

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03345

研究課題名(和文) 神経発生プログラム脆弱仮説の検証

研究課題名(英文) Verifying neurogenesis vulnerable hypothesis

研究代表者

平田 かつみ (Hirata, Tatsumi)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・教授

研究者番号：80260587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,480,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の体内環境の攪乱により、ちょうどその時最も脆弱である誕生したばかりの神経細胞が障害され、多様な発達性障害の症状が発現するのではないかと仮説を検証した。代表者が開発した「誕生日タグづけ法」を用いて、マウス胎児期の特定のタイミングで誕生する神経細胞集団に遺伝子組換えタグを導入した。このマウスが成体になってから、タグづけされた神経細胞集団の活動を化学遺伝学的に操作し、マウス個体に生じる神経機能障害のパターンを調べた。その結果、神経発生のタイミングと出現する症状との間に明確な関係性を見出した。発達障害でよく観察される症状も含まれており、「神経発生プログラム脆弱仮説」の確かさが支持された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発達性障害は社会的にも大きな問題であるが、多種多様な症状が混在し、原因の手がかりすらつかめない。本研究で、その混沌を解く鍵が神経発生のタイミングにある可能性が示唆された。人間集団を対象とした疫学的研究ではこのような因果関係は解析できないため、本研究のような実験生物学的な試みは極めて貴重であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We tested the hypothesis that a disturbance in the body environment during pregnancy may cause diverse developmental disorders by impairing newly-born neurons, which are most vulnerable at that time. Using the “neuronal tagging method” developed by our group, a population of neurons that are born at a particular timing were genetically tagged in mouse embryos. After these embryos reached adulthood, activities of the tagged neuronal population were chemogenetically manipulated, so that the pattern of neuronal dysfunctions in individual mice was evaluated. This analysis found a very clear relationship between the timing of neurogenesis and the neuronal symptoms that appear. The symptoms included commonly observed ones in developmental disorders, supporting the plausibility of this “neurogenesis vulnerable hypothesis”.

研究分野：神経科学

キーワード：誕生日タグづけ法 発達性障害 マウス 神経発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サリドマイド災禍や風疹感染に象徴されるように妊娠中の発生毒性は明確なタイムウィンドウをもつ。器官ごとに感受性期が異なり、ちょうど発生中の器官が最も影響を受けやすいといわれている。胎児期の神経障害についてもまさに同じことがいえるだろう。すなわち、胎内環境の変化に暴露されることで、最も脆弱な誕生したばかりの神経サブセットが障害され、誕生後に神経症状として現れる可能性が考えられる。発達性障害と一括りにされる疾病の中にも多種多様な症状が混在し、原因の手がかりすらつかめないのが現状である。しかし神経発生のタイミングを念頭に置いて、複雑な症状群を見直せば、科学的かつ統一的理解が可能ではないだろうか？本研究では、この「神経発生プログラム脆弱仮説」に対して、代表者が開発した神経細胞の「誕生日タグづけ法」を使ってアプローチした。

「誕生日タグづけ法」は、マウス個体内で誕生したばかりの神経細胞に遺伝子組換えを誘導するユニークな新規技術である (Hirata et al. 2019, 2021)。図1上で説明するように、神経分化に働く遺伝子の中には、神経細胞誕生直後に「一過的」に発現するものが知られている。そのような遺伝子のエンハンサーを利用して、タモキシフェン依存型 Cre 組換え酵素 (CreER) の発現を駆動するトランスジェニックマウスを作成した。これらのマウスにタモキシフェンを投与すると、その数時間前に最終分裂を終えたばかりの神経細胞特異的に、loxP 配列組換えを誘導できる (図1下)。

妊娠時期の異なるタイミングで誕生日タグづけを行うと、明らかに異なる神経細胞の集団が組換えタグづけされる (図2)。大まかにいうと、妊娠初期の早いタイミング (TM 胎生 10.5-11.5 日目) では脳幹や脊髄などの神経細胞がタグづけされ、妊娠が進むにつれて脳の前半部のタグづけが目立つようになり、妊娠最終期 (TM 胎生 17.5 日目) には海馬や終脳最上層の限られた神経細胞のみがタグづけされる。

これはまさしく神経発生の全般的な波を表している

が、脳機能の局在を考えると大変意味深い。というのも、もしも神経細胞の集団が発生タイミングにそって障害されるならば、機能障害の波が引き起こされることが容易に想像できるからである。さらに局所的にみれば、同じ領域内でも異なる神経細胞のサブセットが異なるタイミングでタグづけされており (図2) 各サブセットの機能障害と個体全体に引き起こされる特異的症状との関連に興味もたれる。

