

腹側視床の形成と視床皮質投射の軸索ガイダンス

小野勝彦 (1)、山内菜緒 (1,2)、後藤仁志 (1)、吉井健悟 (3)、野村真 (1,4)

- (1) 京都府立医科大学大学院 神経発生生物学教室
- (2) 岡山大学医学部医学科 ART プログラム
- (3) 京都府立医科大学大学院 基礎統計学
- (4) JST、さきがけ研究員

I. はじめに

大脳皮質と視床との間には、相互に局在性を持った線維連絡があり、皮質機能の重要な神経回路基盤となっている。すなわち、大脳皮質から伸びてくる線維を受ける視床の領域は、逆にその皮質領域に線維を送っており、これを相反投射という(Ono and Niimi, 1986)。これらの回路は、腹側視床 (prethalamus) に含まれる視床網様核を含めて、大脳皮質と視床との相互フィードバック系を形成している。大脳皮質から視床へ投射するニューロンと視床ニューロンは、そのほとんどがグルタミン酸作働性の興奮性ニューロンであり、これに対して視床網様核ニューロンは GABA 作働性抑制性ニューロンから構成される(Takebayashi et al., 2008)。これまでの形態学的研究から、性質を全く異にするこの二群のニューロンは、発生の過程で緊密な相互作用をもって回路形成にかかわっていることが示唆されている。筆者らは、prethalamus が転写因子 *Olig2* によって領域形成の制御が行われることを明らかにしてきた(Ono et al., 2014ab)。本総説では、prethalamus がどのような仕組みで視床皮質間の回路形成にかかわっているか、また *Olig2* 系譜細胞が神経回路形成にどのような機能を持っているか、まとめた。

II. 視床皮質投射の形成と中間標的

視床皮質ニューロンは、視床皮質投射回路の形成過程で腹外側方向に軸索を伸ばして隣接する腹側視床 (prethalamus) を通過し、間脳-終脳境界を越える。次いで背外側方向に伸長方向を変えて終脳腹側部の基底核原

基に入り，ここを通過した後に大脳皮質に到達する(Lopez-Bendito and Molnár, 2003; Molnár et al., 2012). 基底核原基には corridor cell とよばれる細胞集団が視床ニューロンからの軸索を大脳皮質に向かってガイドすることが報告されており，このような機能を持った細胞を中間標的とかガイドポスト細胞とよぶ. Corridor cell は外側基底核原基に由来する Islet1/2 系譜の細胞で，この細胞が発現する Neuregulin 1 が軸索ガイダンスの分子実体であることが明らかにされている(Lopez-Bendito et al., 2006).

一方，上述の通り視床皮質線維は必ず prethalamus を通ることから，この領域も視床皮質回路形成の中間標的とみなされてきた(Lopez-Bendito and Molnár, 2003). 事実，prethalamus の領域形成に異常をきたすさまざまな遺伝子変異マウス・ノックアウトマウスで，視床皮質投射に乱れが生じることが報告されてきた. たとえば Pax6 変異マウスでは，視床ニューロンの軸索は間脳-終脳境界を越えることなく腹側方向に伸びて視床下部にはいる(Kawano et al., 1999). また，線毛形成に関わる転写因子 Rfx1 欠損マウスでも prethalamus の低形成と視床皮質投射の異常がみられ，合わせて終脳腹側部で軸索誘因分子の発現が高まっている(Magnani et al., 2015). その一方，どのような仕組みで prethalamus が視床皮質線維の伸長・回路形成を調節しているのかは，ほとんど明らかにされていない. 著者らのグループでは，転写因子 Olig2 の前脳形成における機能を明らかにするため，Olig2 欠損マウスを解析してきた. その過程で，prethalamus の低形成とこの腹側に隣接する thalamic eminence (視床隆起) の背側方向への領域拡大を見出して報告した(Ono et al., 2014ab). この表現型をもとに，以下の通り prethalamus の回路形成の調節機構の一端が明らかになった.

