様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月 １８ 日現在

機関番号：８２６０９
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2018～2021
課題番号：１８Ｋ１９３８３

研究課題名（和文）マウス大脳皮質から霊長類型大脳皮質への人為的進化

研究課題名（英文）Artificial evolution from mouse cerebral cortex to primate cerebral cortex

研究代表者
岡戸　晴生（OKADO, Haruo）

公益財団法人東京都医学総合研究所・精神行動医学研究分野・研究員

研究者番号：６０２２１８４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：霊長類を含む高等ほ乳類では、大脳皮質におけるニューロン数が飛躍的に増加している。マウスでは、新皮質には、脳室帯と脳室下帯という２つの増殖層が同定されているが、高等ほ乳類では、さらに第３の増殖層として、外側脳室下帯(OSVZ)が発見された。われわれは、転写抑制因子RP58の欠損マウスの解析で、通常マウスではみられないOSVZ様構造を発見した。そこで、ニューロン増加の結果、行動がどう変化するのか、個体レベルで解析を進めるために、発現を自在に制御できる遺伝子改変マウスを用いて、マウス大脳皮質全般でニューロン数を増加させることを試み、大脳皮質ニューロン数が脳機能を規定しているか否かを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義
マウス脳を高等ほ乳類・霊長類型脳に変容させる試みは、これまで成功していない点で、学術的に挑戦的である。細胞周期離脱を遅らせる、という方法で、実際に神経細胞の数を増加させられ、それらが、機能的に組み込まれ、個体レベルで、認知能力や、社会的機能の向上を実証することを目指し、その方法に関しては、考えられる最良な方法を試みる。マウス脳を人為的な遺伝子操作により霊長類型に変容させられれば、進化を考える上で重要な知見となり、脳研究に果たす意義は大きいと考える。

研究成果の概要（英文）：In higher mammals, including primates, the number of neurons in the neocortex has increased dramatically. In mice, two proliferative layers of the neocortex have been identified, the ventricular and subventricular zones, and in higher mammals, a third proliferative layer, the lateral subventricular zone (OSVZ), has been identified. In our analysis of mice deficient in the transcriptional repressor RP58, we found OSVZ-like structures that are not found in normal mice. In order to analyze how the number of OSVZ-like structures in the mouse cerebral cortex changes as a result of the increase in the number of neurons, we attempted to increase the number of neurons in the mouse cerebral cortex in general using genetically engineered mice whose expression can be freely controlled, and to clarify whether the number of cortical neurons determines brain function.

研究分野：脳発達

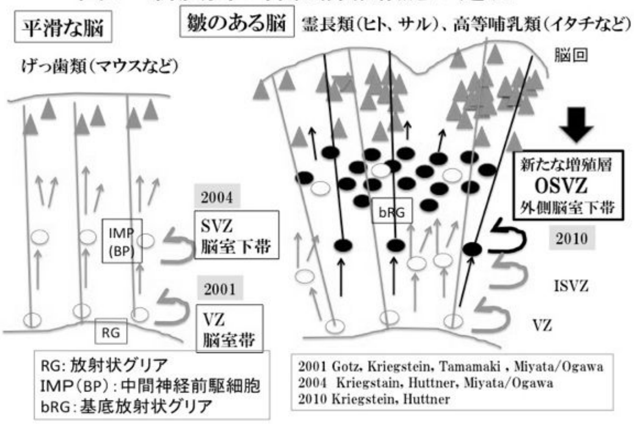
キーワード：RP58　転写抑制因子　OSVZ　進化　大脳皮質

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

霊長類を含む高等ほ乳類では、大脳皮質におけるニューロン数が飛躍的に増加している。このニューロン数の増大が、高等ほ乳類の知能の向上をもたらすことが示唆されている(Roth & Dicke, 2005)。しかし、実験的な検証はない。そこで、本研究では、マウス大脳新皮質のニューロン数を増加させ、それによって、学習記憶を含む脳機能の変化を解析し、大脳皮質ニューロン数が脳機能を規定しているか否かを明らかにすることを目的とする。

