

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06891

研究課題名（和文）大脳皮質形成における直接/間接分化ニューロンの役割の解析

研究課題名（英文）The Role of Direct and Indirect Neurogenesis in Cerebral Cortex Formation

研究代表者

畠中 由美子（HATANAKA, Yumiko）

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・研究員

研究者番号：40271548

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：大脳皮質ニューロンは、幹細胞から直接分化するものと、中間神経前駆細胞（INP）を経て間接分化によりニューロンになるものがある。本研究ではこの2つの分化様式が皮質形成に果たす役割を解析した。その結果、間接分化は主に深層ニューロンが産生される時に多く、直接分化よりもわずかに若いタイプのニューロンを産生するが、基本的には直接分化と同じ時間軸で分化を進行させていることが明らかになった。また1つのINPからは同タイプのニューロンペアが産生された。これらのことから、間接分化はニューロン数の制御を担いながら、直接分化と協調してニューロンタイプの多様性を構築し、大脳皮質形成に寄与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、間接分化がどのように大脳皮質形成に関与するかを明らかにした。具体的には、間接分化が直接分化と同じ時間軸でニューロンを生み出し、ニューロンの数を倍加させていることを示した。これらは、ニューロンの生成過程や脳の複雑さの増大を考える上で基盤となる新たな生物学的知見であり、大脳皮質の発達や進化を考える上で重要な学術的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Traditionally, cortical neurons were thought to be generated directly from radial glial cells to form cortical layers in an inside-out fashion. However, the discovery of indirect neurogenesis via intermediate neuronal progenitors (INPs) has challenged this view. This study investigated the role of both types of neurogenesis in cortical formation. We found that indirect neurogenesis occurs predominantly during the production of deep layer neurons and generates neuron types that are slightly younger than those generated by direct neurogenesis. Despite the differences in time, both types of neurogenesis produce neurons with similar temporal sequences. In addition, each INP produced pairs of neurons with similar phenotypes. Thus, it appears that indirect neurogenesis works in concert with direct neurogenesis to ensure neuronal diversity and to regulate the number of neurons in the cerebral cortex.

研究分野：神経発生

キーワード：発生・形態形成 大脳皮質 神経幹細胞 ニューロン産生 ニューロンタイプ Neurogenin-2 MADM

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質では、全体の約8割を占める興奮性ニューロンが特定の配置をすることで、領野や6層構造を形成している。大脳皮質の機能を理解するには、これらのニューロンが発生過程でどのように産生され、配置されるのか、その機構を明らかにすることが重要である。これまでの研究で、興奮性ニューロンは皮質脳室帯の幹細胞から分化し、移動して最終的な位置に到達すること、この時、分化するのが遅いニューロンほど大脳皮質の表面に近い場所に分布するという「inside-out」の配置規則に従うことが知られている。一方、近年研究で、ニューロンの分化過程には2つの様式があることが報告された。1つは幹細胞から**直接分化**する様式、もう一つは**間接分化**と呼ばれ、中間神経前駆細胞 (INP) を経て分化する様式である。しかし、これらの違いが生体内でどのように大脳皮質の形成に影響を与えているのかは未解明であった。

2. 研究の目的

本研究では、生体内の直接分化ニューロンと間接分化ニューロンを区別する方法を確立し、発生の時期や、各領野・層構造でその割合がどのように変化するかを明らかにする。また、産生されたニューロンの性質を比較し、これらの分化様式が大脳皮質形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにする (図1)。

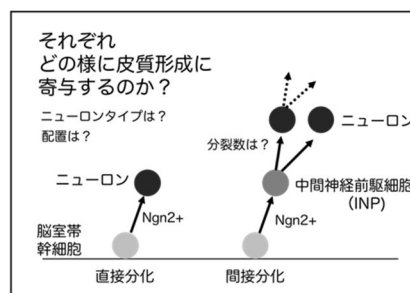


図1 研究の目的

3. 研究の方法

本研究では、Neurogenin-2 CreER (Neurog2CreER) トランスジェニックマウス (G2A 系統、研究協力者の平田たつみ教授より供与) を使用した。ニューロンに分化する細胞では、内在的な *Neurogenin-2* の発現が一時的に高まることが知られている。そのため Neurog2CreER マウスでは、ニューロンへと分化方向が決まった細胞で CreER が発現することが期待された。

