

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：83902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06684

研究課題名（和文）大脳皮質介在ニューロンの分化制御機構の解明

研究課題名（英文）The analysis of cortical interneuron formation in mouse embryo

研究代表者

高木 豪（Takagi, Tsuyoshi）

愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・主任研究員

研究者番号：70300879

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではニューロンの中で最も多様性を有する抑制性介在ニューロンがどのようにしてその多様性を生み出すのか、そのメカニズムの一端を明らかにした。抑制性介在ニューロンは大きく三つのグループに大別されるが、それらはそれぞれさらに細かいサブグループへと分かれる。今回、その一つのグループの形成分化に特定の分泌タンパク質を介したシグナルを伝達する転写因子が関わることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経細胞の中には形態的、機能的に多様性を有しているものもある。このような多様性がどのようにして生じるのか知ることは、脳の働きを理解する上で重要である。今回、特定のシグナル伝達系が抑制性ニューロンのグループの形成に関わることを明らかにしたが、この成果は今後、ニューロンにおける多様性獲得の理解に向けた起点となり得る。また神経発達障害の症状発症に抑制性ニューロンの異常が大きく影響するという知見も蓄積しており、本成果は将来的に神経発達障害の理解、対処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, I reveal the one of mechanisms which give rise to various types of inhibitory interneuron, which possess the most diversity in neuron. Inhibitory interneurons are separated in three major types, then each one is further divided into subgroup. I exhibit the transcription factor which transduce signaling via one secretory factor group involves the formation and differentiation of one major type of inhibitory interneuron.

研究分野：神経発生学

キーワード：細胞分化 抑制性介在ニューロン 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 19世紀の末にスペインの解剖学者レモニ・カハールは、新生児の脳を対象としたゴルジ染色によりヒトの大脳皮質に、短い軸索を持ち、かつユニークな形態的特徴を有するニューロンが複数存在することを見出した。これらは GABA 作動性の cortical interneuron に相当し、近年の single cell RNA-seq の解析から実際には 23 種類ほども存在することが示唆されている。cortical interneuron は胚発生期の MGE (medial ganglionic eminence) に由来する PV (parvalbumin) 陽性型、SST (somatostatin) 陽性型と CGE (caudal ganglionic eminence) に由来する VIP 陽性型、RELN 陽性型に大別される。PV 型はさらに Basket cell、Chandelier cell などに、また SST 型は Martinotti cell、Non-Martinotti cell などにさらに細かくサブタイプに分かれ、これらは形態のみに留まらず電気生理学的特性などを含めてそれぞれユニークな細胞特性を有している。PV 型と SST 型で全体の cortical interneuron の約 70% を占め、またこれらは同じ MGE から生じることから、PV 型と SST 型の分化制御機構の理解は、多様な cortical interneuron が形成されるプロセスのベースとなるものであり欠かすことはできない。しかしその分子メカニズムはまだ明確に解明されていなかった。

(2) 分泌タンパクである BMP が PV 型の cortical interneuron の形成を制御するという *in vitro* におけるデータが既に報告されていた(引用文献 1)。MGE 由来の progenitor の培養中に Bmp4 を添加すると主に PV 型が生じるというものである。しかし、その報告では *in vivo* レベルで BMP の効果の証明をうまくできなかったため、cortical interneuron の研究分野のコミュニティーではあまり評価されていなかった。そのため、BMP が実際に PV 型の分化制御に関わるか再検討する余地が残されていた。

2. 研究の目的

(1) 遺伝子変異マウスにおいて PV 型 cortical interneuron の形成に軽微な異常が観察される(引用文献 2) Two-handed 型 Zn-finger 転写因子である Schnurri-2 に着目し、Schnurri ファミリーの解析を通して PV 型の cortical interneuron の分化制御のメカニズムを明らかにする。

(2) Schnurri ファミリーは BMP シグナル伝達の下流で働く転写因子でもあるため、BMP を介した cortical interneuron の分化制御における Schnurri ファミリーの関与についても可能性を検討し、PV 型 cortical interneuron の分化制御に関わる分泌タンパクから転写因子までのシグナル伝達経路についての示唆を得る。

