

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430033

研究課題名(和文)「知性の源泉」の追求～前頭前野の発生・発達・進化

研究課題名(英文) Development and evolution of the frontal cortex

研究代表者

佐藤 達也 (Sato, Tatsuya)

東北大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：00568222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：分泌性因子Fgf8は、大脳皮質領域を前方化するオーガナイザー分子であることが明らかにされている。本研究では、大脳皮質の中でも特に前頭葉の領域化におけるFgf8の役割を明らかにした。胎生期のマウス終脳前端部においてFgf8を電気穿孔法により過剰発現させると、前頭葉の背内側領域(前帯状皮質および前辺縁皮質)が拡大し、背外側領域が縮小した。前頭葉腹側(下辺縁皮質、眼窩皮質)は欠損した。嗅球が肥大化するとともに、前頭葉と嗅球の組織は連続し、それらの境界は不明瞭となった。Fgf8は前頭葉背側を内側化していると考えられるとともに、嗅球の発生においても重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The frontal cortex (FC) is an important brain region for motor function as well as decision making and social or cognitive behavior. Here we show the organizing molecule, fibroblast growth factor 8 (Fgf8), has an effect to medialize the dorsal part of the FC. We analyzed expression of FC subdivision markers in Fgf8-transfected mouse brains. When Fgf8 was misexpressed in the anterior pole of the telencephalon by in vivo electroporation, the dorsomedial part of the FC (anterior cingulate and prelimbic cortex) was expanded. Expression borders of dorsal FC subdivision markers shifted laterally. We also found that the morphology of the Fgf8-transfected brains was quite abnormal: the ventral FC (the orbital cortex) was not formed and the olfactory bulb was larger than that of wild-type brains. These findings suggest that Fgf8 is involved in the formation of FC subdivision and olfactory bulb development.

研究分野：神経発生学

キーワード：内側前頭前野 嗅球 眼窩前頭皮質 電気穿孔法 マウス 線維芽細胞増殖因子

1. 研究開始当初の背景

哺乳類動物の前頭葉は、組織構築や機能の違いにより、一次運動野、高次運動野、前頭前野に分けられる。さらに前頭前野は、外側前頭前野、内側前頭前野、眼窩前頭皮質に分けられる。これらの脳領域がどのように発生するのか、その分子メカニズムについてはよくわかっていない。特に前頭前野は、ヒトにおいて最も高次の脳機能を司る部位であり、この領域の発生を理解することは「知性の源泉」を明らかにすることに繋がるとともに、高次脳機能障害の治療法の確立に役立つ可能性がある。

繊維芽細胞増殖因子 Fgf8 は、脳の発生においてオーガナイザー分子として機能することが知られてきた (Sato et al., 2004)。Fgf8 は、発生初期の終脳前端部と中脳・後脳境界部においてその発現がみられる。ニワトリ胚を用いた Fgf8 の強制発現実験や、Fgf8 ノックアウトマウスの解析により、中脳・後脳の発生では、Fgf8 のシグナルの「強弱」と「持続時間」が重要であることが示唆されている (Sato et al., 2001; Sato & Nakamura, 2004; Sato & Joyner, 2009)。すなわち、Fgf8 シグナルが強いときには後脳が分化し、弱いときには中脳が分化する。また、中脳・後脳境界に近い領域ほど、その分化には長い時間の Fgf8 シグナルが必要である。

終脳前端部で発現する Fgf8 は、大脳皮質の前後極性の決定に重要な役割を果たしている (Fukuchi-Shimogori & Grove, 2001)。Fgf8 をエレクトロポレーション法により強制発現させると、前頭葉が後方に拡大する。終脳後端部において Fgf8 を強制発現させると、後端部も前側の性質を持つようになる。そして、本来の体性感覚野パレル構造とは別に異所的なパレル構造が現れ、それらは鏡像の位置関係にあった (Fukuchi-Shimogori & Grove, 2001; Assimakopoulos et al., 2012)。また、Fgf8 変異マウス (hypomorph) では、前頭葉が縮小する (Garel et al., 2003)。以上のように、Fgf8 が大脳皮質の領域特異性の決定に重要な役割を果たしていることから、前頭前野の各領域特異性の決定にも関与しているのではないかと推測される。

