

# 大脳視覚皮質におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の発達と視覚剥奪による影響

Oligodendrocyte progenitor cells during postnatal development  
and upon visual loss in mouse visual cortex

15D5601 申 惠蓮 指導教授 川井 秀樹

## SYNOPSIS

Sensory experience modulates proliferation, differentiation, and migration of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs). In the mouse primary visual cortex (V1), visual deprivation-dependent modulation of OPCs has not been demonstrated. Here, we demonstrate that undifferentiated OPCs peaked around the onset of ocular dominance plasticity (ODP) at postnatal day (P) 25, and binocular enucleation (BE) from the time of eye opening (P14-15) elevated symmetrically-divided undifferentiated OPCs in a reversible G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> state at the bottom lamina of the cortex and subcortical white matter (WM) by reducing maturing oligodendrocyte lineage cells (OLs). This enhanced undifferentiation was likely mediated in gray matter by the sonic hedgehog (Shh) signaling pathway, but not in WM. The undifferentiated OPCs differentiated within 5 days, independent of the experience, becoming mostly quiescent cells in control mice, while altering the mode of sister cell symmetry and forming quiescent as well as maturing cells in the enucleated mice. At P50, BE increased mature OLs via symmetric and asymmetric modes, resulting in more populated mature OLs at the bottom layer of the cortex. These data suggest that the peri-onset time for the critical period of ODP is a developmentally sensitive period for the OPC state. Visual loss promotes undifferentiation at the early period, but later increases the formation of mature OLs via a change in the mode of cell type symmetry at the bottom layer and subcortical WM of mouse V1.

Keywords: oligodendrocyte, cell proliferation, cell differentiation, enucleation, sonic hedgehog

## 1. Introduction

オリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte progenitor cells; OPCs)は生後の脳において広く分布し、持続的に増殖性を持つ主な細胞種と知られており、一生にわたって新たなミエリン形成の再編成を繰り返す<sup>1-6</sup>。OPC は均一な数や分布を維持するよう、神経活動に応じて増殖や分化をする<sup>7</sup>。例えば、神経回路の刺激は OPC の増殖や分化を亢進させたり<sup>8,9</sup>、静止状態 OPC のミエリン形成への分化を促進させたりする<sup>10</sup>。マウスのひげ切断による感覚喪失は、体性感覚皮質のバレル野において OPC 増殖と同時に分化を低下させる<sup>11,12</sup>。

視覚情報を受け取って情報処理する一次視覚大脳皮質(primary visual cortex; V1)における経験依存性 OPC の増殖・分化の影響に関する報告は少ない。生後から4週間の暗環境下での発育は、OPC の数や分布の変化に影響しない<sup>11</sup>一方、光入力パターンに応じて神経回路再編成をする感受期である眼球優位可塑性臨界期のピークに、一部のミエリン関連遺伝子の発現は特に V1 の下層において亢進し<sup>13,14</sup>、オリゴデンドロサイト(Oligodendrocyte; OL)発現性遺伝子が光刺激によって増加がある<sup>15,16</sup>ことから、その臨界期の OPC 発達への重要性が示唆された。しかし、それらのミエリン関連遺伝子発現がミエリン形成にどのように関わるかは未だ明らかではない。本研究では、眼球優位可塑性臨界期における、眼球剥奪による OPC および OL の 発達への影響を解明

する事を目的とした。

Sonic Hedgehog (Shh)は、胎児期にモルフォゲンというシグナルタンパク質の濃度勾配が器官形成の制御に重要な役割を担う。最近では、成体の脳梁において軸索変性に反応して OPC 増殖・分化を促進させ、OL 系細胞の分布拡大を誘導する事が報告された<sup>17-19</sup>。そこで本研究では、視覚剥奪の影響の分子メカニズムとして Shh シグナル経路を介す可能性が挙げられ、Shh に着目した。

