

# サブプレートニューロンから紐解く美意識の起源

公益財団法人東京都医学総合研究所

丸山 千秋

It is essential to understand how the mechanisms that respond to various stimuli from the outside world develop from the fetal to the neonatal period to understand the origin of the sense of beauty. Predictably, the neural circuits for perceiving beauty are formed in an "experience-dependent developmental process," in which postnatal experiences stimulate neural circuits. However, neural circuits that develop *in utero*, even with limited sensory input from the outside world, are believed to be mediated by the spontaneous electrical activity of SpNs, the first neurons to be born and mature in the cerebral cortex. SpNs are the first born and mature neurons that play an essential role in neuronal migration and induction of thalamocortical axons during embryonic development. In this study, our first objective was to elucidate the mechanism of constructing basic neural circuits to create human aesthetics through functional analysis of SpNs. By identifying marker genes in SpN during the embryonic period and manipulating spontaneous neural activity, we investigated the essential characteristics of SpN. Furthermore, we explored the role of SpNs in the brain evolutionary process of sensory. We also discussed how the development of input circuits changes, with and without SpN, during brain evolution.

## 1. 緒言

美意識は人間のみならず動物にも存在する。子孫繁殖のパートナーを獲得するために動物たちは美しい体色や模様で相手を惹きつける本能を持っている。ヒトの場合、美を感じると内側眼窩前頭皮質と呼ばれる領域が活性化することが知られている<sup>1)</sup>。また、自閉症や他の精神疾患の患者において美的感覚が健常者と異なる、あるいは感覚過敏があるという報告がある<sup>2)</sup>。すなわち刺激に対する脳の神経回路の反応が、美を感じるメカニズムであるとすれば、その健全な発達が美意識の形成には重要である。そこで主に視覚、聴覚に対する外界の様々な刺激に反応するメカニズムが、胎児期から新生児期にかけてどのように発達してくるのかを知ることは、美意識の起源を理解する上で不可欠である。

ヒトの脳は約860億もの神経細胞(ニューロン)が6層の構造内に精緻に配置されており、それらニューロン間に配線される神経回路によって我々は判断し、覚え、言葉を話す。また、美しい風景や絵画を見たとき、目の網膜に入った視覚刺激は視床と呼ばれる脳領域を経由して大脳皮質第4層の標的細胞に入った後、他の皮質内領域へ出力する。そして内側眼窩前頭皮質や帯状回といった領域の活動が盛んになり、美を認知する。この一連の神経回路がどのようにして形成されるのかについて、生後に経験したことによ

りそれが刺激となって神経回路ができるという“経験依存的な発達”は予想できる発達過程である。しかしながら子宮内で、外界からの感覚入力に限られている中でも発達してくる神経回路は、大脳皮質で最も早く誕生、成熟するニューロンであるSpNの自発的電気活動が担っているのではないかと考えられているが、未解明な部分が多い。胎児や早産児の脳波研究から、下肢が動くとき大脳皮質の体性感覚野のS1領域で紡錘型の速波(spindle burst)と呼ばれる脳波が観測される。この脳波はSpNに由来すると言われており、生後時間が経つにつれてだんだん減少することが観察されている。SpNは最も早く生まれて成熟するニューロンで、胎生期に神経細胞移動<sup>3)</sup>や視床皮質軸索の誘導などの過程で重要な役割を果たすことが知られている。またSpNは生後、細胞死によって激減することから、胎児期から新生児期にかけてその自発電気活動により感覚と運動の統合を制御し、大脳皮質神経回路の基本を作り上げることが示唆される<sup>4)</sup>。そこで本研究では、まずヒトの美意識を作り上げるための基本神経回路の構築メカニズムをSpNの機能解析を通して明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1. SpNのサブタイプの同定