図1　新皮質の神経前駆細胞の進化



マウスでは、新皮質には、脳室帯と脳室下帯という２つの増殖層が同定されている。近年、霊長類を含む高等ほ乳類では、さらに第３の増殖層として、外側脳室下帯(OSVZ)が発見された（**図１,太い矢印**）。我々は、転写抑制因子 RP58 の欠損マウスの解析で、通常マウスではみられない OSVZ 様構造を発見した。これまでの研究 (Hirai et al., *EMBO J,* 2012)から、RP58 欠損により細胞周期から離脱できず、結果的にさらなる増殖層を形成したと考えた。実際、霊長類マーモセット脳に存在する本来の OSVZ でも、RP58 は発現していないことを確かめた。ところで、RP58 は放射状移動にも必須である（Ohtaka-Maruyama et al., *Cell Rep* 2013; Heng et al., *Cerb Cortex* 2015）ため、RP58 欠損により形成された OSVZ において増殖したニューロンは、放射状に移動することができない。そこで子宮内エレクトロポレーションによりニューロンに分化するタイミングで RP58 を補充すると、OSVZ 様構造を形成していた細胞が、放射状移動により脳表に到達し、ニューロンの集積塊を形成した。これは、RP58 の発現を調節することにより、ニューロン数を増加させられることを示唆している。しかし、子宮内エレクトロポレーションでは、RP58 の補充が部分的であるため、個体レベルの高次脳機能への関与は解析できない。そこで、ニューロン増加の結果、行動がどう変化するのか、大脳皮質以外との情報交換はどのようになるのか、など個体レベルで解析を進めるために、大脳皮質全体での変容を目指すことのできる、RP58 発現を自在に制御できる遺伝子改変マウスを用いて（FAST システム;Tanaka et al., 2010)、大脳皮質全般でニューロン数を増加させることを試みたい。そこで本研究計画を考案した。

２．研究の目的

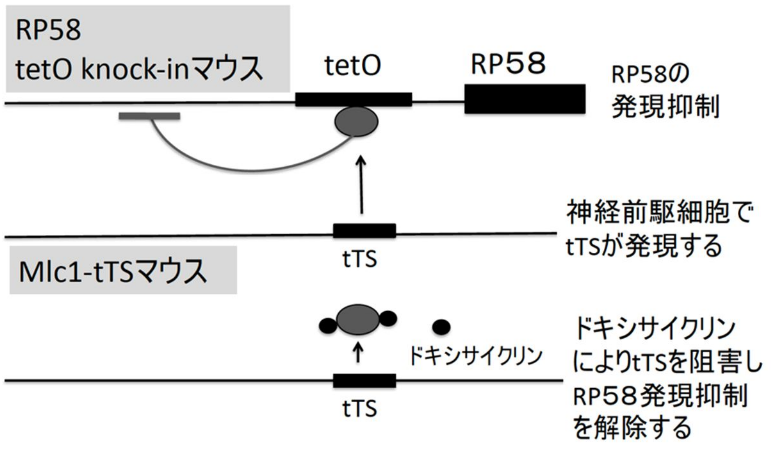
大脳皮質は高次脳機能を担う場であり、大脳皮質を構成する細胞数は、高次脳機能の質を規定すると予想されている。例えば、げっ歯類の大脳皮質に比べ霊長類の大脳皮質では、より多くのニューロンが働いている。本研究では、細胞周期離脱を人為的に遅らせて、ニューロン数の飛躍的増加を試みる。そして「大脳皮質のニューロン数が高次機能を規定している」という仮説を検証する。

大脳皮質を構成するニューロン数を増加させることができるのか？「細胞周期離脱を遅延させることにより、ニューロン数を増加させることができる」という原理が実証された場合、脳の進化を考える上で意義は大きい。もしできることが実証された場合、大脳皮質の組織学的変化、個体レベルの行動学的変化を明らかにする。組織学的には、例えば、脳梁などの交連絡繊維の拡張はあるのか、前頭葉の発達は？シナプス密度は？行動はどのように変化するのか？　認知機能、社会行動の向上はあるのか？等を明らかにする。これらの知見から、脳の、大きな意味での可塑性を理解することが可能となる。

