

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07428

研究課題名(和文) 哺乳類大脳新皮質の発生・進化のメカニズム

研究課題名(英文) Mechanisms of development and evolution of mammalian cerebral cortex

研究代表者

丸山 千秋 (OHTAKA-MARUYAMA, Chiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：00281626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大脳新皮質は6層構造の中に多数のニューロンが精緻に配置され、高次脳機能の構造的基盤になっている。サブプレートニューロンは大脳皮質で最も早く生まれ、成熟するニューロンで、大脳皮質形成期に機能を発揮している。これまで視床から皮質への軸索投射における機能は知られていたが、胎生期における機能は不明なままであった。本研究によりサブプレートニューロンの放射状神経細胞移動における新たな機能を明らかにした。サブプレートニューロンの神経活動を抑制したところ、多極性-双極性変換が障害された。さらにサブプレートニューロンは移動ニューロンに対してグルタミン酸シグナルをシナプスを介して送っていることが、明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SpNは主に胎生期に機能を果たしたのち、細胞死によって失われる。この細胞死が正常通り起こらず残存しているSpNが自閉症患者の脳では多く見られる。すなわち、胎生期における機能と、生後は数が減ることによって神経回路のバランスを保っており、健全な状態を作り上げていると考えられる。したがってSpNの発生、機能発現、そしてその細胞死のメカニズムを知ることは、様々な精神疾患の理解のために重要である。本研究はこのようなSpNの詳細な解析をすることで、最終的には精神疾患の原因解明に寄与できるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Six layer structure of the neocortex in which a huge number of neurons are arranged closely, is a structural base that for higher order brain functions. Subplate neurons (SpNs) are among the first born and matured neuron in the cortex and play a role in corticogenesis. It has been reported that SpNs are essential for the establishment of thalamo-cortical connection. However, the role of SpNs in radial neuronal migration has never been addressed. In this study, we have found that SpNs regulate multipolar(MP) to bipolar(BP) transition of radially migrating neurons. By suppressing neuronal activities of SpNs, the MP-BP transition has been impaired. Moreover, it was revealed that SpNs send glutamate signals to migrating neurons via synaptic transmission.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 サブプレート 神経細胞移動 脳 シナプス グルタミン酸

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の脳新皮質は6層構造の中に多数のニューロンが精緻に配置され、高次脳機能の構造的基盤になっていると考えられている。サブプレート(SP)ニューロンは脳皮質で最も早く生まれ、成熟するニューロンで、生後は細胞死により失われることから、脳皮質形成期にその機能を発揮していると考えられる。これまでは、視床からの軸索投射のガイド役としての機能は知られていたものの、胎生初期から中期における機能は不明なままであった。一方、様々な遺伝子のノックアウトやノックダウンで神経細胞移動の異常が見られるがその多くがサブプレート(SP)層直下で移動を停止してしまうものが多いことに気づいた。なぜサブプレートの直下で移動が止まってしまうのか？新生移動ニューロンが皮質板に進入するためには何か主要なシグナルをSP層で受け取っているのではないかと、という仮説を立て検証実験を始めた。

2. 研究の目的

本研究は脳新皮質の形成メカニズムを明らかにし、未解明の器質的な異常により発症する様々な神経・精神疾患の原因を理解することを最終目的としている。また、脳進化の過程で哺乳類脳がどのようにして6層構造を獲得したのかについても実験的に推察するという、基礎科学的側面の目的も併せ持つ。

