

神経細胞の形態変化に着目した哺乳類大脳皮質進化機構の解明

Exploring regulatory mechanisms of mammalian neocortical development and evolution

(日本神経科学会推薦)

代表研究者 京都府立医科大学 野村 真 Kyoto Prefectural University of Medicine Tadashi Nomura

協同研究者 先端医療研究センター 川内 健史 Institute of Biomedical Research and Innovation Takeshi Kawauchi

The mammalian neocortex is a conspicuous brain structure characterized by a six-layered laminar organization. During neocortical development, excitatory projection neurons migrate toward the brain surface by changing their shapes from multi-polar to bi-polar morphology, which accomplishes an inside-out pattern of cortical development. In contrast, a six-layered neocortex does not develop in non-mammalian species: all neurons exhibit multi-polar shape and organize a three-layered dorsal cortex in reptiles. However, molecular mechanisms underlying species-specific neuronal migration patterns and cortical organization remain unclear. Here we identify that species differences in the regulation of Wnt signaling plays an essential role in mammalian and reptilian corticogenesis. Temporal controls of Wnt signaling in migratory neurons are crucial for multipolar-to-bipolar conversion in mammals, and manipulation of Wnt signaling activity provides a phenocopy of species-specific neuronal morphology. Furthermore, we identified that reptilian and avian migrating neurons have differential potentials in responses to altered Wnt activity. We suggest that heterochronic changes in Wnt activity contributed to the evolution of mammalian-type neuronal migration and an inside-out pattern of corticogenesis.

研究目的

我々ヒトを含む哺乳類の大脳新皮質は、感覚-運動機能の統合、記憶学習や認知機能を司る最上位中枢として機能している。哺乳類の大脳新皮質は膨大な数の神経細胞によって構築されているが、こうした神経細胞は形態学的・機能的にいくつかのサブタイプに分類される。大脳新皮質には特徴的な6層構造が形成されるが、この層構造は少なくとも6種類の異なる種類の錐体神経細胞によって構築される。大脳皮質の錐体神経細胞の多くは軟膜側に伸展した樹状突起（頂上樹状突起）を持つ興奮性の神経細胞であるが、この神経細胞はすべて胎児期の大脳原基の脳室帯に存在する神経前駆細胞から産生される。哺乳類の大脳新皮質の発生過程において、脳室帯で分

化した神経細胞が脳の外側である軟膜側に移動する際、いくつかの移動形態をとることが知られている。まず皮質発生の初期に移動する神経細胞の大半は、神経前駆細胞が持っていた長い突起（放射状線維）をそのまま維持して軟膜側へ移動する「細胞体トランスロケーション」と呼ばれる移動形態を示す。しかし発生が進行すると、細胞体から短い突起を様々な方向に伸展しながら移動する神経細胞が主流となる。この「多極性移動」を行う神経細胞は、一定時間が経過すると1本の長い突起（将来の頂上樹状突起）を軟膜側に伸展しつつ、放射状線維を足場として脳表面へと移動する「ロコモーション」型の移動形態をとる。ロコモーション型の移動を示す神経細胞は「皮質板」と呼ばれる特殊な層を形成し、この

皮質板が将来の皮質6層構造のもととなる。こうした大脳皮質に特徴的な解剖学的構造は長い進化の過程の中で獲得されたと考えられるが、大脳皮質の進化に寄与した発生遺伝学的基盤については未だ明らかとなっていない。

一方、哺乳類と同じ羊膜類（胚が羊膜と呼ばれる膜で包まれた形態で発生する動物群）である爬虫類では、3層からなるシンプルな組織構造が背側皮質に構築される。このような組織学的観察より、比較神経解剖学の分野では長きに渡って爬虫類の背側皮質が羊膜類祖先型の形質を保持しており、哺乳類型大脳新皮質6層構造は爬虫類型の「古代型」3層皮質から進化してきたと推測されてきた。これに対して我々の研究グループを含めた最近の研究により、爬虫類皮質の発生プログラムは祖先的な性質と派生的な性質の両方を備えていることが示されてきた(Nomura et al. Nature Communications 2013)。哺乳類以外の大脳構造がどのように構築されるのかを明らかにすることは、我々哺乳類の大脳皮質の進化的起源に関して重要な知見をもたらすと考えられる。そこで本研究では、爬虫類の大脳発生過程を比較し、脳室帯から軟膜側へと移動する神経細胞の形態を解析することによって、哺乳類大脳皮質における神経細胞の移動形態が進化の過程でどのようにして獲得されてきたのか、さらにその背景となった分子基盤を明らかにすることを試みた。

