

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03270

研究課題名（和文）哺乳類大脳新皮質の発生・進化におけるサブプレートニューロンの機能解明

研究課題名（英文）Functional analysis of subplate neurons in neocortical development and evolution

研究代表者

丸山 千秋（OHTAKA-MARUYAMA, Chiaki）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳・神経科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：00281626

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：サブプレートニューロン(SpN)は大脳皮質で最初に誕生、成熟するニューロンで、胎生期の脳形成に重要な役割を持つ。生後はその数が激減するが、自閉症等の発達障害患者脳ではその減り方が少ないことが示唆されている。従ってSpNの胎生期から生後発達期にかけてのダイナミズムの解明は精神疾患発症のメカニズム解明の上でも重要である。本研究ではSpNの胎生期のマーカーの同定と、サブタイプ分類を進めることで、ヘテロな細胞集団であるSpNの細胞種とその役割の違いを明らかにするためにシングルセル解析、Visium解析を行い、SpNの複数のサブタイプを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症や発達障害は生まれつき発症するケースが多く、脳の器質的な異常に起因することが示唆されるものの、未解明の部分が多い。従ってその治療法についても対処療法に頼り、根本的な治療戦略はないに等しい。本研究は、これらの疾患の発症メカニズムを知るためにもSpNに着目して研究を進めた。SpNは大脳皮質で最初に誕生し、成熟するニューロンであり、胎生期の神経細胞移動や初期の神経回路形成（視床-皮質連絡の形成）を制御している。生後はその数が激減するが、自閉症脳では減り方が少ないことが報告されている。そこで、マウスモデルを用いてSpNを操作するマウスを作製し、精神疾患発症との関連の解明を目指す。

研究成果の概要（英文）：Subplate neurons (SpNs) are the first-born and matured neurons in the cortex and play an essential role in brain formation during embryonic life. Their number is drastically reduced after birth, but it has been suggested that this reduction is less pronounced in the brains of patients with developmental disorders such as autism. Therefore, elucidating the dynamism of the SpN from the embryonic to the postnatal developmental period is vital for elucidating the mechanisms underlying the onset of mental disorders. In this study, single-cell and Visium analyses were performed to identify markers of the embryonic period of SpN. To clarify the differences between SpN subtypes, we classified the subtypes, suggesting that each heterogeneous cell population has different roles.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 サブプレート 自閉症 発達障害 シングルセル解析 Visium 解析 空間的トランスクリプトーム

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

ヒトの脳は大脳新皮質が発達し、その限られた脳領域内に数百億個の神経細胞（ニューロン）が精緻に配置されている。それらのニューロン間に“配線”される精密な神経回路を流れる電気信号が私たちの思考や精神活動の源である。では『この高次脳機能を発揮することができる精巧な大脳新皮質はどのように発生し、また進化の過程で獲得されてきたのだろうか？』この問いに対し研究代表者はこれまで、神経細胞移動の制御機構に焦点を当てて研究を行ってきた。図 1A に示すように、哺乳類胎仔期の脳新皮質において、脳深部で生まれた新生ニューロンは、まず多極性の形態をとり、ランダムな方向性を持つ多極性移動でサブプレート層 (SP) 層まで移動する。その後、SP 層を越えると双極性細胞に形態変化し、放射状グリア線維に沿って脳表に向かって移動する (ロコモーション)。この過程のニューロンの動き

を詳細に観察すると、多極性細胞は SP 層直下でスピードを緩めて一定時間滞留後、形態と移動モードを変えることが判明した (図 1B)。ここで何が起きているかを詳細に解析したところ、移動ニューロンが SpN から一過的なシナプス構造を介してグルタミン酸シグナルを受け取り、移動モードの変換が起こっていることが明らかになった (丸山ら *Science* 2018、図 2)。

SpN は視床-皮質連絡の形成にも必須であることがわかっている。視床は様々な感覚刺激を大脳皮質へ伝える中継点であり、大脳皮質の神経回路形成にとって非常に重要な役割をしている。その回路の形成に SpN が必要であること、また SP 層は哺乳類脳にのみ存在することを考えると、大脳新皮質構造の進化にとって重要な役割を果たした可能性がある。本研究は『SpN は哺乳類大脳新皮質の発生と進化にどのように寄与したのか？』という学術的な問いに取り組み、脳構築の原理を明らかにする。

