

令和元年6月28日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04798

研究課題名(和文) 初期ニューロンを介した大脳新皮質構築機構の解明

研究課題名(英文) Pioneer neurons in neocortical development and evolution

研究代表者

花嶋 かりな (Hanashima, Carina)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・准教授

研究者番号：80469915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,240,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類以降で急速に発達し、ヒトにおいて最も数が増大した大脳皮質で最初に誕生するニューロン群は、その発現分子も含め、これまで知見が極めて乏しかった。本研究では大脳皮質初期ニューロンの分子多様性の意義を明らかにすることで、哺乳類特有の大脳皮質の形成機構を解明することを目的とした。特にゲノムワイドアプローチによる初期ニューロンに特異的に発現する新規遺伝子群の同定、異種間遺伝子導入・細胞移植により、大脳皮質初期ニューロンに発現する遺伝子の多様性が、哺乳類特有の大脳皮質構造の形成に重要な役割をもつことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年の研究の進展により、大脳皮質神経回路の構築を担う分子やその作用機序が明らかになりつつある。一方で、ヒトにおいて最も数が増大し、哺乳類以降で急速に発達した大脳皮質で最初に誕生するニューロン群については、これまで知見が極めて乏しかった。本研究の成果より、哺乳類にユニークな細胞群を介した大脳皮質形成の制御機構が明らかになり、ヒトの脳神経回路の構築原理の理解に向けての新たな伸展が得られた。

研究成果の概要(英文)：The earliest born pioneer neurons of the neocortex have emerged rapidly in the mammalian lineage, however the molecular diversity and its function have remained poorly defined. This study aimed to elucidate the mechanisms of mammalian-specific cortical acquisition by focusing on the roles of early born neurons and the significance of its molecular diversity. Using genome wide approaches, we have identified novel genes that are specifically expressed in the earliest-born neurons in the mammalian neocortex. Further functional analysis using mouse embryos and interspecies gene transfer and cell transplantation have revealed that the diversity of genes expressed in the pioneer neurons play important roles in the formation of the mammalian-specific neocortical architecture.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 初期ニューロン 細胞分化 進化

1. 研究開始当初の背景

哺乳類特有の脳組織である大脳新皮質は、投射標的や形態が異なるニューロンから構成される6層構造を、領野ごとに修飾した秩序だった細胞構築を形成することで、知覚や随意運動などの高次の情報処理を行っている。この大脳皮質の6層を構成するグルタミン酸作動性ニューロンは、発生期に脳室帯に局在する神経幹細胞が非対称分裂を繰り返すことで、最初にカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞から構成されるプレプレートがつくられ、この2つの細胞層の間に侵入するかたちで、第5/6層の深層投射ニューロン、次いで第2-4層の上層投射ニューロンがつくられていく。この結果、プレプレートはカハール・レチウス細胞を含む第1層と最下層のサブプレート層に分かれ、移動してきたニューロンの特有の“インサイドアウト”様式の配置により、最終的に6層構造がつくられる。このカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞は大脳皮質板に最初期に侵入し、皮質板の最表層と最深層を占めることからパイオニアニューロンともよばれ、その最初の記述は1800年代にまで遡る。しかしながら、これらの細胞の機能についてはカハール・レチウス細胞発現遺伝子リーリンの突然変異マウスでの層形成の異常が見出されてから、新たな機能分子の報告がとどまっていた。一方、ヒトとチンパンジーゲノムの比較において塩基置換加速領域の多くが神経発達関連遺伝子であることが示され、最も加速進化を示す領域がヒト胎児脳のカハール・レチウス細胞に特異的に発現することが報告されてから、哺乳類の進化過程におけるカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞の数と分子多様性が層形成のみならず、領域パターンングや神経幹細胞の増殖を制御することが考えられた。さらに一過性と考えられていたこれらの初期ニューロンは、生後長期に渡っても維持し続けられることが見出され、成熟した神経回路でもこれらニューロンの寄与が示唆されてきたが、その分子実体については不明であった。

