

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03552

研究課題名(和文)比較発生学的解析による哺乳類大脳外套領域の進化起源の解明

研究課題名(英文) Exploring the evolutionary origin of mammalian pallial regions by comparative developmental analysis

研究代表者

野村 真 (Nomura, Tadashi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10323007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、哺乳類と非哺乳類(爬虫類、鳥類)の大脳初期発生過程の定性的、定量的な比較解析を行い、種に固有の大脳外套構造を生み出す発生学的基盤を明らかにすることを目標とした。本研究計画の推進の結果、以下のような成果を得ることができた。1)哺乳類、爬虫類、鳥類外套を構成する神経細胞サブタイプの比較を行なった結果、哺乳類大脳皮質の層特異的な神経細胞サブタイプの分化に関わるシス調節領域の種間差異を同定した。2)羊膜類外套領域の形態的多様性にShhシグナルが関与していることを発見した。3)背側外套領域の発生過程において、移動中の神経細胞の形態変化とWntシグナルの種間多様性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の構造と機能については神経解剖学や神経科学の教科書にも詳細に記載されているが、その進化的起源については長年多くの研究者が議論を続けてきた。本研究は哺乳類大脳皮質の進化過程を細胞・分子レベルで検証したものであり、我々の脳の成り立ちやその進化的由来に対する新たな知見をもたらすものである。また本研究で明らかとなった哺乳類独自の脳発生過程の多くは哺乳類大脳皮質の正常な発生に不可欠なプロセスであるため、本研究の成果は大脳皮質の先天性疾患の原因に関する進化医学的な理解に貢献することが期待される。神経科学におけるこうした進化の研究成果は生命科学の広範囲における研究基盤を提供する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research project was to explore developmental mechanisms underlying species-specific anatomical structures in amniote pallium (the dorsal part of the telencephalon), by using quantitative and qualitative analyses of cellular dynamics in early brain development. During the course of the project, I have succeeded to obtain following findings: 1) changes in cis-regulatory regions underlying neuron subtype-specific transcriptional regulations in the developing amniote pallium, 2) the role of sonic hedgehog signaling in the formation of anatomical diversity of the pallium, and 3) changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie anatomical diversities in the developing amniote pallium.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 外套 神経前駆細胞 Sonic Hedgehog Wnt 進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の脳は種に固有の行動特性を反映して高度に多様化している。特に哺乳類の大脳に存在する大脳皮質、扁桃体、前障といった構造は、他の脊椎動物の大脳には観察されない独特の脳構造である。このような哺乳類大脳に固有の神経解剖学的構造が進化の過程でどのようにして獲得されたのかについては、多くの神経解剖学者が 100 年以上に渡り考察と論争を続けているが、未だに決着がついていない。これら哺乳類特有の脳構造は発生学的には終脳の背側領域(外套)に由来する。外套領域はすべての脊椎動物に普遍的な構造として存在するが、哺乳類と同じ有羊膜類である爬虫類や鳥類の外套からは哺乳類とは全く異なる脳構造が形成される。特に、背側脳室隆起(DVR)と呼ばれる構造は、爬虫類、鳥類の大脳外套にしか形成されない独特の脳構造である。この DVR は視覚、聴覚といった様々な感覚情報を受容・統合し、機能的には哺乳類大脳皮質と同様な特性を持つことから、哺乳類大脳皮質の進化的起源の鍵を握る構造として注目されてきた。今世紀に入り、哺乳類大脳の発生過程を制御する様々な分子機構が明るみにになったにも関わらず、こうした外套の形態的多様性がなぜ生じるのか、未だ明らかとなっていない。こうした論争の原因として、DVR を構成する細胞集団が外套のどの部分に由来するのかが解明されておらず、哺乳類外套領域の細胞系譜との照合がされていないこと、また外套の局所的な細胞増殖・細胞分化率や移動様式が種間で比較されておらず、種に固有の脳形態を形成する発生基盤が明らかになっていないことが挙げられる。一方、遺伝子の発現と機能に踏み込んだ現代の発生生物学は、生物の新規形態の進化に関わる遺伝子基盤についても多くの知見をもたらした。すなわち、生物形態の基本構造の構築に必要な遺伝子群(ツールキット遺伝子)は種間で高度に保存されており、こうした遺伝子群の発現が胚組織中で時間的・空間的に変化したことによって形態の多様性が生み出された可能性が示唆されている。さらに、例えば哺乳類と鳥類の前肢の発生過程における細胞系譜が哺乳類と鳥類で異なるように、形態学的類似性、発生学的細胞系譜と遺伝子発現様式が種間で一致しない例も多く報告されている。このような知見を踏まえると、脊椎動物の大脳構造の相同領域とその進化過程を正しく理解するには、哺乳類を含めた様々な脊椎動物の大脳の発生過程における遺伝子発現と細胞系譜との照合、脳の局所的な領域における細胞増殖と細胞分化の定量化と種間比較、さらに相同遺伝子の破壊が大脳の形態に及ぼす変化を種間で定量化する実験系が必要である。

