

## 視神経オリゴデンドロサイトの起源とマウスとニワトリでの種差

小野勝彦<sup>1</sup>、富永洋之<sup>1,2</sup>、栗田菜花<sup>1,3</sup>、後藤仁志<sup>1</sup>、野村真<sup>1</sup>

1、京都府立医科大学大学院 神経発生生物学、2、京都府立医科大学医学部医学科、  
3、新潟大学医学部医学科

### 抄録

中枢神経系内のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトは、脳の形成過程の初期には、限局した領域から生み出されることが知られている。視神経のオリゴデンドロサイトは、脳内に起源をもち移動によって視神経に入っていくことが報告されている。ニワトリでは、第三脳室底で視交叉上領域の神経上皮層に起源をもつことが知られていたが、マウスなどげっ歯類もしくは哺乳類の視神経オリゴデンドロサイトの起源は不明のままであった。著者らのグループは、PDGFR $\alpha$ とOlig2を指標として解析し、胎児期の視索前野に起源をもつことを示した。すなわち、マウスとニワトリとで、オリゴデンドロサイトの起源に種差がみられることが分かった。本稿では、視神経オリゴデンドロサイトの起源の研究をまとめて、これにみられる種差にどのような意味があるか今後の課題を含めて考えてみたい。

### はじめに：O-2A 前駆細胞と視神経オリゴデンドロサイトの脳内起源

脊椎動物の脳内には、大まかに4種類の細胞が存在する。すなわち、神経細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、ミクログリアである。このうちオリゴデンドロサイトは軸索をミエリン膜で包み、ミエリンの不連続部であるランビエの絞輪でのみ活動電位が誘発される跳躍伝導により、神経の伝導速度を飛躍的に高める。ミエリンやその形成に異常をきたす脱髄疾患では、伝導速度の低下のみならず、様々な高次機能にも異常がみられるようになる。このため、ミエリンの再生に関する研究は再生医学の中でも大きな位置を占めている。ミエリンやオリゴデンドロサイトの発生過程は、これらの再生の仕組みを明らかにするうえでも重要である。

オリゴデンドロサイト発生の細胞生物学的な解析は、1980年代に新生児ラットの視神経の培養細胞からO-2A前駆細胞が見出されたことから始まる(Raff et al. 1984)。O-2A前駆細胞は、特定のガングリオンを認識するA2B5抗体で染まる細胞として

同定され、培養条件によりオリゴデンドロサイトまたはアストログリア（タイプ2アストロサイト）に分化することから名前がついた。O-2A 前駆細胞を新生児マウスの脳内に移植するとすべてがオリゴデンドロサイトに分化することから、この細胞は生体内のオリゴデンドロサイト前駆細胞であることがわかった（Espinosa de los Monteros et al. 1993）。また、タイプ2アストロサイトは、生体内でこれに相当する細胞が見出されず、培養下でのアーティファク的な現象であると決着がついている（Skoff and Knapp 1991）。しかし、O-2A 前駆細胞はオリゴデンドロサイトの発生機構解明の上では非常に重要な役目を果たした（Miller et al. 1989）。

視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞（もしくはO-2A 前駆細胞）は周産期からみられるもので、視神経もしくは視柄（optic stalk）に最初からみられるわけではない。ラット胎仔の視神経を、長軸方向に網膜側、真ん中、視交叉側の3つに分けて、それぞれ別々に組織片培養すると、早い時期（より幼若な時期）では視交叉側の培養からのみO-2A 前駆細胞が出現し、発生が進むと真ん中の組織片、さらに網膜側にも出現することから、O-2A 前駆細胞、つまりオリゴデンドロサイト前駆細胞は、脳内に起源をもつと考えられるようになった（Small et al. 1987）。

### PDGFR $\alpha$ とオリゴデンドロサイト前駆細胞

O-2A 前駆細胞は血小板由来成長因子（PDGF）により増殖することから、その受容体の $\alpha$ サブユニット（PDGF receptor  $\alpha$ ; PDGFR $\alpha$ ）を発現している（Richardson et al. 1988）。PDGFR $\alpha$  に対する抗体を用いてこれに結合する細胞を単離すると、オリゴデンドロサイト前駆細胞が単離されることも報告されている（Hall et al. 1996）。オリゴデンドロサイトは、脊髄では発生過程でその腹側部から出現することが示されていたが、PDGFR $\alpha$  が脊髄脳室層腹側部の限局した領域（pMN/OL ドメイン）から出現すること、マウスを用いたPDGFの過剰発現やノックアウトでそれぞれオリゴデンドロサイト前駆細胞が過剰増殖または低形成されることなどから、PDGFR $\alpha$  陽性細胞がオリゴデンドロサイト前駆細胞であるとみなされるようになった（Fruttiger et al. 1999; Calver et al. 1998）。さらに、オリゴデンドロサイト系譜細胞やその分化に必須の分子であるOlig2やSox10が、PDGFR $\alpha$  と同じ発現パターンを示すことも明らかとなった。

