

神経解剖学を基盤とした神経科学研究の展開

竹林 浩秀・堀江 正男・Asim K Bepari

渡辺 啓介・目黒 玲子

新潟大学医学部解剖学第二

Strategy for Neuroscience Research Based on Neuroanatomy

Hirohide TAKEBAYASHI, Masao HORIE, Asim K BEPARI,

Keisuke WATANABE and Reiko MEGURO

Division of Neurobiology and Anatomy,

Niigata University School of Medicine

Abstract

Neuroscience requires a multidisciplinary approach to understand nervous systems at levels ranging from the molecular and cellular to the behavioral and cognitive. In our laboratory, we have been studying neuroanatomy and developmental neurobiology. We are also in active collaboration with researchers in other neuroscience fields, such as neuropathology and physiology, to understand brain functions from wider perspectives. Nowadays, many cutting-edge techniques are available to make hypotheses testable and to address unresolved biological questions. Therefore, it is a good era to study on the brain. In Niigata University, there are a number of neuroscience laboratories in both the Graduate School of Medical and Dental Sciences and the Brain Research Institute. They locate in the same campus and offer a good infrastructure to perform neuroscience research.

Key words: Neuroanatomy, intractable neurological diseases, Olig transcription factor

はじめに

脳は、知能、性格、感情などを司り、ヒトをヒトたらしめている器官であると言える。この複雑で精緻な脳が、どのように形成・維持され、機能するのか明らかにすることは、知的挑戦であり、多くの研究者を惹きつけている。脳を理解するには、分子、細胞、器官、個体レベルのさまざまな階層性があり、多面的なアプローチが必要である。そ

のため、神経科学は統合的な学問であると言われる。以下に、我々がこれまで行ってきた研究を紹介し、解剖学第二教室における今後の研究の方向性について述べたい。

神経幹細胞から特異的ニューロン、 グリアを産み出すメカニズム

中枢神経系の構成細胞であるニューロン、アス

Reprint requests to: Hirohide TAKEBAYASHI
Division of Neurobiology and Anatomy
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学医学部解剖学第二 竹林浩秀

トロサイト、オリゴデンドロサイトは、機能も形態も全く異なる細胞であるが、これらは全て共通の前駆細胞である神経幹細胞から産み出される事が知られている。我々は、胎児期の中枢神経系に特異的に発現している転写因子をスクリーニングし、後に *Olig* ファミリーと名付けられた basic helix-loop-helix 型転写因子ファミリーを同定した^{1)–3)}。*Olig* ファミリーは *Olig1*, *Olig2*, *Olig3* の3つのファミリーメンバーからなる。*Olig1*, *Olig2* は、胎仔期腹側脊髄の pMN ドメインと呼ばれる場所に発現している。この pMN ドメインからは、運動ニューロン、そして、オリゴデンドロサイト前駆細胞が産み出される。特に、*Olig2* は運動ニューロンを産み出す神経産生時期から後のグリア産生時期まで pMN ドメインに強く発現している(図 1A, B)。ニワトリ胚におけるエレクトロポレーション法を用いた機能発現実験により、*Olig2* と *Ngn2* の2つの転写因子の組み合わせが運動ニューロンの発生に重要であることが強く示唆された⁴⁾。更に、*Olig2* 遺伝子を破壊した *Olig2* ノックアウトマウスを作製すると、*Olig2* ノックアウトマウスは出生直後に死亡した。そして、脊髄前角の運動ニューロンと、オリゴデンドロサ

イト前駆細胞が全くないことが明らかとなった。すなわち *Olig2* は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ことが明らかになった⁵⁾。詳細は、他の総説²⁾を参考にさせていただくが、これら一連の研究は、他のグループの激烈な競合の中で行われたものであり、我々のグループも研究の進展に貢献できたことは幸運なことであった。

その後、タモキシフェン誘導性 Cre 組換え酵素 (*CreER*) を *Olig2* 遺伝子座にノックインした *Olig2-CreER* マウスを用いた細胞系譜追跡実験系を立ち上げ⁶⁾、さまざまな時期、脳の領域、病態にて、*Olig2* 陽性細胞の細胞系譜追跡を行ってきた^{7)–9)}。一見オリゴデンドロサイトが完成しているように見える成体脳の白質において、*Olig2* 陽性の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分化が継続して起きている事を明らかにした⁹⁾。この成体脳でのオリゴデンドロサイト新生 (adult oligodendrogenesis) の意義やメカニズムは、今後の研究課題である。

