様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

KAKENHI 科研費

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成２９年　５月３１日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１９０１１

研究課題名（和文）外的因子に着目した哺乳類の脳の大きさの違いを生み出す機構の解明

研究課題名（英文）Roles of extrinsic factors in the cortical expansion in primates.

研究代表者
畠山　淳（Hatakeyama, Jun）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：９０４０４３５０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：　高度な知能をもつヒトに代表される霊長類は、他の哺乳類と比較して際立って大きい大脳皮質を獲得した。神経発生の基本原理は、ほ乳類間でほぼ同じと考えられているのに、種間の脳の「違い」はどうやって形成されるのか？その機構はまだほとんどわかっていない。
　我々は、マウスとカニクイザルを比較し、カニクザル胚の脈絡叢に特異的に発現する分泌因子を複数同定した。これらの因子は、機能解析においてヒト神経幹細胞の増殖を促進することが明らかになり、霊長類の脳が大きくなることに貢献していることが示唆される。これらの因子が霊長類の発生期の脳で発現することが、脳の大きさの違いをもたらす１つの仕組みかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Primates including human have markedly expanded cerebral cortex. Yet, the basic principle of the cortical development that includes neural progenitor proliferation and differentiation is similar and common in all mammals. It is still unclear how species’ specific size of cerebral cortex is determined and mechanisms underlying massive enlargement of human cerebral cortex.
It has reported that the cerebrospinal fluid (CSF), which is produced from the choroid plexus (ChP), influences neural progenitors. CSF contains various secreting molecules and supports neural progenitor proliferation. We have identified several secreting factors from ChP that are specifically expressed in cynomologous monkey but not in mouse. We found that these factors promoted proliferation of primate neural progenitors. We would like to propose that these primate specific factors in CSF have important roles in the expansion of cerebral cortex.

研究分野：神経発生

キーワード：大脳皮質　霊長類　神経幹細胞　脈絡叢　分泌因子

１．研究開始当初の背景
　ヒトは高度な知能を持っており、この「他の動物との明らかな違い」は、脳に起因する。体重に対する脳の比率（脳化指数）は、高度な知能を持つほ乳類で大きくなっており(Hofman, MA. Et al. 1982)、相対的に大きな脳と知能獲得には深い関係があると考えられている。特に霊長類の脳では、大脳皮質を非常に拡大させており、進化の過程で、ニューロンの数、ニューロンを支えるグリア細胞の数を莫大に増大させた。そのために、ヒトを含む霊長類では、神経幹細胞はマウスなどに比してより多く分裂し、長い期間を神経分化に費やさなくてはならない。実際に、大脳皮質におけるニューロンを生み出す「ニューロン産生期」は、マウスは約７日間、サルは約４０日間、ヒトでは約５０日間である(Clancy B. et al. 2001)。神経発生の基本原理は、ほ乳類間でほぼ同じと考えられているが、種間の脳の違いがいかに形成されるのか、脳の「大きさの違い」を生み出す機構は何なのか、まだほとんどわかっていない。
　近年、マウスとヒトの神経幹細胞の遺伝子プロファイルの比較解析が進み、内的因子の違いは急速に明らかになっている。霊長類には特有の神経幹細胞の存在が明らかにされ、outer radial glial cells(oRG 細胞)と呼ばれている（HansenDV. et al. 2010）。また、中間前駆細胞が霊長類では非常に増えており、これらの神経幹細胞の出現が、大脳皮質の拡大に貢献していると考えられている（Noctor SC. et al. 2004, Fiez SA et al. 2011）。oRG 細胞の獲得に関与する因子として、PDGFG、ARHGAP11B や複数の microRNA が報告されている(Lui JH. et al. 2014, FlorioM. et al. 2015, Jahnson MB. et al. 2015)。また、霊長類特異的な long non-cording RNA である LncND は、Notch シグナルの維持に働いており、霊長類で神経幹細胞の増殖期が長いメカニズムの１つであることが考えられる（Rani N. et al. 2016）。しかし、種間差の創出に関する外的要因の研究は少なく、種による脳発生の過程を取り巻く細胞外環境の違いについては、多くが不明である。