上記のPDGFR $\alpha$  陽性細胞も、新生児ラットの視神経では最初は視交叉側にのみみ

られ、発生が進むと視神経全体に見られるようになり、培養実験の結果が反映されているような組織像が報告された。しかし、前脳では、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は脊髄と異なり、明瞭な限局した出現様式がみられず、視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞が脳内のどこに起源をもつのかは不明であった。

### ニワトリ胚視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞の起源領域

ラット胎児で視神経オリゴデンドロサイト前駆細胞の脳内起源が示唆された1990年前後には、まだ遺伝子改変動物はほとんど報告されておらず、発生機構解明のための実験形態学的解析の主役はニワトリ胚や両生類であった。また、この時代にはPDGFR $\alpha$ の発現は放射性同位元素で標識されたプローブを用いた*in situ* hybridization法によってのみ検出可能であり、非常に煩雑な手順を必要とした。このため、著者らはニワトリ胚でオリゴデンドロサイトをその前駆細胞の段階から認識する抗体をスクリーニングし、その結果単クローン抗体O4をマーカー抗体として見出した。ニワトリ胚の脊髄では、O4陽性細胞は孵卵6日目でハンバーガー・ハミルトンのステージ29 (HHstage29)の脊髄脳室層の腹側部から出現し、徐々に脊髄全体に広がっていく(Ono et al. 1995)。これは、ラット脊髄でのPDGFR $\alpha$ 陽性細胞の出現様式とよく似ている(後に全く同じではないことが示された(Fu et al. 2002))。

著者らは、このO4抗体を発達段階の視神経および前脳に適用して免疫組織化学的解析を行い、視神経オリゴデンドロサイト前駆細胞の出現様式を調べた。その結果、ニワトリ胚では視神経もしくはこれに近接した領域として、第三脳室底部で視交叉の予定領域の背側に隣接した神経上皮層で最初にO4陽性細胞が少数出現する。発生が進み視交叉ができると、明瞭な細胞集団となりここから視神経に向かってO4陽性細胞が移動していく様子が見られる(Ono et al. 1997)。最近では、O4抗体以外にもオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーが知られており、例えば上述のPDGFR $\alpha$ やOlig2も、この領域に限局して発現することが示された(Ono et al. 2017a)。特に、Olig2は視交叉ができつつある非常に早い時期から発現することが明らかになっている(栗田ら、未発表データ)。オリゴデンドロサイト前駆細胞は、視神経に入った後、移動と増殖によって視神経全体にO4陽性細胞が拡がり、ミエリン形成オリゴデンドロサイトへと分化する。多くの哺乳類では、オリゴデンドロサイト前駆細胞の移動は強膜篩板まででとまり、網膜内にミエリン/オリゴデンドロサイトはない(Ding et al.

2002)。一方、非哺乳類脊椎動物では、オリゴデンドロサイト前駆細胞が網膜内まで入りその中でミエリンを形成する。オリゴデンドロサイトは神経節細胞層に位置する (Nakazawa et al. 1993; Ono et al. 1998)。

脳内から視神経への移動は、ニワトリ胚の第三脳室に蛍光色素 DiI を注入すると、視神経の中に O4/DiI 二重陽性細胞が出現することから示された。このように、ニワトリ胚を用いた解析から、視神経オリゴデンドロサイトの脳内における起源が視交叉上領域であることが明らかとなった (Ono et al. 1997)。

### マウス視神経のオリゴデンドロサイトの起源

この結果が報告されると、ラットやマウスなど哺乳動物でも同じ領域に由来するものかどうかという検証が行われた。O4 抗原であるスルファチドは、マウスではオリゴデンドロサイトの分化が進んだ段階から検出可能となるため、PDGFR $\alpha$  やミエリンタンパクである PLP の発現を指標として形態学的解析が行われた。マウスでも、発生が進み周産期になると視交叉上領域に PDGFR $\alpha$  陽性細胞は出現するが、散在性の分布でありニワトリ胚のように明瞭な細胞集団は認められなかった。また、Olig2 の発現は、E12.5 などの発生の早い時期には、将来の視交叉となる領域にはみられず、このことからマウスでは視交叉領域がオリゴデンドロサイトの起源領域ではないと考えられた。

