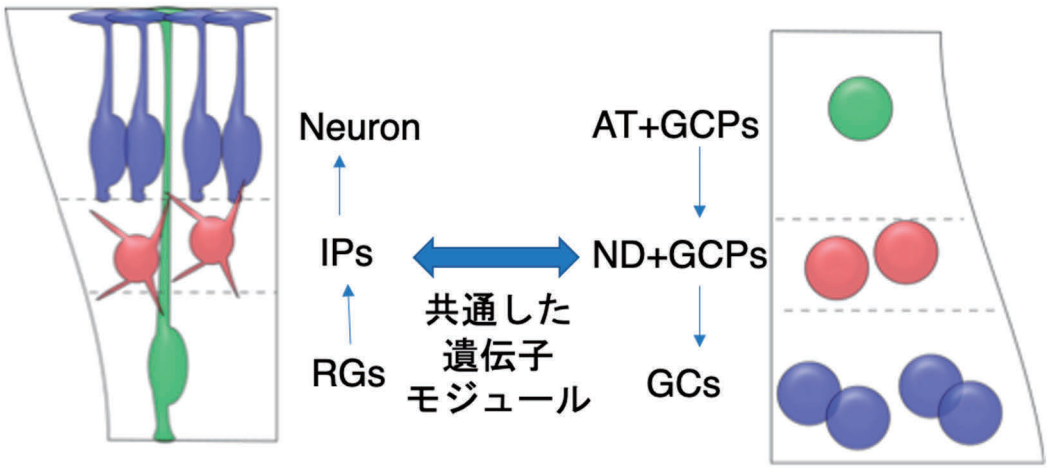
151　生物種間一細胞遺伝子発現解析による脳拡大機構の解明	宮下　聡

【目的】脳は、進化の過程で複雑化・大型化した組織であり、その結果、高次機能などの能力の獲得につながったと考えられている。例えばヒトの場合、大脳皮質が著しく拡大したことが、特徴的な高次機能の獲得に寄与したと考えられている。しかしながら、複雑で拡大した脳がどのような分子メカニズムによって形成されたのかに関しては、未だに不明である。この問題を解決することは、生物進化の過程で高次機能がどのように獲得され、脳の多様性がどのように獲得されるのかという謎を解明する上で極めて重要である。これまでの研究から、中間型神経前駆細胞（Intermediate progenitor）の増加及び、中間型神経前駆細胞を経由した神経細胞の産生（Indirect neurogenesis）が、進化的な脳の複雑化・大型化に寄与したと考えられている。しかしながら、どのような分子メカニズムによって、関節的神経細胞産生機構が制御されているかは不明である。

【方法】これまでに我々のグループが、小脳にも間接的な神経細胞産生機構が存在することを世界で初めて明らかにしたことで、間接的な神経細胞産生が、進化的な大脳皮質の拡大だけではなく、小脳においても用いられていることを示しており、進化的な脳拡大の共通原理であることを示唆した。そこで、大脳皮質・小脳皮質という二つの脳領域を、齧歯類・霊長類という異なる生物種間で横断的に比較解析することにより、進化過程で獲得した脳拡大の共通原理である間接的な神経細胞産生機構を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を実施した。

【結果】まず、我々が齧歯類において見出した関節的神経細胞産生機構がヒトにおいても存在していることがsingle cell RNAseq 解析によって示唆され、大脳皮質の中間型神経前駆細胞との類似性も見出した。さらに、遺伝子モジュール解析によって、関節的神経細胞産生機構に関与する可能性のある一連の遺伝子群の同定に成功した。本研究によって、進化的に獲得した神経細胞産生機構の新たな分子メカニズムの一端を示すことができたため、今後生体内におけるさらなる検証によって、関節的神経細胞産生機構の分子メカニズムが解明されることが期待される。