III. Olig2 欠損マウスにおける視床皮質投射形成とその異常

視床皮質投射は，E13.5 から形成が始まるので，この時期の軸索走行をニューロフィラメント (NF-M) に対する抗体を用いて免疫組織化学的に調べた. この時期の野生型マウスの背側視床では，軸索は外套層と辺縁帯

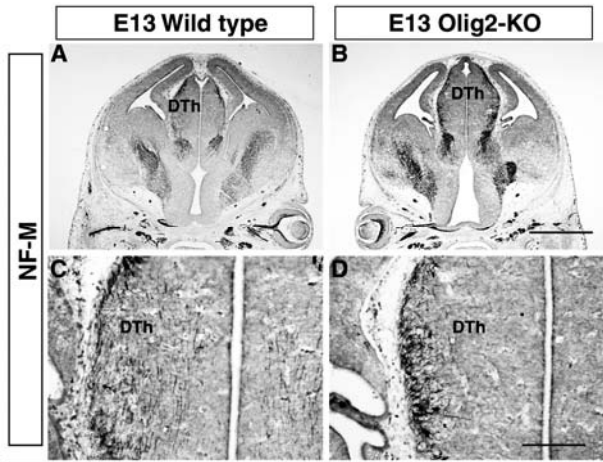


図1 胎齢 13.5 日目の視床で見られる軸索の走行. ニューロフィラメントに対する抗体で免疫染色している. 野生型 (A,C) では軸索は視床内をほぼ平行に走行しているのに対して, Olig2 欠損マウスでは辺縁部に偏在し, 軸索の凝集も見られる. DTh, dorsal thalamus. スケールは B=1mm, D=200 μ m.

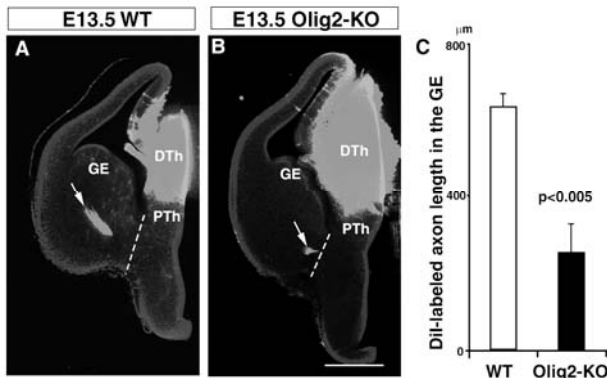


図2 胎齢 13.5 日目の視床皮質線維の伸長. 視床 (DTh) に蛍光色素 Dil を注入して視床皮質線維を標識し, 矢印はその先端部を示す. 野生型(A)では基底核原基(GE)の中ほどまで伸長しているのに対して, Olig2 欠損マウスでは終脳-間脳境界部 (破線) を越えたところまでしか伸びていない. PTh, prethalamus. スケールは 500 μ m. C, 終脳-間脳境界部から Dil で標識された視床皮質線維の先端部までの長さ. Olig2 欠損マウスでは明らかに短い.

に均一に分布しており, 冠状断で背腹軸方向に走行していた. これに対してノックアウトマウスでは, NF-M 陽性を示す軸索は辺縁部に偏在しておりランダムな走行をしたり, 軸索の凝集を形成したりしていた (図1).