A

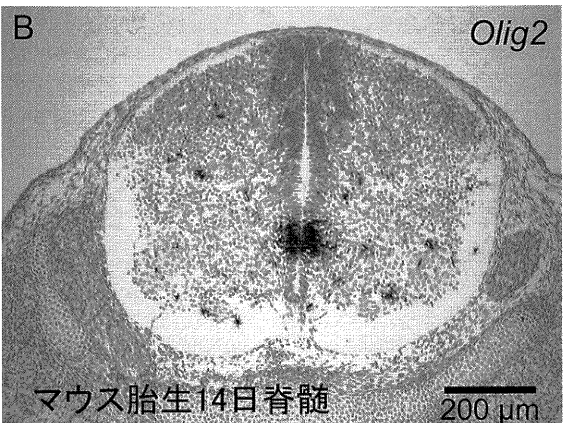
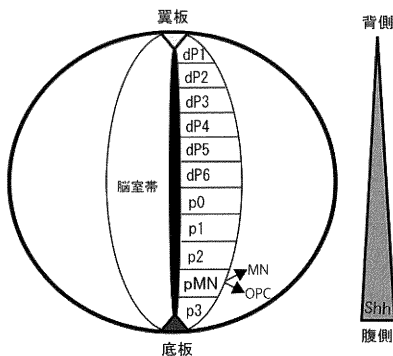


図 1 中枢神経系における *Olig2* 遺伝子発現

- A: 胎仔期マウス脊髄の模式図. *Olig2* 陽性の pMN ドメインから、運動ニューロン (MN)、そして、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) が産み出される。
- B: 胎生 14 日の胎仔期マウス脊髄における *Olig2* 遺伝子発現. 脊髄腹側脳室帯にある pMN ドメインと、移動中のオリゴデンドロサイト前駆細胞に mRNA の発現が見られる。

様々な神経疾患と Olig 因子の関連

Olig 転写因子は、神経発生のみならず、多発性硬化症、グリオーマ、統合失調症、ダウン症などの神経難病の病態にも深く関わっていることが報告されつつある。多発性硬化症の慢性病巣では、オリゴデンドロサイト前駆細胞は存在するが最終分化が起こらず、分化阻害が起こっていることが知られている。この分化阻害には Olig1 タンパクの核内移行の制御異常が関わっている可能性が示唆された¹⁰⁾。グリオーマには多種の組織型があるが、ほぼ全てのグリオーマにおいて Olig2 陽性の細胞が少数ながら存在する事が明らかとなっている¹¹⁾¹²⁾。さらに、その Olig2 陽性細胞はがん幹細胞の性質をもち、Olig2 はがん幹細胞の増殖を制御していることが明らかとなった¹²⁾。統合失調症の家系では、Olig1、Olig2 遺伝子座 (21q22) とリンクすることが報告され¹³⁾、この遺伝子座は Down critical region と呼ばれるダウン症の神経症状を発症するのに関わる領域であること、Olig1、Olig2 遺伝子がトリソミーになることがダウン症モデルマウスの神経症状発現に重要である事が示された¹⁴⁾。

現在は、Olig ファミリーが転写因子として働く際に結合する因子のスクリーニング、同定を行い、解析を進めている。本プロジェクトの推進により、神経幹細胞の分化制御、神経幹細胞やグリオーマ幹細胞の増殖制御などの解明につながると考えている。

大脳皮質発生を制御する新規膜タンパク質の機能解析

大脳皮質は、新皮質とも呼ばれることからわかる通り、哺乳類で新しく進化してきた構造で、特にヒトでは著しく発達した領域である。哺乳類の大脳皮質は6層構造をもつという特徴があり、この層構造は、脳室の近くに存在する脳室帯にある神経幹細胞から産み出された神経前駆細胞が脳表面にむかって放射状に細胞移動 (radial migration) をすることにより形成される。この大脳皮

