

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02591

研究課題名（和文）多階層的比較解析による興奮性神経細胞の進化起源の解明

研究課題名（英文）Multi-level analyses for exploring evolutionary origin of excitatory neurons

研究代表者

野村 真（NOMURA, TADASHI）

京都工芸繊維大学・応用生物学系・教授

研究者番号：10323007

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000 円

研究成果の概要（和文）：今回の研究成果により、哺乳類大脳皮質を構成する興奮性神経細胞の発生と神経回路形成メカニズムが羊膜類において普遍的に存在していることが確認された。特に、有胎盤類にしか存在しない脳梁の発生プロセスが、脳梁が形成されない爬虫類や鳥類にも備わっていること、Satb2が神経細胞の分化や軸索伸長だけでなく、半球間の融合というダイナミックな組織形成にも関与していることを見出した。こうした成果より、哺乳類大脳皮質を構成する興奮性神経細胞の萌芽的発生プログラムは羊膜類の共通祖先ですでに獲得したこと、こうした祖先的発生プログラムが土台となって、哺乳類独自の皮質構造や神経回路が形成されていったことが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大脳皮質の機能発現に重要な役割を果たす層特異的神経回路が進化の過程で一体いつ出現し、どのような過程を経て現在の哺乳類の皮質投射パターンが完成したのか、その過程にどのような遺伝子の機能が関与していたのか、という問題は、19世紀以降の神経解剖学分野の大きな謎として残されていた。今回の研究成果により、大脳皮質の解剖学的特徴に寄与する発生プログラムの起源と進化に関する興味深い知見を得ることができた。この成果は現在の神経科学の大きなテーマの1つである「ヒトの脳の進化起源」の理解に大きく貢献することが期待される。さらに、脳梁欠損などのヒト先天性疾患の病態理解や早期診断にも重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：The results of this study confirm that the mechanisms of excitatory neuron development and neural circuit formation that constitute the mammalian cerebral cortex are universally present in amniotes. In particular, we found that the developmental process of the corpus callosum, which exists only in amniotes, also found in reptiles and birds. Furthermore, we identified that Satb2 is involved not only in neuronal differentiation and axonal outgrowth but also in dynamic tissue remodeling, such as fusion between hemispheres. These results suggest that the common ancestor of amniotes had already acquired the developmental program of cortical excitatory neurons, and that this ancestral developmental program was the basis for the formation of mammalian-specific cortical structures and neural circuits.

研究分野：神経発生学

キーワード：大脳皮質 哺乳類 興奮性神経細胞 羊膜類 神経回路 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む哺乳類の大脳皮質は哺乳類特異的な高次脳機能を司る最上位中枢である。大脳皮質内部には6層の層構造が形成され、特に第2層から6層は特徴的な形態と入力・出力パターンを持つ構成する興奮性の神経細胞(錐体細胞)で構成されている。視床からの感覚入力線維は主に大脳皮質の第4層を構成する星状細胞に投射する。その後、第4層から第2/3層を含む各層へと伝達された情報は皮質内の局所回路で処理されたのち、第5層の錐体細胞に送られる。第5層の錐体細胞は大きな細胞体と太い尖端樹状突起を持ち、対側皮質および線条体や橋核など皮質外の標的に神経投射を行う。近年、大脳皮質の層特異的な神経細胞に発現する転写因子が数多く同定されており、大脳皮質の神経細胞サブタイプに特異的な遺伝子発現が明らかとなっている。一方、こうした大脳皮質の機能発現に重要な役割を果たす層特異的な神経回路が進化の過程で一体いつ出現し、どのような過程を経て現在の哺乳類の皮質投射パターンが完成したのか、その過程にどのような遺伝子の機能が関与していたのか、という問題は、19世紀以降の神経解剖学分野の大きな謎として残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、網羅的な神経軸索標識による神経回路網の種間マッピングと、1細胞遺伝子発現解析およびVisiumによる空間的遺伝子発現解析のデータを統合することにより、爬虫類や鳥類の背側皮質(背側外套)における神経細胞サブタイプの特性を形態と分子の両側面から明らかにすることを目標とした。近年の比較遺伝子発現解析の結果から、哺乳類大脳皮質の層特異的な遺伝子の発現は爬虫類や鳥類の背側皮質(背側外套)でも保存されていることが示されている。一方、背側皮質を構築する神経細胞に関してはそれぞれの神経細胞サブタイプがどのような形態学および遺伝子発現の特性を持ち、種特異的な神経回路形成に寄与しているのか、未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、申請者が独自に開発した胚操作と遺伝子導入技術を用いて、神経軸索の網羅的な標識解析により爬虫類、鳥類の背側外套を構成する興奮性神経細胞の形態と軸索投射様式を明らかにすることを目標とした。さらに、Visium空間的遺伝子発現解析によって位置情報が付加された遺伝子発現データを統合することにより、爬虫類、鳥類大脳を構成する神経細胞の遺伝子発現様式や軸索投射パターンを解析することを目指した。こうした解析により、羊膜類に共通した神経回路形成メカニズムを解明することで、哺乳類大脳皮質を構成する層特異的な神経細胞の起源や神経回路の進化過程を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