視床皮質投射の形成初期から軸索走行に異常が見られることから, さらに視床皮質線維を蛍光トレーサーである DiI で標識して調べた. E13.5 のマウス胎仔を固定し正中断して左右に分けた後, 背側視床に少量の DiI 色素を注入した. これを, 37 $^{\circ}$ Cに4日間置き, DiI を軸索上で拡散させて伸長を調べた. その結果, 野生型では DiI で標識された軸索は, 視床後部の腹側部から腹

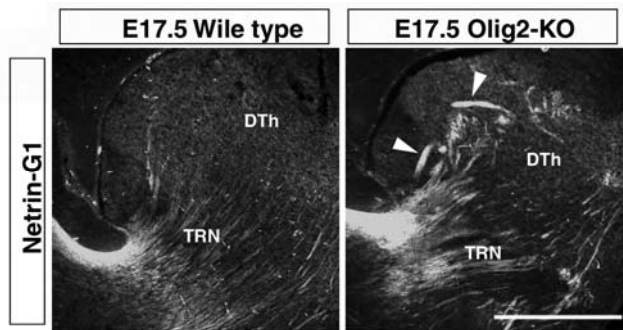


図3 胎齢 17.5 日目の視床内での視床皮質線維の走行-1. Netrin-G1 の免疫染色で可視化している. Olig2 欠損マウスでは, 神経束が形成され不規則な方向に伸長している (矢頭). TRN, thalamic reticular nucleus. スケールは 500 μ m.

外側方向に伸び、その後、前背側方向に伸長方向を変えて、基底核原基の中程に到達していた。一方、Olig2 欠損マウスでは、背側視床から終脳-間脳境界部を出たところで伸長が止まっ

ていた。明らかに軸索伸長が阻害されていた (図2)。

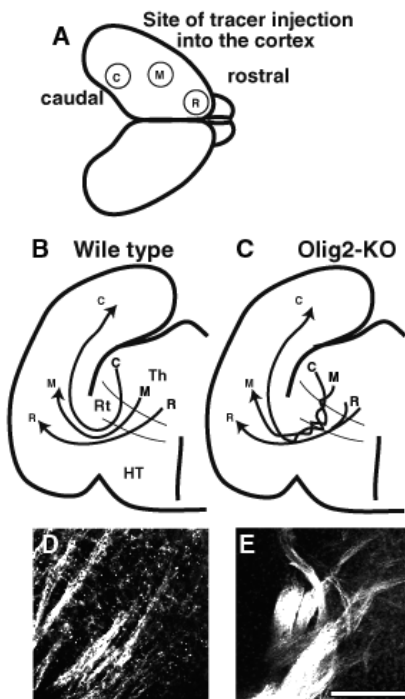


図4 胎齢 17.5 日目の視床内での視床皮質線維の走行と局在. 大脳皮質への蛍光色素の注入により可視化している. A, 大脳皮質への蛍光色素注入の模式図. R,M,C はそれぞれ吻側部, 中間部, 尾側部を示す. B,C, 視床皮質線維の視床内での走行と投射の模式図. Olig2 欠損マウスでは, おおよその局在性は保たれているが, 視床内では軸索相互の交叉などの異常な走行がみられる. D,E, Dil で標識された軸索の視床内での走行. Olig2 欠損マウス(E)では, 軸索の異常な束化と交叉とが認められる. Rt, 視床網様核. スケールは 100 μ m.

胎生後期の野生型マウスの視床では, NF-M 陽性線維や視床皮質線維の選択的マーカーである netrinG1 に陽性を示す線維は背内側から腹外側方

向に走行して、視床網様核を横切っている。個々の軸索は相互に平行であり、交叉する軸索はほとんど見られない。一方で、**Olig2** 欠損マウスでは、**netrinG1** 陽性線維が異所性に束化しており、ランダムな走行が見られた（図3）。さらに、この時期の大脳皮質の前後軸上の三点に脂溶性蛍光レーザーである **DiI** と **DiA** を注入して、標識される視床皮質線維の走行を調べた。その結果、野生型マウスでは **netrinG1** 陽性軸索で見られたと同様に、軸索は相互に並走していた。これに対して **Olig2** 欠損マウスの視床では、視床皮質投射の大まかな局在性は保たれていたが、異常な軸索束は視床内で交叉しており異常な走行をしていた（図4）。このように、**Olig2** 欠損マウスでは、視床皮質回路形成の初期には線維の伸長に遅延がみられ、胎生後期には視床内での軸索走行に乱れが生じていた。