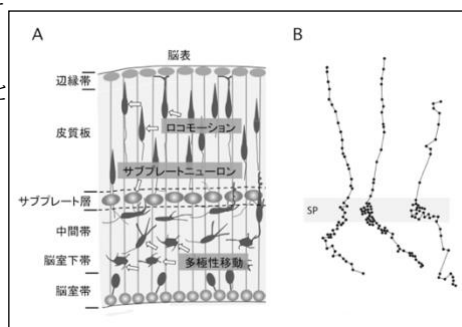


図 1 新生ニューロンの移動過程 (A) 多極性細胞は SP 層を越えると形態と移動モードが変わる。(B) 移動ニューロンの動きのトレース。SP 層付近で一度スピードを緩める。

2. 研究の目的

現代社会においては子どもから大人に至るまで、対人関係やコミュニケーション障害を特徴とする広汎性発達障害やアスペルガー症候群を含むいわゆる自閉症スペクトラム (ASD) やその他の精神疾患の発症率が増加している。また脳形成異常については、近年様々な原因遺伝子が発見されてきた。しかしながらこれらの神経・精神疾患の原因となる脳の生得的な器質的異常や発症機序は未解明な部分が多い。

本研究は、“脳の構築原理の理解”という観点から、脳・神経回路構築の基本原理を知ingことを目的とし、それをもとにして発達障害、心の病の原因や高次脳機能の異常のメカニズムの解明につなげていこうとするものである。これまで、実験動物であるマウスを用いて大脳新皮質形成のメカニズムについて様々な研究者が解析を進めているが、SpN の重要性に着目した研究はほとんどない。さらに、SP 層にはプロテオグリカン等の細胞外基質 (ECM) が豊富に含まれており、その存在意義も解明が待たれる。また、SpN は胎児期の脳形成において重要な機能を果たしているが、その自発活動の起源や、さらには成体になっても残存している SpN である白質細胞 (white

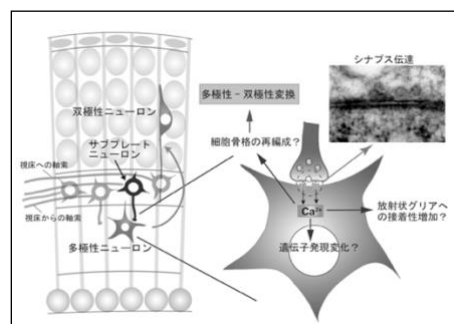


図 2 サブプレートニューロン (SpN) は後から生まれるニューロンにシナプスを介して信号を送り、移動様式の変換を促す。

matter cell) の機能は未解明である。それに加え、マウスに比べて霊長類は厚いサブプレート層をもつが、その細胞集団の詳細や機能も不明なままである。成体における機能を考えるに当たって、最近ナルコレプシーの原因として同定された神経伝達物質、オレキシンに唯一反応するニューロンが白質細胞であることが報告されたことは興味深い。睡眠中の脳自発活動の起源が不明なことを考え合わせると、SpN は睡眠-覚醒の制御にも関与している可能性もある。従って SpN のサブポピュレーションを同定し、分子マーカーによりその動態や機能を解析することで、脳形成から成体脳における睡眠や意識の謎までが解明出来る可能性もあり、その点から高い独自性、創造性に富む研究である。

3. 研究の方法

<2020 年度>

(1) シングルセル RNA シーケンスによる SP ニューロンのサブポピュレーションの同定

SpN は、分子マーカー遺伝子の発現パターンからサブポピュレーションの存在が示唆されていた。しかし明確なグループ分けはされていない。そこで、SpN をシングルセルに単離し各細胞での RNA シーケンスを行うことで、サブポピュレーションの分子レベルでの特徴を明確にする。単離する方法は、胎生 10 日目の子宮内電気穿孔法で SpN をラベルする、または SpN の一部が蛍光標識された Tg マウスの胚脳を用いる。Lpar1-EGFP Tg マウスは胎生 15 日以降 SpN の一部が GFP 陽性になる。また、D1B-Cre-ERT2 マウスを td-Tomato のリポーター系統 (Ai14) と交配し、胎生 10 日目でタモキシフェン投与することで SpN の一部が td-Tomato 陽性になる。これらの標識 SP 細胞を FACS でソーティングして単離する。

