

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640032

研究課題名(和文) 出生により制御される遺伝子カスケードの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of brain formation regulated by birth

研究代表者

河崎 洋志 (Kawasaki, Hiroshi)

金沢大学・脳・肝インターフェイ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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期および出生直後のマウスの大脳皮質を単離しマイクロアレイ解析を行った。候補遺伝子リストの中から転写因子に焦点を絞り機能解析を行った。子宮内電気穿孔法を用いた遺伝子過剰発現実験、shRNAやノックアウトマウスを用いた遺伝子機能阻害実験を行った結果、樹状突起の形態成熟を負に制御する転写因子の同定に成功した。この遺伝子の発現を抑制すると樹状突起の成熟が促進されるだけでなく、神経細胞の移動が障害されることを見いだした。この結果は、神経細胞が適切なタイミングで生じることが重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Using the cerebral cortex of embryonic and neonatal mice, microarray experiments were performed to identify the molecules whose expression levels changed before and after birth. Using in utero electroporation, loss- and gain-of-function studies were carried out, and we identified molecules that negatively regulated dendritic maturation. Furthermore, we found that the migration of immature neurons was also affected, suggesting that dendritic maturation should occur appropriate time point during development. Our results uncovered a novel regulatory mechanisms of neuronal maturation soon after birth.

研究分野：脳神経医学

キーワード：神経細胞成熟

1. 研究開始当初の背景

脳神経系の形成過程を制御する環境の解明は神経科学の重要課題である。「出生」は哺乳類の生涯で最も劇的な環境の変化であり、この急激な変化に対して新生仔の脳神経系は適応を迫られることは想像に難くないが、脳神経系形成における出生の役割は不明な点が多い。最近我々は、マウス大脳皮質の体性感覚神経回路（バレル）の形成開始が、出生に制御されていることを見出した。そこで本研究では、大脳皮質において出生により選択的に制御される遺伝子同定を切り口とし、出生に制御される分化過程の全貌解明を目指す。ヒトでは著しい早産では自閉症などの脳機能障害を示す傾向が高いことから、本研究課題の成果は基礎神経科学のみならず、早産による脳機能障害の病態解明といった臨床周産期医学や小児科領域にも波及効果を及ぼすなど、社会的インパクトも大きい。

2. 研究の目的

我々はこれまでの解析で、バレル形成開始が新生仔の出生（＝母親の出産）により制御されていることを発見した。即ち、妊娠マウスからの出生時期を人為的に変化させると、バレル形成時期も変化したのである。面白いことに、バレル形成とほぼ同時期に見られるバレル可塑性臨界期の終了時期は出生時期の影響を受けなかった。これらの結果は、出生が大脳皮質の体性感覚神経回路形成を選択的に制御する重要な要因であることを意味している。言い換えれば神経回路形成の開始制御という「出生」の新たな生理的役割を見出したとも言える。我々は、出生が体性感覚系だけではなく様々な出生後の変化を制御している可能性があると考えている。そこで本研究課題では、出生後に駆動される分子機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

1) 出生後に発現量が増加する遺伝子の同定

出生後に発現量が増加する遺伝子を同定するために、マイクロアレイを用いた解析を行う。具体的には、出生直前である胎生18日齢、生後1日齢、生後3日齢のマウス新生仔の大脳皮質を取り出し、遺伝子発現パターンをマイクロアレイを用いて解析し、出生前後で発現量が増加する遺伝子を同定する。候補遺伝子の発現量の変化を *in situ hybridization* 法や免疫染色法にて検討し、候補遺伝子を絞り込む。

2) 候補遺伝子の機能解析

候補遺伝子の *gain-of-function*、*loss-of-function* を行うために、子宮内電気穿孔法を用いて大脳皮質へプラスミドの導入を行い、脳神経系の形成過程への影響を

討する。遺伝子発現の時期的制御が必要となる場合は、Cre-ERT2/tamoxifen システムと組み合わせる。候補遺伝子の *loss-of-function*、*gain-of-function* を子宮内電気穿孔法を用いて行い、神経細胞分化マーカーや神経細胞の形態的成熟を検討する。また神経細胞の形態的成熟は、最近我々が開発した PASME 法を用いる。PASME 法は、改変した Thy1 プロモータと子宮内電気穿孔法とを組み合わせることにより、*in vivo* において、まばらな神経細胞に GFP を発現させることができ、神経細胞形態の可視化に強力である (*Mol Cell Neurosci*, 48, 246-257, 2011)