### 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、哺乳類と非哺乳類(爬虫類、鳥類)の大脳初期発生過程の定性的、定量的な比較解析を行い、種に固有の大脳外套構造を生み出す発生学的基盤を明らかにすることを目標とした。計画では、まず遺伝学的手法を用いた細胞標識による細胞系譜と遺伝子発現パターンとの照合を行い、外套領域の詳細な予定運命地図を作製する。また、外套領域の神経前駆細胞の細胞周期と神経細胞分化率、また神経細胞の移動様式を比較し、発生の進行に伴う外套領域の構造の変化を追跡する。さらに、哺乳類大脳皮質や扁桃体の発生に必須の役割を果たす遺伝子の機能をゲノム編集ツールによって破壊し、表現型の種間比較を行う。こうした解析により、哺乳類大脳皮質、扁桃体/前障と爬虫類・鳥類の DVR との相同性や形態的多様性を生み出す発生学的基盤を明らかにすることで、哺乳類大脳皮質と扁桃体の進化的起源に迫ることが本課題の最終到達目標とした。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 細胞系譜解析と遺伝子発現解析による神経細胞サブタイプの比較

哺乳類、爬虫類、および鳥類の大脳外套領域を構成する神経細胞のサブタイプの種間比較を行い、神経細胞サブタイプの種特異性と大脳形態の多様性との関連を明らかにすることを試みた。そのため、1)大脳皮質の層特異的な転写因子の発現を指標とした免疫組織化学的手法による神経細胞サブタイプの比較、また 2)神経前駆細胞を標識し、それらの細胞集団から分化した神経細胞が将来どのような神経細胞サブタイプに寄与するかを追跡した。本研究では、当研究室で入手可能な有羊膜類である哺乳類(マウス)、爬虫類:(ソメワケササクレヤモリ:当研究室にて飼育・繁殖、及びスッポン胚)、鳥類胚(ニワトリ)を実験材料として用いた。神経前駆細胞の細胞系譜追跡のため、蛍光リポーター遺伝子(GFP および mRFP)を発現するトランスポゾンベクターあるいはレンチウイルスベクターを用いた。

#### 3.2 細胞間シグナル応答活性の種間比較

大脳原基の局所的シグナリングセンターより分泌される様々なモルフォジェンの発現量と外套における受容領域の種間比較を行った。特に、Sonic Hedgehog (Shh)および Wnt シグナルの時空間的な活性様式を定量化するため、シグナル受容によって活性化される転写因子の結合配列を持つリポーターベクターを哺乳類、爬虫類、鳥類胚の外套領域に導入し、リポーターの発現強度をルシフェラーゼアッセイあるいは蛍光リポーター強度測定によってシグナル強度の比較定量化を行った。

#### 3.3 外套パターンに関わる転写因子の種間比較機能解析

モルフォジェンによって発現が誘導・維持、あるいは抑制される様々な転写因子は、動物種間で

遺伝子構造と発現が高度に保存されたツールキット遺伝子群として理解されている。これらの転写因子は複数が共同して下流遺伝子の発現を制御することにより、外套の特定領域の神経前駆細胞の運命決定を行い、前駆細胞の増殖と分化率を制御している。そこで、ここ数年で格段に進歩を遂げているゲノム編集ツール (CRISPR/Cas9) を用いて、特に Pax6 の機能を外套特異的に破壊し、外套領域の表現型の変化 (神経前駆細胞の増殖・分化率、大脳外套の遺伝子発現及び解剖学的構造) についての種間比較を行った。

### 3.4 背側外套における神経細胞移動様式の種間比較

大脳皮質相同領域である背側外套の発生過程における神経細胞移動様式の種間比較を行うため、蛍光タンパク質を羊膜類外套に導入し、移動中の神経細胞の形態を免疫組織化学的手法とライブイメージングにより解析した。さらに、移動中の神経細胞の形態変化に重要な役割を果たす Wnt シグナルの活性の種間比較を行い、Wnt シグナルの人為的操作による神経細胞形態の変化に関する種間差異を解析した。