直接分化ニューロンと間接分化ニューロンを区別するためには、INP が分裂細胞であることを利用した。具体的には、まず、Neurog2CreER マウスと Ai14 レポーターマウスを交配させ、得られた妊娠マウスに少量のタモキシフェン (TM) を投与することで、CreER を活性化させ (Cre を核内に移行し組換えを引き起こす) 特定の時期の分化ニューロンを tdTomato 蛍光タンパク質で標識した。この方法では、直接分化ニューロンと間接分化ニューロンの両方が標識されるが、この時、同時に EdU (核酸類自体) の取り込みを行わせた。これにより、直接分化ニューロンは “EdU- / tdTomato+” 間接分化ニューロンは “EdU+ / tdTomato+” となることで両者を区別した。

さらに、間接分化を経た INP の娘ニューロン間の関係や大脳皮質形成における役割を調べるため、MADM (mosaic analysis with double markers: モザイク解析法) を用いた。MADM では、細胞分裂の G2 期に Cre が核内に存在すると、低頻度で相同染色体の組換えが生じる。その後の染色体配分時に、娘ニューロンが GFP (緑色蛍光タンパク質) と RFP (赤色蛍光タンパク質) で標識される Z-segregation が起きた細胞について、これらを INP の子孫ニューロンとして調べた。

4. 研究成果

(1) Neurog2CreER マウスにおける Cre 発現の確認

まず、Neurog2CreER トランスジェニックマウスで CreER がどのように発現するかを確認した。妊娠したマウスに高用量の TM を投与し、CreER を核内にとどませた状態で、胎生 13.5 日目 (E13.5) の仔マウスの CreER の分布について、抗 Neurognin-2 抗体を用いて調べた。その結果、CreER は幹細胞が存在する脳室帯 (VZ) と脳室下帯 (SVZ) の一部の細胞で発現しており、これらの細胞の大部分は、内在的に Neurogenin-2 を発現する細胞と重なっていた。また、SVZ の CreER 陽性細胞には、細胞分裂のマーカーである phospho-histone H3 陽性細胞も含まれていた。このことから、Neurog2CreER マウスは、Neurogenin-2 を発現する細胞で CreER を発現することが確認できた。

(2) 中間神経前駆細胞とその子孫を標識する方法の確立

TM は体内で 4-ヒドロキシ-TM (4TM) に代謝されて活性型となる。特定の時点で短時間だけ組換えを起こすため、低用量の 4TM を尾静脈から投与し、迅速に CreER を活性化させた。妊娠 12.5 日目の母マウス (Neurog2CreER: Ai14) に 4TM を 2 µg/g (body weight, BW) の用量で投与したと

ころ、Cre は速やかに活性化後 4 時間以内に不活性化し、組換えの誘導も確認できた。また INP とその子孫を追跡するために EdU を投与するが、EdU には毒性があるため、その影響を最小限に抑えつつ分裂後のこれら細胞を十分に標識するための用量と投与回数を検討した。その結果、EdU を 10 $\mu\text{g/g}$ BW の用量で、4 時間毎に E13.5 からは 3 回、E15.5 からは 5 回投与することで、細胞死を抑えつつ、INP とその子孫を標識できることがわかった。

(3) 間接分化の割合は神経新生初期に多い

神経が産生される期間を通して、間接分化の割合がどのように変わるかを調べるため E13.5 から E15.5 まで、半日ごとに 5 つの時間を設定し、各設定時間ごとに 4TM と EdU を投与した妊娠マウスを用意した。解析はこれらのマウスから得られた生後 1 日齢の仔マウスで行った。大脳皮質は領野ごとに層構造が異なりニューロンの産生時期にも差があるので、5 つの領野を解析対象とした。解析時には、Ctip2 に対する抗体染色も行い、領野や層構造を同定するとともに、標識ニューロンが皮質外投射ニューロンであるかどうかを確認した。

CreER による組換えで標識された tdTomato+細胞は、深層から浅層へと、基本的にはインサイドアウトのパターンで分布していた。EdU+細胞も基本的にはインサイドアウトのパターンで分布していたが、E14.5 以降では tdTomato+細胞よりも浅い位置に分布するものが多く、2 つの細胞の分布には乖離が見られた。定量的な解析の結果、いずれの領野でも神経新生の期間を通して間接分化は起こっているが、特に神経新生初期に間接分化ニューロンの割合が多く、深層ニューロンの産生により深く関わっていることがわかった。

