脳皮質への遺伝子導入

フェレットに麻酔をかけた状態で側脳室にプラスミドを注入し、電気パルスをかけることで大脳皮質へ遺伝子導入を行った。

2) 免疫組織染色

クリオスタットで切片を作成した後に、一次抗体および二次抗体で処理を行った。

3) *in situ* hybridization 法

クリオスタットで切片を作成した後に、ハイブリバッファーに溶かした Probe で処理をし、SSC で洗った後に NBT/BCIP で発色反応を行った。

4. 研究成果

1) フェレット大脳皮質における遺伝子操作法の確立

これまでに我々は子宮内電気穿孔法を応用して、フェレットの大脳皮質への遺伝子導入法を報告してきた(Molecular Brain 2012)。そこで今回は、高等哺乳動物に特徴的な前駆細胞 outer radial glial (oRG) に遺伝子導入が可能であることを見だし、導入のための至適条件を確立した(Biology Open 2013)。

また高等哺乳動物に特徴的とされる inner fiber layer (IFL) がフェレットにも存在すること、また IFL に存在する神経線維が少なくとも 2/3 層神経細胞由来のものを含んでいることを見出した(Biology Open 2013)。

2) 脳回異常症である多小脳回症の原因が FGF であることを証明

過去に多小脳回患者には FGF 受容体 3 に活性化型が見られるとの報告があった。その一方で、その変異のノックインマウスでは脳表に異常が見られなかった。

そこで、FGF 受容体 3 を活性化する FGF8 をフェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法で導入した。その結果、多小脳回が形成されたことから、やはり FGF シグナルの活性化が多小脳回につながる事が明らかとなった。さらに病態生理を解析した結果、SVZ 神経前駆細胞が著しく増加していることを明らかにした(Scientific Reports 2015)。

3) 脳回形成における SVZ 神経前駆細胞の重要性の発見

2) で FGF を過剰発現した際に多小脳回症となり過剰な脳回が形成されること、さらに SVZ 神経前駆細胞が増加していたことから、正常な発達過程における脳回形成に SVZ 神経前駆細胞が重要である可能性が出てきた。

そこで転写因子 Tbr2 の優性不能型をフェレット大脳皮質へ導入したところ、SVZ 神経前駆細胞の産生が抑制されることを見出した。さらに脳回形成も阻害されていたことから、SVZ 神経前駆細胞が脳回形成に重要であることが明らかになった(Scientific

Reports 2016)。

4) その他

視床形成メカニズム(Cerebral Cortex, in press), ゲフリンの制御メカニズム (Nature Communications 2016), 樹状突起の形成制御機構 (Journal of Neuroscience 2016), 視床皮質軸索の投射メカニズム (Nature Communications 2015), マーモセットの神経細胞可視化 (Cell Reports 2015, eNeuro 2015), 大脳神経回路形成におけるカドヘリンの重要性 (Cerebral Cortex 2015), 回路形成における出生の重要性の発見 (Developmental Cell 213) など

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計23件)