2. 研究の目的

上述した背景をふまえ、本研究では大脳皮質で最初に誕生する初期ニューロンの分子多様性の意義を明らかにすることで、哺乳類特異的な大脳皮質神経回路の形成機構とその動作原理の一端を解明することを試みた。特に本研究では哺乳類特異的なカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞分子の同定とその発現制御様式、さらに領域特異的なカハール・レチウス細胞発現分子を介した大脳皮質分化制御機構について解析を行うことで、大脳皮質神経回路構築における初期ニューロンの機能を明らかにすることを目的とした。この目的を達成するために、これまで確立した生体内のニューロン分化同調システムおよび経時的トランスクリプトーム、クロマチン免疫沈降(ChIP-seq)解析を統合的に用い、哺乳類特異的に発現する新規カハール・レチウス・サブプレート細胞分子を同定し、その機能解析により、初期ニューロンを介した大脳皮質構築機構を解明することを試みた。これらのアプローチにより、ヒトを含む高次脳機能を担う脳神経回路の成立機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

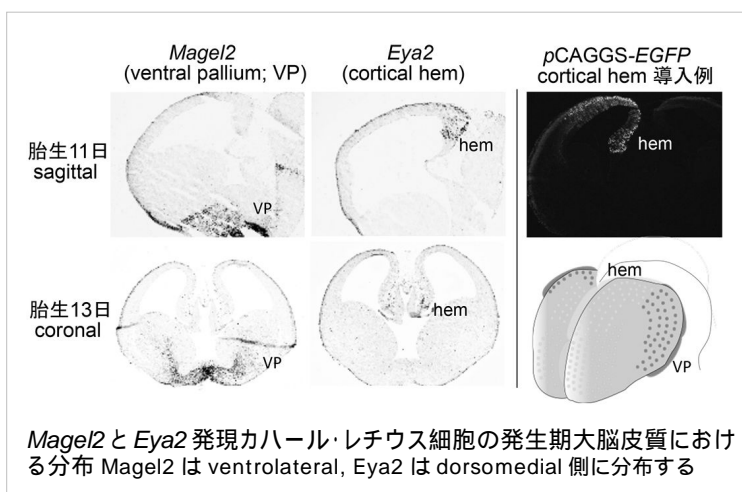
これまでの研究から、大脳皮質の神経幹細胞から経時的に異なるニューロンが生み出されるしくみとして、大脳皮質の各サブタイプのニューロンの分化を制御する転写因子ネットワークと、その下流で細胞の分化を制御する分子プログラムが明らかになっている。一連の研究の中で、フォークヘッド型転写因子であるFoxg1が、大脳皮質において最初期に産生されるパイオニアニューロンから、大脳皮質の深層-上層投射ニューロンの分化へと順次移行させる鍵因子であることを見出し、これらの知見をもとに遺伝学的手法を用いた生体内でのFoxg1誘導による大脳皮質ニューロン分化同調システムを新たに確立した。本研究ではこのシステムを適用し、経時的トランスクリプトームおよびChIP-seqを用いたゲノムワイド解析から、最初期のカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞を産生する神経幹細胞から大脳皮質投射ニューロンの分化へと移行させる下流因子群を同定し、さらに比較ゲノム解析によりこれら下流遺伝子の制御領域へのFoxg1の結合が哺乳類特異的配列を介している遺伝子群について解析を行うこととした。これらの手法により、新規の哺乳類特異的なカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞分子を同定し、領域特異的な初期二

ニューロンを介した大脳皮質分化制御機構について解析を行うことで、大脳皮質神経回路構築における初期ニューロンの機能を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

