

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04654

研究課題名(和文) 軸索ガイダンスに着目した大脳皮質形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of developmental mechanisms of the cerebral cortex focusing on axon guidance

研究代表者

新明 洋平 (Shinmyo, Yohei)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：00418831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：大脳皮質に見られる複雑な脳神経回路の形成機構を理解することを目的として、独自に発見した軸索ガイダンス分子Draxinの解析を行った。Draxinの軸索ガイダンス活性に、受容体であるDccとNeogeninに加えて、ヘパラン硫酸プロテオグリカンが重要であることを明らかにした。さらに、高等哺乳動物であるフェレットの大脳皮質神経回路の形成機構の解明を目的として、子宮内電気穿孔法とCRISPR/Cas9システムを組み合わせた遺伝子ノックアウト法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、大脳皮質の神経回路形成機構の解明のみならず、臨床脳医学にも大きく貢献できる。ヒト大脳皮質形成異常に見られるてんかんや発達遅滞の発症メカニズムには不明な点が多く、根本的な治療法は確立されていないのが現状である。本研究成果は、大脳皮質形成異常の病態機序解明および治療薬探索に繋がることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To understand molecular mechanisms of the neural circuit formation in the cerebral cortex, we investigated functions of an axon guidance molecule, Draxin. We found that in addition to the receptors Dcc and Neogenin, heparan sulfate proteoglycan was important for the activity of Draxin. Furthermore, for the purpose of elucidating molecular mechanisms of the neural circuit formation in the cerebral cortex of higher mammals, we established a gene knockout method by combining in utero electroporation with the CRISPR/Cas9 system in ferrets.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：軸索ガイダンス Draxin マウス フェレット

1. 研究開始当初の背景

精巧な神経回路網は高次脳機能の構造的基盤であり、その形成メカニズムの解明は神経科学の重要研究課題である。約20年前に神経軸索ガイダンス分子が発見され、神経軸索が標的細胞に導かれるという軸索誘導の基本概念が明らかにされた。しかしこの概念だけでは、大脳皮質に見られる複雑な脳神経回路の形成を説明することはできない。この回路形成を制御する新たな概念として「軸索-軸索間の相互作用」が注目を集めているが、この軸索間相互作用に関わる分子の実体はほとんど分かっていなかった。我々は、世界に先駆けて新規の軸索ガイダンス分子を同定し (Draxin と命名) 大脳や脊髄の交連神経形成に重要であることを明らかにした (Islam et al., Science, 2009)。さらに我々は、*Draxin* が軸索間相互作用を担っている分子実体であることを明らかにした (Shinmyo et al., Nature Communications, 2015)。そこで本研究課題では、軸索間相互作用の分子機構の解明を目的として、*Draxin* の軸索ガイダンス活性に関わる分子機構を解析した。

これまでに軸索ガイダンス関連分子の遺伝子改変マウスが数多く作製され、それらマウスの個体レベルでの解析からマウス大脳皮質における神経回路の形成機構が明らかにされてきた。一方で、マウスでの解析が困難である高等哺乳動物に特徴的な神経回路に関する研究は遅れている。例えば、ヒトやサルなどの高等哺乳動物では同側の大脳皮質の異なる脳回 (脳表面の凸部) 領域をつなぐ短連合線維が大きく発達しており、この短連合線維の発達が高次脳機能の獲得に重要であったと考えられている。しかしながら、短連合線維はマウスにはあまり存在しないため、その形成機構については全く分かっていない。

重要なことに、イタチ科に属するフェレットは、脳回など高等哺乳動物に特徴的な発達した脳を持つ。そこで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神経回路形成における軸索ガイダンス機構の解明を目指す。我々はこれまでに、子宮内電気穿孔法を応用しフェレット大脳皮質への遺伝子導入を世界に先駆けて成功させた。この独自技術を用いて CRISPR/Cas9 システムを導入し、フェレット大脳皮質において遺伝子ノックアウト技術の確立を目指した。

2. 研究の目的

軸索間相互作用に基づく神経回路形成機構の解明は最近注目を集めているが、その軸索間相互作用の分子機構はほとんど分かっていなかった。我々は、以前に *Draxin* が軸索間相互作用を介して視床皮質軸索投射を制御することを明らかにした (Shinmyo et al., Nature Communications, 2015)。重要なことに、*Draxin* が視床神経に対して濃度依存的な活性を持つことを明らかにしている。*Draxin* は、低濃度では神経突起伸長を促進する一方、高濃度では逆に神経突起伸長を阻害する。この濃度依存的な活性が視床皮質軸索投射に重要であると考えられることから、この現象を制御する分子機構の解明を目指した。具体的には、この濃度依存的な *Draxin* の活性に関わる受容体を調べた。さらに、この濃度依存的な活性の制御にプロテオグリカンが関わっているかを調べた (研究1)。