終脳前端部においては、Fgf8 の他にも、Fgf17 および Fgf18 が発現する。Fgf17 ノックアウトマウスを用いて、前頭前野の領域特異性について詳細な解析が行われた (Cholfin & Rubenstein, 2007; 2008)。前頭前野で領域特異的に発現する様々な遺伝子マーカーを用いた解析により、Fgf17 ノックアウトマウスでは内側前頭前野が縮小し、外側前頭前野が拡大した。眼窩前頭皮質はほとんど変化がなかった。Fgf8 変異マウスではさらに重篤な変化がみられた。眼窩前頭皮質は非常に縮小し、内側・外側前頭前野に分化すべき領域は、頭頂葉などの後側の脳領域へ分化したのではないかと推測された。Fgf17 は内側・外側前頭前野の領域決定に関与するの

対し、Fgf8 は前頭前野の全ての領域決定に関与していることが明らかとなった。しかし、Fgf8 変異マウスの表現型は非常に重篤であり、Fgf8 がどのように前頭前野の各領域の決定に関与しているのか、詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、前頭前野の各領域形成における Fgf8 の役割について明らかにすることを目的とする。Fgf8 を終脳前端部において強制発現させ、前頭前野の形態学的・組織学的解析と遺伝子マーカーの発現変化を調べることにより、Fgf8 の役割を考察する。

3. 研究の方法

全ての動物実験は、東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会による審査と承認を得て、動物実験関連法規を遵守の上、行った。また、全ての遺伝子組換え実験は、東北大学環境・安全委員会遺伝子組換え実験安全専門委員会による審査と承認を得て、遺伝子組換え実験関連法規を遵守の上、行った。

Fgf8 発現ベクターは以下の手順により作成した。マウス Fgf8b cDNA クローン (Riken mouse FANTOM clone, DNAFORM) を制限酵素 SmaI と SacI で処理し、pCAG-EYFP-CAG ベクター (Saito & Nakatsuji, 2001) に挿入した。

Exo utero エレクトロポレーション法は、Sato et al., 2013; Saito, 2006 に従った。Fgf8 発現ベクター溶液を胎生 11.5 日胚の側脳室に注入し、陽極を終脳前側、陰極を終脳後側に置き、23 V、50 ms の矩形波パルス電圧を 5 回加えた。

in situ hybridization 法は、Takahashi & Osumi, 2002; Kikkawa et al., 2013 に従った。胎生 12.5 日胚および出生 0 日の脳は、4% パラホルムアルデヒドにより、4 中で一晚、固定した。その後、30% スクロース/PBS に浸し、凍結包埋した。14 μm の凍結切片を作成し、in situ hybridization 法を行った。

組織学的解析は、14 μm の凍結切片をチオニンで染色して行った。画像は、キーエンス BZ-X700 顕微鏡により取得した。

4. 研究成果

(1) Sprouty1/2 および Fgf17/18 の発現に対する Fgf8 の影響

Sprouty1/2 (Spry1/2) は、Fgf のターゲット遺伝子であることが知られている。また、Fgf17/18 は、発生初期の終脳前端部において Fgf8 と共に発現がみられる。はじめに、Fgf8 を強制発現させたときにこれらの遺伝子発現に変化がみられるかどうかを調べた。

胎生 11.5 日において Fgf8 を終脳先端部で強制発現し、胎生 12.5 日もしくは 13.5 日で遺伝子発現変化を調べた。すると、Fgf8 強制発現領域とその周囲において、Spry1/2 の発現が誘導された。Fgf8 の強制発現系がうまく機能していることが示唆された。Fgf17/18 の

発現は、誘導されなかった。終脳前端部における内在性の *Fgf17/18* の発現にも影響を与えなかった。本研究での *Fgf8* 強制発現実験による結果は、*Fgf17/18* の発現変化によるものでないことが示唆される。

(2) *Fgf8* 強制発現による形態学的・組織学的変化

胎生 11.5 日において *Fgf8* を強制発現させ、出生後 0 日の脳の形態学的・組織学的変化を調べたところ、大きな形態変化が見られた (図 1 B および C)。第一に、前頭前野と嗅球の間の溝がなく、融合しているため境界がはっきりしなくなった。第二に、嗅球が肥大化した。内腔が拡大し、脳室帯が厚くなった。第三に、*Fgf8* を強制発現させた前端付近では、大脳皮質の低形成がみられた (図 1 B)。より後側では大脳皮質の背側領域の形態異常はより軽微であった (図 1 C)。しかし、眼窩前頭皮質は、その大部分が欠損していた。対照側の大脳皮質の背外側領域 (図 1 F) の細胞密度は、背内側領域 (図 1 D) の細胞密度より低かったが、*Fgf8* を強制発現させた大脳皮質では、背外側領域 (図 1 G) の細胞密度は背内側領域 (図 1 D および E) と同程度に見えた。このことから、*Fgf8* を強制発現させたことにより、背外側領域はその発生運命を変えて内側化したのではないかと考えられた。

