

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07079

研究課題名(和文) 脳領域形成の種間比較による視神経オリゴデンドロサイト前駆細胞の出現機構の解析

研究課題名(英文) Comparative study of origin of optic nerve oligodendrocyte precursor cells

研究代表者

小野 勝彦 (Ono, Katsuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30152523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞(OPC)の出現領域の種差を比較解剖学的に解析した。これまでの解析から、視神経のOPCは、マウスでは視索前野、ニワトリ胚では視交叉上領域に起源をもっていることを明らかにしている。なぜ種によって異なるのか、種差形成の様式を、スッポン胚(爬虫類)を用いて調べた。

スッポンでは、OPCマーカーであるOlig2は視索前野を含む広い範囲で最初に出現し、その後、視交叉上領域にも出現した。一方で、より特異性の高いマーカーであるPDGFRαは視交叉上領域には出現しなかった。スッポンはマウス型のOPC出現様式であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オリゴデンドロサイトは、サメなどの板鰓類から見られる細胞で、活動電位の跳躍伝導を引き起こす。その発生機構は主に脊髄で調べられておりニワトリ、マウス、両生類、魚類と、発生様式はよく保存されている。一方で、視神経のオリゴデンドロサイトは脳から移動して視神経に入ってきたものであることが知られており、本研究ではその脳内起源を比較解剖学的に調べ、種差を明らかにした。脊髄のように比較的種差の少ない領域と異なり、脳は種により多様性が高い。視神経のオリゴデンドロサイト出現を明らかにすることで、多様性の形成機構とそれを制御するシグナル機構とが明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：We previously identified that optic nerve oligodendrocyte in mouse originates from fetal preoptic area (POA) while that in chick originates from suprachiasmatic neuroepithelial layer. Therefore, there is a species difference with respect to the sites of optic nerve oligodendrocytes. In this study, we tried to examine comparative anatomy of sites of origin of optic nerve oligodendrocyte precursor cells. We used Chinese-soft shelled turtle as a model animal, as well as chick embryo and mouse fetus.

Olig2, a marker for OPC, is initially expressed in the rostral hypothalamus including POA by E12. In later stages such as E20, Olig2+ cells were distributed in the suprachiasmatic region as well. PDGFRα, another more specific OPC marker, was expressed in the OPA by E20. However, PDGFRα+ cells were not distributed in the suprachiasmatic region. These results indicated that origin of optic nerve OPC in the turtle was similarly to that in mouse rather than chick.

研究分野：神経発生学

キーワード：オリゴデンドロサイト in situ hybridization スッポン ニワトリ 視神経 視索前野 視交叉 種差

1. 研究開始当初の背景

オリゴデンドロサイト前駆細胞は、ソニックヘッジホッグ (Shh) の影響下に分化誘導を受けて、脳室層の中に出現する。例えば、脊髄では底板から数細胞離れた領域から出現し、これは脊椎動物を通して同じ領域で誘導されることが報告されている。一方、視神経のオリゴデンドロサイトは前脳基底部分で作られて移動して視神経に入ってくることが報告されていた。申請者らは、ニワトリ胚では視交叉上領域に起源をもっていることを報告していたが、マウスの起源領域については不明なままであった。最近になって、マウス視神経のオリゴデンドロサイトは胎生期の視索前野 (preoptic area; POA) に由来することを明らかにして報告した。つまり、マウスとニワトリとで種差がある。

2. 研究の目的

脊髄では種を問わず脊椎動物で同じ仕組みで同じ領域から出現するのに対して、視神経では種差がみられることが明らかとなった。前脳基底部分での OPC の誘導にどのような種差があるのか、このような種差はどのように作られたものか。また、前脳領域は、脊髄と比較して、種差の大きな領域であることから、脳形成そのものの中で、OPC の出現領域の決定を見ていく必要がある。このような点を明らかにするため、マウス胎仔とにわとり胚に加えて、爬虫類の一種であるスッポン胚を用いて比較検討を試みた。特に、前脳基底部分の領域形成の指標となる分子やその誘導因子である Shh とその受容体 Patch-1 (Ptd1) の発現に着目する。脳の領域形成の視点では、視索前野の領域マーカーである転写因子 Nkx5 (Nkx5-1 および Nkx5-2) の発現領域と OPC 出現領域を比較し、前脳の領域形成を含めて観察した。