本研究は、マウスの V1 において OL 系細胞がどのように発達をし、更に両眼球剥奪によって増殖・分化がどのように変化するかを検討した。増殖性細胞の発達的变化を眼球優位可塑性臨界期開始の前後の時期に調べ、OPC 増殖・分化の時期特異的感受期の解明と共に、光情報入力の開始時からの盲目による V1 の灰白質(Gray matter; GM)の下層と白質(White matter; WM)における OPC の未分化性について検証した。この時期に、3 日間の BrdU 投与により増殖した OPC に注目し、分化状態、および細胞分裂の対称性モードの視覚経験依存的变化を検証した。また、増殖した細胞の5日後、25 日後の分化状態を調べた。これらの結果から、V1 の発達に重要な時期に、マウスの目蓋が開く時期から盲目環境にすると、OPC の未分化性維持を誘発し、やがて更なるミエリン形成 OL への成熟を促進させる事が明らかとなった。

## 2. Materials & Methods

### 2-1. 実験動物

実験動物は C57BL 系統マウスを用い、12 時間間暗サイクル下、動物施設で飼育した。全てのマウスの処置は創価大学動物管理委員会の承認の下、実験動物の世話と使用のためのガイドに従った<sup>20</sup>。視覚剥奪のため、生後 15 日目(P15)に目蓋が開いた事を確認した後、麻酔下で両眼球剥奪もしくは偽手術を施し、その後は親のいる元のケージに戻した。2% lidocaine と 0.25% bupivacaine を目蓋の上に塗布して手術中の痛みを軽減し、手術後の 3 日間は、5mg/kg meloxicam の消炎鎮痛剤を腹腔内に投与して手術後の回復をサポートした。本研究では P22、P25、P28、P30、P50 のマウスを用いた。

### 2-2. BrdU と Shh シグナル阻害剤の投与

増殖細胞を特定するため、BrdU (5'-bromo-2-deoxyuridine; Cat# B5002, Sigma, 100 mg/kg/day)をそれぞれの発達期、P19~22、P22~25、P22~28 に、毎日 1 回、そして犠牲させる 2 時間前に腹腔へ注入した。

Shh シグナル経路の Smoothened (Smo)受容体に結合して活性を抑制する Cyclopamine (Cat# C-8700, LC Laboratories, 25 mg/kg/day) は 2-hydropropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HBC, Cat# H-107, Sigma)で溶解した<sup>21</sup>。P22~25 や P22-29 の間に、HBC (vehicle control)或いは Cyclopamine を毎日一回腹腔注入し、P25 や P30 に脳組織を固定した。BrdU 注入の 1 時間後、HBCまたはCyclopamineを投与した。

### 2-3. 免疫蛍光染色

4% PFA (paraformaldehyde)を用いて心臓灌流固定後、40-50  $\mu$ m の脳切片を作製し、増殖性細胞マーカー Ki67 (Leica Microsystems Cat# NCL-Ki67p, RRID:AB\_44210) と BrdU (clone BU1/75(ICR1), GeneTex Cat# GTX26326, RRID:AB\_1081056)、未分化性細胞マーカーNestin (clone rat-401, Millipore Cat# MAB353, RRID:AB\_94911; DSHB Cat# Rat-401, RRID:AB\_2235915)、そして各細胞種特異的マーカーを用いて、免疫蛍光共染色を行い、増殖細胞の未分化性や細胞種を調べた。

### 2-4. 画像分析及び統計学解析

マウスの脳解剖学に基づき<sup>22</sup>、MGv という聴覚系視床から 15-20°にある領域を V1 と定め、共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8)を用いてイメージを取得した。大脳皮質の軟膜から第 6 層・WM の境界線までを 8 等分の Bin を作成した。各 Bin における細胞の密度や 蛍光強度を測定するため、NIH (National Institutes of Health, USA) Fiji ImageJ software (NIH, USA, RRID:SCR\_002285) を用いた。

