

Olig2による間脳の領域形成

小野勝彦、後藤仁志、野村真

京都府立医科大学大学院神経発生生物学

I. Olig2の発見と脊髄での機能

中枢神経系の形成過程では、前後軸に続いて背腹軸が形成され、それぞれの軸に沿った脳の領域化と領域内での細胞分化が起こる。この発生現象は、局所から分泌されるモルフォゲンシグナルに、細胞が濃度依存性に反応することにより行われる。細胞の反応は、転写因子発現の形で見られる。転写因子は、その発現により多くの遺伝子発現が誘導されたり抑制されたりして、領域や細胞の個性を決める分子である。このような分子の一つに Olig 遺伝子ファミリーがある。これは、bHLH-DNA 結合ドメインを指標としてデータベースサーチや PCR により単離・同定されたものである(Lu et al., 2000; Takebayashi et al., 2000; Zhou et al., 2000)。このうち Olig2 は当初、ソニックヘッジホッグに誘導されるオリゴデンドロサイト系譜細胞に特異的な転写因子として報告され、その後ノックアウトマウスの表現型からオリゴデンドロサイトと脊髄の体性運動ニューロンの分化に必須の転写因子であることが明らかにされた(Lu et al., 2002; Takebayashi et al., 2002; Zhou and Anderson, 2002)。さらに、Olig2 のリン酸化がニューロン・グリアのスイッチにかかわることが報告されて(Li et al., 2011)、脊髄での調節機構の詳細が明らかにされている。

II. pMN と p2 ドメイン：相互抑制

Olig2 は脊髄の背腹軸方向では、神経管の発生初期（マウスでは胎齢 8.5、E8.5）には底板に隣接した細胞で発現し、その後、E9.5 からは底板から数細胞の距離をおいた領域の細胞で発現する。E9.5 以降の Olig2 陽性領域からは、運動ニューロンとオリゴデンドロサイト前駆細胞が生まれることから、pMN ドメイン（もしくは pMN/OL ドメイン）と呼ばれている。

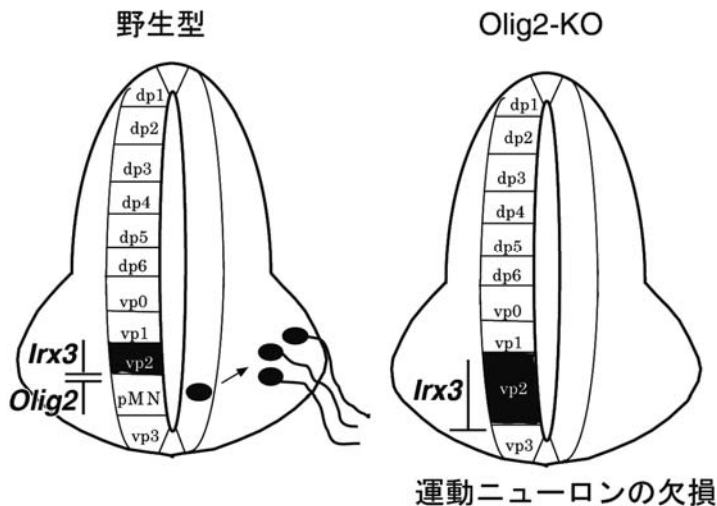


図1 脊髄脳室層におけるドメイン構造と *Irx3*, *Olig2* の相互作用

発生期の脊髄脳室層は転写因子の発現から背腹軸方向に 11 のドメインに分けられる。pMN ドメインでは *Olig2* が、vp2 ドメインでは *Irx3* の発現が見られる。両者は相互抑制的に作用しており、*Olig2* 欠損マウスでは *Olig2* の抑制がなくなるため *Irx3* の発現領域が腹側方向に拡大する。このような転写因子間の相互抑制により領域の境界が形成される。