中枢神経系に共通する神経細胞産生機構とその分子基盤



151. 生物種間一細胞遺伝子発現解析による脳拡大機構の解明

宮下　聡

*新潟大学 脳研究所 システム脳病態学分野

Key words：神経発生，進化，single cell RNAseq

緒　言

脳は、進化の過程で複雑化・大型化した組織であり、その結果、高次機能などの能力の獲得につながったと考えられている。例えばヒトの場合、大脳皮質が著しく拡大したことが、特徴的な高次機能の獲得に寄与したと考えられている。しかしながら、複雑で拡大した脳がどのような分子メカニズムによって形成されたのかに関しては、未だに不明である。この問題を解決することは、生物進化の過程で高次機能がどのように獲得され、脳の多様性がどのように獲得されるのかという謎を解明する上で極めて重要である。

これまでの研究から、中間型神経前駆細胞（Intermediate progenitor）の増加及び、中間型神経前駆細胞を経由した神経細胞の産生（Indirect neurogenesis）が、進化的な脳の複雑化・大型化に寄与したと考えられている［1］。霊長類と比べ、単純な構造をもつ爬虫類や鳥類などの脳内では、多くの場合、神経幹細胞や神経前駆細胞から、直接神経細胞が生み出される直接的神経産生（Direct neurogenesis）の神経細胞産生様式を用いた神経細胞の産生が行われる。一方で、複雑で大型の脳をもつ生物においては、神経幹細胞や神経前駆細胞が、その増殖能力を維持したまま、中間型神経前駆細胞へと分化し、中間型神経前駆細胞が、さらに数回の分裂を行ったのちに、神経細胞へと分化する関節的神経産生（Indirect neurogenesis）の神経細胞産生様式を積極的に用いて神経細胞産生が行われている。このように、関節的神経細胞産生においては、中間型神経前駆細胞の分裂により、最終的に生み出される神経細胞の数は、直接的神経細胞産生と比較して、倍数的に増加する。すなわち、関節的神経細胞産生機構は極めて効率的に最終的な神経細胞の数を増加させるメカニズムである。しかしながら、どのような分子メカニズムによって、関節的神経細胞産生機構が生まれ、進化とともに使われるようになったか、は未だに解明されていない。

この分子メカニズムの研究は、発生期のマウス大脳皮質のモデルを中心に行われてきた。大脳皮質は進化的に拡大・複雑化した脳領域のひとつであり、ヒトなどの霊長類では複雑なシワ構造と著しく拡大した皮質構造をもつことが観察されている。大脳皮質が小さい生物においては、神経幹細胞から直接神経細胞が産生されるが、間接的な神経細胞産生機構をもつ生物では、神経幹細胞から、一過性に細胞増殖を繰り返す中間型神経前駆細胞が産生され、これらの細胞が神経細胞に分化して大量の神経細胞が産生される［2］。マウスは遺伝子操作が容易で発生プロセスもよくわかっているため有用なモデル系であったが、霊長類と比べると小さく単純な大脳皮質構造であり、間接的な神経細胞産生の頻度も多くないため、最適なモデルとはいえない。小脳は、全神経細胞の 70% 以上が存在する脳領域である。近年、ヒトを対象とした脳機能イメージングやモデルマウスの研究結果から、小脳が報酬の予期・言語機能といった認知機能と密接に関連していることが明らかになっている［3］。興味深いことに、小脳を構成する神経細胞の数や小脳皮質の大きさは、進化の過程で急速に増加することが明らかになっており、小脳の拡大が高次機能の獲得に重要な役割を担っていることが示唆されている。これまでに我々のグループでは、小脳にも間接的な神経細胞産生機構が存在することを世界で初めて明らかにした［4］。このことは、間接的な神経細胞産生が、進化的な大脳皮質の拡大だけではなく、小脳においても用いられていることを示しており、進化的な脳拡大の共通原理であることを示唆している。

我々は、これまでの研究をさらに発展させ大脳皮質・小脳皮質という二つの脳領域を、齧歯類・霊長類という

*現在の所属：国立精神・神経医療研究センター神経研究所 病態生化学研究部 分子機能研究室

異なる生物種間で横断的に比較解析することにより、進化過程で獲得した脳拡大の共通原理である間接的な神経細胞産生機構を制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、本研究を実施する。