研究経過

現在地球上に生息する爬虫類は鱗竜類（ヘビ、トカゲなどを含む系統）と主竜類（ワニ、トリなどを含む系統）という2つの系統から構成されている。また最近のゲノム解析からカメ類は主竜類に近い系統であることが明らかとなっている（爬虫類という呼び名は側系統を含むため分岐分類学的には適切ではないが、本論では一般読者のためこの名称を使用する）。本研究では、まず爬虫類の異なる系統にそれぞれ属するソメワケササクレヤモリおよびスッポンの大脳背側皮質の発生過程の組織学的解析を行った。発生の各ステージの段階を追った免疫組織化学的観察、および蛍光タンパク質を発現するベクターを電気穿孔法によって皮質原基に導入することにより移動中の神経細胞の可視化を行った結果、爬虫類の大脳発生過程における神経細胞の移動形態を詳細に観察することができた。爬虫類の背側皮質の発生初期

では細胞体トランスロケーションが比較的多く観察されたが、発生中期以降はほぼすべての神経細胞が多極性移動の形態を示した。一方、多極性移動からロコモーションへと転換するような移動形態の変化は一切観察されず、哺乳類大脳皮質においてロコモーション型の神経細胞で構成される「皮質板」も爬虫類では全く形成されないことが明らかとなった。すでに述べたように、皮質板は哺乳類大脳皮質の形成過程において将来の6層構造となる重要な組織構造である。またDNA複製の際に取り込まれるEdUを用いて神経細胞の誕生時期依存的な分布と移動様式を検討すると、以前の報告と同様に爬虫類（ヤモリ）背側皮質では早産まれの神経細胞は皮質の外側に、遅産まれの神経細胞は皮質のより内側に分布することが明らかとなった。またカメの背側皮質にGFP発現ベクターを導入したのち、脳のスライス標本を作製し共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察を行ったところ、カメの神経細胞は脳室帯から離脱して分化した後はほとんどその位置を変えず移動が停滞していることも明らかとなった（東京都医学総合研究所・丸山千秋博士との共同研究）。こうした実験結果を総合すると、爬虫類の背側皮質では分化した神経細胞は後から産生される神経細胞によって徐々に外側へと押し出されつつ、将来の第2層に集積していくことが示唆された。さらに、分化し移動を終えた神経細胞で発現する転写因子(Ctip2 およびSatb2)の発現様式を哺乳類と爬虫類・鳥類とで比較したところ、哺乳類では層特異的な発現を示すこれらの転写因子が爬虫類や鳥類では1つの神経細胞で重複して発現していることも明らかとなった(Nomura et al. Cell Reports 2018)。すなわち、爬虫類の3層構造の皮質は哺乳類とは全く異なるプロセスによって構築されるものであり、発生過程を観察する限り爬虫類の背側皮質が哺乳類大脳新皮質の祖先型とは言い難いことが示された。

それでは、哺乳類の大脳新皮質と爬虫類の背側皮質の発生プロセスや遺伝学的プログラムにはまったく共通点が無いのだろうか？神経細胞の移動形態の観察結果では、少なくとも細胞体トランスロケーションと多極性移動に関しては共通していることから、これらが共通の分子基盤によって駆動されている可能性が考えられる。先行研究によって、哺乳類大脳皮質の発生過程において神経細胞が多極性から双極性のロコモーション型移動に転換する際にはWntシ

