

# 博士學位請求論文

論文題目 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

専攻名 生命情報工学

学籍番号 15D5601

氏名 申 惠蓮

指導教員 川井 秀樹

創 価 大 学 大 学 院  
工 学 研 究 科

**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**

**2022年2月**

**15D5601 申 惠蓮**

# 目 次

目次	1~3
A. 概要	4~5
B. 緒言	
B-1. オリゴデンドロサイトの発達	6~7
B-2. 神経活性によるオリゴデンドロサイトの発達	7~8
B-3. 成体脳の神経発生(Adult neurogenesis)	8~9
B-4. 本研究に使用されたマーカー	9~12
<i>Ki67</i>	9
<i>BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)</i>	9
<i>Nestin</i>	9~10
<i>GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)</i>	10
<i>SI00<math>\beta</math> (SI00 calcium-binding protein B)</i>	10
<i>NG2 (Neural/glial antigen 2)</i>	11
<i>CNPase (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase)</i>	11~12
B-5. 視覚大脳皮質における眼優位性	12~13
B-6. 視覚剥奪によるグリア細胞の変化	13
B-7. Sonic Hedgehog (Shh) シグナル	13~15
B-8. OPC 増殖・分化における諸メカニズム	15
B-9. 本研究に向けて	15~!7
C. 実験材料・方法	
C-1. 実験動物	18
C-2. BrdU 及び Shh シグナル抑制剤の投与	19
C-3. 免疫蛍光染色	19~20
C-4. V1 の解剖学的分析位置	20
C-5. 画像取得及び分析方法	20~21
C-6. 統計学解析	21~22
D. 結果	
D-1. 眼優位性臨界期の開始時における、灰白質での増殖細胞の検討	23
D-2. V1 の皮質下白質における増殖細胞の性質	23~24
D-3. 灰白質での P22~25 の増殖細胞における視覚剥奪の影響	24~26
D-4. 白質での視覚剥奪による増殖性 OPC 増加の感受性期	26~27
D-5. 灰白質での P22~P25 に増殖した細胞の細胞種同定	27~28
D-6. 灰白質における視覚剥奪による P25 の増殖性 OPC の増加及び細胞分裂の対称性	28

D-7.	灰白質では視覚剥奪は、静止状態 OPC に影響させず、 成熟 OL への分化を減少させて P25 の増殖性 OPC を亢進させる	29~30
D-8.	白質では視覚剥奪は細胞周期からの離脱に影響させず、 OPC の増殖性を亢進させる	30~31
D-9.	灰白質においては視覚剥奪は OPC の細胞分裂の対称性に影響を与えず、 未分化性を維持させて分化を遅延させる	31~32
D-10.	白質において、視覚剥奪は成熟 OL に向けた発達を促進せず OPC を増加させる	32
D-11.	視覚剥奪による OPC の未分化性維持及び Shh シグナルの役割	32~33
D-12.	P22~25 に増殖した OPC の分化動態	34
D-13.	P25~P30 における OPC の静止状態への促進に対する視覚剥奪の影響	34~35
D-14.	Shh シグナル経路を介して対称性細胞分裂の促進に対する視覚剥奪の影響	35~36
D-15.	V1 の灰白質・白質および背側外側膝状体 (dLG) の神経膠症に対する 視覚剥奪の影響	36
D-16.	灰白質における P22~25 に増殖した OPC の P30 以降の経時的変化	37
D-17.	白質における P22~25 に増殖した BrdU+OPC の運命に対す視覚剥奪の影響	37~38
D-18.	V1 下層において視覚剥奪による OPC の成熟 OL への促進	38~39
D-19.	白質における P22~25 に増殖した OPC の成熟	39~40
<b>E. 考察、および今後の課題</b>		
E-1.	GM 結果の考察	41
	V1 皮質内におけるオリゴデンドロサイト系細胞の発達的变化、 および視覚剥奪の影響	41~42
	V1 の OPC 未分化性維持と Shh シグナルの役割	42~44
	視覚剥奪による OPC 成熟の促進	44~45
	本研究の限界点、および今後の課題	45~46
E-1.	WM 結果の考察	46
	健常マウスの WM におけるオリゴデンドロサイト系細胞の発達的变化	46~48
	OL 系細胞の発達に対する両眼球剥奪の影響	48~89
	皮質下 WM における視覚剥奪の影響	49~50
<b>F. 結論</b>		
<b>G. 参考文献</b>		
<b>H. 謝辞</b>		
<b>I. 図</b>		
Figure 1.	解析領域の位置と P25 に BrdU 標識細胞種の同定	73
Figure 2.	マウス V1 の生後発達期における増殖細胞の分析また視覚剥奪の影響	74

Figure 3.	P25 の BrdU+細胞の細胞種同定	75
Figure 4.	P25 の増殖細胞の未分化性状態及びその細胞分裂の対称性	76~77
Figure 5.	P25 の増殖細胞における OL 系細胞の発達変遷	78
Figure 6.	V1 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	79
Figure 7.	P22-25 に増殖した OPC の経時的变化	80~81
Figure 8.	V1 下層における P22~25 に増殖した OPC の成熟	82~83
Figure 9.	生後 4 週目のマウスにおける皮質下白質の増殖細胞の増殖能。	84
Figure 10.	マウス V1 下 WM の P22~25 増殖 OPC の増殖能と経時的变化	85
Figure 11.	マウス V1 下 WM の P22~25 増殖 OPC の分化状態	86
Figure 12.	マウス V1 下 WM の P22~25 増殖細胞の発達進行	87~88
Figure 13.	P25 の V1 と視床における神経膠症	89
Figure 14.	V1 下 WM における P22-25 増殖 OPC の成熟に対する経時的变化	90
Figure 15.	本研究結果のまとめ	91

## J. 表

Table 1.	免疫蛍光染色に用いた一次・二次抗体のリスト	92~93
----------	-----------------------	-------

## A. 概要

オリゴデンドロサイト前駆細胞は、感覚経験によって細胞の増殖・分化が調整される。視覚剥奪依存的オリゴデンドロサイト前駆細胞の変化は、マウスの一次視覚野においては未だ明らかとされていない。本研究では、眼優位性臨界期の開始頃、即ち生後 25 日目の時期特異的にオリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖能がピークとなり、尚、開眼開始(生後 14~15 日目)からの両眼球剥奪によって、一次視覚野の大脳皮質下層と皮質下白質において更なる増加が観られた。これらの結果を二つの章に分けて詳細に述べた。

生後 25 日目の健常マウスでは、細胞周期を通して分裂した娘細胞が対称的に分化へ進んだ。視覚剥奪では、対称的に細胞分裂した未分化性娘細胞が細胞周期の G<sub>1</sub> 期に戻ったため増殖能が増加する一方、G<sub>0</sub> 期に脱して分化へ進む細胞は減少した。これらの未分化性状態の亢進は、ソニックヘッジホッグ(Sonic hedgehog, Shh)シグナル経路の一部を媒介する可能性が挙げられた。その 5 日後(生後 30 日目)、未分化性オリゴデンドロサイト前駆細胞の殆んどは分化へ進み、僅かは更に分化が進み成熟細胞となった。視覚剥奪マウスでは、対称性モードの娘細胞が静止状態と分化状態が転換され、未分化性が維持された。やがて生後 50 日目の健常マウスでは、増殖細胞の殆んどが成熟オリゴデンドロサイトへ分化した。視覚剥奪マウスでは更なる成熟オリゴデンドロサイト数が見られ、それは主に対称的・非対称的に成熟細胞へ分化が増加したためであった。尚、増殖細胞に関わらず、全ての成熟細胞の分布や蛍光強度を検討すると、視覚剥奪によって更に細胞数が増加し、ミエリン形成の更なる増加も示唆された。

皮質下白質においては、第一章の結果のように生後 25 日目に、時期特異的に細胞の増殖能がピークと増加し、視覚剥奪による更なる増加が示された。この増加は、増殖細胞の対称性・非対称性に関わらず、未分化性を促進させたためであった。視神経切断による視覚剥奪では、視神経の軸索がたどり着く視覚視床において反応性アストロサイトやミクログリア・マクروفージが増加したが、一次視覚野では影

響しなかった。即ち、視神経切断による炎症反応は視床でのみ生じ、視覚野の皮質・白質では神経回路の再編成による未分化性増加が示唆された。増殖細胞はやがて成熟細胞へ分化し、増殖 5 日後（生後 30 日目）をピークとして増加し、視覚剥奪マウスでも同様であった。皮質の結果と異なり、視覚剥奪による成熟細胞の促進は影響しなかった。

本研究では、眼優位性臨界期開始頃、オリゴデンドロサイト前駆細胞の発達に重要な時期であると示唆され、やがて視覚剥奪による皮質内と白質で異なる発達・制御をもつ事が明らかとなった。視覚剥奪下、皮質下層では、生後 25 日目の時期特異的に増殖した細胞の未分化性維持は Shh シグナル経路の一部を介して促進され、大脳視覚皮質の下層ではやがて成熟オリゴデンドロサイトへの分化を更に促進させた。白質では、生後 25 日目にも未分化性細胞が視覚剥奪によって増加する一方、成熟への促進は影響しなかった。従って、視覚剥奪すると神経回路の再編成が生じるが、それに伴う皮質内と白質においてオリゴデンドロサイト前駆細胞の発達時期・制御が異なる事が明かされた。この結果は、やがて神経回路再編成にオリゴデンドロサイトの発達が関与する事を示唆する。

## B. 緒言

### B-1. オリゴデンドロサイトの発達

オリゴデンドロサイト(Oligodendrocyte; 以下、OL とも言う)はグリア細胞の一種であり、生後 2 週間目まで大脳皮質内オリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte progenitor cells; 以下、OPC とも言う)のピークとなり(Hill and Nishiyama, 2014)、成熟 OL へ分化してニューロンの軸索の周りに巻き包むミエリンを形成する役割を果たす。中枢神経系にある成熟 OL は 13 ヶ所以上の軸索上ミエリンを形成するが、末梢神経系では一つの OPC が Schwann 細胞に成熟して一か所のみミエリンを形成する相異性がある。中枢神経系の脳における OPC は主に同種性(Homogeneity)の性質をもって生後の脳に広く分布し(Nishiyama et al., 1999)、成体の脳において脳全体の中、2~9%の増殖性をもつ細胞腫であり(Pringle et al., 1992; Dawson et al., 2003)、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(Mallon et al., 2002; Dawson et al., 2003; Dimou et al., 2008; Rivers et al., 2008; Kang et al., 2010; Young et al., 2013; Hill et al., 2018)。

OPC は主に NG2(Neuro-glia antigen 2)を発現し、発達期の間、多数の OL 系細胞と少数のアストロサイトへ分化する(Bergles et al., 2010; Zhu et al., 2011; Huang et al., 2014)。大脳皮質の成体 OPC の殆んどは未成熟状態としてグリッド状として分布し、NG2 発現性(+)OPC 同士で常にコミュニケーションを取り合いながら必要に応じて増殖・分化をするなど、恒常性の特徴を持つ(Hughes et al., 2013; Nishiyama et al., 2014; Mazuir et al., 2021)。成体の中枢神経系における未分化性 OPC の役割は未だ明らかとされていない(Dimou and Gallo, 2015)が、組織損傷や神経変性などによって OPC が増加して修復へ貢献する事は多数報告されている(Horner et al., 2002; Viganò et al., 2016)。しかし、神経活性の一つである眼球剥奪による未分化性 OPC の増減に関しては、未だ解明されていない。

さらに成体の NG2+OPC は多様な細胞種へ分化をする可能性が示されてきた(Belachew et al., 2003; Aguirre and Gallo, 2004; Aguirre et al., 2004; Baracska et al., 2007)が、*in vivo* 研究では未だ明確とされていない(Zhu et al., 2008, 2011; Viganò et al., 2013; Young et al., 2013; Hill and Nishiyama, 2014)。また NG2+OPC の増殖や分化速度そしてミエリン形成数が、神経細胞の細胞体と軸索が存在する灰白質よりも、神経細胞の軸索しか存在しない白質において明らかに早く、多い(Hill et al., 2013; Hill and Nishiyama, 2014)。先行研究より、転写因子や発達領域によって NG2 グリアの異種性(Heterogeneity)の可能性が秘められている(Trotter et al., 2010)。皮



質（灰白質）と白質のそれぞれにおいて NG2+OPC 多様性の違いが報告されており(Dimou et al., 2008; Káradóttir et al., 2008; Zhu et al., 2008, 2011; Hill et al., 2013; Viganò et al., 2016)、中枢神経系の場所によってマウスの感受性期における single-cell RNA 解析から成熟 OL 組成の多様性も示されている(Marques et al., 2016)。最近は、単一の NG2+OPC を追跡することができ、胎児期に新生した NG2+OPC が成体脳の皮質で増殖し続ける事が報告された(García-Marqués et al., 2014)。しかし、神経可塑的臨界期の間、視覚情報を遮断する神経活動の変化に伴って反応する一次視覚大脳皮質の OPC 分布や多様性に関する研究報告は明確にされていない。

## B-2. 神経活性によるオリゴデンドロサイトの発達

最近の研究では、感覚経験による神経活動の減少によって、神経系幹細胞が増殖する事が数々報告されている。例えばマウス体性感覚皮質にあるバレル野形成の臨界期開始期に NG2+OPC はバレルの隔壁 (Septa) に分布するが、ヒゲの切断によって NG2+OPC が増殖してバレルの内側まで分布される(Mangin et al., 2012)。又、オタマジャクシの視神経を切断すると、視覚中枢の一つの視蓋 (Optic tectum) において神経幹細胞が増加する(Sharma and Cline, 2010)。しかし、一次視覚皮質において、視神経の切断によるアストロサイトやミクログリア細胞の増減は報告されているが、オリゴデンドロサイト発達の変化については未だ明らかと分かっていない。

多数の神経伝達物の受容体やグルタミン酸シグナル系が OPC で発現し、OL 系細胞の分化に重要な役割とされると近年に報告された。中枢神経系発達期や成体の脳において、神経細胞（またはニューロン）の軸索からシナプス入力を受けて介す AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) レセプターから OPC も入力を受ける(Kukley et al., 2007; De Biase and Bergles, 2011; Zonouzi et al., 2011; Mitew et al., 2018)。OPC における AMPA レセプターのサブタイプの一つである GluA2 の  $Ca^{2+}$ 透過性の高低程度によって、OPC の増殖や分化が制御される(Chen et al., 2018)。脳梁の OPC は、AMPA レセプターを介すシグナルを受け、新たな生存性のある成熟 OL へ分化が進む(Kougioumtzidou et al., 2017)。また、電位依存性  $Ca^{2+}$ チャンネルの L 型の中で、Cav1.2 と Cav1.3 が生後発達期の皮質内 NG2 発現性 OPC 増殖の増加を制御し、ミエリン形成への成熟には影響を及ぼさないが、OPC 形状が短くなると同時に、ランビエ絞輪の間隔が短くなる。Cav1.2 と Cav1.3 欠損によって、N-

methyl-D-aspartate (NMDA)依存性長期抑制 long-term depression (LTD)が除去され、長期神経可塑性の制御に寄与をする(Zhao et al., 2021)。しかし、興奮性・抑制性ニューロンからのシナプス入力、OPC 分裂の際には変動せず、分化した OL においてシナプス入力反応が減少する(De Biase et al., 2010; Kukley et al., 2010)。視覚喪失による視床～・皮質系経路を介した入力の減少に伴う、一次視覚野における第 4 層のシナプス活性低下による OPC の増殖性・分化性の変動に関する研究は未だ報告されていない。

感覚経験によって OPC の増殖や分化・ミエリン形成に制御される。例えばマウスのヒゲ運動を増加させると、一次体性感覚皮質における OPC・OL 細胞とミエリン形成が増加する(Hill et al., 2018; Hughes et al., 2018)。また、神経回路の再編成によるシナプスにおける棘突起 (dendritic spine) の増加により(Polley et al., 2004; Jung and Herms, 2014)、それに伴う OPC 増殖性の影響が示唆される。しかし、出生後から単独に親や兄弟から単離すると、やがて前頭前皮質 (prefrontal cortex) において myelin basic protein (MBP)の発現が減少するなど、ミエリン形成の数や鞘厚みが減少する(Liu et al., 2012; Makinodan et al., 2012)。従って神経活動の活性亢進は OPC から OL・ミエリン形成へ促進させることが示唆される。ところで、経験活動による神経感覚入力の増加は環境に適応するため神経回路可塑性が生じ、それに伴った OPC 増殖・分化の変動が、視覚喪失によって一次視覚野の OPC でも同様な変動が見られるかは疑問である。

### B-3. 成体脳の神経新生 (Adult neurogenesis)

1900 年以來、胎児期のみならず、哺乳類の成体脳において神経幹細胞の増殖や分化が持続すると報告されてきた。それは、成体脳の主に 2 ヶ所 (脳室下帯 (subventricular zone; SVZ)と海馬の顆粒細胞下帯 (subgranular zone ; SGZ)にある歯状回 (dentate gyrus; DG)) で、常に神経系幹細胞(neural stem cells; NSCs) の増殖が続いている(Gage, 2000, 2002)。SVZ で生まれた NSCs (type B 細胞)は、一過性増殖細胞 (type C 細胞)からニューロblast (type A 細胞)へ、或いはグリア細胞のアストロサイトかオリゴデンドロサイトへ分化し、嗅球 (olfactory bulb)や前頭皮質へ移動して分化をする。SGZ で新生した細胞 (type 1 細胞)は、中間型前駆細胞(intermediate progenitor ; type 2 細胞)からニューロblast (type 3 細胞)となり、やがて海馬の興奮性細胞へ分化するか、または NSCs からアストロサイトやオリゴデンドロサイトへ分化をする(Ming and Song, 2011)。成体マウスを走らせたり、感覚刺激の多い

環境に居させたりすると、海馬の SGZ において NSC が更に増殖し、6 週間目に最も成熟ニューロンへ分化が促進される(Bergami et al., 2015; Gonçalves et al., 2016)。脳の障害や神経疾患によっても、SVZ で増殖した NSCs 損傷領域へ移動して分化し、大脳皮質の NSCs や反応性グリア細胞が増殖することも近年、多数報告されている(Buffo et al., 2005, 2008; Kamphuis et al., 2012; Shimada et al., 2012; Sirko et al., 2013; Faiz et al., 2015)。未分化性細胞である NSC の増殖・分化の機序は神経活性パターンや時期などによっても、それぞれである。しかし、大脳皮質内にある OPC 増殖・分化の機序が、SVZ や SGZ における NSC と同様なシグナル経路を介して制御されるか否かは、未だ明確ではない。

#### **B-4. 本研究に使用された諸マーカー**

##### ***Ki67***

Ki67 は、MKI67 を抗原とし、細胞周期の活性期 (G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M 期) に発現する核タンパク質である(Gerdes et al., 1983, 1984; Burger et al., 1986; Nakajima et al., 1999)。G<sub>0</sub> 期への移行とともに徐々に発現が減少し、細胞周期の長い細胞では検知できない (Miller et al., 2018)。つまり、細胞の増殖能の有無を識別するに有用なマーカーとして使用されている。

##### ***BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)***

BrdU は DNA のチミジンのアナログとなる合成ヌクレオシドである。細胞周期 S 期 (DNA 複製期) の間、DNA のチミジンの CH<sub>3</sub> 基が臭素 (Br) 原子に置き換わって新たに合成される DNA 鎖に取り込まれ、細胞分裂と共に娘細胞へ受け継がれる(Kee et al., 2002)。BrdU を生体へ注入することで増殖細胞が抗 BrdU 抗体の標識で検知され、注入後、2 時間から最大 2 年以上に渡って検出することが可能であると言われる(Eriksson et al., 1998)。BrdU 検知により、活発に増殖する細胞を特定する事が可能である。

##### ***Nestin***

神経系幹細胞・前駆細胞と考えられる未分化性細胞マーカーが Nestin である。Nestin は、中間径フィラメント(intermediate filament)タイプ IV のタンパク質であり、神経系幹細胞又は前駆細胞マーカーとして主に中枢神経系で発現することが知られている。胎児期には放射状グリア細胞(radial glial cell)の軸索に(Murdoch and Roskams, 2008)、生後には SVZ や SGZ の神経系幹細胞や前駆細胞に主に発現し、大脳皮質では神経上皮細胞(neural epithelial cell)や未分

化性細胞に発現する(Lagace et al., 2007; Imayoshi et al., 2008)。Nestin は、分化した成熟細胞では発現が消滅するため、細胞種特異的のマーカーとの共染色する事により、どの種類の細胞が未分化性をもつか識別することが可能となる。

OL 系細胞の中で、OPC が未分化性細胞であるため、Nestin が OPC で発現することが考えられる。*in vitro* 研究では、潜在的増殖能をもつ未分化性グリア前駆細胞と OPC で Nestin が発現し、分化状態の OL やミエリン形成 OL では Nestin が発現しない (Gallo and Armstrong, 1995; Guo et al., 2009; Rafalski et al., 2013)。よって、NG2 との共発現させて比較すると、NG2-Nestin+ グリア前駆細胞、NG2+Nestin+ OPC、NG2+Nestin- 未成熟 OL (pre-OL)、NG2-Nestin- 成熟 OL と識別する事が可能になると考えられる(Tanaka et al., 2009; Reviewed in Schumacher et al., 2012; Kremer et al., 2016)。

### ***GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)***

GFAP は中間径フィラメント(intermediate filament)タンパク質の一種であり、中枢神経系ではアストロサイトや上衣細胞(ependymal cell)に発現し、神経変性疾患や損傷によって現れる反応性肥満アストロサイト(reactive astrocyte)が増殖すると共に強い蛍光強度が検出される。胎児時と出生後の直ぐにおけるマウスの脳 (胎児 18~生後 3 日目) では、殆どどの放射状グリア細胞に発現し、それ以降はアストロサイトに発現する(Ge et al., 2012; Rusnakova et al., 2013)。マウスの胎児 18 日目~生後 3 日目は、アストロサイト発生ピーク期と言われ、放射状グリア細胞からアストロサイトへ分化すると共に、アストロサイトの増殖ピークとなる時期である。GFAP は、発達期や成体の時期に関わらず、代表的アストロサイトのマーカーとして広く用いられている。