まず、SpNの細胞としての特徴を明確にするために、遺伝子発現の違いによるサブタイプの同定を行った。マウス胎児脳においてSpNが特異的に蛍光タンパクを発現する2種のトランスジェニックマウス(Lpar 1-EGFPとNeuro D 1-CreERT 2/Ai14)を用いてGFP陽性、tdTomato陽性のSpNを単離し、シングルセルRNAseq解析を行った。RのパッケージSeuratを用いて個々のデータと2系統の統合データをそれぞれ解析し、さらに空間遺伝子発現解析Visiumの結果との統合解析を行った。



Origins of Aesthetic Sense Unraveled from Subplate Neurons

Chiaki Ohtaka-Maruyama

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

## 2. 2. SpNの自発神経活動と神経回路形成

SpNがどのような自発活動をするのかを調べるために、マウス脳スライスおよび脳全体のカルシウムイメージングを行う。SpN特異的にCReを発現するマウス系統D1B-CreをGCaMP6-flox マウスと交配し、SpNの神経活動が胎生期のどのぐらいの時期から始まっているのかを解析する。また、視床-皮質軸索で特異的にGCaMPを発現するマウス系統(TCA-GCaMP)を用いて、発達過程においてSpNの活動を変化させた際、どのようにTCAの活動パターンが変化するのかについて神経活動をイメージングする。SpNの活動抑制にはKir2.1-flox マウスとSP-特異的Creマウスを交配する方法を用いる。この条件下で、脳構築や神経回路形成、および生後の個体の行動にどのような影響があるかを解析することで、発達脳におけるSpNの細胞ダイナミクスと感覚統合過程を解明する。

## 2. 3. 脳進化におけるSP層の役割

サブプレート (SP) 層は調べられた限り全ての哺乳類に存在するが、非哺乳類脳には存在しない。分子マーカーの発現としては、鳥類や爬虫類にもSpN特異的なマーカー遺伝子は数箇所に分かれて発現している(図1)。一方哺乳類の中でも霊長類になるとSP層が厚く発達していることが知られている<sup>5,6)</sup>。このことは、霊長類ではより多くのニューロンを胎児期に配置し、また視覚、聴覚などの感覚入力においても、より多くの軸索の正確な投射制御が必要である可能性を示唆している。そこで、脳進化過程の鍵とも考えられるSP層の発達に寄与したメカニズムは何かについて、シングル解析のデータおよびマウス、マーモセット、ヒトの胎児脳を用いたVisium解析データを用いて遺伝子発現の観点から検証を行った。

## 3. 結果

### 3. 1. マウスSpNのサブタイプの同定

Lpar1-EGFP、D1B-Cre、およびその2種の統合データおよびVisiumデータを用いて解析を行った結果、図2に示すような、胎生期の新規SP層のマーカー候補が同定できた(図2,3)。各クラスターに特異的に発現している遺伝子もあれば2種、あるいは3種のグループで共通の遺伝子も同定できた。また、注目すべき点の一つは、最終的に同定された33遺伝子のうち、黄色で示した8遺伝子は自閉症に関連があることが報告されている遺伝子であった。またRNA Scope法を用いてNr 4a2、Hs 3st4、Sox5について発現の重なり具合を調べたところ、1遺伝子のみ陽性の細胞から、3つとも陽性のものまで、発現の様式から5種のサブタイプに分かれることが明らかになった(図4)。このようにSpNはヘテロな細胞集団であることが結論づけられた。