3. 研究の方法

(1) PV 型、SST 型の cortical interneuron の progenitor が形成される胚発生期のステージにおける BMP ファミリー及び Schnurri ファミリー遺伝子の発現を *in-situ* ハイブリダイゼーション法により調べる。加えて、これらの発現する領域におけるマーカー遺伝子の発現パターンと比較検討を行う。

(2) PV 型 cortical interneuron の形成異常の見られることが報告されている Schnurri-2 KO マウスと他の Schnurri ファミリーメンバーとのダブル変異マウスを作製し、これらにおける PV 型 cortical interneuron の分化について検討を行う。

4. 研究成果

Schnurri-2 KO マウスで PV 型 cortical interneuron が減少しているという報告に基づき、Schnurri-2 を含む Schnurri ファミリー遺伝子の cortical interneuron 形成ステージにおける発現を *in-situ* ハイブリダイゼーション法によって検討を行った。E13.5 胚のステージでは Schnurri-1 (Shn-1) 及び Schnurri-3 (Shn-3) の発現はコロナル切片において cortical interneuron の分化、形成の場所である終脳腹側の LGE や MGE で比較的均一に見られた。一方、Schnurri-2 (Shn-2) は LGE (lateral ganglionic eminence) と MGE の境界辺りにおいて特異的な強い発現が観察された(図 1、矢印)。

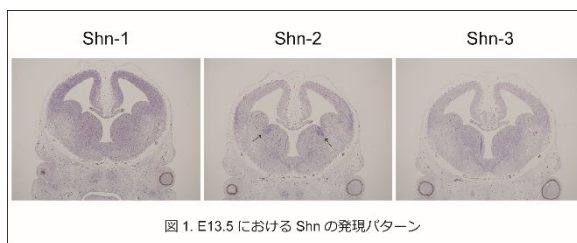


図 1. E13.5 における Shn の発現パターン

終脳での特徴的な Schnurri-2 の発現に着目し、胚のステージを遡ってその発現をさらに調べた。E11.5 胚のステージにおいても Schnurri-2 の発現は LGE と MGE の境界付近で強く発現がみられ、この Schnurri-2 の発現は尾部側へ向けて継続して観察された(図 2)。

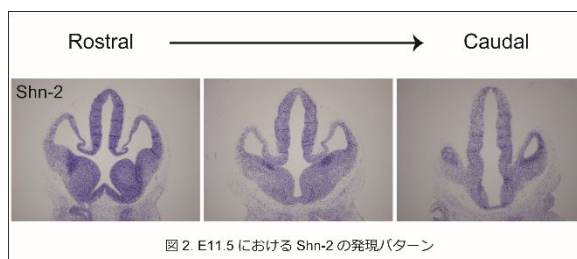


図 2. E11.5 における Shn-2 の発現パターン

Schnurri は分泌因子である BMP のシグナリング伝達に関わる転写因子であること

から、Schnurri-2 と BMP ファミリーメンバーの発現を同一個体由来のコロナル切片を用いて比較し、そのパターンに関連がみられるか検討した。その結果、Bmp2、Bmp4、Bmp7 は Schnurri-2 の発現する領域と近接する部位で発現することが分かった(図 3)。また、cortical interneuron の分化制御に重要な役割を担うことが知られている分泌因子の Shh も、BMP ファミリーと全く部位は異なるが、Schnurri-2 と近接する部位で発現することも確認された(図 3)。

LGE、MGE、CGE をすべて包含する切り口で発現解析をするために、クロス切片を用いてこれらの領域で特異的な発現をする他のマーカー遺伝子と Schnurri-2 の発現パターンの比較検討を行った。コロナル切片でみた背腹軸方向におけるパターンと同様に吻尾軸方向においても Schnurri-2 と BMP ファミリーメンバーの近接した発現パターンが観察された(図 4)。また、Shh についても同様であった(図 4)。MGE のマーカー遺伝子である Nkx2.1 のパターンとの比較によって、Schnurri-2 が MGE から LGE へまたがって発現していることをはっきりと確認することができた(図 4)。LGE と MGE で共に発現する転写因子の Dlx2 は、LGE と MGE の境界付近で発現が低下しており、この領域においては Schnurri-2 と Dlx2 は相補的な発現をしていることが分かった(図 4)。加えて、PV 型と SST 型の cortical interneuron の分化制御に関わるオーファン型の核内リセプターである CoupTF ファミリーの CoupTF1、CoupTF2 の発現を調べると、これらの発現は Schnurri-2 のものと類似していることが分かった。MGE と LGE の境界領域や CGE における発現の強い領域において特に CoupTF1 と Schnurri-2 との発現の強い相関が見られた(図 4)。