２．研究の目的
ヒトは、進化の過程で大きな脳を獲得し、高度な知能を得た。ヒトはいかにして大きな脳を獲得したのか？大きな脳を形成するには、神経幹細胞の高い増殖能力、ニューロンとグリア細胞産生の長期持続が必要である。しかし、ほ乳類間で神経発生の基本原理はほぼ同じと考えられており、種間の脳の違いを作り出す機構は、まだ不明な点が多い。本研究では、霊長類が大きな脳を獲得した機構の理解を目指し、ほ乳類の種間における「脳の大きさの違い」を作り出す機構の解明を目的とする。「マウス」と「ヒトまたはカニクイザル」を比較し、発生期の脳を取り巻く外的因子（脈絡叢、頭蓋、血管）の違いに着目し、外的因子の脳形成に対する作用を明らかにする。

３．研究の方法
「マウス」と「ヒトまたはカニクイザル」を比較すると、霊長類の発生期の脳では、脳脊髄液を産生する器官である脈絡叢が非常に発達している（図１）。脳脊髄液中には、脈絡叢由来の増殖因子が多く含まれていることが知られおり、脈絡叢由来の増殖因子の違いが種間の脳の大きさに影響することが想定される　(Johansson PA. 2014)。本研究では、脈絡叢由来の種間の因子の違いに着目し、脳発生における霊長類に特有の脈絡叢由来の因子の機能解析を行った。申請者は、マイクロアレイ解析により、「大脳皮質には発現せず脈絡叢に発現する分泌因子」をカニクイザル胚で探索した。そして、マウス胚の脈絡叢にはほとんど発現しておらず、カニクイザル胚の脈絡叢に特異的に発現する分泌因子を複数同定していた。本研究では、マイクロアレイで同定した因子が霊長類の脳の拡大に関わるのかどうか、以下の実験を遂行し検証した。
１）定量 PCR、in situ hybridization 法、及び免疫染色法による発現の確認
２）human Neural stem cells を用いたタンパク質添加によるヒトの神経幹細胞に対する機能解析
３）mouse neurosphere を用いたマウスの神経幹細胞に対する効果の解析
４）候補因子タンパク質のマウス胚脳室への注入による機能解析

４．研究成果

<u>１）定量 PCR、in situ hybridization 法、及び免疫染色法による発現の確認</u>

　まず、マイクロアレイ解析の結果を確かめるために、候補因子の発現を定量 PCR で検討した。その結果、候補因子の多くは、サルの脈絡叢で特異的もしくはより強く発現していることが確認できた。

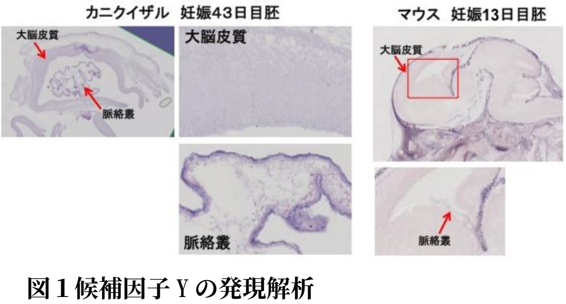

　図１候補因子 Y の発現解析
サル胚の脈絡叢上皮細胞に特異的な発現がある。サル胚の大脳皮質、マウス胚の大脳皮質、脈絡叢にはほとんど発現していない。

次に、発現領域を確認するために、in situ hybridization 法または免疫染色法にて発現領域の確認を行った（図１）。
そして、マウス胚の脈絡層では発現がない、もしくは少なく、カニクイザル胚の脈絡層に特異的に発現しており、増殖因子として機能することが予想される候補因子を３つにしぼった。以下、この３つの候補因子を、便宜上 X、Y、Z と呼ぶ。

