

## 論文の内容の要旨

論文題目 Pathophysiological analyses of cortical malformation using gyrencephalic mammals.  
(脳回をもつ動物を用いた大脳皮質形成異常の病態生理学的解析)

氏名 梶田 宏輔

高等哺乳動物の大脳皮質における最も目立つ特徴の1つが脳回である。ヒト、サルやフェレットの大脳皮質には脳回が見られるが、多くの齧歯類の大脳皮質には脳回は見られない。また、発生期の脳回形成異常がみられるヒトの疾患である滑脳症(lissencephaly)や多小脳回症(polymicrogyria)などでは著明な脳機能障害をきたすことから、脳回の形成異常疾患の病態解析は重要である。

タナトフォリック骨異形成症(thanatophoric dysplasia, TD)は四肢と脳神経系に異常が見られる先天性疾患であり、脳神経系は巨脳(megalencephaly)、脳回形成異常としての多小脳回などが見られる。TDはFGF受容体3の点変異によりチロシンキナーゼ活性が持続的に活性化することにより生じると考えられている。しかし、この点変異を導入したノックインアウスでは巨脳は見られるが多小脳回が見られず、FGF受容体3の点変異が本当に多小脳回を引き起こす原因なのか、検証されていなかった。さらにFGF受容体3という分子レベルの変化と、脳回形成異常という組織レベルでの異常とを結びつけるメカニズムも不明であった。

最近、河崎らはイタチ科哺乳動物であるフェレットの脳回のある大脳皮質に対して、子宮内エレクトロポレーション法を応用して遺伝子導入する技術を確立した(Kawasaki et al., Molecular Brain 2012; Kawasaki et al., Biology Open 2013)。そこで私は、この技術を用いてFGF受容体3のリガンドであるFGF8をフェレット大脳皮質に導入したところ、TDの表現型である多小脳回を誘導することに成功した(以下、FGF8を導入したフェレットをFGF8フェレットと呼ぶ)。さらにFGF8フェレットの大脳皮質の形態学的及び組織学的分析を行ったので、以下に報告する。

### 結果

#### ① FGF8を発現したフェレット大脳皮質は多小脳回と巨脳を示す

子宮内エレクトロポレーション法を用いて胎生33日目にFGF8をフェレット大脳皮質に発現させたところ、大脳皮質のサイズが大きくなり、また脳回が増加するなど巨脳と多小脳回を呈することを見いだした。冠状断切片を用いて定量した結果、脳実質および脳室いずれも有意に

大きくなっていることが明らかとなった。また脳回形成の指標として gyrification index(GI)と gyrification number index(GN)を定量した結果、いずれも有意に増加していた。これらの結果は、FGF 活性化によりフェレット大脳皮質で巨脳と多小脳回が引き起こされることを意味している。

## ② FGF8 フェレットの脳室下帯(subventricular zone, SVZ)では神経幹細胞及び神経前駆細胞が増加している

脳回をもつ動物の発生期の脳皮質には主に3種類の神経前駆細胞(RG、IP、oRG)が見られる。放射状グリア(radial glia, RG)は脳室帯(ventricular zone, VZ)に存在する神経幹細胞であり、中間前駆細胞(intermediate progenitor, IP)へと分化する。IPは脳室下帯に存在する神経前駆細胞であり、神経細胞へと分化する。OSVZ放射状グリア(oRG)も脳室下帯に存在する神経前駆細胞であり、脳回を持つ高等哺乳動物で多く存在することから、その進化的意義が注目を集めている。

まず免疫組織学的解析を行い、FGF8 フェレットの大脳皮質では Ki-67 陽性細胞、リン酸化ヒストン H3 陽性細胞が脳室下帯で増加していることを見いだした。この結果は脳室下帯において細胞増殖が増加していることを示唆している。次に増殖している神経前駆細胞の種類を明らかにするために、Pax6、リン酸化ビメンチンおよび Tbr2 に対する免疫組織染色を行った。Pax6 およびリン酸化ビメンチンは RG と oRG で発現しており、Tbr2 は IP で発現している。その結果、FGF8 フェレットでは脳室下帯における Pax6、リン酸化ビメンチンおよび Tbr2 陽性細胞はいずれも有意に増加していることを見いだした。この結果は、FGF8 フェレットの脳室下帯において oRG と IP が増加していることを示唆している。

## ③ FGF8 フェレットではアストロサイトが増加している

神経細胞以外の変化について検討するために、GFAP および APC、Olig2 に対する免疫組織染色も行った。その結果、FGF8 フェレットの大脳皮質では GFAP 陽性領域が増加しており、アストロサイトが増加していることが示唆された。一方、APC および Olig2 陽性領域は明らかな増加は見られず、オリゴデンドロサイトには影響がないことが示唆された。これらの結果は、TD においてアストロサイト増加が巨脳もしくは多小脳回に関与している可能性を提起している。

## ④ FGF8 フェレットの大脳皮質では 2/3 層が厚くなっている

大脳皮質の層構造について検討するために、NeuN、Brn2、Ctip2、Foxp2 に対する免疫組織染色を行った。NeuN は成熟神経細胞、Brn2 は 2/3/5 層、Ctip2 と Foxp2 は 5/6 層に発現が見られる。その結果、FGF8 フェレット大脳皮質の多小脳回の部位では明らかな層構造の異常は

見られないことを見いだした。さらに定量的評価の結果、FGF8 フェレットでは大脳皮質 2/3 層が有意に厚くなっていたが、4-6 層は有意な変化は見られないことを見いだした。これらの結果から、多小脳回の形成には 2/3 層の神経細胞の増加が関与している可能性があると考えられる。

## 考察

私はフェレットの大脳皮質へ FGF8 を導入することで、ヒト TD に見られる多小脳回や巨脳などをフェレットにおいて再現することに成功した。組織学的解析で oRG や IP などの神経幹細胞や神経前駆細胞が脳室下帯で増加していたことから、神経幹細胞や神経前駆細胞の増加が多小脳回をつくる原因ではないかと考えられた。神経前駆細胞の増加が、大脳皮質 2/3 層もしくはアストロサイトの増加を引き起こし、その結果として多小脳回が生じた可能性があると考えている。

FGF 受容体 3 に活性化型変異を入れたマウスでは IP が増加したと報告されているが、今回の結果から FGF8 フェレットでは IP に加えて oRG も増加していることが明らかとなった。マウスで活性化型変異を入れても多小脳回ができなかった理由として、マウスでは oRG が増えていなかったためかもしれない。実際に、過去の研究により oRG は脳回を持つ動物の大脳皮質に多く存在することが報告されており、脳回形成における oRG の役割が今後興味深い。

TD 患者の脳サンプルを入手することが困難であることから、TD に関する病態生理学的解析は困難であった。今回私が作成した FGF8 フェレットはヒト TD 患者がもつ多小脳回や巨脳を呈しており、TD の病態解析に有用であると考えている。また、フェレットに関する遺伝子導入技術は、他の脳疾患への応用もしくは正常な脳回形成メカニズムの解明にも応用できるなど発展性が高いと考えられる。