Schnurri-2 のみならず、Schnurri-1、Schnurri-3 も cortical interneuron の形成期に発現がみられたことから Schnurri-2 とこれらの二重変異マウスを作製して Schnurri-2 変異マウスで報告されている PV 型 cortical interneuron の減少がさらに促進されるか検討することにした。Schnurri-1、Schnurri-2 の二重変異マウスは PV が発現する生後 2 週齢時点で得ることが出来ず、恐らく生後致死でないかと思われ解析を行うことができなかった。一方、Schnurri-2、Schnurri-3 の二重変異マウスは生後致死になるものも見られたが、一部のマウスは PV の発現を検討できる P16 まで生存したため、このステージのマウスを使って解析を行うことができた。報告されていた Schnurri-2 KO マウスにおける PV 型 cortical interneuron の減少は、今回の解析では顕著ではなかった。おそらく報告されたものは純系の遺伝背景を用いており、今回は二つの純系系統の F1 背景を用いた点が異なるため、遺伝背景の違いが影響している可能性が考えられた。複数の Schnurri-2、Schnurri-3 の二重変異マウスを調べたところ、これらでは PV 型 cortical interneuron がほとんど観察されなかった(図 5)。このことから Schnurri ファミリーは協調して PV 型の cortical interneuron の形成に関わっていることが分かった。