### ***S100β (S100 calcium-binding protein B)***

S100β はカルシウム結合ドメインの持つタンパク質であり、中枢神経系、特に脳において高い発現性をもち、アストロサイトに選択的に発現する。S100β タンパク質は、細胞内のカルシウム濃度をある程度の一定に維持させるバッファーとして機能し、細胞内のシグナル伝達や細胞外への分泌など、S100β の役割に関しては明確になっていない。ところが、S100β は通常、アストロサイトマーカーとして広く使われ、近年、胎児期と出生直後の脳における放射状グリア細胞での主な発現と、グリア前駆細胞や分化性細胞においてラベルされる事が報告されている(Clarke and Barres, 2013)。S100β マーカーを使用して細胞種同定を行うには、

多種マーカーとの共染色により明確な細胞種を同定する事が出来る。

### **NG2 (Neural/glial antigen 2)**

NG2 細胞 (ポリデンドロサイト：多樹状細胞) は、ニューロン、成熟した OL、アストロサイト、ミクログリアとは異なる中枢神経系の細胞の一種である。NG2 は、細胞膜においてプロテオグリカン NG2 (CSPG4, *chondroitin sulfate proteoglycan 4*) の発現によって検出でき、枝分かれした樹状突起が豊かな形を持ち、灰質や灰白質において脳全体に分布している。NG2 は、膜貫通型プロテオグリカンで、通常 252 kDa の分子量をもち、グリコシル化状態では 300kDa となる。NG2 のコアタンパク質は、95%を占める 2,225 アミノ酸配列の大きな細胞外ドメイン、25 アミノ酸配列の膜貫通ドメイン、および 76 アミノ酸配列の短い細胞質尾部で構成されている(Stallcup, 2002; Price et al., 2011; Yadavilli et al., 2016)。これらのドメインは、NG2 と細胞外・内リガンドとの相互作用を促進し、細胞付着キナーゼおよび MAP キナーゼ経路を介してシグナル伝達を活性化させる。それによって、細胞増殖、移動、浸潤、細胞骨格再編成、生存、神経回路の再編成などの重要な細胞機能を調節する(Stallcup, 2002; Sakry et al., 2014; Yadavilli et al., 2016)。マウス NG2 の発現は、翻訳開始部位の上流にある 1,585 塩基対のプロモーター領域によって制御される(Sellers et al., 2009)。NG2 プロモーターには、遺伝子発現を調節する共活性因子として p300 および CREB 結合タンパク質の結合部位が含まれている(Sellers et al., 2009)。

また、*in vitro* 研究より、NG2 細胞は成熟 OL へと分化することから、しばしば OPC と同一視されてきた。実際に NG2 細胞は OPC で、PDGFR  $\alpha$  を発現すると *in vivo* 研究でも分かり(Rivers et al., 2008; Kang et al., 2010; Li et al., 2017)、OPC から成熟 OL の間にいる未成熟 OL(pre-OL)の前半期まで発現する事が分かってきた(Kelenis et al., 2018; Marie et al., 2018)。しかし、このポリデンドロサイト(多樹状細胞)が、ニューロンとアストロサイトをも生み出すことができる多能性細胞であると、最近少しずつ報告されている(Zhu et al., 2008, 2011)。さらに、電気生理学的研究では、ニューロンからシナプス入力を受け取ることが示し、それらが神経回路に統合されていることを示唆している(Kukley et al., 2008, 2010; Nishiyama et al., 2014)。本研究では、NG2 標識抗体および他の細胞種抗体と共染色して、OL 系細胞でどの細胞種を示し、それに加えてアストロサイト等の他の細胞種にも発現するか検証を行った。

### **CNPase (2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase)**

CNPase は、ヌクレオシド 2', 3'-サイクリックモノホスフェート (2', 3'-cNMP) がヌクレオシド 2'-モノホスフェート (2'-NMP) へ加水分解すると 1960 年代にはじめて観察された。それ以来、中枢神経系の非コンパクト型ミエリンの酵素としてよく知られており、ミエリンタンパク質の中で 4% を占め (Trapp et al., 1988; De Monasterio-Schrader et al., 2012; Raasakka and Kursula, 2014)、末梢神経系にも極少量が存在すると報告された (Radtko et al., 2011)。CNPase ドメインの大部分は C 末端 (アイソフォーム 1) ペプチドとして脂質化された Cys 残基を介して細胞膜に結合しており、極一部は N 末端のターゲット配列 (アイソフォーム 2) を介してミトコンドリアに輸送される (McFerran and Burgoyne, 1997; Lee et al., 2006)。また、カルモジュリンや細胞骨格の相互作用をする polynucleotide kinase (PNK) 類似型ドメインと (Stingo et al., 2007)、ホスホエステラーゼ活性部位がある His-X-Thr-X の 2 連続ドメインの構造を持つ (Lee et al., 2001; Raasakka and Kursula, 2014)。CNPase は、C 末端ペプチド作用によって OL 樹状突起の形成、分岐、成長に不可欠であり (Lee et al., 2005)、成熟 OL やミエリン形成 OL で発現するタンパク質として知られている (Hemmer et al., 2002; Lappe-Siefke et al., 2003; Raasakka and Kursula, 2020)。

#### B-5. 視覚大脳皮質における眼優位性

脳には学習や記憶に必要な神経回路がある。その回路には、環境に適応しながら機能を形成する重要な時期がある。それを臨界期または感受性期と呼ぶ。通常、一つの機能に対する臨界期は一生に一度しか生じないため、極めて重要である。臨界期が生じる時期は、視覚や聴覚などの感覚機能や、言語学習などの記憶機能というように各々異なり、さらには動物種によっても異なる。

臨界期に重要な脳の部位は大脳皮質であり、感覚皮質の神経回路形成においては光刺激や音刺激などの各要素に対応する臨界期が存在する。その臨界期は、典型的にマウスの生後 19 日目から 32 日目までと知られてる (Prusky et al., 2006; Maffei et al., 2010)。視覚の刺激パターンによってニューロンの機能的反応に敏感な時期であり、神経回路が成熟した後 (成体時) においては視覚入力パターンによる変化は生じないと良く知られている (Hubel and Wiesel, 1962; Wiesel and Hubel, 1963; Globus and Scheibel, 1967; Hensch, 2005)。感覚皮質は感覚入力パターンによって、一生に渡ってダイナミックな変化や適応をする (Burton, 2003; Amedi et al., 2005; Merabet and Pascual-Leone, 2010)。子猫の早期 (開眼前) の眼球剥奪は一次視覚野における

シナプス活性は変化させず、視覚情報の減少により、視床の lateral geniculate nucleus (LGN) に至る軸索を減少させ、反応性のある一次視覚野の領域を縮小させる(Ohwaza and Freeman, 1988; Karlen and Krubitzer, 2009)。

興奮性と抑制性の神経細胞、およびグリア細胞とそれらの神経細胞との相互作用が臨界期形成に重要だと考えられている。例えば、視覚皮質では、興奮性神経活動を抑制する抑制性神経細胞(特に、Parvalbumin(PV)発現性バスケット細胞)が臨界期の開始に重要な働きをすることが報告されている(Hensch, 2005)。また、抑制性神経細胞による興奮性神経細胞の制御とアストロサイトによる神経伝達物質の代謝が臨界期の形成に関与していると考えられている(Hensch, 2005; Muthukumar et al., 2014)。したがって、神経細胞やグリア細胞などの神経系幹細胞の増殖かは、臨界期における神経回路形成に重要な役割をもつことが考えられる。

#### B-6. 視覚剥奪によるグリア細胞の変化

V1 の発達時における視覚経験はグリア細胞に影響を与える。眼優位性臨界期の以前の生後 12 日目から 24 日目までマウスを闇環境下(Dark rearing)にさせると、GFAP+アストロサイトの細胞数には影響を与えないが、生後 12 日目から成体までの闇環境では GFAP+アストロサイトを減少させる(Corvetti et al., 2003, 2006)。生後 28 日目からの単眼剥奪は、両眼から情報を受け取って処理する V1B 領域 (the binocular zone of primary visual cortex) において Iba1 を発現するミクログリアの分布を変化させないが、単眼剥奪より 4 日間までは、ミクログリアが形態的に変化し、ブランチ(神経突起数)が増加した(Sipe et al., 2016)。出生後から 4 週間の暗環境下での発育では、OPC の数や分布に影響しないと報告されている(Mangin et al., 2012)。一方、ミエリン関連遺伝子は生後 28 日目の一次視覚野の下層において増加し(Lyckman et al., 2008)、オリゴデンドロサイト特異的遺伝子は生後 26 日目の一次視覚野に最も多く発現している(Benoit et al., 2015)。その中で、serum/glucocorticoid-regulated kinase(e.g., *Sgk1*, *Erf*, *Egr1*, Nogo-66 receptor, etc)などの一部は光刺激に反応して増加する(McGee et al., 2005; Hrvatin et al., 2018)。しかし、視覚入力パターンによる OPC 増殖や分化における OL 系細胞の発達に関して未だ明らかとされていない。

#### B-7. Sonic Hedgehog (Shh) シグナル

Shh は、胎児期にモルフォゲンとして、濃度勾配による器官形成の制御に重要な役割を担

い、生後の細胞種や組織部位によって役割が変わってくるがよく知られている(Lu et al., 2000)。例えば、脳組織の発生過程で、神経管の腹側にある脊索 (Notochord) から分泌され、腹側から背側へ濃度勾配を形成しながら NSC を OPC へ分化させる。また、成体 NSC での細胞分裂やグリア細胞への分化制御にも、Shh が関与することが報告された(Ruiz i Altaba et al., 2002; Araujo et al., 2014)。さらに Shh は、視神経交叉(Optic chiasm)または脊髄の中央交連 (spinal cord midline commissure)で軸索を介して長い距離まで分泌され(Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Fabre et al., 2010; Sánchez-Arrones et al., 2013)、神経回路形成に関与する可能性が示唆されている。Shh の RNA レベルや N 末端タンパク質は Pre-synapse と Post-synapse 両方で発現し、マウスの胎児 14 日目をピークとして経時的に減少し、P30 の皮質で僅かな増加が表れる(Rivell et al., 2019)。これらより、シナプスにおける Shh 発現の増減による、神経回路再編成が生じるかどうかという疑問が生まれる。

Shh は皮質第 5 層の興奮性ニューロン(Harwell et al., 2012)と、皮質内アストロサイトによって分泌されると報告された(Garcia et al., 2010; Hill et al., 2019)。Shh タンパク質は、C 末端ドメインと 19 kDa の N 末端ドメインで構成されており、N 末端でのパルミトイル化と C 末端アミノ酸へのコレステロール付加によって修飾され、シグナル活性状態の Shh-N タンパク質として細胞外へ分泌される(Bonn-Breach et al., 2019)。非活性状態の場合、Shh シグナルを受ける細胞では、PTCH1(Patched 1)受容体が Oxysterol と結合して Smo(Smoothened)受容体を非活性化させ、その下流にある Gli 複合体が Sufu タンパク質と結合して、核内で転写抑制因子として働く。Shh-N タンパク質が PTCH1 受容体に結合すると、Oxysterol が PTCH1 から離れて Smo 受容体に結合すると同時に、Smo 受容体が活性化され、その下流にある Gli タンパク質と Sufu タンパク質との結合が解除され、Gli が核内で転写活性因子として働く。つまり、Gli は Shh シグナル関連遺伝子、例えば、PTCH1、Smo、Gli1/2/3 など(Bonn-Breach et al., 2019; Espinosa-Bustos et al., 2019; Yang et al., 2021)の転写活性を制御する。本研究では、Shh シグナルの制御による OPC 未分化性維持を調べるため、Cyclopamine と用いて Smo 受容体の活性を抑制した。上記のように、Oxysterol が Smo 受容体に結合することによって Shh シグナル経路の活性され、Cyclopamine は Oxysterol に代わって Smo に結合し、Shh シグナルを非活性状態で維持させる(Chen et al., 2002)。成体マウス SVZ の新生細胞では、Cyclopamine 投与によって Smo 受容体下流の RNA 量が低下した(Palma et al., 2005)ため、Shh シグナルを効果的に阻害できると想定した。



脳卒中などによる脳損傷、また多発性硬化症やアルツハイマー認知症による神経変性疾患は、損傷部位における肥満アストロサイトが発現してグリア性瘢痕(Glial scar)を形成し、Shhを分泌して(Yang et al., 2012; Sirko et al., 2013)、ニューロンの細胞死を保護する(Chechneva et al., 2014; Pitter et al., 2014; Sofroniew, 2020)。アストロサイトとは別に、Shh シグナル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(Ferent et al., 2013; Samanta et al., 2015; Sanchez and Armstrong, 2018)。しかし、神経疾患を持たない健常 OPC の大脳皮質における Shh シグナルの影響は知られていない。

### B-8. OPC 増殖・分化における諸メカニズム

OPC 増殖や分化は多数のメカニズムによって制御される。皮質のスライス切片培養 (*in vitro*) では、phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/mammalian target of rapamycin (mTOR) と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路の相互作用によって NG2 + 細胞の増殖性が亢進されるが、extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路は介さない(Ishii et al., 2012; Hill et al., 2013)。 *in vivo* 研究より、p38MAPK-ERK1/2 シグナルは、ミエリン鞘の太さを制御し、Akt/mTOR と ERK1/2 経路の相互作用は OPC から OL への分化を促進させる(Chew et al., 2010; Ishii et al., 2012, 2016; Dai et al., 2014)。また、OPC をターゲットとした PTEN-Akt-GSK3 $\beta$  の活性は OPC から OL への分化を促進し、mTOR 非依存的に新たなミエリンを形成させる(González-Fernández et al., 2018)。さらに、Notch1 や TGF  $\beta$  シグナルが OPC から OL へ分化の促進に関わり、Wnt/ $\beta$  catenin 回路の TCF7L2 Transcription factor 7 like 2)は阻害の方に働く(Fancy et al., 2009; Hammond et al., 2015)。従って、OL 系細胞の発達には諸メカニズムに関わり、マウスの日齢や実験方法による結果の相異性を見極める必要があると考えられる。

### B-9. 本研究に向けて

オリゴデンドロサイト前駆細胞は生後の脳において広く分布し、一生にわたって持続的に増殖性の持つ主な細胞種として知られており、やがて成熟 OL へ分化して新たなミエリンの再編成を繰り返す(Mallon et al., 2002; Dawson et al., 2003; Dimou et al., 2008; Rivers et al., 2008; Kang et al., 2010; Young et al., 2013)。OPC は均一な数や分布を維持し、神経活動に応じて増殖や分化をする(Hughes et al., 2018)。例えば、神経回路における特定のニューロンを刺激させると、OPC の増殖や分化を亢進させたり(Li et al., 2010; McKenzie et al., 2014)、静止状態 OPC

の成熟 OL への分化を促進させたりする(Gibson et al., 2014)。マウスのヒゲ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 増殖と同時に成熟を低下させる(Mangin et al., 2012; Hill et al., 2014)。

一次視覚皮質においては経験依存性 OPC の増殖・分化の影響に関する報告は少ない。生後 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(Mangin et al., 2012)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優位性臨界期のピークには、一部のミエリン関連遺伝子の発現が、特に V1 の下層において亢進し(Lyckman et al., 2008; Benoit et al., 2015)、光刺激によって OL 発現性遺伝子が増強する(McGee et al., 2005; Hrvatin et al., 2018)ことから、その臨界期での OPC 発達への重要性が示唆された。しかし、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、眼優位性臨界期における、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。

本研究は、マウスの一次視覚野において OL 系細胞がどのように発達し、更に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優位性臨界期開始前後の時期に調べ、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一次視覚野の灰白質(Gray matter; GM)、特に下層における OPC の未分化性について検証した。生後 22 日目から 25 日目までの BrdU 投与により OPC が最も増殖したことから、この時期に着目し、増殖能の有無、分化状態、および細胞分裂した娘細胞の対称性モードを視覚経験依存的で有るか否かを検証した。また、これらの変化を Shh シグナル経路が介するかを検討した。増殖細胞の 25 日以降の分化状態を経時的に調べ、成熟 OL やミエリン形成に眼球剥奪がどのように影響を与えるか検証した。これらの結果より本研究では、一次視覚野の神経回路再編成に重要な時期に、マウスの目蓋が開く時期から盲目環境にすると、Shh シグナル経路の一部を介して 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。

さらに皮質下白質 (WM) での両眼剥奪の影響を調べた。WM には、神経伝達情報を仲介する投射軸索において、適切な神経電氣的伝導を行うのためにミエリンが存在している。ミエリンは、神経情報の電氣的伝導の速度とタイミングを制御し、軸索を構造的・機能的に修飾する。そのため、神経回路の成熟形成に OL がどのように発達するかを理解することが重要である。OPC の密度は GM よりも WM で約 50%高い分布を示す(Dawson et al., 2003)。OPC は自己新生して増殖し、OL へと分化する(Rivers et al., 2008; Guo et al., 2009; Kang et al.,

2010; Young et al., 2013; Nishiyama et al., 2014)。OPC 発達における増殖率は、GM よりも WM において速い(Simon et al., 2011)。これらの OPC 特性の重要性は、まだ明らかとされていない。

OPC 増殖は、ニューロンの軸索活動によって影響される。成体における脳梁の *in vivo* 研究より、電位依存性ナトリウムチャネル阻害剤テトロドトキシンによって局所的な軸索伝導が阻害され、OPC の増殖が増加した(Gautier et al., 2015)。出生時からヒゲを切断して感覚入力が皮質に到達するのを防ぐと、一次体性感覚皮質のバレル野における GM でも OPC 増加が検出された(Mangin et al., 2012; Hill et al., 2014)。一方、*in vitro* 研究から、後根神経節(dorsal root ganglion)で神経活動が強化されると OPC 増殖が減少した(Stevens et al., 2002)。つまり、神経活動の増加が OPC 分布を減少させ、神経活動の喪失が OPC を増加させた。しかし、このようにを結論付けるのは簡単ではない。成体運動野の皮質下 WM と皮質脊髄路(corticospinal tract)においては、神経活動の亢進によって OPC 増殖は減少せず、増加した(Li et al., 2010; Gibson et al., 2014)。これは、脳領域依存的な OPC 増殖性が示唆される。また、OPC 増殖の増加における原動力として OPC 恒常性が考えられ、細胞分裂時に、OPC から分化への割り当てを制御することによって、OPC を一定数に保つと考えられる(Hughes et al., 2013; Xiao et al., 2016)。一次視覚野の皮質下 WM では、OPC の増殖と分化の性質、そしてそれらの活動依存性に関しては殆んど知られていない。

本研究で、GM では、生後 15 日目の開眼時から視覚剥奪すると、特定の発達時期に OPC 未分化性を増加させ、その後 OL への分化を増強させることを発見した。盲目マウスでは、生後 19 日目から 22 日目または生後 25 日目から 28 日目に比較して、生後 22 日目から生後 25 日目に毎日 1 回 BrdU の腹腔内注射で検出された OPC 増殖を増加させた。この皮質下層における OPC 増殖の増加は、Ki67+増殖性細胞を上昇させて Ki67-分化性細胞を減少させる事を明らかにした。興味深いことに、増殖した細胞の成熟が、生後 25 日目以降に促進された。本研究より、P22~25 の時期は、神経活動依存による OPC 増殖に対して感受性の高い特異的時期であることが示唆された。さらに、生後 22 日目から 25 日目の特異的な期間の V1 の皮質下 WM における OL 系細胞の発達上の変化や、OPC の増殖と分化に対する視覚剥奪の影響を検証し、GM との違いを明らかにした。

## C. 実験材料・方法

### C-1. 実験動物

実験動物はC57BL系統マウスを用い、12時間明暗サイクル下、動物施設で飼育をした。全てのマウスの処置は創価大学動物管理委員会の承認下、実験動物の世話と使用のためのガイドに従った(US National Research Council Committee, 2011)。本研究では生後15~50日目のマウスを用いた。

マウスにおける視覚剥奪環境を作るため、生後15日目(Postnatal day; P15)に目蓋が開いた事を確認した後、視神経切断の手術を行った。IACUCの承認下（承認番号170015、18013、190009、20008、21006）、眼球剥奪の実験手法は先行研究に基づいて施した(Karlen and Krubitzer, 2009; Aerts et al., 2014)。P15のマウスに鼻を覆うマスクを用いて、1.0 L/min O<sub>2</sub>と1.5 L/min N<sub>2</sub>Oのガス混合物とともに2%イソフルラン(Cat# 008313, Intervet)のガス麻酔下で眼球剥奪手術を施した。手術の間、マウスの体温が冷え込まないように、ヒットパッドを用いて37°Cで体温を維持させた。麻酔にかかって不動状態であることを確認した後、痛み止めである2%リドカイン(Cat# 125-05681, Wako)を目蓋の上に塗布した。目蓋を開いてピンセットで眼球を持ち上げながら軌道から離し、その眼球の奥方にある血管と視神経をピンセットで軽く虚血した後、手術用ハサミで視神経を切断した。眼球剥奪の後、眼球不在の代わりに、滅菌済みのGelfoam (Pfizer)の断片を入れ込んだ。目蓋を閉じ、手術の部分的痛み軽減させるため、綿棒で濡らした2%リドカインか0.25% ブピバカイン(bupivacaine; LKT laboratories, USA)を目蓋の上から再び塗布した。一方側の眼球剥奪は上記と同様に行い、一匹マウスの手術時間は概して5分以内で済ました。対照群のため、眼球剥奪ステップのみ除いて同様な実験手法で偽手術を行った。手術後、対照群と眼球剥奪マウスに5 mg/kgの消炎鎮痛剤メタカム(Metacam; Meloxicam; Cat# M20812A-32, Boehringer Ingelheim)を3日間、一日一回を腹腔内注入を行い、マウスの手術による苦痛をできるだけ抑える工夫を行った。手術の間、マウスの体温や心拍数、呼吸を持続的にモニターをした。両眼球剥奪もしくは偽手術を施したマウスは、その親や兄弟・姉妹の元に戻して、12時間明暗サイクル下、動物施設で飼育をした。マウスの健康状況を確認するため、毎日モニターを行った。P20頃に親元から離乳した後、視覚低下による生存低下を防ぐため、実験動物が自ら餌が食べれるまで概して3~5日間餌を手動供給しながら観察をした。実験に用いた全ての動物は、手術による顕著な体重低下は見られなかった。手術後、P22、P25、P28、P30、P50のマウスを用いた。