4. 研究成果

胎生期および出生直後のマウスの大脳皮質を単離し、mRNA を抽出した後にマイクロアレイ解析を行った結果、出生後に発現量が増加する候補遺伝子のリストを得ることができた。候補遺伝子リストの中から、分化過程を制御する可能性の高い転写因子に焦点を絞り、その発現変化を *in situ hybridization* や免疫染色法を用いて確認し、実際に発現量が増加する候補遺伝子のみ、その後の解析対象とした。

大脳皮質において出生直後には神経細胞の成熟が進行することから、これらの転写因子の神経細胞成熟における機能解析を行った。子宮内電気穿孔法を用いた遺伝子過剰発現実験、shRNA やノックアウトマウスを用いた遺伝子機能阻害実験を行った。これらの遺伝子操作の効果判定は、NeuN、doublecortin などの神経細胞成熟マーカー、および上記の PASME 法を用いた形態学的な樹状突起の成熟過程を検討した結果、樹状突起の形態成熟を負に制御する転写因子の同定に成功した。この遺伝子の発現を抑制すると、樹状突起の成熟が促進されるだけでなく、神経細胞の移動が障害されることを見いだした。この結果は、神経細胞が適切なタイミングで生じることが重要であることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kawasaki H., Spatio-temporal regulation of the formation of the somatosensory system, **Development, Growth & Differentiation**, 2015, in press, 査読有

2. 河崎洋志、フェレットを用いた高等哺乳動物の脳神経医学研究、生体の科学, 66, 1-6, 2015, 査読無

3. Wakimoto M., Sehara K., Ebisu H., Hoshiba Y., Tsunoda S., Ichikawa Y. and Kawasaki H.,

Classic cadherins mediate selective intracortical circuit formation in the mouse neocortex, **Cerebral Cortex**, 2015, in press, 査読有

4. 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

5. Kawasaki H., Molecular investigations of the brain of higher mammals using gyrencephalic carnivore ferrets, **Neuroscience Research**, 86, 59-65, 2014, 査読有

6. 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

7. 河崎洋志, 脳神経系の形成制御機構の解明とその医学的応用、金沢大学十全医学会雑誌, 123, 34-35, 2014, 査読無

8. 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

9. 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

10. 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

[学会発表] (計 29 件)

1. Ebisu, H., Kawasaki H., The role of Foxp2 in the thalamic pattern formation during development, 第 8 回神経発生討論会、2015/3/19-20、九州大学、博多

2. 佐藤千尋、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、第 9 2 回日本生理学会大会・第 1 2 0 回日本解剖学会、2015/3/21-23、神戸国際会議場、神戸

3. 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、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シンポジウム 2015, 2015/3/13、KKR ホテル金沢、金沢

4. 新明洋平、河崎洋志、神経回路形成における軸索ガイダンス分子 Draxin の機能、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シンポジウム 2015, 2015/3/13、KKR ホテル金沢、金沢

5. 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、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シンポジウム 2015, 2015/3/13、KKR ホテル金沢、金沢

6. 河崎洋志、感覚神経回路形成における出生の意義、生理研研究会「シナプス・神経ネットワークの機能ダイナミクス」、2014/12/2-3、生理学研究所、岡崎

7. 干場義生、戸田智久、Wegner M., 田中弘文、柳茂、河崎洋志、大脳皮質神経細胞の成熟抑制機構の解析、国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」、2014/12/1-2、国立遺伝学研究所、三島

8. Ebisu H., Iwai L., Momoi T., Kawasaki H., The molecular mechanism of thalamic pattern formation during development, 国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」、2014/12/1-2、国立遺伝学研究所、三島

9. Ebisu H., Iwai L., Momoi T., Kawasaki H., The molecular mechanism of thalamic pattern formation during development, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Dec 15-19, Washington Convention Center, Washington, USA

10. Hoshiba Y., Toda T., Wegner M., Yanagi S., Tanaka H., Kawasaki H., The role of Sox11 in neuronal maturation in the mouse cerebral cortex, 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Dec 15-19, Washington Convention Center, Washington, USA

