

分子マーカーから探る大脳新皮質の発生・進化における サブプレートニューロンの役割の解明

The role of subplate neurons in the development and evolution of the neocortex explored by molecular markers

(日本発生生物学会推薦)

代表研究者 公益財団法人東京都医学総合研究所 丸山 千秋

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science Chiaki OHTAKA-MARUYAMA

協同研究者 オックスフォード大学 ゴルタン モルナー The University of Oxford Zoltan MOLNAR

How is the neocortical layered structure formed? For this elaborate structure to be created within the limited developmental time of the fetal period, phenomena such as the neogenesis and migration of neurons and the formation of neural circuits by axonal projections must proceed simultaneously and in synchrony. Subplate neurons (SpNs), the first neurons to be born during cerebral development and disappear after birth, have been shown to control the timing of migration mode conversion of newborn neurons by their neural activity. We explore the function of the SP through molecular markers and consider which regulatory mechanisms were necessary during the neocortical evolution. The SP layer is particularly thickened in primates and may have contributed to the development of complex brains. But why is the primate SP layer so thick? The reasons for this are unclear. To tackle this question, we analysed Visium spatial gene expression using common marmoset and human fetal brain sections. As a result, we have identified several candidate genes that may contribute to the SP layer's expansion during evolution.

研究目的

哺乳類の大脳新皮質は、後から生まれたニューロンが先に生まれたニューロン層を乗り越えて上へ上へと層を積み上げていく、いわゆるインサイドアウトの6層構造を持つ。この極めて特異な脳構造の獲得により哺乳類は膨大な数のニューロンを整然と配置させ、高度な情報処理や創造性を持つヒト脳への飛躍的な進化を遂げてきた。この大脳新皮質の層構造はどのようにしてできるのだろうか？胎児期という限られた発生時間のなかで、この精巧な構造ができるには、ニューロンの新生や移動、軸索投射による神経回路形成等の現象が同時進行、かつ互いに同調して進行する必要がある。しかしながらその総合的な制御メカニズムは未解明のままである。サブプレート(SP)ニューロンは大脳発生期において最初期に誕生し、生後は消失する一過的なニューロンであ

るが、最近その神経活動が新生移動ニューロンの移動モード変換のタイミングを制御することが明らかになった。(Ohtaka-Maruyama et al., *Science*, 2018)。サブプレート層(SP層)はSPニューロンの他に豊富な細胞外基質から成り、細胞の形態や移動モードの変換のための様々なシグナルを移動ニューロンへ送っていることが予想される。SP層もまた哺乳類独特の構造であることから、大脳新皮質の発達にとって司令塔的な役割を果たしていることが示唆される。実際にSPニューロンの減少率が少ないことと自閉症との関連を示唆する報告もあり、SPニューロンと精神疾患との関連も高いことが予想される。そこで本研究は、SPの機能を分子マーカーを通して探ることで、どのような制御機構が哺乳類大脳新皮質の構築過程およびその進化に重要であったのかを考察し、限定された時間軸の中で脳構築が正確に行われるメ

カニズムの解明を目的とする。SPニューロンの分子マーカーとしては、CTGFやNurr1等複数の遺伝子が知られているが、胎生期のSPニューロンの分子マーカーはほとんど同定されていない。従ってまずはSPニューロンの胎生期の分子マーカーを同定し、それを手がかりに発生・進化的起源について解析を進めていく。また、霊長類脳では特に胎児期にSP層がマウスに比べて厚く発達していることが知られている。このSP層拡大の脳進化における意義とは何か？また、なぜヒトは脳進化のトレードオフとして精神疾患のリスクを背負ったのか？これらの謎を解くためにも霊長類脳におけるSP層に特異的に発現している遺伝子の同定も進める。

研究経過

① シングルセルRNAシーケンスによるSPニューロンのサブポピュレーションの同定

SPニューロンは、分子マーカーの発現パターンからサブポピュレーションの存在が示唆されていた。しかし明確なグループ分けはされていない。そこで、SPニューロンをシングルセルに単離し各細胞でのRNAシーケンスを行うことで、サブポピュレーションの分子レベルでの特徴を明確にする。SPの一部が蛍光標識されたTgマウス(Lpar1-EGFP)の胚脳を用いた。また、D1B-Cre-ERT2マウスをtd-Tomatoのリポーター系統(Ai14)と交配し、胎生10日目でタモキシフェン投与することでSPニューロンの一部がTomato陽性になる。これらの標識SP細胞をFACSでソーティングして単離した。シングルセル解析は、ブリュダインC1システムで一度に800細胞まで解析可能である。得られたデータを解析し、分子の発現によるグループ分けを行った。Zoltan Molnar研で以前に得られている、切り出したSP層でのプロファイリングデータも用いて今回のデータと比較検討した。さらに、以前得られているVisium空間的遺伝子発現解析のE17脳切片のデータとの統合解析も行った。その結果、SP層で発現し、胎生期のSP層マーカーとなり得る候補遺伝子が複数同定できた。その結果、最終的に33遺伝子が候補として同定できた。そのうち1遺伝子はMolnar研で以前同定された遺伝子であったが、残りは新規に同定された遺伝子であった。また、候補遺伝子のうち8遺伝子は自閉症関連遺伝子として報告されている遺伝子であった。これらの候補遺伝子について、従来の*in situ*ハイ