## C-2. BrdU 及び Shh シグナル抑制剤の投与

細胞の新生時期を特定するため、BrdU (5'-bromo-2-deoxyuridine; Cat# B5002, Sigma, 100 mg/kg/day)を発達期のそれぞれの時期に、P19~22、P22~25、P22~28 に、毎日1回、そして犠牲させる2時間前に腹腔内に投与した。BrdUの最初注入から~72時間経過したマウスを用い、0.1 M phosphate buffer で溶解した4% (w/v) paraformaldehyde (Cat# 168-23255, Wako) (4% PFA)で脳組織を固定し、その脳切片を用いて特定細胞種マーカーと共に BrdU を検知した。

Shh シグナル経路の Smoothed (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、phosphate-buffered saline (PBS) followed で溶かした45%の2-hydropropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HBC, Cat# H-107, Sigma)で1 mg/mlになるよう溶解したものを使用した(Van den Brink et al., 2001)。P22~25 または P22-29 に、HBC (vehicle control)或いは Cyclopamine を毎日一回、腹腔内注入をし、P25 また P30 に脳組織固定を行った。P22~25 には、BrdU 投与の1時間後、vehicle や Cyclopamine を投与した。

## C-3. 免疫蛍光染色

マウスにウレタン(1.0 g/kg, i.p.; Cat# U2500, Sigma)とキシラジン(13 mg/kg i.p.; Cat# X1251, Sigma)を腹腔内注入をして麻酔させた。麻酔された実験動物は、氷上で冷やした4% PFAを用いて5分間の心臓灌流固定を行い、取り出した脳を4% PFA 上で4℃下、2時間以内の追加固定をした。ビブラトーム(Cat# DTK-1000, Dosaka)を用いて冠状(Coronal)脳切片を浮動状態下で厚みが40-50  $\mu$ m になるように作製し、細胞種特異的な諸抗体で免疫蛍光染色手法に従った。

anti-Ki67 抗体の染色に当たり、事前熱処理による Ki67 抗原の表れが求められる。熱処理のため、脳切片を入れたウェルプレートは sodium citrate buffer (pH 6.0) で80℃下、30分間、恒温槽で熱を与えた後、常温で10~15分間冷やし、PBS で5分間2回洗浄した。Anti-BrdU 抗体の染色に当たり、事前塩酸処理によって DNA の2本鎖を解かせて BrdU 抗原の表れが求められる。脳切片を入れたウェルプレートは1N HCl に37℃下、恒温槽で45分間インキュベートした後、pH を中和させるために0.1M borate buffer (pH 8.5)に入れ替え、常温で15分間2回付け置き、PBS で10分間5回洗浄をした。anti-Ki67 と anti-BrdU 抗体の共染色には、先に事前熱処理を行ってから塩酸処理をして、先行研究に基づいた手法で染色を行った

(Kee et al., 2002; Wojtowicz and Kee, 2006)。BrdU ラベルと多重染色のため、脳切片は 4°C 下、4 % PFA で 1 時間インキュベートしてから、次のステップへ進んだ。

PBS で脳切片を洗浄し、ブロッッキング試薬(5 % normal donkey or goat serum, 0.3 % Triton X-100 in PBS)を常温で 2~3 時間アプライし、ブロッッキング試薬に希釈した一次抗体(下記参考)は 16 時間以上、4°C下でインキュベートした。続きに、PBS による洗浄後、同様の脳切片に二次抗体をブロッッキング試薬に希釈して常温で 1.5 時間インキュベートした(希釈率 1/500; Table 1)。細胞の核を可視化するため、Hoechst 33342 (3 µg/ml; Thermo Fisher)を最後に染色した。染色された脳切片は Vectashield antifade mounting medium (H1000, Vector Lab)の塗布後、カバーガラスを上から覆って、透明マニキュアで固定させた。

細胞特異的に検知させるため様々な一次抗体を用い、それらを可視化させるため其々の染料が付着された二次抗体を用いた。使用した抗体らの品名、会社、希釈率、RRID や Cat. No. などの情報を含むリストを Table 1 にまとめた。

#### C-4. V1 の解剖学的分析位置

マウスのアトラスに基づき(Paxinos and Franklin, 2008)、両眼球からの情報を受け取って処理する V1B を主に分析領域とした。V1B は、眼優位性臨界期の間、眼球の左右から受ける情報が両眼視野闘争による敏感な反応性を示す領域として知られている(Maffei et al., 2006)。V1B の冠状脳切片における場所特定のため、先ず MGv (the ventral division of the medial geniculate nucleus)の中心部から垂直線を引き、その垂直線から後頭皮質側へ 15°になるよう 2 番目の線を引く(Figure 1)。この 15°線はマウスのアトラス (脳解剖学) に基づき、V1B に相当すると推測した。細胞密度解析のための ROI (The region of interest)は、Hoechst 染色からの核染色により、Pia (大脳皮質の軟膜) から皮質第 6 と WM の境界線までを GM 領域とし、皮質第 6 と WM の境界線から海馬までを WM 領域とし、15°線から内側と側面の方に 0.4 mm の離れた 2 つの線を其々平らになるよう引いて解析領域を決めた。一匹マウスから V1 の連続的脳切片を平均的に 5~6 枚を使用し、1 グループ当たり最低限 3 匹のマウスを使用した。

#### C-5. 画像取得及び分析方法

HyD detector を使って共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SP8)でイメージを撮影した。一領域に対する画像の Z 軸ステップは 1 µm 置きにして取得した。

蛍光強度の閾値以上となる細胞を免疫陽性細胞(或いは発現性細胞)と定義した。細胞数算出に当たり、同じ脳切片において画像背景となる非発現性場所の蛍光強度を最低限 5 か所の平均値を算出した。閾値蛍光強度は、脳切片ごとに、画像背景強度平均値の 3X 標準偏差値 (SD)と決め、ROI 内に計算された値を引き算した。細胞カウントは実験条件の未知の下、実行した。取得したイメージで、染色の視覚化可能の範囲内における細胞数と体積を計算し、細胞密度(cells/10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>)と分析した。一次視覚野の ROI に関しては、Pia を除く第 1 層を Bin 1 とし、Bin 2~8 は大脳皮質の第 2 層から第 6 層と WM の境界線までを 7 等分し、Bin を決めた。各 Bin における細胞の算出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)で解析を行った。

CNPase (2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase)の発現するピッセル蛍光強度を測定するため、取得した画像は NIH image J に運び出し、Z 軸スタッキングをして 2 次元の 1 枚の画像へ変換させた。閾値は強度以上の数値として引き算した。蛍光強度の分布は、各脳切片において Image J の Profile 機能を用いて測定した。強度の平均値は、各実験条件当たり、最低限 4 枚の脳切片の平均値を出した。蛍光強度の累積分布解析のため、ピッセル強度は Pia から第 6 層まで 1%ステップごとに測定し、全体強度を標準化させ、Kolmogorov-Smirnov 検定による解析を行った。データ解析は実験条件の未知の下、実行した。

BrdU+ダブレット細胞の解析にあたり、BrdU+娘細胞の中心間距離を取得画像から 3 次元で測定した。先行研究に基づき、BrdU+細胞の中、細胞間距離を 35 μm 以下となるものをダブレット細胞として定義した(Boda et al., 2015)。

## C-6. 統計学解析

本研究では統計学解析ツールとして Microsoft Excel と the R Project for Statistical Computing software (RRID:SCR\_001905) を用いた。健常マウスと BE マウスグループの 2 標本に当たり平均値の違いによる有意差を検定するため、unpaired Student's t-test や one-way ANOVA test (元配置分散分析法) を行い、統計学的有意差(p < 0.05)を検証した。Cyclopamine の実験に当たり、4 条件のコンディションにおける違いを比較するため、one-way ANOVA で検証した後、the Tukey post hoc test (多重比較検定)を行った。

CNPase の蛍光強度解析のため、各グループの違いを 2 標本 KS-検定(the two-sample Kolmogorov-Smirnov test)を用いてテストを行い、有意差(p < 0.05)を検証した。2 標本 KS-検

定は、適合度の検定法の一つであり、分布種類を問わないノンパラメトリックな二つのグループ間の確率分布が異なるものであるか否かを検定する手法である。各グループの累積確率分布より、二つの標本間の差を計算し、その最大値を  $D$  として表し、KS 統計量と呼ぶ。二つの分布が等しいという仮説から得られた KS 統計量を  $D\text{-crit}$  と、実際に得られた値は  $D\text{-stat}$  と表記して  $D\text{-crit}$  より大きければ有意差があるとする。

各実験のグループやコンディションに当たる有意差や  $N$  値（実験に用いた実験マウスの匹数）は、図や図の説明文（Legend）に記した。各グラフは、該当データ毎の【 $\text{平均値} \pm \text{平均値の標準誤差}$ 】として表した。



## D. 結果

### D-1. 眼優位性臨界期の開始時における、灰白質での増殖細胞の検討

マウスの一次視覚野において、眼優位性臨界期(P19-32)の初めの頃(P22, P25, P28)、神経回路再編成に伴って細胞増殖に変化するか検討する事を目的とし、まずはGMでの発達変化を観察した。増殖細胞マーカーとして Ki67 と BrdU を用いて免疫蛍光染色を行った。Ki67 は G<sub>0</sub> 期を除く細胞周期 (G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub> 期、M 期) 内に発現する核タンパク質であり、増殖能力の持つ細胞マーカーである。Ki67 発現(+)細胞は、V1 の全体的に広く分布していた (Figure 2)。健常マウス(Control mice; CTRL)では P25 に有意的に増加した(Figure 2G; one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 7.30$ ,  $p = 0.0061$ )。Ki67+細胞は、P22 から P25 に 2.5 倍増加し、P25 から P28 に減少の傾向であった(Figure 2G)。DNA 複製を経て活発に増殖した細胞を標識する BrdU は、マウスの腹腔へ P19~P22、P22~P25、P25~P28 の各時期に、一日一回(合計 4 回) 注入し、其々の期間内に実際に増殖したと考えられる細胞を検討した(Figure 2H)。3 日間の BrdU 投与により増殖した BrdU+細胞は、Ki67 細胞数より 2 倍以上存在し、V1 の下層でより多く分布するが、どの時期においても細胞密度がほぼ同様であった(Figure 2H, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 0.181$ ,  $p = 0.84$ )。これらの結果より、新たに生まれた BrdU+細胞の増殖率は変化せず、増殖能の持つ未分化性 Ki67+細胞は眼優位性臨界期の早期である P25 に増加すると示唆される。

そして BrdU と Ki67 の共染色より、BrdU+Ki67+細胞と BrdU+Ki67-細胞を上記と同様な時期で検討した。BrdU+Ki67+細胞は、DNA 複製期を経て細胞周期内に残っている増殖性細胞を示し、P25 時期特異的に増加をした(Figure 2I, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 7.46$ ,  $p = 0.0067$ )。BrdU+Ki67-細胞は、DNA 複製期を経て細胞分裂後に G<sub>0</sub> 期へ細胞周期を脱した細胞であり、推定的に静止状態か分化へ進んだ細胞を示す。しかし、BrdU+Ki67-細胞は、BrdU+Ki67+細胞より多く分布するが(Figure 2I & 2J の比較)、どの時期においても優位的変化は無かった (Figure 1J, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 0.014$ ,  $p = 0.986$ )。これらの結果より、普段の増殖細胞は細胞周期から脱するが、眼優位性臨界期の開始時である P22~25 の間増加した細胞は増殖性に感受性を持つと示唆される。

### D-2. V1 の皮質下白質における増殖細胞の性質

生後 4 週目とそれ以降、V1 の両眼領域における皮質下白質 (WM) で増殖細胞の分化性・

未分化性状態を検討した。各時期に、BrdU を毎日腹腔内へ注入し、WM で増殖した細胞が標識された (Figure 1)。P25 の全ての BrdU+細胞は Olig2 と NG2 を発現したことから (Figure 1D、 $96.1 \pm 1.4\%$ 、 $N = 6$ )、増殖細胞がオリゴデンドロサイト系細胞であることを示唆された (Dimou et al., 2008)。Ki67 を用いた免疫蛍光染色により、増殖能をもつ Ki67+細胞を検討した (Figure 9A、B)。健常マウスの WM における Ki67+細胞の密度は P22 と P25 で同様だったが、P25 から P28 の間で約半分が急激に低下し (one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 6.18$ ,  $p = 0.011$  Tukey-Kramer post-hoc test, P25 vs. P28,  $p = 0.00094$ )、P28 から P50 の3週間で半分近く更なる減少が続いた (Figure 9C)。P25 から P28 への減少は、増殖の低下や細胞周期から細胞  $G_0$  期へ脱した状態へ発達の移行による要因であると考えられる。

Ki67+細胞の発達の減少を探索するため、先ず3日間の BrdU 投与により OL 系細胞を P19 から P22 (P19~22)、P22 から P25 (P22~25)、または P25 から P28 (P25~28) 標識し、BrdU と Ki67 の共染色による増殖率を調べた。BrdU+細胞は、P19~22 から P25~28 に減少の傾向が観られた (Figure 9D)。P22~25 から P25~28 に BrdU+細胞は  $4.4 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  が減少し、これは P25 から P28 に Ki67+細胞の低下 ( $6.0 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ ) に寄与したと考えられる。実際に BrdU+ Ki67+細胞は P22~25 から P25~28 に約  $2.2 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  が減少し (Figure 9E)、これは Ki67+細胞喪失の3割以上であった。したがって、Ki67+細胞の喪失は、増殖率の低下を伴う可能性が考えられる。

BrdU+ Ki67+増殖性細胞が P22~25 から P25~28 に減少したにも関わらず、BrdU+ Ki67-細胞の増加に寄与しなかった (Figure 9F)。3つの期間のいずれかにおいて Ki67-細胞の割合は、ほぼ同様であった (P19~22 で 73%、P22~25 で 71%、P25~28 で 78%)。これらの結果より、健常マウスでの増殖率検証の3つの時期で、細胞の分化状態の割合に明らかな変化が無く、P25 から P28 に細胞増殖が低下し、増殖細胞の喪失があったことが示唆された。

### D-3. 灰白質での P22~25 の増殖細胞における視覚剥奪の影響

V1 における Ki67 や BrdU をラベルした細胞の増殖性・分化性に対して、視覚剥奪による影響を検討した。開眼時期である P14~15 に視神経を切断し、両眼球を無くした盲目マウスにおける増殖細胞の変化を調べた。視覚剥奪マウスでも健常マウスと同様に、V1 における Ki67+細胞が P25 に有意的に増加した (Figure 2G; one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 8.33$ ,  $p = 0.0036$ )。しかし、Ki67+細胞に対して、視覚剥奪による影響や日齢間 (P22, P25, P28) での顕著な変化は

見られなかった(two-way ANOVA analysis,  $F(2, 30) = 2.06$ ,  $p = 0.14$ )。つまり発達期を通して、健常マウスと視覚剥奪マウスにおいては、細胞の増殖能の違いは無い事を示唆する。ところで、盲目マウスの BrdU+細胞は、P25 の時期に顕著な増加をし(Figure 2H, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 7.42$ ,  $p = 0.0058$ )、これは視覚剥奪が P22 から P25 の間に細胞の増殖率を促進させたことを示唆される。しかし、BrdU+細胞に対して、視覚剥奪と日齢による相互的影響は無かった(two-way ANOVA,  $F(2, 30) = 1.21$ ,  $p = 0.31$ )。P22、P25、P28 の3つの発達期の間、視覚剥奪による BrdU+細胞の影響は少なかった(Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.093$  for P19-22 vs. P22-25,  $p = 0.54$  for P22-25 vs. P25-28)。更に、どの時期においても盲目マウスで健常マウスより BrdU+細胞数が有意的に増加しなかった(Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.90$  for P22,  $p = 0.86$  for P25, and  $p = 1.0$  for P28)。これらの結果より、健常マウスでも盲目マウスでも P25 の時期特異的に増殖能がピークとなる発達の影響を示す一方、視覚剥奪による増殖細胞の分布には影響しなかったことを示唆する。

新たに新生した細胞の増殖性・分化性の状態に視覚剥奪によって制御されるか検討するため、BrdU+Ki67+細胞と BrdU+Ki67-細胞の分布を調査した。P22~25 に増殖した BrdU+Ki67+細胞の数は盲目マウスで最も多かった(Figure 2I, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 11.1$ ,  $p = 0.0013$ )。しかし、BrdU+Ki67+細胞は、視覚剥奪や日齢による顕著な相互的影響は示されなかった(two-way ANOVA,  $F(2, 30) = 2.09$ ,  $p = 0.14$ )。BrdU+Ki67+細胞は、P19-22 より P22-25 に約5倍以上、P25-28 より P22-25 に約2倍以上が盲目マウスで優位的に増加した(Figure 2I; Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.0034$  for P19-22 vs. P22-25,  $p = 0.015$  for P22-25 vs. P25-28)。盲目マウスで P22-25 に増加した BrdU+Ki67+細胞は、健常マウスの分布と同様であった(Tukey-Kramer test,  $p = 0.054$ )。その一方で、細胞周期を脱した BrdU+Ki67-細胞に対して、どの時期においても視覚剥奪による影響は無く(Figure 2J, one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 1.17$ ,  $p = 0.34$ )、盲目や時期による相互作用は観られなかった(two-way ANOVA,  $F(2, 30) = 0.33$ ,  $p = 0.72$ )。そしてどの時期においても、健常マウス(Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.84$  for P19-22,  $p = 0.97$  for P22-25,  $p = 1.0$  for P25-28)と盲目マウス(Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.094$  for P19-22 vs. P22-25,  $p = 1.00$  for P22-25 vs. P25-28)における顕著な統計学的有意差は検知されなかった。これらの結果より、P22-25 の時期特異的に視覚剥奪によって増殖性細胞が顕著に増える一方、細胞周期から脱した BrdU+Ki67-細胞の影響は少なかったと示唆される。

成熟 OL マーカーの myelin basic protein (MBP)が、発達期の間皮質の下層で高い強度を示

すと同時に、多数の OL 遺伝子が発現する事より (Dawson et al., 2000)、本研究では P25 の時期特異的に増殖する細胞が V1 内特定の層で増加するか、大脳視覚皮質を Bin 1~8 に等分し各層別の定量分析を行った。Bin 1~4 は第 1~4 層、Bin 5~6 は第 5 層の上下、Bin 7~8 は第 6 層の上下に大まかに同様であると想定した。その中、WM に近接した Bin 8 における BrdU+Ki67+細胞が、時期特異的な有意差が観られた (two-way ANOVA test,  $F(2, 29) = 30.14$ ,  $p = 8.3 \times 10^{-8}$ )。盲目マウスにおいて増殖性細胞は、P22 から P25 で 2.5 倍以上が増加し、P25 から P28 で同様な倍率として減少をした (Figure 2K, Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 1.1 \times 10^{-6}$  for P22 vs. P25;  $p = 2.0 \times 10^{-5}$  for P25 vs. P28)。P25 の BrdU+Ki67+細胞は、視覚剥奪によって健常マウスより更なる増加が観られた (Figure 2K; two-way ANOVA test,  $F(2, 29) = 6.97$ ,  $p = 0.0034$ ; Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 1.9 \times 10^{-6}$  for control vs BE mice)。一方で BrdU+Ki67-細胞に対し、各時期における顕著な差は示されなかった (Figure 2L; two-way ANOVA test,  $F(2, 29) = 0.23$ ,  $p = 0.80$ ; Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.78$  for P22 vs. P25,  $p = 0.99$  for P25 vs. P28)。したがって、少なくとも V1 の下層において、P25 の時期特異的に視覚剥奪によって更なる増殖が促進されて、未分化性状態が増加したと示唆され、本研究では大脳視覚皮質の Bin 8 に注目した。

#### D-4. 白質での視覚剥奪による増殖性 OPC 増加の感受性期

増殖能をもつ Ki67+細胞において、視覚剥奪の影響を WM で検討した。P15 の開眼時から視覚剥奪をすると、健常マウスに比べて P25 の Ki67+細胞数が一般により高かったが、統計学的有意差は認められなかった (Figure 9C; unpaired Student's t-tests,  $p = 0.13$ )。Ki67+細胞は、P25 から P28 に減少し (one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 4.60$ ,  $p = 0.028$ )、盲目マウスでは健常マウスと同様に P50 まで低下し続けた。

次に、視覚剥奪が増殖率や分化性状態に何らかの影響を及ぼしたかどうかを調査した。視覚剥奪は、3 つの時期において BrdU+増殖細胞の数に影響を与えなかったが (Figure 9D; unpaired Student's t-tests, P19~22:  $p = 0.95$ , P22~25:  $0.085$ , P25~28:  $p = 0.86$ )、P22~25 に増殖した BrdU+細胞は健常マウスに比べて盲目マウスで僅かな増加が現われた。P22~25 や P25~28 の間では、増殖率に有意差が見つかった (one-way ANOVA,  $F(2, 15) = 7.96$ ,  $p = 0.0044$ , Tukey-Kramer post-hoc test, P22~25 vs. P25~28,  $p = 0.0032$ )。P25~28 に増殖した BrdU+細胞は健常マウスと盲目マウスで同様であったため、P22~25 は視覚剥奪に対して感受性の高い時期であると考えられる。この検討に相応し、BrdU+ Ki67+細胞は視覚剥奪によって約 70%

有意に増加した (Figure 9E、unpaired Student's t-test,  $p=0.042$ )。この増加は、P19~22 (unpaired Student's t-test,  $p=0.042$ ) または P25~28 (unpaired Student's t-test,  $p=0.57$ ) では見つからなかった。しかし BrdU+Ki67-細胞は、BrdU で標識する3つの期間に、視覚剥奪によって変化しなかった (Figure 9F、unpaired Student's t-tests, p19-22:  $p=0.68$ , p22-25:  $p=0.50$ , p25-28:  $p=0.70$ )。したがって、視覚剥奪によって増加した P22~25 の BrdU+ Ki67+増殖性細胞は、細胞周期から脱した Ki67-細胞の減少とは関連性が無かったと考えられる。これらの結果より、視覚剥奪によって、新たに増殖した細胞が増加するのに対して、細胞周期から脱して G<sub>0</sub> 期に存在する細胞には影響しないことから、細胞周期内に残って増殖し続ける OPC には P22~25 という、視覚剥奪に対して感受性が高い時期があると示唆される。