細胞密度の統計学解析のため、Microsoft Excel と the R Project for Statistical Computing (RRID:SCR\_001905) software を用いて unpaired Student's *t*-test で二つグループの統計学的有意差( $p < 0.05$ )を検討した。多数なグループの比較をするためには、one-way 或いは two-way ANOVA test 後、Tukey-Kramer post hoc test で検討した。成熟 OL マーカーの CNPase (2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase)の蛍光強度解析は、ノンパラメトリックな各グループの違いを確認するため、the two-sample Kolmogorov-Smirnov test (K-S test) による検討を行った。

## 3. Results

### 3-1. 眼球優位可塑性臨界期の開始前後、視覚野における増殖性細胞の検討、及び視覚剥奪の影響

眼球優位可塑性臨界期(P19-32)の開始頃(P22, P25, P28)における増殖細胞を検討するため、先ず増殖細胞マーカーの Ki67 と BrdU で共染色を行った。Ki67 は、細胞周期内で発現し<sup>23</sup>、G<sub>0</sub>期の静止期には徐々に発現が消え、細胞周期の長い細胞では G<sub>1</sub>/S 期に検出できない核タンパク質である<sup>24</sup>。健常マウス(Control mice; CTRL)の視覚野における Ki67 発現性(+)細胞は、P22 と P28 と比較し P25 に一時的に増加した(図 1)。しかし、3 日間の BrdU 投与により、DNA 複製を介して増殖した BrdU+細胞は、どの時期にでも細胞密度がほぼ同じだった。視覚剥奪したマウス(binocular enucleation; BE)においても Ki67+細胞は P25 をピークとして増加した(図 1)。

細胞周期内に滞在して増殖をし続けられる BrdU+Ki67+細胞の各 Bin 別解析により、Bin 8 で P22-25 をピークとして増殖性が増加した(図 1)。BE マウスでも P22-25 をピークとして増加し、この時に視覚剥奪による更なる増加が観られた(図 1)。そして、WM においても P22-25 の増殖性細胞に視覚剥奪による増加が示された(図 1)。従って、P22-25 間に増殖した細胞は、未分化性細胞へ分裂した娘細胞が細胞周期に残って増殖持続性を示し、それが視覚剥奪によって更なる促進の影響があった。

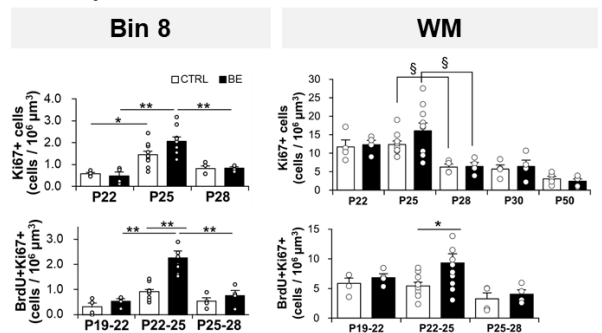


図 1. V1 の Bin8 と WM における Ki67+細胞と BrdU+Ki67+細胞の発達の变化及び視覚剥奪の影響

視覚剥奪は P22-25 の時期特異的に増殖した細胞と各細胞種特異的のマーカ－との共染色により細胞種同定を行った。V1 下層の Olig2+細胞(OL 系列細胞マーカ－)は BrdU+細胞の 98%を、NG2+細胞(主に OPC 及び pre-OL マーカ－)は 90%を占めた。WM では Olig2+細胞が 96%を、NG2 が 80%を占めた。また、アストロサイト(GFAP)、ミクログリア(Iba1)、抑制性神経前駆細胞 (GAD67)ではない事が分かった。これらの結果により、眼球優位可塑性臨界期の開始時である P22-25 で、時期特異的に増殖性細胞が増加し、視覚剥奪は更なる促進をさせる事が分かり、これらは OL 系細胞での変化であると示唆される。従って、視覚情報喪失は未分化性 OL 系細胞の増加と臨界期に関連性があることが示唆された。