### サブプレートマーカー遺伝子の発現

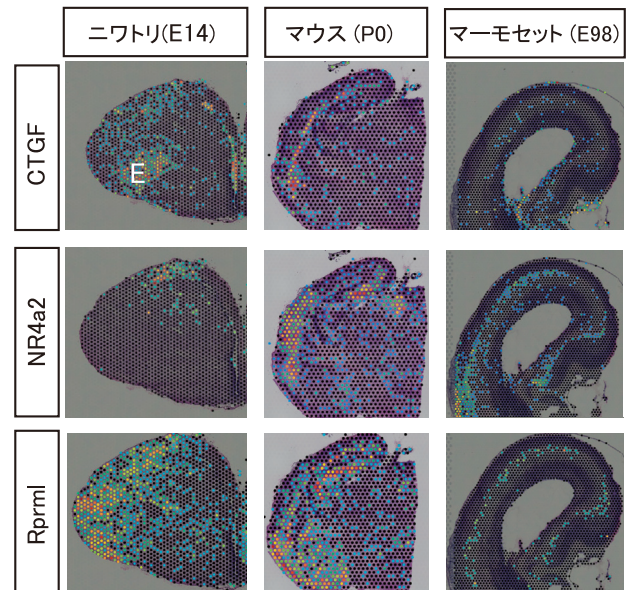


図1 SP マーカー発現の比較

### 同定したサブプレートニューロン (SpN) の胎生期マーカー

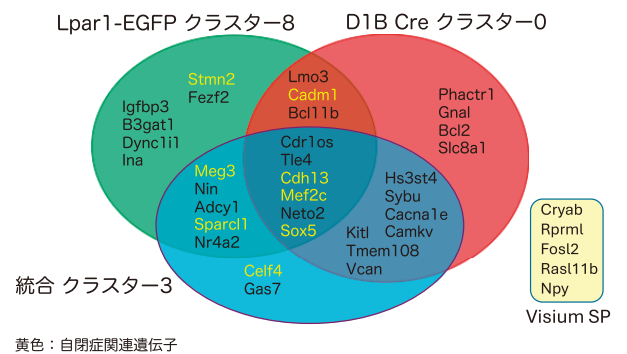


図2 胎生期サブプレートの新規分子マーカー

### 胎生期のSpNマーカーの同定

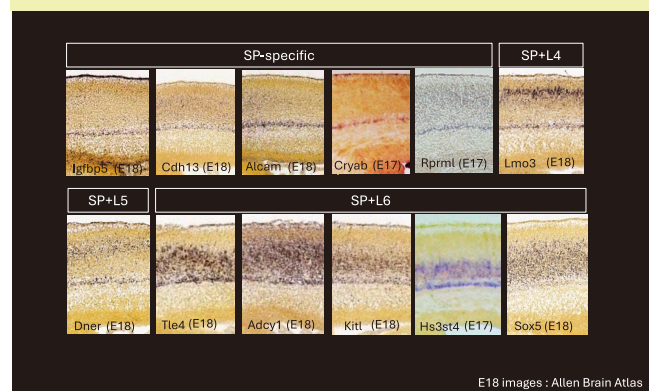


図3 胎生期サブプレート子マーカーの mRNA 発現パターン

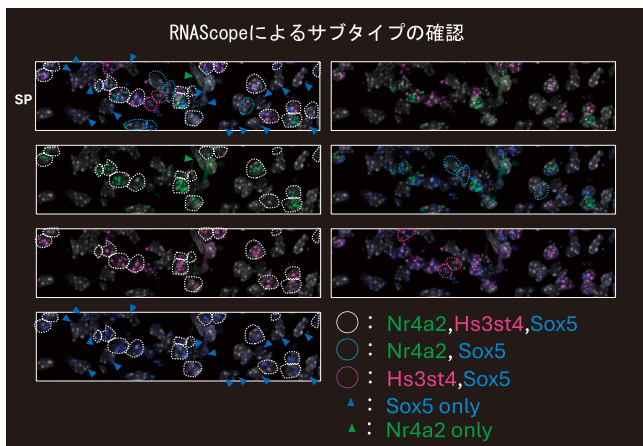


図4 サブプレートニューロンのサブタイプ

### 3. 2. SpNの自発神経活動と神経回路形成

SpNは神経産生期に最初に生まれ、成熟するニューロンであるため、大脳形成期の最初から神経活動を行って後から生まれるニューロンや神経回路の形成過程に関わっている。これまでにマウス胎生期E15.5の段階でスライスを作製してCa<sup>2+</sup>イメージングを行ったところ、この時期からSpNは盛んに神経活動をしていることがわかった。そこで、より早い段階でSpNの活動を計測する実験を進めている。TCA-GCaMPを用いた広域Ca<sup>2+</sup>イメージングの計測条件が決定できた。今後はSpNの自発神経活動を抑制した際のTCA-GCaMPの活動や、脳構築にどのような影響が出るのかについてKir2.1-floxマウスをD1B-Creとの交配マウスの全脳イメージングやスライスでのイメージングを行う。