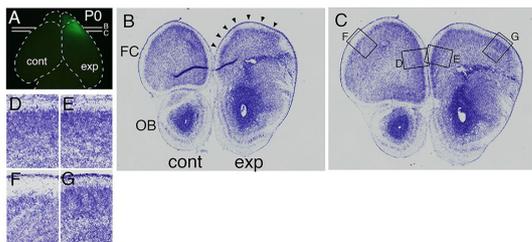


図 1 *Fgf8* を強制発現させたときの大脳皮質の形態・組織学的変化

(A) pCAG-EYFP-CAG-*Fgf8* を強制発現させた生後 0 日の脳を背側からみたもの。(B) (A) の B の位置での冠状断切片。大脳皮質がわずかに認められた (矢頭)。嗅球が肥大化し、眼窩皮質が分化していないようにみえる。(C) (A) の C の位置での冠状断切片。(D-G) (C) の四角で囲まれた領域の拡大図。*Fgf8* を強制発現させた外側の前頭前野 (G) の細胞密度は、内側前頭前野 (D および E) の細胞密度と同程度にみえる。cont:対照側、exp:強制発現させた側、FC:前頭葉、OB:嗅球

(3) *Fgf8* 強制発現による前頭前野特異的遺伝子マーカーの発現変化

Fgf8 強制発現によって前頭前野の各領域がどのように変化するのを探るため、前頭前野の各領域特異的遺伝子マーカーの発現変化を調べた。胎生 11.5 日において *Fgf8* を強制発現させ、出生後 0 日の脳における遺伝子発現変化を調べた。脳の前部では、形態変化が著しく、大脳皮質が非常に小さかった。

遺伝子発現が不明瞭であり、どのような領域に分化したのか断定することが難しかった。より後部では大脳皮質構造が広い範囲にわたって認められたが、眼窩皮質に相当する部分は欠損しており、遺伝子発現変化からもそれは確認された。分化した大脳皮質は、内側前頭前野 (前帯状皮質および前辺縁皮質) の遺伝子マーカーの組み合わせを発現していた (図 2)。さらに後部では、内側前頭前野の拡大、外側前頭前野の縮小、下辺縁皮質と眼窩皮質の欠損が認められ、各種遺伝子マーカーの発現境界は側方にシフトしていた。

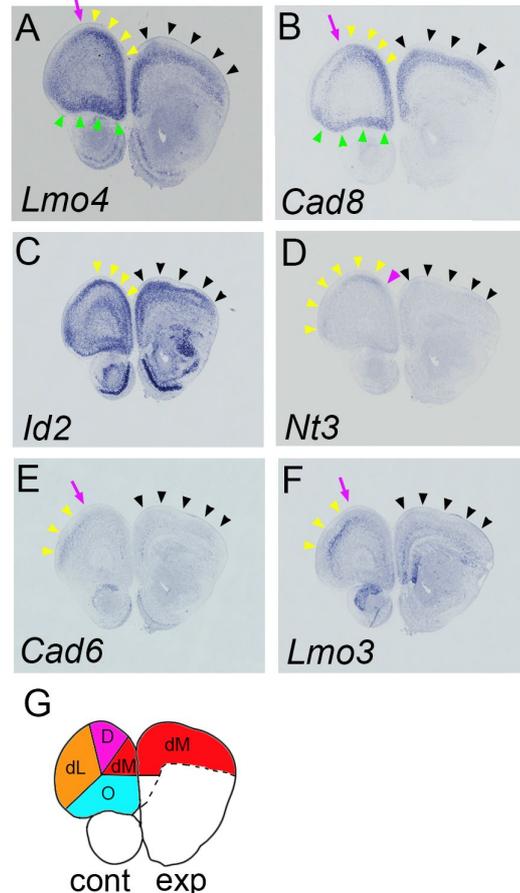


図 2 *Fgf8* を強制発現させたときの遺伝子マーカーの発現変化

(A-F) 前頭前野の冠状断切片像。隣接切片。in situ hybridization 法によって、*Lmo4* (A)、*Cad8* (B)、*Id2* (C)、*Nt3* (D)、*Cad6* (E)、*Lmo3* (F) の各遺伝子発現を検出した。切片の右側が強制発現させた側。左側は対照側。黄色の矢頭は対照側の遺伝子発現、黒色の矢頭は実験側の大脳皮質を示す。緑色の矢頭は眼窩皮質における遺伝子発現を示す。赤色の矢印は背側前頭前野と背外側前頭前野の境界を示す。赤色の矢頭は背内側前頭前野と背側前頭前野の境界を示す。(G) 遺伝子発現変化から推測される領域の変化。dM:背内側前頭前野、D:背側前頭前野、dL:背外側前頭前野、O:眼窩前頭皮質

