

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03237

研究課題名(和文)ブロードマン脳地図形成の分子メカニズム

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of Brodmann's map formation

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・教授

研究者番号：80469915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ブロードマン脳地図の形成メカニズムという未解明の問題に挑むため、発生期の脳皮質に発現する分子の機能と、領野ごとの細胞構築の違いを生み出す細胞動態に焦点を当て、脳皮質領野の構築メカニズムを明らかにすることを目的とした。具体的に、脳皮質の領野間の境界における新生ニューロンの挙動の違いに着目し、細胞の遺伝学的標識とライブイメージングを用いて、同時期に生み出されるニューロンの動態を可視化・制御した。これにより、異なる領野に統合される細胞のふるまいや、領野特異的に作動する細胞の分化プログラムを明らかにし、ブロードマン脳地図における細胞構築の差異を生み出す分子・細胞基盤を初めて確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ブロードマン脳地図が報告されて以来未解明であった脳皮質領野形成機構に関する新たな知見を得た。時期特異的神経細胞の操作とバイオインフォマティクス、遺伝学的手法を統合的に使用した解析により、脳皮質の細胞構築の形成原理が明らかになった。この成果により、ヒトで最も増加した領野の細胞構築学的な意義が明らかになり、知覚や随意運動などを司る高次脳機能を担う領野特異的なニューロンの分化制御機構およびその機能不全の理解に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate the mechanisms of Brodmann's map formation by focusing on the functions of molecules expressed in the developing cerebral cortex, and the cellular dynamics that contribute to the differences in cytoarchitecture among cortical areas. Specifically, we focused on the behavioral differences of newborn neurons at the boundaries between cortical areas and visualized the dynamics of neurons generated at the same time using genetic labeling and live imaging techniques. Through this approach, we revealed the differential behavior of cells integrating into distinct areas and the differentiation programs of cells across cortical areas, thus establishing for the first time the molecular and cellular basis that underlie the differences in cytoarchitecture as described in the Brodmann's map.

研究分野：神経発生学

キーワード：脳新皮質 ブロードマン脳地図 領野 神経幹細胞 細胞移動

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多様な細胞から構成される大脳新皮質は、投射標的や形態が異なるニューロン群からなる6層構造を領野ごとに修飾することで、視覚・体性感覚・随意運動などの高次の情報処理を担っている。この大脳皮質の異なる細胞構築を示した「ブロードマンの脳地図」は、その後のペンフィールドの電極刺激実験や機能イメージングによる脳の機能局在と一致することが示され、今日の神経科学の基盤をなしてきた。しかしながら、脳の領野特異的回路がつくられるメカニズムについては、1980年代に内因性のプログラムによる制御を支持するProtomap仮説と、末梢器官からの感覚入力の重要性を唱えたProtocortex仮説が提唱されて以来、未解明のままであった。大脳皮質の基盤となる構造は、発生期に脳室帯とよばれる部位に存在する神経幹細胞が非対称細胞分裂を繰り返しながら、初めに第1層のカハール・レチウス細胞が産生され、続いて第5/6層の深層ニューロン、第2～4層の上層ニューロンが分化し、移動した細胞がインサイドアウト様式に配置されることにより、最終的に6層のニューロン層がつけられていく。この6層の配分は領野ごとに異なり、一次感覚野では第4層が発達し、代わりに運動野では第5層が厚いことが知られているが、同時期に産生されたニューロンがどのように異なるニューロン層の厚みに反映されるのかは不明であった。我々はこれまで、大脳皮質の形成過程を調べるために、神経幹細胞にコードされる遺伝子を操作することで、経時的なニューロン産生の切り替えを制御するプログラムを明らかにしてきた。同様に国内外の研究により、各層のニューロンの分化を制御する遺伝子が同定され、大脳皮質の層形成の分子機構については、理解が大きく進展した。そこで本研究では、高次脳機能の基盤をなす大脳皮質領野の構築原理を明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