3. 研究の方法

まず、新生ニューロンの移動に伴うカルシウム動態を調べるために、GCaMPを導入しタイムラプスイメージングで観察した。その結果、移動ニューロンはサブプレート層を越える際に一過的なカルシウム上昇が起こり、その後皮質板へと進入し移動モードを変えることがわかった。すなわち、サブプレート層に到達した多極性細胞は何らかのメカニズムでカルシウム上昇が起こるシグナルを受け取っている。サブプレートニューロンは、皮質下に初めての軸索(パイオニア軸索)を伸ばし、視床-皮質投射軸索のガイド役を担っていることは知られていた。しかし放射状に移動してくる新生ニューロンに対してシグナルを送っているかは未知であった。そこで次に、サブプレートニューロンがそもそも胎生中期において活動しているかどうかを確かめた。サブプレートニューロンは胎生10-11日目に生まれることから、GCaMPを胎生10日目の子宮内電気穿孔法により導入し、15日目に脳スライスを作成してカルシウムイメージングを行なった。その結果活発なカルシウムオシレーションが観察され、この時期からすでに神経活動をしていることが示唆された。さらにその活動を詳細に解析するため、シナプス前細胞における小胞放出があると蛍光シグナルが上がる、シナプトフィジン-フルオリン(Syp-pHluorin)プローブをサブプレートニューロンに導入しイメージングを行なった。すると、サブプレート直下にフルオリンシグナルが観察され、このシグナルは100mM KClによる脱分極刺激に反応して増強することから、シナプス伝達によるものであることがわかった。次にサブプレートニューロンと移動ニューロンを異なる蛍光でラベルし、そのふるまいを観察した。このイメージングにより、サブプレートニューロンは脳室帯側に向かって軸索様の突起を盛んに伸ばし、それら突起と移動ニューロンが密接にコンタクトしていることがわかった。そこで、このコンタクトサイトを電子顕微鏡で観察したところ、意外なことに、シナプス様の接着構造が見つかった。この接着構造は二重免疫電顕により、移動ニューロン側のシナプス後肥厚部と類似した膜肥厚部と、その対側のシナプス前部の活性帯と類似した膜肥厚部から成り、シナプス前部には平均して43nmのシナプス小胞が存在することが明らかになった。未熟で移動途中の胎生中期の新生ニューロンにシナプス様構造が見られることは驚きであった。

このシナプスを介したコンタクトはニューロン移動の制御に関与しているのだろうか？そこで次に、サブプレートニューロンの神経活動を2種の方法で抑制し、移動への影響を調べた。まず胎生10日目の胚脳に内向き整流性K⁺チャンネルであるKir2.1をGFP発現プラスミドとともに導入することによりサブプレートニューロンの興奮を抑制し、続いて胎生14日目にRFP発現プラスミドを同じ胚脳へ導入して移動ニューロンを標識し、その移動への影響を調べた。もう一つの方法は、テタヌス毒素鎖遺伝子のfloxマウスに、胎生10日目にCre発現プラスミドを導入した後、同じく胎生14日目になって同じ胚にRFP発現プラスミドを導入すること移動ニューロンへの影響を調べた。どちらの実験においても、サブプレートニューロンのシナプス活動を抑制することにより移動ニューロンの皮質板への進入が障害された。この結果はサブプレートの神経活動が新生ニューロンの移動制御に関与することを示す初めての発見となった。

サブプレートニューロン側のシナプスコンタクト部位には小胞性グルタミン酸トランスポーターであるVGLUT2が局在していることが免疫組織化学法により明らかになり、このシナプスはグルタミン酸作動性であることが示唆された。次に移動ニューロン側でどのようなグルタミン酸受容体が使われているのかを調べるためにマイクロアレイ解析を行なった。移動中のGFP

標識ニューロンを FACS ソーティングにより集め、RNA を単離し遺伝子の発現量の推移を調べた。その結果、多くのグルタミン酸受容体サブユニットの発現が確認されたが、なかでも NMDA 受容体のサブユニットの発現量が顕著に上昇することがわかった。そこで NMDA 受容体の移動制御への関与を確認するために NMDA 受容体の必須サブユニットである NR1 を移動ニューロン内で特異的にノックダウンすると、やはり移動ニューロンの皮質板への進入が障害されたことから NMDA 受容体の関与が示唆された。次にグルタミン酸を早い段階で受け取ることで移動が促進されるかどうかを調べる実験を行なった。移動ニューロンがサブプレートに到達する前の段階で、光操作で遊離させることができるグルタミン酸アンケーシング試薬を用いてグルタミン酸濃度を局所的に上げると、移動ニューロンのロコモーションへの変換が早まった。

以上の結果から、次のモデルが考えられた。移動を始めた新生ニューロンは、多極性移動でサブプレート層に近づき、サブプレートニューロンから一過的なシナプスを介してグルタミン酸シグナルを受け取る。すると多極性細胞内のカルシウム濃度が上昇しその下流のシグナルがオンになって、細胞骨格の再構成が起こり、形態と移動モードを変換する、というモデルである（図 1）。今後はこの下流シグナルの実態を