(2) RNA シーケンスの結果を解析し、SP ニューロンと精神疾患との関連性を探る

これまでに、SP 層に多く発現している遺伝子が自閉症や統合失調症に関連していることが報告されている (Hoerder-Suabedissen et al., PNAS, 2013)。そこで 1. で得られた RNA シーケンスの結果において、どのような疾患やシグナル伝達に関わる遺伝子発現が多いのかパイオインフォマティクス解析を行い、精神疾患発症と SpN との関連性を検証する。シングルセル解析は、フリーダイム C1 システムで一度に 800 細胞まで解析可能である。得られたデータを R のパッケージである Seurat を用いて解析し、クラスタリング解析等のグループ分けを行う。それぞれの細胞グループで発現量の多い遺伝子については *in situ* ハイブリダイゼーションや免疫組織化学染色を行って発現の時期と部位を確認する。

(3) SP ニューロンの発生起源の同定

(1) で同定された SpN のマーカーを用いて発生起源を探索する。これまでは脳室帯の神経前駆細胞から由来するものとされていたが、Rostromedial telencephalic wall (RMTW) から移動してくるサブグループが報告された (Pedraza et al., PNAS, 2014, 図 3A)。脳発生期に一過的に存在する別の細胞種、カハールレチウス細胞は、皮質外の 3 箇所から移動してくる (図 3A) ことを考えると、SpN の新規の発生起源の存在可能性も考えられる。そこで、SpN の発生起源とその移動経路を、抗体染色、タイムラプスイメージング等により詳細に調べ、胎生期脳構築における足場構造ともいえる SpN の動態を調べる。またそれらの非哺乳類 (鳥類、爬虫類) での発現を調べ、哺乳類の特異性を明らかにする。さらに、非哺乳類の新生ニューロンを哺乳類大脳皮質へ移植した場合に移植ニューロンの動態にどのような影響があるかを解析し、SP 層の進化における役割を実験的に考察する。

(4) SP ニューロンの神経活動が脳構築に与える影響の解析

SpN はシナプス伝達を介して多極性細胞の移動のタイミングを制御していることが研究代表

者らの研究で明らかになった（丸山ら、**Science** 2018）。SpN の神経活動は興奮性ニューロンの移動制御以外にも影響を及ぼしているのだろうか？ GABA 陽性の抑制性ニューロンは皮質外から接線方向に移動してくるが、その後方向を変えて皮質板へと進入する。このタイミング制御にも SpN が関与している可能性がある。また、視床から皮質へ入ってくる軸索についてもその神経活動が影響していることも考えられる。そこでこれを検証していく。SpN の神経活動を抑制し、GABA ニューロンの分布にどのような影響を及ぼすのか、また視床軸索の投射に影響するのかについて、抗体染色やタイムラプスイメージングで解析する。SpN の神経活動抑制は、胎生 10 日目に Kir2.1 発現プラスミド（K⁺チャネルで、過剰発現により神経活動が抑制される）を子宮内電気穿孔法で導入する方法を用いる。又は SpN 特異的な Cre-ERT2 系統マウス (D1B-Cre) に DTR (ジフテリア毒素受容体) の flox マウスを交配し、胎生 10 日目にタモキシフェンを与えて SpN に DTR を発現させ、適当な時期に DT (ジフテリア毒素) を与えることで SpN 特異的に細胞死させる。また、ハロロドプシンを SpN に導入し、スライス培養後に光操作で活性を抑制する方法も検討する。

