

日本神経化学会優秀賞受賞者研究紹介

グリア細胞発生・分化機構の解析と  
生体内細胞系譜追跡実験系の確立・応用

竹林 浩秀

(新潟大学大学院医歯学総合研究科 神経生物・解剖学分野)

はじめに

グリア細胞は、長らくニューロンとニューロンの隙間を埋める存在と考えられ、あまり注目されていない存在であった。しかし、近年、グリア細胞は神経機能発現や、さまざまな病態に深く関わっていることが明らかとなっており、多くの神経科学者の注目を集める存在になってきている<sup>1)~3)</sup>。我々が研究を始めた当初、グリア細胞の発生と分化制御機構については、ごく限られた事実のみが知られていた。例えば、オリゴデンドロサイトの発生については、胎仔期腹側脊髄の限局した領域から、運動ニューロンに引き続いて産生される事が知られていたが、その発生を制御する特異的転写因子の存在は明らかではなかった<sup>4)</sup>。我々は、グリア発生を含む神経発生制御機構を分子レベルで明らかにする目的で、胎仔期神経系で領域特異的に発現する転写因子のスクリーニングを行った。その結果、発生期にオリゴデンドロサイト前駆細胞に発現する basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子 Olig1、Olig2 を同定し、さらに、同じ bHLH 型ファミリーに属する新規遺伝子 Olig3 を見出し、2000 年に報告した<sup>5)</sup>。Olig1、Olig2 は、同年に他の 2 グループから先行報告された<sup>6)7)</sup>が、我々のグループも、Olig 転写因子ファミリーを同定したグループの 1 つと認知されている。これらの転写因子の機能解析を行うために、ニワトリ胚における機能発現実験<sup>8)</sup>、および、ノックアウトマウス作製による機能喪失実験<sup>9)</sup>を行い、発生期における機能の一端を明らかにした。また、

生体内での Olig2 陽性細胞の分化様式を調べるために、タモキシフェン投与により時期特異的に DNA 組換えを誘導する CreER 遺伝子を Olig2 遺伝子座にノックインして Olig2-CreER ノックインマウスを作製し、Olig2 陽性細胞の細胞系譜追跡実験系を確立した<sup>10)11)</sup>。本稿では、細胞系譜追跡実験により明らかとなった、様々な時期、領域、病態(脱髄、脳損傷など)における Olig2 陽性細胞の分化動態について紹介する。

Olig 転写因子のグリア細胞の発生および神経疾患への関与

Olig 転写因子同定の詳細については別の総説<sup>11)</sup>に譲るが、Olig 転写因子の発現解析を行った結果、Olig1、Olig2 は胎仔期神経管の腹側に、Olig3 は胎仔期神経管の背側に発現している事が判明した<sup>5)</sup>。特に、早い時期(胎生 9.5 日)の脊髄腹側の pMN ドメインでは、Olig2 は Olig1 よりも強く発現していたので、Olig2 が運動ニューロン分化に関わる可能性を考えて、強制発現実験を行った。その結果、2 つの bHLH 型転写因子、Olig2 と Neurogenin2 が運動ニューロンの発生に協調して関与することが強く示唆された<sup>8)</sup>。さらに、発生における Olig2 の機能を調べるために Olig2 ノックアウトマウスを作製して機能喪失実験を行ったところ、Olig2 ノックアウトマウスは出生直後に死亡した。その脊髄を組織学的に解析した結果、運動ニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞の両方が全く存在しないことから、Olig2 が運動

ニューロンとオリゴデンドロサイトの発生に必須の転写因子である事がわかった<sup>9)</sup>。その後の詳細な解析により、Olig2は、終脳腹側部のコリン作動性ニューロンの発生<sup>12)</sup>、終脳アストロサイトの発生<sup>13)</sup>、視床-皮質路の形成<sup>14)</sup>、小脳発生における神経幹細胞の性質変化<sup>15)</sup>にも関わる事明らかとなった。

