

霊長類の大脳皮質が大きくなった機構の解明

熊本大学・発生医学研究所・脳発生分野
島 山 淳

1. 目的

ヒトは高度な知能を持っており、この「他の動物との明らかな違い」は脳に起因する。霊長類の脳では、大脳皮質を著しく拡大させており、進化の過程で、ニューロンの数、ニューロンを支えるグリア細胞の数を莫大に増大させた。そのために、ヒトを含む霊長類では、神経幹細胞はマウスなどに比してより多く分裂し、長い期間を神経分化に費やさなくてはならない。神経発生の基本原理は、ほ乳類間でほぼ同じと考えられているが、種間の脳の違いがいかに形成されるのか、脳の大きさの「違い」を生み出す機構は何なのか、まだほとんどわかっていない。本研究では、神経幹細胞の高い増殖能力、ニューロン産生の長期持続を、霊長類の脳でいかに可能にして脳を大きくしたのか、即ち「霊長類の大脳皮質が大きくなった機構」を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

「マウス」と「ヒトまたはカニクイザル」を比較すると、霊長類の発生期の脳では、脳脊髄液を産生する器官である脈絡叢が非常に発達している（図1）。脳脊髄液中には、脈絡叢由来の増殖因子が多く含まれていることが知られおり、脈絡叢由来の増殖因子の違いが種間の脳の大きさに影響することが想定される（Johansson PA. 2014）。本研究では、脈絡叢由来の種間の因子の違いに着目し、脳発生における霊長類に特有の脈絡叢由来の因子の機能解析を行った。申請者は、マイクロアレイ解析により、「大脳皮質には発現せず脈絡叢に発現する分泌因子」をカニクイザル胚で探索した。そして、マウス胚の脈絡叢にはほとんど発現しておらず、カニクイザル胚の脈絡叢に特異的に発現する分泌因子を複数同定していた。本研究では、マイクロアレイで同定した因子が霊長類の脳の拡大に関わるのかどうか、以下の実験を遂行し検証した。

- 1) 定量PCR、in situ hybridization法、及び免疫染色法による発現の確認
- 2) human Neural stem cells を用いたタンパク質添加によるヒトの神経幹細胞に対する機能解析
- 3) mouse neurosphere を用いたマウスの神経幹細胞に対する効果の解析
- 4) 候補因子タンパク質のマウス胚脳室への注入による機能解析

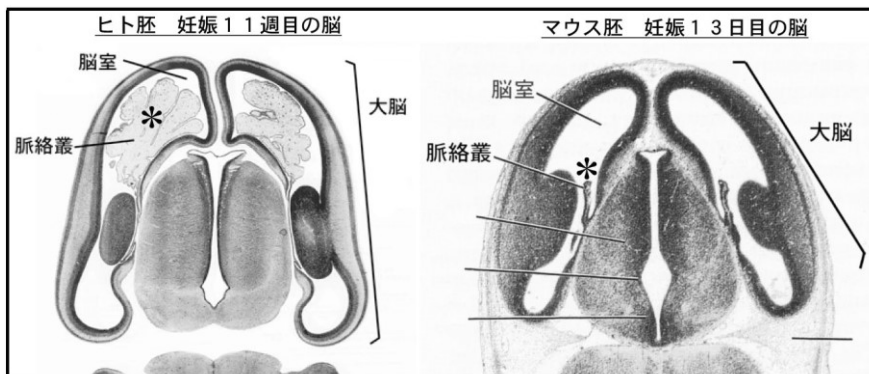


図1 ヒトとマウス胚の脳の水平断面
ヒト胚の脳ではマウスと比較して脈絡層が発達している。

3. 結果

- 1) 定量PCR、in situ hybridization法、及び免疫染色法による発現の確認

まず、マイクロアレイ解析の結果を確かめるために、候補因子の発現を定量PCRで検討した。その結果、候補因子の多くは、サルの脈絡叢で特異的もしくはより強く発現していることが確認できた。

次に、発現領域を確認するために、in situ hybridization法または免疫染色法にて発現領域の確認を行った（図2）。そして、マウス胚の脈絡層では発現がない、もしくは少なく、カニクイザル胚の脈絡層に