(4) 結論

以上の結果から、*Fgf8* は背側の前頭前野を

内側化していると考えられた。これは正常胚における *Fgf8* の発現領域と大脳皮質の相対的な位置関係からも支持される。眼窩前頭皮質については、本研究の *Fgf8* 強制発現実験および *Fgf8* 変異マウスの両方の場合において欠損がみられることから、適切な(空間的、時間的、量的) *Fgf8* シグナルが必要であることが推測される。また、嗅球の発生にも *Fgf8* が関与していることが示唆される。*Fgf* レセプター-*Fgfr1* のノックアウトマウスでは、嗅球が形成不全となる (Hebert et al., 2003)。このマウスでは、細胞増殖の異常が観察された。本研究においても、細胞増殖に異常が観察される可能性がある。または、嗅球の領域決定に異常があるかもしれない。眼窩皮質、嗅球の発生に *Fgf8* がどのように関与しているのかを明らかにすることは、今後の課題である。

<引用文献>

- Assimacopoulos, S., Kao, T., Issa, N. P. & Grove, E. A. 2012. Fibroblast growth factor 8 organizes the neocortical area map and regulates sensory map topography. *J Neurosci.* 32, 7191-7201.
- Cholfin, J. A. & Rubenstein, J. L. 2007. Patterning of frontal cortex subdivisions by *Fgf17*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 104, 7652-7657.
- Cholfin, J. A. & Rubenstein, J. L. 2008. Frontal cortex subdivision patterning is coordinately regulated by *Fgf8*, *Fgf17*, and *Emx2*. *J Comp Neurol.* 509, 144-155.
- Fukuchi-Shimogori, T. & Grove, E. A. 2001. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. *Science* 294, 1071-1074.
- Garel, S., Huffman, K. J. & Rubenstein, J. L. 2003. Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in *Fgf8* hypomorphic mutants. *Development* 130, 1903-1914.
- Hébert, J. M., Lin, M., Partanen, J., Rossant, J. & McConnell, S. K. 2003. FGF signaling through FGFR1 is required for olfactory bulb morphogenesis. *Development* 130, 1101-1111.
- Kikkawa, T., Obayashi, T., Takahashi, M., Fukuzaki-Dohi, U., Numayama-Tsuruta, K. & Osumi, N. 2013. *Dmrta1* regulates proneural gene expression downstream of Pax6 in the mammalian telencephalon. *Genes Cells* 18, 636-649.
- Saito, T. 2006. In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nat. Protoc.* 1, 1552-1558.
- Sato, T., Araki, I. & Nakamura, H. 2001. Inductive signal and tissue responsiveness defining the tectum and the cerebellum. *Development* 128, 2461-2469.
- Sato, T. & Nakamura, H. 2004. The *Fgf8* signal causes cerebellar differentiation by activating the Ras-ERK signaling pathway. *Development* 131, 4275-4285.
- Sato, T., Joyner, A. L. & Nakamura, H. 2004. How does *Fgf* signaling from the isthmus organizer induce midbrain and cerebellum development? *Dev Growth Differ.* 46, 487-494.
- Sato, T. & Joyner, A. L. 2009. The duration of *Fgf8* isthmus organizer expression is key to patterning different tectal-isthmus-cerebellum structures. *Development* 136, 3617-3626.
- Sato, T., Muroyama, Y. & Saito, T. 2013. Inducible gene expression in postmitotic neurons by an in vivo electroporation-based tetracycline system. *J Neurosci Methods* 214, 170-176.
- Takahashi, M. & Osumi, N. 2002. Pax6 regulates specification of ventral neurone subtypes in the hindbrain by establishing progenitor domains. *Development* 129, 1327-1338.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kusano, R., Fujita, K., Shinoda, Y., Nagaura, Y., Kiyonari, H., Abe, T., Watanabe, T., Matsui, Y., Fukaya, M., Sakagami, H., Sato, T., Funahashi, J.I., Ohnishi, M., Tamura, S. & Kobayashi, T. Targeted disruption of the mouse protein phosphatase *ppm1l* gene leads to structural abnormalities in the brain. *FEBS Lett.* 590, 3606-3615, 2016 査読有
DOI: 10.1002/1873-3468.12429

Harada, H., Sato, T. & Nakamura, H. *Fgf8* signaling for development of the midbrain and hindbrain. *Dev. Growth Differ.* 58, 473-445, 2016 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12293

