

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 22～平成 24 年度

課題番号：22500295

研究課題名（和文） 神経回路形成における細胞分化制御プログラム関与の統合的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of neural differentiation programs in the neural circuit formation

研究代表者

小野 勝彦 (ONO KATSUHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号 30152523

研究成果の概要（和文）：組織形成の過程では、局所から分泌されるモルフォゲン分子に誘導された転写調節因子が細胞の「個性」を決定する。神経系ではこの「個性」に基づいて、細胞サブセット特有の細胞移動や神経回路形成が行われると考えられている。したがって、「個性」を生み出す遺伝子プログラムの中に、細胞固有の挙動を調節する仕組みが含まれていることが予想される。本研究課題では、間脳における転写因子 Olig2 の機能を調べつつこの課題に取り組んだ。その結果、Olig2 は間脳の腹側視床と thalamic eminence の発生調節をすることを明らかにし、さらに視床皮質投射形成にも Olig2 が関わることを明らかにした。本研究の成果は、論文として投稿し現在改訂中である。

研究成果の概要（英文）：To understand mechanisms underlying neural circuit formation, we analyzed Olig2 function on the diencephalon formation including thalamocortical projection formation. Olig2 deficient mouse shows malformation (reduced size) of the prethalamus and expansion of the thalamic eminence. In addition, thalamocortical axons follow tortuous courses. The prethalamus has long been regarded as an intermediate target for the thalamocortical projection formation. Our results indicate that Olig2 regulates prethalamus formation, and also thalamocortical projection formation with an indirect manner. These results have been submitted to Development, an international journal for developmental biology, and now under revision.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|-----------|-----------|
| 22年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 23年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 24年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経科学一般

キーワード：転写因子、間脳、転写因子、軸索ガイダンス分子、Olig2、Dlx2、EphA3

1. 研究開始当初の背景

| 神経系の発生過程では、局所から分泌される

液性因子に誘導されて前後軸・背腹軸が形成され、この過程で細胞分化がおこる。さらにその後、神経回路が形成されて機能的な構造ができる。細胞分化プログラムに神経回路形成の調節機構が含まれることを予想して、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経管の脳室層細胞における細胞分化の過程、特に **neurogenesis** や **gliogenesis** の過程での細胞の運命決定・転換に伴う分子発現変化が、これに続く神経回路形成にどのような意味を持っているのかを明らかにする。具体的には、(1) 細胞分化の過程で発現する細胞特異的転写因子の発現により軸索ガイダンス分子やその受容体の発現が始まったり変化したりすることを示し、(2) これらの軸索ガイダンス分子がどのように周囲の細胞の挙動を調節するか、(3) ガイダンス分子受容体がどのように細胞自身の挙動を制御するか、という3つの点について形態学的に解析した。

3. 研究の方法

細胞分化調節を担う転写因子 *Olig2* に注目し、その間脳形成とこれに続く神経回路形成にどのように関わっているかを調べた。このため、*Olig2* 欠損マウスの表現型解析から始めた。また、*Olig2* 欠損マウスにおける transcriptome 解析も共同研究として行い、*Olig2* の欠損で発現変化する軸索ガイダンス分子を探索し、軸索ガイダンス分子の突起誘導能を培養実験で調べた。さらに、これらの初見をもとに、*Olig2* の異所性発現により軸索ガイダンス分子の発現変化が誘導されるか、神経回路形成に異常が生じるか、などを解析した。

4. 研究成果

(1) 間脳の形成過程では、*Olig2* の欠損によりその発現領域である腹側視床の形成不全が見られ、その腹側に位置する thalamic eminence の領域が拡大していた。
(2) *Olig2* 欠損マウスでは、視床から大脳皮質に至る神経回路の視床皮質投射に異常が見られた。具体的には、神経線維が曲がりくねった走行を示し、軸索伸長の遅れもみられた。
(3) *Olig2* 欠損マウスの transcriptome 解析から、いくつかの軸索ガイダンス分子の発現変化が示唆された。これらを *in situ* hybridization 法により調べた結果、*EphA3* と *EphA5* の発現が更新していた。これらは thalamic eminence で発現し腹側視床では発現しない。従って、*Olig2* 欠損マウスでみら

れる領域変化と一致していた。

(4) ニワトリ胚の神経管に *Olig2* を異所的に発現させ、*EphA3* の発現変化を調べた。*Olig2* の導入により、運動ニューロンの分化マーカーである *Islet1/2* の発現誘導は見られたが、*EphA3* に発現変化は認められなかった。

