フェレットを用いた大脳の形成・進化および疾患病態の解析

メタデータ	言語: eng
	出版者:
	公開日: 2022-05-18
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 河﨑, 洋志, Kawasaki, Hiroshi
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00066099

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.

【総説】

フェレットを用いた大脳の形成・進化および疾患病態の解析

河　崎　洋　志
金沢大学 医学系 脳神経医学研究分野

Investigation of the mechanisms underlying development, evolution and diseases of the cerebral cortex using ferrets

Hiroshi Kawasaki

は　じ　め　に

ヒトに至る長い進化の歴史のなかで，脳神経系，特に大脳は大きく発達してきた．体積が大きくなり，さらに様々な発達した脳構築を獲得してきた．これらの脳構築は，高次脳機能の基盤となったと考えられている．例えば，ヒトの大脳の表面には，多くの皺すなわち脳回が存在することが特徴的である．脳回を獲得したことで大脳の表面積が増え，頭蓋の限られた容積のなかに，数多くの大脳皮質の神経細胞を収容できるようになったと考えられている．また発生期の大脳では多くの神経細胞を産生するため，新たな神経前駆細胞である外側放射状グリア(oRG)細胞が著しく増加し，外側脳室下帯(OSVZ)を形成した．このoRG細胞はマウスでは極少数見られるのみで，oRG細胞の増加が神経細胞の増加の基盤と考えられていることから注目されている．また進化において神経線維連絡も発達してきたが，発達した大脳の形成や進化，異常疾患病態の分子機構には不明な点が多い．

不明な点が多い理由として，分子遺伝学的解析に使われるマウスの大脳は哺乳類の中では比較的小さく，また脳回などの発達した脳構築を持っておらず，マウスでは研究が難しい点が挙げられる．そこで我々は，ヒトの大脳に類似した特徴を備えた大脳を持つ食肉類哺乳動物フェレット(*Mustela putorius furo*)(図1) に着目し，フェレットに分子生物学的研究技術を導入してきた[1-3]．本稿では，我々のフェレット解析技術を用いて明らかになってきた発達した大脳の形成と進化，異常疾患病態に関する最近の知見を紹介したい．

フェレットを用いた分子生物学的研究技術の確立

フェレットは中型食肉類哺乳動物で，体長約50cm，体重約1-2kg，平均寿命は6-8年と言われている (図1)．ヨーロッパケナガイタチが家畜化したものと言われている．発達した大脳を解析するために，フェレットには以下のような利点がある．第一に，マウスの脳に比べてフェレットの脳はサイズが大きく，また脳回やoRG細胞などの発達した脳構築を持っている (図2, 3)．第二に，これまでにフェレットは電気生理や神経解剖学的解析に多く使われており，フェレット脳の生理学的・解剖学的情報が利用可能である．第三に，新生仔が未熟な状態で生まれることから，大脳の発達機構の解析に適している．第四に，欧米を中心に神経科学研究に用いられており，飼育に関するノウハウがある．第五に，脳研究以外にもインフルエンザウイルスなどの感染症，嘔吐機構や制吐剤の研究にも用いられており，実験動物として広く認知されている．我々は，このような利点を持つフェレットに分子生物学的研究技術を導入できれば，発達した大脳を用いた遺伝子レベルでの脳研究の突破口となると考えた[1-3]．