Olig転写因子と神経疾患との関わりについても報告されてきており、Olig転写因子は、神経発生学のみならず、幹細胞生物学、神経病理学、再生医学分野など様々な分野で注目されている。例えば、Olig1, Olig2は、脳腫瘍の一型であるオリゴデンドログリオーマに高発現することが報告された<sup>16)17)</sup>。その後、Olig2陽性細胞は、ほとんどのグリオーマの腫瘍組織の中に数パーセントの割合で存在し<sup>18)19)</sup>、腫瘍組織中のOlig2陽性細胞はグリオーマ幹細胞の性質をもつこと、そして、Olig2がグリオーマ幹細胞の増殖を制御していることが示唆されている<sup>19)</sup>。また、脱髄疾患である多発性硬化症の慢性病巣におけるオリゴデンドロサイト系譜細胞内では、Olig1タンパクが核内に移行せずに細胞質に留まっていることが示され、Olig1タンパクの細胞内局在制御異常が、オリゴデンドロサイトの最終分化の異常につながっている可能性が示唆されている<sup>20)</sup>。さらには、Olig1, Olig2遺伝子座と統合失調症<sup>21)</sup>やダウン症の神経症状<sup>22)</sup>との関連についても報告されている。

## Olig2陽性細胞の細胞系譜追跡実験系の確立と応用

Olig2遺伝子の遺伝子改変マウスの作製にあたり、我々は、CreER遺伝子をOlig2遺伝子座にノックインしたOlig2-CreERノックインマウスを作製した<sup>9)</sup>。当時は、トランスジェニックマウスにより特異的発現を示すCreERマウスが作製されていたが、トランスジーン挿入部位からの影響を受ける等の問題点があった。我々は、外来性の遺伝子の発現を厳密に制御するために「CreERノックイン法」を最も早くに取り入れたグループの一つである<sup>23)</sup>。我々が作製したOlig2-CreERノックイン

マウスとCreレポーターマウスを用いて、タモキシフェン誘導性にloxP配列における組換えを誘導して、細胞系譜追跡実験を行った(図1)。脊髄における細胞系譜追跡実験により、Olig2陽性のpMNドメインの細胞から、運動ニューロン、オリゴデンドロサイト前駆細胞のみならず、少数のアストロサイト、上衣細胞も産み出されることを明らかにした<sup>10)</sup>。この細胞系譜追跡実験を行っていく過程で、いくつかの留意すべき点があることがわかった<sup>24)</sup>。特に見過ごされている重要なポイントは、次の2つである。1) CreERが高発現している場合には、タモキシフェン依存性の細胞毒性を示す(Cre組換え酵素には、細胞毒性があることが知られている)。2) タモキシフェンはアポトーシス抑制効果を持つ(タモキシフェンは、抗エストロゲン作用以外の薬理作用を持つことが知られている)(図2)。すなわち、正確な細胞系譜追跡実験の結果を導き出すためには、できるだけ厳密なコントロール実験を行う必要がある。

続いて、Olig2-CreERノックインマウスを用いた細胞系譜追跡実験を、さまざまな時期、部位、病態に応用した。胎仔期終脳の細胞系譜追跡実験では、終脳のOlig2陽性細胞は、オリゴデンドロサイト、アストロサイトにおよそ半々の割合で分化する事が判明し、胎仔期脊髄Olig2陽性細胞と異なる性質を持つ事が明らかとなった<sup>13)</sup>。内側基底核原基(medial ganglionic eminence, MGE)のOlig2陽性細胞追跡実験により、大脳皮質の抑制性ニューロンのサブタイプはMGEにおける抑制性ニューロン産生のタイミングに関連することを明らかにした<sup>25)</sup>。さらに、成体脳における細胞系譜追跡実験では、白質においてオリゴデンドロサイト前駆細胞から成熟オリゴデンドロサイトへの最終分化を捉えることに成功し、adult oligodendrogenesisとも言える現象を示すことができた<sup>26)</sup>。病態脳における細胞系譜追跡実験に関して、凍結損傷モデル<sup>27)</sup>、実験的自己免疫性脳脊髄炎(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)モデル<sup>28)</sup>、慢性脱髄モデル(plp過剰発現トランスジェニックマウス)<sup>29)</sup>などを用いることにより、脱髄状態ではOlig2陽性細胞はオリゴデンドロサ