３．研究の方法

RP58を欠落させることにより、細胞周期離脱を抑制し、マウスでも霊長類型の前駆細胞層を形成させる。適当なタイミングでRP58の発現を停止／再開するために、人為的な遺伝子の発現制御ができる FAST システム(Tanaka et al., 2010)を用いる(図２)。神経前駆細胞でトランスサイレンサー(tTS)を発現するマウス(Mlc1-tTSマウス)を理研より導入する。すでに作製済の tTS の結合部位(tetO)を RP58 の上流に持つ、tetO-RP58 マウスと Mlc1-tTS マウスを交配させる。その結果、前駆細胞において RP58 を欠落させ、OSVZ 様構造を作製させる。OSVZ 用構造作製後ドキシサイクリンで tTS の作用を阻害することにより、RP58 の発現を再開させる。Mlc1-tTS は E12 から E14 にかけて神経前駆細胞に発現開始することが知られている。この時期に tTS を発現させることで、RP58 の発現が神経前駆細胞で欠落し、細胞周期離脱が遅れ、脳表側に増殖層(OSVZ 様構造)が出現することが推測される（図３,太い矢印)。ドキシサイクリン投与により tTS が不活性化し、RP58 の発現が再開し、その増殖層のニューロンが移動、分化を開始すると推測している（図３下)。

図２　神経前駆細胞でのRP58発現を抑制し、ドキシサイクリン投与によりその発現を再開させることができる



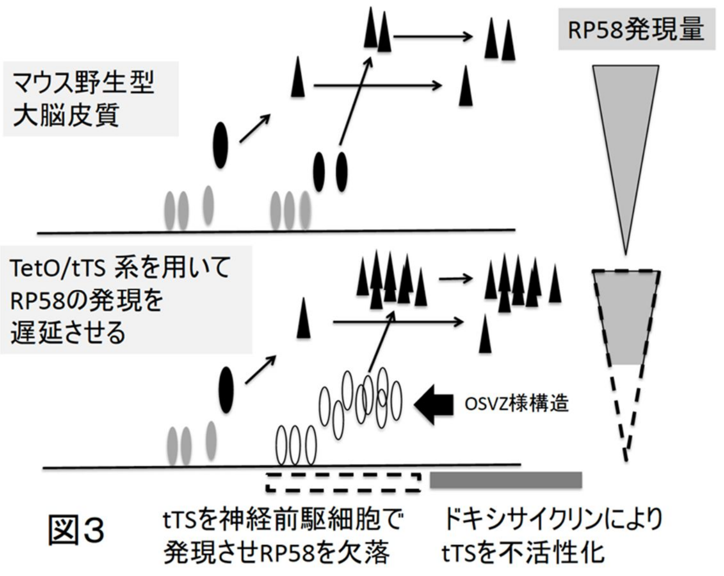


図３

４．研究成果

RP58 の発現を発生初期に神経前駆細胞で減少させた。方法は図２のように、tTS を RP58 の上流に結合させることによる。そのため、RP58 の上流に tetO 配列を挿入したマウスを挿入場所の違いで２種類作成した（tetOV1, tetOV2)。そしてゲノムの２本とも変異体のものを tetOV1homo,tetOV2homo,１本のみのものを tetOV1hetero,tetOV2hetero とする。tetV1homo:Mlc1-tTS 、tetV1homo:Mlc1-tTS の場合、出生生存するが、とても小さく、脳の低形成が認められた。これは、この系で RP58 の発現が効率よくが抑制されていること、また、主に神経前駆細胞で RP58 が欠損することで、脳形成が阻害されることを示している。

そこで、E18 の時点で、図３のように、妊娠マウスにドキシサイクリンを給餌したところ、tetV1homo:Mlc1-tTS は出生生存したが、脳室拡大が観察された。このことは、ドキシサイクリンで tTS の tetO 配列への結合が抑制され、RP58 の発現が回復すること、また、E18 の時点で RP58 発現が回復すれば、出生生存できる、つまり RP58 は、胎生後期に生存に重要な機能を有していることを示唆している。しかし、脳室拡大することは、ニューロン産生が阻害されていることが推察され、RP58 の発現回復時期を早める必要性を考えた。そこで、E18 ではなく E16 にドキシサイクリンの給餌を早めたところ、マウスは出生生存した。思春期(P24)で、灌流固定し、コントロールを tetOV1homo として、tetOV1hetero: Mlc1-tTS, tetOV1homo: Mlc1-tTS を解析した。DAPI 染色，NeuN 染色、Pax6 染色、RP58 染色等により、大脳皮質興奮性ニューロンの核の大きさが拡大傾向、数も増加傾向にあった。また Pax6 陽性アストロサイトの数、核の大きさが増大傾向にあった。この傾向は、tetOV1hetero: Mlc1-tTS よりも tetOV1homo: Mlc1-tTS で強かった。本研究は、個体数が限られ、統計的な解析ができておらず、さらに研究を続ける必要がある。