Olig2-CreER マウスは、Olig2 の遺伝子座に Cre リコンビナーゼと改変エストロゲン受容体 (ER) の遺伝子が導入されており、エストロゲンのアンタゴニストであるタモキシフェンの投与により、Olig2 発現細胞の細胞質に局在していた CreER タンパクが、核内に移行し loxP 配列があればこれを認識して組み換えが誘導される (Takebayashi et al. 2002)。著者らのグループでは、Olig2-CreER と Rosa レポーターマウス (Cre リコンビナーゼで認識される loxP 配列にはさまれて Stop codon がありその下流 3' 側に GFP 遺伝子がある) とを交配させ、妊娠動物にタモキシフェンを投与することで、胎児期の Olig2 発現細胞を GFP で永続的に標識し、その細胞系譜を追跡している (Masahira et al. 2006)。視神経において、Olig2 発現細胞は E15 ~ E16 に視神経交叉側から出現しそれ以前にはみられないことから、これ以前にタモキシフェンを投与すると脳内の Olig2 陽性細胞だけが GFP で標識されることになる。Olig2-CreER:Rosa レポーター妊娠マウスの E11.5 でタモキシフェンを投与した場合、周

産期の視神経に GFP 陽性細胞が出現しないことから、この時期にはまだ視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞はまだ作られていない可能性が高い。これに対して、E12.5 以降でタモキシフェン投与すると視神経に GFP 陽性細胞がみられるようになる。これを成体（30 日目および 180 日目）まで育てると、視神経に GFP 陽性ミエリンがみられるようになる。すなわち、GFP 陽性細胞のほとんど（85% 以上）がオリゴデンドロサイトのマーカーである CC1 に陽性を示し、その突起が PLP 陽性となる (Ono et al. 2017b)。したがって、視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞は、E12.5 までに脳内のどこかで作られることが明らかになった。また、Cre リコンビナーゼのレポーターマウスとして、細胞全体が染まるものの組み換え効率が低い Z/EG マウスを用いた場合には、同じスケジュールで実験を行っても、視神経では GFP 陽性細胞はほとんど出現しなかったことから、脳内にある視神経のオリゴデンドロサイト前駆細胞は非常に少数であることが予想された。

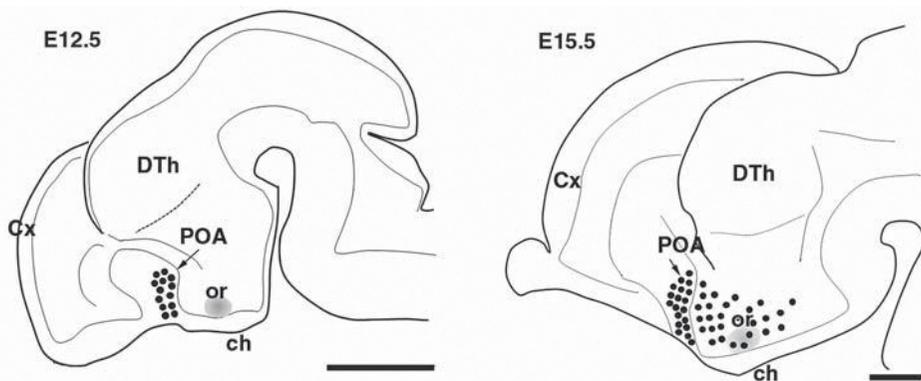


図1 マウス胎仔における視床下部～視交叉におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC; ●) の出現と拡散。胎仔の脳を正中断して PDGFR $\alpha$  に対する抗体を用いて whole-mount 免疫染色したものの模式図。E12.5 では視索前野 (POA) に PDGFR $\alpha$  陽性 OPC が出現する。E15.5 になると、視床下部後部まで広がる。Cx, 大脳皮質。ch, 視交叉。DTh, 背側視床。or, (胎仔期の) 第三脳室視交叉陥凹。

では脳内のどの領域に由来するのか? E12.5 の前脳では、Olig2 は内側線条体原基 (medial ganglionic eminence) と視索前野の脳室層に広く発現しているが、PDGFR $\alpha$  陽性細胞は視索前野の一部の領域に見られる。Olig2-CreER/Rosa レポーターマウスの E12.5 にタモキシフェンを投与して 1 日、または 2 日間の生存期間において前脳内を調べると (短期系譜解析)、視索前野～視床下部前部に GFP 陽性で