これまで既知のカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞マーカー遺伝子としてはそれぞれ Reelin/p73、CTGF 等が報告されていたが、これらは非哺乳類脳の細胞にも一部発現しており、哺乳類特異的なカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞発現分子の全貌については不明であった。一方、これまで当研究室で得られた知見から、Foxg1 が初期ニューロンの分化を抑制することが示され、生体内での Foxg1 誘導後 48 時間までの神経幹細胞の経時トランスクリプトーム解析を行った結果、Foxg1 の発現により、多数の抑制応答を示す遺伝子が同定され、さらに *in situ* ハイブリダイゼーションと定量的 PCR によりこれら遺伝子が既知のカハール・レチウス細胞とサブプレート細胞マーカーを含むことを明らかにした。そこで Foxg1 抗体を用いた全ゲノムクロマチン免疫沈降 (ChIP-seq) を行い、上記のトランスクリプトーム解析から得られた抑制応答遺伝子群のうち、Foxg1 の直接的結合遺伝子について、その結合配列が哺乳類特異的なものについて選定を行った。これらバイオインフォマティクス解析により、全マウスゲノムから 44 個の候補遺伝子を抽出し、胎生 10 日目から 18 日目までのマウス脳を用いてカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞での発現特異性について確認した。これらの多段階スクリーニングにより、8 個のカハール・レチウス細胞発現候補遺伝子について絞り込みを行い、この中で発現がリーリン (Reelin) 自体には依存しない遺伝子を Reeler マウス (*Reelin* 遺伝子欠損マウス) を用い選定した。さらに、このカハール・レチウス細胞における遺伝子発現が真に哺乳類特異的に制御されるかを見極めるため、非哺乳類および霊長類胚脳として鳥類: ニワトリ、フィンチ、爬虫類: ヤモリ、霊長類: コモンマーモセットを用い、*in situ* ハイブリダイゼーションにより発現パターンを解析した。これにより非哺乳類脳で発現せず、霊長類のカハール・レチウス・サブプレート細胞で発現パターンが保存されているものを、哺乳類特異的なカハール・レチウス・サブプレート細胞発現遺伝子として新規に同定した。

次に配列比較において、脊椎動物間で Foxg1 タンパク質の N 末側の相同性が低いことが確認されているため、マウス *Foxg1* cDNA のトリ胚への導入、および Foxg1 ノックアウトマウスでのニワトリ *Foxg1* cDNA 発現ベクターの導入により、タンパク質レベルでの互換性について検証を行った。その結果、ニワトリ *Foxg1* cDNA を *Foxg1* 欠損マウスに導入することで、マウス *Foxg1* cDNA 同様に大脳新皮質のプログラムの切り替えを誘導できることが確認された。これらの結果、進化上新たに哺乳類で獲得された Foxg1 の制御機構が、*Foxg1* 遺伝子配列側ではなく、その結合領域の配列



変化に依存することが示された。これらの一連の解析から、さらに進化過程で獲得された哺乳類特異的な大脳皮質細胞構築におけるカハール・レチウス細胞・サブプレート細胞の起源と機能的意義についての解析を試みた。その結果、絞り込みを行った哺乳類特異的なカハール・レチウス発現遺伝子のうち、*Magel2* と *Eya2* 陽性カハール・レチウス細胞は各々 ventral pallium と cortical hem 領域から産生され、その後 ventral 側と dorsal 側領域を辿って大脳皮質の表層において異なる分布を示すことが明らかになった (上図)。この結果をふまえ、これら領域特異的なカハール・レチウス細胞分子について、胎生 11-13 日のマウス胚に本来の分布と相補的な領域に遺伝子導入を行い (*Magel2*: cortical hem, *Eya2*: ventral pallium) (上図右上)、胎生 18 日および生後解析を行った結果、領域特異的な分化への影響が見出された。