IV. 軸索ガイダンス分子の発現と **Olig2** の欠損による変化

このような表現型は、**Olig2** 欠損マウスで見られる視床皮質線維の走行の遅延や異常が、その通過経路での軸索ガイダンス分子の発現変化により細胞非自律的に引き起こされたものであることを強く示唆している。そこで、**Olig2** 欠損マウスの E13.5 前脳で発現する遺伝子をマイクロアレイ解析した。そのデータをもとに **pathway** 解析を行うと、**axon guidance** に関連する遺伝子群に多くの発現変化が認められた（吉井ら、未発表）。したがって、マイクロアレイで示された遺伝子発現変化と、脳の形成異常との間に一致した結果がみられた。発現変化が示唆された遺伝子をさらに詳細に調べた結果、**Eph-ephrin** 遺伝子のいくつかに発現が上昇していた。**Eph-ephrin** は、軸索伸長を抑制する受容体ーリガンド系であり、さらに逆シグナルとして **Eph** がリガンドとして **ephrin** に結合してこれが受容体としてシグナルを伝えて軸索伸長が抑制されることも示されている (Xu and Henkemeyer, 2012)。

In situ hybridization により、空間的発現パターンを調べると、野生型では **prethalamus** では **EphA3** と **EphA5** の発現がほとんど見られなかったのに対して、ノックアウトマウスでは視床隆起領域の背側方向への拡大に伴い **EphA3**, **EphA5** 陰性の領域が狭くなるか、またはなくなっていた

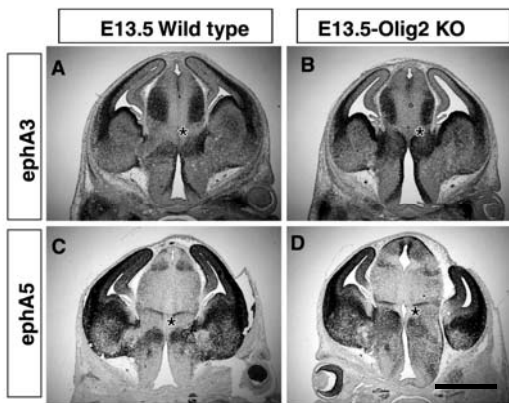


図5 胎齢13.5日目の前脳におけるEphA3とEphA5の発現。Olig2欠損マウス(B,D)では、Ephの陰性領域(★)が、野生型と比べて縮小している。スケールは1mm。

の突起の長さがコントロールと比較して短く軸索伸長が抑制されていた(図6)。したがって、EphA3が視床ニューロンの軸索伸長を阻害することが示された。これに似た現象として、prethalamusの組織が背側視床ニューロンの軸索伸長に対して反発活性を持つことが共培養実験から報告されている(Mandai et al., 2009)。

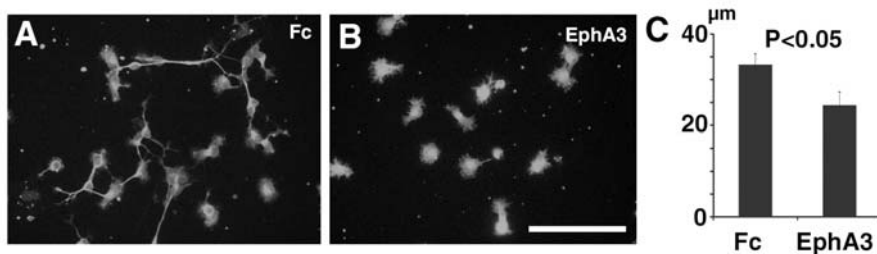


図6 EphA3による視床ニューロンの軸索伸長抑制。培養皿にEphA3(B)またはコントロールFc(A)をコートしその上で視床細胞を培養。40時間の培養ののち固定し、ClassIIIβチューブリンを免疫染色し、その長さを計測した。スケールは100μm。Cは突起の長さの平均。EphA3基質上では有意に軸索伸長が抑制された。