２）human Neural stem cells を用いたタンパク質添加によるヒトの神経幹細胞に対する機能解析

次に、３つの候補因子に対して、機能解析を行った。まず、候補因子が霊長類の神経幹細胞に対して増殖の作用があるのかどうか検討するために、human ES 細胞由来の human Neural Stem cells（hNSC）を用いて、細胞増殖の解析を行った。hNSC の培養液中に、候補因子のタンパク質を添加し、３日後に細胞がどれくらい増えているか計測した。その結果、いずれの因子も、コントロールに対して、hNSC に対して有意に増殖を促進することが明らかとなった（図２）。

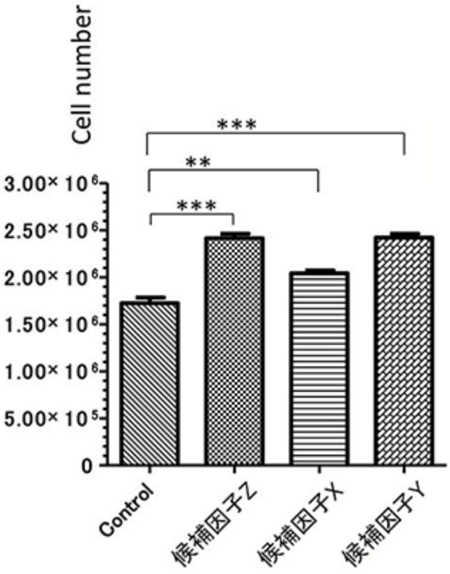

図２　hNSC を用いた候補因子の細胞増殖に対する機能解析
精製タンパク質を添加後７２時間で細胞数を計測。いずれの候補因子も hNSC に対して増殖を促進した。

３）mouse neurosphere を用いたマウスの神経幹細胞に対する効果の解析

これらの候補因子がマウスの神経幹細胞に対しても増殖を促進するのかどうか検討するために、マウス妊娠１１日目胎仔の大脳から神経幹細胞を取り出し、neurosphere を形成して、それに候補因子 X と Y の精製タンパク質を添加した。その結果、候補因子 X のタンパク質を添加すると、コントロールと比較して neurosphere が有意に大きくなり、増殖を促進することが明らかとなった。一方、候補因子 Y は、コントロールと比較して有意な差は見られなかった。候補因子 Z に関しては、精製タンパク質の準備ができ次第、検討を行う予定である。

４）候補因子タンパク質のマウス胚脳室への注入による機能解析

mouse neurosphere に対して増殖を促進することが明らかとなった候補因子 X について、マウス胎仔の脳においても神経幹細胞の増殖を促すのだろうか。それを検討するために、マウスの妊娠１２日目の胎仔大脳の脳室に精製タンパク質を注入し、２日後に大脳皮質の発生にどのような影響があるか解析を行った。Pax6 陽性の神経幹細胞を比較したところ、その数が増え、神経幹細胞が分布する脳室帯が肥厚していること、大脳皮質の大きさも大きくなっていることが確認された(図３)。