1. Kawasaki H., Molecular investigations of development and diseases of the brain of higher mammals using the ferret, **Proceedings of the Japan Academy, Series B**, 93, 259-269, 2017, 査読有
2. Hasegawa H., Hatano M., Sugimoto H., Ito M., Kawasaki H.(共同責任著者) and Yoshizaki T., The effects of unilateral cochlear ablation on the expression of vesicular glutamate transporter 1 in the lower auditory pathway of neonatal rats, **Auris Nasus Larynx**, in press, 査読有, doi:10.1016/j.anl.2017.01.007
3. Matsumoto N., Hoshiya Y., Morita K., Uda N., Hirota M., Minamikawa M., Ebisu H., Shinmyo Y. and Kawasaki H., Pathophysiological analyses of periventricular nodular heterotopia using gyrencephalic mammals, **Human Molecular Genetics**, 26, 1173-1181, 2017, 査読有, doi:10.1093/hmg/ddx038
4. Shinmyo Y. and Kawasaki H., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation, **Current Protocols in Neuroscience**, 79, 3.32.1-3.32.11, 2017, 査読有, doi:10.1002/cpns.26
5. Sato C., Iwai-Takekoshi L., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Cell type-specific expression of FoxP2 in the ferret and mouse retina, **Neuroscience Research**, 117, 1-13, 2017, 査読有, doi:10.1016/j.neures.2016.11.008、表紙に選ばれた。
6. Ebisu H., Iwai-Takekoshi L., Fujita-Jimbo E., Momoi T. and Kawasaki H., Foxp2 regulates identities and projection patterns of thalamic nuclei during development, **Cerebral Cortex**, in press, 査読有, doi:10.1093/cercor/bhw187
7. Inoue N., Ikawa Y., Sato A., Yokoi A., Kuroda M., Nomura K., Sakai S., Tajima H., Ikeda H., Ebisu H., Kawasaki H., Ohta T. and Yachie A., Immunostaining of sulfatide-storing macrophages in gallbladder of a patient with metachromatic leukodystrophy, **Pediatric Neurology**, 64, e3-e4, 2016, 査読有, doi:10.1016/j.pediatrneurol.2016.08.006
8. Ghosh H., Aguadri L., Battaglia S., Simone Thirouin Z., Zemoura K., Messner S., Acuña M. A., Wildner H., Yévenes G. E., Dieter A., Kawasaki H., Hottiger M. O., Zeilhofer H. U., Fritschy J.-M. and Tyagarajan S. K., Several posttranslational modifications act in concert to regulate gephyrin scaffolding and GABAergic transmission, **Nature Communications**, 7, 13365, 2016, 査読有, doi:10.1038/ncomms13365
9. Toda T., Shinmyo Y., Dinh D. T. A., Masuda K. and Kawasaki H., An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals, **Scientific Reports**, 6, 29578, 2016, 査読有, doi:10.1038/srep29578
10. Hoshiya Y., Toda T., Ebisu H., Wakimoto M., Yanagi S. and Kawasaki H., Sox11 balances dendritic morphogenesis with neuronal migration in the developing cerebral cortex, **Journal of Neuroscience**, 36, 5775-5784, 2016, 査読有, doi:10.1523/JNEUROSCI.3250-15.2016, Journal of Neuroscience 誌の「This Week in The Journal」および「Journal Club」に選ばれた
11. Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H., CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation, **Scientific Reports**, 6, 20611, 2016, 査読有, doi:10.1038/srep20611
12. Shinmyo Y., Riyadh M. A., Ahmed G., Naser I. B., Hossain M., Takebayashi H., Kawasaki H., Ohta K. and Tanaka H., Draxin from neocortical neurons controls the guidance of thalamocortical projections into the neocortex, **Nature Communications**, 6, 10232, 2015, 査読有,