特異的に発現しており、増殖因子として機能することが予想される候補因子を3つに絞り込んだ。以下、この3つの候補因子を、便宜上X、Y、Zと呼ぶ。

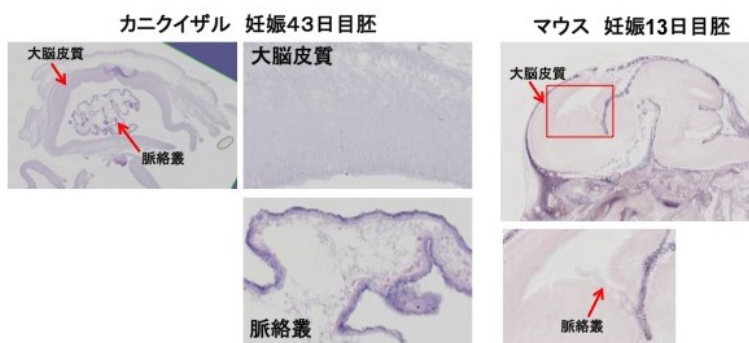


図2 候補因子Yの発現解析

サル胚の脈絡叢上皮細胞に特異的な発現がある。サル胚の大脳皮質、マウス胚の大脳皮質、脈絡叢にはほとんど発現していない。

2) human Neural stem cellsを用いたタンパク質添加によるヒトの神経幹細胞に対する機能解析

次に、3つの候補因子に対して、機能解析を行った。まず、候補因子が霊長類の神経幹細胞に対して増殖の作用があるのかどうか検討するために、human ES細胞由来のhuman Neural Stem cells (hNSC) を用いて、細胞増殖の解析を行った。hNSCの培養液中に、候補因子のタンパク質を添加し、3日後に細胞がどれくらい増えているか計測した。その結果、いずれの因子も、コントロールに対して、hNSCに対して有意に増殖を促進することが明らかとなった(図3)。

3) mouse neurosphereを用いたマウスの神経幹細胞に対する効果の解析

これらの候補因子がマウスの神経幹細胞に対しても増殖を促進するのかどうか検討するために、マウス妊娠11日目胎仔の脳から神経幹細胞を取り出し、neurosphereを形成して、それに候補因子XとYの精製タンパク質を添加した。その結果、候補因子Xのタンパク質を添加すると、コントロールと比較してneurosphereが有意に大きくなり、増殖を促進することが明らかとなった。一方、候補因子Yは、コントロールと比較して有意な差は見られなかった。候補因子Zに関しては、精製タンパク質の準備ができ次第、検討を行う予定である。

4) 候補因子タンパク質のマウス胚脳室への注入による機能解析

mouse neurosphereに対して増殖を促進することが明らかとなった候補因子Xについて、マウス胎仔の脳においても神経幹細胞の増殖を促すのだろうか。それを検討するために、マウスの妊娠12日目の胎仔大脳の脳室に精製タンパク質を注入し、2日後に大脳皮質の発生にどのような影響があるか解析を行った。Pax6陽性の神経幹細胞を比較したところ、その数が増え、神経幹細胞が分布する脳室帯が肥厚していること、大脳皮質の大きさも大きくなっていることが確認された(図4)。

