

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430021

研究課題名(和文) 視床皮質投射線維の通り道は腹側視床の領域形成過程で作られる

研究課題名(英文) Pathway of thalamocortical axons is formed during region formation of the ventral thalamus

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)：視床皮質線維は、視床から腹側視床に出て終脳腹側部を通過して大脳皮質にいたる。このうち、腹側視床から終脳腹側部に軸索がガイドされる際に、どのような仕組みが働いているのかを調べるため、野生型および視床皮質投射に異常が見られるOlig2欠損マウスを用いて遺伝子発現解析を中心に行った。軸索伸長に対してinstructiveに作用する分子や、マイクロアレイ解析でOlig2の欠損により発現変化する分子に着目した。定量PCRの解析によりプロテオグリカンの一種およびSlit2の発現に次期特異的に野生型とOlig2欠損マウスで差が見られた。一方でいずれも組織レベルの解析では、大きな変化は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Thalamocortical axons (TCAs) extend from the dorsal thalamus to the cerebral cortex through ventral thalamus and ventral telencephalon. We aimed to examine how axons are regulated when they extend from the thalamus to the ventral telencephalon. Especially, we focused on instructive mechanisms in the ventral thalamus. For this purpose, we analyzed expression of axon guidance molecules in these areas. Candidate molecules were picked up from the microarray analysis of Olig2 deficient mouse forebrain which shows malformed TCA projection. Among the molecules that were shown to be altered their expression in the Olig2-KO mouse, qPCR elucidated that expression of some kinds of proteoglycan and that of Slit2 were really altered in the Olig2-KO mouse. However, in situ hybridization analysis showed no or few alteration in expression of these molecules. It is possible that subtle change of expression could alter axonal path finding.

研究分野：神経発生学

キーワード：Olig2 視床 腹側視床 神経回路形成 軸索ガイダンス分子 転写因子 領域形成 視床隆起

1. 研究開始当初の背景

視床皮質投射は、大脳皮質機能に必須の構造基盤である。その形成過程では、視床ニューロンの軸索は、背側視床から出ると腹側視床を通過し腹側終脳を通った後、皮質に到着する。視床皮質線維は必ず腹側視床を通ることから、この領域に何らかの軸索誘導シグナルがあり中間標的として機能していると予想されてきたが、全く不明のままである。申請者らは、転写因子Olig2の欠損マウス胎仔で腹側視床の形成不全を見出し、この形成不全が視床皮質投射回路の異常を引き起こしていることを示してきた。腹側視床が正常に形成されることが、正常は視床皮質回路の形成に重要であることから、この欠損マウスの遺伝子発現をその機能を調べることから、腹側視床のガイダンス機能を明らかにすることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究課題では、Olig2欠損マウスをモデルとして、腹側視床に含まれる視床皮質線維のガイダンス機構を、その領域形成の中で明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

マイクロアレイ解析で、胎齢13.5日目Olig2欠損マウスと野生型マウスの前脳基底部の遺伝子発現を比較解析し、発現変化の見られた遺伝子をピックアップした。そして、定量PCR (qPCR) 法とin situ hybridization法にて、実際の発現の比較を行った。

qPCRでは、E13.5およびE15.5の野生型およびOlig2欠損マウスの前脳(終脳と間脳を含む)から、セパゾールを用いて全RNAを抽出した。それぞれ2マイクログラムの全RNAを用いて逆転写反応を行いfirst strand cDNAを作製してこれを用いた。プローブは、PCR産物が150bp程度になるように設計した。

In situ hybridizationでは、4%パラフォルム

アルデヒドで固定した胎仔脳を、クリオスタットで20ミクロン厚に薄切した。これにRT-PCR法によりクローニングした部分cDNAを鋳型としてdigoxigenin標識cRNAを作製してこれをプローブとして用いた。Hybridization法は、既報の手順で行った。