分子生物学的研究には，遺伝子同定と遺伝子操作が重要である．そこで我々はまず，特徴的な発現分布を

図1．フェレットの外観
フェレットは発達した大脳を持つことから，大脳の発生，進化および疾患の研究で注目されている．

示す遺伝子の同定を行うために独自にフェレット用マイクロアレイを作成した[4]．このマイクロアレイを用いて，高等哺乳動物で発達した視覚神経系に存在する大細胞や小細胞に選択的に発現する遺伝子を同定してきた[4-6]．続いて，我々は分子メカニズムを解析するためにフェレット大脳皮質での遺伝子操作技術を確立してきた[7-9]．マウスに用いられていた子宮内電気穿孔法を齧歯類以外の哺乳動物に応用することに初めて成功し，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を実現した (図2) [7-9]．この方法により，6層構造をもつ大脳皮質のほぼ全ての層の神経細胞だけではなく，oRG細胞など神経前駆細胞へも効率よく遺伝子導入が可能となった．電気穿孔法を使っているため，数日という短期間で遺伝子を発現させた動物個体を得ることができ，また複数種類のプラスミドを共導入することも可能である．また一腹のなかで各胎児に異なる条件の遺伝子導入が可能であり，多くの条件の実験を効率よく進めることができる．さらに我々は子宮内電気穿孔法とゲノム編集技術CRISPR/Cas9を組み合わせ，マウスやフェレットの脳で簡便に遺伝子ノックアウトを行うことも可能とした[10-12]．これらの技術基盤整備の結果，フェレットを用いた大脳の分子生物学的解析が可能となり，現在多くの国内外の研究室で導入されている[13]．

脳回の構造的特徴と形成プロセス

ヒトの大脳を見て印象に残る構造的特徴は，大脳表面に存在する多くの皺であろう．大脳の表面には隆起している脳回(gyrus) と陥凹している脳溝(sulcus) があり，皺のある折りたたまれた外観をしている (図2, 3)．脳回を持つ皺のある大脳はgyrencephalic，皺のない平滑な大脳はlissencephalic と表現する．脳回はヒト，サル，ネコ，フェレットなどの比較的大きな大脳を持つ動物種には見られるが，ラットやマウスなどの大脳が小さい動物種には見られない傾向がある．生物の進化の歴史のなかで脳回と脳溝を獲得したことにより大脳皮質の表面積を増加させ，頭蓋のなかに多くの大脳皮質の神経細胞を収容できるようになったと考えられている．従って，脳回や脳溝は大脳が高機能化するうえで鍵となった重要な構造だと考えられている．また，脳回に異常が見られる多小脳回症(polymicrogyria) や滑脳症(lissencephaly) などの患者は重篤な脳機能障害を呈し，自閉症や統合失調症でも脳回に異常があることが報告されていることから，発達期の脳回形成機構やその異常疾患病態の解明は近年特に注目を集めている．

大脳は神経細胞が集積している6層構造の灰白質と，主に軸索やミエリンからなる白質で構成される．gyrencephalic な大脳では，大脳の表面および灰白質と白質の境界のいずれにも弯曲があり，灰白質の6層全てが折り畳まれている (図3)．一方，白質の脳室側は平坦であり弯曲は見られないという特徴がある (図3)．従って，白質は脳溝部分よりも脳回部分において厚くなっている．脳回の研究をする際には，この特徴が見られるか検討することが重要である．

マウスを用いた脳回の形成メカニズムへのアプローチ

マウスの大脳には脳回は存在しないが，ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど分子遺伝学的解析技術が多く利用可能であることから，マウスを用いて脳回形成の分子メカニズムを明らかにする試みもなされてきた．神経前駆細胞を過剰増殖させると，脳回に類似する弯曲を大脳皮質の表面に作ることができたと報告された．しかし，このマウスでは大脳