## Lineage tracing experiment using *Olig2-CreER* knock-in mice

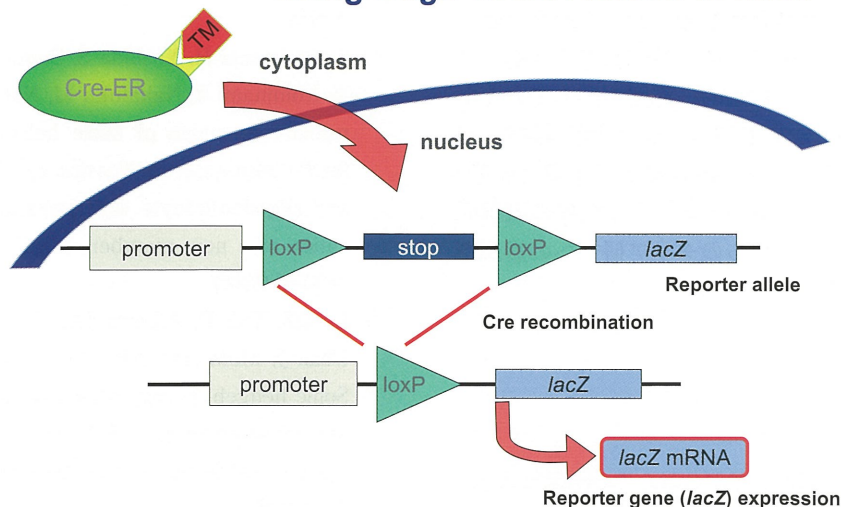


図1 CreER システムを用いた細胞系譜追跡実験

CreER は、P1 バクテリオファージ由来の DNA 組換え酵素 Cre と変異型エストロゲンレセプター (ER) のリガンド結合部位との融合タンパクである。CreER タンパクは、タモキシフェン (TM) と結合すると細胞質から核内に移行し、レポーターアレルの loxP 配列での組換えを誘導する。2つの loxP 配列で挟まれた DNA を除去されたレポーターアレルから、レポーター遺伝子 (図では *lacZ* 遺伝子) が発現する。

### CreER systemを使用する際の注意点

#### (1) Cre組換え酵素の細胞毒性

発現量が多い場合、CreERはタモキシフェン依存的な細胞毒性を示す

#### (2) タモキシフェンのアポトーシス抑制作用

タモキシフェンは、抗エストロゲン作用以外にも薬理作用があることが知られている



コントロール実験を厳密に行う必要がある

図2 CreER システムを使用する際の注意点

イトに分化するが、病態によっては、アストロサイトへの分化も起こりうる事がわかってきた。さらに、成体脳の脳室下帯におけるオリゴデンドロサイト産生<sup>30)</sup>、脊髄損傷モデルにおけるグリア瘢痕の形成過程の解析<sup>31)</sup>、視床下部における出生後の

神経新生の研究<sup>32)</sup>などにも *Olig2-CreER* ノックインマウスは活用され、*Olig2* 陽性細胞の脳内動態を明らかにすることに貢献した。

おわりに

今後の研究の方向性の一つとしては、*Olig2* 転写因子の多機能性に関する分子メカニズムの解明があげられる。*Olig2* タンパクは複数のアミノ酸でリン酸化修飾をうけること、発生が進むに従ってリン酸化型 *Olig2* の割合が減少することが報告された<sup>33)34)</sup>が、*Olig2* 転写因子の多様な機能の発現の際の分子機能、具体的には、結合因子、および、転写因子の下流標的遺伝子についての詳細が明らかにされていくものと考えられる。また、生後脳発達におけるオリゴデンドロサイトの機能についても、ようやく解明されつつある段階にきている。最近では、幼若期の社会的経験と前頭前野のミエリン形成の関連<sup>35)</sup>、神経活動によるオリゴデンド