(Richardson et al., 2000; Zhou and Anderson, 2002)。脊髄の背腹軸方向のドメインは、このような転写因子の相互抑制作用により形成され、全部で 11 に分けられている(Helms and Johnson, 2003; Wilson and Maden, 2005)。このような転写因子のノックアウトマウスでは、相互抑制がなくなるためドメイン構造が欠失するとともに隣接する領域が拡大することが知られている。*Olig2* においても、そのノックアウトマウスでは、pMN ドメインの背側に隣接する *Irx3* 陽性ドメインが腹側方向に広がる (図 1) (Lu et al., 2002; Takebayashi et al., 2002; Zhou and Anderson, 2002)。

III. 間脳形成における *Olig2* の機能(Ono et al., 2014)

(1) *Olig2* による Prethalamus の形成

Olig2 は脊髄以外の領域でも発生の初期には領域特異的発現が見られ、前脳では終脳腹側部の内側線条体原基(medial ganglionic eminence, MGE)や間脳の腹側視床(prethalamus)と視床下部後部で発現している(Takebayashi et al., 2000; Ono et al., 2008)。これらの領域に関しては *Olig2* 欠損マウスでの表現型がこれまで報告されておらず、

脳の形成における領域特異的な機能は明らかではなかった。我々のグループは、前脳での Olig2 機能を探索して、これまでに前脳基底部でのアセチルコリンニューロンの分化や大脳皮質のグリア細胞分化における機能を報告してきた(Furusho et al., 2006; Ono et al., 2008; Ono et al., 2009)。一方で、MGE や prethalamus などの前脳での機能は不明のままであった(Miyoshi et al., 2007; Takebayashi et al., 2008)。

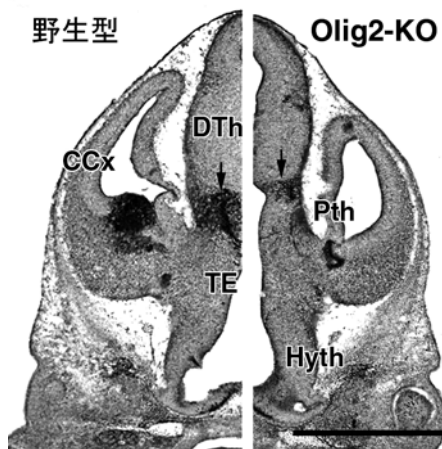


図2 Olig2 欠損マウスにおける prethalamus の低形成 (↓)

胎齢 13.5 日目の間脳前額断切片を、Dlx2 の mRNA と Islet1/2 の蛋白との発現を調べたもの。両者の細胞はまとめて黒い領域として染まっている。野生型の脳(左)と Olig2 欠損マウスの脳(右)との同じようなレベルを並べている。CCx、cerebral cortex(大脳皮質)。DTh、dorsal thalamus(背側視床)。Hyth、hypothalamus(視床下部)。Pth、prethalamus。TE、thalamic eminence(視床隆起)。スケールは 500 μ m。Ono et al., 2014 より改変

間脳での Olig2 機能を調べるため、Olig2 ノックアウトマウスの胎生中期の脳 (E11.5 ~E15.5) を詳細に調べた(Ono et al., 2014)。Prethalamus は成体脳では視床網様核 (thalamic reticular nucleus, TRN) に分化し、Olig2 系譜細胞は GABA ニューロンに分化する(Ono et al., 2008)。発生中期の prethalamus の細胞は、脳室層で Olig2 を発現し、外套層では Dlx1/2、Islet1/2 を発現する(Bulfone et al., 1993)。これらの転写因子を指標として、Olig2 欠損マウスの間脳を調べた結果、E11.5 から prethalamus の低形成が認められた(図2)。前額断切片で prethalamus の面積を計測し、野生型と Olig2 欠損マウスとで比較したところ、60%の減少であった。ノックアウトマウスの prethalamus は、腹側境界部が背側方向にシフトすることにより領域が狭くなっているように見受けられたことから、隣接領域との境界を調べて prethalamus の低形成をより詳細に解析した。prethalamus の腹側に隣接する視床隆起 (thalamic eminence) で転写因子 Tbr1、Tbr2(Puelles, 2001)やカルレチニン(Abbott and Jacobowitz, 1999)を発現している。これらの Olig2、Islet1/2、Cre (Olig2 ノックアウトマウスにおいて Olig2 の遺伝子座に挿入されている遺伝子、後述)、Tbr2 を指標として領域境界の相対的位置を調べた。間脳の前額断面で第三脳室の底部

