

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06895

研究課題名（和文）転写因子Olig2による前脳の神経回路形成の調節機構

研究課題名（英文）Regulation of neural circuit formation by Olig2 in the forebrain

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：転写因子Olig2は、脊髄腹側部においてニューロンとグリア細胞の分化スイッチにかかわる転写調節因子として見出された。一方、脳領域においては、オリゴデンドロサイトの分化調節にくわえて、領域形成や神経回路形成の調節にかかわることが、申請者らによって示された。本研究では、さらに脳領域でのOlig2の機能を明らかにする目的で、Olig2欠損マウスを用いて調べた。その結果、Olig2欠損マウスでは、前交連の形成に異常が見られ、あわせて第三脳室壁の融合過程が遅れていることも示された。本研究の結果から、Olig2は脳室層融合や軸索伸長を調節する遺伝子を介して前交連の形成を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転写因子Olig2は細胞分化調節にかかわる遺伝子として同定され、詳細に解析されてきた。一方で、申請者らの一連の研究から、脳内の領域形成や神経回路形成にもかかわることが示されている。さらに今回の研究からは、マイクロアレイを用いたパスウェイ解析から上皮間葉転換にかかわる遺伝子の発現調節を行っている可能性が見いだされた。さらに形態学的解析からは、脳室層の融合や脳室系の形成にかかわることが新たに示された。新たなOlig2の機能が明らかにされ、脳の形成過程が明らかにされるとともに、Olig2の研究フィールドに新たなインパクトを与えることができた。

研究成果の概要（英文）：The transcription factor Olig2 was isolated in the ventral spinal cord as a transcriptional regulator involved in the differentiation switch between neurons and glial cells. On the other hand, in the brain region, the applicants have shown that it is involved in regulation of region formation and neural circuit formation in addition to regulation of oligodendrocyte differentiation. In this study, we used Olig2-deficient mice to clarify the function of Olig2 in the brain region. As a result, Olig2-deficient mice showed abnormal formation of the anterior commissure and delayed fusion of the third ventricular wall. Our results suggest that Olig2 regulates anterior commissure formation through genes that regulate ventricular layer fusion and axonal outgrowth.

研究分野：神経発生生物学

キーワード：転写因子 軸索ガイダンス 神経回路形成 オリゴデンドロサイト前駆細胞 第三脳室 脳室層融合 前交連

## 1. 研究開始当初の背景

転写調節因子 Olig2 は、当初、脊髄において運動ニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) との分化スイッチにかかわる遺伝子として同定された。その後、Olig2 欠損マウスの脳の解析などから、Olig2 は、前脳領域でも広く発現しており、アストロサイトの分化にかかわること、ならびに間脳では prethalamus と thalamic eminence の領域の境界形成に関わりその結果、視床皮質投射回路の形成を調節することを示した。Olig2 は、脳内では広い領域に発現していることから、さらに多様な機能をもっていることが予想された。また、Olig2 欠損マウスを用いたマイクロアレイのパスウェイ解析から、多くの軸索ガイダンス分子が Olig2 欠損マウス胎仔の脳で発現変化していることが示された。従って、視床皮質投射回路以外の神経回路形成にも異常がみられることが予想された。

## 2. 研究の目的

脳領域では Olig2 は、多様な領域で発現することが示されている。胎仔の中後期のものでは、preoptic area, ganglionic eminence, prethalamus, caudal hypothalamus などの脳室層で発現が認められる。これらの領域はすべてが OPC の出現部位というわけではない。Olig2 欠損マウスの前脳で新たな変異を見出すことができれば、変異の見られる領域での Olig2 の新たな機能に結び付くことが予想される。また、マイクロアレイデータを用いて様々なパスウェイ解析を行うことで、新たな下流遺伝子候補も見出すことができる。このように、Olig2 の新たな機能と新たな顆粒遺伝子候補を見出す子により、Olig2 の機能解析のみならず、脳形成の新たな仕組みの解明に結び付くことを予想して、この研究を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 後期胎仔の脳の組織学的解析

- ・胎齢 18.5 日目 (E18.5) のパラフィン切片に HE 染色または Nissl 染色を行い観察した。
- ・ビブラトームを用いて 100~80µm 厚の浮遊切片を作製し、抗 L1-CAM 抗体を用いて軸索を染色し、回路形成様式を調べた。E14.5~E17.5 の時期を調べた。
- ・固定した E18.5 の脳に Dil を注入し、軸索 tracing を行いその走行を調べた。
- ・E14.5 の脳での脳室面積測定を、脳室拡大の傾向を調べた。