方　法

1. single cell RNAseq による生物種間での遺伝子発現解析

1）single cell RNAseq による生物種間での遺伝子発現解析

マウス及びヒト発生期の小脳 single cell RNAseq データを取得し［5，6］、Seurat パッケージを用いてデータのクオリティーチェック、クラスタリング、データの統合を行った［7］。さらに、MAGIC パッケージを用いた細胞の系譜解析を行った［8］。以上の解析は全て、解析ツールの製作者のプロトコルに沿って行った。

2）大脳皮質・小脳皮質における共通遺伝子モジュールの探索

上述方法 1）と同様に、マウス発生期の大脳皮質のデータを取得し［9］、解析を行った。さらに、WGCNA パッケージを用いてマウス発生期の小脳顆粒細胞における、遺伝子モジュールを同定し、その発現をヒト小脳皮質及び、大脳皮質においても検証した［10］。

結果および考察

1. 発生期のマウス及びヒト小脳顆粒細胞に共通する遺伝子発現モジュールの探索

我々はこれまでに、発生期のマウス小脳顆粒細胞においては、EGL と呼ばれる一過的な神経前駆細胞の増殖ニッチ内に、転写因子 *Atoh1* を発現する未分化型神経前駆細胞である AT＋GCPs と転写因子 *Neurod1* を発現する中間型神経前駆細胞である ND＋GCPs が存在することをすでに明らかにしていた（Miyashita 2021）。一方で、同じ哺乳類であり、さらに発達し複雑な小脳をもつ霊長類においては、中間型神経前駆細胞である ND＋GCPs が存在するかどうかは、不明であった。我々はまず、ヒト小脳顆粒細胞の single cell RNAseq（scRNAseq）データを取得し、細胞系譜解析を行った（図 1）。*CCND2* および *RBFOX1* の発現がそれぞれ増殖中の神経前駆細胞と増殖を終え分化した神経細胞を示している。興味深いことに、*CCND2* の発現が見られる領域において、*ATOH1* と *NEUROD1* がそれぞれ相補的に発現していることが示された。以上の結果は、ヒトにおいても中間型神経前駆細胞が存在することを明らかにした（図 1）。

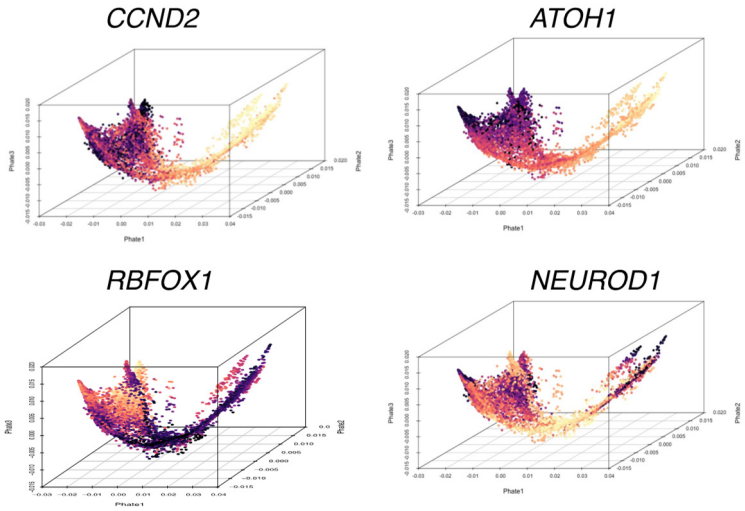


図 1. ヒト小脳顆粒細胞の細胞系譜解析
ヒト小脳顆粒細胞から取得したscRNAseqデータの細胞系譜を可視化し、CND2、RBFOX1、ATOH1、NEUROD1の発現量を可視化した。