### 3. 3. 脳進化におけるSP層の役割

哺乳類脳は大脳新皮質に6層の構造が見られるが、これは哺乳類独自の構造で、非哺乳類にはない。鳥類脳ではニューロンが集まって神経核を形成する核構造が見られる(図5)。哺乳類の中でも特にヒト胎児脳ではSP層は皮質板(CP)の5倍以上も厚く、表層SP(SPs)、中間層SP(SPi)と深層SP(SPd)に分けられる<sup>7)</sup>。しかしなぜ霊長類やヒトではSP層がこんなに厚くなるのか、その中にどのようなSpNのサブタイプが存在するのかについては未解明である。そこで我々は、ニワトリ、マウス、マーモセットのVisium空間的遺伝子発現解析を用いて、SP層の分子マーカー発現を指標に種間による比較解析を行った(図6)。その結果、鳥類脳のCTGF遺伝子は視床からの軸索投射先であるentopallium(E)に強く発現していた(図1)。ここは入力神経細胞のマーカーであるEAG2の発現領域でもあり、サブプレートと、哺乳類で言うところの入力細胞である第4層のマーカーが共局在していた。一方哺乳類脳ではCTGFは視床軸索が最初に到達するSpNでのみ発現す

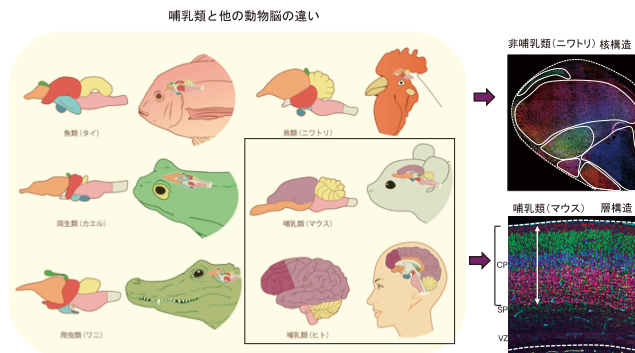


図5 脳構造の動物種による違い

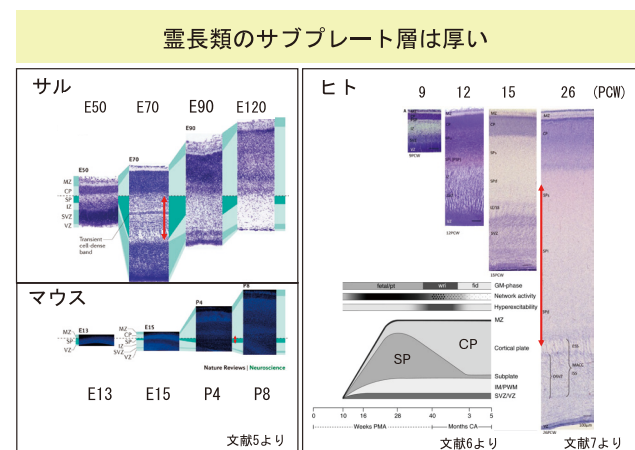


図6 SP層の種間比較

る、という種による違いが明らかになった。

## 4. 考察

SpNは脳構築の際に、細胞移動制御や視床軸索の投射制御などを担い、哺乳類大脳新皮質の形成過程に必須の役割を果たしている。その分子発現による特徴は胎児期ではほとんどわかっていなかったが、今回の解析で、胎生期のマウス脳のSpNは少なくとも5種以上のサブタイプが存在することがわかった。そのサブタイプの役割の違いは未解明であるが、移動ニューロンにシナプスを介してシグナルを送っているサブタイプと、視床軸索の入力を受けて第4層へと投射を促すSpNは別のサブタイプである可能性がある。また、非哺乳類にはSpNはないが、視床からの感覚入力を受ける軸索が投射する入力細胞SpNのマーカーのCTGFの発現が見られたという結果より、原始羊膜類の脳では、感覚入力を最初に伝える視床軸索が到達する早生まれニューロンがCTGFを発現する、という共通性がある可能性が示唆された。それが哺乳類ではSpNとなってさらに第4層へと軸索を伸張させて入力神経細胞層の特異化に寄与するが、非哺乳類ではそれが直接inputニューロンになるという違いがあるのではないかと考えられた。ま