PDGFR $\alpha$  陽性を示す細胞が多くみられ、視床下部後部になると PDGFR $\alpha$  陽性細胞がみられなくなる。E12.5 および E15.5 の前脳を PDGFR $\alpha$  に対する抗体で whole-mount 免疫染色すると、E12.5 では第三脳室前部の視索前野に陽性細胞の集団がみられた (図 1) が、視神経 (この段階ではまた optic stalk) 周辺には見られなかった。3 日後の E15.5 になると、陽性細胞の分布は視索前野から尾側方向に視交叉をこえて視床下部に広がっていた。そして、PDGFR $\alpha$  は視交叉領域から第三脳室視交叉陥凹の脳室壁にもみられ、これらの細胞が視神経に入っていくと考えられた (図 1)。以上の Olig2 の発現分布、短期系譜解析および PDGFR $\alpha$  の whole-mount 免疫染色から、E12.5 にタモキシフェンを投与して成体の視神経で見られる GFP 陽性オリゴデンドロサイトは、胎児期の視索前野に由来することが強く示唆された (Ono et al. 2017b)。

#### 種差の解析へむけて：まとめに代えて

ニワトリ胚では、視神経のオリゴデンドロサイトは視神経に接した第三脳室底部の神経上皮層に起源をもつものに対して、マウスでは視神経から距離を置いた視索前野の神経上皮層に起源をもつことが明らかとなった (図 2)。すなわち、種差が示された。この種差にはどのような意味が含まれるのか、今後の課題とともに考えてみたい (Ono et al. 2017a)。

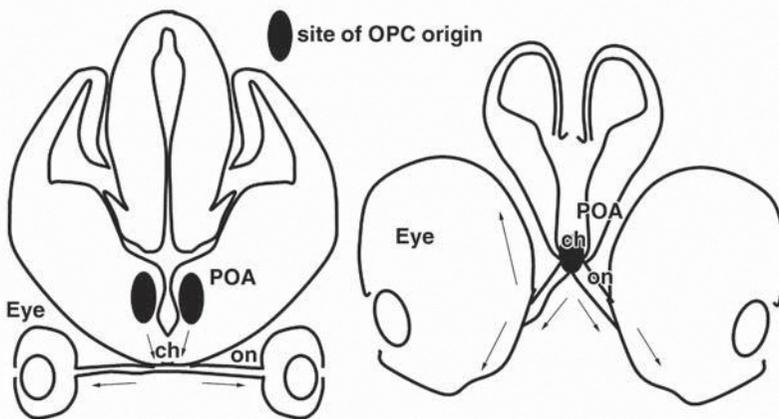


図 2 マウス胎仔 (左) とニワトリ胚 (右) におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の出現拡散様式の種差。矢印は、OPC の移動方向。ニワトリ胚では OPC が眼球/網膜まで入るのに対して、マウスでは視神経の網膜側末端で止まる。脳のサイズに対しての眼球のサイズの違いにも注目してもらいたい。ch, 視交叉。Eye, 眼球。on, 視神経。POA, 視索前野。

まず、マウスとニワトリの視覚系の構造の違いを見てみる。マウスの視神経ではその直径は細く視交叉から網膜までは長いのに対して、ニワトリでは逆に短く太い。眼球のサイズは、脳と比較するとマウスでは相対的に小さくニワトリでは大きい。また、哺乳動物の多くでは視神経の網膜側末端の強膜篩板でオリゴデンドロサイト前駆細胞の移動が止まり網膜内にオリゴデンドロサイトやミエリン形成がみられないのに対して、非哺乳類脊椎動物では網膜の中にもオリゴデンドロサイト前駆細胞が入りミエリンが形成される (Nakazawa et al. 1993; Tian et al. 2016)。これらの違い (図 2) から、どちらの視神経がより多くのオリゴデンドロサイト前駆細胞を必要とするのか、という点を考える必要があるかもしれない。著者らの研究室では、大脳皮質の進化的起源を調べており、非羊膜脊椎動物として爬虫類の胚も研究に用いている (Nomura et al. 2016)。眼球と脳の相対的な大きさについては、爬虫類のスッポン胚がちょうど中間的 (相対的にマウス胎仔より大きくニワトリ胚より小さな眼球) であることがわかり、これを用いてオリゴデンドロサイトの発生を調べることにより何らかのヒントが得られる可能性がある。予備実験から、マウス胎仔やニワトリ胚で使える *Olig2*、*Sox10*、*PLP* に対する抗体が、スッポンの組織でも反応することがわかった。また、*in situ* hybridization により *PDGFR $\alpha$*  の mRNA の発現パターンから、スッポンでもこの分子がオリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーとして使えることが示された。今後は、脳、視神経、網膜のサイズや発生の時間軸も含めて、オリゴデンドロサイト前駆細胞ならびにオリゴデンドロサイトの出現やミエリン形成の様式を基に、発生起源の種差の意味をさらに考えていきたい。