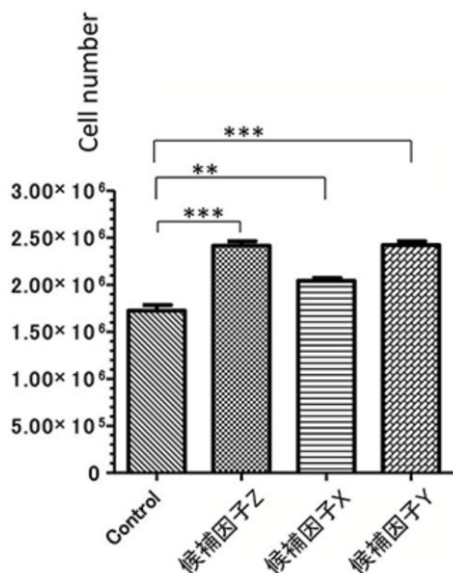


図3 hNSCを用いた候補因子の細胞増殖に対する機能解析
精製タンパク質を添加後72時間で細胞数を計測。いずれの候補因子もhNSCに対して増殖を促進した。
幹

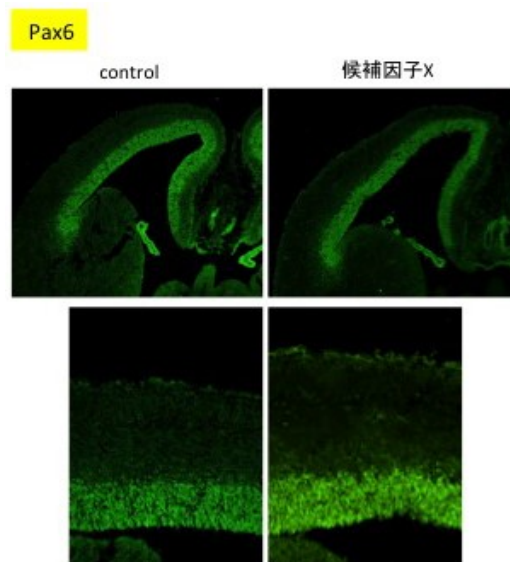


図4 マウス胚の脳室への候補因子Xの精製タンパク質注入

候補因子Xタンパク質を注入すると、Pax6陽性の神経細胞が増加し、大脳皮質の厚みも増した。

霊長類の大脳皮質の拡大に関与する可能性がある因子を探索し、マイクロレイ解析と発現解析、現在までの論文報告を参考に3個の候補因子に絞った。これらの因子は、今までに増殖因子として働くことが報告されており、候補因子Y、Zは、ヒトの脳脊髄液に含まれる事も報告されている(Zappaterra MD. et al. 2007)。そして、hNSCの解析より、これら3因子は、ヒト神経幹細胞に対して増殖作用があることがわかった。

脳脊髄液には脈絡叢由来のものを含む多くのシグナル因子が含まれる。例えば、Shh、Fgf2、Wnt4、Igf1が脳脊髄液中には存在しており、いずれも増殖因子として働く因子である。実際に、脳脊髄液に含まれる脈絡叢由来のIgf2は、マウスの大脳皮質神経幹細胞に対して、増殖を促すことがわかっている(Lehtinen MK. et al. 2011)。これらのことから、候補因子X、Y、Zも、ヒトを含む霊長類の発生期の脳内で、神経幹細胞の増殖に働いていることが示唆される。そして、候補因子X、Y、Zいずれも、サル胚の脈絡叢には高いレベルで発現しているのに対して、マウスの脈絡叢にはほとんど発現していないか、発現レベルは低いので、霊長類特有の大脳皮質の拡大化に貢献している可能性がある。

それでは、これらの因子をマウス胚の脳で働かせたら、マウスの脳は大きくなるのだろうか。本研究において行ったマウスのneurosphere解析では、候補因子Xがマウス神経幹細胞に対して増殖の促進をもたらした。候補因子Xは、霊長類の大脳皮質の拡大化に貢献していることが強く示唆され、実際にマウス胚の脳室内に精製タンパク質を注入すると、大脳皮質の神経幹細胞の数が増大した。今後は、サル胚の大脳皮質で、候補因子Xのシグナルを阻害したときに神経幹細胞の増殖が阻害されるのか、検証を行いたい。

候補因子Yは、増殖促進の効果がみられなかったが、これはマウスの神経幹細胞に候補因子Yの受容体が発現していない可能性が考えられる。そもそも、マウス胚の脳では、候補因子Yは発現していないので、受容体が発現していない可能性が高い。今後、マウス胚の脳に受容体を発現させるか、恒常活性化型の受容体を発現させて、候補因子Yのシグナルがマウスの神経幹細胞に対しても増殖を促進するのか検討する。

また、候補因子Zについては、マウスの神経幹細胞において受容体が発現していることは確認しており、精製タンパク質の準備が整いしだい、候補因子Yの効果について検証する。

昨今、霊長類の神経幹細胞の遺伝子プロファイルが明らかになり、霊長類特有の因子の発現が、神経幹細胞の増殖や固有の神経幹細胞の獲得に貢献していると考えられている(Stahl R. et al. 2013, Lui JH. et al. 2014, Florio M. et al. 2015, Johnson MB. et al. 2015)。このように、内在的な因子の研究は盛んになりつつあるが、外的要因の作用に着目した研究はまだ少ない。大脳皮質の神経幹細胞は、脳脊髄液に常に曝されており、その影響を受ける環境にある。霊長類では、脈絡叢が非常に発達しており、脳脊髄液の量も多く、マウスやラットには見られない因子も含まれる(Zappaterra MD. et al. 2007)。すなわち、脳脊髄液は、動物種によって神経幹細胞に異なる影響を与える可能性が高い。候補因子X、Y、Zは、神経幹細胞に作用する外的要因の1つで、霊長類の神経幹細胞を特徴付ける新たな機構の因子となるかもしれない。

本助成により、霊長類の脳の大脳皮質の拡大に関わる候補因子のしぼりこみ、そして機能解析で興味深い結果を得る事ができた。このように、大きな目的は達成することができ、これから数年、大きく研究が発展していくことが十分に期待できる。

この機会をいただきましたこと、誠に感謝致します。

5. 参考文献

- Johansson PA. (2014) *Frontiers in neuroscience* 8; 1-9
Zappaterra MD. et al. (2007) *Journal of Proteome Research* 6; 3537-3548
Lehtinen MK. et al. (2011) *Nuoron* 69(5); 893-905
Stahl R. et al. (2013) *Cell* 153; 535-549
Lui JH. et al. (2014) *Nature* 515; 264-268
Florio M. et al. (2015) *Science* 347; 1465-1470
Johnson MB. et al. (2015) *Nature Neuroscience* 18; 637-647