では、どのような分子がprethalamusで発現して視床皮質線維の軸索伸長を誘導しているか、permissiveまたはattractiveな基質として機能するに必要な分子はなにか、今回の実験では明らかには出来ておらず今後の大

(図5)。Ephの視床ニューロンの軸索伸長に対する影響を調べるため、次のような培養実験を行った。すなわち、EphA3-Fc融合タンパクを培養基質に塗布しその上で胎仔の視床からとってきた神経前駆細胞を培養した。コントロールとしては、Fcを塗布した培養基質を用いた。その結果、EphA3を塗布した基質上では、ニューロン

きな課題として残されている。視床皮質投射回路の形成にかかわる分子には、いくつかのプロテオグリカンが知られているが、これらのコアタンパクは今回用いたマイクロアレイには載っていなかった。このため、回路形成と関連が示唆されている syndecan 3 および neurocan の発現を定量 PCR で調べた。E13.5 および E15.5 の前脳から全 RNA を抽出して逆転写反応ののち、real time PCR を行った。その結果、発生に伴った発現変化は認められたが、Olig2 の欠損マウスと野生型との間での発現変化はみられなかった。これは、in situ hybridization を用いた定性的な解析でも同様に大きな違いは認められなかった（山内ら、未発表）。したがって、プロテオグリカンは prethalamus における軸索ガイダンスには積極的にはかかわっていないことが明らかとなった。

V. 細胞分化・領域形成と軸索ガイダンス —まとめにかえて—

これらの結果をまとめると、Olig2 は正常な間脳の形成過程では、(1)脳室面で prethalamus の細胞運命を決める、(2)その過程で Olig2 は視床隆起の細胞で発現する何らかの転写因子と相互抑制的に作用し、prethalamus と視床隆起の境界を形成する、(3)視床隆起に分化した細胞では EphA3 などの軸索伸長抑制分子を発現する、(4)prethalamus では EphA3 を発現することなく視床皮質線維が伸長する、(5)Olig2 の欠損で視床隆起が背側方向に拡大すると EphA3/EphA5 発現領域が拡大して視床皮質線維には抑制的な環境となり軸索伸長が妨げられる、ということが考えられる。視床隆起は間接的に視床皮質線維の伸長方向を規定していることが示された。

Olig2 は細胞分化を誘導する転写因子としての機能が明らかにされている。脊髄では、その発生の初期には運動ニューロンが、その後にはオリゴデンドロサイト前駆細胞が、Olig2 により分化してくる(Masahira et al., 2006)。さらに、筆者らは、前脳においては prethalamus の細胞分化を調節して領域形成にかかわることを示した。その分化した（もしくは分化途上にある）細胞が視床皮質線維をガイドする機能を備えている。Olig2 陽性細胞は、脳幹において顔面神経ニューロンの移動の経路中に存在しその

移動を制御することが示唆されている(Zannino et al., 2012). また, オリゴデンドロサイト前駆細胞に分化した Olig2 系譜細胞は軸索ガイダンス分子である Semaphorin 5a を(Goldberg et al., 2004), 同様に運動ニューロンに分化した細胞は NT4 や Slit2 を発現し, 回路形成を調節する可能性が示唆されている(Usui et al., 2012). このように, 今回の結果も含めて Olig2 は環境因子として軸索伸長/回路形成を調節する細胞を生み出すという点で, 領域を越えて共通した機能を持っている可能性がある. Olig2 によって発現調節を受ける軸索ガイダンス分子は今のところ不明であるが, 今後はこのような視点からも Olig2 の機能を明らかにされていくものと予想される.