今回の研究から Schnurri ファミリーが PV 型の cortical interneuron に重要な働きを担って

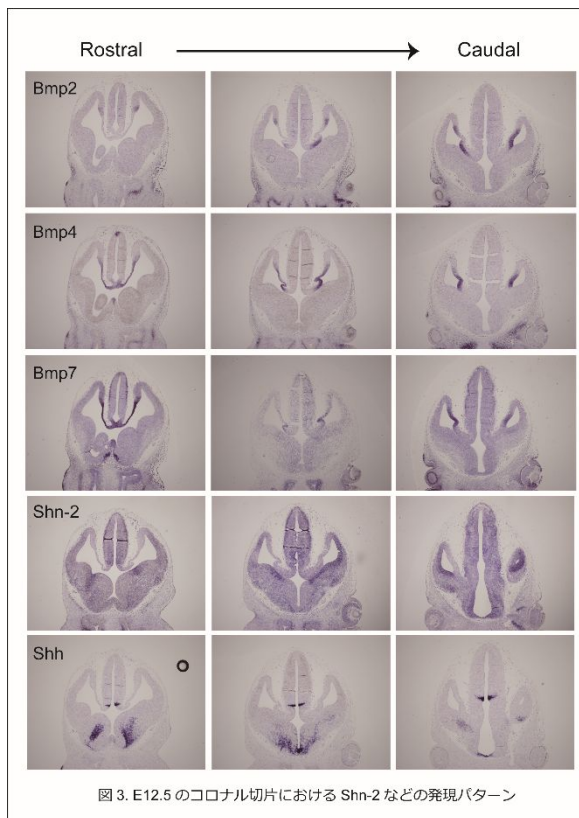


図 3. E12.5 のコロナル切片における Shn-2 などの発現パターン

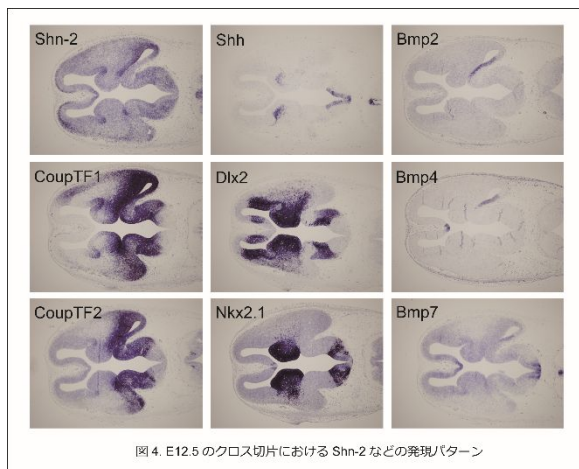


図 4. E12.5 のクロス切片における Shn-2 などの発現パターン

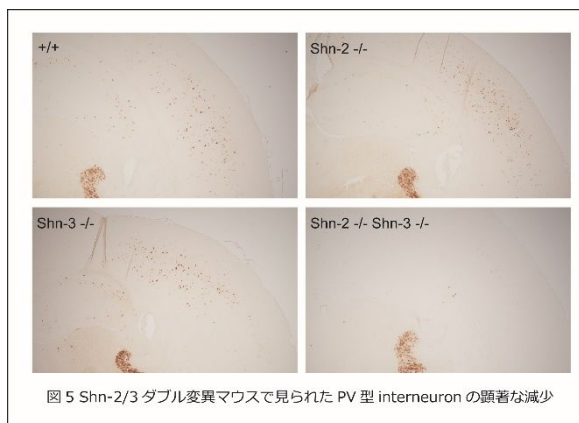


図 5 Shn-2/3 ダブル変異マウスで見られた PV 型 interneuron の顕著な減少

いることが明らかとなったが、Schnurri は BMP シグナルを伝達する転写因子でもある。実際、BMP のメンバーは Schnurri ファミリーの発現する終脳腹側領域と近接するところで発現していた。過去の *in vitro* の研究で BMP は cortical interneuron の progenitor を PV 型のものに誘導する能力を有することが示されており、これらのことから BMP は Schnurri ファミリーを介して PV 型 cortical interneuron の形成を制御している可能性が高いと思われる。興味深いことに BMP ファミリーと近接した領域で発現していた Schnurri-2 は、領域としては全く異なるが、BMP と同じく分泌因子の Shh とも近接した発現様式を示した。Shh はマウスの ES 細胞を用いた *in vitro* での interneuron への分化実験において、Shh を含む培地では PV 型より SST 型の割合が高くなり、Shh を含まない培地では逆の結果になることが報告されている(引用文献 3)。このことから、Schnurri-2 は BMP による制御を受けるだけでなく、Shh によって BMP とは全く逆の制御、つまり BMP は Schnurri-2 を介して PV 分化を誘導し、一方 Shh は Schnurri-2 の発現又は活性を抑制して PV への分化を抑制する方向に働く制御が存在する可能性も考えられた。今後 Shh を介した Schnurri-2 の発現、活性制御の研究は、転写因子 Schnurri-2 の制御を核とする cortical interneuron の分化制御機構の全体像の理解に大きく貢献するかもしれない。

引用文献

- (1) Mukhopadhyay A, McGuire T, Peng CY, Kessler JA Differential effects of BMP signaling on parvalbumin and somatostatin interneuron differentiation. *Development* v136 p2633-2642 (2009)
- (2) Takao K, Kobayashi K, Hagihara H, Ohira K, Shoji H, Hattori S, Koshimizu H, Umemori J, Toyama K, Nakamura HK, Kuroiwa M, Maeda J, Atsuzawa K, Esaki K, Yamaguchi S, Furuya S, Takagi T, Walton NM, Hayashi N, Suzuki H, Higuchi M, Usuda N, Suhara T, Nishi A, Matsumoto M, Ishii S, Miyakawa T Deficiency of schnurri-2, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* v8 p 1409-1425 (2013)
- (3) Tyson JA, Goldberg EM, Maroof AM, Xu Q, Petros TJ, Anderson SA Duration of culture and sonic hedgehog signaling differentially specify PV versus SST cortical interneuron fates from embryonic stem cells. *Development* v142 p1267-1278 (2015)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 T. Takagi, Y Higashi, M Asai, S Ishii	4. 巻 1749
2. 論文標題 Introduction of a de novo Creb-binding protein gene mutation in sperm to produce a Rubinstein-Taybi syndrome model using inbred C57BL/6 mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.147140	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木豪、浅井真人
2. 発表標題 精子de novo変異導入法による優性遺伝疾患モデルマウスの作製
3. 学会等名 日本臨床分子形態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木豪
2. 発表標題 重度知的障害を伴うRubinstein-Taybi syndromeのde novo変異型モデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木豪、浅井真人
2. 発表標題 優性遺伝型のモデルマウス産出への精子de novo変異導入法の利用
3. 学会等名 日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究 分担 者	田中 基樹 (Tanaka Motoki) (90584673)	愛知県医療療育総合センター発達障害研究所・障害モデル研究部・主任研究員 (83902)	

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
---------	---------