た、霊長類のSP層の厚みに関しては、Visiumでどのような遺伝子が特異的に発現しているのかについて確認したところ、軸索誘導や細胞外基質の関連遺伝子が高発現している他、レチノイン酸の代謝関連遺伝子も霊長類で特に高発現していることもわかってきた。これらの結果は、美的感覚も含む、感覚入力に原始羊膜類から視床を介して入力細胞に送られるという共通性がある一方で、哺乳類ではSpNの一部のサブタイプがそれを受け取り、第4層へと回路を繋ぐ中継所の役割を担っているが、非哺乳類では中継点がなく、入力を受け取った細胞自身が入力細胞へと分化することが示唆された。また、哺乳類では視床皮質回路の制御に関わるSpNのサブタイプ以外にも、細胞移動を促すサブタイプや、未知の機能を持つサブタイプなど、複数のヘテロな細胞集団であることがわかってきた。同定された胎生期のSpNの分子マーカーに自閉症関連遺伝子が多いということは、これらのSpNの機能の不具合は生後の神経回路構築、特に感覚入力の回路形成にとって決定的な影響を及ぼすことが想定される。このことが自閉症患者の感覚過敏の表現型につながっている可能性は否定できない。

## 5. 総括

今後は同定されたSpNマーカー遺伝子が、早期の脳形成過程でSpNに発現することでどのような機能を果たしているのかを解析することで、感覚入力を大脳皮質に伝える最初期の神経回路である、視床-皮質神経回路形成のメカニズムの理解を深めてゆきたい。

これまでの先行研究も考え合わせると、哺乳類における脳構築の共通の原理として、SpNの発達早期の自発活動が「活動依存的な神経回路構築」に必須であり、さらに生後の「経験依存的な神経回路の発達」と合わせて両輪となって脳神経回路形成を促進していると考えられる。前者の早

期の自発活動が美意識を生み出す起源と言えるのではないかと考えている。今後は、SpNの発生起源についても明らかにし、鳥類や爬虫類との比較進化学的解析により動物の美意識はどのように進化してきたのかについての考察を深めたい。

## (引用文献)

- 1) Kawabata H, Zeki S, Neural correlates of beauty. *J Neurophysiol.*, **91**, 1699-1705 (2004)
- 2) Danesh AA, Howery S, Aazh H, Kaf W, Eshraghi AA., Hyperacusis in autism spectrum disorders. *Audiol Res.*, **11**, 547-556 (2021)
- 3) Ohtaka-Maruyama C, Okamoto M, Endo K, Oshima M, Kaneko N, Yura K, Okado H, Miyata T, Maeda N, Synaptic transmission from subplate neurons controls radial migration of neocortical neurons. *Science*, **360**, 313-317 (2018)
- 4) Molnar Z, Luhmann HJ, Kanold PO, Transient cortical circuit match spontaneous and sensory-driven activity during development. *Science*, **370**, 308 (2020)
- 5) Hoerder-Suabedissen, Molnar Z., Development, evolution and pathology of neocortical subplate neurons. *Nature Neurosci.*, **16**, 133-146 (2015)
- 6) Hadders-Alga M, Neural subplate and clinical significance of general movements:an update. *Dev. Med Child Neurol.* **60**, 39-46 (2018)
- 7) Kostovic I, The enigmatic fetal subplate component forms an early tangential cortical nexus and provides the framework for construction of cortical connectivity. *Prog Neurobiol.*, **194**, 101883 (2020)