ブリダイゼーション(ISH)法と、高感度のISH法であるRNAScope法を用いて発現細胞を詳細に確認し、サブタイプの同定を試みた。その結果SPニューロンには分子発現パターンの特徴から7種類程度のサブタイプが存在することがわかった。

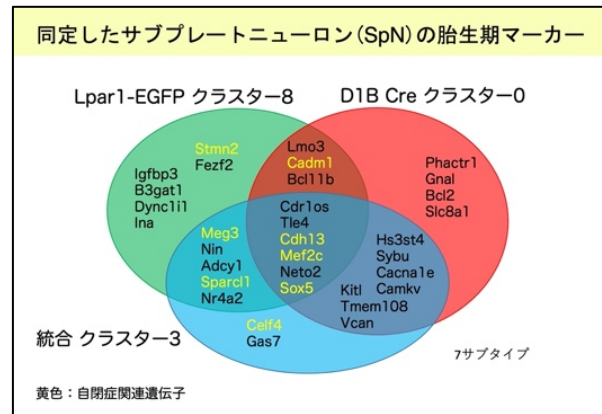


図1 マウス胎生17日大脳のSPニューロンから同定した分子マーカー遺伝子

Fig.1 Molecular marker genes identified from SP neurons of mouse E17 cortex

② 脳進化におけるサブプレートの発達と分子メカニズム解明

SP層は全ての哺乳類脳に存在するが、特に霊長類では肥厚化し、複雑脳への進化・発達に寄与した可能性がある。そこで、マウスに比べ、なぜ霊長類脳ではSP層が厚いのか、そのメカニズムと精神疾患との関連を調べるために、コモンマウスとヒトの胎児脳切片を用いてVisium空間的遺伝子発現解析を行った。同時に既存のシングルセル解析データも用いて霊長類のサブプレートに高発現している遺伝子の同定を試みた。その結果、転写因子ST18、レチノイン酸分解酵素CYP26A1、およびヒアルロン酸合成酵素HAS3等の候補遺伝子が同定できた。いずれもマウスのサブプレートではほとんど発現していないのに対し、マウスとヒトのサブプレートでは発現が見られた。ST18についてはマウスのSP層で強制発現させることでSP層の構築に何かしらの影響を与えるかどうかを確認するためにE10において子宮内電気穿孔法を用いて早生まれのSPニューロンにST18を過剰発現させた。E18にて脳を回収し、サブプレート層構築への影響を解析した。その結果、ST18過剰発現脳では、E10で標識されるサブプレートニューロンが、コントロールと比べて、接着性が

増したような細胞塊状になっている様子が観察できた。また、Cyp26A1 遺伝子については、サブプレートの中でも特に細胞密度の濃い一過性に現れるバンド状の薄い細胞層 (Cell Dense Band) に強く発現していることが明らかとなった。Cyp26A1 遺伝子はレチノイン酸分解酵素をコードする遺伝子で、SP 層の中央にこの酵素が発現していることで、ヒト (霊長類) 大脳皮質の頂底軸に沿ってレチノイン酸の濃度勾配が存在する可能性が示唆された。

考察

以上のような解析から得られた結果から、まず、SPニューロンは胎生期でも複数のサブタイプが存在し、おそらく何かしらの機能分担を行なっていることが予想された。例えば、胎生中期に盛んに行われている放射状神経細胞移動においてその移動モード変換を促すためにシナプス伝達を行なっている SPニューロン、視床から大脳皮質に進入してくる軸索 (TCA) が最初にシナプスを形成する SPニューロン、また生後も残存して生体脳神経回路に組み込まれて機能する SPニューロンといった、グループごとに異なる役割を持つサブタイプに分かれている可能性がある。これを確かめるためにも、各サブタイプのマーカー遺伝子を用いて遺伝子改変マウスを作製してその影響を解析するといった実験が今後必要となる。

次に、霊長類での SP 層拡大化に関与した分子メカニズムの解明に関しては、転写因子 ST18 が有力な候補遺伝子として同定された。マウスの SPニューロンでの ST18 の過剰発現脳では、SP 層の拡大とも取れる表現型が観察できた。この結果は、脳進化の過程で、ST18 が転写因子として発生期の霊長類脳の SPニューロンを発現するようになり、それが SPニューロンの増殖または挙動に何かしらの影響を与えた可能性が示唆される。今後は、本転写因子の下流標的遺伝子を同定し、霊長類 SP 層の拡大の分子メカニズムを解明してゆきたい。一方 Cyp26A1 遺伝子は、レチノイン酸を分解する活性を持つ酵素をコードする遺伝子である。これまでの報告で、霊長類の前頭葉ではレチノイン酸濃度が高く、前後軸に沿って後方に行くほど低いという濃度勾配があることが報告されている。しかしマウスでは濃度勾配がほとんどない。このことから、霊長類、特にヒトにおける前頭葉の発達にはレチノイン酸シグナルが関与していることが示唆されている。今回我々の解析により、SP 層の