ロサイト分化の促進<sup>36)</sup>、adult oligodendrogenesisと運動スキル学習の関連<sup>37)</sup>、などの報告がなされたが、今後は、精神機能を含んだ、生後脳発達におけるオリゴエンドロサイト分化制御の意義とメカニズムについて、飛躍的に理解が進んでいくと考えられる。平成25年度より新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」が組織され、日本においてもグリア研究の機運が高まっており、日本からのグリア研究への貢献が期待されている。

## 謝 辞

この度は、第一回日本神経化学会優秀賞を受賞いたしました。身の引き締まる思いであります。日本神経化学会に対しては、研究者として育てて頂いた学会として感謝の気持ちを持っております。本研究を開始するきっかけを与えて下さいました鍋島陽一先生、研究の遂行に關しまして長年に亘って様々なサポートを頂きました池中一裕先生、小野勝彦先生を始めとする池中研メンバー、国内外の共同研究者の先生、そして、一緒に実験を行った研究室員に、この場を借りて御礼申し上げます。今後も、後進の育成を行いながら研究に精進していく所存ですので、日本神経化学会の諸先生より、変わらぬご指導ご鞭撻を頂きましたら幸いです。

## 参考文献

- 1) Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci*, 31, 361-370 (2008).
- 2) Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci*, 14, 311-321 (2013).
- 3) Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell*, 158, 15-24 (2014).
- 4) Richardson WD, Pringle NP, Yu WP, Hall AC. Origins of spinal cord oligodendrocytes: possible developmental and evolutionary relationships with motor neurons. *Dev Neurosci*, 19, 58-68 (1997).
- 5) Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Dynamic expression of basic helix-loop-helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. *Mech Dev*, 99, 143-148 (2000).
- 6) Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH. Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. *Neuron*, 25, 317-329 (2000).
- 7) Zhou Q, Wang S, Anderson DJ. Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors. *Neuron*, 25, 331-343 (2000).
- 8) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M. Combinatorial roles of olig2 and neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron*, 31, 757-771 (2001).
- 9) Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol*, 12, 1157-1163 (2002).
- 10) Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez-Buylla A, Shimizu K, Ikenaka K. Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells. *Dev Biol*, 293, 358-369 (2006).
- 11) 竹林浩秀. グリア発生の研究を起点とした脳研究. *神経化学*, 47(1), 10-18 (2008).
- 12) Furusho M, Ono K, Takebayashi H, Masahira N,

- Kagawa T, Ikeda K, Ikenaka K. Involvement of the Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain. *Dev Biol*, 293, 348-357 (2006).
- 13) Ono K, Takebayashi H, Ikeda K, Furusho M, Nishizawa T, Watanabe K, Ikenaka K. Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev Biol*, 320, 456-468 (2008).
- 14) Ono K, Clavairoly A, Nomura T, Gotoh H, Uno A, Armant O, Takebayashi H, Zhang Q, Shimamura K, Itohara S, Parras CM, Ikenaka K. Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2. *Development*, 141, 2075-2084 (2014).
- 15) Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M. Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun*, 5, 3337 (2014).
- 16) Marie Y, Sanson M, Mokhtari K, Leuraud P, Kujas M, Delattre JY, Poirier J, Zalc B, Hoang-Xuan K. OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *Lancet*, 358, 298-300 (2001).
- 17) Lu QR, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, Alzamora MG, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH, Black PM. Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10851-10856 (2001).
- 18) Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y. Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol*, 164, 1717-1725 (2004).
- 19) Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, Bachoo RM, Kane M, Louis DN, Depinho RA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH. Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron*, 53, 503-517 (2007).
- 20) Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ, Stiles CD. bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science*, 306, 2111-2115 (2004).
- 21) Georgieva L, Moskvina V, Peirce T, Norton N, Bray NJ, Jones L, Holmans P, Macgregor S, Zammit S, Wilkinson J, Williams H, Nikolov I, Williams N, Ivanov D, Davis KL, Haroutunian V, Buxbaum JD, Craddock N, Kirov G, Owen MJ, O'Donovan MC. Convergent evidence that oligodendrocyte lineage transcription factor 2 (OLIG2) and interacting genes influence susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 12469-12474 (2006).
- 22) Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RS, Isaac JT, Galdzicki Z, Haydar TF. Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat Neurosci*, 13, 927-934 (2010).
- 23) Joyner AL, Sudarov A. Genetic Neuroanatomy. In: *The Mouse Nervous System*. Watson C, Paxinos G, Puelles L (eds) Academic Press, p 36-50 (2012).
- 24) Takebayashi H, Usui N, Ono K, Ikenaka K. Tamoxifen modulates apoptosis in multiple modes of action in CreER mice. *Genesis*, 46, 775-781 (2008).
- 25) Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G. Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci*, 27, 7786-7798 (2007).
- 26) Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Götz M. Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci*, 28, 10434-10442 (2008).