を 0%、背側端部を 100%とみなした。その結果、Olig2 欠損マウスでは、視床隆起の腹側境界、prethalamus の背側境界は、野生型と有意な差は見られなかったが、両者の境界部は明らかに背側方向にシフトしていた (図 3)。

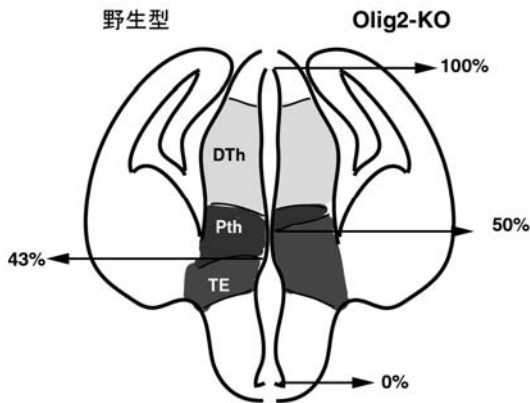


図3 Olig2 欠損マウスにおける prethalamus と視床隆起の境界部の背側シフト
第三脳室の背腹全長を 100% として底面からの相対的距離を示している

(2) Olig2 の欠損による細胞の運命転換

では、この領域境界の背側方向へのシフトはどのようにして生じるのかが次の問題として上がってきた。脊髄で pMN ドメインが p2 ドメインに転換することを考えると、間脳においても Olig2 系譜細胞が Olig2 の機能欠損により運命転換するということが予想される。そこで、本来 Olig2 を発現すべき細胞が Olig2 を欠損した場合にどのような細胞運命をとるか調べた。Olig2 ノックアウトマウスの Olig2 遺伝子座には CreER 遺伝子が挿入されており (Takebayashi et al., 2002)、Olig2 陽性細胞では細胞質に Cre リコンビナーゼと ER (エストロゲン受容体) の融合蛋白が発現している。このマウスにエストロゲン受容体のアンタゴニストであるタモキシフェンを投与すると、CreER 蛋白は核内に移行し、loxP 配列で挟まれたゲノム DNA があれば Cre リコンビナーゼの作用で切り出される (Gotoh and Ono, 2013)。これを利用して、Olig2-CreER マウスと flox レポーターマウス (loxP 配列で挟まれた中に stop codon がありその 3' 下流側にレポーター遺伝子をもつマウス; (Nakahira et al., 2006)) を交配させて、時期特異的に Olig2 陽性細胞を永続的に標識することができる (Masahira et al., 2006)。Olig2^{+/CreER};Rosa-GAP-EGFP (Olig2-hetero;Rosa レポーター) マウスと Olig2^{CreER/CreER};Rosa-GAP-EGFP (Olig2-KO;Rosa レポーター) マウスの E10.5 にタモキシフェン

を投与し、この時期の Olig2 系譜細胞を GFP で標識し、E13.5 で解析した。その結果、Olig2-hetero;Rosa レポーターでは GFP 陽性 Olig2 系譜細胞はカルレチニン陽性を示す視床隆起細胞の背側に位置しこれと重なることはほとんどなく、相互に排他的であった (図 4 AB)。これに対して、Olig2-KO;Rosa レポーターマウスでは、GFP 陽性 Olig2 系譜細胞 (Olig2 の発現はないが) はカルレチニン陽性視床隆起細胞と広い範囲で重なっていた (図 4 CD)。この結果から、Olig2 系譜細胞が Olig2 の発現 (機能) を失うことで、prethalamus のアイデンティティーを失い視床隆起細胞に運命転換したことが明らかとなった。従って、間脳の局所において Olig2 は Prethalamus の領域形成のみならず、隣接領域との境界形成にも重要なはたらきをしていることが示された。