グナル活性が低下することが必要であることが報告されている (Boitard et al. 2015)。我々がこの結果を追試したところ、哺乳類大脳皮質の発生過程では特に多極性の移動形態を示す神経細胞において Wnt シグナルの活性化レベルが高く、この傾向が羊膜類の種を超えて保存されていることを見出した。またソメワケササクレヤモリの神経細胞をマウス大脳皮質に移植すると、移植されたヤモリの細胞は多極性のままマウス皮質内で停滞し、高い Wnt 活性を維持し続けていることも明らかとなった。こうした事実より、神経細胞の形態変化と Wnt シグナル活性の変化に種を超えた保存性があり、特に細胞自律的な Wnt 活性の制御が種特異的な神経細胞移動形態に寄与している可能性が考えられた。そこで、移動する神経細胞自律的な Wnt シグナル活性を人為的に操作することによって、移動中の神経細胞の形態が変化するかどうかを検証した。Wnt シグナルは細胞内において LEF/TCF 等の転写因子を介して下流遺伝子の発現制御が行われる。そこで、ドミナントネガティブ型の Tcf4 (dnTcf4) を発現するベクターをマウスおよびソメワケササクレヤモリの大脳に導入し細胞内在的な Wnt シグナル活性を阻害したところ、多極性の神経細胞が多数を占める発生段階において細胞体トランスロケーション型の神経細胞移動を誘導することに成功した。一方、薬剤投与による誘導型遺伝子発現系 (Tet-On システム) を用いて一旦多極性の移動形態に移行した神経細胞で dnTcf4 を発現させることにより Wnt シグナル活性を阻害しても、ソメワケササクレヤモリ大脳においてロコモーション型の細胞移動形態を誘導することはできなかった。これらの結果から、細胞体トランスロケーションおよび多極性の神経細胞移動に関わる Wnt シグナルの機能は羊膜類の種を超えて保存されていること、これに対してロコモーション型の神経細胞移動には Wnt シグナルの阻害だけでは不十分なことが推測された。

Wnt シグナル活性を負に制御する分子の一つとして Gsk3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) が知られている。一方、哺乳類大脳皮質の発生過程では Gsk3 β は Wnt シグナル以外のシグナル経路を介してロコモーション型の神経細胞移動に必須の役割を果たすことも報告されている (Morgan-Smith et al. 2014)。そこで、Gsk3 β の発現を哺乳類と爬虫類の大脳と比較したところ、爬虫類大脳では Gsk3 β の発現レベルが低いことが明らかとなった。また哺乳類と非哺乳類に

おける Gsk3 β のゲノム配列を比較したところ、Gsk3 β の 5' 側プロモーター領域の保存性が大きく異なること、特に哺乳類間での保存性が高い領域が存在することを見出した。さらに、恒常活性化型の Gsk3 β (Gsk3 β S9A) をソメワケササクレヤモリ胚大脳に強制発現すると、Wnt シグナルの機能阻害実験と同様に細胞体トランスロケーション型の神経細胞移動様式をヤモリ大脳に誘導することができた。一方、一旦多極性の移動様式を示した細胞で Tet-On システムを用いて Gsk3 β S9A を強制発現してもロコモーション型の細胞移動様式は誘導されなかった。これらの結果は、哺乳類大脳皮質の発生過程におけるロコモーション型の神経細胞移動には多数の分子基盤が関与しており、爬虫類の皮質発生プログラムにはこの神経細胞移動様式を可能にする十分なコンピテンスが備わっていない可能性を示唆している。

最後に、羊膜類の中の主竜類の一群である鳥類胚の大脳原基における神経細胞移動様式を哺乳類や爬虫類と比較した。その結果、鳥類 (ニワトリ) 胚の大脳の発生過程ではほぼすべての神経細胞が多極性の移動様式を示し、移動中の神経細胞は高い Wnt シグナル活性を示した。一方、dnTcf4 の強制発現により Wnt シグナルを阻害したところ、移動細胞の突起が消失し神経細胞移動が著しく障害されたが、爬虫類で見られるような細胞体トランスロケーション型の神経細胞移動様式は誘導されなかった。この結果より、移動中の神経細胞における Wnt シグナルの役割は爬虫類と鳥類で異なる可能性が示唆された。

ごく最近、哺乳類と鳥類の大脳発生過程において異なる神経細胞の移動様式が報告された (Garcia-Moreno et al. 2018)。こうした神経細胞の分化には多数の転写因子が関与していると予測される。我々はこうした転写因子の中でも Pax6 が哺乳類と鳥類大脳の神経分化において異なる機能を担っていることを見出した。さらに、Pax6 の下流制御遺伝子として Dbx1 を同定したが、この遺伝子の発現様式が哺乳類と鳥類で大きく異なっているにもかかわらず、哺乳類特異的な発現を制御するゲノム領域が高度に保存されていることを見出した (Yamashita et al. Development 2018)。これらの事実は、羊膜類の大脳発生過程において哺乳類とそれ以外の系統において神経細胞の分化や移動に関わる分子機構が系統特異的に大きく変化していることを示唆している。