- 27) Tatsumi K, Takebayashi H, Manabe T, Tanaka KF, Makinodan M, Yamauchi T, Makinodan E, Matsuyoshi H, Okuda H, Ikenaka K, Wanaka A. Genetic fate mapping of Olig2 progenitors in the injured adult cerebral cortex reveals preferential differentiation into astrocytes. *J Neurosci Res*, 86, 3494-3502 (2008).
- 28) Guo F, Maeda Y, Ma J, Delgado M, Sohn J, Miers L, Ko EM, Bannerman P, Xu J, Wang Y, Zhou C, Takebayashi H, Pleasure D. Macroglial plasticity and the origins of reactive astroglia in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci*, 31, 11914-11928 (2011).
- 29) Shimizu T, Tanaka KF, Takebayashi H, Higashi M, Wisesmith W, Ono K, Hitoshi S, Ikenaka K. Olig2-lineage cells preferentially differentiate into oligodendrocytes but their processes degenerate at the chronic demyelinating stage of proteolipid protein-overexpressing mouse. *J Neurosci Res*, 91, 178-186 (2013).
- 30) Kako E, Kaneko N, Aoyama M, Hida H, Takebayashi H, Ikenaka K, Asai K, Togari H, Sobue K, Sawamoto K. Subventricular zone-derived oligodendrogenesis in injured neonatal white matter in mice enhanced by a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *Stem Cells*, 30, 2234-2247 (2012).
- 31) Barnabé-Heider F, Göritz C, Sabelström H, Takebayashi H, Pfrieger FW, Meletis K, Frisén J. Origin of new glial cells in intact and injured adult spinal cord. *Cell Stem Cell*, 7, 470-482 (2010).
- 32) Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A, Takiar V, Charubhumi V, Balordi F, Takebayashi H, Aja S, Ford E, Fishell G, Blackshaw S. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*, 15, 700-702 (2012).
- 33) Sun Y, Meijer DH, Alberta JA, Mehta S, Kane MF, Tien AC, Fu H, Petryniak MA, Potter GB, Liu Z, Powers JF, Runquist IS, Rowitch DH, Stiles CD. Phosphorylation state of Olig2 regulates proliferation of neural progenitors. *Neuron*, 69, 906-917 (2011).
- 34) Li H, de Faria JP, Andrew P, Nitarska J, Richardson WD. Phosphorylation regulates OLIG2 cofactor choice and the motor neuron-oligodendrocyte fate switch. *Neuron*, 69, 918-929 (2011).
- 35) Makinodan M, Rosen KM, Ito S, Corfas G. A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science*, 337, 1357-1360 (2012).
- 36) Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, Inema I, Miller SE, Bieri G, Zuchero JB, Barres BA, Woo PJ, Vogel H, Monje M. Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344, 1252-1254 (2014).
- 37) McKenzie IA, Ohayon D, Li H, de Faria JP, Emery B, Tohyama K, Richardson WD. Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, 346, 318-322 (2014).