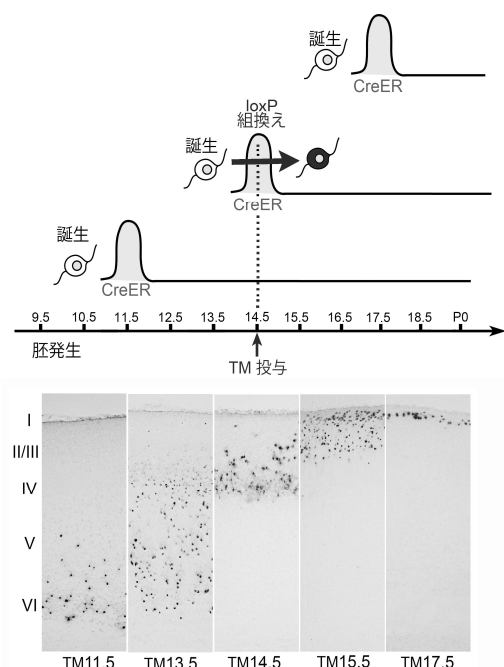


図1 誕生日タグづけの原理と実際 (上) 神経細胞は誕生後数時間後をピークとして CreER を発現する。タモキシフェン (TM) 投与により、ちょうどその時点で CreER を発現している神経細胞でのみ Cre-loxP 組換えが起きる。(下) 誕生日タグづけマウス (Neurog2-G2A 系統) の生後 7 日目の大脳新皮質切片。下に記載した胎生日に TM を投与。組換えを起こした神経細胞は、誕生日依存的な inside-out パターンの層分布を示している。

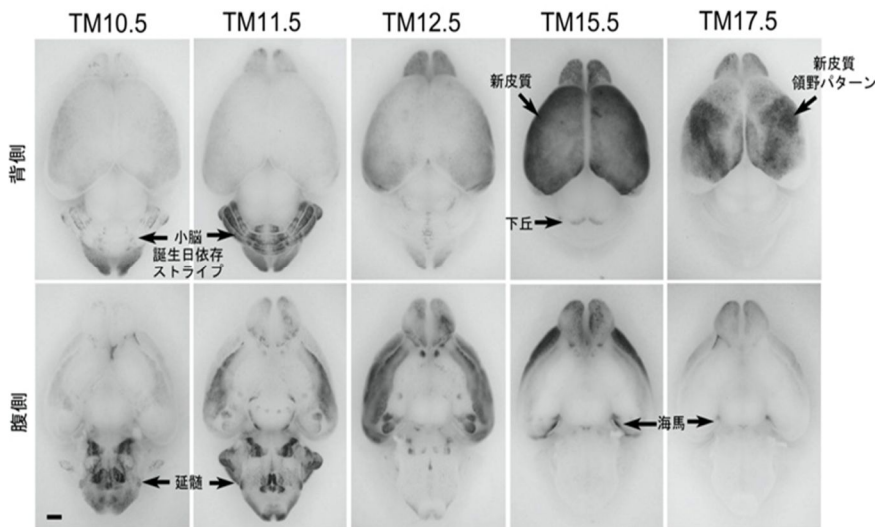


図2 誕生日タグづけされた P7 脳のホルマウント画像 (Neurog2-G2A 系統) 画像上に示した胎生ステージにタモキシフェン (TM) を投与し、特異的な脳領域の神経細胞群がタグづけされている。例えば、TM10.5-12.5 では、小脳プルキンエ細胞の誕生日依存的なストライプが観察される。TM17.5 で標識される新皮質の浅層細胞は、なぜか明確な領野特異的なパターンを呈しており興味深い。NeuroGT データベースより改変 (<https://ssbd.riken.jp/neurogt/>)

2. 研究の目的

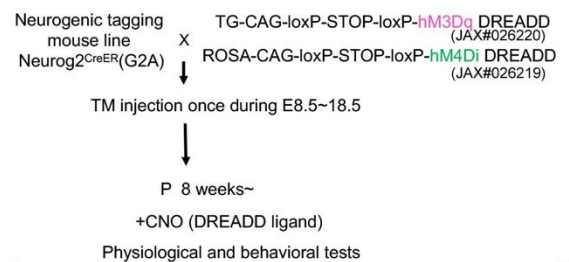
本研究の目的は、この「誕生日タグづけ」技術を使って、発生期の同一タイミングに誕生する神経細胞の活動を人為的に障害して、マウス個体に生じる神経機能障害のパターンを解析することである。具体的には、マウスの妊娠期間中のある特定のタイミングに誕生する神経細胞に組換えタグづけして、人工リガンド (CNO) 依存的に神経活動を操作できるデザイナー受容体 (DREADD) を発現させる。これらのマウスを成体にまで育てた後、CNO を投与してタグづけされた神経細胞の活動を一気に操作して、その結果マウス個体に出現する神経機能障害を調べる。この解析を通して、神経発生プログラムが作りだす脆弱性が、発達性障害にみられる様々な症状の違いを説明しうるか、という「問い」に対する答えを探った。