【爬虫類および鳥類背側外套における神経軸索投射様式の解析】

爬虫類および鳥類の背側皮質を構成する神経細胞がどのような軸索投射様式を持つのかを解析するため、ソメワケササクレヤモリ、スッポン、ニワトリ胚を対象として、発生中の背側皮質(外套)への脂溶性色素の注入、GFPを発現するプラスミドベクターの電気穿孔法による遺伝子導入、あるいはアデノ随伴ウイルスの導入をおこなった。

【爬虫類および鳥類背側外套の組織化学的解析】

爬虫類および鳥類の背側皮質の半球間結合様式を解析するため、ソメワケササクレヤモリ、スッポンおよびニワトリの異なるステージの胚を採取しパラフィン切片を作製したのち、詳細な組織学的解析を行なった。また比較解析のため異なるステージのマウス胚を採取し、同様に組織化学的解析を行なった。

【鳥類大脳における空間的遺伝子発現解析】

Visium空間的遺伝子発現解析を行うため、東京都医学総合研究所の丸山千秋博士、隈元拓馬博士と共同研究を行い、ニワトリ胚大脳における網羅的な遺伝子発現解析のデータから神経細胞サブタイプを規定する遺伝子の発現様式を解析した。

【神経細胞サブタイプ特異的な遺伝子を破壊した爬虫類の作製と表現型解析】

哺乳類大脳皮質を構成する神経細胞サブタイプに特異的な遺伝子の機能を種間で比較するため、理化学研究所BDR・清成寛博士との共同研究により皮質層特異的な遺伝子を破壊したソメワケササクレヤモリ胚を作製した。

4. 研究成果

【爬虫類および鳥類背側外套における半球間交連神経線維の同定】

ソメワケササクレヤモリ、スッポン、ニワトリ胚の脳皮質領域に蛍光タンパク質を発現するベクターを導入して神経軸索を可視化したところ、多様な神経回路を同定することができた。特に、爬虫類、鳥類の背側皮質（背側外套）から内側に伸張し、大脳中隔野に向かう神経軸索については、爬虫類、鳥類ともに確認できた。爬虫類では、これらの神経軸索は大脳正中部の融合領域を通過し対側の皮質へと投射する、いわゆる pallial commissure を形成していた。鳥類では、DVR および嗅皮質を標識した場合、半球間結合として前交連および手綱交連が確認された。一方、鳥類の背側外套を標識すると、標識軸索は中隔野に伸長するが対側への投射は見られず、標識線維はそのまま同側の脳を下降していた。爬虫類における pallial commissure は、解剖学的、発生学的な観点から、有胎盤哺乳類の大脳皮質を繋ぐ線維である脳梁に類似することが明らかとなった。また鳥類外套から伸長する神経線維の一部は脳梁と類似しているが、対側への投射が見られない点で、他の羊膜類とは異なる発生プログラムに依存していることが示唆された。

【爬虫類および鳥類の大脳半球融合の融合過程の解析】

哺乳類の大脳皮質を繋ぐ脳梁の発生過程では、まず左右の大脳半球の組織的な融合が起こる。そこで、爬虫類、鳥類の半球間融合の過程について、パラフィン切片を作製し詳細に検討した。その結果、ソメワケササクレヤモリ、スッポン、ニワトリのいずれの胚においても、半球間の融合が起こることが確認された。哺乳類の大脳融合過程では、大脳正中部に存在する特殊な放射状グリア細胞やアストロサイトが重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、爬虫類や鳥類の大脳にもこうした細胞群が存在するかについて、GFAP や Vimentin などに対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ソメワケササクレヤモリ、スッポン、ニワトリの大脳にもこうした細胞群が存在していることが明らかとなった（図1）。