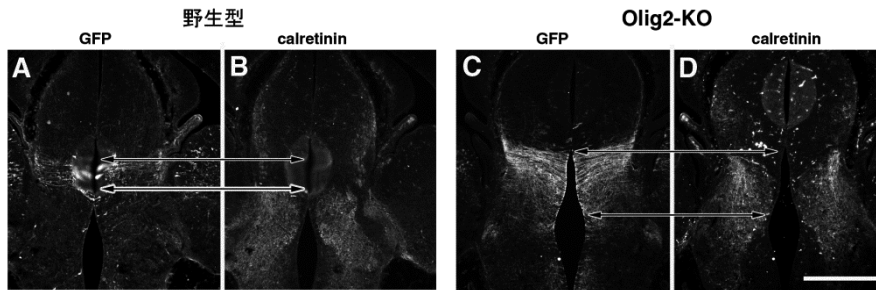


図4 Olig2 欠損マウスにおける Olig2 系譜細胞の運命転換

野生型マウスでは GFP 陽性 Olig2 系譜 prethalamus 細胞はカルレチニン陽性視床隆起細胞と重ならないが (A,B)、Olig2 欠損マウスでは其々の陽性領域が重なる。矢印は、Olig2 陽性領域の背側部および腹側部の境界を示している。スケールは 250 μ m。

III. 前脳の前後軸形成と Olig2

これまで、間脳は前額断切片での形態をもとに区分されており、背側方向より視床上部、背側視床、腹側視床、視床下部に分けられていた。一方、哺乳類や鳥類の脳は発生の過程で前後軸が複雑に屈曲することが知られており、最近になってこの屈曲を考慮に入れて、長軸方向に沿って間脳もしくは前脳の領域区分が見直されるようになった (Puelles and Rubenstein, 2003)。その結果、従来の腹側視床が背側視床の腹側に位置するという視点から、前後軸方向で前方に位置するという視点に改められ、prethalamus と呼ばれるようになった。Olig2 による間脳の領域形成の調節機構は、脊髄における pMN ドメインの形成様式と似ていると考えられる。脊髄では、Olig2 の欠損で、pMN ドメインが p2 ドメインにかわり、細胞運命が運動ニューロンから v2 インターニュー

ロンに運命転換する。脊髄では背腹軸の境界形成に機能していた *Olig2* が、間脳では同じ作用様式（相互抑制作用）で前後軸形成の領域／境界形成を調節するようになったものと考えられる。脊髄では *Irx3* や *Nkx2.2*、*Pax6* などが *Olig2* との境界形成に作用する転写因子として知られている。間脳においても、*Olig2* の欠損により、*Olig2* 陽性領域が狭くなり一方で視床隆起が拡大する。視床隆起のマーカーのうち *Tbr1* と *Tbr2* は転写因子であり、間脳の境界の変化から *Olig2* 系譜細胞が *Tbr1* や *Tbr2* を発現するようになったと考えられる。転写因子ではないが、*Olig2* 欠損マウスで *Olig2* 系譜細胞が視床隆起マーカーの一つであるカルレチニンを発現するようになったことは、このことを強く示唆している。*prethalamus* 腹側部の境界形成において *Olig2* の発現を抑制する転写因子の同定が今後の課題の一つであり、前脳における *Olig2* 機能解明の大きな手がかりになるものと思われる。

本稿は、平成26年11月25日にハイデラバード大学で行われた IC-FCEN2014 での State of Art Lecture の一部をまとめたものである。

文献

- Abbott, L. C. and Jacobowitz, D. M. (1999) 'Developmental expression of calretinin-immunoreactivity in the thalamic eminence of the fetal mouse', *Int J Dev Neurosci* 17(4): 331-45.
- Bulfone, A., Puellas, L., Porteus, M. H., Frohman, M. A., Martin, G. R. and Rubenstein, J. L. (1993) 'Spatially restricted expression of *Dlx-1*, *Dlx-2* (*Tes-1*), *Gbx-2*, and *Wnt-3* in the embryonic day 12.5 mouse forebrain defines potential transverse and longitudinal segmental boundaries', *J Neurosci* 13(7): 3155-72.
- Furusho, M., Ono, K., Takebayashi, H., Masahira, N., Kagawa, T., Ikeda, K. and Ikenaka, K. (2006) 'Involvement of the *Olig2* transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain', *Dev Biol* 293(2): 348-57.
- Gotoh, H. and Ono, K. (2013) 'Developmental cell lineage in the central nervous system (in Japanese)', *Kyotofuritsu Ikadaigaku Zasshi* 122(6): 361-70.
- Helms, A. W. and Johnson, J. E. (2003) 'Specification of dorsal spinal cord interneurons', *Curr Opin Neurobiol* 13(1): 42-9.