### 3-2. 視覚剥奪による P25 の OPC 未分化性増加と Shh シグナル経路の役割

先行研究と同様、BrdU+細胞は細胞間距離が近接している娘細胞が多く存在しており<sup>12,25-27</sup>、細胞間の 35 μm 以下となるペアをダブルットと想定して<sup>27</sup>、OPC 分裂の対称性を検討した。CTRL マウスにおける BrdU+ダブルットでは細胞分裂後、主に細胞周期を対称的に離脱(Ki67<sup>-/-</sup>)したが、視覚剥奪マウスでは対称的に細胞周期に残った(Ki67<sup>+/+</sup>)。つまり視覚剥奪は分化を抑制して未分化性維持を促進すると考えられる。

神経系の未分化性細胞マーカ－Nestin を用いて、増殖した細胞の分化性状況を検証した。CTRL マウスの V1 下層では BrdU+細胞の半分が分化の方向(Ki67-Nestin<sup>-</sup>)へ進み、20%の増殖する未分化性細胞(Ki67+Nestin<sup>+</sup>)と 30%の静止状態未分化性細胞(Ki67-Nestin<sup>+</sup>)が存在した。それに対して WM ではこの3種の分化状態がそれぞれ均一に分布した。視覚剥奪によって、GM と WM の両方で、静止状態未分化性細胞は変化せず、分化した細胞が減少する一方、増殖する未分化性細胞が増加した。GM では対称的分裂の変化による影響であるが、WM では大きな影響はなかった。これらのことから、生後の V1 において増殖した細胞は、細胞分裂時に分化状態が調整され、視覚剥奪は増殖性細胞を増加させ、分化への進行を抑える事が示唆された。

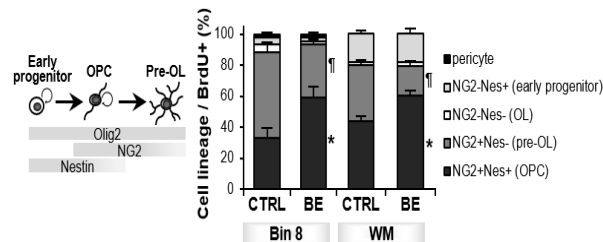


図 2：視覚剥奪による P25 の OL 系細胞の発達状態

視覚剥奪による未分化性細胞の維持を更に検証するため、OL 系細胞の発達ステージを検証した(図 2)。NG2 と Nestin マーカ－の免疫蛍光共染色手法により、グリア前駆細胞 (NG2-Nestin<sup>+</sup>)、OPC (NG2+Nestin<sup>+</sup>)、pre-OL (NG2+Nestin<sup>-</sup>)、ミエリン形成 OL (NG2-Nestin<sup>-</sup>)を見分けられる。CTRL マウスでは、BrdU+細胞のうち、~30%の OPC と~60%の pre-OL が GM の Bin 8 に存在し、WM では各々~40%の OPC と pre-OL が存在した。視覚剥奪により、GM と WM に関わらず、OPC と pre-OL のステージシフトが生じた。WM には~20%の早期前駆細胞があり、GM より明らかに多かった。OL や Pericyte は殆どなかった。GM と WM 両方において、視覚剥奪により対称性 BrdU+ OPC ダブルットが約 2 倍増加した。従って、視覚剥奪による OPC から pre-OL への分化遅延は、BrdU+娘細胞の対称的分裂による OPC の未分化性増加であると推測された。

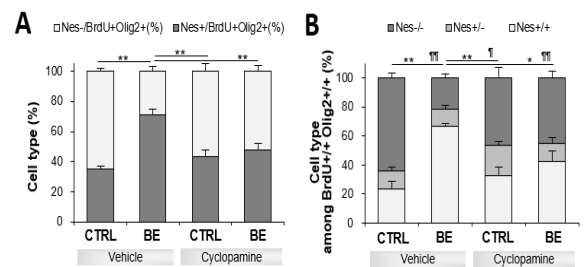


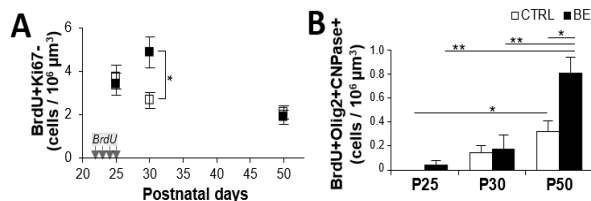
図 3：V1 の下層において、視覚剥奪による P25 の OPC 未分化性維持と Shh シグナルの役割