(4) 間接分化は特定のニューロンタイプを産生するのではない

間接分化は深層ニューロンが産生される時期に多いことがわかったが、深層ニューロンのタイプは複数ある。間接分化が特定のタイプの深層ニューロンの産生に関わるか否かを調べるため、E14.0 で標識されるニューロンを 5 層および 6 層、さらに Ctip2 陽性 (皮質外) と陰性 (皮質内投射) の 4 タイプに分類し、間接分化ニューロンの割合を比較した。その結果、いずれのタイプのニューロンも、ほぼ同じ割合で間接分化ニューロンを含んでいた。これにより、間接分化はニューロンタイプではなく、時期によってその割合が変わることがわかった。

(5) 同時期に標識される直接および間接分化ニューロンの違い

4TM の投与により、同時期にニューロン分化が始まった細胞に焦点をあて、直接分化と間接分化ニューロン間の細胞タイプの比較を行った。解析は第一次体性感覚野前方で行った。この比較では、深層ニューロンが主に産生される E13.5 から E14.5 の約 24 時間をさらに細かく 5 つに区切り、各タイムポイントで標識されたニューロンタイプを生後 1 日目に調べた。その結果、5/6 層と内/外側投射で分けたニューロンタイプの組成は類似していたが、間接ニューロンは直接ニューロンよりも若いタイプのニューロンの割合がやや高いことがわかった。また、皮質の深さ方向の分布を調べたところ、間接分化ニューロンの方が表層に近く分布し、やはり若いニューロンタイプであることを示していた。しかし、5 つのタイムポイント全体を俯瞰すると、これらニューロンタイプは、どちらの分化様式でも同じ時間軸に沿って産生されていた。

(6) 間接分化を経て INP は類似したペアニューロンを産生する

間接分化ニューロンの割合が多い深層ニューロン産生時に焦点をあて、MADM マウスを用いて INP 由来の娘ニューロンを標識した。娘ニューロンとして標識された GFP+および RFP+細胞の解析から、INP は主に 1 回分裂して近接するペアニューロンに分化することがわかった。これらのペアニューロンは初期投射が同じであり、生後 3 週齢の時点でも形態的に類似していた。これにより、間接分化は同じタイプのニューロン数を倍加していることが示された。

(7) まとめ

以上の結果から、間接分化は神経新生の期間を通して起こるが、特に初期にその割合が高いことがわかった。また、直接分化ニューロンと比較すると、間接分化ニューロンはやや若いタイプのニューロンに分化していた。しかし、時間軸にそって両者のニューロンタイプを比較すると、どちらも同じ時間軸上で、同様なタイプのニューロンを産生していることが判明した。さらに、INP からは類似したペアニューロンが産生されることが明らかになった。よって、間接分化は直接分化と協調し、特に深層皮質ニューロンの多様性を確保し、さらにその数を調整することで皮質構造形成に寄与していることが考えられた (図 2)。

本研究では、皮質形成における間接分化の役割が明らかになったが、今後の重要な課題として、なぜ幹細胞から直接分化でなく間接分化が選ばれるのか、そのメカニズムを解明することが挙

げられる。また、進化するにつれ浅層ニューロンの割合が高くなることが知られているが、進化した動物において間接分化ニューロンの割合がどのように変わるのか、さらに、1つのINPから生じる娘細胞の数に変化があるか否かなど、脳の進化における間接分化の役割を解析することで、大脳皮質の進化について新たな情報を得ることが期待される。