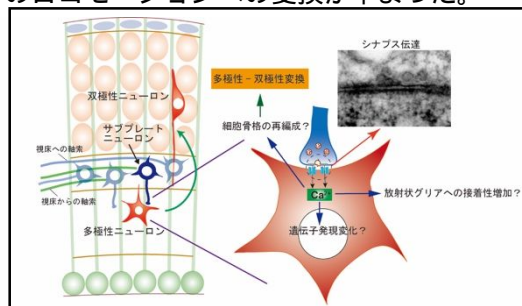


図 1 SpN による放射状神経細胞移動の制御

明らかにすることが重要である。細胞骨格の再編成のほかにも、移動ニューロンがサブプレート層を突破するためには豊富な細胞外マトリックスを分解する必要もあるかもしれない。そこで、移動ニューロンの発現プロファイリングデータを解析した結果、シナプス関連以外に、細胞外基質関連の GO を持つ遺伝子も有意に変動していた。中でも細胞外基質プロテアーゼである ADAMTS2 遺伝子が ADAMTS ファミリーの中でも移動につれてもっとも発現上昇することがわかった。そこで本プロテアーゼの移動制御への関与を調べるために、子宮内エレクトロポレーションを用いたノックダウン実験を行なったところ、移動が遅れることがわかった。次に大脳新皮質での ADAMTS2 の発現領域について抗体染色及び In situ hybridization で確認したところ、サブプレートの下の中間帯に局在する移動中のニューロンで発現していることが明らかになった。

4. 研究成果

本研究によりサブプレートニューロンの新たな機能、すなわち放射状神経細胞移動における機能を明らかにした。サブプレートのニューロンの神経活動を抑制したところ、新生移動ニューロンの多極性-双極性変換が障害された。さらにサブプレートニューロンは移動多極性ニューロンに対してグルタミン酸シグナルをシナプスを介して送っていることが、電顕観察、及びタイムラプスイメージング実験により明らかになった。

これまで、シナプス構造およびその構成タンパク質は、主に成熟した神経細胞同士の神経情報伝達で使われるものであると考えられてきた。本研究はこのような観念を覆し、シナプスは発生期の幼若ニューロンにおけるシグナル伝達の道具としても使われることを初めて示した。発達期の脳において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に限られた発生時間内に同時進行、かつ互いに同調して進行する必要があるが、その制御メカニズムは未解明のままである。本研究では、サブプレートニューロンの神経活動が、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。サブプレートニューロン自身の神経活動はどこに由来するのかについては、自発発火から始まり、視床から皮質に最初に投射してくる軸索からのシナプス入力サブプレートニューロンをさらに発火させている可能性が考えられる。これまでサブプレートニューロンは発達期の神経回路形成における司令塔的な役割を果たすと考えられてきたが、今回見出された一過性のシナプ形成は、刻々と複雑化していく大脳新皮質の神経回路形成過程において、ニューロンの移動と初期神経回路形成という 2 つのプロセスを同調させる役割に貢献しているのかもしれない。サブプレートニューロンの発現プロファイリング解析から自閉症関連の遺伝子が有意に発現している報告もサブプレートニューロンの脳形成過程における重要性を示唆している。