- Li, H., de Faria, J. P., Andrew, P., Nitarska, J. and Richardson, W. D. (2011) 'Phosphorylation regulates OLIG2 cofactor choice and the motor neuron-oligodendrocyte fate switch', *Neuron* 69(5): 918-29.
- Lu, Q. R., Sun, T., Zhu, Z., Ma, N., Garcia, M., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H. (2002) 'Common developmental requirement for Olig function indicates a motor neuron/oligodendrocyte connection', *Cell* 109(1): 75-86.
- Lu, Q. R., Yuk, D., Alberta, J. A., Zhu, Z., Pawlitzky, I., Chan, J., McMahon, A. P., Stiles, C. D. and Rowitch, D. H. (2000) 'Sonic hedgehog--regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system', *Neuron* 25(2): 317-29.
- Masahira, N., Takebayashi, H., Ono, K., Watanabe, K., Ding, L., Furusho, M., Ogawa, Y., Nabeshima, Y., Alvarez-Buylla, A., Shimizu, K. et al. (2006) '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(2): 358-69.
- Miyoshi, G., Butt, S. J., Takebayashi, H. and Fishell, G. (2007) 'Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors', *J Neurosci* 27(29): 7786-98.
- Nakahira, E., Kagawa, T., Shimizu, T., Goulding, M. D. and Ikenaka, K. (2006) 'Direct evidence that ventral forebrain cells migrate to the cortex and contribute to the generation of cortical myelinating oligodendrocytes', *Dev Biol* 291(1): 123-31.
- Ono, K., Clavairoly, A., Nomura, T., Gotoh, H., Uno, A., Armant, O., Takebayashi, H., Zhang, Q., Shimamura, K., Itoharu, S. et al. (2014) 'Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2', *Development* 141(10): 2075-84.
- Ono, K., Takebayashi, H., Ikeda, K., Furusho, M., Nishizawa, T., Watanabe, K. and Ikenaka, K. (2008) '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(2): 456-68.
- Ono, K., Takebayashi, H. and Ikenaka, K. (2009) 'Olig2 transcription factor in the

developing and injured forebrain: cell lineage and glial development', *Mol Cells* 27(4): 397-401.

Puelles, L. (2001) 'Brain segmentation and forebrain development in amniotes', *Brain Res Bull* 55(6): 695-710.

Puelles, L. and Rubenstein, J. L. (2003) 'Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model', *Trends Neurosci* 26(9): 469-76.

Richardson, W. D., Smith, H. K., Sun, T., Pringle, N. P., Hall, A. and Woodruff, R. (2000) 'Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection', *Glia* 29(2): 136-42.

Takebayashi, H., Nabeshima, Y., Yoshida, S., Chisaka, O., Ikenaka, K. and Nabeshima, Y. (2002) 'The basic helix-loop-helix factor *olig2* is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages', *Curr Biol* 12(13): 1157-63.

Takebayashi, H., Usui, N., Ono, K. and Ikenaka, K. (2008) 'Tamoxifen modulates apoptosis in multiple modes of action in CreER mice', *Genesis* 46(12): 775-81.

Takebayashi, H., Yoshida, S., Sugimori, M., Kosako, H., Kominami, R., Nakafuku, M. and Nabeshima, Y. (2000) '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(1-2): 143-8.

Wilson, L. and Maden, M. (2005) 'The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube', *Dev Biol* 282(1): 1-13.

Zhou, Q. and Anderson, D. J. (2002) 'The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification', *Cell* 109(1): 61-73.

Zhou, Q., Wang, S. and Anderson, D. J. (2000) 'Identification of a novel family of oligodendrocyte lineage-specific basic helix-loop-helix transcription factors', *Neuron* 25(2): 331-43.