

## 【研究紹介】

## 脳神経系の形成制御機構の解明とその医学的応用

## Understanding the mechanisms underlying brain formation and its medical application

金沢大学医薬保健研究域 脳・肝インターフェースメディスン研究センター分子神経科学部門  
 医学系脳細胞遺伝子学研究分野  
 河 崎 洋 志

## はじめに

高次脳機能の基盤である脳神経系は、我々の身体で最も複雑かつ精巧な臓器である。ヒトの脳神経系には約1000億個もの神経細胞が存在し、正しくシナプスを形成することにより脳機能を発揮することができる。しかしどのようなメカニズムで発生および発達過程において脳神経系が正しく形成され発達するかという点は未だに不明な点が多く、脳神経医学の重要研究課題として残されている。我々の研究室では以下の3点を念頭におき研究を進めてきた。第1には、正常な脳神経系の形成過程および発達過程を理解することである。正常を理解することは異常を理解するために重要と考えている。第2には、正常な形成過程および発達過程に異常が起きた際に見られる病態の理解である。第3には、第1と第2で得られた知見を治療に応用することである。これらの3点を念頭におき行ってきた研究内容についてご紹介したい。

## 1. ES細胞から神経細胞への分化誘導法 (SDIA法) の開発

脳神経系には多様な個性を持つ多彩な神経細胞が存在している。発生過程においてこの多様な個性がどのように決定されるかという点について、これまでに多くの研究がなされてきた。そこで我々はこれらの過去の知見を総合することにより、試験管内で神経細胞を人為的に作成できるのではないかと考えた。

我々の身体は受精卵から作られるが受精卵は入手困難であることから、その代替として万能細胞と呼ばれるES細胞(胚性幹細胞, embryonic stem cells)を使うこととした。ES細胞の培養条件を検討し神経細胞への分化効率を検討したところ、PA6細胞と呼ばれる特殊な細胞と共培養すると神経細胞へ分化誘導できることがわかった。さらに培地中の血清が神経細胞への分化を阻害していることを見だし培地組成を最適化した。その結果、1週間ほどの短期間で90%以上の細胞が神経細胞へと分化する分化誘導法を確立することに成功し、SDIA法(stromal cell-derived inducing activity法)と命名した<sup>1)</sup>。

分化誘導された神経細胞の個性を検討したところ、驚いたことにドーパミン作動性神経細胞が約30%も含まれていた。実際に培養液中にドーパミンが分泌されていたことから機能的なドーパミン作動性神経細胞であることがわかった<sup>1)</sup>。さらに移植によりパーキンソン病モデルサルルの症状の改善が見られることがわかった<sup>2)</sup>。これら

の結果はドーパミン作動性神経細胞を初めて試験管内で作成したことを意味している。ドーパミン作動性神経細胞以外の神経細胞の分化誘導も試みたところ、網膜色素上皮細胞、運動神経細胞、感覚神経細胞や皮膚細胞などを分化誘導することに成功し、これらの細胞を分化誘導するための「レシピ」を作成した<sup>3,4)</sup>。

その後にiPS細胞が作られ、SDIA法を用いてiPS細胞からもドーパミン作動性神経細胞が分化誘導できることが山中伸弥先生から報告された。また、ドーパミン作動性神経細胞は京都大学iPS研究所の高橋淳先生により、網膜色素上皮細胞は理化学研究所発生再生科学総合研究センターの高橋政代先生により臨床応用に向けた取り組みが現在なされており、今後の発展が注目されている。

## 2. 脳回路形成における出生の機能的な重要性

脳神経系形成は遺伝的要因に加えて環境要因からも多大な影響を受けている。そこで我々は生涯においてもっとも劇的な環境変化が何か考えて、出生(母親から生まれ出ること)に着目した。胎児期には外界から遮断され栄養も酸素も受動的に供給されるが、生まれ出れば様々な外界からの刺激を受容し積極的に行動する必要がでてくる。このように「出生」は受精から死に至る哺乳類の生涯で最も劇的な環境変化とも言えるが、出生が脳神経系の形成や発達に及ぼす影響は不明な点が多い。

マウスの大脳皮質では触覚を司る体性感覚系の神経回路が出生直後に形成されることから、我々は出生が体性感覚系の神経回路の形成開始スイッチとして働いていると仮説を立てた。この仮説を検証するためにマウスを早産させたところ回路形成時期も連動して早まったことから、仮説が正しいことが明らかとなった。出生と回路形成開始とをつなぐ分子機構を解析した結果、出生が契機となり脳内の細胞外セロトニン濃度が減少し、その結果として神経回路の形成が開始することを見いだした<sup>5)</sup>。

また体性感覚系の機能に依存するsuckling behaviorの発達も出生により制御されていたことから、出生は解剖学的な回路形成のみならず機能的な発達も制御していることがわかった<sup>6)</sup>。さらに眼球から外側膝状体にいる視覚神経回路の形成も出生及びセロトニンにより制御されていたことから、我々が見いだした出生による神経回路の形成制御機構は様々な脳部位で使われている可能性がある<sup>5)</sup>。今後はさらに出生により制御される脳部位の同定を進める予定である。

著しい早産で生まれた場合には自閉症などの発達障害や統合失調症などの精神疾患の発症リスクが高まることが知られているが、その病態はまったく分かっていない。本研究の結果、出生が脳回路形成に重要であることが明らかとなったことから、早産による発症リスクとの関連が興味深い。