質の発生および進化的側面について研究を進めるために、我々は、大脳皮質の興奮性神経前駆細胞特異的に発現している遺伝子のスクリーニングを行い、Dpy19L1 遺伝子を同定した¹⁵⁾。もともと dpy-19 は、線虫の dumpy mutant の 19 番目の遺伝子として同定された 8-11 回の予測膜貫通ドメインをもつ新規膜タンパク質をコードする遺伝子である¹⁶⁾。これまで哺乳類 Dpy19 ファミリーの機能は全くわかっていなかったが、我々のショートヘアピン RNA (shRNA) を用いた Dpy19L1 遺伝子に対する RNA ノックダウン実験により、興奮性神経細胞の radial migration に関与する分子であることが明らかとなった¹⁵⁾。また、最近になって、Dpy19L2 と男性不妊症¹⁷⁾¹⁸⁾、Dpy19L3 と躁鬱病¹⁹⁾との関連が報告され、Dpy19 ファミリーメンバーとヒト疾患との直接的な関わりが示された。Dpy19 ファミリーは注目を集めつつあり、今後の研究発展が待たれている。現在、個体での機能解析をするために Dpy19 ファミリー遺伝子改変マウスを作製して解析を進めている。

ヒト病理切片における *in situ* hybridization を用いた遺伝子発現解析

新潟大学の脳研究所には、膨大なヒト脳疾患の病理標本リソースがあり、現在も精力的に整備が進められている²⁰⁾。我々は、脳研究所病理学分野との共同研究を行い、ヒト病理切片における *in situ* hybridization (ISH) 法を用いた遺伝子発現解析系を立ち上げた。まずは、Olig2 ISH プロブを用いることにした。その理由は、Olig2 陽性細胞は中枢神経系全体に散在するので、Olig2 の ISH シグナルの強さを観察することにより、組織や RNA の保存状態を検定できるからである。至適条件の検討を行った結果、組織の保存状態によりシグナルの強弱はあるが、調べた 4 例全てのパラフィン切片で Olig2 の ISH シグナルを検出することができた。ISH 法にて遺伝子発現解析を行う利点としては、興味ある遺伝子のプロブを比較的簡単に準備できること、そして、全ての ISH プロブは同じ条件で染色できることが挙げられ

る。これらは、抗体を用いた免疫染色法にはない利点である。最近では、マイクロアレイ法を用いた実験により、遺伝子発現変化を網羅的に調べたデータが数多く公開されているが、その膨大なデータを活かしきれていない状況がある。本実験系により、脳疾患病理切片を用いて遺伝子発現を組織学的に調べる事ができ、様々な病態解析に応用可能である。そして、脳研究所が世界に誇るヒト脳疾患リソースをより一層有効活用することにつながると考えている。

神経難病の病態解析

—ジストニアモデルマウスを例に—

我々は神経解剖学および神経発生学の研究を行ってきたが、これまでの経験や知識を神経難病の

病態解析および治療法開発の研究に応用することが可能である。神経難病の病態を理解し、その症状改善を目指した研究を進めるためには、疾患モデル動物を作製し、その解析を行う事がたいへん有効である。ジストニアは、中枢神経系の障害による不随意で持続的な筋収縮にかかわる運動障害の総称であり、普遍的な治療法のない難病の一つである²¹⁾。我々は、*dystonin* 遺伝子の遺伝子改変マウスを作製し、ジストニア様症状を示すモデルマウスを作製した。このマウスは常染色体劣性遺伝し、進行性の神経症状を示す。*dystonin* 遺伝子座からは、複数のアイソフォームが発現するが、どのアイソフォームが神経症状の原因となっているかについては、よくわかっていなかった。我々の遺伝子改変マウスの作製・解析により、原因となるアイソフォームの詳細が明らかになった。さ