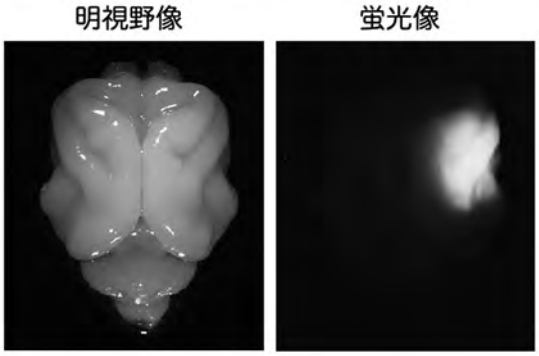

図2．子宮内電気穿孔法を用いて蛍光タンパク質を発現させたフェレットの脳
大脳には多くの脳回が見られる．右側の大脳に蛍光タンパク質を発現させてある．

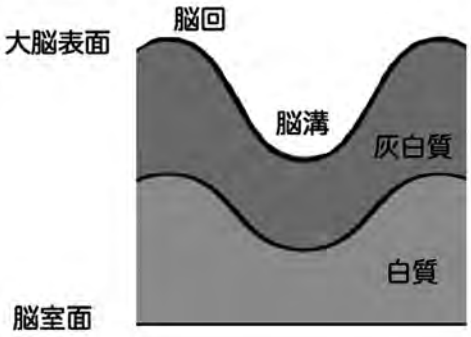

図3．脳回と脳溝の構造の模式図
大脳の断面を模式的に示している．大脳の表面および灰白質と白質の境界には弯曲がある一方で，脳室側は平坦であり弯曲は見られないという特徴がある．

皮質の表面のみならず，本来の脳回では見られない脳室面の弯曲も見られたことから，本来の脳回とは異なる弯曲ではないかと指摘されている．その他にも，核タンパクTrnp1の阻害，ソニックヘッジホッグ(Shh)シグナリングの活性化，類人猿特異的遺伝子ARHGAP11BやTBC1D3の過剰発現により，マウスの大脳皮質の表面に弯曲が生じると報告された．これらの研究成果は，胎児期の大脳皮質の神経前駆細胞を操作することにより大脳皮質表面に弯曲を作れることを実験的に証明した点で重要であるが，これらの遺伝子が実際に生理的な脳回形成に関与しているか，今後，脳回を持つフェレットなどの動物を用いて詳細な検証をすることが必要であろう．

フェレットを用いた脳回形成メカニズムの解析

近年，フェレットを用いて大脳形成の分子機構の解析を進めている研究室が世界的に増えてきている．まず，脳回形成における神経前駆細胞の重要性が解析された．神経前駆細胞の分裂期のフェレットにおいて薬剤を用いて細胞分裂を抑制すると，脳回の形成が阻害された[14]．逆にフェレット大脳皮質で神経前駆細胞の分裂を増加させると，脳回の形成が促進された[15, 16]．また脳回形成が始まる前の段階で，後に脳回となる領域では細胞分裂量が多く，脳溝となる領域では少なかった[17]．これらの結果は，神経前駆細胞の増加が脳回形成に重要であることを示唆している．

神経前駆細胞には，放射状グリア細胞 (RG細胞)，oRG細胞と中間前駆細胞 (IP細胞) の3種類が存在する(図4)．このいずれが脳回形成に重要であるか検討するため，我々は発生期のフェレット大脳皮質におけるRG細胞，oRG細胞とIP細胞の分布を解析した．その結果，oRG細胞およびIP細胞は，将来，脳回になる部分には多く存在するが，脳溝になる部分では少なかった[18]．この結果は，oRG細胞もしくはIP細胞が脳回になる部分に多く分布し，神経細胞を多く供給することで脳回という隆起を作る可能性を提起している．また，脳回を持つ動物種，即ちヒト，サルやフェレットの大脳ではoRG細胞が多く存在するが，脳回を持たないマウスの大脳ではoRG細胞は少ないことから，oRG細胞が脳回形成に重要であると考えられている[19-21]．さらに我々は，oRG細胞はHOPX陽性およびHOPX陰性の2群に分けられることを見いだし，HOPX陽性oRG細胞が脳回形成に関わっている可能性が高いことを報告した[22]．

次に我々は脳回形成に重要な遺伝子を同定するため，脳回異常疾患に注目した．タナトフォリック骨異形成症は，骨の形成異常と多小脳回症などの脳形成異常を示す先天性疾患である．その原因として線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体3の活性型変異が報告されていた[23]．そこでFGFシグナルの脳回形成における役割を検討するために，FGF受容体3のリガンドであるFGF8を子宮内電気穿孔法でフェレット大脳に発現させたところ，脳回が増加することを見いだした[16]．さらに優性不能型FGF受容体をフェレット大脳に導入しFGFシグナルを阻害したところ，脳回形成が抑制されることを見いだした[24]．これらの結果は，FGFシグナルが脳回形成に重要なシグナルであることを意味している (図5)．oRG細胞が脳回形成に関わっていると考えられていることから，FGFシグナルがoRG細胞に影響を与えていると考えた．FGF8を発現させることによりoRG細胞の分裂が促進されoRG細胞数が増加し[16]，逆に優性不能型FGF受容体を発現させたところoRG細胞の分裂が抑制されoRG細胞数が減少した[24]．これらの結果は，FGFシグナルがoRG細胞の分裂を制御することを通じて，脳回の形成を促進していることを示唆している．