考察

今回の研究結果から明らかにされた事実を基に、哺乳類型大脳皮質の進化過程に関して幾つかの新しい知見を得ることができた。まず 1) 哺乳類の大脳新皮質と爬虫類の背側皮質の発生プロセスは大きく異なっていることが判明した。爬虫類の皮質 3 層構造は哺乳類の大脳皮質 6 層構造とはまったく異なる方式で構築されており、この事実は爬虫類皮質が哺乳類大脳新皮質の祖先型であるという見方は正しくないことを意味している。2) 哺乳類大脳皮質における神経細胞の移動様式の 1 つであるロコモーション型の細胞移動が爬虫類背側皮質の発生過程では観察されなかった。したがって、このタイプの神経細胞移動を可能とする発生プログラムは哺乳類でのみ獲得された新規な発生機構であることが示唆された。3) Wnt シグナルに依存した細胞体トランスロケーション、および多極性の細胞移動様式は哺乳類大脳新皮質および爬虫類の背側皮質の発生過程で共通していたことから、哺乳類と爬虫類の共通の祖先系統において、これらの細胞移動様式を可能とする発生プログラムが既に獲得されていた可能性が考えられた。さらに 4) 鳥類の大脳発生過程ではほぼすべての移動神経細胞が多極性の移動様式によって移動を行っていること、Wnt シグナルを阻害した場合の表現型が哺乳類や爬虫類とは大きく異なることが明らかとなった。したがって、鳥類における多極性の神経細胞移動は Wnt シグナルに大きく依存しているが、Wnt シグナル依存的な細胞体トランスロケーションの発生プロセスは鳥類の進化過程において二次的に失われた可能性が示唆された。こうした結果より、羊膜類の祖先系統の胚発生ですでに獲得されていた Wnt シグナル依存的な神経細胞の移動様式とその分子基盤をさらに改変することにより、羊膜類の各系統に特異的な大脳構造が進化した可能性が考えられた。

参考文献

T. Nomura, H. Gotoh, K. Ono. Changes in the regulation

of cortical neurogenesis contribute to encephalization during amniote brain evolution. *Nature Communications* 4: 2206 (2013).

M. Boitard, R. Bocchi, K. Egervari, V. Petrenko, et al. Wnt signaling regulates multipolar-to-bipolar transition of migrating neurons in the cerebral cortex. *Cell Reports* 10, 1349-1361 (2015).

M. Morgan-Smith, Y. Wu, X. Zhu, J. Pringle, W. D. Snider. Gsk-3 signaling in developing cortical neurons is essential for radial and dendritic orientation. *eLife* 3, e02663 (2014).

F. Garcia-Moreno, E. Anderton, M. Jankowska, J. Encinas, et al. Absence of tangentially migrating glutamatergic neurons in the developing avian brain. *Cell Reports* 22, 96-109 (2018).

研究の発表

口頭発表

1. 野村真「哺乳類型大脳皮質構造の進化に寄与した発生プログラムの解明」北海道大学電子科学研究所セミナー 2018年4月19日
2. T. Nomura. “Molecular mechanisms underlying mammalian-specific neocortical development and evolution.” The 19th International Congress of Neuropathology. Tokyo Sep 26th 2018
3. 野村真「神経細胞の分化・移動機構の変化と哺乳類型大脳皮質構造の進化」第41回日本分子生物学会ワークショップ、横浜 2018年11月29日
誌上発表

1. T. Nomura, W. Yamashita, H. Gotoh, K. Ono. Species-specific mechanisms of neuron subtype specification reveal evolutionary plasticity of amniote brain development. *Cell Reports* 22, 3142-3151 (2018).
2. W. Yamashita, M. Takahashi, T. Kikkawa, H. Gotoh, N. Osumi, K. Ono, T. Nomura. Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain. *Development* 145, dev159764. doi:10.1242/dev.159764 (2018).