

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度  
課題番号：20H05700  
研究課題名：新生児脳におけるニューロン新生とその病態：先端分析技術による統合的理解

研究代表者氏名（ローマ字）：澤本 和延（SAWAMOTO Kazunobu）  
所属研究機関・部局・職：名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90282350

研究の概要：

新生児期の神経幹細胞や移動・成熟する脳細胞と周囲の細胞群の相互作用について、三次元電子顕微鏡による網羅的形態解析や、メタボローム・プロテオーム・シングルセル RNA-seq を組み合わせたマルチオミクス解析により、その分子機構を解明する。本研究により、新生児期の脳発達や恒常性維持におけるニューロン新生のメカニズムが解明され、早産で生じる発達障害等の病態解明・治療開発につながる。

研究分野：

キーワード：再生医学、神経化学、脳・神経、脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

生後脳で生まれるニューロンの多くは、側脳室の外側壁（脳室下帯）に存在する神経幹細胞から産生され、長距離を脳内の目的地まで移動して、神経回路に組み込まれる。また、近年、ヒト新生児期の脳でも新しいニューロンが神経幹細胞から継続的につくられ、脳内を移動していることが明らかになり、正常な脳発達において新生児期のニューロン新生・移動が重要な役割を担っていると考えられている。

研究代表者らは、正常動物と病態モデルを比較しながら解析することで、新生ニューロンが周囲の細胞と相互作用して移動する興味深い現象を多数見だし、報告してきた。しかし、実臨床ではこれらの脳障害に対する有効な治療法はいまだ存在せず、これら細胞間相互作用の形態学的基盤と分子機構を解明し、新しい治療法の基盤を構築することが求められている。

2. 研究の目的

生後脳におけるニューロン新生と細胞移動・成熟の過程について、先端分析技術を駆使して大規模・高解像度に研究し、その特徴を明らかにして脳障害の病態を解明することを目的とする。本研究により、周産期・発達期や老化の過程における脳室下帯の細胞構築と各細胞の微細形態学的特徴の変化を捉えるとともに、そのメカニズムと意義を遺伝子・タンパク質・代謝産物のレベルで包括的に理解することが可能となる。

3. 研究の方法

本研究計画では、（1）生後脳におけるニューロン新生と細胞移動を支える組織構築を3次元的に微細形態レベルで明らかにし、（2）シングルセル RNA-seq（scRNAseq）・プロテオーム・メタボロームを組み合わせたマルチオミクス解析によって、ニューロン新生・移動を制御する候補分子群を網羅的に抽出する。さらに、（3）早産が生後のニューロン新生・移動に与える影響を解析する。これらの情報をもとに、（4）ニューロン新生・移動を制御する分子機構の解明、及びその操作技術の開発を行う。

4. これまでの成果

（1）生後のニューロン新生と細胞移動を支える組織構築の三次元微細形態解析

連続ブロック表面走査型電子顕微鏡（SBF-SEM）技術を用いて、脳室下帯で産生される細胞の微細形態を大規模・3次元的に撮像し、神経幹細胞・前駆細胞・新生ニューロン・血管などの3次元微細構造および接着様式を明らかにした。また、独自のAI技術を開発し、撮像された連続電顕写真から、形態学的特徴をもとに細胞膜と標的細胞を高速で自動抽出し、三次元再構築を行うことに成功した。

（2）ニューロン新生・移動を制御する分子のスクリーニング

脳室下帯細胞のscRNAseqやプロテオーム解析により、細胞種ごとの遺伝子発現およびタンパク質発現のプロファイリングを実施した。また、PESI-MS/MSを用いたメタボローム解析により、正期産・早産モデルマウスの脳室下帯における代謝状態を解析するとともに、scRNAseqと組み合わせたマルチオミクス解析によって、出生や早産における細胞種特異的な遺伝子発現変化および代謝変化の相関を見いだした。さらに、マイクロダイアリシス法と組み合わせることでマウスの脳内成分

の変化を捉えることが可能なリアルタイム測定技術 (*Talanta* 2021) を開発した。

### (3) 新生児期のニューロン新生機構と早産による影響

マウス早産モデルを作製し、生後のニューロン新生を組織学的に解析した。ヒトに類似した構造を有するマイクロミニピッグ及びコモンマーモセットの脳室下帯に着目し、新生仔期における組織学的解析および scRNAseq 解析を実施した。さらに、ヒト早産児の死後脳における脳室下帯のニューロン新生について組織学的に解析した。

### (4) 新生児期のニューロン新生・移動を調節する分子機構と操作技術の開発

正常脳におけるニューロン移動を制御する分子群の機能解析を実施した。これらの細胞移動解析に必要な基盤技術として、経時変化に伴う細胞の軌跡を高精度で自動追跡する深層学習ソフト 3DecCellTracker (*eLife* 2021) を開発した。また、早産において影響を受けるニューロン新生制御因子の発現を解析した。

正常脳を移動する新生ニューロンに対する SBF-SEM による 3 次元微細形態解析や二光子顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージングによって、ミクログリアが、成熟する新生ニューロンのシナプスを貪食する様子を捉えた。MFG-E8<sup>D89E</sup> 変異タンパク質を新生ニューロン特異的に発現し、細胞外に露出したホスファチジルセリンを被覆して貪食を阻害する遺伝子組み換えマウスの解析により、ミクログリアによるシナプス貪食が新生ニューロンの機能的な成熟に重要であることを明らかにした (*J Exp Med* 2022)。

## 5. 今後の計画

SBF-SEM を用いた三次元微細形態解析や各種オミクス解析の結果を統合し、生後の脳室下帯組織における神経幹細胞及び産生された新生ニューロンと周囲の細胞群との細胞間相互作用を形態・分子レベルで明らかにする。本研究から明らかになった新生児脳のニューロン新生機構とその病態に関する情報を治療開発に応用する基盤を確立するため、マウス早産モデルを用いた実験を行うと同時に、霊長類モデル・ヒトサンプルを用いた検討を行う。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Kurematsu C, Sawada M, Ohmuraya M, Tanaka M, Kuboyama K, Ogino T, Matsumoto M, Oishi H, Inada H, Ishido Y, Sakakibara Y, Nguyen HB, Thai TQ, Kohsaka Sh, Ohno N, Yamada MK, Asai M, Sokabe M, Nabekura J, Asano K, Tanaka M, \* Sawamoto K. Synaptic pruning of murine adult-born neurons by microglia depends on phosphatidylserine. *J Exp Med*, 2022; 219: e20202304, 査読あり

Nakajima C, Sawada M, \* Sawamoto K. Postnatal neuronal migration in health and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 2021; 66: 1-9, 査読あり

Wen C, Miura T, Voleti V, Yamaguchi K, Tsutsumi M, Yamamoto K, Otomo K, Fujie Y, Teramoto T, Ishihara T, Aoki K, Nemoto T, Hillman EMC, \* Kimura KD. 3DecCellTracker, a deep learning-based pipeline for segmenting and tracking cells in 3D time lapse images. *eLife*, 2021; 10: e59187, 査読あり

Kawakami D, Tsuchiya M, Murata T, Iguchi A, \* Zaitzu K. Rapid quantification of extracellular neurotransmitters in mouse brain by PESI/MS/MS and longitudinal data analysis using the R and Stan-based Bayesian state-space model. *Talanta*, 2021; 234: 122620, 査読あり

## 7. ホームページ等

澤本和延研究室ホームページ

<http://k-sawamoto.com/>