(5) *EphA3*-Fc 蛋白を培養基質にコートして視床の前駆細胞を培養すると、コントロール (Fc をコートした基質上) と比べて軸索身長が抑制された。

(6) 以上の結果から、*Olig2* は腹側視床の形成過程で領域の決定し、これを介して視床皮質投射を調節していることが明らかとなった。

(7) *Olig2* が *EphA3* の発現を直接制御していることは示されていないので、どのような発現調節機構があるかが、次の課題の一つである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- (1) Shibasaki K, Maruyama N, Ono K, Ishizuka Y, Tominga M. TRPV2 enhances axon outgrowth through its activation by membrane stretch in developing sensory and motor neurons. *J Neurosci* 30: 4601-4612 (査読有り)
- (2) Murakami S, Ohki-Hamasaki H, Watanabe K, Ikenaka K, Ono K. (2010) Netrin 1 provides a chemoattractive cue for the ventral migration of GnRH neurons in the chick forebrain. *J Comp Neurol* 518: 2019-2034. (査読有り)
- (3) Gotoh H, Ono K, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, *Ikenaka K. (2011) Lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells by genetically-defined lineage tracing method in chick spinal cord. *Dev Biol* 349: 504-11. (査読有り)
- (4) Inamura N, Ono K, Takebayashi H, Zalc B, Ikenaka K. *Olig2*-lineage cells generate GABAergic neurons in the prethalamic nuclei, including the zona incerta, ventral lateral geniculate nucleus and reticular thalamic nucleus. *Dev Neurosci*, 2011;33(2):118-29 (査読有り)
- (5) Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono K. Expression of myelin genes in the developing chick retina *Gene Expression Pattern*, 2011 11(8):471-5. (査読有り)
- (6) Usui N, Watanabe K, Ono K, Tomita

- K, Tamamaki N, Ikenaka K, Takebayashi H. (2012). Role of motoneuron-derived NT-3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation. *Development* 139, 1125-1132 (査読有り)
- (7) Gotoh H, Ono K, Nomura T, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K. (2012) Nkx2.2+ Progenitors Generate Somatic Motoneurons in the Chick Spinal Cord. *PLoS One*, 7(12): e51581. (査読有り)
- (8) 小野勝彦, 後藤仁志, 上田貴之 (2012) ニワトリ胚網膜のミエリン形成細胞について *Studia Humana et Naturalia*, 46, 55-63 (査読なし)
- (9) Nomura T, Kawaguchi M, Ono K, Murakami Y. (2013) Reptiles: A new model for brain Evo-Devo Research. *J. Exp. Zool.* 2013 Mar;320(2):57-73 (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 村上志津子, 小野勝彦, 内山安男 GnRH ニューロンの移動におけるセマフォリン 3A の反発活性 Neuro2010 第 33 回神経科学大会 平成 22 年 9 月 4 日 神戸
- (2) 後藤仁志, 小野勝彦, 竹林浩秀, 原田英奇, 仲村春和, 池中一裕 ニワトリ胚脊髄における新規細胞系譜解析法を用いた Nkx2.2 発現細胞の細胞系譜解析 Neuro2010 第 33 回神経科学大会 平成 22 年 9 月 4 日 神戸
- (3) Ono K, Parras CM, Takebayashi H, Shimamura K, Gotoh H, Ikenaka K. Involvement of Olig2 in the neural circuit formation in the fetal mouse forebrain (Olig2 は間脳の軸索ガイダンス分子の発現調節を通して神経回路形成を制御する) 第 34 回日本神経科学大会 平成 23 年 9 月 14-17 日 横浜
- (4) Ono K, Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K. Expression of myelin genes in the developing chick retina. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 平成 23 年 9 月 24-25 日 金沢
- (5) 宇野葵, 青山美奈絵, 藤原悠紀, 後藤仁志, 野村真, 小野勝彦 Olig2 と軸索ガイダンス分子の発現相関の解析. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 平成 23 年 9 月 24-25 日 金沢

- (6) Ono K, Parras CM, Nomura T, Zhang Q, Takebayashi H, Shimamura K, Gotoh H, Itohara S, Ikenaka K Involvement of Olig2 in the formation of reciprocal connection between the thalamus and cortex 第 117 回解剖学会総会・全国学術集会 山梨 甲府 平成 24 年 3 月 26 日
- (7) Matsusue Y, Horii-Hayashi N, Sasagawa T, Matsunaga W, Ono K, Nishi M. Distribution of corticosteroid receptors in oligodendrocytes of mice. 第 117 回解剖学会総会・全国学術集会 山梨 甲府 平成 24 年 3 月 26 日
- (8) Ono K, Parras CM, Nomura T, Zhang Q, Gotoh H, Takebayashi H, Shimamura K, Itohara S, Ikenaka K. Olig2 controls thalamocortical projection through regulation of the ventral thalamus formation. 第 35 回日本神経科学大会。平成 24 年 9 月、名古屋
- (9) Ono K, Olig2 regulates thalamocortical axon arrangement in a non-cell autonomous manner Gordon Research Conference Myelin, Italy, April 29 2012-May 4, 2012 poster presentation

[図書] (計 1 件)

- (1) Ono K, and Ikenaka K. Lineage and development: Oligodendrocytes. In "Neuroglia" Third edition. Kettenman H, and Ransom B Eds. pp.148-158, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

京都府立医科大学大学院 神経発生生物学

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/y/biology/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 勝彦 (ONO KATSUHIKO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30152523

(2)研究分担者

野村 真 (NOMURA TADASHI)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10323007

後藤 仁志 (GOTOH HITOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20462202

(3)連携研究者

竹林 浩秀 (TAKEBATASHI HIROHIDE)

新潟大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号：60353439