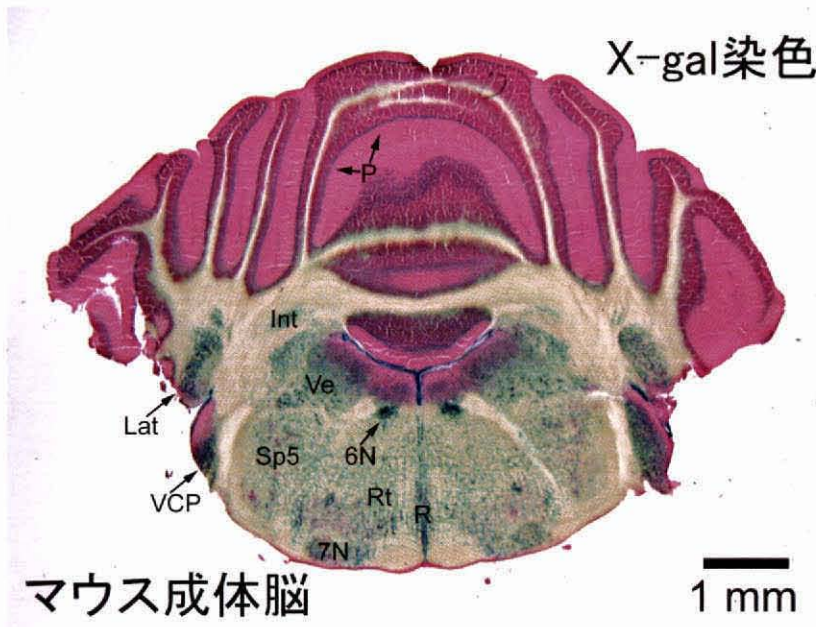


図2 X-gal染色にて染色された Dystonin 発現領域

我々が作製した *dystonin* 遺伝子改変マウス (成体ホモマウス) の脳の前額断切片を作製し X-gal 染色を行った。Dystonin 発現領域が青色に染色されている。ピンク色は nuclear fast red による対比染色。6N, abducens nucleus; 7N, facial nucleus; Int, interposed cerebellar nucleus; Lat, lateral cerebellar nucleus; P, Purkinje cell layer of cerebellum; R, raphe nucleus; Rt, pontine reticular formation; Sp5, spinal trigeminal nucleus; VCP, ventral cochlear nucleus, posterior part; Ve, vestibular nucleus.

らに *lacZ* 遺伝子が内在性遺伝子と同様のパターンで発現するので、X-gal 染色により *dystonin* 発現パターンを詳細に明らかにした (図 2)。今回作製したアリアルはコンディショナルアリアルであり、異常 *dystonin* タンパクを脳の局所に発現するコンディショナル実験が可能である。今後、このコンディショナル実験を行うことにより、脳の領域と運動異常の相関を知ることが可能になる。

将来的には、ジストニアなどの運動障害疾患のみならず、脱髄疾患等の神経難病モデルマウスの作製も計画している。

大脳生理学と神経解剖学のコラボレーション

マウス大脳皮質感覚野の経頭蓋フラビン蛋白蛍光イメージングは、脳研究所の澁木克栄教授らにより実用化された方法であり²²⁾、頭皮を切開するだけで透明な頭蓋骨越しに大脳皮質の神経活動を観察できる独創的な手法である。我々は、澁木研究室との共同研究により、視覚、聴覚の感覚入力刺激によって活動する大脳皮質小領域にトレーサーを注入して、高次脳機能を司る神経回路を詳細に解析している²³⁾。まさに生理学と神経解剖学の知見を融合して、脳の動作原理に迫る研究であり、今後の更なる発展が期待できる。

おわりに

我々は、神経解剖学、神経発生学をベースに分子、細胞、個体、様々なレベルで脳を理解する事を試みている。近年の脳科学の進歩は目を見張るものがあり、様々な研究ツールが開発・実用化され、因果関係を多角的に調べられるようになりつつある。まさに今後の大きな発展が期待できる分野であり、高い志を持った若手の参入を期待している。研究プロジェクトを推進しながら、新潟大学における人材育成と研究活性化に微力ながら貢献していきたいと考えている。

謝辞

新潟医学会において座長をお引き受けいただいた脳

研究所・柿田明美先生始め、多くの学内・学外の共同研究者と研究を進めております。また、当教室の高橋成治氏、森由紀子氏の研究補助も大きな研究推進力になっています。この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 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: 10 - 18, 2008.
- 2) Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M and 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.
- 3) Takebayashi H, Ohtsuki T, Uchida T, Kawamoto S, Okubo K, Ikenaka K, Takeichi M, Chisaka O and Nabeshima Y: Non - overlapping expression of Olig3 and Olig2 in the embryonic neural tube. *Mech Dev* 113: 169 - 174, 2002.
- 4) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K and Nakafuku M: Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan - neuronal and subtype - specific properties of motoneurons. *Neuron* 31: 759 - 773, 2001.
- 5) Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K and Nabeshima Y: The basic helix - loop - helix factor Olig2 is essential for development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12: 1157 - 1163, 2002.
- 6) Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez - Buylla A, Shimizu K and 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.
- 7) Furusho M, Ono K, Takebayashi H, Masahira N, Kagawa T, Ikeda K and Ikenaka K: Involvement