doi:10.1038/ncomms10232

13. Sadakane O., Masamizu Y., Watakabe A., Terada S., Ohtsuka M., Takaji M., Mizukami H., Ozawa K., Kawasaki H., Matsuzaki M. and Yamamori T., Long-term two-photon calcium imaging of neuronal populations with subcellular resolution in adult non-human primates, **Cell Reports**, 13, 1989-1999, 2015, 査読有, doi:10.1016/j.celrep.2015.10.050
14. Masuda K., Toda T., Shinmyo Y., Ebisu H., Hoshiya Y., Wakimoto M., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals, **Scientific Reports**, 5, 15370, 2015, 査読有, doi:10.1038/srep15370.
15. Sadakane O., Watakabe A., Ohtsuka M., Takaji M., Sasaki T., Kasai M., Isa T., Kato G., Nabekura J., Mizukami H., Ozawa K., Kawasaki H. and Yamamori T., *In vivo* two-photon imaging of dendritic spines in marmoset neocortex, **eNeuro**, 2, e0019-15, 2015, 査読有, doi:10.1523/ENEURO.0019-15.2015
16. Wakimoto M., Sehara K., Ebisu H., Hoshiya Y., Tsunoda S., Ichikawa Y. and Kawasaki H., Classic cadherins mediate selective intracortical circuit formation in the mouse neocortex, **Cerebral Cortex**, 25, 3535-3546, 2015, 査読有, doi:10.1093/cercor/bhu197
17. Kawasaki H., Spatio-temporal regulation of the formation of the somatosensory system, **Development, Growth & Differentiation**, 57, 193-199, 2015, 査読有, doi:10.1111/dgd.12208
18. Fujishiro T., Kawasaki H., Aihara M., Saeki T., Yamagishi R., Atarashi T., Mayama C. and Araie M., Establishment of an experimental ferret ocular hypertension model for the analysis of central visual pathway damage, **Scientific Reports**, 4, 6501, 2014, 査読有, doi:10.1038/srep06501
19. Kawasaki H., Molecular investigations of the brain of higher mammals using gyrencephalic carnivore ferrets, **Neuroscience Research**, 86, 59-65, 2014, 査読有, doi:10.1016/j.neures.2014.06.006
20. Toda T. and Kawasaki H., The development of suckling behavior of

neonatal mice is regulated by birth, **Molecular Brain**, 7, 8, 2014, 査読有, doi:10.1186/1756-6606-7-8, Molecular Brain 誌の 2014 Top downloaded article の第 4 位。

21. Toda T., Homma D., Tokuoka H., Hayakawa I., Sugimoto Y., Ichinose H. and Kawasaki H., Birth regulates the initiation of sensory map formation through serotonin signaling, **Developmental Cell**, 27, 32-46, 2013, 査読有, doi:10.1016/j.devcel.2013.09.002
22. Kawasaki H. (corresponding author), Toda T. and Tanno K., *In vivo* genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation, **Biology Open**, 2, 95-100, 2013, 査読有, doi:10.1242/bio.20123160
23. Iwai L., Ohashi Y., van der List D., Usrey W. M., Miyashita Y. and Kawasaki H., FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets, **Cerebral Cortex**, 23, 2204-2212, 2013, 査読有, doi:10.1093/cercor/bhs207

〔学会発表〕(計 21 件)

1. Hiroshi Kawasaki, Mechanisms of formation and malformation of the cerebral cortex of ferrets, Keystone シンポジウム, California, USA, 2017/1/9-17, ポスター
2. 河崎洋志, フェレットを使った脳神経系の形成と異常の解析, 第一回オモロイ生き物研究会, 定山溪ホテル, 札幌, 2016/10/22-23, 招待講演
3. Hiroshi Kawasaki, Genetic and environmental regulation of neonatal cortical development, 国際シンポジウム Circuit Construction in the Mammalian Brain, 大阪大学吹田キャンパス, 大阪, 2016/8/8-9, 招待講演
4. 河崎洋志, 脳神経系の形成機構の解析とその医学的応用, 日本神経科学学会, パシフィコ横浜, 横浜, 2016/7/20-22, 教育講演
5. Hiroshi Kawasaki, Mechanisms regulating neuronal morphogenesis during development, 新学術領域研究「神経細胞の多様性と大脳新皮質の構築」第 3 回国際シンポジウム, 東京大学, 2016/2/11-12, 口演