4. 研究成果

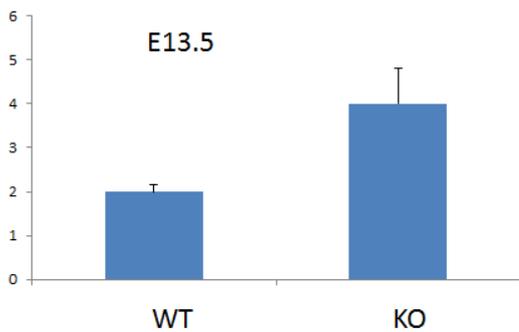
(1)着目した遺伝子

マイクロアレイ解析は、共同研究者のCarlos Parrasのグループで行われた。その結果、Eph/ephrin分子グループの多くで発現変化が見られた。このうち、EphA3は、Olig2欠損マウスで発現が上昇していた。EphA3は腹側視床のさらに腹側に位置する視床隆起(thalamic eminence)で発現する分子である。Olig2欠損マウスでは、腹側視床の形成不全と視床隆起の領域拡大がみられ、EphA3は腹側視床で発現する分子であることから、このような結果になったものと考えられる。実際に、in situ hybridization法により、EphA3発現領域の拡大がみられた。また、培養実験から、EphA3を塗布した基質の上では視床ニューロンの軸索伸長が抑制されることが示された。このことは腹側視床の正常な形成が、正常な視床皮質回路形成に必須であり、また視床隆起がEphA3の発現により反発性に回路形成を制御していることが示された(Ono et al., Development 2014; 小野他, Studia Human et Naturalia, 2015)。

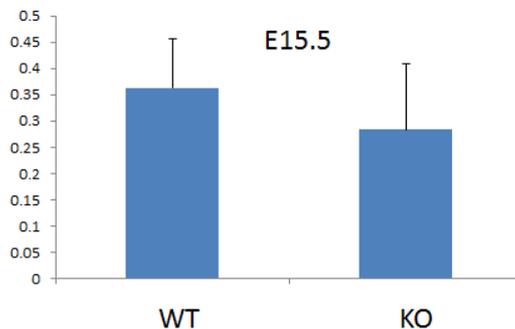
次に、Slit2について調べてみた。Slit2は反発性軸索ガイダンス分子として知られているが、一方で、いったん形成された交差性回路の再交差を防ぐという機能もあることから、視床皮質回路の固定化につながる分子の可能性が考えられる。



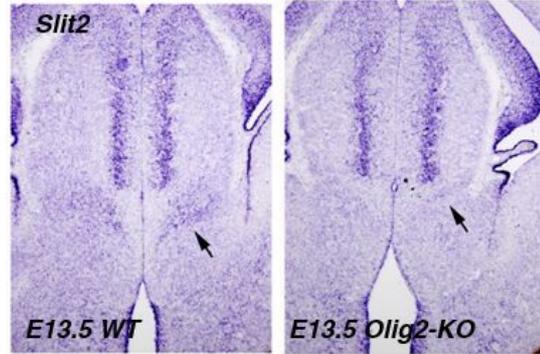
Slit2 は上記のように視床 (DTh) の内足部に発現し、また腹側視床 (Pth) にも弱く発現している。マイクロアレイ解析では、Olig2 欠損マウスでは発現低下する分子となっている。これを qPCR により発現を比較してみた。β アクチンをリファレンス遺伝子として、E13.5 ならびに E15.5 の 2 つの胎齢での発現を調べた。それぞれの時期の野生型マウスと Olig2 欠損マウスの前脳から total RNA を抽出し、逆転写反応により first strand cDNA を作製して qPCR に用いた。その結果、



E13.5 では Olig2 欠損マウスで優位に発現上昇がみられた。一方、E15.5 では野生型マウスと Olig2 欠損マウスの前脳での発現に違いは見られなかった。



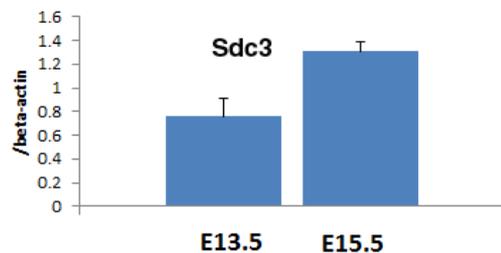
Slit2 は、胎生期の前脳では、腹側視床以外に、第三脳室周囲などでも発現しており、in situ hybridization や免疫組織化学染色、Western blot などにより詳細な解析が必要であると考えられる。このような時期の野生型および Olig2 欠損マウスの前脳を組織化学的に染色して調べたが、下記の図の通り



