

## 脳神経回路の発達と障害のメカニズムの解明

公益財団法人東京都医学総合研究所 脳神経回路形成プロジェクト  
丸山 千秋

脳は数百億の神経細胞(ニューロン)やグリア細胞からなり、認知、記憶、判断などの活動を担う。大脳新皮質は哺乳類独自の構造で、6層内に同種の細胞が精緻に配置される。これらのニューロン間に神経回路が形成される。この大脳新皮質形成のメカニズムに関して、“サブプレートニューロン”と呼ばれる大脳発生期に最初に生まれ、自発神経活動をする細胞群が脳神経回路の構築に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつある。神経上皮細胞の幹細胞から次々に生まれ、正確な行き先まで移動後配置される新生ニューロンは、なぜ自分の行き先へとスムーズに移動できるのか？その一端が申請者の研究で明らかになった。サブプレートニューロン (SpN) が、後から生まれるニューロンに、シナプス伝達を介した信号を送ることで移動を促していた。SpN はこの他、視床-皮質連絡の確立や脳溝形成等重要な機能を果たしている。また、生後 SpN は細胞死により大部分が失われるが、6層の下部に白質細胞として残存する割合の高さと自閉症の関連も報告されている。しかし早期の分子マーカーや、神経活動の特徴など未解明である。そこで、本研究は SpN の大脳新皮質形成、機能における役割の解明を通して脳構築や発達障害発症のメカニズムの包括的な理解を目指した。

### 研究計画の概要と結果

#### 研究計画 1 : SpN のサブタイプと発生起源の同定

SpN の細胞集団は均一でなく、サブタイプがあることが報告されている。しかし詳細な遺伝子発現プロファイルは未解明である。さらに胎生期のマーカーは未同定のため、その発生起源やサブタイプによる役割分担、また細胞死で消失するものと残存するものの違い等大部分が未解明であった。そこで、Lpar1-EGFP TG マウスおよび NeuroD1-CreERT2/Ai14 マウスの SpN (各 GFP 陽性および td-Tomato 陽性) を FACS sorting で分取し、シングルセル RNA-seq 後、単独データおよび統合データを用いてクラスタリング解析を行なった。さらに Visium 空間的遺伝子発現解析も行い、場所情報を持った Visium データの各スポットとシングルセルデータのクラスターでどれが最も相関が高いかを計算し、最終的に SpN の胎生期の分子マーカーを同定した。絞り込んだ 33 遺伝子のうち 8 遺伝子は自閉症に関連することが知られている遺伝子であった(図 1)。この結果は SpN のダイナミクス障害と自閉症発症に関連性があることをサポートする結果となった。

#### 研究計画 2 : SpN 数を操作した際の脳神経回路形成への影響の解析(図 2)

SpN の自発神経活動は新生児大脳皮質における初期のネットワーク活動の生成に深く関与している。ヒトでは、SP 層は受胎後 20 週から 30 週令が最も厚く、生後は SpN の大部分は 1 ヶ月以内に細胞死する。しかし自閉症患者ではその残存数が高い。そこで、SpN 数を操作するマウスを作出することを試みた。

Ablation には、SpN 特異的に Cre を発現する Tg マウス系統(CTGF-Cre、D1B-Cre)を DTR(ジフテリア毒素受容体)flox マウスと交配し、E10 でタモキシフェン投与により SpN で Cre と DTR の発現を誘導した後、E14, 15 で DT を投与し、P0 で回収して SpN が減少するかどうかを定量した。その結果、50mg/kg 体重の dose で DT を打つと約 1/3 まで SpN が減少し、SpN 減少マウスの作出に成功した(図 2)。今後はこの動物を用いて大脳皮質の層構造や回路形成への影響、行動に変化が出るのかどうか等について解析していく。

### 研究計画 3: 脳波からみた SpN のダイナミクスと発達障害のメカニズム

SpN が生成する脳波は、ヒトではデルタブラッシュ、げっ歯類では紡錘波群発と呼ばれ、SP 層の退縮とともに消失する。早産児ではその消失度合いと 18 ヶ月時点での発達指数に有意な相関がある。そこで名古屋大学、東京大学との共同研究で、脳発達とサブプレート層の関係について考察する。マウスにおいても脳波計測を行い、野生型、SpN 数制御マウスについて紡錘波群発の出現頻度を明らかにする。脳波測定が困難な場合は、脳スライス標本作製し、コリン作動薬投与により発生する Spindle burst への影響を評価する。さらにこのマウスの行動解析を行い、発達障害のモデルマウスとなるか検討する。以上の解析結果を総合し、最終的にはニューロンネットワークの発達モデルを構築する。以上の予定であった研究計画に関しては先の DTR/DT の系を用いた SpN の ablation の条件決定に時間がかかったため、計画通りには進まなかった。

全体をまとめると、SpN の胎生期のマーカーの同定と SpN 減少マウス作製の条件を決定できた。これらの結果は、SpN の機能解明を通して脳発達とその障害のメカニズムを考える上で非常に重要な基礎データとなり得る。これをもとに今後はさらに本研究を発展させ、脳発達と障害のメカニズムを理解していくとともに、その治療応用に向けての基盤をより充実させていきたい。

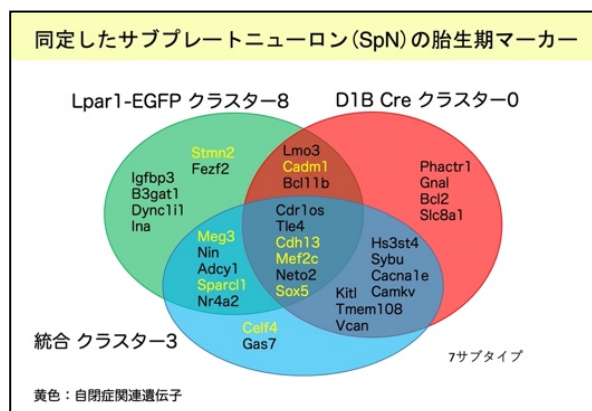


図 1. 胎生期サブプレートの新規分子マーカー

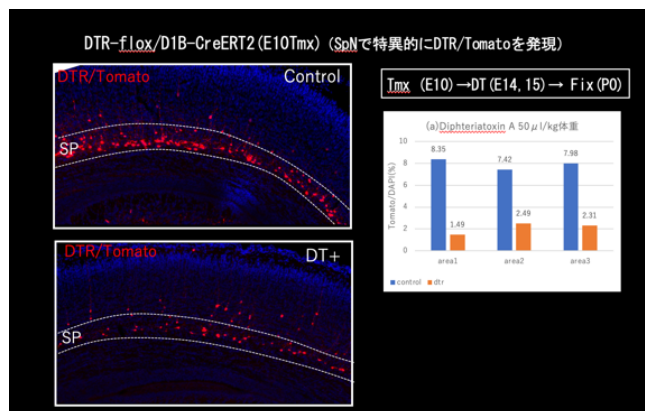


図 2. DT による SpN の ablation