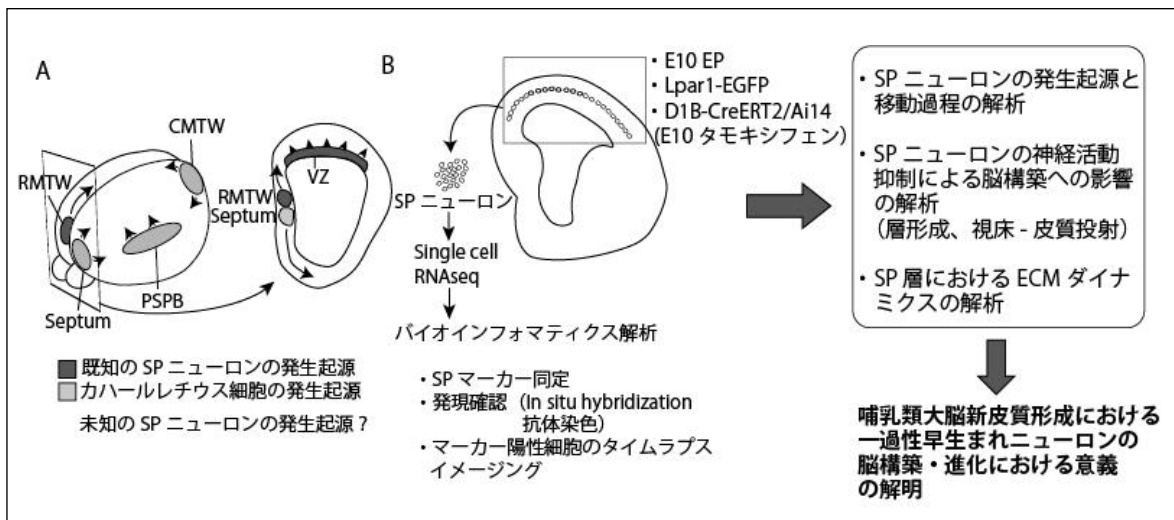


図 3 SP ニューロンの脳構築における機能の解明

(5) SP 層における細胞外基質 (ECM) ダイナミクスの解析

SP 層はプロテオグリカンやコラーゲン等の ECM タンパク質が豊富に存在する。ECM は、シグナル分子を保持するシグナリングセンターとなっている可能性がある。そこで今回得られた RNA シーケンスのデータを解析し、SpN がどのような ECM タンパク質を産生しているのかについて解析する。また以前に行った移動ニューロン側の発現プロファイリングのデータから、Adamts2 などの ECM プロテアーゼの発現が上昇してくるのことがわかっている。SP 層における ECM の分解とそれによって上昇するシグナル経路を詳細に解析することで、脳室帯とは異なるもう一つの脳構築の“場”としての SP 層の実態を明らかにする。

4. 研究成果

(1) SpN のサブポピュレーションの同定

Lpar1-EGFP Tg マウスの大脳皮質を胎生 17 日目に単離して GFP 陽性細胞を FACS ソートし、C1 シングルセル解析にかけた。また、D1B-Cre-ERT2 マウスを td-Tomato のリポーター系統 (Ai14) と交配し、胎生 10 日目にタモキシフェン投与することで SpN の一部が td-Tomato 陽性になるため、この Tomato 陽性 SP 細胞を FACS でソーティングして単離し、C1 シングルセル解析にかけた。さらに、得られたシーケンスデータを R のパッケージである Seurat で解析し、クラスタリングを行った。その結果 Lpar1-EGFP の方は 8 つのクラスターに分けられ、D1B-Cre 陽性の方

は10個のクラスターに分けられた。これらの2データの統合解析、さらにVisiumのデータとの統合解析により胎生期のSpNで高発現している分子マーカーも複数同定した。また既存の大脳皮質全体のシングルセルデータとも比較し、その中の一部がSpNの細胞クラスターであることを見出した。実際に高感度 *in situ* hybridization (ISH) 方であるRNAScopeで発現細胞の確認を行い、SpNのサブタイプが明確化した。

(2) SPニューロンの神経活動が脳構築に与える影響の解析

先行研究にて、カイニン酸を用いSpNをablationした例はあるが成体であった。我々は、胎生期のSpN特異的にCreを発現するマウス系統NeuroD1-Cre-ERT2を用いることで胎生期におけるSpNのablationを試みた。タモキシフェン(Tmx)を胎生10日目(E10)に投与することでCreをサブプレート特異的に発現させ、Cre依存的にtd-TomatoとDTR(ジフテリア毒素の受容体)を発現するfloxマウス系統にかけ合わせることで、サブプレート特異的にtd-Tomato陽性、かつDTRが発現するマウスを作製した。このマウスにE10でTmx投与後、E14, 15においてジフテリア毒素(DT)を投与しP0で固定した。その後、免疫染色を行い、大脳皮質の3領域でセルカウントを行った。DTは50 μ g/kg体重と75 μ g/kg体重、100 μ g/kg体重の3種類の条件にて投与を行った。その結果、50 μ g/kg体重投与の条件ではControlと比べ、SpN数が約1/3以下に減少していることが確認できた。今後はこの条件で作製したマウスを用いて、脳形成への影響や社会行動への影響を解析する予定である。さらにKir2.1-floxマウスを用いてSpNの活動を抑制した際の影響も解析することで、SpNの活動と脳構築の関係についても解析を進める。