形態的には腹側視床での発現がみられなくなっていたが (図右の矢印)、それ以外の領域では著明な変化は見られなかった。このように、腹側視床では in situ hybridization と qPCR の結果は一致していなかった。

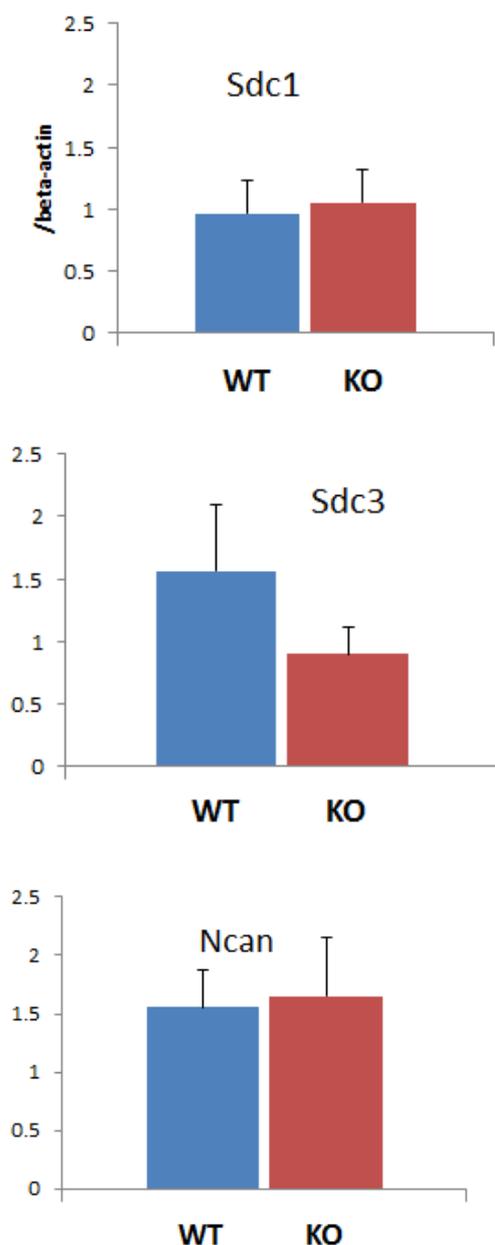
次に、視床皮質投射を制御するといわれているプロテオグリカンについて発現を調べた。N-syndecan (Sdn3) と Neurocan (Ncan) は視床皮質線維に発現しており、この回路形成を制御していることが示唆されている。新たに total RNA を抽出し Slit2 と同じように逆転写反応をおこない、cDNA を作製して qPCR を行った。解析では、Syndecan 1 (Sdn1) も合わせて解析した。

まず、Sdc3 の経時的発現を調べた。



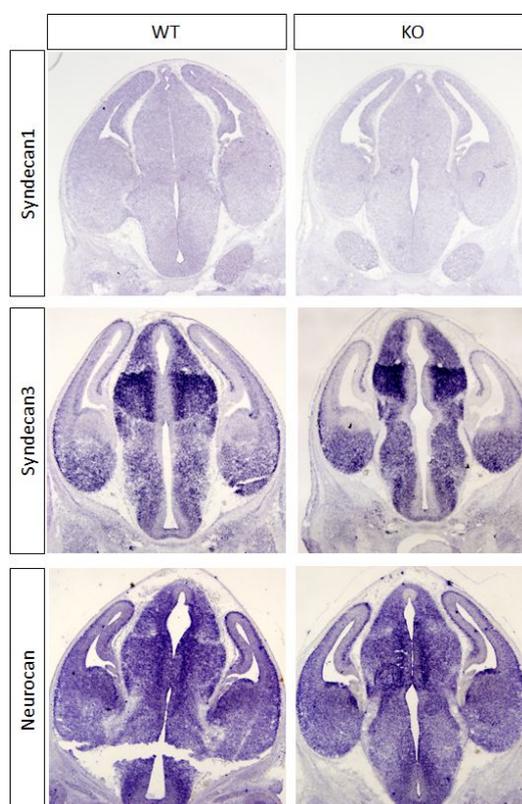
その結果、上記のように、E13.5 と E15.5 では発現が有意に高くなることが明らかにされた。