次に、小脳顆粒細胞で同定された中間型神経前駆細胞が、これまでに大脳皮質において報告されていた中間型神経前駆細胞と類似した遺伝子発現プロファイルをもつかどうかを、個々の細胞間での遺伝子発現の類似性を比較することによって、確かめた（図 2）。分化した神経細胞同士が強い相関を示していることは、この解析の妥当性を示している。小脳顆粒細胞の中間型神経前駆細胞である ND＋GCPs のほとんどが、大脳皮質に存在する中間型神経前駆細胞である Intermediate progenitors（Ips）と強く相関することが明らかとなった。すなわち、小脳で我々が同定した中間型神経前駆細胞は、大脳皮質における中間型神経前駆細胞と性質が類似していることが明らかとなった（図 2）。

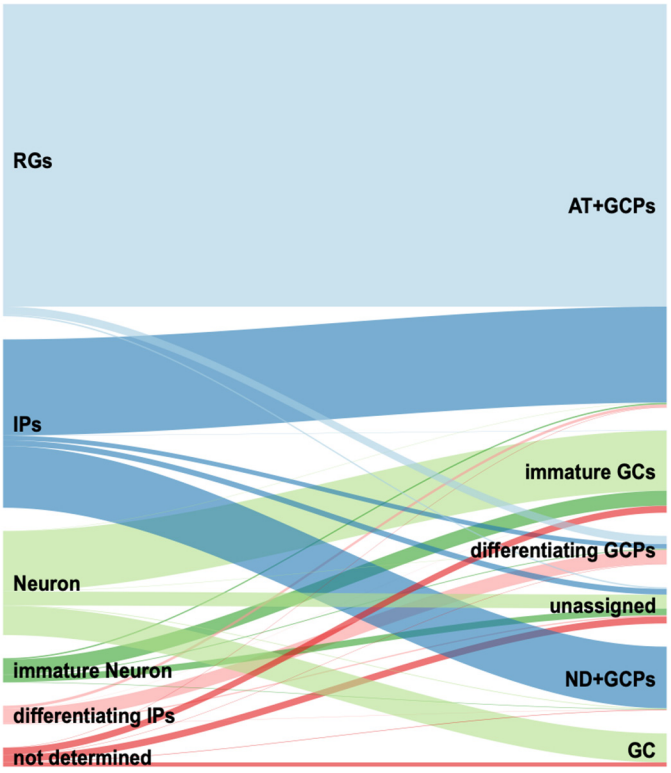


図 2.　小脳顆粒細胞と大脳皮質興奮性神経細胞の相関解析
マウス小脳顆粒細胞と発生期大脳皮質の各細胞種の遺伝子発現の相関を解析し、サンキーダイアグラムで図示した。

ここまでの結果は、小脳顆粒細胞で我々が同定した中間型神経前駆細胞 ND+GCPs は、大脳皮質でこれまでに知られていた IPs と類似した分子基盤によって増殖や分化が制御されていることが示唆された。つまり、ND＋GCPs の存在を支持する分子基盤を詳細に解析することによって、神経系全体にわたる共通原理が明らかになると仮説を立て、遺伝子モジュール解析を行った。WGCNA 法を用いて、マウス小脳顆粒細胞に対して遺伝子モジュールの同定を行った（図 3）。その結果、5 つの遺伝子モジュールを同定することに成功した。そのモジュールのうち、Yellow module だけが、ND＋GCPs でだけ特異的に発現することを見出したことから、Yellow module が中間型神経前駆細胞の分子基盤となる遺伝子群であることが示唆された。興味深いことに、この Yellow module はヒト、マウスに共通して ND＋GCPs で特異的な発現が見られることから、進化過程で共通した中間型神経前駆細胞の分子基盤であると考察することができる。今後は、この Yellow module の発現を制御する分子や、他の生物・領域における発現を解析していくことで、進化過程で獲得した脳拡大の共通原理である間接的な神経細胞産生機構を制御する分子メカニズムを明らかにすることができると考えている。