あわせて、OPC を微細形態レベルでも種間で比較を行うことも始めた。電顕レベルでの形態解析は、1980年代で終了していると思われるが、この時代には OPC という概念が希薄であり、この細胞に特化した形態解析は行われていない。

これらの分子発現による脳領域の形成および OPC の形態学的解析を通して、オリゴデンドロサイトの発生分化の種を超えた共通原理と種や領域による特異性を明らかにする。

3. 研究の方法

各動物種における領域や細胞種のマーカーは、マウスで用いてきた抗体をニワトリ胚やスッポン胚にも適用し、in situ hybridization との二重染色などにより検討を行った。またスッポン組織のタンパクを電気泳動により分離して Western blot により抗体が認識する抗原の分子量も確認した。

In situ hybridization のための部分 cDNA は、それぞれの動物から total RNA を用いて RT-PCR を行い、cDNA を単離して RNA プロブを作製して in situ hybridization に用いる。スッポン胚の頭部を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、クリオスタットで 20 μ m の切片を作製するか、またはパラフィン包埋して 4 μ m の切片を作製して組織解析に用いた。

OPC の微細形態については、SBF-SEM (serial block face scanning electron microscopy) を用いた。ミエリン形成前である生後 4 日目 (P4) マウスを 2%パラホルムアルデヒドと 2.5% グルタルアルデヒドを含む PBS で灌流固定した。取り出した視神経に FBS-SEM 用にブロック染色をほどこし、観察用とした。観察は ABiS の支援のもと、自治医科大学の大野伸彦教授との共同研究として、生理学研究所において行った (Gatan 3view - Zeiss Σ IGMA/VP)。

4. 研究成果

(1)細胞マーカーの検証:オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーとして、Olig2 と PDGFR α を用いた。スッポン胚の脊髄を用いて、in situ hybridization と免疫組織化学染色とにより二重染色したところ、陽性細胞は脳室層腹側部のいわゆる pMN ドメインに相当する領域に出現し、ここから脊髄の外殻層 (mantle layer) に広がっていき様子が示された。そして、免疫染色で Olig2 陽性を示す細胞は、すべて mRNA を発現していた。従って、マウスの組織に用いていた抗 Olig2 抗体は、スッポンにも使えることが示された。また、Western blot により、スッポン PLP (proteolipid protein; 4 回膜貫通型のミエリン膜のタンパク) の分子量を調べたところ、30kDa 付近にバンドが見えたので、PLP に対する抗体もスッポンで用いることができることが示された。もう一つのマーカーである PDGFR α は、クローニングした cDNA は in situ hybridization 法により前脳領域でシグナルが得られたが、他のマーカーとの二重染色はまだ行っておらず、今後の課題として残っている。

(2)OPC の出現領域の解析:スッポンの前脳基底領域では、Olig2 陽性細胞は、孵卵 15 日目 (E15) から E17 にかけて、側脳室周囲の脳室層腹側部から出現する。次いで E19 ころより視交叉上領域の脳室層に Olig2 陽性細胞がみられるようになり、E24 ころより視神経の中にも Olig2 陽性細胞がみられるようになるが、にわとり胚と比較すると細胞密度は非常に低い。一方、PDGFR α 陽性細胞は E19 ころから、第三脳室前端部レベルの第三脳室と側脳室に挟まれた領域に出現するようになる。脳室層そのものには、非常に少ない。また、視交叉上領域には、PDGFR α 陽性