次に、E13.5 の時期で、野生型と Olig2 欠損マウスとで発現を比較した。



Sdn3 の Olig2 欠損マウスで減少する傾向にあったが、統計的に有意ではなかった。それ以外の 2 つのプロテオグリカンの発現には変化はなかった。

次に、In situ hybridization により形態的に発現を調べた。右カラムにその結果を示す。E13.5 では、Sdn1 の発現は検出限界以下であるように思われた。



Sdn3 (N-syndecan) は背側視床で特に強く発現し、それ以外の領域も一定の発現が認められた。Ncan は前脳領域では広い領域で強い発現が認められた。いずれも、野生型と Olig2 欠損マウスとの間で、顕著な発現の違いは認められなかった。

以上のように、マイクロアレイで発現変化の見られる分子や、また過去の文献で報告されている分子を qPCR と in situ hybridization により発現解析を行った。これまでのところ、プロテオグリカンでは、Sdn3 が時間的に発現が増強することが分かったが、Olig2 欠損マウスにおいても空間的発現パターンに違いはなかった。Slit2 に次期特異的発現変化が認められたことから、前脳内での回路形成を調節していることはまちがい無いと考えられる。一方で、腹側視床では、Olig2 欠損マウスで発現がみられなくなる / 弱くなることから、Slit2 が細胞非自律的に視床皮質回路形成に関わることが示唆された。

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 12 件)

以下に代表的なものを 5 件記載します

1) Ono K, Yoshii K, Tominaga H, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Ikenaka H, (2017) Oligodendrocyte precursor cells in the mouse optic nerve originate in the preoptic area. *Brain Structure and Function*, in press. 査読あり

2) Horie M, Mekada K, Sano H, Kikkawa Y, Chiken S, Someya T, Saito K, Hossain MI, Nameta M, Abe K, Sakimura K, Ono K, Nambu A, Yoshiki A, Takebayashi H. Characterization of novel dystonia musculorum mutant mice: Implications for central nervous system abnormality. *Neurobiol Dis.* 2016 Dec; 96:271-283 査読あり

3) Naruse M, Ishino Y, Kumar A, Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K, Hitoshi S. (2016) The dorsoventral boundary of the germinal zone is a specialized niche for the generation of cortical oligodendrocytes during a restricted temporal window. *Cerebral Cortex*; 26(6):2800-10. 査読あり

4) 小野勝彦、山内菜緒、後藤仁志、吉井健悟、野村真 (2015) 腹側視床の形成と視床皮質線維のガイダンス . *Studia Humana et Naturalia*, 49,31-40, 2015 査読なし

5) Ono K, Clavairoly A, Nomura T, Gotoh H, Uno A, Armant O, Takebayashi H, Zhang Q, Shimamura K, Itohara S, Parras CM, Ikenaka K. (2014) Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2. *Development*, 141:

2075-2084. 査読あり

[学会発表] (計 11 件)

以下に代表的なものを 3 件記載します。

1) Ono K, Yoshii K, Tominaga H, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Ikenaka I. Preoptic area generates oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in the mouse optic nerve. Cold Spring Harbor Asia, 2016 Dec 6; Suzhou China

2) 小野勝彦、マウス視神経のオリゴデンドロサイトの起源 . 第 120 回日本解剖学会、第 92 回日本生理学会、合同大会、シンポジウム「中枢神経系におけるオリゴデンドロサイト発生の場所・時期・メカニズム」, 平成 27 年 3 月 21 日 - 23 日、神戸 (神戸国際会議場)

3) Ono K, Prethalamus formation is crucial for thalamocortical projection formation, and is regulated by Olig2. State of Art Lecture in “Frontier in Comparative endocrinology and Neurobiology 2014”, Nov 25-28, 2014, Hyderabad, India

[その他]

ホームページ等

<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)

京都府立医科大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号 : 30152523

(3) 連携研究者 竹林 浩秀

(Takebayashi, Hirohide)

新潟大学大学院・医歯学総合研究科・教授

研究者番号 : 60353439