Harada, H., Omi, M., Sato, T. & Nakamura, H. *Pea3* determines the isthmus region at the downstream of *Fgf8*-Ras-ERK signaling pathway. *Dev. Growth Differ.* 57, 657-666, 2015 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12254

Hashimoto, M., Sato, T., Muroyama, Y., Fujimura, L., Hatano, H. & Saito, T. *Nepro* is associated with the nucleolus and essential for the preimplantation development in mice. *Dev. Growth Differ.* 57, 529-538, 2015 査読有

DOI: 10.1111/dgd.12232

〔学会発表〕(計10件)

Sato, T., Kuwata, R., Nakamura, H., Itoi, K. & Osumi, N. Role of Fgf8 for regionalization of the frontal cortex
第10回神経発生討論会、秋保リゾートホテルクレセント(宮城県仙台市)(2017年3月10日、11日)

Tatsuya Sato, Katsuya Uchida, Yasumasa Iwasaki, Satoshi Yamagata, Chiaki Tanaka, Hiroaki Tomita, Keiichi Itoi Identification of homeobox genes regulating expression of catecholamine-synthesizing enzymes in the locus ceruleus
The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease 東北大学(宮城県仙台市)(2017年2月16日)

Satoshi Yamagata, Isumi Akiba, Tatsuya Sato, Katsuya Uchida, Li Zhou, Rie Natsume, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi Generation and application of CRF neuron-selective channelrhodopsin-2 expressing mouse
The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease 東北大学(宮城県仙台市)(2017年2月16日)

Hiroko Otsuka, Katsuya Uchida, Masahiro Morisita, Shinji Tsukahara, Toshimitsu Fuse, Yuto Kagotani, Satoshi Yamagata, Tatsuya Sato, Manabu Abe, Kenji Sakimura, Keiichi Itoi Sex differences of CRF-expressing neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of the mouse
The 2017 Japan-NIH joint Symposium on Advances in Biomedical Research and Disease 東北大学(宮城県仙台市)(2017年2月16日)

Nakamura, H., Harada, H. & Sato, T. Fate determination of mesencephalon and metencephalon by Fgf8 signaling
Avian Model Systems 9: A New Integrative Platform 台北(台湾)(2016年3月29日)

Ryuji Nakamura, Takako Kikkawa, Tatsuya Sato, Noriko Osumi Pax6 is involved in inhibitory neuron production in the murine cerebral cortex
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学学会大会、合同大会、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)(2015年12月2日)

Sato, T., Saito, T. & Osumi, N. Dendritic morphology of the cortical pyramidal neurons is regulated by dopaminergic signal in early postnatal mice
Tohoku Forum for Creativity, Memory and Mind 東北大学(宮城県仙台市)(2015年9月29日)

Sato, T., Saito, T. & Osumi, N. Dendritic morphology of the cortical pyramidal neurons is regulated by dopaminergic signal in early postnatal mice
Tohoku Forum for Creativity, Development and Disease 東北大学(宮城県仙台市)(2015年8月25日、26日)

Sato, T., Saito, T. and Osumi, N. Dendritic morphology of the cortical pyramidal neurons is regulated by dopaminergic signal in early postnatal mice
第38回日本神経科学大会、神戸国際会議場、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)(2015年7月28日)

Sato, T., Muroyama, Y. & Saito, T. Postmitotic dorsal spinal cord neurons are transduced into commissural neurons by induced misexpression of *Barhl*
第44回北米神経科学会、ワシントン(アメリカ合衆国)(2014年11月18日)

〔図書〕(計3件)

佐藤達也、大隅典子
Dojin Bioscience シリーズ「分子脳科学」三品昌美編 第20章分担「脊椎動物脳形成の分子基盤」化学同人、2015年

Sato, T., Muroyama, Y. and Saito, T. NEUROMETHODS “Electroporation Methods in Neuroscience”, Chapter 15, Control of gene expression by the use of *in vivo* electroporation and the tetracycline system. Springer, 2015年
DOI: 10.1007/978-1-4939-2459-2

佐藤達也、齋藤哲一郎
脳科学辞典「エンハンサー」2015年
<http://bsd.neuroinf.jp/wiki/エンハンサー>
DOI: 10.14931/bsd.2781

〔その他〕

ホームページ等
<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/4d3f50ddd69eadeb6bb8f9befd7f3bdb9.html>

<http://researchmap.jp/7000010862/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 達也 (SATO, Tatsuya)
東北大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号：00568222

(2) 研究分担者

大隅 典子 (OSUMI, Noriko)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00220343