#### D-5. 灰白質での P22~P25 に増殖した細胞の細胞種同定

次に、P22~25 の時期特異的に増殖した細胞の細胞種同定を検討するため、P22~25 にラベルされた BrdU+細胞と各細胞種特異的マーカーとの共染色を行った(Figure 3)。Olig2 は OL 系細胞の転写因子であり、OPC からミエリンを形成する成熟 OL まで、OL 系列全般的に検知できるマーカー(OL 系列細胞マーカー)である。V1 下層の Olig2+細胞は BrdU+細胞の 98% を、NG2+細胞(主に OPC 及び pre-OL マーカー(Dawson et al., 2000; Ghoumari et al., 2005; Kremer et al., 2016))は 90%近くを占めた(Figure 3G)。先行研究と同様に、増殖細胞の殆んどが OPC である結果が得られた(Dimou et al., 2008; Psachoulia et al., 2009; Simon et al., 2011)。BrdU+NG2+細胞の全ては Olig2 を発現し、BrdU+細胞の殆んどは OL 系細胞であると可能性が挙げられた。BrdU+細胞の 10%余りの NG2 非発現性 (-) 細胞は、グリア前駆細胞或いは成熟 OL であると思われる。ところで、Olig2+細胞や NG2+細胞はアストロサイトのような他細胞種も生み出すため(Takebayashi et al., 2002; Zhou and Anderson, 2002; Marshall et al., 2005; Cai et al., 2007; Dimou et al., 2008; Zhu et al., 2008, 2012)、先ずアストロサイトマーカーである GFAP と S100 $\beta$  を用いて BrdU+細胞と共染色を行った(Figure 3C, 2D and 2G)。BrdU+細胞では、~2%の GFAP+細胞であるが、S100 $\beta$ +細胞は~20%を占めた。2種のマーカーともアストロサイトに良く使用されている抗体であるものの、S100 $\beta$  を発現する細胞がより多い割合を占めた。この結果は驚くべきではなく、OPC を含む OL 系細胞においても S100 $\beta$  を発現する事が既に報告されていた(Deloulme et al., 2004)。その他、BrdU+細胞の中、Iba1(Figure 3E)や GAD67(Figure 3F)を発現する細胞は全く存在しなかったため、P22~25 に増殖した細胞はミク

ログリア(Iba1)や抑制性神経前駆細胞 (GAD67)ではない事が分かった。したがって、P25 に増殖した細胞種は、全てが OL 系細胞であり、その中でも NG2+グリアであった。

さらに、視覚剥奪によって増殖細胞の細胞種に変化させるかも検討した(Figure 3G)。しかし、その細胞種も健常マウスと同様な割合を示した。上記の結果より、視覚剥奪は BrdU+細胞の分布を制御せず、Ki67 発現を促進させたため、細胞種より OL 系細胞における増殖能や分化性の制御をする事が示唆される。

#### D-6. 灰白質における視覚剥奪による P25 の増殖性 OPC の増加及び細胞分裂の対称性

V1 において P22~25 の時期特異的に増殖した細胞が、視覚剥奪によって OL 系細胞の増殖性・分化性が制御されるかを確認した。まず P22~25 に増殖した BrdU+細胞の中、Ki67+Olig2+細胞 (増殖性 GPC か OPC) と Ki67-Olig2+細胞 (静止状態 GPC か OPC、或いは分化した Pre-OL か OL) を皮質の各層・白質における分布を検討した(Figure 4)。V1 の各 Bin 別解析により、BrdU+Ki67+Olig2+細胞は、白質で細胞数が最も多く、灰白質の中上層 (Bin 2~4)に比べて下層(Bin 6~8)でより多く分布した。どの層においても BrdU+Olig2+細胞の中、増殖能 Ki67+より非増殖性 Ki67-細胞が多かった(Figure 4I and 4J)。

視覚剥奪による OPC 増殖能の制御に皮質の層依存的であるか検討するため、盲目マウスにおける BrdU+Olig2+細胞の増殖性・分化性を調べた。皮質下層の Bin 8 において、盲目マウスでは BrdU+Olig2+Ki67+細胞が 2 倍程増加し(Figure 4B, one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test,  $F(1, 8) = 51.91$ ,  $p = 0.000092$ )、BrdU+Olig2+Ki67-細胞は健常マウスと同様であった(Figure 4C)。白質の BrdU+Olig2+Ki67+細胞は、盲目マウスで増加の傾向であった(Figure 4C)。これらの結果より、V1 第 6 層の下部において特異的に、視覚剥奪によって感受性的に反応して OL 系細胞の増殖能が顕著に増加する事が分かった。

先行研究と同様に、BrdU+細胞は細胞間距離が近接している娘細胞が脳皮質内に多く存在し(Kukley et al., 2008; Ge et al., 2009; Hill et al., 2014; Boda et al., 2015)、細胞間の 35  $\mu\text{m}$  以下となるペアをダブルット細胞と想定し(Boda et al., 2015)、V1 下層における OPC 分裂の対称性を検討した。BrdU+細胞の半分以上がダブルット状態である事が分かった(Figure 4A'-4A'')。健常マウスの BrdU+ダブルット細胞は、細胞分裂後、主に細胞周期から対称的に離脱(Ki67-/-)し、少数が細胞間の 0~15 $\mu\text{m}$  として対称的に細胞周期に残り(Ki67+/+)、非対称的に分裂した細胞(ペアの中の片方は Ki67+、一方は Ki67-)は少なかった(Figure 4D)。しかし、視覚剥奪

マウスの BrdU+ダブレット細胞は、対称性 Ki67<sup>-/-</sup>細胞が主に存在し、非対称性 Ki67<sup>+/-</sup>細胞が少ないものの、対称性 Ki67<sup>+/+</sup>細胞が細胞間の 6~10 $\mu$ m で約 3 倍増加した(Figure 4E; for 6~10  $\mu$ m,  $5.6 \pm 2.3\%$  for control and  $17.1 \pm 3.2\%$  for BE; one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 7.94$ ,  $p = 0.023$ )。つまり盲目による細胞の増殖性増加は、対称的に細胞分裂をして細胞周期の G1 期へ戻り、増殖能の持続性が向上した事に相応すると示唆される。

#### D-7. 灰白質では視覚剥奪は、静止状態 OPC に影響させず、成熟 OL への分化を減少させて P25 の増殖性 OPC を亢進させる

視覚剥奪による細胞の増殖能促進に細胞周期から脱した細胞の分化状況を調査するため、Ki67 と Nestin を用いて共染色を行った(Figure 5)。Nestin は神経系幹細胞・前駆細胞の未分化性細胞マーカーであり、生後の大脳皮質では神経上皮細胞(Neural epithelial cell)や未分化性細胞に発現することが報告されている(Gallo and Armstrong, 1995; Guo et al., 2009; Rafalski et al., 2013; Reviewed in Schumacher et al., 2012; Kremer et al., 2016)。Nestin 発現の血管内皮細胞から識別するため、CollagenIV を用いて血管細胞を検知させた。BrdU+Nestin+細胞は CollagenIV を発現しない未分化性細胞である事が確認できた。Nestin は増殖性のグリア前駆細胞や OPC に発現し、分化へ進んだ OL (未成熟 OL (Pre-OL とも言う)、成熟 OL、ミエリン形成 OL) では発現しない(Gallo and Armstrong, 1995; Reviewed in Schumacher et al., 2012; Podbielska et al., 2013; Coppi et al., 2015)。Ki67 と Nestin を共染色する事により、Ki67+Nestin+細胞は活発に増殖能をもつ未分化性細胞、Ki67-Nestin-細胞は細胞周期から脱して分化へ進んだ細胞、Ki67-Nestin+細胞は未分化性状態で G<sub>0</sub> 期へ脱した静止状態細胞として其々想定をした。P22~25 に増殖した BrdU+細胞は健常マウスと盲目マウスにおける数が同様であったため、増殖細胞の未分化性状態の変化を割合を検討した。上記の推測の下、健常マウスの BrdU+細胞の半分は分化の方向(Ki67-Nestin-)へ進み、20%の増殖する未分化性細胞(Ki67+Nestin+)と 30%の静止状態未分化性細胞(Ki67-Nestin+)として存在した(Figure 4F-4H)。視覚剥奪によって、静止状態の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約 3 倍増加した(Figure 4H, one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test,  $F(1, 8) = 8.31$ ,  $p = 0.020$  for control vs. BE of BrdU+Ki67+Nestin+;  $F(1, 8) = 12.41$ ,  $p = 0.0078$  for control vs. BE of BrdU+Ki67-Nestin-)。健常マウスと盲目マウスにおける BrdU+Ki67-細胞数は同様であった事より(Control:  $4.03 \pm 0.52$  cells/  $10^6 \mu\text{m}^3$ ; BE:  $3.84 \pm 0.60$  cells/  $10^6 \mu\text{m}^3$ ; Tukey-Kramer post hoc

test,  $p = 0.95$ ) (see also Figure 2L and Figure 4C)、視覚喪失は静止状態の細胞に影響せず、分化を抑制して未分化性維持を促進すると考えられる。

上記の視覚剥奪による増殖性細胞の未分化性・分化性の制御が細胞分裂時に決定されるか BrdU+ダブレット娘細胞の解析を用いて、分化性シフトと細胞分裂の対称性の関連性を検討した。健常マウスにおいて、対称的に分裂した Ki67<sup>-/-</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (分化性) 細胞は、細胞間 6-20  $\mu\text{m}$  の距離で主に存在し、細胞間 31-35  $\mu\text{m}$  の距離では対称的に分裂した Ki67<sup>-/-</sup>Nestin<sup>+/+</sup> (静止状態未分化性) 細胞が占められていた(Figure 4I)。それに対し盲目マウスでは、細胞間 15  $\mu\text{m}$  以内の距離において、対称的に増殖能を持つ Ki67<sup>+/+</sup>Nestin<sup>+/+</sup> (増殖性未分化性) 細胞が顕著に増加する一方(one-way ANOVA,  $F(1,8) = 20.3$ ,  $p = 0.0020$  for 6–10  $\mu\text{m}$ )、対称性 Ki67<sup>-/-</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (分化性) 細胞が減少した(one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 17.04$ ,  $p = 0.0033$  for 6–10  $\mu\text{m}$ ,  $F(1, 8) = 9.43$ ,  $p = 0.015$  for 11–15  $\mu\text{m}$ )( Figure 4I and 4J)。対称的に分裂した細胞の殆んどは、静止状態の娘細胞 (Ki67<sup>-/-</sup>Nestin<sup>+/+</sup>) と推定される細胞として分裂して互いに離れていき、互いに近接する細胞は極少であり、盲目マウスでも同様であった。細胞周期の S 期を介して G<sub>2</sub> 期に居るか細胞分裂後に 35  $\mu\text{m}$  以上離れたと思われるシングレット未分化性細胞が存在し、健常マウスでも盲目マウスでも同様な割合を示した。健常と盲目の両マウスにおいて、非対称的に分裂した未分化性娘細胞(ペアの片方は増殖性、一方は静止状態未分化性; Ki67<sup>+</sup>Nestin<sup>+</sup> & Ki67<sup>-</sup>Nestin<sup>+</sup>)として極少ない割合で発見できた。これらの結果より、視覚剥奪の下、P22~25 に増殖した BrdU+細胞は、未分化性細胞の増殖能を維持させる一方、静止状態の未分化性細胞には変化せず、分化への進行を抑えたことから、視覚剥奪が細胞分裂を制御する可能性が考えられた。

#### D-8. 白質では視覚剥奪は細胞周期からの離脱に影響させず、OPC の増殖性を亢進させる

視覚剥奪が P22~25 に増加した BrdU+ OPC の増殖性を上昇させるとすると、OPC の分化性にも視覚剥奪の影響を与えると推測された。Ki67 と、神経系前駆細胞を発現する中間径フィラメントタンパク質である Nestin との共染色により、増殖状態、静止状態、または分化状態の区別を試みた(Lendahl et al., 1990) (Figure 11)。Nestin は未分化性 OL 系細胞で発現するため(Gallo and Armstrong, 1995; Guo et al., 2009; Rafalski et al., 2013; Dimou and Gallo, 2015)、Ki67 と Nestin を共発現する細胞 (Ki67<sup>+</sup> Nestin<sup>+</sup>) は増殖能をもつ未分化性細胞、Ki67 を発現しない細胞 (Ki67<sup>-</sup>Nestin<sup>+</sup>) は細胞周期から脱した潜在的静止状態の未成熟細胞、Ki67 と



Nestin の両方を発現しない細胞 (Ki67-Nestin-) は成熟 OL に向けて分化する細胞であると考えられる(Chen et al., 2017)。Nestin は、BrdU+Ki67+細胞の核に近い細胞質に発現し、BrdU+Ki67-細胞では発現しなかった (Figure 11A、B)。健常マウスにおける BrdU +細胞の割合を調べ、約 30%が細胞周期内の増殖状態、約 40%が静止状態、約 30%が分化状態であった (Figure 11C)。特に視覚剥奪は、増殖し続ける Ki67+ Nestin+細胞数を増加させた。推定的静止細胞および分化性細胞では、有意的増加はみられなかった。

増殖し続ける細胞の増加は、増殖細胞の対称性分裂によると考えられるため、細胞分裂の対称性を検証した。BrdU+細胞で、核の中心間の距離が 35  $\mu\text{m}$  以内の場合、ダブルットと娘細胞とみなした(Boda et al., 2015)。細胞密度の分析より、対称的に分裂して細胞周期内にいる (Ki67+ Nestin+) ダブルットと Ki67+ Nestin+ / Ki67-Nestin+細胞へ非対称的分裂したダブルットは、視覚剥奪によって増加した。他のダブルット細胞種は影響を受けなかった。したがって、視覚剥奪は、主に対称的に分裂して増殖能をもつ細胞を増加させ、少ない程度であるが、非対称的にも増加させる一方、細胞周期から脱した非対称性分化細胞には影響しなかった。

#### D-9. 灰白質においては視覚剥奪は OPC の細胞分裂の対称性に影響を与えず、未分化性を維持させて分化を遅延させる

P22~25 に増殖した BrdU+細胞の半分程は P25 時に分化へ進み、視覚剥奪によって未分化性 OPC の増殖能が増加させて成熟を減少させる事まで分かった。これらの結果は、視覚剥奪が OPC を増加させ、未成熟 OL (Pre-OL) の形成を減少したとも推測される。この推測を実際に検証するため、NG2 と Nestin マーカーの免疫蛍光共染色手法により、グリア前駆細胞 (NG2-Nestin+)、OPC (NG2+Nestin+)、pre-OL (NG2+Nestin-)、ミエリン形成 OL (NG2-Nestin-)として其々見分けられる(Tanaka et al., 2009; Reviewed in Schumacher et al., 2012; Kremer et al., 2016)。健常マウスの BrdU+細胞では、殆んどが OPC (33.2  $\pm$  6.2%)と pre-OL (55.2  $\pm$  5.1%)であり、血管周皮細胞(Pericyte)や分化へ進んだ OL は少ない割合を占めた(Figure 5A-5H)。視覚剥奪すると、OPC (59.2  $\pm$  6.9%) と pre-OL (34.2  $\pm$  5.8%)の発達ステージシフトが生じ (Figure 5H; one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test,  $F(1, 8) = 7.89$ ,  $p = 0.023$  for NG2+Nestin+ OPCs,  $F(1, 8) = 7.49$ ,  $p = 0.026$  for NG2+Nestin- pre-OLs for control vs. BE)、他の細胞種の変化は無かった。これらの結果より、視覚剥奪は OPC から Pre-OL への分化を抑制し、OPC の未分化性を維持させる事で OL 系細胞の発達ステージをシフトさせたと示唆される。

成体 OPC は、増殖性 NG2+細胞と NG2-成熟 OL へ良く非対称的に分裂する(Simon et al., 2011; Boda et al., 2015)。OL 系細胞へ分化する際の対称性モードにおいて視覚剥奪の影響を検討するため、BrdU+ダブレット細胞の対称性解析を行った。健常マウスの BrdU+娘細胞の多数は、対称性 Pre-OL (NG2+/+Nestin-/-, 44.8 ± 6.5 %)や OPC (NG2+/+Nestin+/+, 22.6 ± 4.2 %)として存在した(Figure 5I)。視覚剥奪によって、対称性の OPC と Pre-OL の割合値がシフトした(NG2+/+Nestin+/+, 50.1 ± 8.0 %; NG2+/+Nestin-/-, 20.4 ± 5.4 %)。しかし、非対称的に OPC と Pre-OL へ分裂する細胞(NG2+/+Nestin+/-)は、視覚剥奪によって少しだが増加が見られた。つまり、視覚剥奪による OPC の未分化性維持は、対称的に分裂した細胞を OL 系細胞への分化を減少して増殖性 OPC を増加を促進させる要因であったと示唆される。

#### D-10. 白質において、視覚剥奪は成熟 OL に向けた発達を促進せず OPC を増加させる

次に、OL 系細胞の特異的マーカーを用い、視覚剥奪によって OL 系発達を変化されたかどうかを白質で調べた (Figure 12)。P22~25 に増殖した BrdU+細胞は、NG2 と Nestin で共染色を行った。NG2 は主に OPC で発現し、分化中に徐々に分解され、Nestin はグリア前駆細胞 (GPC) と OPC の両方で発現するが、分化へ進んだ OL では発現しない(Figure 12A; Ghomari et al., 2005; Schumacher et al., 2012; reviewed in Kremer et al., 2016)。つまり、NG2-Nestin+, NG2+Nestin+, NG2+Nestin-, および NG2-Nestin-細胞は、それぞれ GPC、OPC、未分化性 OL (Pre-OL)、および成熟 OL と考えることができる。この推定定義に従うと、健常マウスの OPC と pre-OL は、ほぼ等しい細胞数であった (Figure 12C)。視覚剥奪は OPC を約 50%増加させる一方、pre-OL を約 40%減少させる傾向がみられた。

ダブレット分析より、OL 系細胞の発達における細胞の分裂対称性を調べた。盲目マウスでは、NG2+Nestin+対称性細胞が大幅に上昇し、上記の OPC 増加の要因である事が確認出来た。NG2-Nestin+の対称性 GPC ダブレットは、少ない割合だが、視覚剥奪によって増加した (Figure 12D)。他の細胞種は、視覚剥奪によって変化しなかった。これらの結果より、視覚剥奪は増殖した細胞の未分化性を促進したと考えられる。

次に、NG2、PDGFR $\alpha$ 、および CC1 の免疫染色により、P22~25 に増殖した BrdU+細胞が OL 系細胞の発達に視覚剥奪の影響がみられたかも検討した (Figure 12E-G)。PDGFR $\alpha$  は OPC で発現し、CC1 は恐らく pre-OL の後半および成熟 OL で発現する(Figure 12A、たとえば Nagy et al., 2017)。視覚剥奪すると、NG2+PDGFR $\alpha$ + CC1-細胞 (OPC) の増加が現われる

一方、NG2+PDGFR $\alpha$ -CC1-細胞 (pre-OL の前半) と NG2+PDGFR $\alpha$ -CC1+細胞 (pre-OL の後半) と NG2-PDGFR $\alpha$ -CC1+細胞 (成熟 OL) では視覚剥奪による顕著な影響は見つからなかった (Figure 12F)。ダブレット細胞の分析より、視覚剥奪によって対称性 OPC が増加した (Figure 12G)。したがって、P22~25 に増殖した OPC の増殖能が増加した視覚剥奪の影響に、細胞分裂時の対称性との関連性が示唆される。

#### D-11. 視覚剥奪による OPC の未分化性維持及び Shh シグナルの役割

次は視覚剥奪による未分化性 OPC の増殖を制御するメカニズムの一つとして Shh (sonic hedgehog) シグナルに着目した。Shh は脳室下帯や脳梁における OPC 分布の増加を促進させる制御分子の一つとして報告されている (Tong et al., 2015; Daynac et al., 2016)。盲目による未分化性細胞の増加と Shh シグナルとの関連性を検討した。Shh シグナル活性を抑制させるため、Cyclopamine を P22-25 に毎日一回腹腔内注入 (25 mg/kg, i.p.) をした。Cyclopamine は、Shh と Ptch1 (Patched1) 受容体との結合によって活性化される Smo (smoothened) 受容体に結合してシグナル経路を阻害する。P22-25 に増殖した BrdU+ OPC の未分化性を 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、視覚剥奪によって BrdU+Olig2+細胞の未分化性 (Nestin+) が増加して Pre-OL への分化が遅延された (Figure 6A and 6B; two-way ANOVA test,  $F(1, 16) = 16.67$ ,  $p = 0.00087$ ; Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.000029$  for vehicle in control vs. vehicle in BE)。それに対し Cyclopamine の投与下、視覚剥奪による影響が抑えられ (Tukey-Kramer post hoc tests,  $p = 0.00048$  for vehicle in BE vs. cyclopamine in control,  $p = 0.0029$  for vehicle in BE vs. cyclopamine in BE)、つまり視覚剥奪による OPC の未分化性維持に Shh シグナルを媒介する可能性が示唆される。

また、増殖細胞が対称的に未分化性細胞へ分裂する事に対し、つまり P22~25 に増殖した細胞の同種性 (homogeneity)・異種性 (heterogeneity) に対し、Cyclopamine が視覚剥奪による更なる促進を抑制するか否かを検証した。視覚剥奪マウスでは BrdU+Olig2+娘細胞の中、Nestin+/+ 未分化性細胞の対称性分裂が増加し、Cyclopamine によってこの増加は抑制された (Fig 5C; two-way ANOVA test,  $F(1, 16) = 9.28$ ,  $p = 0.0077$  for interaction of drug (vehicle, cyclopamine) and mice (control, BE), Tukey-Kramer post hoc tests:  $p = 0.00024$  for vehicle injection in control vs. BE mice,  $p = 0.0025$  for vehicle in BE vs. cyclopamine in control,  $p = 0.030$  for vehicle vs. cyclopamine in BE mice)。視覚剥奪によって非対称性 OPC 分裂 (Nestin+/-) は変化しなかったが (two-way ANOVA,  $F(1, 16) = 0.199$  for drug and mice interaction)、分化性細胞の対称性分裂 (Nestin-/-)