## 4. 研究成果

### 4.1 神経細胞サブタイプの多様性を生み出す転写制御機構の変化の同定

哺乳類大脳皮質の層特異的な神経細胞サブタイプに発現する転写因子である Ctip2 と Satb2 に注目し、これらの転写因子の発現様式を爬虫類、鳥類の外套で検討した結果、非哺乳類羊膜類では 2 つの転写因子が 1 つの神経細胞内で同時に発現している細胞を多数確認した。さらに、爬虫類、鳥類の Ctip2 遺伝子座における転写抑制配列 MAR (Matrix Attachment Region) の機能を哺乳類と比較したところ、爬虫類、鳥類の MAR の転写抑制活性が低いことを明らかにした。一方、保存された転写因子を発現する神経細胞サブタイプでも種間で異なる神経回路を形成していることも明らかとなった。こうした研究結果から、外套領域の神経細胞サブタイプと神経回路は羊膜類の系統で多様化していること、哺乳類大脳皮質に特異的な転写抑制活性によって大脳皮質の層特異的な神経細胞が進化したことが推測された (文献 1)。

### 4.2 外套神経前駆細胞の多分化能の種間保存性

Cre 組替え酵素による多種類の蛍光タンパク質の発現による細胞標識法 (Cytbow/Nucbow) および蛍光レポーターを発現するレンチウイルスベクターによる細胞標識法を用いて、羊膜類外套の細胞系譜解析を行った。その結果、多種類の神経細胞サブタイプを産生する神経前駆細胞は爬虫類や鳥類の外套にも存在すること、運命決定論的な神経産生と確率論的なグリア産生能は羊膜類の種を超えて保存されていることが明らかとなった (文献 1、2、3)。

### 4.3 哺乳類と鳥類外套における Pax6 の種間機能比較解析

外套領域の神経前駆細胞に発現する転写因子である Pax6 の機能の種間比較を行うため、CRISPR/Cas9 システムを用いてニワトリ外套における Pax6 遺伝子機能の破壊実験を行った結果、外套領域の遺伝子発現が消失し外套下領域の遺伝子発現が誘導された。従って、Pax6 による外套領域化のプロセスは羊膜類の種間で保存されていることが明らかとなった。一方強制発現の実験結果より、哺乳類 (マウス) 大脳皮質の発生後期において Pax6 は Notch シグナルを正に制御することで神経前駆細胞を維持しているが、こうした制御機構は鳥類の外套においては確認されなかった。従って Pax6 による神経前駆細胞の維持は哺乳類に特異的な現象であることが明らかとなった。さらに、Pax6 は種を超えて Dbx1 の発現を制御していること、こうした発現誘導が保存されたプロモーターの特性に依存していることが明らかとなった。従って、Pax6 の発現制御機構の一部が鳥類系統の進化の過程で二次的な改変を受け、鳥類 (および爬虫類) に特異的な DVR の形成に寄与した可能性が示唆された (文献 4)。

### 4.4 背側外套における神経細胞移動様式の多様性と Wnt シグナル制御機構の進化

背側外套 (大脳皮質およびその相同領域) における神経細胞の移動様式を哺乳類と爬虫類で比較した。神経細胞の移動様式のうち、細胞体トランスロケーション、および多極性細胞移動は哺乳類と爬虫類の背側外套で保存されていたが、ロコモーション型の細胞移動は哺乳類大脳皮質の発生過程でしか観察されなかった。さらに、哺乳類大脳皮質において多極性からロコモーション型への形態変化の際に起こる Wnt シグナルの減弱が爬虫類外套の発生過程では認められなかった。一方、爬虫類背側外套において Wnt シグナルを強制的に遮断する実験を行うと細胞体トランスロケーション型の細胞移動様式が誘導されるが、ロコモーション型の移動様式は出現しなかった。従って、Wnt シグナルの減弱に伴うロコモーション型の細胞移動様式の獲得が哺乳類大脳皮質に特異的な層構造と皮質表面の放射状の拡大の進化に寄与したことが示唆された (文献 5)。

### 4.5 外套領域における Shh シグナルの種間多様性の発見

Shh の受容体である Patched の外套領域における発現を種間で比較した結果、爬虫類、鳥類の DVR で Patche1 あるいは Patched2 が特異的に発現していることを見出した。さらに、DVR における Shh シグナルを阻害したところ DVR の隆起構造が縮小することを見出した。また Shh シグナルを伝達する転写因子である GLI3 のアミノ酸配列を種間で比較した結果、GLI3 の C 末端側配列の保存性が低く、この領域に依存した転写活性が種間で異なることを明らかにした。こうした

Shh シグナルの時空間的变化とタンパク質の構造変化により外套領域の神経前駆細胞の増殖と分化率が種間で大きく変化し、外套領域の解剖学的多様性が進化した原動力になっている可能性が示唆された（論文投稿準備中）。