- of the Olig2 transcriptional factor in the cholinergic neuron development of the basal forebrain. *Dev Biol* 293: 348 - 357, 2006.
- 8) Miyoshi G, Butt SJB, Takebayashi H and Fishell G: Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2 expressing progenitors. *J Neurosci* 27: 7778 - 7798, 2007.
 - 9) Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H and 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.
 - 10) Arnett HA, Fancy SP, Alberta JA, Zhao C, Plant SR, Kaing S, Raine CS, Rowitch DH, Franklin RJ and Stiles CD: bHLH transcription factor Olig1 is required to repair demyelinated lesions in the CNS. *Science* 306: 2111 - 2115, 2004.
 - 11) Yokoo H, Nobusawa S, Takebayashi H, Ikenaka K, Isoda K, Kamiya M, Sasaki A, Hirato J and Nakazato Y: Anti - human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol.* 164: 1717 - 1725, 2004.
 - 12) Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, Bachoo RM, Kane M, Louis DN, Depinho RA, Anderson DJ, Stiles CD and Rowitch DH: Olig2 - regulated lineage - restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* 53: 503 - 517, 2007.
 - 13) Huang K, Tang W, Tang R, Xu Z, He Z, Li Z, Xu Y, Li X, He G, Feng G, He L and Shi Y: Positive association between OLIG2 and schizophrenia in the Chinese Han population. *Hum Genet* 122: 659 - 660, 2008.
 - 14) Chakrabarti L, Best TK, Cramer NP, Carney RS, Isaac JT, Galdzicki Z and Haydar TF: Olig1 and Olig2 triplication causes developmental brain defects in Down syndrome. *Nat Neurosci* 13: 927 - 934, 2010.
 - 15) Watanabe K, Takebayashi H, Bepari AK, Esumi S, Yanagawa Y and Tamamaki N: Dpy1911, a multi - transmembrane protein, regulates radial migration of glutamatergic neurons in the developing cerebral cortex. *Development* 138: 4979 - 4990, 2011.
 - 16) Honigberg L and Kenyon C: Establishment of left/right asymmetry in neuroblast migration by UNC - 40/DCC, UNC - 73/Trio and DPY - 19 proteins in *C. elegans*. *Development* 127: 4655 - 4668, 2000.
 - 17) Harbuz R, Zouari R, Pierre V, Ben Khelifa M, Kharouf M, Coutton C, Merdassi G, Abada F, Escoffier J, Nikas Y, Vialard F, Koscinski I, Triki C, Sermondade N, Schweitzer T, Zhioua A, Zhioua F, Latrous H, Halouani L, Ouafi M, Makni M, Jouk PS, Sèle B, Hennebicq S, Satre V, Viville S, Arnoult C, Lunardi J and Ray PF: A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. *Am J Hum Genet* 88: 351 - 361, 2011.
 - 18) Koscinski I, Elinati E, Fossard C, Redin C, Muller J, Velez de la Calle J, Schmitt F, Ben Khelifa M, Ray PF, Kilani Z, Barratt CL and Viville S: DPY19L2 deletion as a major cause of globozoospermia. *Am J Hum Genet* 88: 344 - 350, 2011.
 - 19) Smith EN, Bloss CS, Badner JA, Barrett T, Belmonte PL, Berrettini W, Byerley W, Coryell W, Craig D, Edenberg HJ, Eskin E, Foroud T, Gershon E, Greenwood TA, Hipolito M, Koller DL, Lawson WB, Liu C, Lohoff F, McInnis MG, McMahon FJ, Mirel DB, Murray SS, Nievergelt C, Nurnberger J, Nwulia EA, Paschall J, Potash JB, Rice J, Schulze TG, Scheftner W, Panganiban C, Zaitlen N, Zandi PP, Zöllner S, Schork NJ and Kelsoe JR: Genome - wide association study of bipolar disorder in European American and African American individuals. *Mol Psychiatry* 14: 755 - 763, 2009.
 - 20) Kakita A and Takahashi H: Human brain resource - experience at the Brain Research Institute, University of Niigata. *Brain Nerve* 62: 1019 - 1024, 2010.
 - 21) Tassone A, Sciamanna G, Bonsi P, Martella G and Pisani A: Experimental models of dystonia. *Int Rev Neurobiol* 98: 551 - 572, 2011.
 - 22) Shibuki K, Hishida R, Murakami H, Kudoh M,

Kawaguchi T, Watanabe M, Watanabe S, Kouuchi T and Tanaka R: Dynamic imaging of somatosensory cortical activity in the rat visualized by flavoprotein autofluorescence. *J Physiol* 549: 919 - 927, 2003.

23) Horie M, Tsukano H, Hishida R, Takebayashi H and Shibuki K: Dual compartments of the ventral division of the medial geniculate body projecting to the core region of the auditory cortex in C57BL/6 mice. *Neurosci Res* 76: 207 - 212, 2013.