前述した背景のもと、本研究ではブロードマン脳地図の形成メカニズムという未解明の問題に挑むために、発生期の脳皮質に発現する分子の機能と、領野ごとの細胞構築の違いを生み出す細胞動態に焦点をあて、大脳皮質領野の構築メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に大脳皮質の領野間の境界における新生ニューロンの挙動の違いに着目し、同時期に生み出されるニューロンの動態を、細胞の遺伝学的標識とライブイメージングにより可視化・制御することで、異なる領野に統合する細胞のふるまいを明らかにし、新たなアプローチから大脳皮質の構築原理を明らかにすることを目的として行った。

3. 研究の方法

本研究ではブロードマン脳地図の形成メカニズムを明らかにするために、(1) 新生ニューロンの移動モードの違いを生み出す新規分子の機能解析によるブロードマン領野の形成への寄与、(2) *in vitro* 培養系を用いた領野特異的細胞分化の分子機序、(3) イメージングを用いた細胞間コミュニケーションによる領野間の新生ニューロンの動態への影響、に焦点をあてて解析を行った。

4. 研究成果

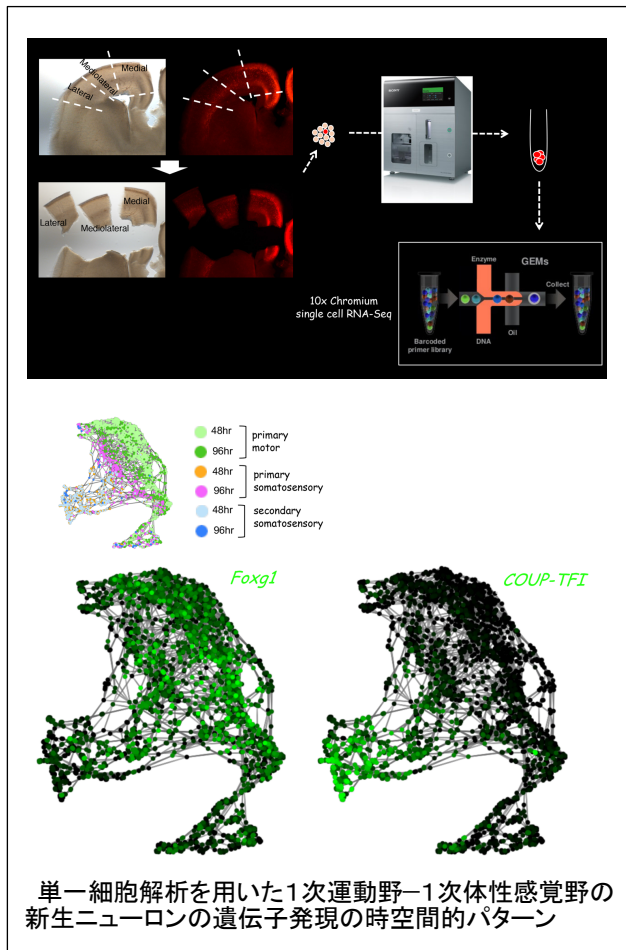
(1) 新生ニューロンの移動モードの違いを生み出す新規分子群の機能

同一時間に生み出される層特異的サブタイプのニューロンの標識手法を用い、領野間で配置や形態の違いが顕著である第4層ニューロンに焦点をあて、哺乳類において高度に保存されている一次運動野—一次体性感覚野の領野間の細胞動態についてタイムラプスイメージングを行った。この結果、境界をまたいだ領野間において、新生ニューロンの移動スピードと大脳皮質への統合パターンが大きく切り替わるという結果が得られた。このことから、一次運動野では、神経幹細胞より新たに生み出されるニューロンは速いスピードで大脳皮質板へ高速移動し、一次体性感覚野では、新生ニューロンが大脳皮質板の下で一旦停止することが見出され、大脳皮質板へ

の侵入のタイミングの違いが、ブロードマン領野における細胞構築の違いを生み出しているという新たな仮説が示された。

そこで一次体性感覚野における4層ニューロンの *in vivo* でのレポーター遺伝子発現誘導後、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い、遺伝子発現の高次元パターン解析を行った結果(右図)、高い精度でそれぞれ高速移動と停止細胞において、細胞自律的に制御される新規の分子群の同定を行うことが可能となった。この結果から、