さらに本研究では、高等哺乳動物に特徴的な神経回路形成機構を理解することを目的に、フェレット大脳皮質において遺伝子機能の解析技術を検討した。具体的には、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、フェレット大脳皮質特異的な遺伝子ノックアウト法の確立を目指した。この技術の有用性を示すために、ヒト滑脳症の原因遺伝子として知られている *Cdk5* 遺伝子に着目した (研究2)。

3. 研究の方法

(1)

Draxin の濃度依存的な軸索ガイダンス活性制御の分子メカニズムを調べるために以下の研究

を行った。最初に、Draxin 受容体である Dcc と Neogenin (Neo1) のダブルノックアウトマウスの神経細胞を分離培養し、Draxin の濃度依存的な活性にこれらの受容体が必要であるかどうかを調べた。次に、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) のヘパラン硫酸側鎖を分解するヘパリナーゼの存在下において、正常マウスの神経細胞を分離培養し、Draxin の濃度依存的な活性に HSPG が必要であるかどうかを調べた。

(2)

Cdk5 に対する標的配列を持つ pX330-Cdk5 プラスミドを 5 種類作成し、それぞれのコンストラクトを pCAG-EGFP と混合し、妊娠 31 日目のフェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法を用いて導入した。8 日後の妊娠 39 日目に胎仔を固定した。フェレット大脳皮質における Cdk5 の機能阻害では神経細胞の移動障害が起こると予想されたので、凍結切片を作成後、EGFP 陽性細胞の分布を調べた。次に、移動障害を示した神経細胞において Cdk5 の発現が消失しているかを調べるために、Cdk5 に対する抗体を用いて免疫染色を行なった。

また、フェレット脳回形成において Cdk5 が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を妊娠 31 日目のフェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法を用いて導入した。フェレット脳の発生において、出生約一週間後に大脳表面に凹凸構造が観察され始め、出生 16 日後にははっきりとした脳回が観察される。そこで、生後 16 日目で脳を固定し、形態学的に脳回に異常があるかどうかを調べた。

4 . 研究成果

(1)

Dcc と Neo1 のダブルノックアウトマウスの視床神経細胞を分離培養し、Draxin の濃度依存的な活性の有無を調べた。その結果、低濃度 (10nM) の Draxin の活性 (神経突起伸長を促進する) は、Dcc と Neo1 のダブルノックアウトマウスの神経細胞ではほぼ完全に消失した。この結果から、Draxin の神経突起伸長の促進効果には、受容体である Dcc と Neo1 があれば十分であると考えられた。一方、高濃度 (100nM) の Draxin の活性 (神経突起伸長を阻害する) は、Dcc と Neo1 のダブルノックアウトマウスの神経細胞において低減するものの完全には消失しなかった。この結果から、Draxin の神経突起伸長の阻害効果には、受容体である Dcc と Neo1 は必要であるが、それ以外の受容体が関与する事が示唆された。

次に、正常マウスの神経細胞をヘパリナーゼの存在下において分離培養し、Draxin の濃度依存的な活性がどう変化するかを調べた。その結果、低濃度 (10nM) の Draxin の活性 (神経突起伸長を促進する) は正常に維持されていた。一方、面白いことに、本来神経突起伸長を阻害する高濃度での Draxin の活性がヘパリナーゼを添加すると逆転し神経突起伸長を促進する事を見出した。この結果から、Draxin の阻害活性に HSPG が重要であると考えられた。HSPG には、Syndecan, Glypican, Agrin, Perlecan 等がある。今後、in vitro での結合実験や神経細胞の分離培養を用いた実験を行うことにより、Draxin の神経突起阻害活性に重要な HSPG を同定したい。

(2)

マウス大脳皮質の発生期に、Cdk5 は分裂後の神経細胞に強く発現し、その放射状移動に必須であることが知られている。実際、Cdk5 ノックアウトマウスの大脳皮質では、神経細胞の移動障害により正常な層構築が形成されない。フェレット大脳皮質における Cdk5 の機能阻害においても神経細胞の移動障害が起こると予想された。マウス大脳皮質におけるノックアウトでは、hCas9 (human codon optimized Cas9) とガイド RNA を同時に発現できるプラスミド (pX330) が有用であったので、フェレットにおいてもこのプラスミドを使用した。標的配列が異なる 5 種類の pX330-Cdk5 を作成し、それぞれのコンストラクトを pCAG-EGFP と混合し、フェレット大脳皮質へ子宮内電気穿孔法を用いて導入した。8 日後の妊娠 39 日目に胎仔を固定し、EGFP 陽性細胞の

分布を調べた。Cdk5 に対する標的配列を持たない pX330 を導入したコントロールでは、EGFP 陽性細胞は皮質板に移動していた。一方、pX330-Cdk5 を導入した個体では 5 種類すべてにおいて、EGFP 陽性細胞の約半数が移動障害を示した (図 1)。次に、移動障害を示した神経細胞において Cdk5 の発現が消失しているかを Cdk5 に対する抗体を用いた免疫染色により調べた。その結果、正常に移動した GFP 陽性細胞では Cdk5 の発現が観察されたが、移動障害を示した GFP 陽性細胞では Cdk5 の発現が完全に消失していた。これらの結果から、pX330-Cdk5 の導入された EGFP 陽性細胞の約半数で、Cdk5 の機能が喪失し放射状移動が障害されたと考えられた。このように、子宮内電気穿孔法と CRISPR/Cas9 システムとを組み合わせることにより、フェレット大脳皮質において効果的な遺伝子ノックアウト法の確立に成功した (Shinmyo et al., Cell Reports, 2017)。