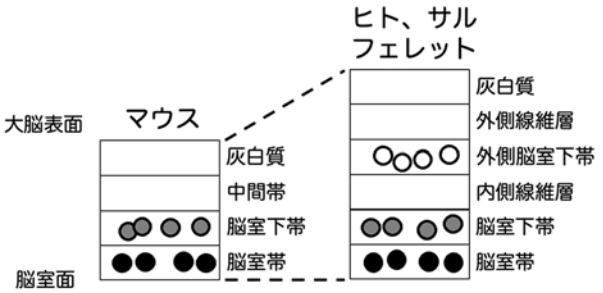

図4．発達期の大脳における神経前駆細胞の分布の模式図
大脳の断面におけるRG細胞 (黒色)，IP細胞 (灰色) およびoRG細胞 (白色) の分布を模式的に示している．

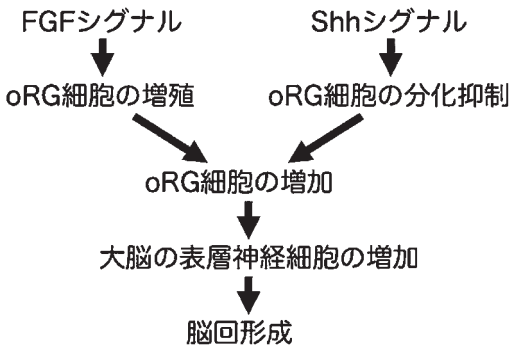

図5．脳回形成を制御する分子機構
FGFシグナルはoRG細胞の増殖を，ShhシグナルはoRG細胞の分化を制御している．FGFシグナルおよびShhシグナルの活性化によりoRG細胞が増加し，大脳表層側の2～3層神経細胞が増加することが脳回形成の基盤となっている．

ソニックヘッジホッグ(Shh) シグナルの異常も脳回異常疾患の原因となるとの報告があったことから，我々は続いてShhシグナルの脳回形成における重要性を検討した[22]．リガンドであるShhをフェレット大脳へ導入しShhシグナルを活性化したところ脳回が増加することを見いだした．逆にHhipΔC22を発現させShhシグナルを抑制すると脳回形成が抑制されたことから，Shhシグナルも脳回形成に重要であることが明らかとなった (図5) [22]．さらにoRG細胞への影響を検討したところ，ShhシグナルはoRG細胞の分化を制御していることを見いだした．Shhをフェレット大脳へ導入するとoRG細胞から神経細胞への分化が抑制され，oRG細胞の数が増加した．逆にShhシグナルを抑制するとoRG細胞から神経細胞への分化が促進され，oRG細胞の数が減少した．すなわち，ShhシグナルはoRG細胞の分化を抑制し，oRG細胞の状態を維持することによりoRG細胞を増加させることがわかった[22]．

おもしろいことにマウスとフェレットにおけるShhシグナルを比較したところ，大脳に存在するShhタンパク質がフェレットで多いことがわかった[22]．さらにShhシグナルがマウスよりもフェレットの大脳で強く活性化していることを見いだした．これらの結果は，進化の過程で大脳におけるShhシグナル活性が増加することにより，oRG細胞が増加し脳回形成につながったことを示唆している[22]．