は減少し、この減少も Cyclopamine 投与によって抑制された (two-way ANOVA test,  $F(1, 16) = 17.25$ ,  $p = 0.00075$  for drug and mice interaction, Tukey-Kramer post hoc tests:  $p = 0.000086$  for vehicle in control vs. BE,  $p = 0.011$  for vehicle in BE vs. cyclopamine in control, and  $p = 0.017$  for vehicle vs. cyclopamine in BE)。しかし、白質における OPC の未分化性維持には、cyclopamine による影響はみられなかった。これらの結果より、Shh シグナルは対称性分裂細胞に対して灰白質下層 OPC の分化性を減少させて未分化性を増加させる視覚剥奪の影響に関与すると示唆される。

#### D-12. P22~25 に増殖した OPC の分化動態

P22~25 に増殖した GM の BrdU+細胞の OL 系細胞における発達変化を検討した。まず、P22~25 に増殖細胞の P30 における発達状態を調べた (Figure 7)。健常マウスにおける BrdU+Ki67+増殖性細胞の殆んどは、P30 に既に不在し (Figure 7A and 7E)、言い換えると P22~25 に細胞周期の S 期を通過した細胞が 5 日後には G<sub>0</sub> 期へ脱して分化状態或いは静止状態にいたことを示す。これまでの健常マウスの BrdU+Olig2+Nestin+細胞は、P25 ( $1.77 \pm 0.36$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$ ,  $N = 5$ )から P30 ( $0.80 \pm 0.23$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$ ,  $N = 5$ )に減少の傾向であった (Figure 7H; one-way ANOVA test,  $F(1.8) = 5.07$ ,  $p = 0.054$ )。それで OPC の未分化性・分化性は P30 以降から変化しなかった。P30 から P50 における BrdU+細胞の消失は血管に沿って解析領域外へ移動もしくは細胞死の可能性が挙げられる (Tsai et al., 2016)。P30 の BrdU+細胞は死細胞マーカーである cleaved caspase-3 を発現しなかったため ( $N = 2$  mice)、BrdU+細胞の消失はアポトーシスではないと思われる。Ki67 発現の結果を合わせると、P25 に増殖能をもつ細胞は P30 になって細胞周期から G<sub>0</sub> 期へ脱し、分化性細胞 (Nestin-Ki67-) より静止状態の未分化性細胞 (Nestin+Ki67-) になったと示唆される。

P22~25 に増殖した WM の BrdU+細胞の運命を調べ、Ki67+細胞の喪失が増殖細胞の分化性変化を伴うかどうかを検討した (Figure 10)。P25 で BrdU の注入を止め、5 日後のマウスを用いた。追跡された P30 の BrdU+細胞は、P25 から約 28%の損失を示した (Figure 10A)。興味深いことに、健常マウスの BrdU+ Ki67+細胞は、P30 でほぼ完全に消失した (Figure 10B)。P25 から P30 における BrdU+ Ki67+細胞は約  $4.8$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  を失い、これは P25 から P30 に見られる Ki67+細胞の喪失の一部に相応する (Figure 9C;  $\sim 5.8$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  健常マウス)。一方、BrdU+ Ki67-細胞は P25 と P30 で同様であった (Figure 10C)。これらの結果より、Ki67+細胞の減少は、Ki67 発現の喪失ではなく、BrdU+細胞の消失に関連すると示唆

される。また、P28 と P30 における Ki67+細胞の数が類似することから (Figure 9C)、増殖後 3 日以内に BrdU+細胞の喪失が起こったと示唆される。

#### D-13. P25~P30 における OPC の静止状態への促進に対する視覚剥奪の影響

次には、P22~25 に増殖した細胞の分化・発達に対する視覚剥奪による影響を調べた。今までの結果と同様に P25 の BrdU+Ki67+増殖性細胞は、視覚剥奪によって 2 倍程増加した (Figure 7E)。5 日後の P30 においては、P25 の細胞数より約  $82.8 \pm 8.0\%$ 程が減少した。健常マウスでも増殖性細胞が同様に減少した ( $91.3 \pm 8.7\%$ )。盲目に関わらず、BrdU+細胞数ほどの時期でも同様であったため (see above for P25; control:  $4.47 \pm 0.80$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$ , BE:  $4.55 \pm 0.73$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  for P30)、Ki67 発現が同様な割合で失われた事は、分裂後、細胞周期の G<sub>1</sub> 期に戻る静止状態の未分化性細胞に視覚剥奪細胞は影響を及ぼさなかった可能性が挙げられる。

OPC の未分化性・分化性変移における視覚剥奪の影響が P25 から P30 の間にも未分化性維持に持続するか更に検討した。Shh シグナル阻害剤の Cyclopamine を P22~29 に投与し、P30 の BrdU+Olig2+細胞の Nestin 発現有無により、P30 まで Shh シグナル経路を介して OPC び未分化性が維持されるか調べた。P30 の BrdU+Olig2+Nestin+未分化性細胞において Cyclopamine 投与や視覚剥奪による相互的影響は、two-way ANOVA 検定より統計学的有意差が示された (Figure 7H;  $F(1, 16) = 4.59, p = 0.048$ )。盲目マウスでは未分化性細胞数が増加し、それが Cyclopamine 投与によって抑制された (Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.014$  for vehicle injection in control vs. BE,  $p = 0.043$  for vehicle vs. cyclopamine in BE,  $p = 0.017$  for vehicle in BE vs. cyclopamine in control,  $p = 1.00$  for vehicle vs. cyclopamine in control)。P25 の BrdU+Olig2+Nestin+未分化性細胞は、健常マウスで  $1.77 \pm 0.36$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  で、盲目マウスで  $4.48 \pm 0.43$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  であった (one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 22.96, p = 0.0014$ )。P30 の未分化性細胞は、健常マウスで  $0.80 \pm 0.23$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  で、盲目マウスで  $1.94 \pm 0.25$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$  であった (Figure 7H)。P25 から P30 において、健常マウスでは  $46.3 \pm 24.3\%$ 減少し、盲目マウスでは  $55.5 \pm 6.7\%$ が減少した (one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 0.133, p = 0.72$ )。つまり、視覚剥奪によって P25 と P30 に未分化性維持が促進されたにも関わらず、Nestin+細胞の減少率は健常マウスでも盲目マウスでも同様であった。two-way ANOVA 検定から、BrdU+Olig2+Nestin+未分化性細胞に対する時期と視覚剥奪による総合的有意差は無かった ( $F(1, 32) = 1.24, p = 0.27$ )。即ち、未分化性細胞の静止状態への変移に視覚剥奪によって増加されたと示唆される。

#### D-14. Shh シグナル経路を介して対称性細胞分裂の促進に対する視覚剥奪の影響

そして、分裂した細胞が対称的に分化へ進む事に Shh シグナルが関与する可能性を検証した。P30 の vehicle 投与した健常マウスの BrdU<sup>+/+</sup>Olig2<sup>+/+</sup>娘細胞の多数は Nestin を発現しなかった事(Nestin<sup>-/-</sup>;  $88.9 \pm 5.5\%$ ; Figure 7J)より、殆んどが分化へ進んだと示唆される。Nestin<sup>+/+</sup>娘細胞は極少なかった( $0.22 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ )。盲目マウスにおいて BrdU<sup>+/+</sup>Olig2<sup>+/+</sup>娘細胞の中、Nestin<sup>+/+</sup>細胞は  $0.67 \pm 0.19 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  として約 3 割を示し( $34.0 \pm 8.5\%$ )、Nestin<sup>-/-</sup>細胞は  $0.64 \pm 0.08 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  として約 3 割を示した( $36.3 \pm 5.8\%$ )。BrdU<sup>+/+</sup>Olig2<sup>+/+</sup>娘細胞の数は健常マウス( $1.91 \pm 0.67 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ ) と盲目マウス( $1.89 \pm 0.29 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ )で同様であったため、Nestin を発現する細胞の割合の差は OPC 娘細胞の対称性分裂に視覚剥奪による促進の影響が示唆される。

Shh シグナル経路を介して OPC 未分化性の対称的分裂へ促進させるか否かを検討した。Nestin 発現細胞において視覚剥奪と阻害剤投与の 2 つ要因による総合的有意差を求める為、two-way ANOVA 解析を行い、BrdU<sup>+/+</sup>Olig2<sup>+/+</sup>娘細胞の中にある Nestin<sup>-/-</sup>娘細胞の割合に有意的な影響が観られた( $F(1, 16) = 10.7, p = 0.0047$ )。Nestin<sup>-/-</sup>娘細胞は 健常マウスより盲目マウスで顕著に少なく、Cyclopamine 投与によって Nestin 発現の減少が抑えられた(Tukey-Kramer post-hoc tests,  $p = 0.00017$  for vehicle-injected control vs. BE mice;  $p = 0.042$  for vehicle- vs. cyclopamine-投与 BE mice;  $p = 0.70$  for cyclopamine-injected control vs. BE mice)。また Nestin 発現性 OPC の非対称性分裂 (Nestin<sup>+/-</sup>) における影響は小さかった(two-way ANOVA,  $F(1, 16) = 1.47, p = 0.24$ )。これらの結果は、視覚剥奪によって P30 の OPC を対称性分裂として未分化性を増加させ、それに Shh シグナルが一部関与する事が示唆される。

#### D-15. V1 の灰白質・白質および背側外側膝状体 (dLG) の神経膠症に対する視覚剥奪の影響

OL 系細胞の発達における視覚剥奪の影響は、V1 内の構造的・機能的変化に起因する可能性がある。先行研究より、出生時からの視覚剥奪は視神経から dLG において神経変性が生じ(Reese, 1986)、dLG のサイズを縮小さると示された(Heumann and Rabinowicz, 1980; Asanuma and Stanfield, 1990; Massé et al., 2014)。つまり視床皮質軸索の構造や機能に影響を与え、V1 の OPC 増減に変化をもたらすと考えられる。この可能性を理解するため、OPC 未分化性維持が視神経切断による神経傷害で誘導されたものであるかどうかを調べた。V1 の GM や皮質下 WM および dLG において、神経細胞の軸索変性や細胞死などの損傷によって誘発する神経膠症 (グリオシス) を検証するため、アストログリオシスのマーカーである GFAP と、

ミクログリア食作用のマーカーである CD68 を用いて調査した (Figure 13)。健常マウスと盲目マウスにおいて、GM や WM では GFAP と CD68 の発現に明らかな違いは検出されなかった (Figure 13A、B)。しかし dLG において、GFAP 発現は健常マウスよりも盲目マウスでより増強され、CD68+細胞は健常マウスで検出されず、盲目マウスで GFAP 発現の領域に沿って一部検出された (Figure 13C、D; 1 マウス当たり 2 枚の切片を使用、N = 3)。これらの結果より、視覚剥奪による未分化性 OPC の増加は、V1 の GM や皮質下 WM の損傷によるものではないものの、dLG の変化とそれに従う視床皮質シグナルの変化を伴う可能性が示唆された。

#### D-16. 灰白質における P22~25 に増殖した OPC の P30 以降の経時的変化

P22~25 に増殖した未分化性細胞の多数が静止状態へ移行する事が明らかとなり、それから健常マウスの増殖細胞が日齢が進むに連れて静止状態のまま残るか、成熟 OL へ分化するか疑問が生まれた。増殖細胞の発達の変化を調べるため、CNPase 抗体と共染色を行い、成熟 OL をラベルした (Figure 8)。CNPase を発現する BrdU+細胞において、P25 の健常マウスでは存在しなかった (平均  $53 \pm 5$  BrdU+Olig2+細胞, N = 3)。しかし、P30 の CNP+細胞は少数が検知され (Figure 8C and 8G)、BrdU+Olig2+細胞の中の  $3.2 \pm 1.2\%$  として存在した (Figure 8H, N = 4)。細胞周期から脱して G<sub>0</sub> 期に居る (BrdU+Ki67-) OPC の細胞数は、BrdU+CNPase+成熟 OL の細胞数 (Figure 8G,  $0.15 \pm 0.06$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$ ) よりも明らかに多かった (Figure 7F,  $2.67 \pm 0.37$  cells/ $10^6 \mu\text{m}^3$ )。また P30 の BrdU+Olig2+細胞の殆んどは Nestin を発現しない分化性細胞であったため (Figure 8I)、BrdU+細胞の多くは分化へ進んだ推定的 Pre-OL (未成熟 OL) として CNPase を発現しない状態と存在し、僅かだけが成熟 OL へ分化した。興味深く、P30 の CNPase+成熟 OL は非対称性分裂細胞として検知された (Figure 8H)。分化した細胞の非対称性・異種性 (heterogeneity) は少なくとも P50 まで続き、BrdU+Olig2+娘細胞の中で 4 倍近く増加した。同時に、対称性・同種性 (homogeneity) の分化細胞は成熟へも進み、これは P22~25 に増殖した細胞は日齢に連れて成熟が進んだと示唆される。

#### D-17. 白質における P22~25 に増殖した BrdU+OPC の運命に対す視覚剥奪の影響

次に白質において視覚剥奪が P22~25 に増殖した BrdU+OPC の P25 以降の運命に影響を与えるかどうかを調べた。最後の BrdU 注入から 5 日後と 25 日後に BrdU +細胞を検討すると、P25 から P30 までの増殖細胞は、健常マウス (~24%) と盲目マウス (~28%) で同様

に減少し、P30 から P50 までは健常マウス（～48%）よりも盲目マウス（～62%）で更なる減少をした（Figure 10A）。BrdU +細胞は、P25 と同様に P30 の健常マウスよりも盲目マウスにおいて僅かに高かった（ただし、有意差はない、unpaired Student's t-test、 $p=0.45$ ）が、P50 の健常マウスと盲目マウスでは同様な数を示した（unpaired Student's t-test、 $p=0.14$ ）。したがって、健常マウスと BE マウスにおける増殖細胞の平均値の差は、P30 まで維持された。増殖細胞の減少は、細胞周期内に残って増殖し続けるためか、細胞周期から脱するためか検証するため、BrdU+ Ki67+細胞と BrdU+ Ki67-細胞の運命を調べた。

盲目マウスで増加した BrdU+ Ki67+細胞は、P30 またはその前において健常マウスと同様に、ほぼ完全に消失した（Figure 10B）。P50 の BrdU+ Ki67+細胞は、健常マウスと盲目マウスの両方とも、殆んどがゼロに減少した（5 匹中 1 匹の健常マウスと 5 匹中 4 匹の盲目マウスで、BrdU+ Ki67+細胞は見つからなかった）。それに対し、BrdU+ Ki67-細胞は、健常マウスと盲目マウスの両方とも P25 と P30 の間で同様のままであった（Figure 10C）。これらの結果より、P25 から P30 に減少した BrdU+細胞は、細胞周期から G<sub>0</sub> 期へ脱せず、細胞周期内に残って増殖能を保つことが示唆された。一方、P30 から P50 に渡り、BrdU+ Ki67-細胞は約 47%減少したが、P30 の BrdU+ Ki67+細胞は P50 に比べて有意的な差が無かった。したがって、P30 から P50 における BrdU+細胞の低下（Figure 10A）は、BrdU+ Ki67-分化性細胞の消失が原因であると考えられる。これらの結果より、P22～25 に増殖した BrdU+細胞は少なくとも次の 2 つの異なるステップを介して発達の消失すると考えられる：BrdU+ Ki67+細胞の喪失と、それに続く BrdU+ Ki67-細胞の喪失。既に BrdU+ Ki67-細胞は同様な数で消失したが、BrdU+ Ki67+細胞自体は直接に消失したのか、それとも最初に BrdU+ Ki67-細胞へ移行したのかは明確ではない。

これらの結果を合わせると、V1 の皮質下 WM において、P22～25 に増殖した健常マウスの BrdU+ OPC は 25 日間にわたって徐々に減少した。この減少は主に、最初の 5 日間の増殖性細胞の喪失と、それに続く P30 以降の G<sub>0</sub> 期へ脱した細胞の喪失によるものだった。視覚剥奪は、P25 で P22～25 に増殖した BrdU+ OPC の増殖状態を一時的に亢進させたが、P50 までの運命に殆んど影響を与えなかった。

#### D-18. V1 下層において視覚剥奪による OPC の成熟 OL への促進

増殖細胞の運命に視覚剥奪が影響を与えたか検討した。P30 の BrdU+Olig2+CNPase+成熟



OLは少ない数で下層に分布し、盲目マウスでも同様であった(Figure 8G)。P25のBrdU+細胞はCNPaseを殆んど発現せず、NG2を発現するOPCもしくはPre-OLとして存在した(Figure 8A-B)。BrdU+Olig2+細胞中のCNPase+細胞に対し、割合はP30からP50において約2倍程の増加が現われ、P50の細胞数は盲目マウスで健常マウスより4倍以上増加した(two-way ANOVA test,  $F(2, 18) = 3.54$ ,  $p = 0.050$ , Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.0026$  for P30 vs P50 BE mice,  $p = 0.79$  for P30 vs P50 control mice)。その結果、P50のBrdU+成熟OL細胞数は盲目マウスで、健常マウスより2.5倍程多かった(Tukey-Kramer test,  $p = 0.016$  for control vs BE mice at P50)。この増加は、細胞間の距離が35  $\mu\text{m}$ 以内となる分裂細胞の対称性・非対称性の増加が含まれた(Figure 8C-8F and 8H)。

上記より、P15からの視覚剥奪マウスのV1下層では、P22~25の増殖性OPCを増加し、P30に細胞未分化性を維持させ、やがてP50にOPCから成熟OLへ対称的に分化を促進させることが明らかとなった。それでP22~25にラベルされたBrdU+細胞に関わらず、眼優位性臨界期の最中(P30)と終了時(P50)において、P15からの視覚剥奪によるCNPase+細胞自体の変化を検討した(Figure 8I-N)。V1の各BinにおけるCNPase+細胞は、上層より下層の方に多く分布し、P30からP50に渡ってBin全体的な増加が現れた(Figure 8I-L)。視覚剥奪によるCNPase+細胞は、P30では健常マウスと同様な分布が見られ、P50ではBin 8において有意的に増加をした(Figure 8K, 8L; one-way ANOVA test,  $F(1, 8) = 6.88$ ,  $p = 0.031$ )。P50の盲目マウスにおける成熟OLの増加は、対称性の増加に伴った(Figure 8M; two-way ANOVA test,  $F(1, 14) = 8.02$ ,  $p = 0.013$ , Tukey-Kramer post hoc test,  $p = 0.0092$  for control vs BE mice at P50)。CNPaseは成熟OLの細胞体の他に、ミエリンにも発現するため、CNPase+蛍光強度解析を行った。盲目マウスでV1の下層においてCNPase発現の有意的増加が見られた(Figure 8N; K-S test,  $p = 0.00003$ )。従って、これらの結果は、視覚剥奪下、P22~25の時期特異的に増殖したBrdU+細胞の未分化性OPCを増加させ、やがて成熟OLへ分化を亢進させる事がV1下層に領域特異的に起きたことと示す。

#### D-19. 白質におけるP22~25に増殖したOPCの成熟

P22~25に増殖したBrdU+細胞の白質における成熟への発達を、成熟OLマーカーのCNPaseを検出して調べた。P30とP50ではBrdU+Olig2+CNPase+細胞において、BrdU+細胞は白質の太い繊維状の染色内に殆んどがCNPase+細胞として存在し、全てがOlig2+であった(Figure 14; P30で $100 \pm 0\%$ 、P50で $96 \pm 4\%$ )。BrdU+Olig2+CNPase+細胞の定量分析を行

ったところ、P25 の健常マウスでは非常に少なく ( $0.54 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ ) (Figure 14A)、NG2–Nestin–細胞の数に一致した ( $0.6 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$ ; Figure 12B)。BrdU+ Olig2+細胞中の CNPase+成熟 OL の割合は  $0.3 \pm 0.3\%$  であり、BrdU +細胞の極僅かが成熟 OL となった。P30 において、BrdU+ Olig2+細胞のほぼ 1/4 ( $25.6 \pm 8.8\%$ 、N = 4) が CNPase を発現したため、より多くの BrdU+細胞は成熟 OL になった (Figure 14B)。細胞周期から G<sub>0</sub>期へ脱した BrdU+細胞 (すなわち、BrdU+Ki67–) の割合は P30 で約 95%であったため、これらの結果は、多数の BrdU+細胞が細胞周期から脱して CNPase–の pre-OL または静止細胞に移行した OPC であると考えられる。視覚剥奪により、BrdU+ Olig2+ CNPase+ 成熟 OL の細胞数 (Figure 14D) も、BrdU+ Olig2+細胞中の CNPase+の割合 (盲目マウスで  $27.1 \pm 8.5\%$ 、N = 4) も顕著に変化しなかった。

P50 における BrdU+ Olig2+ CNPase+ 成熟 OL の細胞密度は、P30 の約 1/4 に減少した (Figure 14D)。成熟 OL は約  $2.3 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  低下し、約  $6.2 \text{ cells}/10^6 \mu\text{m}^3$  の BrdU+ Ki67–細胞の減少よりも少なかった (Figure 14C)。BrdU+細胞の消失は成熟 OL の消失によると考えられ、細胞周期から離脱した他の細胞もこの期間中に失われた。さらに、P30 で形成された殆どどの成熟 OL は P50 まで持続しなかったため、成熟に寄与する細胞は細胞死を起こす可能性が考えられた。視覚剥奪は BrdU+ Olig2+ CNPase+細胞数に殆ど影響を与えなかった (Figure 14D)。CNPase+ 成熟 OL は、P50 の健常マウスで BrdU+ Olig2+細胞の  $33.6 \pm 8.9\%$  (N = 5) を構成した。成熟 OL におけるこの割合は、P30 から P50 まで変化しなかった (unpaired Student's t-test、 $p = 0.54$ )。BrdU+ Ki67+細胞はほぼ存在せず、本質的に全ての BrdU+細胞は既に P30 までに細胞周期から脱したため (Figure 10B)、成熟 OL の割合が変化しない事は、CNPase– pre-OL または静止状態 OPC も同様な割合で消失したことが示唆される。視覚剥奪は、BrdU+ Olig2+細胞中の CNPase+細胞の割合に有意な影響を及ぼさなかった (盲目マウスで  $51.1 \pm 11.3\%$ 、unpaired Student's t-test、 $p = 0.26$ )。したがって視覚剥奪により、P30 から P50 にわたり、P22~25 に増殖した OL 系細胞は成熟に向けて発達する事に殆ど影響しなかったと考えられる。