11. 河崎洋志、脳神経系の形成過程における出生の役割、第 37 回日本神経科学大会、2014/9/11-13、パシフィコ横浜、横浜

12. 干場義生、戸田智久、河崎洋志、マウス大脳皮質の神経細胞成熟過程における Sox11 の機能解析、第 37 回日本神経科学大会、2014/9/11-13、パシフィコ横浜、横浜

13. Kawasaki H., Birth regulates sensory map formation during development, 第47回日本発生生物学会, 2014/5/27-30、ウイック愛知、名古屋

14. 河崎洋志、出生による脳神経系発達の制御メカニズム、第12回GPCR研究会、2014/5/9-10、日本科学未来館、東京

15. Kawasaki H., Birth regulates sensory map formation in the brain through serotonin signaling, 第91回日本生理学会, 2014/3/18、鹿児島大学、鹿児島

16. 干場義生、河崎洋志、大脳皮質神経細胞の成熟抑制機構の解析、第7回神経発生討論会、2014/3/13-14、大阪大学、大阪

17. 干場義生、河崎洋志、大脳皮質神経細胞の成熟制御機構の解析、国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」2013/12/19-20、国立遺伝学研究所、三島

18. 戸田智久、河崎洋志、感覚系神経回路形成の時期制御、国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」2013/12/19-20、国立遺伝学研究所、三島

19. 河崎洋志、感覚神経系の形成過程の制御メカニズム、国立遺伝学研究所研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」2013/12/19-20、国立遺伝学研究所、三島

20. 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、金沢大学脳肝インターフェイスメディスン研究センターシンポジウム、2013/11/21、KKR ホテル金沢、金沢

21. Kawasaki H., Toda T., Iwai L. and Tanno K., Inner fiber layer-like structures revealed with in utero electroporation in ferrets, 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Dec 15-19, San Diego Convention Center, San Diego, USA

22. 戸田智久、本間大悟、徳岡宏文、早川格、一瀬宏、河崎洋志、Birth regulates the initiation of sensory map formation through serotonin signaling, 包括脳ネットワーク夏のワークショップ、2013/8/29-9/1、名古屋国際会議場、名古屋

23. 河崎洋志、高等哺乳動物を用いた脳神経系の遺伝学的解析、第36回日本神経科学大会、2013/6/20-23、国立京都国際会館、京都

24. Kawasaki H., Structural properties of the cerebral cortex in ferrets revealed with in utero electroporation, Neuro2013Satellite Symposium, 2013/6/19、京都府立医科大学、京都

25. 河崎洋志、子宮内電気穿孔法を用いたフェレット大脳皮質の形成過程解析、第46回日本発生生物学会、2013/5/28-31、くにびきメッセ、松江

26. 河崎洋志、戸田智久、岩井玲奈、フェレットを用いた高等哺乳動物の脳神経系の形成過程解析、日本生化学会北陸支部第31回大会、2013/5/25、金沢大学、金沢

27. 戸田智久、本間大悟、徳岡宏文、一瀬宏、河崎洋志、出生による感覚系神経回路形成の開始制御、日本生化学会北陸支部第31回大会、2013/5/25、金沢大学、金沢

28. 河崎洋志、フェレットを用いた高等哺乳動物の脳神経系の分子遺伝学的解析、第60回日本実験動物学会総会、2013/5/15-17、つくば国際会議場、筑波

29. 河崎洋志、フェレットを用いた脳神経系の遺伝学的解析、第44回北陸実験動物研究会、2013/4/20、金沢大学、金沢

[図書] (計 3 件)

1. 河崎洋志、感覚神経系の分子脳科学、分子脳科学、三品昌美編、化学同人、京都、2015、69-75

2. Kawasaki H., Genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation, in **Electroporation Methods and Neuroscience**, Saito T. ed., Springer Publishers, New York, 2014, pp105-113

3. 河崎洋志、フェレットを用いた高等哺乳動物の脳神経解析、脳神経系の発生・再生の融合的新展開、井村裕夫、高橋淳、河崎洋志編、診断と治療社、東京、2014、146-149

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：高等哺乳動物を用いた新規脳疾患モデル動物

発明者：河崎洋志、榊田宏輔

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：特願 2015-006388

出願年月日：2015年1月16日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/top/kawasaki/welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河崎 洋志 (KAWASAKI Hiroshi)
金沢大学・脳・肝インターフェイスマディシン研究センター・教授
研究者番号：50303904

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：