FGFシグナルやShhシグナルを活性化させて脳回形成を促進した大脳皮質を詳細に検討すると，大脳皮質の表層側の2～3層の厚さが選択的に増加し，深層側の5～6層はあまり影響を受けていないことを見いだした[16, 22, 24]．この結果は，脳回形成には大脳の表層側と深層側の量比が重要であるとの仮説に一致していた[25, 26]．実際に，2～3層は大脳皮質の領域間の機能的連携に重要であると考えられており，進化の過程で2～3層の神経細胞は特に増加していることが知られている．我々は実験的に選択的に2～3層の神経細胞数を減少させると脳回形成が阻害されることを見いだした (図5) [11]．これらの研究から，哺乳類の進化において大脳皮質の表層の神経細胞の増加が重要なプロセスであることが明らかとなった．

大脳における神経線維連絡の進化と形成プロセス

ヒトやサルなどの発達した大脳においてU線維が注目されている．U線維は灰白質直下に存在する短連合線維である．U線維は近隣の大脳皮質領域間の機能的連合に重要であり，大脳皮質機能の発達に特に重要であると考えられている．U線維は自閉症や統合失調症などで異常が報告されており，さらに副腎白質ジストロフィー，脳虚血や多発性硬化症においてU線維は他の白質とは異なる特徴的な疾患感受性を持っていることから，臨床的にも重要である．U線維についてはこれまでに，ヒトやサルの脳を対象としたMRI画像解析などが行われているが，マウスでは対応する線維の報告がなく，形成機構や疾患感受性の分子機構の解析は困難だった．

そこで我々は大脳が発達しているフェレットにもU線維があるのではないかと考えた．実際にこれまでにMRI画像解析が行われ，フェレット大脳でもU線維に類似した軸索投射が存在することが報告されていた．そこで我々はフェレット大脳皮質の神経細胞にGFPを発現させ，大脳皮質神経細胞からの軸索を可視化したところ，灰白質直下に近隣の大脳皮質領域へと投射するGFP陽性軸索が存在することを見いだした[27]．この結果はフェレットにもU線維が存在していることを示唆している[27]．さらに我々は，発生段階におけるU線維の形成過程，さらにマウスとの比較によるU線維の進化のプロセスなどを明らかにしている[27, 28]．今後はU線維に特徴的な疾患感受性の分子機構の研究が重要になると考えている．

7. 今後の展望

哺乳動物の大脳は多くの研究者の関心を集めているが，その形成や進化，疾患病態の分子機構は未だに不明な点が多い．従来は，マウスをモデル動物として使用することにより大脳の理解が進んできた．さらに近年，フェレットやマーモセットのような新たな動物モデル，子宮内電気穿孔法やゲノム編集技術などの新たな研究技術の発達により，大脳の研究は急激に発展しつつある．我々にはフェレットを用いた独自の研究技術の多くの蓄積があることから，世界に先駆けて発達した大脳で見られる複雑な脳構築や機能，その異常による疾患病態の理解に貢献していきたいと考えている．一緒に研究する仲間を受け入れているので，このような研究に興味があればkawasaki@med.kanazawa-u.ac.jpまで，ぜひ気軽に連絡して頂きたい．

謝　　辞

今回の寄稿の機会を頂きました金沢大学十全医学会雑誌・編集委員長・吉崎智一教授および関係各位に深謝申し上げます．今回ご紹介した研究の一部は，私たちの研究室のメンバーが頑張ってくれた研究の成果です．この場を借りて感謝したいと思います．

参 考 文 献

1) Kawasaki H. Molecular investigations of the brain of higher mammals using gyrencephalic carnivore ferrets. Neurosci Res 86: 59-65, 2014

2) Kawasaki H. Molecular investigations of development and diseases of the brain of higher mammals using the ferret. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 93(5): 259-269, 2017

3) Shinmyo Y, Masuda K, Hoshiba Y et al. Molecular investigations of the structure and development of the brain of carnivores. *In* S Shigeno, Y Murakami, T Nomura (eds), Brain Evolution by Design, 1st ed, p311-327, Springer Publishers, New York, 2017

4) Kawasaki H, Crowley JC, Livesey FJ et al. Molecular organization of the ferret visual thalamus. J Neurosci 24(44): 9962-9970, 2004

5) Iwai L, Ohashi Y, van der List D et al. FoxP2 is a parvocellular-specific transcription factor in the visual thalamus of monkeys and ferrets. Cereb Cortex 23(9): 2204-2212, 2013