## E. 考察、および今後の課題

### E-1. GM 結果の考察

本研究では、マウス V1 における OPC の増加性がピークとなる発達期が解明された。BrdU を用いて 3 日間の BrdU 投与により新生した細胞の研究より、開眼時からの視覚剥奪によって P22~25 に増殖した OPC の増殖能がピークとなる時期特異的に感受性が高く、それが V1 の第 6 層の下部で領域特異的に感受性が有る事が分かった。視覚剥奪すると、P25 に OPC の増殖性が促進される一方、分化性が減少した。本研究では、視覚剥奪による OPC 増殖性の亢進に Shh シグナル経路を介す可能性が示された。P22~25 に増殖した BrdU+細胞の増殖性 OPC は、5 日後の P30 の時に、殆んどが細胞周期から G<sub>0</sub> 期へ脱して静止状態となり、対称的に細胞分裂をしていた。増殖した OPC の静止状態への移行増減には視覚剥奪の影響は無かった。P50 の盲目マウスでは、P22~25 に増殖した BrdU+細胞が CNPase+成熟 OL へ分化が亢進され、それに対称性（同種性）・非対称性（異種性）としての成熟増加も加わった。実際に、CNPase+成熟 OL 細胞数は、BrdU+細胞に関わらず、視覚剥奪によって増加された。これらの結果は、視覚剥奪により、V1 発達の眼優位性の臨界期に OPC の未分化性を維持させて、やがて成熟制帽へ分化を促進させる事が示唆される。ここでは OPC の増殖性がピークとなる発達期、増殖性 OPC における視覚剥奪の影響、P22~25 に増殖した OPC の発達の変遷、そして P50 における成熟に関して述べる。また本研究の限界点に関して論ずる。

### V1 皮質内におけるオリゴデンドロサイト系細胞の発達的变化、および視覚剥奪の影響

V1 における増殖性 OPC は P25 に促進され、この P25 の時は眼優位性のピークとなる時期に相応する(reviewed in Espinosa and Stryker, 2012)。P19 から P28 の眼優位性臨界期の間、連続した 3 日間の BrdU 投与によりラベルされた BrdU+細胞中の Ki67+細胞に対して、P22~25 に新たに生まれた OPC の増殖能が増加したが、BrdU+Ki67-細胞は変化しなかった。類似な増殖率により、眼優位性の臨界期の間、皮質において分化細胞を供給する一方、増殖性 OPC が一時的に蓄積されると示唆される。眼優位性と増殖性 OPC の蓄積の関連性は明確ではないが、P25 の増殖性 OPC の増加は、V1 発達の重要な時期の間に生じる可塑性の結果である事を反映すると思われる。発達期における遺伝子発現の解析より、P28 の時に OL とミエリン関連遺伝子が大きく増加し(Maffei et al., 2010)、P26 の時にニューロンやアストロサイト関連遺伝子より OL 関連遺伝子が顕著に多い割合を示した(Lyckman et al., 2008)。したがっ

て、眼優位性の臨界期がピークとなるこの時期は、OPC の未分化性・分化性の変化や OL 成熟に対し、発達的に感受性高くなる時期である事が考えられる。

今までの先行研究からは、V1 における OPC の感覚経験による影響に関しては報告が少なかった。マウスの一次体性感覚皮質におけるバレル野を形成する前である P0~P4(Rebsam et al., 2002)にヒゲを切断すると、OPC が増殖してバレル野の中隔 (Septa) から中空 (Hollow) へ分布が広がった(Mangin et al., 2012)。皮質内ミエリン形成の開始時である P6 にヒゲを切断して 4~6 日後のバレル野では、OPC が増殖して分化を減少させると同時にアポトーシスも生じた(Hill et al., 2014)。つまり、感覚喪失は OPC を未分化性状態へシフトさせた。本研究では、視覚喪失によって P25 の OPC が分化性から未分化性へシフトされた。しかし、視覚剥奪による増殖性 OPC の増加は、皮質第 6 層の下部において増殖率を変えず、アポトーシスも起こらなかった事より、ヒゲ切断による先行研究とは相異が観られた。一次視覚野において、NG2 を発現する OPC の数は、生後 4 週目の間、皮質第 2/3 層や第 5 層に比べて第 4 層で少なかった(Mangin et al., 2012)。即ち、OPC の増殖や分化は視床から皮質内への入力に依存すると示唆された。Mangin らの研究チーム (2012) は、誕生から闇環境下(Dark rearing)にすると、V1 の皮質第 2/3 層や第 5 層と同時に第 4 層における OPC の分布に違いは無かった。それと同様に本研究では、V1 の第 2~4 における OPC 分布に視覚剥奪による有意差が無かった。V1 の第 6 層において闇環境下による影響は明確ではないが、V1 の下層における本研究の発見は、感覚経験に依存する OPC の発達への影響に新たな現象が示された。

### V1 の OPC 未分化性維持と Shh シグナルの役割

OPC 分化状態は視覚剥奪によって皮質下層で感受性がある事が考慮される。皮質内各層別で特異的に分布する細胞から局所的に分泌される一つの可能性が考えられる。アストロサイトは、増殖と分化によって制御される OPC とは異なる(reviewed in Gallo and Deneen, 2014; Bergles and Richardson, 2015; Dimou and Gallo, 2015; Baydyuk et al., 2020)。GFAP の発達の発現は、P12 では皮質内の全層で分布し、P24 では第 1~2 層と第 6 層に限って分布する(Corvetti et al., 2003)。アストロサイト発現増加の時期と OPC の増殖性ピークとなる時期は、P25 頃の第 6 層の下部で制御する共通因子の可能性が挙げられる。因子の一つとして Shh が考えられる。最近の研究報告より、皮質内の Shh 転写レベルと Shh タンパク質の N 末端断片が発達につれて徐々に増加し、P21 に一定の数値に達し、少なくとも P30 まで発現が続いた(Rivell

et al., 2019)。Shh は NeuN 発現性皮質ニューロン(Garcia et al., 2010)と一次体性感覚の第 5 層下部のニューロン(Harwell et al., 2012)で発現される。生後第 4 週目の間、主に成熟アストロサイトが Shh を分泌し、皮質下層におけるシナプス形成に関わる(Hill et al., 2019)。アストロサイトは、主に PDGF (Platelet-derived growth factor、血小板由来増殖因子) や FGF (fibroblast growth factor、線維芽細胞増殖因子) などの成長因子によって OPC の増殖能を制御し(Bögler et al., 1990; McKinnon et al., 1990)、主に LIF (Leukemia inhibitory factor、白血病阻止因子) を介して OPC の分化時期を制御する事が考えられる(Ishibashi et al., 2006, 2009)。主にアストロサイトによる様々な局所的分泌の因子は、本研究の発見の様に、Shh 依存的に OPC 分化状態を制御する可能性が考えられる。

さらに視覚剥奪によって皮質第 6 層の下部における増殖性 OPC の増加する事は、神経回路の再編成に関わる可能性が考えられる。開眼時からの視覚剥奪による OPC 変化は、V1 の神経回路にどの様に影響を及ぼすか明確ではない。視神経を切断する事は、外側膝状体背側核 (dorsal lateral geniculate nucleus, dLGN) と上丘 (superior colliculus, SC) まで繋がる視覚系求心路が切断され、視覚系経路に神経変性が誘導される(Reese, 1986)。誕生から視覚剥奪をすると、dLGN のサイズ(Heumann and Rabinowicz, 1980; Asanuma and Stanfield, 1990)と楔状束核 (cuneate nucleus) の神経刺激伝達が減少する(Asanuma and Stanfield, 1990)。dLGN は更に、眼球剥奪したラット(Doron and Wollberg, 1994; Bronchti et al., 2002)やハムスター(Izraeli et al., 2002)の下丘 (inferior colliculus, IC) からも軸索入力を受ける。IC ニューロンから dLGN における神経刺激伝達に関して視覚剥奪マウスでの変化は未だ報告されていないものの(Chabot et al., 2008)、無眼球症モデルのマウスでは発見されている(Piché et al., 2004; Laemle et al., 2006; Chabot et al., 2007, 2008)。また、IC ニューロンは直接に V1 の下層へ軸索を投射する(Laemle et al., 2006)。このような感覚系統合の再編成が視神経切断による視覚剥奪マウスで生じるなら、無眼球症マウス(Laemle et al., 2006)や眼球剥奪のフクロネズミ(Kahn and Krubitzer, 2002)の様に視覚的刺激の無い場合でも主に dLGN を介して V1 でニューロンの機能的活性化が起こると考えられる。視覚剥奪や先天的盲目は、視床から V1 への投射に影響を及ぼさないのである(Charbonneau et al., 2012)。dLGN ニューロンは V1 へ軸索を投射し、主に第 4 層で入力を受け、第 6 層では入力が少ない(Cruz-Martín et al., 2014; Ji et al., 2016)。非視覚系の活性は V1 内の神経経路に影響を与え、本研究より、視床皮質系軸索からの入力は Shh 分泌によって OPC 分布に局所的に活性させる事が考えられる。ニューロンに加え、Shh を生産する源

の可能性として、OPC 自体とアストロサイトの可能性も挙げられる。神経変性モデルでは、Shh 転写が OL 系細胞で強く発現され、Shh の過剰発現は OPC や成熟 OL の数を増加させた (Ferent et al., 2013)。しかし、アストロサイトは脳損傷によって Shh を分泌する事が報告された (Yang et al., 2012; Pitter et al., 2014; Wang et al., 2014)。したがって、皮質下層における増殖性 OPC の増加は、ニューロンかグリア細胞から分泌された Shh と神経回路の再編成による活性亢進である可能性が考えられた。

P22~25 に増殖した OPC は、5 日以降に殆んどが静止状態から分化状態へ進む事が分かった。P25 に増殖した細胞は、約 80% が Ki67<sup>-</sup>となり、多数が既に細胞周期から脱して G<sub>0</sub> 期にいたと示唆される。Nestin と Ki67 の共染色より、BrdU<sup>+</sup>細胞の約 3 割は静止状態の OPC と推定され、約半分は分化へ進んだと示唆された。NG2 と Nestin の共染色より、NG2<sup>+</sup>細胞の約半分は Nestin<sup>-</sup>分化性細胞である事が確かめられた。しかし、P25 の BrdU<sup>+</sup>細胞では CNPase<sup>+</sup>成熟 OL は存在しなかったため、BrdU<sup>+</sup>Nestin<sup>-</sup>細胞は未成熟 OL である Pre-OL であると考えられた。P25 から P30 に渡り、Pre-O の細胞数は変化せず、P25 に新生した増殖性 OPC は P25 に細胞周期から脱した (~20% for control, ~40% for BE mice)。つまり P25~30 に Pre-OL が増加しなかった事と CNPase<sup>+</sup>成熟 OL が P30 で極小数であったという結果から、未分化性 OPC を静止状態とさせたと解釈した。視覚剥奪によって増強された Nestin<sup>+</sup>未分化性細胞が持続的 Cyclophamide 投与下で未分化性維持が抑制されたため、OPC の静止状態への転移は Shh シグナル経路を媒介する結果が現われた。この結果は、大脳皮質の OPC 未分化性維持における Shh シグナルの役割を示す最初の証拠であると思われる。静止状態の OPC 形成に関与する分子メカニズムを確立する事は、今後の研究課題である。

### 視覚剥奪による OPC 成熟の促進

次に、視覚剥奪による増殖性 OPC の分化や成熟の促進に対して、本研究における潜在的な重要性を論ずる。P22~25 に増殖した BrdU<sup>+</sup> Pre-OL 細胞の少数は P30 で CNPase<sup>+</sup>を発現し、BrdU<sup>+</sup>娘細胞の僅か 5% だけが CNPase<sup>+</sup>として非対称的に異種性分化をした。やがて P25 以降、非対称的に異種性分化をした CNPase<sup>+</sup>細胞の割合は ~20% まで増加し、対称的に同種性分化をした CNPase<sup>+/+</sup>細胞は ~12.5% まで達した。この成熟の発達プロセスは一次体性感覚皮質における先行研究と同様である (Hill et al., 2014)。闇環境下では、眼優位性の臨界期の終了 (P32) 以降、ミエリンを発現する MBP が V1 において変化しないと報告されている

(McGee et al., 2005)。これは本研究の P30 における結果に関連性が見られるが、視覚剥奪による CNPase+成熟 OL の細胞数や蛍光強度に大きな影響は無かった。興味深い事に、25 日以降の P50 まで残った BrdU+娘細胞に対し、視覚剥奪はその中の 90%近く同種性の CNPase+/+細胞を顕著に増加させた。皮質下層において視覚剥奪は、BrdU+CNPase+細胞数を約 2 倍増加させると共に、60%以上の CNPase 発現を亢進させた。神経活動の減少によって皮質内の細胞やミエリンが増加する事は、先行研究と相違した予想外の結果であった(Simon et al., 2011; Gibson et al., 2014; McKenzie et al., 2014)。盲目マウスの分化や成熟促進における本研究の驚きな結果は、他感覚系の入力からの神経回路再編成に関与する事が考えられる。

未分化性 OPC が静止状態から成熟へ実際に移行したかは、より詳細に検討する必要がある。これに関する証拠の一つとして、神経変性に反応して OPC を増殖させて一時的に分化を遅延させ、やがて増殖した分、成熟を促進させた結果がある(Levine and Reynolds, 1999; Watanabe et al., 2002; Bu et al., 2004; Fancy et al., 2004)。また分化を亢進させるメカニズムとして、Nkx2.2 や Olig2(Fancy et al., 2004)、Sox2(Zhao et al., 2015; Zhang et al., 2018)、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を介す Tcf7L2 の活性などが考えられる(Fancy et al., 2009; Hammond et al., 2015)。メカニズムに関わらず、視覚剥奪はミエリン形成発達のピーク (生後 3 週目頃 ; (Aguirre et al., 2007)) 後から成熟を促進させた。開眼時からの眼球剥奪は、P22 から P25 の間、OPC 恒常性の細胞内メカニズムに関わると思われる。視覚剥奪によって、第 6 層もおける興奮性神経細胞の活動や神経回路の再編成に適応するため、更新された増殖性 OPC はやがて成熟 OL を増加させたという可能性が挙げられる。

## 本研究の限界点、および今後の課題

最後に、本研究の限界点について論ずる。まず、視覚剥奪による OPC 分化状態の制御に基づく潜在的メカニズムは、より詳細に検討する必要性が求められる。本研究では、Shh シグナル経路の阻害剤として Cyclopamine のみで *in vivo* 実験を行った。Shh シグナル経路に関わる他の因子を抑制する阻害剤やトランスジェニックマウスを用いる追加実験を行い、OPC で特異的に Shh シグナルが直接に関与する事と、その特定受容体の活性化によってその下流の細胞内シグナルメカニズムも確かめる必要がある。2 点目として、視覚剥奪による未分化性維持による重要性を付加的に検証する必要がある。本研究では、Ki67 と Nestin を用いて未分化性、静止状態、分化性細胞と見分けた。NG2 と Nestin を用いて OPC が分化へ進んだ

Pre-OL と見分けた。これは、Ki67 や Nestin 発現と OPC 未分化性状態の正確的な関連性を確かめると同時に、OL 系細胞の特異的マーカーを用いて発達状況も再び検証する必要がある。限界点の 3 つ目として、OL へ成熟やミエリン形成を増強させた視覚剥奪の影響を検証する必要がある。本研究では CNPase のみで成熟 OL をラベルしているため、他の OL 系細胞のマーカーを用いて成熟 OL の増加を再び検証する事で研究結果の信憑性はより高まるだろう。今後、ミエリン形成のターゲット軸索や増加と、成熟 OL 数の増加が実際にどの様に関与するか検証する事で、より重要性が示される。P22-25 に新生して OL と分化した細胞は、どの神経細胞種（例えば、皮質下行性や皮質求心性ニューロン或いは、抑制性ニューロン）をターゲットとするためだったかを解明できると興味深くなる。最後に、視覚剥奪による神経活動の推定的変化と OPC 発達の関連性は、明確にする必要がある。皮質第 6 層の下部 OPC における視覚剥奪の感受性は特有な結果である。皮質下層における神経細胞特性の潜在的变化とそれに伴うミエリン形成の関連性は検証することは将来の課題である。

## E-2. WM 結果の考察

V1 の皮質下 WM は視覚機能を維持し、皮質求心性および皮質遠心性投射ニューロンの軸索を通過する部位である。白質はニューロンの計算と認知的機能に寄与すると考えると (Bullock et al., 2005; Petersen and Sporns, 2015)、視覚系経路における発達と経験依存性の構造的可塑性を理解することが重要となる。本研究では、P22~25 の時期に、V1 の皮質下 WM において生後 4 週目の OPC 恒常性をもつ発達期であることを報告した。新たに新生した OPC は、主に細胞周期から脱して G<sub>0</sub> 期へ移行する一方、OPC の増殖性は数日内に消失してしまう。視覚剥奪は、眼優位性臨界期やそれ以降に、成熟細胞への分化及び発達に大きな影響を与えず、増殖性 OPC を一時的に増加させた。下記では、これに関して考察し、また本研究の限界点に関して論ずる。

### 健常マウスの WM におけるオリゴデンドロサイト系細胞の発達的变化

本研究では、生後 4 週目の V1 の WM における OPC が細胞周期からの離脱に対して比較的効率的かを確認した。BrdU 投与により、検討した 3 つのいずれの期間においても、4 日目の BrdU 注入の最終日に既に BrdU+細胞の 75% 近くが細胞周期から脱し（すなわち、Ki67-）、残りは（~25 %）増殖性を維持した (Figure 9)。増殖性細胞のこの割合は、成体脳の脳梁における細胞周期内に局在する Olig2+細胞の割合の約 2 倍である (Dimou et al.,



2008; Rivers et al., 2008)。P25 の細胞周期から脱して G<sub>0</sub> 期に居る細胞は、分化状態と静止状態の細胞に見分けられる。全 P22~25 BrdU+細胞の約 70%が細胞周期から離脱し、それらの約 30%が P25 で分化したため、BrdU+Ki67-細胞の約 40%が 4 日間で分化したことになる。成体の脳梁で 7 か月間 (P45~P255) をかけて生成された OL の割合は、全 OL 中の 20%以上であるため(Rivers et al., 2008)、成体の視神経で分化した OPC の割合は遥に少ないことになる(~6.5% P120~P185 までの 2 か月間、~6.5%; Young et al., 2013)。したがって、他の領域の成体 WM と比較して、生後 4 週目の V1 の WM においては、成熟 OL への分化はより効率的と考えられ、これは先行研究の報告と同様である(Reviewed in Bergles and Richardson, 2015; Nishiyama et al., 2021)。

他の発見として、P25 から P28 への Ki67+細胞の増殖能喪失は、増殖率の低下と増殖細胞の消失によると考えられる。増殖率は P22~25 から P25~28 に約 23%減少し、P22~25 の間の BrdU 投与により~72 時間内で生まれた BrdU+ Ki67+細胞のほぼ全てが 5 日以内に消失した。残った増殖性細胞 (~30%) は新生後の数日で消失したため、P22~25 増殖細胞の運命は増殖期間以内に決まると考えられる。BrdU+ Ki67-細胞は細胞周期から G<sub>0</sub> 期へ移行中に増加しなかったため、増殖性細胞の喪失は分化ではなく、BrdU+細胞の消失が原因である可能性がある。消失の可能性として、細胞死、検出閾値以下の抗原検出、または分析領域からの移動が含まれる。アポトーシスのマーカーである cleaved Caspase-3 はカスパーゼ非依存性の壊死細胞を示す(Raff, 1998; Zangemeister-Wittke and Simon, 2001)。cleaved Caspase-3 はアポトーシス中に短時間で発現するため、本研究では検出できなかった (unpublished observation) が、実際に細胞死が生じた可能性も考えられる。BrdU による核膜の喪失が原因で細胞死が生じる可能性がある(Okuda et al., 2009)。細胞分裂により BrdU が低下し、その結果、検出されなくなる可能性もある。あるいは、WM の増殖性細胞は健常の成体脳では非移動性を表す(Gensert and Goldman, 1996)が、思春期に OPC が分析領域から移動した可能性もある。生後 4 週目における増殖性細胞の消失と運命決定メカニズムの正確な性質を理解するには、更なる研究が必要である。

また、P25 から P30 にかけて増殖や分化は変化せず、成熟した OL が増加する事も分かった。NG2 と Nestin の共染色結果に基づき、この日齢で BrdU+細胞の約 18%および BrdU+Ki67-細胞の約 30%が成熟 OL であると推定できる (Figure 12)。P22~25 BrdU+細胞の CNPase +成熟 OL は 5 日後に 3.0 cells/10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup> として増加したが (Figure 14D)、細胞周期

から脱して G<sub>0</sub> 期に居る BrdU+ Ki67-細胞は P25 から P30 にかけて変化しなかった (Figure 10C)。したがって、増殖後 G<sub>0</sub> 期に居る OL 系細胞において成熟 OL へ分化性状態のシフトが生じ、P25 で約 4%から P30 で約 23%まで増加したと推測される。つまり細胞周期から脱した細胞の一部は細胞死により消失したが、BrdU+ Ki67-細胞は一定の細胞数に維持されていた。細胞周期から脱した OPC において、静止状態へのシフトか、成熟 OL の供給のためであったかは、不明である。