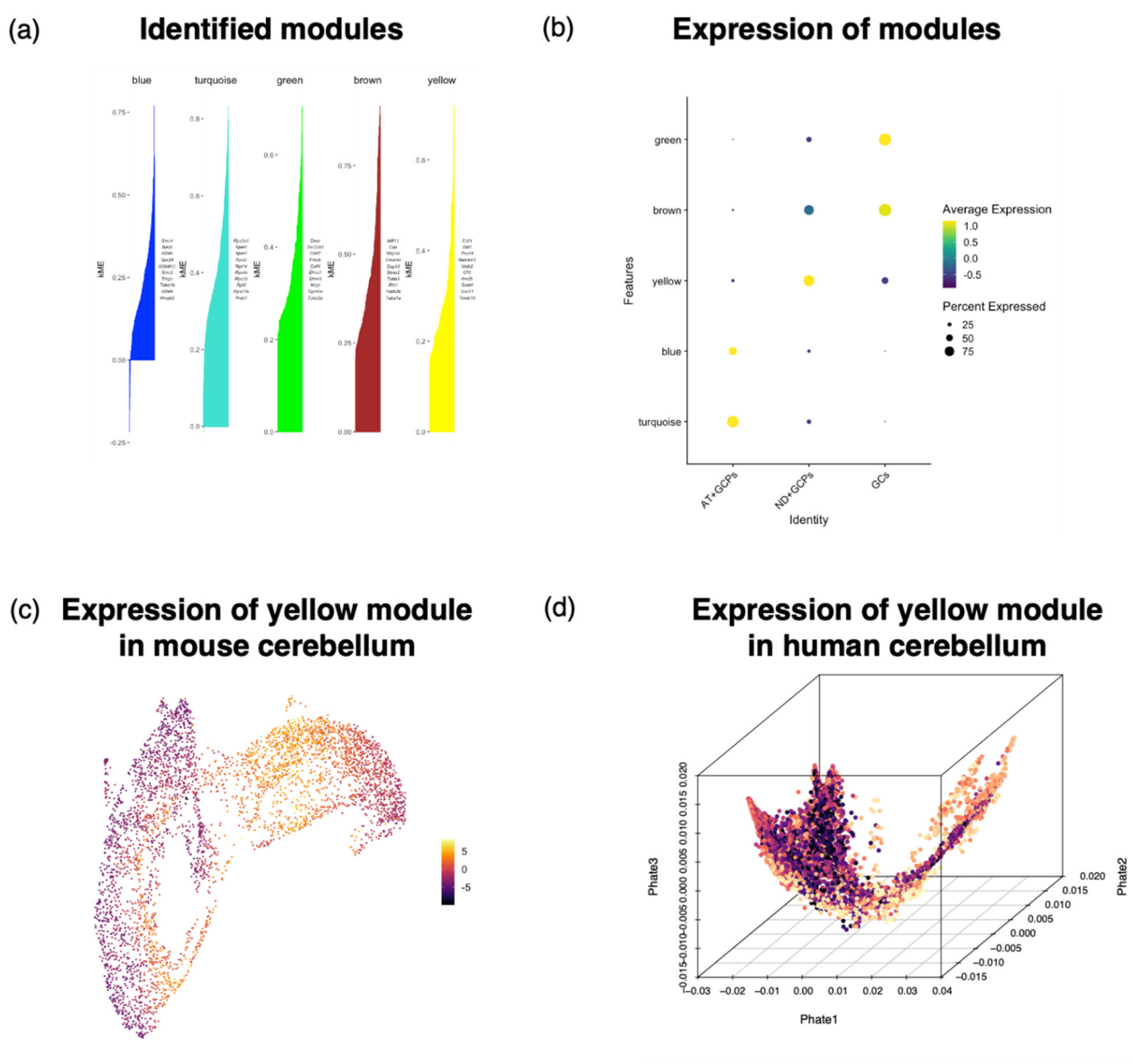


図 3. 遺伝子モジュール解析

WGCNA を用いてマウス小脳顆粒細胞において同定されたモジュール（a）とその発現量（b）。
マウス（c）およびヒト（d）小脳顆粒細胞における個々の細胞における Yellow module の発現量。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、国立精神神経医療研究センター病態生化学研究部の星野幹雄部長には多くのご助言をいただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1) Miyashita S, Hoshino M. Transit Amplifying Progenitors in the Cerebellum: Similarities to and Differences from Transit Amplifying Cells in Other Brain Regions and between Species. Cells. 2022 Feb 18;11(4):726. doi: 10.3390/cells11040726. PMID: 35203375; PMCID: PMC8870322.