(2) pathway 解析; Olig2 欠損マウスのマイクロアレイデータから、軸索ガイダンス分子と上皮間葉転換にかかわる遺伝子の発現変化を調べた。

(3) pathway 解析の結果をもとに、E13.5 の時期の野生型と Olig2 欠損マウスの前脳基底部分から RNA を精製し、これを用いて qPCR を行い、遺伝子の発現解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 後期胎仔の脳の組織学的解析

まず、野生型および Olig2 欠損マウスの胎齢後期 (E18.5) の脳のパラフィン切片を作製し、Nissl 染色および HE 染色で詳細に観察した。この時期の前脳腹側部の前額断切片では、野生型、Olig2 欠損マウスともに、前交連は正中領域を交差する太い軸索束として観察された。詳細に観察すると、Olig2 欠損マウスでは、前交連は分岐がみられ、切片によっては細い軸索束を伴っていた (図 1)。水平断切片では、野生型、Olig2 欠損マウスとも、前交連は U 字型をした前部と左右に直線状に伸びる後部から構成されていた。しかし、Olig2 欠損マウスでは、軸索束の一部が、第三脳室壁にぶつかりこれを越えられず、左右交差していないように見られるものがあつた。また、脳弓との相対的に位置が前方であつたり、後方であつたりして、一定していなかつた。以上のように、Olig2 欠損マウスの前交連では、形成異常が認められた。

次に、前交連を含む軸索マーカーである L-CAM に対する抗体を用いて、前交連の形成を経時的に調べた。野生型マウスの前脳基底部分では、E14.5 には L1-CAM 陽性の細い線維束が左右の前脳基底

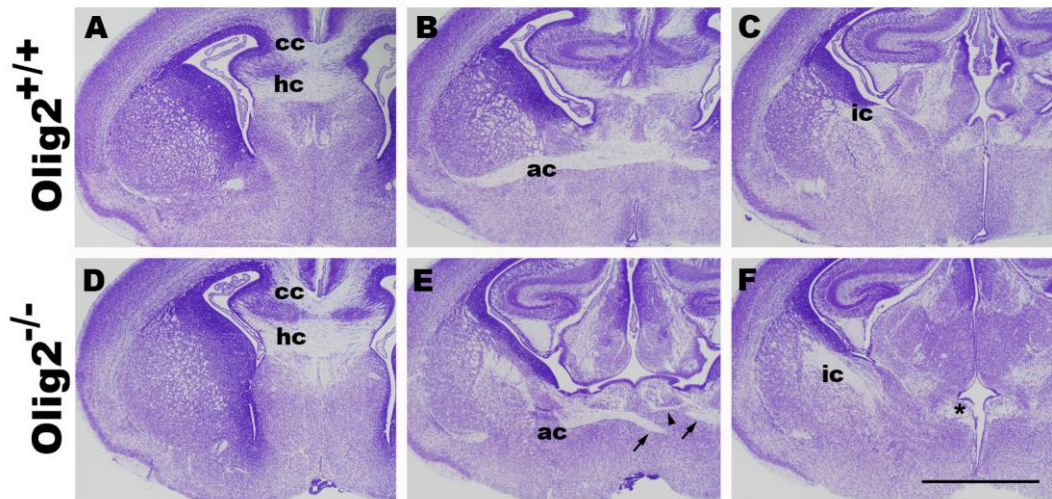


図1 E18.5 マウスの前額断切片。Bar = 1 mm. Olig2 欠損マウスでの前交連は断片化しているように見える(EF)。

部をつないで交差していることが認められ、前交連の形成が認められた(図 2AB)。この軸索束は、発生とともに太くなっているのが認められた(図 2E-G)。一方、Olig2 欠損マウスでは、E14.5 ~E17.5 の時期では、正中領域を交差する L1-CAM 陽性の太い軸索束は認められなかった(図 2CDHI)。また、第三脳室が拡大して左右の脳室壁の融合不全もしくは遅延しているように見られる E15.5 では L1-CAM 陽性の線維が前脳基底部の正中方向に向かわず、背側方向に方向転換していることを示唆する像が見られた。E16.5 および E17.5 では、正中線を越える L1-CAM 陽性の細い軸索束がみられるものもあった(図 2J、矢頭)。L1-CAM をマーカーとした回路形成の解析からは、Olig2 欠損マウスでは前交連の形成不全が明らかになった。