又、視覚剥奪誘導性の OPC 未分化性維持に関わるメカニズムを調べるため、Shh シグナルを検証した。Shh は脳室下帯の OPC の増殖を促進させる脳梁に OPC を増やす分子である<sup>28,29</sup>。Shh シグナル阻害剤である Cyclophamine を P22-25 に毎日一回腹腔注入し、P22-25 に BrdU に取り込まれた細胞の OPC 未分化性を Olig2 と Nestin(Nes)抗体を用いて検証した。予測通り、Vehicle 注入グループにおいては、視覚剥奪誘導性の未分化性細胞の増加が見られ、それに対し Cyclophamine 投与により BE による影響が抑えられた(図 3.A)。これらの変化は対称的分裂が伴った(図 3.B)。即ち、Shh シグナルは眼球優位可塑性臨界期の開始時に、OPC の対称的分裂より未分化性を増加させ、OL 系細胞への分化を遅延させると示唆された。

### 3-3. 増殖した OPC の系列発達における経時的変化及び視覚剥奪の影響

P22-25 に増殖した BrdU+細胞が、眼球優位可塑性臨界期を経て、OL 系細胞の成熟や変化を検討した。P22-25 にラベルされた BrdU+細胞は、GM と WM 両方とも P30 には Ki67+として既にほぼ存在せず、大部分は Ki67<sup>-</sup>であった。

即ち、BrdU+細胞は P30 に細胞周期から離脱し、分化へ進むか、静止状態の OPC となる事を示す。GM の下層において、P25 で視覚剥奪によって有意的増加をした Ki67+細胞は、P30 に Ki67-細胞となり、これらは Olig2+Nestin+未分化性 OPC であった(図 4.A)。即ち、視覚剥奪によって増加した V1 下層の OPC は、5 日後に潜在的静止状態の細胞となると示唆された。一方、WM においては P30 以降、盲目による変化は見られなかった。



**図 4：V1 下層における増殖した OPC の経時的変化と視覚剥奪による OL への分化**

そして分化した OL マーカーである CNPase を用いて免疫蛍光染色を行い、P22-25 に増加した BrdU+細胞の系列発達の変化を検討した。GM において、CTRL と BE マウスでは CNPase+ OL へ発達し、P50 には視覚剥奪によって約 2 倍に増加し(図 3.B)、この増加は対称性と非対称性の分裂で分化へ進んだ。これに加え、V1 での CNPase+細胞数の変化を調べ、Bin 8 で視覚剥奪により有意的に増加が見られ、これはダブレット増加による影響であることが分かった。また、CNPase+蛍光強度解析からも CTRL マウスより CNPase 発現の有意的差が見られた。一方、WM において、OPC の CNPase+ OL への発達は進むものの、BE による影響はなかった。従って、これらの結果は、視覚剥奪が、未分化性 OPC を増加させ、やがて OL へ分化を亢進させる事、そしてこれらを V1 下層で起こすことを示す。

#### 4. Conclusion

本研究では、マウス V1 の GM と WM における未分化性 OPC の増加時期や発達の経時的変化、そして視覚剥奪による影響も分かった。眼優位性臨界期の開始の頃(P22-25)、V1 全体的に増殖細胞の P25 で一時的な増加が見られ、V1 の下層や WM の領域特異的に視覚剥奪による OPC 分化状態制御の感受性期が存在することが明らかに分かった(Figure 15)。更に、視覚剥奪による V1 皮質下層の OPC 未分化性増加に Shh シグナルが関与することが示唆された(Figure 15A)。P22~25 の時期特異的に増加した新生 OPC は、V1 皮質下層では、大半が 5 日後に、対称的分裂により細胞周期の G<sub>0</sub> 期に移行し、静止状態や分化の方向へ進んだ。視覚喪失は対称的分裂により OL への分化を減少させ OPC の未分化性を促進した。P22-25 に生まれた V1 下層の OPC は、視覚剥奪により、未分化性が増加すると共に、