- ① 高速移動または停止細胞に特異的に発現し、運動野-体性感覚野間の新生ニューロンの移動スピードの違いに関わる遺伝子について絞り込みを行い、これらの遺伝子発現の特異性について検証を行った。
- ② 高速移動細胞および停止細胞に特異的に発現する遺伝子群について、それぞれマウス胚に時期特異的(胎生12~15日目)および領域特異的に遺伝子導入を行い、移動スピード、形態、細胞の配置パターンについて解析を行い、一次体性感覚野の停止細胞に特異的に発現する遺伝子を導入したマウス胚では、移動細胞速度と細胞の配置に変化をもたらすことが見出された。
- ③ 大脳皮質領野形成において相補的な機能をもつ転写因子群について解析を行った結果、Foxg1が高速移動細胞、COUP-TFIが停止細胞においてそれぞれ単一細胞レベルで相補的な発現パターンを示すことが確認され(上図)、大脳皮質の領野特異的な細胞の移動パターンがこれら遺伝子の下流で制御されている可能性が示された。



(2) *In vitro*培養系を用いた領野特異的細胞分化の分子機序

時期特異的産生ニューロンの標識システムにより、体性感覚野の第4層ニューロンが生まれるタイミングでタモキシフェンを投与し、投与後24時間後に大脳皮質細胞を分散、10日間まで培養を続けTdTomato標識細胞の挙動を解析したところ、*in vitro*で単離されたときにおいても、運動野および体性感覚野特異的のマーカ発現および樹状突起パターンを示すことが見出された。これらの解析の結果、発生期における領野間における細胞の不均一性が、従来予想されていたよりも早く獲得され得ることが新たに示された。

(3) 細胞間コミュニケーションによる領野間の新生ニューロンの動態への影響

*In vitro*および*in vivo*における樹状突起形態の経時的解析より、領野特異的ニューロンの特性が、神経活動非依存的に獲得されることを新たに見出した。これらの違いを担う内因性機構を明らかにするために、体性感覚野第4層に分化するニューロンと同時期に産生される運動野のニューロンの比較において、異なる発現を示す遺伝子群についてパスウェイ解析を行った結果、体性感覚野第4層において樹状突起の発達や分化に関わる遺伝子群の有意な発現上昇を見出した。これらの一連の解析より、大脳新皮質の領野特異的なニューロンの分化と形態特性を生み出す分子機構が明らかにされた。

以上の解析により、本研究では領野特異的に作動する細胞の分化プログラムを明らかにし、ブロードマン脳地図における細胞構築の差異を生み出す分子・細胞基盤を初めて確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Erkhembaatar Munkhsoyol, Yamamoto Iroha, Inoguchi Fuduki, Taki Kosuke, Yamagishi Satoru, Delaney Leanne, Mariko Nishibe, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Hanashima Carina, Naka kaneda Hayato, Ihara Dai, Katsuyama Yu	4. 巻 64
2. 論文標題 Involvement of strawberry notch homologue 1 in neurite outgrowth of cortical neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 379 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12802	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 Gonda Yuko, Namba Takashi, Hanashima Carina	4. 巻 8
2. 論文標題 Beyond Axon Guidance: Roles of Slit-Robo Signaling in Neocortical Formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 607415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.607415	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 該当する

1. 著者名 Hou Pei-Shan, hAilin Darren O, Vogel Tanja, Hanashima Carina	4. 巻 14
2. 論文標題 Transcription and Beyond: Delineating FOXG1 Function in Cortical Development and Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2020.00035	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 該当する