P30 で細胞周期から G<sub>0</sub> 期へ移行した後、成熟 OL は P50 で約 78%が減少し、殆どどの BrdU+成熟細胞が 20 日で消失したことがわかった。それに対して生後 4 週間目 (Levison et al., 1993; Zerlin et al., 1995) 及び、その後の成人期まで (Levison et al., 1999; Dimou et al., 2008)、脳室下帯 (SVZ) から生まれた OPC は脳梁の OL 増加に継続性を与える。これらの先行研究より、脳梁と V1 の皮質下 WM との間に、明確な OL 生理学の違いを示唆している。P30 から P50 において BrdU+ Ki67-細胞 (6.2 cells/10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>) の消失がみられたため、成熟 OL の減少の原因は細胞死によると考えられる。P50 の健常マウスにおける BrdU+ Ki67-細胞 (6.9 cells/10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>) は、生き残った成熟 OL (0.720 cells/10<sup>6</sup> μm<sup>3</sup>) よりも遥に多かった。したがって、生存した BrdU+細胞の多数 (~90%) は、分化細胞が静止状態の未分化性細胞へ戻らない限り、未成熟な分化細胞 (pre-OL または CNPase-未成熟 OL) として存在し続く。

### OL 系細胞の発達に対する両眼球剥奪の影響

本研究では主に、P22~25 増殖細胞の成熟進行に影響を与えることなく、P25 に増殖性 OPC において、開眼時からの視覚剥奪によって更なる増加が発見された。視覚剥奪の効果は、それほど強くはないが、様々な細胞系特異的マーカーの組み合わせを使用して一貫して観察された。視覚剥奪の影響がはダブレット分析でより明確に見られ、盲目マウスでは対称的に分裂した増殖性 OPC が増加していた。しかし、経時的な横断分析によって制限があり、多数の系統マーカーを用いた免疫染色の成功に大きく依存している。将来、トランスジェニックマウスによる増殖細胞の追跡は、細胞種をより適切に分類する事ができ、増殖した OPC における増殖性・分化性・および移動の追跡もできるため、重要であると考えられる。

視覚剥奪による増殖性 OPC の亢進において根本的な原因として、皮質下 WM における軸索活動の変化や白質損傷が考えられる。GFAP および CD68 発現の結果より、後者の可能性が除外できる。しかし、dLG で検出された神経膠症は、dLG におけるニューロンの性質が変化したことを示唆する。可能性として、視神経細胞の軸索変性 (Reese, 1986) または、新生児

期の眼球剥奪マウスにおける dLG サイズの減少が考えられる(Heumann and Rabinowicz, 1980; Asanuma and Stanfield, 1990; Massé et al., 2014)。本研究では、出生時ではなく自然な開眼時からの眼球剥奪により、dLG 変性の可能性に関する予備実験的な情報を提供する。

ニューロンの細胞数の減少や神経活性の変化は、皮質下 WM を介して投射する視床皮質系神経細胞の軸索に影響を及ぼし、OPC に影響を与える可能性がある。先行研究より、ニューロンの活動は、白質の OL 系細胞における成熟を調整することが示されている(*Reviewed in Fields, 2008; Richardson et al., 2011; Bergles and Richardson, 2015; Káradóttir and Kuo, 2018*)。思春期マウスにおける運動前野 (M2) の皮質下白質 (脳梁) では、第 5 層の投射ニューロンに活動電位の発火が促進され、OPC の増殖と分化が促進され、成熟 OL の増加とより厚いミエリンが形成された(Gibson et al., 2014)。神経細胞の軸索活性は、運動技能学習後の運動皮質において(McKenzie et al., 2014; Xiao et al., 2016)、および豊かな環境による様々な脳領域において(Okuda et al., 2009; Ehniger et al., 2011; Simon et al., 2011; Hughes et al., 2018)、OL 新生や OPC 増殖・分化における促進が観察された。一方、感覚運動刺激の低下 (すなわち、貧弱な環境) でラットを飼育すると、視覚野におけるミエリン形成の成熟が遅延された(Narducci et al., 2018)。したがって、ニューロン活動の増加や減少は、OL 系細胞における発達進行を直接制御する。メカニズムとして、中枢運動経路の神経活動の亢進による OPC 増殖は、軸索の無髓部分において(Kukley et al., 2007; Tomassy et al., 2014)、主にグルタミン酸を介した OPC へのシナプス入力に依存すると報告されている(Káradóttir et al., 2005, 2008; Kukley et al., 2007; Ziskin et al., 2007)。神経活動の喪失が WM の成熟進行にどのように影響するかは不明である。Narducci 研究チームの結果(2018)より、V1 の灰白質においてミエリンを形成期やパターンがする程度わかっていた。したがって、WM に対する神経活動の減少の影響はまだ分かっていない。中枢視覚系経路を介した視覚情報に加え、V1 は非視覚野から直接的或いは視床核を介して間接的に視覚情報以外の感覚情報を受け取るため、非視覚入力の影響を考慮する必要がある(Larsen et al., 2009)。

### 皮質下 WM における視覚剥奪の影響

V1 の皮質下 WM には、dLG からの求心性軸索が存在する。上記の網膜神経変性による dLG 縮小に加え、先天性無眼球マウスで下丘 (IC) から異種の軸索入力を dLG で受け取る事が検証されたため、視覚剥奪は dLG を介して WM に影響を与える可能性が考えられる(Piché et al., 2004; Laemle et al., 2006; Chabot et al., 2007, 2008)。IC ニューロンは V1 の下層に投射するため(Laemle et al., 2006)、それらの軸索は皮質下 WM を横切る可能性がある。さら

に、健常マウスの V1 皮質下 WM には、視覚視床を含む他の視床核(外側後核、LP : Simmons et al., 1982; Garrett et al., 1992; 後背核、LD : Charbonneau et al., 2012) 、非視覚視床(Larsen et al., 2009; 前内側核;前腹核;前背核;後核 : Charbonneau et al., 2012)、および運動関連視床(ただし Larsen et al., 2009 参照; 腹側前核、腹外側核、腹内側核 : Charbonneau et al., 2012) からの求心性軸索が含まれる。先行研究より、視床投射は盲目モデルによって違うことが示された。たとえば、新生児からの眼球剥奪マウスの LD (Charbonneau et al., 2012)、ZRDCT/An 系統の先天性無眼球マウスの LD および LP(Godement et al., 1979; Kaiserman-Abramof et al., 1980; LP については Charbonneau et al., 2012 参照)、そして 桿体を介した視床を欠く Gnat<sup>-/-</sup>系統マウスの聴覚、体性感覚、運動、および辺縁系視床核など、通常の V1 に投射しない視床核(Larsen et al., 2009) からの V1 への投射は、C57BL/6 系統マウスと比較して、より強いことが報告された。これらの求心性軸索に加えて、皮質下 WM には皮質下投射ニューロンも含まれており、視覚剥奪時に構造的・機能的変化を起こす可能性がある(Rhoades et al., 1985)。視覚剥奪は、P22~25 の間に V1 の皮質下 WM の求心性・遠心性軸索の機能を変化させ、増殖性 OPC の増加を誘発させると考えられる。本研究で、P22~25 で増殖し分化した白質の OL 細胞数には、視覚剥奪の影響は見られなかった。OPC 変化に対して構造的・機能的な影響は未だ特定されておらず、これらの検証は今後の課題である。

## F. 結論

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变化、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。

## G. 参考文献

- Aerts J, Nys J, Arckens L (2014) A highly reproducible and straightforward method to perform in vivo ocular enucleation in the mouse after eye opening. *J Vis Exp* 92:1–5 Available at: <https://doi.org/10.3791/51936>.
- Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V (2007) A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. *Nat Neurosci* 10:990–1002 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1938>.
- Aguirre A, Gallo V (2004) Postnatal neurogenesis and gliogenesis in the olfactory bulb from NG2-expressing progenitors of the subventricular zone. *J Neurosci* 24:10530-10541. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3572-04.2004>.
- Aguirre AA, Chittajallu R, Belachew S, Gallo V (2004) NG2-expressing cells in the subventricular zone are type C-like cells and contribute to interneuron generation in the postnatal hippocampus. *J Cell Biol* 165:575-589. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200311141>.
- Amedi A, Merabet LB, Bempohl F, Pascual-Leone A (2005) The occipital cortex in the blind lessons about plasticity and vision. *Curr Dir Psychol Sci* 14:306-311. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.0963-7214.2005.00387.x>.
- Araujo GLL, Araujo JAM, Schroeder T, Tort ABL, Costa MR (2014) Sonic hedgehog signaling regulates mode of cell division of early cerebral cortex progenitors and increases astrogliogenesis. *Front Cell Neurosci* 8:1–11 Available at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2014.00077/abstract>.
- Asanuma C, Stanfield BB (1990) Induction of somatic sensory inputs to the lateral geniculate nucleus in congenitally blind mice and in phenotypically normal mice. *Neuroscience* 39:533–545 Available at: [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90241-U](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90241-U).
- Baracska KL, Kidd GJ, Miller RH, Trapp BD (2007) NG2-positive cells generate A2B5-positive oligodendrocyte precursor cells. *Glia* 55:1001-1010.
- Baydyuk M, Morrison VE, Gross PS, Huang JK (2020) Extrinsic Factors Driving Oligodendrocyte Lineage Cell Progression in CNS Development and Injury. *Neurochem Res* 45:630–642 Available at: <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02967-7>.
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V (2003) Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161:169-186. Available at: <https://doi.org/10.1083/jcb.200210110>.
- Benoit J, Ayoub AE, Rakic P (2015) Transcriptomics of critical period of visual cortical plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8094–8099 Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1509323112>.

- Bergami M, Masserdotti G, Temprana SG, Motori E, Eriksson TM, Göbel J, Yang SM, Conzelmann KK, Schinder AF, Götz M, Berninger B (2015) A Critical Period for Experience-Dependent Remodeling of Adult-Born Neuron Connectivity. *Neuron* 85:710–717 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.001>.
- Bergles DE, Jabs R, Steinhäuser C (2010) Neuron-glia synapses in the brain. *Brain Res Rev* 63:130–137 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.003>.
- Bergles DE, Richardson WD (2015) Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a020453 Available at: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>.
- Bertoli C, Skotheim JM, De Bruin RAM (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:518–528.
- Boda E, Di Maria S, Rosa P, Taylor V, Abbracchio MP, Buffo A (2015) Early phenotypic asymmetry of sister oligodendrocyte progenitor cells after mitosis and its modulation by aging and extrinsic factors. *Glia* 63:271–286 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22750>.
- Bögler O, Wren D, Barnett SC, Land H, Noble M (1990) Cooperation between two growth factors promotes extended self-renewal and inhibits differentiation of oligodendrocyte-type-2 astrocyte (O-2A) progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6368–6372 Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6368>.
- Bonn-Breach R, Gu Y, Jenkins J, Fasan R, Wedekind J (2019) Structure of Sonic Hedgehog protein in complex with zinc(II) and magnesium(II) reveals ion-coordination plasticity relevant to peptide drug design. *Acta Crystallogr Sect D Struct Biol* 75:969–979.
- Bronchti G, Heil P, Sadka R, Hess A, Scheich H, Wollberg Z (2002) Auditory activation of “visual” cortical areas in the blind mole rat (*Spalax ehrenbergi*). *Eur J Neurosci* 16:311–329 Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02063.x>.
- Bu J, Banki A, Wu Q, Nishiyama A (2004) Increased NG2+ glial cell proliferation and oligodendrocyte generation in the hypomyelinating mutant shiverer. *Glia* 48:51–63 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.20055>.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn A-P, Mori T, Gotz M (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci* 105:3581–3586 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0709002105>.
- Buffo A, Vosko MR, Erturk D, Hamann GF, Jucker M, Rowitch D, Gotz M (2005) Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: Implications for neuronal repair. *Proc Natl Acad Sci* 102:18183–18188 Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506535102>.
- Bullock TH, Bennett MVL, Johnston D, Josephson R, Marder E, Fields RD (2005) Neuroscience. The neuron doctrine, redux. *Science* 310:791–793 Available at:

<https://doi.org/10.1126/science.1114394>.

- Burger PC, Shibata T, Kleihues P (1986) The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells: application to surgical neuropathology. *Am J Surg Pathol* 10:611–617 Available at: <https://doi.org/10.1097/00000478-198609000-00003>.
- Burton H (2003) Visual Cortex Activity in Early and Late Blind People. *J Neurosci* 23:4005-4011. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-10-04005.2003>.
- Cai J, Chen Y, Cai WH, Hurlock EC, Wu H, Kernie SG, Parada LF, Lu QR (2007) A crucial role for Olig2 in white matter astrocyte development. *Development* 134:1887–1899 Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.02847>.
- Chabot N, Charbonneau V, Laramée M-E, Tremblay R, Boire D, Bronchti G (2008) Subcortical auditory input to the primary visual cortex in anophthalmic mice. *Neurosci Lett* 433:129–134.
- Chabot N, Robert S, Tremblay R, Miceli D, Boire D, Bronchti G (2007) Audition differently activates the visual system in neonatally enucleated mice compared with anophthalmic mutants. *Eur J Neurosci* 26:2334–2348 Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05854.x>.
- Charbonneau V, Laramée ME, Boucher V, Bronchti G, Boire D (2012) Cortical and subcortical projections to primary visual cortex in anophthalmic, enucleated and sighted mice. *Eur J Neurosci* 36:2949–2963 Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08215.x>.
- Chechneva O V., Mayrhofer F, Daugherty DJ, Krishnamurty RG, Bannerman P, Pleasure DE, Deng W (2014) A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis* 5:e1481-12 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.446>.
- Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA (2002) Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothened. *Genes Dev* 16:2743–2748.
- Chen TJ, Kula B, Nagy B, Barzan R, Gall A, Ehrlich I, Kukley M (2018) In Vivo Regulation of Oligodendrocyte Precursor Cell Proliferation and Differentiation by the AMPA-Receptor Subunit GluA2. *Cell Rep* 25:852-861.e7 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.066>.
- Chen Z, Li X, Zhou J, Yuan B, Yu B, Tong D, Cheng C, Shao Y, Xia S, Zhang R, Lyu J, Yu X, Dong C, Zhou WH, Qiu Z (2017) Accumulated quiescent neural stem cells in adult hippocampus of the mouse model for the MECP2 duplication syndrome. *Sci Rep* 7:1-9. Available at: <https://doi.org/10.1038/srep41701>.
- Chew L-J, Coley W, Cheng Y, Gallo V (2010) Mechanisms of Regulation of Oligodendrocyte Development by p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Neurosci* 30:11011–11027 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.2546-10.2010>.
- Clark MA, Douglas M, Choi J (2018) *Biology*. OpenStax. Available at:



<https://openstax.org/details/books/biology-2e>.

- Clarke LE, Barres BA (2013) Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci* 14:311–321.
- Coppi E, Cellai L, Maraula G, Dettori I, Melani A, Pugliese AM, Pedata F (2015) Role of adenosine in oligodendrocyte precursor maturation. *Front Cell Neurosci* 9:155 Available at: <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00155>.
- Corvetti L, Aztiria E, Domenici L (2006) Reduction of GFAP induced by long dark rearing is not restricted to visual cortex. *Brain Res* 1067:146–153 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.10.072>.
- Corvetti L, Capsoni S, Cattaneo A, Domenici L (2003) Postnatal development of GFAP in mouse visual cortex is not affected by light deprivation. *Glia* 41:404–414 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.10194>.
- Cruz-Martín A, El-Danaf RN, Osakada F, Sriram B, Dhande OS, Nguyen PL, Callaway EM, Ghosh A, Huberman AD (2014) A dedicated circuit links direction-selective retinal ganglion cells to the primary visual cortex. *Nature* 507:358–361 Available at: <https://doi.org/10.1038/nature12989>.
- Dai J, Bercury KK, Macklin WB (2014) Interaction of mTOR and Erk1/2 signaling to regulate oligodendrocyte differentiation. *Glia* 62:2096–2109.
- Dawson MR., Polito A, Levine JM, Reynolds R (2003) NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci* 24:476–488 Available at: [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00210-0](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00210-0).
- Dawson MRL, Levine JM, Reynolds R (2000) NG2-expressing cells in the central nervous system: Are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61:471–479 Available at: [https://doi.org/10.1002/1097-4547\(20000901\)61:5%3C471::AID-JNR1%3E3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1097-4547(20000901)61:5%3C471::AID-JNR1%3E3.0.CO;2-N).
- Daynac M, Tirou L, Faure H, Mouthon MA, Gauthier LR, Hahn H, Boussin FD, Ruat M (2016) Hedgehog controls quiescence and activation of neural stem cells in the adult ventricular-subventricular zone. *Stem Cell Reports* 7:735–748 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.08.016>.
- De Biase LM, Bergles DE (2011) Same players, different game: AMPA receptor regulation in oligodendrocyte progenitors. *Nat Neurosci* 14:1358–1360 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2965>.
- De Biase LM, Nishiyama A, Bergles DE (2010) Excitability and synaptic communication within the oligodendrocyte lineage. *J Neurosci* 30:3600–3611 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6000-09.2010>.
- De Monasterio-Schrader P, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, Patzig J, Werner HB (2012) Systematic

- approaches to central nervous system myelin. *Cell Mol Life Sci* 69:2879–2894.
- Deloulme JC, Raponi E, Gentil BJ, Bertacchi N, Marks A, Labourdette G, Baudier J (2004) Nuclear expression of S100B in oligodendrocyte progenitor cells correlates with differentiation toward the oligodendroglial lineage and modulates oligodendrocytes maturation. *Mol Cell Neurosci* 27:453–465 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.07.008>.
- Dimou L, Gallo V (2015) NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 63:1429–1451 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22859>.
- Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M (2008) Progeny of Olig2-expressing progenitors in the gray and white matter of the adult mouse cerebral cortex. *J Neurosci* 28:10434–10442 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2831-08.2008>.
- Doron N, Wollberg Z (1994) Cross-modal neuroplasticity in the blind mole rat *Spalax ehrenbergi*: a WGA-HRP tracing study. *Neuroreport* 5:2697–2701 Available at: <https://doi.org/10.1097/00001756-199412000-00072>.
- Dyer MA, Cepko CL (2001) Regulating proliferation during retinal development. *Nat Rev Neurosci* 2:333–342.
- Ehninger D, Wang LP, Klempin F, Römer B, Kettenmann H, Kempermann G (2011) Enriched environment and physical activity reduce microglia and influence the fate of NG2 cells in the amygdala of adult mice. *Cell Tissue Res* 345:69–86. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1200-z>.
- Eriksson PS, Perrfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Cage FH (1998) Eriksson Et Al (1998). *Nat Med* 4:1313–1317 Available at: <https://doi.org/10.1038/3305>.
- Espinosa-Bustos C, Mella J, Soto-Delgado J, Salas CO (2019) State of the art of Smo antagonists for cancer therapy: advances in the target receptor and new ligand structures. *Future Med Chem* 11:617–638.
- Espinosa JS, Stryker MP (2012) Development and Plasticity of the Primary Visual Cortex. *Neuron* 75:230–249 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.009>.
- Fabre PJ, Shimogori T, Charron F (2010) Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor boc. *J Neurosci* 30:266–275 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3778-09.2010>.
- Faiz M, Sachewsky N, Gascón S, Bang KWA, Morshead CM, Nagy A (2015) Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell* 17:624–634.
- Fancy SPJ, Baranzini SE, Zhao C, Yuk DI, Irvine KA, Kaing S, Sanai N, Franklin RJM, Rowitch DH (2009) Dysregulation of the Wnt pathway inhibits timely myelination and remyelination in the mammalian CNS. *Genes Dev* 23:1571–1585 Available at: <https://doi.org/10.1101/gad.1806309>.

- Fancy SPJ, Zhao C, Franklin RJM (2004) Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS. *Mol Cell Neurosci* 27:247–254 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.06.015>.
- Ferent J, Zimmer C, Durbec P, Ruat M, Traiffort E (2013) Sonic hedgehog signaling is a positive oligodendrocyte regulator during demyelination. *J Neurosci* 33:1759–1772 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3334-12.2013>.
- Fields RD (2008) White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31:361–370 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.001>.
- Gage FH (2000) Mammalian Neural Stem Cells. *Science* (80- ) 287:1433–1438 Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.287.5457.1433>.
- Gage FH (2002) Neurogenesis in the Adult Brain. *J Neurosci* 22:612–613.
- Gallo V, Armstrong RC (1995) Developmental and growth factor-induced regulation of nestin in oligodendrocyte lineage cells. *J Neurosci* 15:394–406. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00394.1995>.
- Gallo V, Deneen B (2014) Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron* 83:283–308 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.010>.
- García-Marqués J, Núñez-Llaves R, López-Mascaraque L (2014) NG2-glia from pallial progenitors produce the largest clonal clusters of the brain: Time frame of clonal generation in cortex and olfactory bulb. *J Neurosci* 34:2305–2313. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3060-13.2014>.
- Garcia ADR, Petrova R, Eng L, Joyner AL (2010) Sonic Hedgehog Regulates Discrete Populations of Astrocytes in the Adult Mouse Forebrain. *J Neurosci* 30:13597–13608 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0830-10.2010>.
- Garrett B, Sørensen JC, Slomianka L (1992) Fluoro-Gold tracing of zinc-containing afferent connections in the mouse visual cortices. *Anat Embryol (Berl)* 185:451–459 Available at: <https://doi.org/10.1007/BF00174083>.
- Ge WP, Miyawaki A, Gage FH, Jan YN, Jan LY (2012) Local generation of glia is a major astrocyte source in postnatal cortex. *Nature* 484:376–380.
- Ge WP, Zhou W, Luo Q, Jan LY, Yuh NJ (2009) Dividing glial cells maintain differentiated properties including complex morphology and functional synapses. *Proc Natl Acad Sci* 106:328–333 Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0811353106>.
- Gensert JM, Goldman JE (1996) In vivo characterization of endogenous proliferating cells in adult rat subcortical white matter. *Glia* 17:39–51. Available at: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199605\)17:1%3C39::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199605)17:1%3C39::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-2).
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H (1984) Cell cycle analysis of a cell

- proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-1715. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/133/4/1710/>.
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H (1983) Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J cancer* 31:13–20 Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910310104>.
- Ghoumari AM, Baulieu EE, Schumacher M (2005) Progesterone increases oligodendroglial cell proliferation in rat cerebellar slice cultures. *Neuroscience* 135:47–58 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.05.023>.
- Gibson EM, Purger D, Mount CW, Goldstein AK, Lin GL, Wood LS, Inema I, Miller SE, Bieri G, Zuchero JB, Barres BA, Woo PJ, Vogel H, Monje M (2014) Neuronal Activity Promotes Oligodendrogenesis and Adaptive Myelination in the Mammalian Brain. *Science* 344:1252304 Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1252304>.
- Globus A, Scheibel AB (1967) The effect of visual deprivation on cortical neurons: A Golgi study. *Exp Neurol* 19:331–345 Available at: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(67\)90029-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(67)90029-5).
- Godement P, Saillour P, Imbert M (1979) Thalamic afferents to the visual cortex in congenitally anophthalmic mice. *Neurosci Lett* 13:271–278 Available at: [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(79\)91506-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(79)91506-4).
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH (2016) Adult Neurogenesis in the Hippocampus : From Stem Cells to Behavior. *Cell* 167:897–914 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.021>.
- González-Fernández E, Jeong HK, Fukaya M, Kim H, Khawaja RR, Srivastava IN, Waisman A, Son YJ, Kang SH (2018) PTEN negatively regulates the cell lineage progression from NG2+ glial progenitor to oligodendrocyte via mTOR-independent signalling. *Elife* 7:1-30. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.32021>.
- Guo F, Joyce M, McCauley E, Bannerman P, Pleasure D (2009) Early postnatal proteolipid promoter-expressing progenitors produce multilineage cells in vivo. *J Neurosci* 29:7256-7270. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5653-08.2009>.
- Hammond E, Lang J, Maeda Y, Pleasure D, Angus-Hill M, Xu J, Horiuchi M, Deng W, Guo F (2015) The Wnt Effector Transcription Factor 7-Like 2 Positively Regulates Oligodendrocyte Differentiation in a Manner Independent of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling. *J Neurosci* 35:5007–5022 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4787-14.2015>.
- Harwell CC, Parker PRL, Gee SM, Okada A, McConnell SK, Kreitzer AC, Kriegstein AR (2012) Sonic Hedgehog Expression in Corticofugal Projection Neurons Directs Cortical Microcircuit Formation. *Neuron* 73:1116–1126 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.009>.
- Hemmer B, Archelos JJ, Hartung HP (2002) New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 3:291–301.