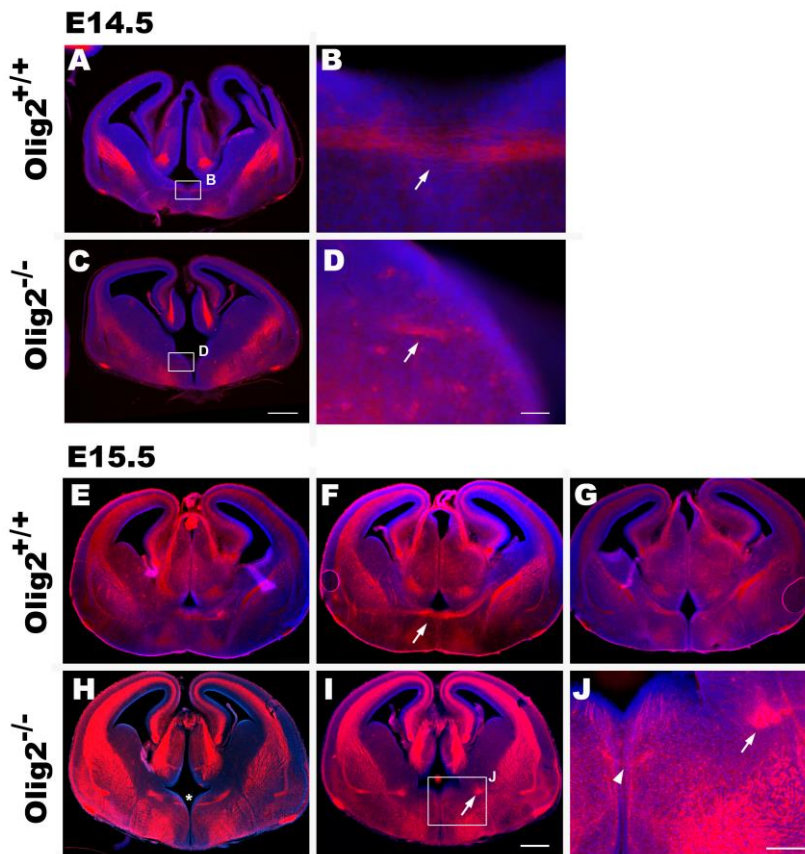


図2 L1-CAM をマーカーとした前交連形成過程の解析。Bars in C and I = 500  $\mu$ m, in D = 50  $\mu$ m, and in J = 200  $\mu$ m.  
野生型では E14.5 で正中交差する軸索束がみられる(A,B)。Olig2-KO マウスでは正中交差する軸索束は見られない。  
E15.5 の Olig2-KO マウスでは軸索束が背側方向に伸びようとしている者がみられる(IJ の矢印)。



L1-CAM をマーカーとした解析では、両側からの軸索が同時に染まるため、片側からの軸索が正中交差しているのか、両側から伸びてきた軸索が正中線で合流しただけなのかが、不明である。そこで、脂溶性軸索トレーサーの Dil を片側の嗅球基部など前交連の起始ニューロンの存在する領域に注入して、軸索走行を調べた。E18.5 の野生型マウスでは、Dil を取り込んだ軸索が正中線を越えて反対側まで伸びていることが示された(図 3B)。これに対して *Olig2* 欠損マウスでは、Dil で標識された軸索の走行には、i) 正中線を越えてすぐに伸長を止めるもの(図 3EH)、ii) 正中線を越えてすぐに細い軸索束になり腹側方向に伸びるもの(図 3E)、iii) 正中線から遠ざかるもの(図 3DG)、があった。このように Dil を用いた軸索トレーシングでも、前交連の形成不全が示された。また軸索走行の乱れは多様であり、複数の原因によるものと考えられた。