細胞は出現しない。

オリゴデンドロサイト前駆細胞を誘導する因子である Shh は、スッポン胚では脳室層前端部でいわゆる終板 (Lamina terminalis) に強く発現していた。また側脳室腹側部の周囲にも発現していた。Shh の受容体である Ptd1 は側脳室腹側部の脳室層の細胞や第三脳室を取り囲む脳室層の細胞に発現していた。つまり、Olig2 陽性細胞が出現する脳室層には Ptd1 が発現している。

マウス胎仔の前脳基底部で最初に OPC/Olig2 陽性細胞/PDGFR α 陽性細胞が出現する領域には視索前野マーカー転写因子である Nkx5 (Hmx) が発現する。この領域の脳室層には Ptd1 が発現しており、他の Nkx 型転写因子と同じように Nkx5 も Shh により発現が誘導されることが示唆された。ニワトリ胚とスッポン胚でも、Nkx5 は視交叉からそれより吻側で発現しており、視索前野での発現が示された。一方、Ptd1 の発現は、マウス胎仔では Nkx5 陽性領域と重なっていたが、ニワトリ胚では重ならず、スッポン胚では部分的な重複がみられたただけであった。Nkx5 が 3 つの種のいずれでも視索前野のマーカーであることは、視交叉との相対的な位置関係から明らかであるが、Shh/Ptd1 シグナルのかかわり方には、種差があることが示唆された。脳領域形成シグナルの違いが、OPC 出現領域にも影響があるものと考えられた。

これらの観察結果から、スッポン胚の前脳基底部におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の起源領域は側脳室周囲腹側部と視交叉上領域の 2 つの可能性が示唆された。また、いずれの領域も Ptd1 が発現しており、Shh シグナルにより分化誘導を受けることも示唆されている。したがって、マウスとニワトリの両方の特徴を持っていることになる。

(3)OPC の微細形態の解析：新生児マウス視神経で、ミエリン形成が始まる前の生後 4 日目の視神経を用いて、細胞の微細形態を解析している。この時期の視神経には、アストロサイト、ミクログリア、そして OPC もしくは premyelinating oligodendrocyte が存在している。SBF-SEM を用いることにより、完全な連続切片から細胞形態を調べることができる。前 2 者の微細形態は、詳細に報告されている。アストロサイトは、中間系フィラメントとグリコーゲン顆粒を持ち、ミクログリアは電子密度が高い暗調な細胞でリソソームを含む。そのような形態的特徴を示さない細胞を OPC であると予想して、微細形態を調べた。これまでに 2 本の視神経を用いて、500 個の細胞を観察できた。微細形態からアストロサイトとミクログリアの特徴を呈さない細胞は 13% あった。