中央付近の細胞密度の高い細胞層で CYP26A1 遺伝子が特異的に高発現していることを見出した。レチノイン酸は脳表付近の髄膜細胞あたりに局在し、その付近の細胞によって産生されているという報告はあるが、分解酵素についての局在の報告はこれまでなかった。今回 Visium 解析によりヒト胎児脳でも SP 層で高発現していることがわかった。さらにマーマセット胎児脳でも、ヒトよりは低レベルではあるが、SP 層で特異的な発現が見られた。それに対しマウス脳では CYP26A1 遺伝子の SP 層での発現は見られない。この解析結果は、霊長類脳においては、前後軸のみならず、脳表から脳室帯への頂底軸方向にもレチノイン酸の濃度勾配が存在し、それが SP 層拡大とそれに伴う大脳新皮質の発達に寄与した可能性を示唆している。そしてこの SP 層の拡大こそ、哺乳類の中でも進化の過程で、爆発的な大脳新皮質のニューロン層の発達が起こった霊長類、さらにはヒト脳への進化に重要な役割を果たしたのではないかと考えることができる。今後は、大脳新皮質の層構造においてレチノイン酸の濃度勾配が実際に存在するののかどうかについて、質量分析イメージング (MALDI イメージング) 等の手法を用いて解析を行う予定である。そして、もし濃度勾配があるとわかった場合には、それをマウス脳に適用した場合に SP 層の肥厚化が起こるのか、また、大脳新皮質の層構造の構築にどのような影響があるのかについて解析を進める。

以上のような解析を進めることにより、SP 層の進化の分子機構について理解を深めることで、脳構築の原理を理解し、その知見をもとに、将来的には自閉症等の精神疾患発症のメカニズムの理解に繋げていきたいと考えている。

研究の発表

口頭発表

1. [Ohtaka-Maruyama C](#) 「Role of subplate neurons in neocortical development and evolution」Cortical Development Conference 2022 「Neural Stem Cells to Neural Circuits」2022 年 5 月 30 日, Milazzo, シチリア島, イタリア
2. [Ohtaka-Maruyama C](#), 「Identification of embryonic molecular markers of mouse subplate neurons and search for their developmental origins」第 45 回日本神経科学大会 (NEURO2022) 「Formation of the earliest cortical neuronal circuits orchestrated by subplate neural activity」シンポジウム「サブ

プレート神経活動のダイナミズムによる脳神経回路の発達機」2022年6月30日 沖縄コンベンションセンター

3. Ohtaka-Maruyama C., 「Analysis of the developmental and evolutionary origins of SpNs and their role in cerebral development」 International Symposium on Neural Development and Diseases (新学術領域研究「発生時計と場の連携」2023国際シンポジウム) 2023年3月16日 京都大学医学部芝蘭会館

誌上発表

1. Hara Y, Kumamoto T, Yoshizawa-Sugata N, Hirai K, Song X, Kawaji H, Ohtaka-Maruyama C. Spatial transcriptome of developmental mouse brain reveals temporal dynamics of gene expressions and heterogeneity of the claustrum *bioRxiv* (2023) DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.04.12.536360>
2. Hirai S, Miwa H, Shimbo H, Nakajima K, Kondo M, Tanaka T, Ohtaka-Maruyama C., Hirai S,

Okado H. The mouse model of intellectual disability by ZBTB18/RP58 haploinsufficiency shows cognitive dysfunction with synaptic impairment. *Mol Psychiatry*, (2023) Feb 1. DOI: 10.1038/s41380-023-01941-3

3. Kaneko N, Hirai K, Oshima M, Yura K, Hattori M, Maeda N, Ohtaka-Maruyama C. ADAMTS2 regulates radial neuronal migration by activating TGF- β signaling at the subplate layer. of the developing neocortex *bioRxiv* (2022) DOI:<https://doi.org/10.1101/2022.08.07.502954>
4. Takigawa-Imamura H, Hirano S, Watanabe C, Ohtaka-Maruyama C., Ema M, Mizutani K. Computational Model Exploring Characteristic Pattern Regulation in Periventricular Vessels. *Life*, 12, 2069 (2022) DOI: 10.3390/life12122069
5. Kumamoto T, Ohtaka-Maruyama C. Visualizing Cortical Development and Evolution: A Toolkit Update *Front Neurosci.*, 16,876406 (2022) DOI: 10.3389/fnins.2022.876406