### 3. 高等哺乳動物における脳神経系の遺伝学的解析

現在、脳神経系の分子生物学的解析には遺伝子改変動物が使用可能であるマウスが主に用いられている。しかしマウスの脳はヒトの脳に比べて小さく様々な重要な構築を失っている。そこで我々は分子生物学的な解析が可能な高等哺乳動物が必要と考え、以下の理由から食肉類哺乳動物でネコに近縁のフェレットに着目した。第1にフェレットはマウスに比べて脳神経系が発達している点である。例えば、マウスの脳には脳回がなく表面が平坦であるが、フェレットの脳ではヒトの脳と同様に脳回が存在しているために、脳回の形成機構の解析や脳回異常の病態解析に使用可能である。第2には従来フェレットは脳神経系の解剖学および電気生理学的解析に用いられており、これらの解析結果が利用できることである。第3には飼育が容易である点が挙げられる。

しかしフェレットでは遺伝子スクリーニング技術や遺伝子機能解析技術が発展していなかったことから、その技術開発を行った。フェレット用cDNAマイクロアレイを独自に作成し、それを用いて視覚神経系で高等哺乳動物に特徴的に存在するP細胞（色彩や形態に関する視覚情報を伝達する細胞）に特異的に発現する遺伝子を初めて同定することに成功した<sup>7),8)</sup>。続いて遺伝子機能解析をフェレットで行うために遺伝子操作技術の開発を行った。子宮内電気穿孔法をフェレットに応用することを試みた結果、フェレットの大脳皮質神経細胞に遺伝子導入が可能であることを見いだした。この結果は、高等哺乳動物における迅速かつ効率よい遺伝子操作が可能になったことを意味している<sup>9)</sup>。

近年、高等哺乳動物とマウスの大脳皮質の相違点が報告されており、脳神経系の進化的発達との関連に興味が集まっている。OSVZ (outer subventricular zone) は発生過程における神経前駆細胞が増殖する大脳皮質の一部であり、高等哺乳動物には存在するもののマウスには見られないことから、高等哺乳動物における大脳皮質の肥大化に重要ではないかと考えられている。そこで我々が開発したフェレットの子宮内電気穿孔法を用いることによりOSVZの神経前駆細胞に遺伝子導入が可能か検討した。GFPを子宮内電気穿孔法で発現させたところ、OSVZ神経前駆細胞のマーカーPax6およびSox2陽性のGFP陽性細胞が多く見いだされた。この結果は、OSVZ神経前駆細胞の遺伝子操作が可能であることを意味している<sup>10)</sup>。IFL (inner fiber layer) は高等哺乳動物に特徴的だと考えられている神経線維層であるが、この神経線維がどの神経細胞から由来しているか不明であった。大脳皮質2層・3層にGFPを発現させた場合にIFLがGFP陽

性になることを見いだしたことから、少なくともIFLの一部は大脳皮質2層・3層由来であることをわかった<sup>10)</sup>。

このようにフェレット用の遺伝子スクリーニング技術や遺伝子操作技術が確立してきたことから、今後は高等哺乳動物に特徴的な脳構築の形成制御機構やその異常が引き起こす疾患病態の解析を行う予定である。

### 終 わ り に

我々は脳神経系の形成および発達過程に焦点を絞り、その分子制御機構の解析と医学的応用を行ってきました。このような研究を行うことができるのは、これまでの多くの諸先生方の陰日向の温かい御支援と御高導の賜物であり、改めて深く御礼申し上げます。また当教室に所属して苦楽をともにし研究を推進してくれた多くのメンバーの多大な努力に感謝致します。2013年に金沢大学に着任させて頂き、研究を推進するための絶好の機会を頂きました。オリジナルな研究と人材育成に努めて参りますので、今後とも御高導を賜りますようどうぞ宜しくお願い申し上げます。最後に今回の寄稿の機会を頂きました金沢大学十全医学会の皆様へ御礼を申し上げます。

### 文 献

- 1) Kawasaki, H., et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 28, 31-40 (2000).
- 2) Takagi, Y., et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115, 102-109 (2005).
- 3) Kawasaki, H., et al. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1580-1585 (2002).
- 4) Mizuseki, K., et al. Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 5828-5833 (2003).
- 5) Toda, T., et al. Birth regulates the initiation of sensory map formation through serotonin signaling. *Dev. Cell* 27, 32-46 (2013).
- 6) Toda, T. & Kawasaki, H. The development of suckling behavior of neonatal mice is regulated by birth. *Mol. Brain* 7, 8 (2014).
- 7) Kawasaki, H., Crowley, J.C., Livesey, F.J. & Katz, L.C. Molecular organization of the ferret visual thalamus. *J. Neurosci.* 24, 9962-9970 (2004).
- 8) Iwai, L., et al. FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets. *Cereb. Cortex* 23, 2204-2212 (2013).
- 9) Kawasaki, H., Iwai, L. & Tanno, K. Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using in utero electroporation. *Mol. Brain* 5, 24 (2012).
- 10) Kawasaki, H., Toda, T. & Tanno, K. In vivo genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using in utero electroporation. *Biol. Open* 2, 95-100 (2013).