3. 研究の方法

図 3 上に示すように、誕生日タグづけマウス系統 Neurog2-G2A と loxp 配列組み換え後にユビキタスプロモーター下で活性化型 DREADD (hm3Dq) または抑制型 DREADD (hm4Di) を発現するマウス系統と交配した。妊娠が確認された母マウスに対して、妊娠 8.5 日目～18.5 日のいずれかの 1 日に TM を腹腔内注射した。これにより、誕生日タグづけされた神経細胞でのみ DREADD タンパク質が発現すると予想される。生まれたマウスを生後 8 週齢まで育ててから、DREADD リガンドである CNO を腹腔内注射して、DREADD を発現する神経細胞の神経活動を一気に操作する。そして神経細胞の活動操作が起きる CNO 投与後 30 分～1 時間以内に、マウス個体に現れる神経機能を測定した。

神経機能症状としては、図 3 下に示すように、体

スケジュール



神経機能テスト項目

Body temperature	Open field test	Pinna reflex
Respiration rate	Rotor rod test	Corneal reflex
Heart rate	Fear conditioning	Righting reflex
Defecation	Hotplate test	Contact righting reflex
Urination	Foot print test	Toe pinch
Pupil diameter	Tail suspension test	Auditory response
Serum corticosterone	Startle response	Visual placing
Food intake	Aggression	Whisker Twitch
Water intake	Vocalization	Touch escape
Salivation	Tameness	Pelvic elevation
Lacrimation	Limb grasping	Abdominal tone
Body length	Wire maneuver	Limb tone
Body weight	Provoked biting	Locomotor activity
Body position	Time before move	Tail elevation
Death	Transfer arousal	Trunk curl

図 3 実験方法

温、呼吸数、心拍数、瞳孔径、ストレスホルモンレベル、摂水餌量などの生理機能から、オープンフィールド、ロータロッド、恐怖条件づけホットプレート、テールサスペンションなどの行動学的試験や、シンプルな反射反応など、さまざまな機能をカバーする約 50 種の計測を行って評価した。TM の注入時期の違う各群 10-20 匹程度、合計約 200 匹のマウスを作成して評価した。