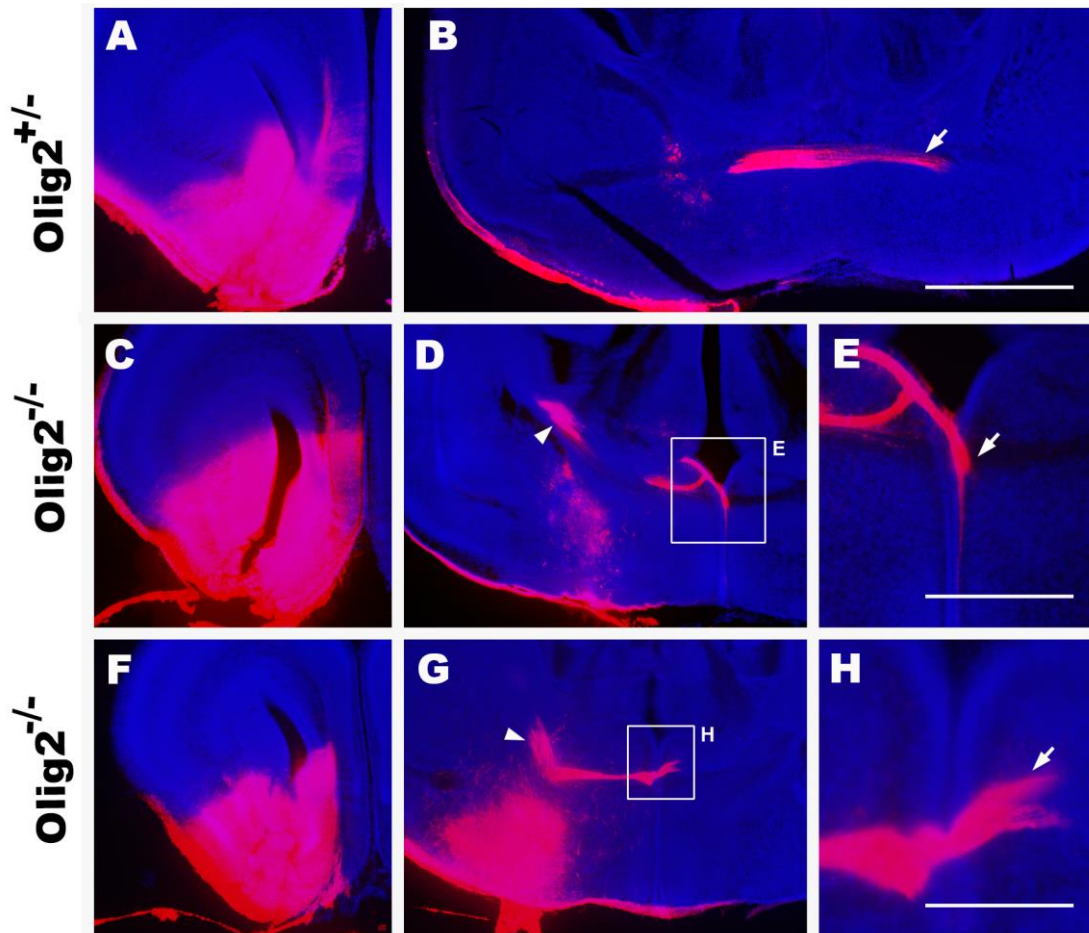


図 3 Dil を用いた前交連線維の走行の解析。E18.5。Bars in B = 1 mm, in E = 400  $\mu$ m, and in H = 200  $\mu$ m。ACF は Dil を注入した領域を示す。野生型マウスの前交連線維は、ほぼまっすぐ伸びて正中交差している(B)。Olig2-KO マウスの前交連線維は正中交差してもすぐに伸長を止めているように見えるものや(EH)、正中領域から遠ざかるように見えるものもあった(DG の矢頭)。

*Olig2* 欠損マウスの前脳基底部では、第三脳室が野生型より拡大しているように見えたことから、脳室の面積を比較した。E14.5 では、*Olig2* 欠損マウスの脳室面積や、野生型の 2 倍以上あり、*t*-検定で有意であった( $p=0.039$ )。従って、前交連の軸索が正中交差を開始する時期に、*Olig2* 欠損マウスではまだ左右の脳室層が融合しておらず、軸索がとおる構造ができていない可能性が示唆された(図 2CD)。

## (2) pathway 解析; 軸索ガイダンス分子と上皮間葉転換にかかわる遺伝子

これまでの形態学的解析から、前交連の神経回路形成が異常であることが明瞭であり、あわせて第三脳室壁の融合に遅れが見られた。脳室壁の融合では上皮間葉転換にかかわる遺伝子の発現が発現異常を示すことが示唆されてきたことから、E13.5 の野生型マウスと *Olig2* 欠損マウスの前脳基底部の

RNA を使ったマイクロアレイデータを用いて、軸索ガイダンスと上皮間葉転換にかかわる遺伝子の pathway 解析を行った。いずれの遺伝子群においても、発現変化する遺伝子が認められた。

(3) E13.5 マウス脳 RNA を用いた qPCR による発現解析

上記の pathway 解析で発現変化が示唆された遺伝子を、qPCR 法を用いて野生型と *Olig2* 欠損マウスとで発現を比較した。対象とした遺伝子は、軸索ガイダンス遺伝子として、*EphA3*、*EphA5*、*Sema5a*、*Slit2*、上皮間葉転換にかかわる遺伝子として *Vangl2* である。いずれも ( $p < 0.05$ ) で有意な差は見られなかったが、*Sema5a* は  $p = 0.074$ 、*EphA3* は  $p = 0.10$  で、いずれも *Olig2* 欠損マウスで発現が上がる傾向にあった(図4AC)。