6) Sato C, Iwai-Takekoshi L, Ichikawa Y et al. Cell type-specific expression of FoxP2 in the ferret and mouse retina. Neurosci Res 117: 1-13, 2017

7) Kawasaki H, Iwai L, Tanno K. Rapid and efficient genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. Mol Brain 5: 24, 2012

8) Kawasaki H, Toda T, Tanno K. *In vivo* genetic manipulation of cortical progenitors in gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. Biol Open 2(1): 95-100, 2013

9) Kawasaki H. Genetic manipulation of gyrencephalic carnivores using *in utero* electroporation. In T Saito (ed), Electroporation Methods and Neuroscience, 1st ed, p105-113, Springer Publishers, New York, 2015

10) Shinmyo Y, Tanaka S, Tsunoda S et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. Sci Rep 6: 20611, 2016

11) Shinmyo Y, Terashita Y, Dinh Duong TA et al. Folding of the cerebral cortex requires Cdk5 in upper-layer neurons in gyrencephalic mammals. Cell Rep 20(9): 2131-2143, 2017

12) Shinmyo Y, Kawasaki H. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in the mouse brain using *in utero* electroporation. Curr Protoc Neurosci 79: 3.32.1-3.32.11, 2017

13) Gilardi C, Kalebic N. The ferret as a model system for neocortex development and evolution. Front Cell Dev Biol 9: 661759, 2021

14) Haddad R, Rabe A, Dumas R. Neuroteratogenicity of methylazoxymethanol acetate: behavioral deficits of ferrets with transplacentally induced lissencephaly. Neurotoxicology 1: 171-189, 1979

15) Nonaka-Kinoshita M, Reillo I, Artegiani B et al. Regulation of cerebral cortex size and folding by expansion of basal progenitors. EMBO J 32(13): 1817-1828, 2013

16) Masuda K, Toda T, Shinmyo Y et al. Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals. Sci Rep 5: 15370, 2015

17) Reillo I, de Juan Romero C, Garcia-Cabezas MA et al. A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. Cereb Cortex 21(7): 1674-1694, 2011

18) Toda T, Shinmyo Y, Dinh Duong TA et al. An essential role of SVZ progenitors in cortical folding in gyrencephalic mammals. Sci Rep 6: 29578, 2016

19) Fietz SA, Kelava I, Vogt J et al. OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. Nat Neurosci 13(6): 690-699, 2010

20) Reillo I, Borrell V. Germinal zones in the developing cerebral cortex of ferret: ontogeny, cell cycle kinetics, and diversity of progenitors. Cereb Cortex 22(9): 2039-2054, 2012

21) Betizeau M, Cortay V, Patti D et al. Precursor diversity and complexity of lineage relationships in the outer subventricular zone of the primate. Neuron 80(2): 442-457, 2013

22) Matsumoto N, Tanaka S, Horiike T et al. A discrete subtype of neural progenitor crucial for cortical folding in the gyrencephalic mammalian brain. eLife 9: e54873, 2020

23) Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ et al. Mutations in the transmembrane domain of FGFR3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. Cell 78(2): 335-342, 1994

24) Matsumoto N, Shinmyo Y, Ichikawa Y et al. Gyrification of the cerebral cortex requires FGF signaling in the mammalian brain. eLife 6: e29285, 2017

25) Richman DP, Stewart RM, Hutchinson JW et al. Mechanical model of brain convolutional development. Science 189: 18-21, 1975

26) Kriegstein A, Noctor S, Martinez-Cerdeno V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. Nat Rev Neurosci 7(11): 883-890, 2006

27) Yoshino M, Saito K, Kawasaki K et al. The origin and development of subcortical U-fibers in gyrencephalic ferrets. Mol Brain 13(1): 37, 2020

28) Saito K, Mizuguchi K, Horiike T et al. Characterization of the inner and outer fiber layers in the developing cerebral cortex of gyrencephalic ferrets. Cereb Cortex 29(10): 4303-4311, 2019