4 . 研究成果

神経細胞の誕生時期と、その神経細胞が障害を受けた時の症状との間に明らかな関係性が認められた。現在、解析の結果得られた仮説について実験生物学的に検討中である。この成果を論文発表したのちに、神経発生タイミングと神経機能障害との関係性について総説の形で発表したいと考えている。人間集団を対象とした疫学的研究ではこのような因果関係は解析できないため、本研究のような実験生物学的な試みは極めて貴重であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Masuda Aki, Nishida Kazuhiko, Ajima Rieko, Saga Yumiko, Bakhtan Marah, Klar Avihu, Hirata Tatsumi, Zhu Yan	4. 巻 10
2. 論文標題 A global gene regulatory program and its region-specific regulator partition neurons into commissural and ipsilateral projection types	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadk2149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adk2149	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 Hirata Tatsumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Olfactory information processing viewed through mitral and tufted cell-specific channels	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neural Circuits	6. 最初と最後の頁 1382626
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2024.1382626	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 Shimojo Yuki, Suehara Kazuki, Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako	4. 巻 17
2. 論文標題 Segmentation of Mouse Brain Slices with Unsupervised Domain Adaptation Considering Cross-sectional Locations	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 IPSJ Transactions on Bioinformatics	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2197/ipsjtbio.17.33	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 Kawabata Hiroto, Shimojo Yuki, Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako	4. 巻 -
2. 論文標題 Large-scale Image Processing and Three-Dimensional Reconstruction of Mouse Brains with Neurogenic-Tagged Neurons	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the 13th International Conference on Biomedical Engineering and Technology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1145/3620679.3620680	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 Banerjee Piu, Kubo Fumi, Nakaoka Hirofumi, Ajima Rieko, Sato Takuya, Hirata Tatsumi, Iwasato Takuji	4. 巻 12
2. 論文標題 Spontaneous activity in whisker-innervating region of neonatal mouse trigeminal ganglion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-20068-z	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 Luo Yuanjun, Chao Yuhan, Owusu-Mensah Richard Nana Abankwah, Zhang Jingyun, Hirata Tatsumi, Sugihara Izumi	4. 巻 13
2. 論文標題 Neurogenic timing of the inferior olive subdivisions is related to the olivocerebellar projection topography	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33497-1	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 Hirata Tatsumi, Tohsato Yukako, Itoga Hiroya, Shioi Go, Kiyonari Hiroshi, Oka Sanae, Fujimori Toshihiko, Onami Shuichi	4. 巻 1
2. 論文標題 NeuroGT: A brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2021.100012	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 Zhang Jingyun, Tran-Anh Khoa, Hirata Tatsumi, Sugihara Izumi	4. 巻 462
2. 論文標題 Striped Distribution Pattern of Purkinje Cells of Different Birthdates in the Mouse Cerebellar Cortex Studied with the Neurog2-CreER Transgenic Line	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 122 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuroscience.2020.07.028	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 Zhu Yan、Hirata Tatsumi、Mackay Fabienne、Murakami Fujio	4. 巻 10
2. 論文標題 Chemokine receptor CXCR7 non-cell-autonomously controls pontine neuronal migration and nucleus formation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68852-z	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 Tran-Anh Khoa、Zhang Jingyun、Nguyen-Minh Viet Tuan、Fujita Hirofumi、Hirata Tatsumi、Sugihara Izumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Common Origin of the Cerebellar Dual Somatotopic Areas Revealed by Tracking Embryonic Purkinje Cell Clusters with Birthdate Tagging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeuro	6. 最初と最後の頁 1-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/ENEURO.0251-20.2020	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 Hatanaka Yumiko、Hirata Tatsumi	4. 巻 8
2. 論文標題 How Do Cortical Excitatory Neurons Terminate Their Migration at the Right Place? Critical Roles of Environmental Elements	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.596708	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21件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平田たつみ
2. 発表標題 神経細胞の誕生日タグづけ法を用いた神経細胞と身体生理表現型との体系的関連づけ
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平田たつみ
2. 発表標題 神経発生の原理を利用した神経科学研究
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会 教育講演（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 畠中 由美子、平田 たつみ
2. 発表標題 神経分化の初期に優勢な間接的ニューロン新生は、直接的ニューロン新生と同様に、誕生日依存的な皮質ニューロンサブタイプの産生を行う
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川端 宏知、下條 優貴、平田たつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 大規模なマウスの脳切片画像の画像処理と三次元再構築
3. 学会等名 第25回 画像の認識・理解シンポジウム（MIRU2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下條 優季、平田 たつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 高解像度なマウス脳画像の領域検出にむけた画像の前後処理法の提案
3. 学会等名 第25回 画像の認識・理解シンポジウム（MIRU2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下條優季、平田 かつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 深層学習による高解像度なマウス脳切片画像の領域検出に向けた画像処理法の提案
3. 学会等名 第11回生命医薬情報学連合大会（IIBMP2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端 宏知、下條 優貴、平田 かつみ、遠里 由佳子
2. 発表標題 NeuroGTのマウス全脳画像の三次元再構築
3. 学会等名 第11回生命医薬情報学連合大会（IIBMP2022）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuanjun Luo, Khoa Tran-Anh, Tatsumi Hirata, Izumi Sugihara
2. 発表標題 Formation of Purkinje cell clusters in the murine embryonic cerebellum
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onami
2. 発表標題 NeuroGT: A brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons
3. 学会等名 第54回日本発生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onam
2. 発表標題 NeuroGT: 神経細胞の誕生日タグづけ用CreERドライバーマウスの脳アトラス
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tatsumi Hirata, Yukako Tohsato, Hiroya Itoga, Go Shioi, Hiroshi Kiyonari, Sanae Oka, Toshihiko Fujimori and Shuichi Onami
2. 発表標題 Launching NeuroGT: a brain atlas of neurogenic tagging CreER drivers for birthdate-based classification and manipulation of mouse neurons
3. 学会等名 北米神経科学学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平田たつみ、遠里由佳子、糸賀裕弥、塩井剛、清成寛、岡早苗、藤森俊彦、大浪修一
2. 発表標題 NeuroGT: 神経細胞の誕生日タグづけ用CreERドライバーマウスの脳アトラス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会、ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 HATANAKA Yumiko、HIRATA Tatsumi
2. 発表標題 The proportion of neurons that generate via indirect neurogenesis is higher during the early stages of mouse corticogenesis
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jingyun Zhang, Khoa Tran-Anh, Tatsumi Hirata, and Izumi Sugihara
2. 発表標題 Birthdate-dependent compartmentalization of the cerebellar cortex in the mouse
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 譚 婉琴, 松股 美穂, 相田 知海, 石久保 春美, 宇佐美 貴子, 田中 光一, 平田 たつみ, 相澤 秀紀
2. 発表標題 遺伝学的標識法による手綱核亜核の神経活動操作
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>“誕生日タグづけ”マウスの脳画像データベース「NeuroGT」を公開 https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2021/05/research-highlights_ja/pr20210525.html NeuroGT https://ssbd.riken.jp/neurogt/</p>
--

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	小出 剛 (Koide Tsuyoshi) (20221955)	国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授 (63801)	マウス行動心理学的解析

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