以上の結果は、発生初期に RP58 発現を抑制し、細胞周期離脱を遅らせることで、ニューロン細胞数の増加を予想したが、それが実証されたことを示唆する。さらに、核の拡大という、予想外の結果を得た。高等哺乳類、霊長類のニューロン、アストロサイトは齧歯類より大きいことか

ら、数に加えて大きさも拡大したことは、人為的な進化を支持すると考えられる。細胞周期離脱の人為的な阻害は、細胞周期の回数の他、時間も延長し、そのため、ニューロンの数と大きさが共に増大したと推察される。本研究は、岡戸が総括を、実験は新保が主に行った。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計7件（うち査読付論文　7件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Tomoko Tanaka, Shinobu Hirai, Naoto Hosokawa, Takashi Saito, Hiroshi Sakuma, Takaomi Saido, Masato Hasegawa, and Haruo Okado,	４．巻 337
２．論文標題 Early-life stress induces the development of Alzheimer’s disease pathology via angiopathy, 2020 Dec 10; 337:113552.	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Experimental Neurology,	６．最初と最後の頁 113552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.expneurol.2020.113552.	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 Haruo Okado	４．巻 178
２．論文標題 Nervous system regulated by POZ domain Kruppel-like zinc finger (POK) family transcription repressor RP58	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Br J Pharmacol.	６．最初と最後の頁 813-826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.15265.	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 Sanchez-Valpuesta M, Suzuki Y, Shibata Y, Toji N, Ji Y, Afrin N, Asogwa CN, Kojima I, Mizuguchi D, Kojima S, Okanoya K, Okado H, Kobayashi K, Wada K.	４．巻 116
２．論文標題 Corticobasal ganglia projecting neurons are required for juvenile vocal learning but not for adult vocal plasticity in songbirds.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	６．最初と最後の頁 22833-22843.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1913575116.	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 該当する

１．著者名 Okado H.	４．巻 1705
２．論文標題 Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Brain Res.	６．最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.02.042.	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 Kita M, Nakae J, Kawano Y, Asahara H, Takemori H, Okado H, Itoh H	４．巻 12
２．論文標題 Zfp238 Regulates the Thermogenic Program in Cooperation with Foxo1.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 iScience	６．最初と最後の頁 87-101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2019.01.005.	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 Okado H	４．巻 1795
２．論文標題 Regulation of brain development and brain function by the transcriptional repressor RP58.	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Brain Research	６．最初と最後の頁 15-23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2018.02.042	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 Hirai S, Hotta K, Okado H.	４．巻 40
２．論文標題 Developmental Roles and Evolutionary Significance of AMPA-Type Glutamate Receptors.	５．発行年 2018年
３．雑誌名 BioEssays	６．最初と最後の頁 e1800028.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.201800028.	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2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 Tomoko Tanaka, Okado Haruo.
２．発表標題 Mechanism for the maintenance of cognitive function, Neuro2019, July 25-28 Niigata
３．学会等名 第４２回日本神経科学大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 新保 裕子，平井 志伸，田中 智子、田中 謙二、岡戸 晴生
２．発表標題 成体でのRP58発現抑制は認知機能低下を惹起する
３．学会等名 第４２回日本神経科学大会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
転写抑制因子RP58の発現制御可能なトランスジェニック非ヒト動物	岡戸晴生、新保裕子	公益財団法人東京都医学総合研究所
産業財産権の種類、番号	**出願年**	**国内・外国の別**
特許、2019-136490	2019年	国内

〔取得〕　計0件

〔その他〕

－

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

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関