本研究の一部は文部科学省及び日本学術振興会科学研究費補助金の援助を得て, 池田一裕博士(生理学研究所), 竹林浩秀博士(新潟大学), Carlos M. Parras 博士(INSERM, Paris), 糸原重美博士(理研 BSI), 嶋村健児博士(熊本大学)らとの共同研究として行われた.

文献

Goldberg, J. L., Vargas, M. E., Wang, J. T., Mandemakers, W., Oster, S. F., Sretavan, D. W. and Barres, B. A. (2004) 'An oligodendrocyte lineage-specific semaphorin, Sema5A, inhibits axon growth by retinal ganglion cells', *J Neurosci* 24(21): 4989-99.

Kawano, H., Fukuda, T., Kubo, K., Horie, M., Uyemura, K., Takeuchi, K., Osumi, N., Eto, K. and Kawamura, K. (1999) 'Pax-6 is required for thalamocortical pathway formation in fetal rats', *J Comp Neurol* 408(2): 147-60.

Lopez-Bendito, G., Cautinat, A., Sanchez, J. A., Bielle, F., Flames, N., Garratt, A. N., Talmage, D. A., Role, L. W., Charnay, P., Marin, O. et al. (2006) 'Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation', *Cell* 125(1): 127-42.

Lopez-Bendito, G. and Molnar, Z. (2003) 'Thalamocortical development: how are we going to get there?', *Nat Rev Neurosci* 4(4): 276-89.

- Magnani, D., Morle, L., Hasenpusch-Theil, K., Paschaki, M., Jacoby, M., Schurmans, S., Durand, B. and Theil, T. (2015) 'The ciliogenic transcription factor Rfx3 is required for the formation of the thalamocortical tract by regulating the patterning of prethalamus and ventral telencephalon', *Hum Mol Genet* 24(9): 2578-93.
- Mandai, K., Guo, T., St Hillaire, C., Meabon, J. S., Kanning, K. C., Bothwell, M. and Ginty, D. D. (2009) 'LIG family receptor tyrosine kinase-associated proteins modulate growth factor signals during neural development', *Neuron* 63(5): 614-27.
- 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.
- Molnar, Z., Garel, S., Lopez-Bendito, G., Maness, P. and Price, D. J. (2012) 'Mechanisms controlling the guidance of thalamocortical axons through the embryonic forebrain', *Eur J Neurosci* 35(10): 1573-85.
- Ono, K., Gotoh, H. and Nomura, T. (2014a) 'Region formation in the diencephalon by the Olig2 transcription factor (in Japanese)', *Studia Humana et Naturalia* 48: 63-70.
- Ono, K., Clavairoly, A., Nomura, T., Gotoh, H., Uno, A., Armant, O., Takebayashi, H., Zhang, Q., Shimamura, K., Itohara, S. et al. (2014b) 'Development of the prethalamus is crucial for thalamocortical projection formation and is regulated by Olig2', *Development* 141(10): 2075-84.
- Ono, K. and Niimi, K. (1986) 'Afferent projections to the thalamic mediodorsal nucleus in the cat studied by retrograde and anterograde axonal transport of horseradish peroxidase', *J Hirnforsch* 27(6): 597-610.
- 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.

Usui, N., Watanabe, K., Ono, K., Tomita, K., Tamamaki, N., Ikenaka, K. and Takebayashi, H. (2012) 'Role of motoneuron-derived neurotrophin 3 in survival and axonal projection of sensory neurons during neural circuit formation', *Development* 139(6): 1125-32.

Xu, N. J. and Henkemeyer, M. (2012) 'Ephrin reverse signaling in axon guidance and synaptogenesis', *Semin Cell Dev Biol* 23(1): 58-64.

Zannino, D. A., Sagerstrom, C. G. and Appel, B. (2012) 'olig2-Expressing hindbrain cells are required for migrating facial motor neurons', *Dev Dyn* 241(2): 315-26.