上記の結果を受け、さらにマウス型カハール・レチウス分子をニワトリ胚 (HH18~24) に遺伝子導

入し、その表現型について解析を行い、並行してカハール・レチウス、サブプレート細胞が過剰産生される *Foxg1* 欠損マウスの大脳皮質細胞を、直接ニワトリ胚に異種間移植し、非哺乳類胚におけるカハール・レチウス細胞獲得の意義について評価した。特に放射状グリア型突起伸長、移動細胞の双極性、層構造形成、カハール・レチウス細胞様接線方向への移動に焦点をあてて解析を行った結果、マウス型カハール・レチウス細胞発現遺伝子 *Ebf3* を導入したニワトリ胚では放射状グリア型突起伸長と層構造形成の表現型が見出された。これら一連の結果から、大脳皮質初期ニューロンに発現する遺伝子の多様性が、哺乳類特有の大脳皮質構造の形成に重要な機能をもつことが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Watanabe K, Irie K, Hanashima C, Takebayashi H, Sato N. (2018) Diencephalic progenitors contribute to the posterior septum through rostral migration along the hippocampal axonal pathway. *Scientific Reports* 査読有, 8(1):11728

Kumamoto, T, Hanashima, C. Evolutionary conservation and conversion of *Foxg1* function in brain development. (2017) *Development, Growth & Differentiation* 査読有, 59, 258-269

Hou, P.S., Kumamoto, T., Hanashima, C. (2017) A Sensitive and Versatile In Situ Hybridization Protocol for Gene Expression Analysis in Developing Amniote Brains *Methods in Molecular Biology* 査読無, 1650, 3189-334

當麻憲一, 花嶋かりな (2016) 大脳皮質層ニューロンの分化と統合メカニズム *生体の科学 大脳皮質 —成り立ちから機能へ* 査読無, 68, 19-23

〔学会発表〕(計 12 件)

Hanashima, C. (2018) Neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. Gordon Research Conference, Newport, USA

Hanashima, C. (2018) Transcriptional control of fate specification and circuit specialization in the neocortex. The 41st Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Kobe, Japan

Hanashima, C. (2017) The role of *Foxg1* in the development of neocortex. International Symposium and Conference on Congenital Anomaly and Developmental Biology. Yogyakarta, Indonesia

Hanashima, C. (2017) Mechanisms of neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex. Janelia Conference 2017 ‘Control of Neuronal Identity II’ Ashburn, USA

Wang, T.C. Hanashima, C. (2016) Roles of neuronal activity in the establishment of neocortical neuron identity. Neuroscience 2016, SfN’s 46th Annual Meeting, San Diego, USA

Hou, P.S. Hanashima, C. (2016) Temporal dynamics of laminar subtype neuron differentiation in developing mouse neocortex. Neuroscience 2016, SfN’s 46th Annual Meeting, San Diego, USA

Hanashima, C. (2016) Establishing neuronal identity in the cerebral cortex. Volga Neuroscience Meeting 2016 ‘Molecular Neuroscience’ Saint Petersburg-Nizhny Novgorod, Russia

花嶋かりな (2018) 時空間制御による大脳皮質ニューロン産生のメカニズム. シンポジウム「多角的視点から紐解く大脳皮質の発生と機能」第 123 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 東京

Hou, P.S. Hanashima, C. (2017) Transcriptional mechanisms underlying the establishment of sensory areas. 次世代脳プロジェクト 合同若手シンポジウム, 東京

Wang, T.C. Hanashima, C. (2017) Early thalamocortical connectivity is established through activity-dependent specification of layer 4 neurons. 第 40 回日本神経科学大会, 幕張

Hanashima, C. (2016) Mechanisms that establish cell fate in the cerebral cortex. 第 39 回日本分子生物学会 シンポジウム「神経細胞の誕生と初期神経回路形成の分子メカニズム」横浜

Wang, T.C. Hanashima, C. (2016) Intrinsic and extrinsic control of layer IV neuron identity in the cerebral cortex. 第 39 回日本神経科学大会, 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://hanashima-lab.wixsite.com/waseda>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。