次に、フェレット脳回形成において Cdk5 が重要であるかを調べるために、pX330-Cdk5 を導入した個体の組織学的解析を行った。生後 16 日目で脳を固定し、形態学的に脳回に異常があるかどうかを調べた。その結果、コントロール個体では、脳回形成には異常が見られなかった。一方、pX330-Cdk5 を導入した個体では脳回の低形成が観察された。これらの結果から、Cdk5 が脳回形成に必須であることが明らかとなった。pX330-Cdk5 を導入した個体では、Cdk5 の機能不全により正常に灰白質に移動できなかった神経細胞が白質に集積していた。一方、グリア細胞であるアストロサイトやオリゴデンドロサイトの分布には異常が見られなかった。以上の結果から、神経細胞の正常な移動が脳回形成に必須であると考えられた (Shinmyo et al., Cell Reports, 2017)。このように、子宮内電気穿孔法による CRISPR/Cas9 システムの導入は、大脳皮質の神経回路形成の解析にも有用であると考えられるので、今後、高等哺乳動物に特徴的な神経回路の形成機構を明らかにしたい。

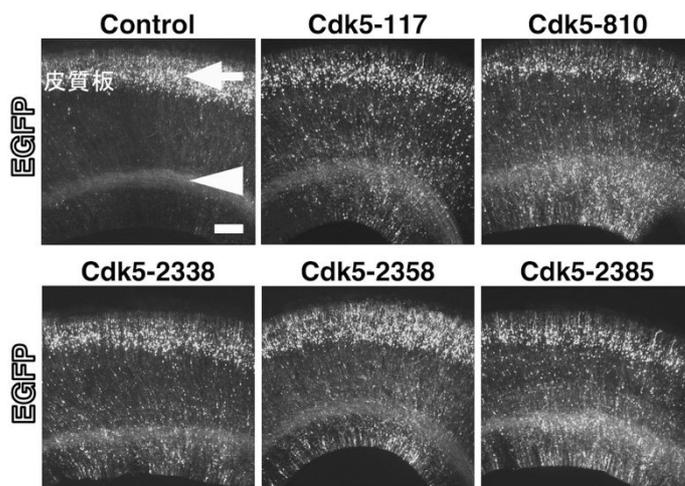


図 1 . 大脳皮質における Cdk5 のノックアウト

標的配列が異なる 5 種類の pX330-Cdk5 を子宮内電気穿孔法により大脳皮質に導入にした。コントロールサンプルにおいて EGFP 陽性細胞は皮質板に移動していたが (矢印) pX330-Cdk5 を導入した個体の場合 5 種類すべてにおいて、EGFP 陽性細胞の約半数が移動障害を示した。矢尻は、GFP 陽性の神経軸索を示す。スケールバー : 0.2 mm。

< 引用文献 >

1. Islam S. M., Shinmyo Y., Okafuji T., Su Y., Naser I. B., Ahmed G., Zhang S., Chen S., Ohta K., Kiyonari H., Abe T., Tanaka S., Nishinakamura R., Terashima T., Kitamura T. and Tanaka H. Draxin, a repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. *Science*, 323, 388-393, 2009.

2. 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.
3. Shinmyo Y., Terashita Y., Dinh Duong T. A., Horiike T., Kawasumi M., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H. Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. *Cell Reports*, 20(9), 2131-2143, 2017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shinmyo Y. and Kawasaki H	4. 巻 79
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Current Protocols in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 3.32.1-3.32.11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpns.26.	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 -
1. 著者名 Shinmyo Y., Terashita Y., Dinh Duong T. A., Horiike T., Kawasumi M., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Folding of the Cerebral Cortex Requires Cdk5 in Upper-Layer Neurons in Gyrencephalic Mammals.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2131-2143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2017.08.024.	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 -
1. 著者名 Shinmyo Y., Tanaka S., Tsunoda S., Hosomichi K., Tajima A. and Kawasaki H.	4. 巻 6, 20611
2. 論文標題 CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using in utero electroporation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6, 20611
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep20611	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 -
1. 著者名 Toda T., Shinmyo Y., Dinh Duong T. A., Masuda K., and Kawasaki H.	4. 巻 6, 29578
2. 論文標題 An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6, 29578
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep29578	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yohei Shinmyo, Tomohisa Toda, Dinh Tung Anh Duong, Kosuke Masuda and Hiroshi Kawasaki.
2. 発表標題 An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals.
3. 学会等名 日本神経科学大会
4. 発表年 2017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)	