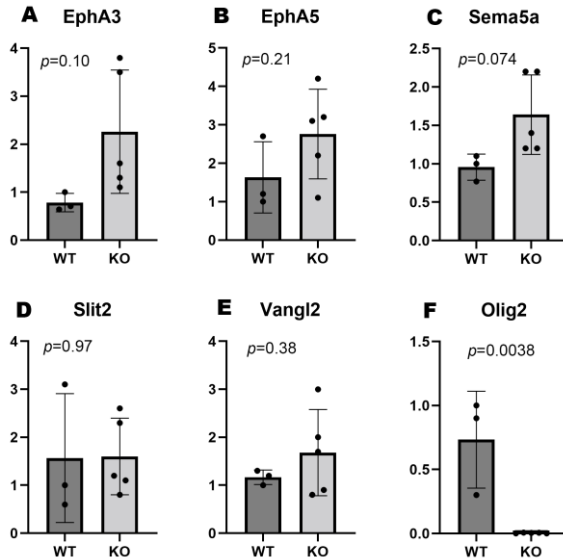


図 4 定量 PCR 法による遺伝子発現解析。いずれも統計学的に有意ではないが、*EphA3* (A)と *Sema5a* (C)は *Olig2*-KO マウスで発現が上がる傾向がみられる。

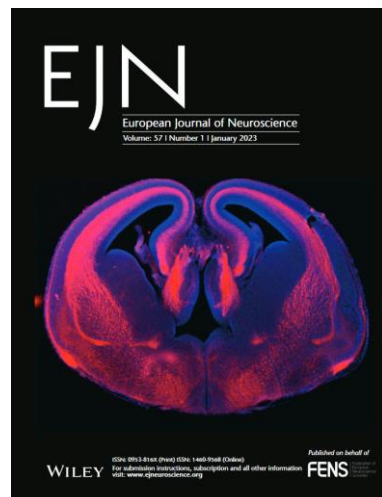
今回の実験結果のまとめは以下の通りである。

- *Olig2* 欠損マウスでは前交連の形成、軸索走行に異常が見られた。
- *Olig2* 欠損マウスでは、第三脳室壁の融合が遅延したり融合しなかったりして、前交連の軸索の通り道が形成されない個体がある。
- *Olig2* 欠損マウスの前交連の軸索には、正中方向に向かわず背側方向に伸びるものがある。
- *Olig2* 欠損マウスのマイクロアレイデータの pathway 解析から、*Olig2* は軸索ガイダンス分子とともに上皮間葉転換にかかわる遺伝子の発現を調節する可能性が示唆された。
- 定量 PCR による解析から、*Olig2* 欠損マウスでは *EphA3* と *Sema5a* の軸索ガイダンス分子の発現が上がる傾向が見られたが、有意な差ではなかった。
- 定量 PCR と pathway 解析の結果から、このような、複数の遺伝子がわずかな *Olig2* の欠損で発現が変わることが、脳室層の融合や軸索伸長に影響を与え、前交連の走行に異常が惹起されたものと考えられた。

本文中の図はいずれも Gotoh H\*, Maruyama K\*, Yoshii K, Yamauchi N, Nomura T, Ohtsuka S, Shirasaki R, Takebayashi H, & Ono K. (2023) Disruption of the anterior commissure in *Olig2* deficient mice. *Eur J Neurosci*, 57, 4-16. (\*, co-first authors)からの引用。

図 2I は当該雑誌の cover picture に採用されている(右の図)

。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Katsuhiko Ono, Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Mami Matsumoto, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno
2. 発表標題 Ultrastructural characterization of oligodendrocyte precursor cells in the early postnatal mouse optic nerve: An SBF-SEM study
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野勝彦、後藤仁志、野村真、松本真実、齊藤成、大野伸彦
2. 発表標題 新生児マウスの視神経でみられるグリア細胞の微細形態：D-SEMを用いた解析
3. 学会等名 第97回日本解剖学会近畿地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野勝彦、後藤仁志、野村真、松本真実、齊藤成、大野伸彦
2. 発表標題 新生児マウスの視神経でみられるオリゴデンドロサイト前駆細胞の微細形態：3D-SEMを用いた解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Katsuhiko Ono, Hitoshi Gotoh, Tadashi Nomura, Mami Matsumoto, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno
2. 発表標題 Ultrastructural characterization of glial cells in the early postnatal mouse optic nerve
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	後藤 仁志  (Gotoh Hitoshi)  (20462202)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教    (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------