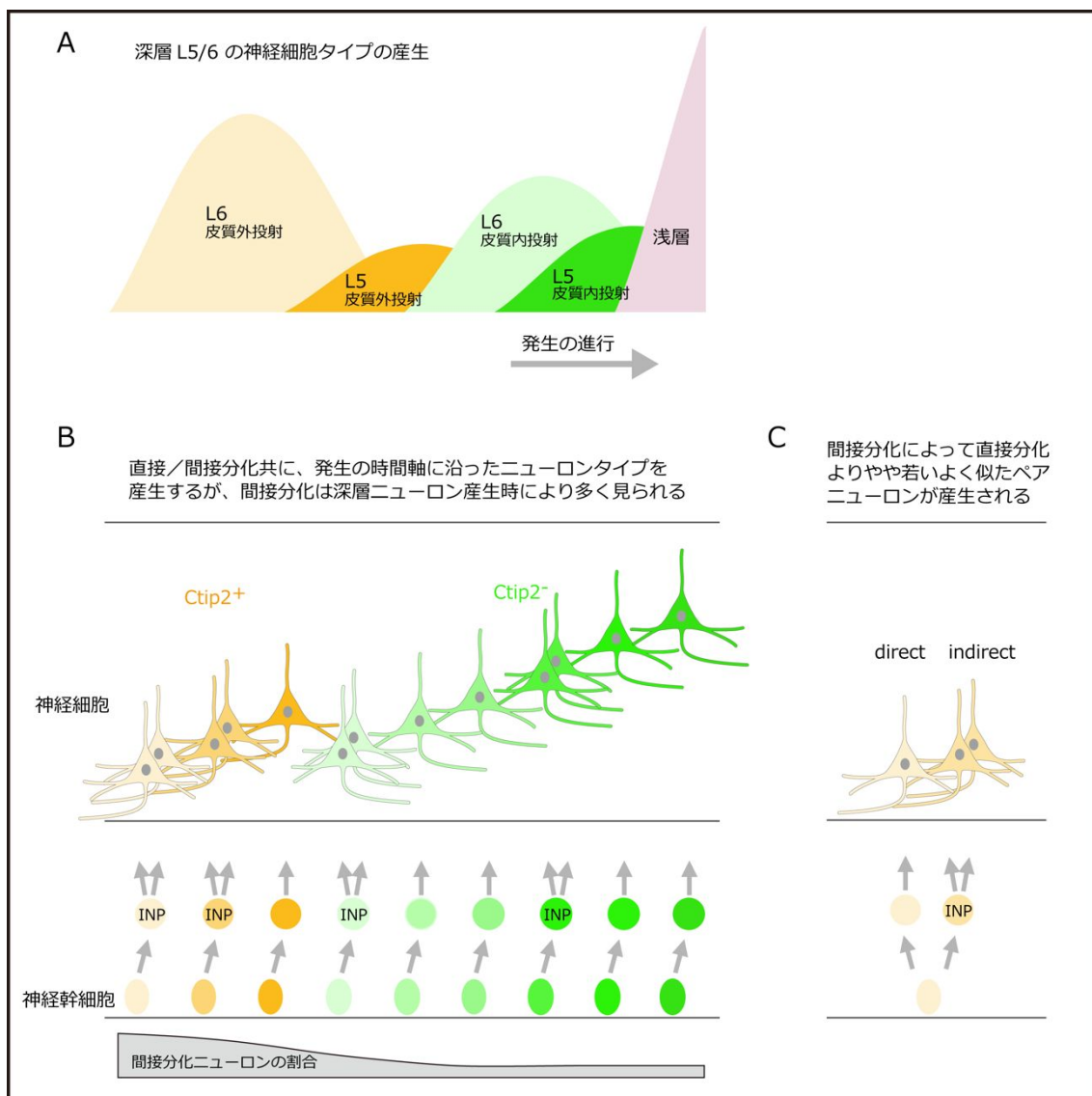


図2 まとめ

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 1件）

1. 著者名 Yumiko Hatanaka and Tatsumi Hirata	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 596708
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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 畠中由美子、平田たつみ
2. 発表標題 Indirect neurogenesis prevailing in the early stage generates the birth-order-dependent excitatory cortical neuron subtypes that are similar to direct neurogenesis
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 Yumiko Hatanaka
2. 発表標題 Indirect neurogenesis produces cortical neurons in a time-dependent manner and its proportion is high at the early stage of corticogenesis
3. 学会等名 Development and Plasticity of the Brain（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 畠中由美子 平田たつみ
2. 発表標題 The proportion of neurons generated via indirect neurogenesis is high in the early stage of mouse corticogenesis
3. 学会等名 日本神経科学学会
4. 発表年 2021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
研究協力者	平田 たつみ (Hirata Tatsumi)		
研究協力者	川口 泰雄 (Kawaguchi Yasuo)		

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