2) Cárdenas A, Villalba A, de Juan Romero C, Picó E, Kyrousi C, Tzika AC, Tessier-Lavigne M, Ma L, Drukker M, Cappello S, Borrell V. Evolution of Cortical Neurogenesis in Amniotes Controlled by Robo Signaling Levels. Cell. 2018 Jul 26;174(3):590-606.e21. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.007. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29961574; PMCID: PMC6063992.
3) Schmahmann JD. The cerebellum and cognition. Neurosci Lett. 2019 Jan 1;688:62-75. doi: 10.1016/j.neulet.2018.07.005. Epub 2018 Jul 8. PMID: 29997061.
4) Miyashita S, Owa T, Seto Y, Yamashita M, Aida S, Sone M, Ichijo K, Nishioka T, Kaibuchi K, Kawaguchi Y, Taya S, Hoshino M. Cyclin D1 controls development of cerebellar granule cell progenitors through phosphorylation and stabilization of ATOH1. EMBO J. 2021 Jul 15;40(14):e105712. doi: 10.15252/embj.2020105712. Epub 2021 May 31. Erratum in: EMBO J. 2023 Apr 17;42(8):e113613. PMID: 34057742; PMCID: PMC8280807.
5) Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, Farooq H, Holgado BL, Sundaravadanam Y, Ramaswamy V, Hendrikse LD, Kumar S, Mack SC, Lee JJY, Fong V, Juraschka K, Przelicki D, Michealraj A, Skowron P, Luu B, Suzuki H, Morrissy AS, Cavalli FMG, Garzia L, Daniels C, Wu X, Qazi MA, Singh SK, Chan JA, Marra MA, Malkin D, Dirks P, Heisler L, Pugh T, Ng K, Notta F, Thompson EM, Kleinman CL, Joyner AL, Jabado N, Stein L, Taylor MD. Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. Nature. 2019 Aug;572(7767):67-73. doi: 10.1038/s41586-019-1158-7. Epub 2019 May 1. PMID: 31043743; PMCID: PMC6675628.
6) Aldinger KA, Thomson Z, Phelps IG, Haldipur P, Deng M, Timms AE, Hirano M, Santpere G, Roco C, Rosenberg AB, Lorente-Galdos B, Gulden FO, O'Day D, Overman LM, Lisgo SN, Alexandre P, Sestan N, Doherty D, Dobyns WB, Seelig G, Glass IA, Millen KJ. Spatial and cell type transcriptional landscape of human cerebellar development. Nat Neurosci. 2021 Aug;24(8):1163-1175. doi: 10.1038/s41593-021-00872-y. Epub 2021 Jun 17. PMID: 34140698; PMCID: PMC8338761.
7) Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. Nat Biotechnol. 2015 May;33(5):495-502. doi: 10.1038/nbt.3192. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25867923; PMCID: PMC4430369.
8) Moon KR, van Dijk D, Wang Z, Gigante S, Burkhardt DB, Chen WS, Yim K, Elzen AVD, Hirn MJ, Coifman RR, Ivanova NB, Wolf G, Krishnaswamy S. Visualizing structure and transitions in high-dimensional biological data. Nat Biotechnol. 2019 Dec;37(12):1482-1492. doi: 10.1038/s41587-019-0336-3. Epub 2019 Dec 3. Erratum in: Nat Biotechnol. 2020 Jan;38(1):108. PMID: 31796933; PMCID: PMC7073148.
9) Loo L, Simon JM, Xing L, McCoy ES, Niehaus JK, Guo J, Anton ES, Zylka MJ. Single-cell transcriptomic analysis of mouse neocortical development. Nat Commun. 2019 Jan 11;10(1):134. doi: 10.1038/s41467-018-08079-9. PMID: 30635555; PMCID: PMC6329831.
10) Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. BMC Bioinformatics. 2008 Dec 29;9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559. PMID: 19114008; PMCID: PMC2631488.