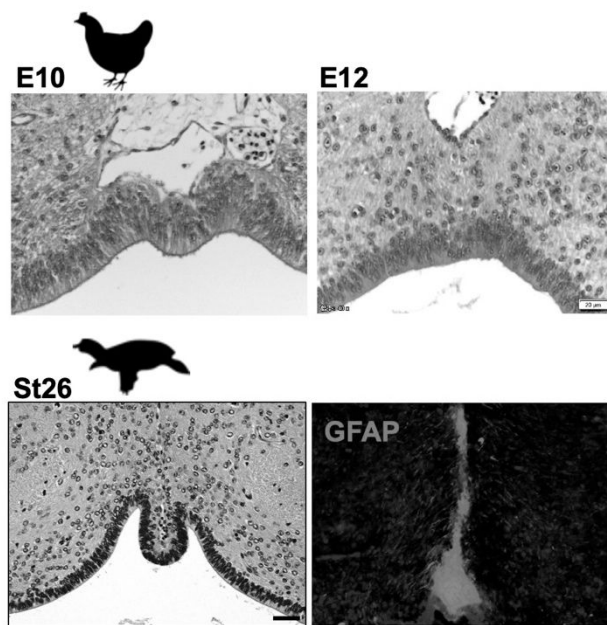


図1 ニワトリ、スッポン胚大脳における半球間融合

【鳥類大脳における空間的遺伝子発現解析】

東京都医学総合研究所の丸山千秋博士、隈元拓馬博士らから、ニワトリ胚大脳における網羅的な遺伝子発現解析のデータの提供を受け、特に半球間結合に関わることが報告されている遺伝子群についての発現解析を行った。その結果、哺乳類大脳皮質の上層神経細胞に発現する Satb2、哺乳類で脳梁の発生に関わる Slit、Neuropilin、Draxin などが鳥類の外套にも発現していることが明らかとなった。

【神経細胞サブタイプ特異的遺伝子を破壊した爬虫類の作製と表現型解析】

Satb2 は哺乳類大脳皮質の脳梁形成に重要な役割を果たす遺伝子として知られている。我々の解析により、爬虫類や鳥類の大脳にも Satb2 陽性細胞が存在することが明らかとなっている。そこで、哺乳類以外の羊膜類の大脳神経回路形成における Satb2 の機能を探るため、理化学研究所 BDR・清成寛博士との共同研究により Satb2 遺伝子を破壊したソメワケササクレヤモリ胚を CRISPR/Cas9 を用いて作製した。作製された Satb2 遺伝子破壊ヤモリは上顎正中部の形成異常、下顎の低形成、眼瞼異常などを示し、これらの表現型の一部は Satb2 遺伝子破壊マウスの表現型と類似していた。さらにパラフィン切片を作製し脳形態を詳細に検討した結果、Satb2 遺伝子破壊ヤモリでは大脳正中部の融合不全、それにとまなう大脳交連線維(Pallial commissure)の形成不全が確認された（図2）。