1. 著者名 Li Huiping, Miki Takao, Almeida Glicia Maria de, Hanashima Carina, Matsuzaki Tomoko, Kuo Calvin J., Watanabe Naoki, Noda Makoto	4. 巻 19
2. 論文標題 RECK in Neural Precursor Cells Plays a Critical Role in Mouse Forebrain Angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 559 ~ 571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.08.009	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 Hou Pei-Shan, Miyoshi Goichi, Hanashima Carina	4. 巻 10
2. 論文標題 Sensory cortex wiring requires preselection of short- and long-range projection neurons through an Egr-Foxg1-COUP-TFI network	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11043-w	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22件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Carina Hanashima
2. 発表標題 Specification and integration of glutamatergic neuron subtypes in the cerebral cortex
3. 学会等名 ISN-APSN 2022, Symposium 'Cerebral Cortex Assembly: neuron migration, folding and connectivity' (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Carina Hanashima
2. 発表標題 Neuronal subtype transitions and integration in the cerebral cortex
3. 学会等名 Gordon Research Conference 'Molecular and Cellular Neurobiology' (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoto Ohte and Carina Hanashima
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of neocortical layer 4 development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Misa Cho and Carina Hanashima
2. 発表標題 Mechanisms of spiny stellate-specific dendritic morphology acquisition in the neocortex
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryoka Katayama, Takuma Kumamoto, Chiaki Ohtaka-Maruyama, and Carina Hanashima
2. 発表標題 The mechanisms of sensory input neuron production in the avian pallium
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zi Chao Ngiam, Kenichi Toma, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Foxg1 and Brn2 cooperatively regulate the temporal production of upper-layer neurons in the developing neocortex Me
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大手直人、侯 珮珊、西山千尋、花嶋かりな
2. 発表標題 大脳新皮質第 4 層発達過程の時空間的遺伝子発現と統合ダイナミクス
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Zi Chao Ngiam and Carina Hanashima
2. 発表標題 Transcriptional and post-transcriptional mechanisms of Brn2-mediated upper-layer neurogenesis in the cerebral cortex
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会/第65回日本神経化学会大会/第32回日本神経回路学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白坂みさの、花嶋かりな
2. 発表標題 Retrosplenial cortexの特異性に関わる遺伝子と層構造構築過程の解析
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会/第65回日本神経化学会大会/第32回日本神経回路学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuko Gonda and Carina Hanashima
2. 発表標題 Robo1 signaling-mediated Golgi apparatus dynamics determine the dendritic morphology of layers 2/3 pyramidal neurons in the cerebral cortex
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会/第65回日本神経化学会大会/第32回日本神経回路学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoto Ohte, Hou Pei-Shan, Chihiro Nishiyama, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of neocortical layer 4 neuron development during the postnatal period
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回CJK国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misano Shirasaka, Marina Fujimoto, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Analysis of the specific genes and laminae constructions of retrosplenial cortex
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回CJK国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Gonda, Tatsunori Seki, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Molecular control of layer-specific dendritic formation of neocortical neurons
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会/第1回CJK国際会議(国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Carina Hanashima
2. 発表標題 Roles of early-born neurons in the assembly of the neocortical circuit
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Rui Iizuka, Peishan Hou, Chihiro Nishiyama, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Cellular and molecular mechanisms of neocortical integration through area-specific migration mode
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Misano Shirasaka, Marina Fujimoto, and Carina Hanashima
2. 発表標題 Spatiotemporal dynamics of molecular and laminar organization of the retrosplenial cortex
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Munkhsoyol Erkhembaatar, Keito Minemori, Iroha Yamamoto, Takashi Imaz, Fuduki Inoguchi, Carina Hanashima, Satoru Yamagishi, Hayato Naka-Kaneda, and Yu Katsuyama
2. 発表標題 Transcription regulation of neurite growth by Strawberry Notch Homolog 1
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 侯 珮珊, 花嶋 かりな
2. 発表標題 Preselection of long- and short-range projection neurons through reciprocal Foxg1 and COUP-TFI actions establish the sensory cortical circuit
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of JSDB
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Carina Hanashima
2. 発表標題 Mechanisms of neuronal subtype specification and integration in the cerebral cortex
3. 学会等名 Baikal Neuroscience Meeting 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 浩一郎, 西山 千尋, 花嶋 かりな
2. 発表標題 大脳皮質領野形成における放射状グリア細胞の役割
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会 Neuro2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江 浩一郎, 西山 千尋, 花嶋 かりな
2. 発表標題 大脳皮質領野形成における放射状グリア細胞の役割
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 白坂みさの, 藤本真里奈, 花嶋かりな
2. 発表標題 脳梁膨大後部皮質特有の神経回路構築を担う分子機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Hanashima Lab Website https://hanashima-lab.wixsite.com/waseda
--

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			
ドイツ	University of Freiburg			