6. Hiroshi Kawasaki, The roles of birth and serotonin in neural circuit formation during development, CFC シンポジウム, Korea Institute of Science and Technology, 韓国, 2015/11/16-17, 招待講演
 7. 河崎洋志, 脳神経系の形成と発達を制御する脳内環境の解明, 新学術領域研究「脳内環境」平成 27 年度夏のワークショップ, 軽井沢プリンスホテルウエスト, 軽井沢, 2015/9/24-25, ポスター
 8. 田中智、新明洋平、河崎洋志, CRISPR/Cas9 を用いたマウス大脳皮質特異的な遺伝子発現制御, 2015 年度 MD 研究者育成プログラム全国リトリート, 神戸国際会議場, 神戸, 2015/3/21-22, ポスター
 9. 佐藤千尋、岩井玲奈、桃井隆、河崎洋志, フェレットとマウスにおける FoxP2 陽性網膜神経節細胞の個性解析, 2015 年度 MD 研究者育成プログラム全国リトリート, 神戸国際会議場, 神戸, 2015/3/21-22, 口演
 10. 蛭子はるか、岩井玲奈、桃井隆、河崎洋志, The role of Foxp2 in the thalamic pattern formation during development, 第 8 回神経発生討論会, 九州大学, 博多, 2015/3/19-20, ポスター
 11. 蛭子はるか、河崎洋志, 視床パターン形成における Foxp2 の機能解析, 脳肝インターフェースメディスン研究センターシンポジウム 2015, KKR ホテル, 金沢, 2015/3/15, ポスター
 12. 干場義生、河崎洋志, 大脳皮質神経細胞における樹状突起の成熟抑制機構の解析, 脳肝インターフェースメディスン研究センターシンポジウム 2015, KKR ホテル, 金沢, 2015/3/14, 口演
 13. 新明洋平、河崎洋志、田中英明, 神経回路形成における軸索ガイダンス分子 Draxin の機能, 脳肝インターフェースメディスン研究センターシンポジウム 2015, KKR ホテル, 金沢, 2015/3/13, 口演
 14. 河崎洋志, 感覚神経回路形成における出生の意義, 生理学研究会, 生理学研究所, 岡崎, 2014/12/2-3, 招待講演
 15. Hiroshi Kawasaki, Cortical structures in ferrets revealed with in utero electroporation, Ferret Brain 2014 Meeting, Maryland 大学, 米国, 2014/11/20, ポスター
 16. Hiroshi Kawasaki, Spatio-temporal regulatory mechanisms underlying formation of the mammalian brain, OIST ワークショップ, 沖縄科学技術大学院大学, 沖縄, 2014/7/12-14, 招待講演
 17. 河崎洋志, 脳神経系の発達における出生の重要性, 第 11 回 GPCR 研究会, 日本科学未来館, 東京, 2014/5/9-10, 基調講演
 18. 河崎洋志, 感覚系神経回路形成における出生の機能的意義, 第 47 回日本発生生物学会, ウィンク愛知, 名古屋, 2014/5/27-29, 口演
 19. 河崎洋志, 脳神経系の形成過程の解析とその医学的応用, 富山大学脳神経外科脳神経講演会, 富山大学杉谷キャンパス, 富山, 2014/3/25, 招待講演
 20. 河崎洋志, 脳神経系の発達における出生の機能的意義, 第 91 回日本生理学会大会, 鹿児島大学, 鹿児島, 2014/3/18, 招待講演
 21. 河崎洋志, 脳神経系の発達過程における出生の機能的意義, 脳・肝インターフェースメディスン研究センターシンポジウム, KKR ホテル金沢, 金沢, 2013/11/21, 口演
- 〔図書〕(計 2 件)
1. Shinmyo Y., Masuda K., Hoshiba Y., Ebisu H. and Kawasaki H., Molecular investigations of the structure and development of the brain of carnivores, in **Brain Evolution by Design**, Shigeno S., Murakami Y. and Nomura T. eds., Springer Publishers, New York, pp311-327, 2017, 査読有
 2. Kawasaki H., Genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation, in **Electroporation Methods and Neuroscience**, Saito T. ed., Springer Publishers, New York, pp105-113, 2015, 査読有
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)
名称: 多小脳回症モデル動物
発明者: 河崎洋志、榎田宏輔
権利者: 金沢大学
種類: 特願
番号: 2015-006388
出願年月日: 平成 27 年 1 月 16 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/top/kawasaki-lab/>

6．研究組織

(1)研究代表者

河崎 洋志 (Hiroshi Kawasaki)

金沢大学・脳・肝インターフェイスメ
ディシン研究センター・教授

研究者番号：50303904