(3) SP層における細胞外基質(ECM)ダイナミクスの解析

以前に行った移動ニューロン側の発現プロファイリングのデータから、Adams2などのECMプロテアーゼの発現が上昇してくることがわかっている。そこでAdams2のノックダウンや過剰発現等の制御を行い、神経細胞移動への影響を解析し、Adams2がSP層においてECM分解し、TGF- β シグナルをオンにすることで移動モード変換を促進していることが明らかになり、Adams2のニューロン移動制御における役割についての論文を投稿するに至った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miyatake S†, Kato M†, Kumamoto T..., Ohtaka-Maruyama C, and Matsumoto N	4. 巻 7
2. 論文標題 Denovo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 2368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd2368	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 Ohtaka-Maruyama C	4. 巻 14
2. 論文標題 Subplate neurons as an organizer of mammalian neocortical development.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnana.2020.00008	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 Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Kiyonari H, Gotoh H, Ono K	4. 巻 31
2. 論文標題 Changes in Wnt-dependent neuronal morphology underlie the anatomical diversification of neocortical homologs in amniotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107592	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 Hirai Sayaka, Miwa Hideki, Shimbo Hiroko, Nakajima Keisuke, Kondo Masahiro, Tanaka Tomoko, Ohtaka-Maruyama Chiaki, Hirai Shinobu, Okado Haruo	4. 巻 1
2. 論文標題 The mouse model of intellectual disability by ZBTB18/RP58 haploinsufficiency shows cognitive dysfunction with synaptic impairment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-023-01941-3	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 Kumamoto Takuma, Ohtaka-Maruyama Chiaki	4. 巻 16
2. 論文標題 Visualizing Cortical Development and Evolution: A Toolkit Update	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2022.876406	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 Takigawa-Imamura H, Hirano S, Watanabe C, Ohtaka-Maruyama C, Ema M, Mizutani KI.	4. 巻 1
2. 論文標題 Computational Model Exploring Characteristic Pattern Regulation in Periventricular Vessels	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life12122069.	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 Kaneko Noe, Hirai Kumiko, Oshima Minoru, Yura Kei, Hattori Mitsuharu, Maeda Nobuaki, Ohtaka-Maruyama Chiaki	4. 巻 1
2. 論文標題 ADAMTS2 regulates radial neuronal migration by activating TGF- signaling at the subplate layer of the developing neocortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.08.07.502954	査読の有無 無
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 Hara Yuichiro, Kumamoto Takuma, Yoshizawa-Sugata Naoko, Hirai Kumiko, Xianghe Song, Kawaji Hideya, Ohtaka-Maruyama Chiaki	4. 巻 1
2. 論文標題 Spatial transcriptome of developmental mouse brain reveals temporal dynamics of gene expressions and heterogeneity of the claustrum	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.04.12.536360	査読の有無 無
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9件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 大脳新皮質形成の仕組み -神経発生学研究から-
3. 学会等名 日本学術会議第一部心理学・教育学委員会主催 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiaki Ohtaka-Maruyama
2. 発表標題 Mechanisms of Neocortical Organization by Neuronal Activity of Subplate Neurons
3. 学会等名 The 30th Anniversary and The 63rd Annual Meeting and International Symposium of Korean Society of Life Science（招待講演） （国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田京介、隈元拓馬、丸山千秋
2. 発表標題 神経細胞移動様式の変化による大脳皮質の進化のメカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiaki Ohtaka-Maruyama
2. 発表標題 Characteristics of subplate neuron molecular expression elucidated by single-cell and spatial transcriptome analysis
3. 学会等名 International Symposium on Development and Plasticity of Neural System（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohtaka-Maruyama C
2. 発表標題 Subplate neuron acts as an organizer for mammalian neocortical formation
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会 シンポジウム「大脳皮質構築と機能におけるサブプレートが多機能性; Multiple roles of subplate in organization and functions of neocortex」(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 サブプレートニューロンの神経活動による大脳新皮質構築のメカニズム
3. 学会等名 第62回日本小児神経学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 サブプレートニューロンの神経活動による大脳新皮質構築のメカニズム
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田京介、隈元拓馬、丸山千秋
2. 発表標題 神経細胞移動様式の変化による大脳皮質の進化のメカニズム
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山千秋
2. 発表標題 大脳新皮質形成の仕組み -神経発生学研究から-
3. 学会等名 日本学会議第一部心理学・教育学委員会主催 公開シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京都医学総合研究所・脳神経回路形成プロジェクト https://www.igakuken.or.jp/regeneration/

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