やがて P50 には CNPase 発現性 OL への分化を更に促進させた。

WM において、視覚剥奪は P25 の未分化性細胞の増加を亢進させる一方、P30 以降は影響を及ぼさなかったため、P25 での一時的な変化を生じさせた(Figure 15B)。以上の結果より、開眼時からの視覚剥奪は、V1 の OPC 発達の感受期において、細胞周期や OL への分化に影響を及ぼすが、それは GM と WM における相異性がある事が明らかとなった。

#### 5. References

- Mallon, B. S., Shick, H. E., Kidd, G. J. & Macklin, W. B. *J. Neurosci.* **22**, 876–885 (2002).
- Dawson, M. R. ., Polito, A., Levine, J. M. & Reynolds, R. *Mol. Cell. Neurosci.* **24**, 476–488 (2003).
- Dimou, L., Simon, C., Kirchhoff, F., Takebayashi, H. & Gotz, M. *J. Neurosci.* **28**, 10434–10442 (2008).
- Rivers, L. E. *et al. Nat. Neurosci.* **11**, 1392–1401 (2008).
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D. & Bergles, D. E. *Neuron* **68**, 668–681 (2010).
- Young, K. M. *et al. Neuron* **77**, 873–885 (2013).
- Hughes, E. G., Orthmann-Murphy, J. L., Langseth, A. J. & Bergles, D. E. *Nat. Neurosci.* **21**, 696–706 (2018).
- Li, Q., Brus-Ramer, M., Martin, J. H. & McDonald, J. W. *Neurosci. Lett.* **479**, 128–133 (2010).
- McKenzie, I. A. *et al. Science* **346**, 318–322 (2014).
- Gibson, E. M. *et al. Science* **344**, 1252304 (2014).
- Mangin, J. M., Li, P., Scafidi, J. & Gallo, V. *Nat. Neurosci.* **15**, 1192–1194 (2012).
- Hill, R. A., Patel, K. D., Goncalves, C. M., Grutzendler, J. & Nishiyama, A. *Nat. Neurosci.* **17**, 1518–1527 (2014).
- Lyckman, A. W. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 9409–9414 (2008).
- Benoit, J., Ayoub, A. E. & Rakic, P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 8094–8099 (2015).
- McGee, A. W., Yang, Y., Fischer, Q. S., Daw, N. W. & Strittmatter, S. M. *Science* **309**, 2222–2226 (2005).
- Hrvatin, S. *et al. Nat. Neurosci.* **21**, 120–129 (2018).
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M. & Traiffort, E. *J. Neurosci.* **33**, 1759–1772 (2013).
- Samanta, J. *et al. Nature* **526**, 448–452 (2015).
- Sanchez, M. A. & Armstrong, R. C. *Exp. Neurol.* **299**, 122–136 (2018).
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academies Press (US), 2011).*
- Van den Brink, G. R. *et al. Gastroenterology* **121**, 317–328. (2001).
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (Academic Press, 2008).
- Gerdes, J. *et al. J. Immunol.* **133**, 1710–1715. (1984).
- Miller, I. *et al. Cell Rep.* **24**, 1105–1112 (2018).
- Kukley, M. *et al. FASEB J.* **22**, 2957–2969 (2008).
- Ge, W. P., Zhou, W., Luo, Q., Jan, L. Y. & Yuh, N. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 328–333 (2009).
- Boda, E. *et al. Glia* **63**, 271–286 (2015).
- Tong, C. K. *et al. Stem Cell Reports* **5**, 461–470 (2015).
- Daynac, M. *et al. Stem Cell Reports* **7**, 735–748 (2016).