OPC と思われる細胞(中間系フィラメントとグリコーゲン顆粒がなく、リソソームも少ない)は、アストロサイトと比較して、細胞表面が滑らかであった。また、アストロサイトではすべての細胞で一次繊毛と基底小体がみられたが、OPC では基底小体/中心小体は見られたものの繊毛はほとんど発達していなかった。また、OPC では小胞体も発達しておらず、成熟したオリゴデンドロサイトやアストロサイト、ミクログリアで見られる層状に重なった小胞体が見られなかった。このように、OPC と思われる細胞は、大きさに関わらず、幼弱性を示す微細形態的特徴を持っていた。今後は、観察した細胞の 3D 再構築を行い、繊毛の長さ、ゴルジ装置の配列なども含めて解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Hashimoto Y, Gotoh H, Ono K, Nomura T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential potentials of neural progenitors for the generation of neurons and non-neuronal cells in the developing amniote brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40599-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Gotoh H, Wood WM, Patel KD, Factor DC, Boshans LL, Nomura T, Tesar PJ, Ono K, Nishiyama A.	4. 巻 66
2. 論文標題 NG2 expression in NG2 glia is regulated by binding of SoxE and bHLH transcription factors to a Cspg4 intronic enhancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2684-2699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23521	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawano K, Gotoh H, Nomura T, Ono K.	4. 巻 94
2. 論文標題 Birthdate-dependent heterogeneity of oculomotor neurons is involved in transmedian migration in the developing mouse midbrain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 32-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchemneu.2018.08.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita W, Takahashi M, Kikkawa T, Gotoh H, Osumi N, Ono K, Nomura T.	4. 巻 145
2. 論文標題 Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.159764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura T, Yamashita W, Gotoh H, Ono K.	4. 巻 22
2. 論文標題 Species-Specific Mechanisms of Neuron Subtype Specification Reveal Evolutionary Plasticity of Amniote Brain Development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3142-3151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.02.086.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono K, Hirahara Y, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Yamada H, Ikenaka K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Origin of Oligodendrocytes in the Vertebrate Optic Nerve: A Review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 3-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2404-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita W, Takahashi M, Kikkawa T, Gotoh H, Osumi N, Ono K, Nomura T.	4. 巻 145
2. 論文標題 Conserved and divergent functions of Pax6 underlie species-specific neurogenic patterns in the developing amniote brain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.159764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sato K, Yamashita T, Ohuchi H, Takeuchi A, Gotoh H, Ono K, Mizuno M, Mizutani Y, Tomonari S, Sakai K, Imamoto Y, Wada A, Shichida Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Opn5L1 is a retinal receptor that behaves as a reverse and self-regenerating photoreceptor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Commun	6. 最初と最後の頁 1255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03603-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura T, Yamashita W, Gotoh H, Ono K.	4. 巻 22
2. 論文標題 5. Species-Specific Mechanisms of Neuron Subtype Specification Reveal Evolutionary Plasticity of Amniote Brain Development.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 3142-3151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.02.086.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono K, Hirahara Y, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Yamada H, Ikenaka K.	4. 巻 43
2. 論文標題 Origin of Oligodendrocytes in the Vertebrate Optic Nerve: A Review.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurochem Res	6. 最初と最後の頁 186-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-017-2404-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ono K, Yoshii K, Tominaga H, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Ikenaka K.	4. 巻 2441-2448
2. 論文標題 Oligodendrocyte precursor cells in the mouse optic nerve originate in the preoptic area.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 2441-2448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00429-017-1394-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hashimoto Y, Gotoh H, Ono K, Nomura T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Differential potentials of neural progenitors for the generation of neurons and non-neuronal cells in the developing amniote brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 4514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40599-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Kiyonari H, Gotoh H, Ono K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Changes in Wnt-Dependent Neuronal Morphology Underlie the Anatomical Diversification of Neocortical Homologs in Amniotes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 107592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107592.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小野勝彦、後藤仁志、山下航、野村真
2. 発表標題 視神経オリゴデンドロサイトの起源領域の比較解剖学
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野勝彦、栗田彩花、後藤仁志、野村真、竹林浩秀
2. 発表標題 視神経オリゴデンドロサイトの起源の種差
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗田彩花、後藤仁志、野村真、竹林浩秀、小野勝彦
2. 発表標題 マウスとニワトリ間での視神経オリゴデンドロサイトの起源の違いはなぜ生じるか
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ono K, Yoshii K, Gotoh H, Nomura T, Tominaga H, Takebayashi H, Ikenaka K.
2. 発表標題 Optic nerve oligodendrocyte precursor cells originate in the preoptic area in the mouse fetus.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川野幸平、後藤仁志、野村真、小野勝彦
2. 発表標題 マウス胎仔における動眼神経細胞の発生と移動
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ono K, Gotoh H, Nomura T.
2. 発表標題 Species differences of the origin of optic nerve oligodendrocytes in amniote embryos.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ono K,
2. 発表標題 Origin of optic nerve oligodendrocytes.
3. 学会等名 International Symposium on myelin in health and disease in Hangzhou. (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都府立医科大学生物学教室
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/y/biology/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----