<引用文献>

1. Nomura T\*, Yamashita W., Gotoh H., Ono K. Species-specific mechanisms of neuron subtype specification reveal evolutionary plasticity of amniote brain development. *Cell Reports* 22, 3142-3151 (2018).
2. Hashimoto Y., Gotoh H., Ono K., Nomura T\*. Differential potentials of neural progenitors for the generation of neurons and non-neuronal cells in the developing amniote brains. *Scientific Reports* 9, 4514 (2019).
3. 野村真 「羊膜類の脳進化機構の解明 遺伝子発現機構の可塑性と細胞型の相同性」 生化学 第92巻第2号 pp200-209 (2020)
4. Yamashita W., Takahashi M., Kikkawa T., Gotoh H., Osumi N., Ono K., Nomura T\*. Convergent and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain. *Development* 145: dev159764 doi: 10.1242/dev.159764 (2018).
5. Nomura T\*, Ohtama-Maruyama C., Kiyonari H., Gotoh H., Ono K. Changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie anatomical diversification of neocortical homologues in amniotes. *Cell Reports* 31, 107592 (2020).

\*研究代表者が責任著者

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tadashi Nomura, Chiaki Ohtaka-Maruyama, Hiroshi Kiyonari, Hitoshi Gotoh, Katsuhiko Ono	4. 巻 31
2. 論文標題 Changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie the anatomical diversification of neocortical homologs in amniotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107592	査読の有無 有
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 野村真	4. 巻 92
2. 論文標題 羊膜類の脳進化機構の解明—遺伝子発現機構の可塑性と細胞型の相同性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 200-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920200	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 Hashimoto Yuki, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko, Nomura Tadashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential potentials of neural progenitors for the generation of neurons and non-neuronal cells in the developing amniote brain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1038/s41598-019-40599-2">https://doi.org/10.1038/s41598-019-40599-2</a>	査読の有無 有
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 野村真、河本昌也	4. 巻 52
2. 論文標題 ゲノム編集技術を用いた脳の進化発生学的研究の展開	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 STUDIA HUMANA et NATURALIA	6. 最初と最後の頁 51-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Yamashita Wataru, Takahashi Masanori, Kikkawa Takako, Gotoh Hitoshi, Osumi Noriko, Ono Katsuhiko, Nomura Tadashi	4. 巻 145
2. 論文標題 Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev159764
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1242/dev.159764	査読の有無 有
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 Nomura Tadashi, Yamashita Wataru, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Species-Specific Mechanisms of Neuron Subtype Specification Reveal Evolutionary Plasticity of Amniote Brain Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3142 ~ 3151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.086	査読の有無 有
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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Tadashi Nomura
2. 発表標題 The evolution of the neocortex, Notch, Shh & beyond
3. 学会等名 German-Japanese Developmental Neuroscience Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tadashi Nomura
2. 発表標題 Patterns of neuronal migration and the evolution of mammalian-type neocortical architecture
3. 学会等名 Neuro2019公募シンポジウム「種特異的神経回路の構築と動作原理」(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 大脳皮質進化研究フェーズ2：絶滅生物ゲノムの機能解析
3. 学会等名 細胞構成研究会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Nomura
2. 発表標題 Changes in Wnt-dependent neuronal migration patterns contributed to the evolution of the pallial architecture in amniotes
3. 学会等名 9th European Conference on Comparative Neurobiology (ECCN9) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Nomura
2. 発表標題 Changes in Wnt-dependent neuronal migration patterns contributed to the evolution of the pallial architecture in amniotes
3. 学会等名 第52回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tadashi Nomura, Chiaki Maruyama-Ohtaka, Hitoshi Gotoh, Katsuhiko Ono
2. 発表標題 Changes in Wnt-dependent neuronal migration patterns contributed to the evolution of mammalian neocortex
3. 学会等名 22nd Biennial Meeting of International Society for Developmental Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadashi Nomura
2. 発表標題 Molecular mechanisms underlying mammalian-specific neocortical development and evolution
3. 学会等名 The 19th International Congress of Neuropathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 Pax6依存的な神経産生プログラムの時空間的变化と脳の発生進化
3. 学会等名 第40回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 滋野修一、野村真、村上安則	4. 発行年 2018年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 519
3. 書名 遺伝子から解き明かす脳の不思議な世界	

〔産業財産権〕

[その他]

CORTICAL EVOLUTION GROUP  
https://tadnom.jimdo.com

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
連携研究者	小野 勝彦  (Ono Katsuhiko)  (30152523)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (24303)	形態学的解析で連携
連携研究者	後藤 仁志  (Gotoh Hitoshi)  (20462202)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (24303)	分子生物学的解析で連携
連携研究者	丸山 千秋  (Ohtaka-Maruyama Chiaki)  (00281626)	公益財団法人東京都医学総合研究所・脳神経回路プロジェクト・プロジェクトリーダー   (82609)	タイムラプス・イメージングで連携