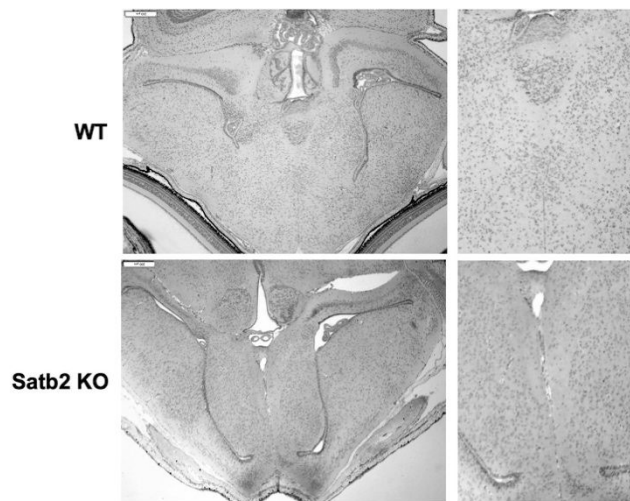


図2 Satb2KO ヤモリにおける大脳半球融合不全

一連の研究成果により、哺乳類大脳皮質を構成する興奮性神経細胞の発生と神経回路形成メカニズムが羊膜類において普遍的に存在していることが確認された。特に、哺乳類（有胎盤類）にしか存在しない脳梁の発生プロセスが、脳梁が形成されない爬虫類や鳥類にも備わっていること、Satb2 が神経細胞の分化や軸索伸長だけでなく、半球間の融合というダイナミックな組織形成にも関与していることを見出した。こうした成果より、哺乳類大脳皮質を構成する興奮性神経細胞の萌芽的発生プログラムは羊膜類の共通祖先ですでに獲得されており、哺乳類の進化の過程でこうした祖先的発生プログラムが土台となって、哺乳類独自の皮質構造や神経回路が形成されていったことが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nomura Tadashi, Gotoh Hitoshi, Kiyonari Hiroshi, Ono Katsuhiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell Type-Specific Transcriptional Control of Gsk3 in the Developing Mammalian Neocortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2022.811689	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 Tadashi, Nagao Kohjiro, Shirai Ryo, Gotoh Hitoshi, Umeda Masato, Ono Katsuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Temperature sensitivity of Notch signaling underlies species-specific developmental plasticity and robustness in amniote brains	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-27707-5	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 野地亮太、野村真	4. 巻 56
2. 論文標題 爬虫類を用いた進化医学的アプローチ -非モデル生物を用いた分子遺伝学の確立-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STUDIA HUMANA et NATURALIA	6. 最初と最後の頁 55-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 野村真	4. 巻 40
2. 論文標題 温度依存的なNotchシグナルの制御による種特異的な脳構築	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1304 ~ 1309
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18958/7013-00003-0000142-00	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 Agata Ako, Ohtsuka Satoshi, Noji Ryota, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko, Nomura Tadashi.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Neanderthal/Denisovan GLI3 variant contributes to anatomical variations in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1247361	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14件(うち招待講演 5件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野村真、後藤仁志、清成寛、小野勝彦
2. 発表標題 哺乳類大脳皮質の発生と進化におけるGsk3 の細胞種特異的な転写制御
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿形亜子、後藤仁志、小野勝彦、野村真
2. 発表標題 ネアンデルタール人GLI3バリエントは多様なヒト表現型に寄与する
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野地亮太
2. 発表標題 哺乳類大脳半球を繋ぐ交連線維「脳梁」はどのようにして進化したのか？
3. 学会等名 京都4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 哺乳類の解剖学的特徴の進化に寄与した発生メカニズムの解明
3. 学会等名 東京都医学総合研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野地亮太
2. 発表標題 脳梁の進化過程における保存された発生学的基盤
3. 学会等名 第16回神経発生討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nomura Tadashi, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko
2. 発表標題 Species-specific brain morphology is associated with spatial differences in Shh inputs
3. 学会等名 Neuro2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 温度依存的なNotch シグナルの制御と脳の発生・進化
3. 学会等名 Biothermology workshop（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野地亮太、隈元拓馬、後藤仁志、丸山千秋、小野勝彦、野村真
2. 発表標題 脳梁の進化過程における保存された発生プログラム
3. 学会等名 第46回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村真、野地亮太、後藤仁志、小野勝彦
2. 発表標題 ニックヘッジホッグシグナルの時空間的制御は羊膜類における種特異的な脳形態の基盤となる
3. 学会等名 第46回日本神経科学学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 Shh/GLI3シグナリングの微調整は哺乳類の解剖学的特徴の基盤となる
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会シンポジウム「脳発生進化研究の最前線」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野村真
2. 発表標題 発生工学的アプローチによるヒト先天性異常の病態解明
3. 学会等名 京都工芸繊維大学応用生物学系主催 第46回KITライフサイエンスセミナー「異分野融合による生体機能の解明から医薬品開発まで」(招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nomura Tadashi
2. 発表標題 Genetic and developmental bases of human anatomical evolution and disease
3. 学会等名 KIT-ASEAN Symposium 2024 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Noji Ryota, Kiyonari Hiroshi, Kaneko Mari, Abe Takaya, Kumamoto Takuma, Gotoh Hitoshi, Maruyama-Ohtaka Chiaki, Ono Katsuhiko, Nomura Tadashi.
2. 発表標題 Conserved developmental processes in amniote brains underlie the evolution of the corpus callosum
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Nomura Tadashi, Gotoh Hitoshi, Ono Katsuhiko
2. 発表標題 Species-specific brain morphology is associated with spatial differentiation in Shh inputs
3. 学会等名 Neuro2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>温度環境によって変化する脳の発生メカニズムを解明 https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2022/files/29442.pdf CORTICAL EVOLUTION GROUP https://tadnom.jimdo.com 京都府立医大プレスリリース「温度環境によって変化する脳の発生メカニズムを解明」 https://www.kpu-m.ac.jp/doc/news/2022/files/29442.pdf 京都工芸繊維大学プレスリリース「応用生物学系 野村真 教授らの研究グループは、ネアンデルタール人が持っていたタンパク質が骨格の変化をもたらすことを発見しました」 https://www.kit.ac.jp/2023/11/news231102/</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
研究協力者	丸山 千秋 (Maruyama-Ohtaka Chiaki)		
研究協力者	隈元 拓馬 (Kumamoto Takuma)		
研究協力者	清成 寛 (Kiyonari Hiroshi)		

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