サブプレートニューロンの初期神経回路形成における詳細な機能解析を進めることで今後は様々な神経・精神疾患の原因解明につながる可能性が期待される。また、サブプレート層は哺乳類に独特なニューロン層であることから、大脳新皮質の進化を考える上でも重要である。すなわち、神経前駆細胞の分裂様式だけでなく、新生ニューロンの「新しい移動モード」の獲得も新皮質獲得に重要だったのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 丸山千秋、前田信明	4. 巻 91
2. 論文標題 サブプレートニューロンからのシナプス伝達が大脳皮質における神経細胞移動を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 101-104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910101	査読の有無 無
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 丸山千秋、前田信明	4. 巻 5
2. 論文標題 サブプレートニューロンから移動ニューロンへのシナプス伝達は大脳新皮質における放射状移動を制御する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ライフサイエンス新着論文レビュー	6. 最初と最後の頁 1-3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7875/first.author.2018.053	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Endo K, Oshima M, Kaneko N, Yura K, Okado H, Miyata T, Maeda N	4. 巻 360
2. 論文標題 Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 313-317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 0.1126/science.aar2866.	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 Ohtaka-Maruyama Chiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Subplate Neurons as an Organizer of Mammalian Neocortical Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2020.00008	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22件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons.
3. 学会等名 ISDN2018, 22nd Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience 「Development of circuit, functions, and disorders in the NERVOUS SYSTEM」 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Endo K, Oshima M, Kaneko N, Yura K, Okado H, Miyata H, Maeda N
2. 発表標題 Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons.
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th, Tokyo2018 Cell and Developmental Biology Meeting. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金子乃愛、丸山千秋、由良敬、前田信明
2. 発表標題 発生期大脳新皮質のサブプレート層においてECM関連遺伝子が神経細胞の移動を制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 哺乳類大脳新皮質の発生、進化におけるサブプレート層の役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会ワークショップ「脳発生プログラムの複雑化とその進化」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 大脳新皮質形成におけるサブプレートニューロンの新規の機能
3. 学会等名 第二回和光-精神神経懇話会「基礎神経科学と臨床医学の融合による脳機能・精神神経疾患の統合的理解」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 Functional role of subplate neurons in neocortical development and evolution
3. 学会等名 遺伝研研究会「哺乳類脳の機能的神経回路の構築メカニズム」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons
3. 学会等名 FENS Brain Conference「Cortex Evolution and Development」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C, Kaneko N, Oshima M, Yura K, Maeda N
2. 発表標題 ECM remodeling in the neocortex during radial migration of excitatory neurons
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金子乃愛、丸山千秋、大島実莉、由良敬、前田信明
2. 発表標題 細胞外基質プロテアーゼによる放射状神経細胞移動制御
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山千秋、岡本麻友美、金子乃愛、大島実莉、由良敬、宮田卓樹、前田信明
2. 発表標題 発生期大脳皮質のサブプレートニューロンは多極性細胞との一過的なシナプス形成を介してロコモーションモードへの移行を促進する
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 サブプレートニューロンはシナプス伝達を介して放射状神経細胞移動を制御する
3. 学会等名 第11回神経発生討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 脳構築におけるサブプレート層の機能解明
3. 学会等名 第4回領域班会議『脳構築における発生時計と場の連携』
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneko N, Yura K, Maeda N, Ohtaka-Maruyama C,
2. 発表標題 Radial neuronal migration in the neocortex is regulated by ADAMTS2 that reorganizes ECM in the subplate layer
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第42回日本神経科学大会)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 A novel function of subplate neurons in radial migration and its implication in the evolution of mammalian neocortical layer structure
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (第42回日本神経科学大会) シンポジウム『Molecular mechanisms for making specific neuronal circuits 種特異的神経回路の構築と作動原理の解明』(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 Subplate neurons function as key players in neocortical development and evolution
3. 学会等名 20thTMIMS International Symposium『Principles of Neocortical Development and Evolution』(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 Subplate neurons function as an organizer in neocortical development
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (北米神経科学会)(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaneko N, Ohtaka-Maruyama C, Yura K, Maeda N
2. 発表標題 Extracellular matrix reorganization in the subplate layer is important for the regulation of neuronal migration in the developing
3. 学会等名 49th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (北米神経科学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C, Kaneko N, Fujii A, Hirai K, Yura K,
2. 発表標題 Multifunction of subplate neurons in the developing cerebral cortex
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子乃愛、丸山千秋、由良敬、前田信明
2. 発表標題 発生期大脳新皮質のサブプレート層におけるECMリモデリングは放射状神経細胞移動を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山千秋、金子乃愛、由良敬、前田信明
2. 発表標題 脳構築の“場”としてのサブプレート層の大脳新皮質発生における機能
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金子乃愛、丸山千秋、由良敬、前田信明
2. 発表標題 細胞外基質プロテアーゼによる発生期大脳新皮質のサブプレート層における神経細胞移動制御
3. 学会等名 次世代脳プロジェクト冬のシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 サブプレートニューロンの神経活動による大脳新皮質構築のメカニズム
3. 学会等名 自然科学研究機構分野融合型共同研究事業 ワークショップ「運動・行動から紐解く脳神経回路発達メカニズムの異分野融合による解明」
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人東京都医学総合研究所 http://www.igakuken.or.jp/ 東京都医学総合研究所・神経回路形成プロジェクト http://www.igakuken.or.jp/regeneration/ 第20回都医学研国際シンポジウム開催報告 http://www.igakuken.or.jp/public/column.html#190730 2019年度第3回都民講座「赤ちゃんの脳をすくすく育てる」開催報告 http://www.igakuken.or.jp/public/column.html#190714
--

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