## 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費基盤研究 (C) の援助のもとに行われた。  
開示すべき潜在的利益相反はない。

## 文献

- Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1998) Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron* 20 (5):869-882
- Ding L, Yamada K, Takayama C, Inoue Y (2002) Development of astrocytes in the

- lamina cribrosa sclerae of the mouse optic nerve, with special reference to myelin formation. *Okajimas folia anatomica Japonica* 79 (5):143-157
- Espinosa de los Monteros A, Zhang M, De Vellis J (1993) O2A progenitor cells transplanted into the neonatal rat brain develop into oligodendrocytes but not astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1):50-54
- Fruttiger M, Karlsson L, Hall AC, Abramsson A, Calver AR, Bostrom H, Willetts K, Bertold CH, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD (1999) Defective oligodendrocyte development and severe hypomyelination in PDGF-A knockout mice. *Development* 126 (3):457-467
- Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M, Richardson W, Qiu M (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of *Olig2* and *Nkx2.2* in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129 (3):681-693
- Hall A, Giese NA, Richardson WD (1996) Spinal cord oligodendrocytes develop from ventrally derived progenitor cells that express PDGF alpha-receptors. *Development* 122 (12):4085-4094
- Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez-Buylla A, Shimizu K, Ikenaka K (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. *Developmental biology* 293 (2):358-369. doi:10.1016/j.ydbio.2006.02.029
- Miller RH, French-Constant C, Raff MC (1989) The macroglial cells of the rat optic nerve. *Annual review of neuroscience* 12:517-534. doi:10.1146/annurev.ne.12.030189.002505
- Nakazawa T, Tachi S, Aikawa E, Ihnuma M (1993) Formation of the myelinated nerve fiber layer in the chicken retina. *Glia* 8 (2):114-121. doi:10.1002/glia.440080207
- Nomura T, Ohtaka-Maruyama C, Yamashita W, Wakamatsu Y, Murakami Y, Calegari F, Suzuki K, Gotoh H, Ono K (2016) The evolution of basal

- progenitors in the developing non-mammalian brain. *Development* 143 (1):66-74. doi:10.1242/dev.127100
- Ono K, Bansal R, Payne J, Rutishauser U, Miller RH (1995) Early development and dispersal of oligodendrocyte precursors in the embryonic chick spinal cord. *Development* 121 (6):1743-1754
- Ono K, Hirahara Y, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Yamada H, Ikenaka K (2017a) Origin of Oligodendrocytes in the Vertebrate Optic Nerve: A Review. *Neurochemical research*. doi:10.1007/s11064-017-2404-8
- Ono K, Tsumori T, Kishi T, Yokota S, Yasui Y (1998) Developmental appearance of oligodendrocytes in the embryonic chick retina. *The Journal of comparative neurology* 398 (3):309-322
- Ono K, Yasui Y, Rutishauser U, Miller RH (1997) Focal ventricular origin and migration of oligodendrocyte precursors into the chick optic nerve. *Neuron* 19 (2):283-292
- Ono K, Yoshii K, Tominaga H, Gotoh H, Nomura T, Takebayashi H, Ikenaka K (2017b) Oligodendrocyte precursor cells in the mouse optic nerve originate in the preoptic area. *Brain structure & function*. doi:10.1007/s00429-017-1394-2
- Raff MC, Abney ER, Miller RH (1984) Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Developmental biology* 106 (1):53-60
- Richardson WD, Pringle N, Mosley MJ, Westermarck B, Dubois-Dalcq M (1988) A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell* 53 (2):309-319
- Skoff RP, Knapp PE (1991) Division of astroblasts and oligodendroblasts in postnatal rodent brain: evidence for separate astrocyte and oligodendrocyte lineages. *Glia* 4 (2):165-174. doi:10.1002/glia.440040208
- Small RK, Riddle P, Noble M (1987) Evidence for migration of oligodendrocyte-type-2 astrocyte progenitor cells into the developing rat optic nerve. *Nature* 328 (6126):155-157. doi:10.1038/328155a0
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y (2002) The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development

of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Current biology* : CB 12 (13):1157-1163

Tian C, Zou S, Hu B (2016) Extraocular Source of Oligodendrocytes Contribute to Retinal Myelination and Optokinetic Responses in Zebrafish. *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (4):2129-2138. doi:10.1167/iovs.15-17675