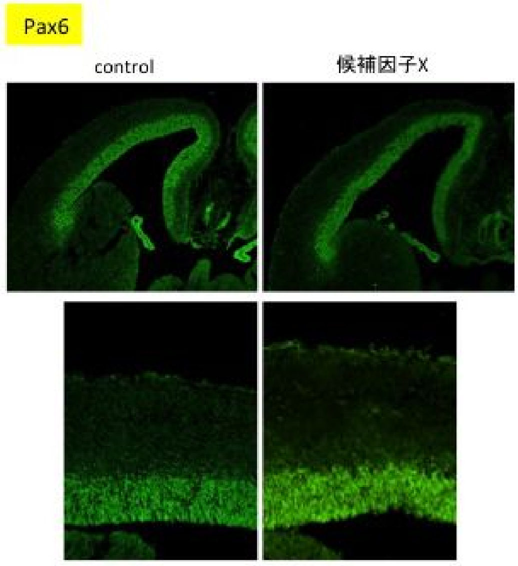

図３ マウス胚の脳室への候補因子 X の精製タンパク質注入
候補因子 X タンパク質を注入すると、Pax6 陽性の神経幹細胞が増加し、大脳皮質の厚みも増した。

以上の結果より、カニクイザル胚の脈絡叢により強く発現している候補因子 X,Y,Z の３因子は、霊長類の脳の拡大化に貢献している可能性がある。今後、霊長類の試料を用いて、機能阻害実験等が必要になるが、種間差創出及び進化における脳脊髄液の役割の新たな一面を明らかにできる可能性が高い。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　３件）

1) Hatakeyama J*, Sato H*. and Shimamura K.
Developing guinea pig brain as a model for cortical folding.
Development, Growth & Differentiation in press
*Equal contribution

2) Ha T, Moon KH, Dai L, Hatakeyama J, Yoon K, Park HS, Kong YY, Shimamura K, Kim JW.
The Retinal Pigment Epithelium Is a Notch Signaling Niche in the Mouse Retina.
Cell Rep. 2017 Apr 11;19(2):351-363. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.040.

3) Kameyama H, Kudoh S, Hatakeyama J, Matuo A, Ito T.
Significance of Stat3 Signaling in Epithelial Cell Differentiation of Fetal Mouse Lungs.
Acta Histochem Cytochem. 2017 Feb 28;50(1):1-9. doi: 10.1267/ahc.16032. Epub 2017 Feb 23.

〔学会発表〕（計　６件）
１）○Jun Hatakeyama.
Extrinsic factors and the cortical expansion in primates.
第４０回日本神経科学大会
2017 年 7 月 20 日-7 月 23 日、千葉市、
シンポジウム講演

２）○Jun Hatakeyama
Roles of extrinsic factors in the cortical expansion in primates.
Annual meeting of the Japanese society of developmental biologidts 50th
2017 年 5 月 10 日-5 月 13 日、東京都江戸川区、シンポジウム招待講演

３）Kenji Shimamura, Jun Hatakeyama, Haruka Sato, Rika Matsushita, Mitinori Saitou, Hideaki Tsutiya, Ryoichiro Kageyama.
A role for the choroid plexuss in the cortical expansion in the primates.
CDB Symposium 2017
2017 年 3 月 27 日-3 月 29 日、神戸

４）○畠山淳、佐藤晴香、松下理香、影山龍一郎、斎藤通紀、土屋英明、嶋村健児
日本進化学会第１８回大会
2016 年 8 月 25 日-28 日、東京都目黒区、
シンポジウム招待講演

５）○畠山淳、松下理香、佐藤晴香、影山龍一郎、斉藤通紀、嶋村健児
霊長類の脳はなぜ大きくなったのか？
第１２１回日本解剖学会総会　（シンポジウム：発生現象から辿る神経回路形成と機能連関の新知見）
2016 年 3 月 28 日-30 日（28 日）、福島県郡山市、　シンポジウム招待講演

６）○Hatakeyama J. and Shimamura K.
Novel roles of Fgf8 which is expressed in ventral region of the developing chick hindbrain.
第４８回日本発生生物学会、 筑波市
2015 年 6 月 2-5 日（6月３日）、ポスター発表

〔図書〕（計　１件）
1)
Hatakeyama J. and Shimamura k.
Electroporation for the Chick Embryonic CNS.
Electroporation methods in neuroscience (Saito T. Editor)　Neuromethods 2015 vol.102

〔産業財産権〕

○出願状況（計　　件）

該当なし

○取得状況（計　　件）

該当なし

〔その他〕
ホームページ
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/brain_morphogenesis/

６．研究組織
(1)研究代表者
　　畠山　淳　　（HATAKEYAMA, Jun）
　　熊本大学・発生医学研究所・助教
　　研究者番号：90404350

(2)研究分担者
　　なし

(3)連携研究者
　　なし

(4)研究協力者
　　なし