- Hensch TK (2005) Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nat Rev Neurosci* 6:877–888  
Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn1787>.
- Heumann D, Rabinowicz T (1980) Postnatal development of the dorsal lateral geniculate nucleus in the normal and enucleated albino mouse. *Exp brain Res* 38:75–85 Available at:  
<https://doi.org/10.1007/BF00237933>.
- Hill RA, Li AM, Grutzendler J (2018) Lifelong cortical myelin plasticity and age-related degeneration in the live mammalian brain. *Nat Neurosci* 21:1–13 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0120-6>.
- Hill RA, Nishiyama A (2014) NG2 Cells ( Polydendrocytes ): Listeners to the Neural Network with Diverse Properties. :1195–1210.
- Hill RA, Patel KD, Goncalves CM, Grutzendler J, Nishiyama A (2014) Modulation of oligodendrocyte generation during a critical temporal window after NG2 cell division. *Nat Neurosci* 17:1518–1527 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3815>.
- Hill RA, Patel KD, Medved J, Reiss AM, Nishiyama A (2013) NG2 cells in white matter but not gray matter proliferate in response to PDGF. *J Neurosci* 33:14558–14566 Available at:  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2001-12.2013>.
- Hill SA, Blaeser AS, Coley AA, Xie Y, Shepard KA, Harwell CC, Gao W-J, Garcia ADR (2019) Sonic hedgehog signaling in astrocytes mediates cell type-specific synaptic organization. *Elife* 8:1–23 Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.45545>.
- Horner PJ, Thallmair M, Gage FH (2002) Defining the NG2-expressing cell of the adult CNS. *J Neurocytol* 31:469–480 Available at: <https://doi.org/10.1023/A:1025739630398>.
- Hrvatin S, Hochbaum DR, Nagy MA, Cicconet M, Robertson K, Cheadle L, Zilionis R, Ratner A, Borges-Monroy R, Klein AM, Sabatini BL, Greenberg ME (2018) Single-cell analysis of experience-dependent transcriptomic states in the mouse visual cortex. *Nat Neurosci* 21:120–129 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0029-5>.
- Huang W, Zhao N, Bai X, Karram K, Trotter J, Goebbels S, Scheller A, Kirchhoff F (2014) Novel NG2-CreERT2 knock-in mice demonstrate heterogeneous differentiation potential of NG2 glia during development. *Glia* 62:896–913 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.22648>.
- Hubel DH, Wiesel TN (1962) Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J Physiol* 160:106–154 Available at:  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006837>.
- Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE (2013) Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci* 16:668–676 Available at: <http://www.nature.com/articles/nn.3390>.
- Hughes EG, Orthmann-Murphy JL, Langseth AJ, Bergles DE (2018) Myelin remodeling through

- experience-dependent oligodendrogenesis in the adult somatosensory cortex. *Nat Neurosci* 21:696–706 Available at: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0121-5>.
- Imayoshi I, Sakamoto M, Ohtsuka T, Takao K, Miyakawa T, Yamaguchi M, Mori K, Ikeda T, Itohara S, Kageyama R (2008) Roles of continuous neurogenesis in the structural and functional integrity of the adult forebrain. *Nat Neurosci* 11:1153–1161.
- Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov S V., Stewart CL, Fields RD (2006) Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49:823–832 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.02.006>.
- Ishibashi T, Lee PR, Baba H, Fields RD (2009) Leukemia inhibitory factor regulates the timing of oligodendrocyte development and myelination in the postnatal optic nerve. *J Neurosci Res* 87:3343–3355 Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.22173>.
- Ishii A, Furusho M, Dupree JL, Bansal R (2016) Strength of ERK1/2 MAPK activation determines its effect on myelin and axonal integrity in the adult CNS. *J Neurosci* 36:6471–6487 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.0299-16.2016>.
- Ishii A, Fyffe-Maricich SL, Furusho M, Miller RH, Bansal R (2012) ERK1/ERK2 MAPK signaling is required to increase myelin thickness independent of oligodendrocyte differentiation and initiation of myelination. *J Neurosci* 32:8855–8864.
- Izraeli R, Koay G, Lamish M, Heicklen-Klein AJ, Heffner HE, Heffner RS, Wollberg Z (2002) Cross-modal neuroplasticity in neonatally enucleated hamsters: structure, electrophysiology and behaviour. *Eur J Neurosci* 15:693–712 Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.01902.x>.
- Jablonska B, Aguirre A, Vandenbosch R, Belachew S, Berthet C, Kaldis P, Gallo V (2007) Cdk2 is critical for proliferation and self-renewal of neural progenitor cells in the adult subventricular zone. *J Cell Biol* 179:1231–1245.
- Ji X-Y, Zingg B, Mesik L, Xiao Z, Zhang LI, Tao HW (2016) Thalamocortical Innervation Pattern in Mouse Auditory and Visual Cortex: Laminar and Cell-Type Specificity. *Cereb Cortex* 26:2612–2625 Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhv099>.
- Jung CKE, Herms J (2014) Structural dynamics of dendritic spines are influenced by an environmental enrichment: An in vivo imaging study. *Cereb Cortex* 24:377–384 Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs317>.
- Kahn DM, Krubitzer L (2002) Massive cross-modal cortical plasticity and the emergence of a new cortical area in developmentally blind mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:11429–11434 Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.162342799>.
- Kaiserman-Abramof IR, Graybiel AM, Nauta WJ (1980) The thalamic projection to cortical area 17 in a congenitally anophthalmic mouse strain. *Neuroscience* 5:41–52 Available at:

- [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(80\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0306-4522(80)90069-X).
- Kamphuis W, Orre M, Kooijman L, Dahmen M, Hol EM (2012) Differential cell proliferation in the cortex of the APP<sup>swe</sup>PS1<sup>dE9</sup> Alzheimer's disease mouse model. *Glia* 60:615–629.
- Kang SH, Fukaya M, Yang JK, Rothstein JD, Bergles DE (2010) NG2 + CNS Glial Progenitors Remain Committed to the Oligodendrocyte Lineage in Postnatal Life and following Neurodegeneration. *Neuron* 68:668–681 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.009>.
- Káradóttir R, Cavelier P, Bergersen LH, Attwell D (2005) NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature* 438:1162-1166. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature04302>.
- Káradóttir R, Hamilton NB, Bakiri Y, Attwell D (2008) Spiking and nonspiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nat Neurosci* 11:450–456 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn2060>.
- Káradóttir RT, Kuo CT (2018) Neuronal Activity-Dependent Control of Postnatal Neurogenesis and Gliogenesis. *Annu Rev Neurosci* 41:139–161 Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031054>.
- Karlen SJ, Krubitzer L (2009) Effects of bilateral enucleation on the size of visual and nonvisual areas of the brain. *Cereb Cortex* 19:1360–1371 Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn176>.
- Kee N, Sivalingam S, Boonstra R, Wojtowicz JM (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods* 115:97–105 Available at: [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(02\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(02)00007-9).
- Kelenis DP, Hart E, Edwards-Fligner M, Johnson JE, Vue TY (2018) ASCL1 regulates proliferation of NG2-glia in the embryonic and adult spinal cord. *Glia* 66:1862–1880.
- Kougioumtzidou E, Shimizu T, Hamilton NB, Tohyama K, Sprengel R, Monyer H, Attwell D, Richardson WD (2017) Signalling through AMPA receptors on oligodendrocyte precursors promotes myelination by enhancing oligodendrocyte survival. *Elife* 6:1-31. Available at: <https://doi.org/10.7554/eLife.28080>.
- Kremer D, Göttle P, Hartung HP, Küry P (2016) Pushing Forward: Remyelination as the New Frontier in CNS Diseases. *Trends Neurosci* 39:246–263 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.02.004>.
- Kukley M, Capetillo-Zarate E, Dietrich D (2007) Vesicular glutamate release from axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:311-320. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1850>.
- Kukley M, Kiladze M, Tognatta R, Hans M, Swandulla D, Schramm J, Dietrich D (2008) Glial cells are born with synapses. *FASEB J* 22:2957–2969 Available at: <https://doi.org/10.1096/fj.07-090985>.

- Kukley M, Nishiyama A, Dietrich D (2010) The fate of synaptic input to NG2 glial cells: Neurons specifically downregulate transmitter release onto differentiating oligodendroglial cells. *J Neurosci* 30:8320-8331. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0854-10.2010>.
- Laemle LK, Strominger NL, Carpenter DO (2006) Cross-modal innervation of primary visual cortex by auditory fibers in congenitally anophthalmic mice. *Neurosci Lett* 396:108–112 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.11.020>.
- Lagace DC, Whitman MC, Noonan MA, Ables JL, DeCarolis NA, Arguello AA, Donovan MH, Fischer SJ, Farnbauch LA, Beech RD, DiLeone RJ, Greer CA, Mandyam CD, Eisch AJ (2007) Dynamic Contribution of Nestin-Expressing Stem Cells to Adult Neurogenesis. *J Neurosci* 27:12623–12629 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.3812-07.2007>.
- Lappe-Siefke C, Goebbels S, Gravel M, Nicksch E, Lee J, Braun PE, Griffiths IR, Nave K-A (2003) Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nat Genet* 33:366–374.
- Larsen DD, Luu JD, Burns ME, Krubitzer L (2009) What are the Effects of Severe Visual Impairment on the Cortical Organization and Connectivity of Primary Visual Cortex? *Front Neuroanat* 3:30 Available at: <https://doi.org/10.3389/neuro.05.030.2009>.
- Lee J, Gravel M, Gao E, O'Neill RC, Braun PE (2001) Identification of essential residues in 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. Chemical modification and site-directed mutagenesis to investigate the role of cysteine and histidine residues in enzymatic activity. *J Biol Chem* 276:14804–14813.
- Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE (2005) Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol* 170:661–673.
- Lee J, O'Neill RC, Park MW, Gravel M, Braun PE (2006) Mitochondrial localization of CNP2 is regulated by phosphorylation of the N-terminal targeting signal by PKC: implications of a mitochondrial function for CNP2 in glial and non-glial cells. *Mol Cell Neurosci* 31:446–462.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RDG (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60:585-595. Available at: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90662-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90662-X).
- Levine JM, Reynolds R (1999) Activation and Proliferation of Endogenous Oligodendrocyte Precursor Cells during Ethidium Bromide-Induced Demyelination. *Exp Neurol* 160:333–347 Available at: <https://doi.org/10.1006/exnr.1999.7224>.
- Levison SW, Chuang C, Abramson BJ, Goldman JE (1993) The migrational patterns and developmental fates of glial precursors in the rat subventricular zone are temporally regulated. *Development* 119:611-622. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.119.3.611>.
- Levison SW, Young GM, Goldman JE (1999) Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially



- generate oligodendroglia. *J Neurosci Res* 57:435–446 Available at:  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19990815\)57:4%3C435::AID-JNR3%3E3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19990815)57:4%3C435::AID-JNR3%3E3.0.CO;2-L).
- Li P, Li HX, Jiang HY, Zhu L, Wu HY, Li JT, Lai JH (2017) Expression of NG2 and platelet-derived growth factor receptor alpha in the developing neonatal rat brain. *Neural Regen Res* 12:1843–1852.
- Liu J, Dietz K, Deloyht JM, Pedre X, Kelkar D, Kaur J, Vialou V, Lobo MK, Dietz DM, Nestler EJ, Dupree J, Casaccia P (2012) Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci* 15:1621–1623 Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.3263>.
- Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, McMahon AP, Stiles CD, Rowitch DH (2000) Sonic Hedgehog – Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron* 25:317–329.
- Lyckman AW, Horng S, Leamey CA, Tropea D, Watakabe A, Van Wart A, McCurry C, Yamamori T, Sur M (2008) Gene expression patterns in visual cortex during the critical period: Synaptic stabilization and reversal by visual deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9409–9414 Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.0710172105>.
- Maffei A, Lambo ME, Turrigiano GG (2010) Critical Period for Inhibitory Plasticity in Rodent Binocular V1. *J Neurosci* 30:3304–3309 Available at:  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5340-09.2010>.
- Maffei A, Nataraj K, Nelson SB, Turrigiano GG (2006) Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature* 443:81–84.
- Makinodan M, Rosen KM, Ito S, Corfas G (2012) A critical period for social experience-dependent oligodendrocyte maturation and myelination. *Science* (80- ) 337:1357–1360 Available at:  
<https://doi.org/10.1126/science.1220845>.
- Mallon BS, Shick HE, Kidd GJ, Macklin WB (2002) Proteolipid promoter activity distinguishes two populations of NG2-positive cells throughout neonatal cortical development. *J Neurosci* 22:876–885 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00876.2002>.
- Mangin JM, Li P, Scafidi J, Gallo V (2012) Experience-dependent regulation of NG2 progenitors in the developing barrel cortex. *Nat Neurosci* 15:1192–1194 Available at:  
<https://doi.org/10.1038/nn.3190>.
- Marie C, Clavairoly A, Frah M, Hmidan H, Yan J, Zhao C, Van Steenwinckel J, Daveau R, Zalc B, Hassan B, Thomas JL, Gressens P, Ravassard P, Moszer I, Martin DM, Richard Lu Q, Parras C (2018) Oligodendrocyte precursor survival and differentiation requires chromatin remodeling by Chd7 and Chd8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E8246–E8255.
- Marques S et al. (2016) Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* (80- ) 352:1326–1329 Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aaf6463>.

- Marshall CAG, Novitsch BG, Goldman JE (2005) Olig2 directs astrocyte and oligodendrocyte formation in postnatal subventricular zone cells. *J Neurosci* 25:7289–7298 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1924-05.2005>.
- Massé IO, Guillemette S, Laramée M-E, Bronchti G, Boire D (2014) Strain differences of the effect of enucleation and anophthalmia on the size and growth of sensory cortices in mice. *Brain Res* 1588:113–126.
- Mazuir E, Fricker D, Sol-Foulon N (2021) Neuron–oligodendrocyte communication in myelination of cortical gabaergic cells. *Life* 11.
- McFerran B, Burgoyne R (1997) 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase is associated with mitochondria in diverse adrenal cell types. *J Cell Sci* 110 ( Pt 23):2979–2985.
- McGee AW, Yang Y, Fischer QS, Daw NW, Strittmatter SM (2005) Experience-Driven Plasticity of Visual Cortex Limited by Myelin and Nogo Receptor. *Science* 309:2222–2226 Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1114362>.
- McKenzie IA, Ohayon D, Li H, De Faria JP, Emery B, Tohyama K, Richardson WD (2014) Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346:318–322 Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1254960>.
- McKinnon RD, Matsui T, Dubois-Dalq M, Aaronson SA (1990) FGF modulates the PDGF-driven pathway of oligodendrocyte development. *Neuron* 5:603–614 Available at: [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90215-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90215-2).
- Merabet LB, Pascual-Leone A (2010) Neural reorganization following sensory loss: The opportunity of change. *Nat Rev Neurosci* 11:44-52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2758>.
- Miller I, Min M, Yang C, Tian C, Gookin S, Carter D, Spencer SL (2018) Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep* 24:1105–1112 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>.
- Ming G li, Song H (2011) Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70:687–702 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.001>.
- Mitew S, Gobius I, Fenlon LR, McDougall SJ, Hawkes D, Xing YL, Bujalka H, Gundlach AL, Richards LJ, Kilpatrick TJ, Merson TD, Emery B (2018) Pharmacogenetic stimulation of neuronal activity increases myelination in an axon-specific manner. *Nat Commun* 9:1–16 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02719-2>.
- Murdoch B, Roskams AJ (2008) A novel embryonic nestin-expressing radial glia-like progenitor gives rise to zonally restricted olfactory and vomeronasal neurons. *J Neurosci* 28:4271–4282.
- Muthukumar AK, Stork T, Freeman MR (2014) Activity-dependent regulation of astrocyte GAT levels during synaptogenesis. *Nat Neurosci* 17:1340–1350 Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/nn.3791>.

- Nagy B, Hovhannisyanyan A, Barzan R, Chen T-J, Kukley M (2017) Different patterns of neuronal activity trigger distinct responses of oligodendrocyte precursor cells in the corpus callosum. *PLoS Biol* 15:e2001993 Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001993>.
- Nakajima T, Kagawa K, Deguchi T, Kimura H, Kakusui M, Katagishi T, Mitsumoto Y, Okanoué T, Kashima K, Ashihara T (1999) Novel Formula for Cell Kinetics in Xenograft Model of Hepatocellular Carcinoma Using Histologically Calculable Parameters. *Exp Cell Res* 246:412–420 Available at: <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4252>.
- Narducci R, Baroncelli L, Sansevero G, Begenisic T, Prontera C, Sale A, Cenni MC, Berardi N, Maffei L (2018) Early impoverished environment delays the maturation of cerebral cortex. *Sci Rep* 8:1-15. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-19459-y>.
- Nishiyama A, Chang A, Trapp BD (1999) NG2+ glial cells: A novel glial cell population in the adult brain. *J Neurophysiol* 82:1113-1124. Available at: <https://doi.org/10.1097/00005072-199911000-00001>.
- Nishiyama A, Shimizu T, Sherafat A, Richardson WD (2021) Life-long oligodendrocyte development and plasticity. *Semin Cell Dev Biol* Available at: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.02.004>.
- Nishiyama A, Suzuki R, Zhu X (2014) NG2 cells (polydendrocytes) in brain physiology and repair. *Front Neurosci* 8:1-7. Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00133>.
- Ohwaza I, Freeman RD (1988) Binocularly deprived cats: Binocular tests of cortical cells show regular patterns of interaction. *J Neurosci* 8:2507-2516. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.08-07-02507.1988>.
- Okuda H, Tatsumi K, Makinodan M, Yamauchi T, Kishimoto T, Wanaka A (2009) Environmental enrichment stimulates progenitor cell proliferation in the amygdala. *J Neurosci Res* 87:3546–3553 Available at: <https://doi.org/10.1002/jnr.22160>.
- Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sánchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Álvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A (2005) Sonic hedgehog controls stem cells behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 132:335–344.
- Paxinos G, Franklin KBJ (2008) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, 3rd ed. Academic Press.
- Petersen SE, Sporns O (2015) Brain Networks and Cognitive Architectures. *Neuron* 88:207–219 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.027>.
- Piché M, Robert S, Miceli D, Bronchti G (2004) Environmental enrichment enhances auditory takeover of the occipital cortex in anophthalmic mice. *Eur J Neurosci* 20:3463–3472 Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03823.x>.
- Pitter KL, Tamagno I, Feng X, Ghosal K, Amankulor N, Holland EC, Hambardzumyan D (2014) The SHH/Gli pathway is reactivated in reactive glia and drives proliferation in response to

- neurodegeneration-induced lesions. *Glia* 62:1595–1607 Available at:  
<https://doi.org/10.1002/glia.22702>.
- Podbielska M, Banik NL, Kurowska E, Hogan EL (2013) Myelin recovery in multiple sclerosis: The challenge of remyelination. *Brain Sci* 3:1282–1324 Available at:  
<https://doi.org/10.3390/brainsci3031282>.
- Polley DB, Kvašňák E, Frostig RD (2004) Naturalistic experience transforms sensory maps in the adult cortex of caged animals. *Nature* 429:67–71 Available at:  
<https://doi.org/10.1038/nature02469>.
- Price MA, Colvin Wanshura LE, Yang J, Carlson J, Xiang B, Li G, Ferrone S, Dudek AZ, Turley EA, McCarthy JB (2011) CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:1148–1157.
- Pringle NP, Mudhar HS, Collarini EJ, Richardson WD (1992) PDGF receptors in the rat CNS: During late neurogenesis, PDGF alpha-receptor expression appears to be restricted to glial cells of the oligodendrocyte lineage. *Development* 115:535-551. Available at:  
<http://dev.biologists.org/content/115/2/535.abstract>.
- Prusky GT, Alam NM, Douglas RM (2006) Enhancement of Vision by Monocular Deprivation in Adult Mice. *J Neurosci* 26:11554–11561 Available at:  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3396-06.2006>.
- Psachoulia K, Jamen F, Young KM, Richardson WD (2009) Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol* 5:57-67. Available at:  
<https://doi.org/10.1017/S1740925X09990354>.
- Raasakka A, Kursula P (2014) The myelin membrane-associated enzyme 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: on a highway to structure and function. *Neurosci Bull* 30:956–966.
- Raasakka A, Kursula P (2020) Flexible Players within the Sheaths: The Intrinsically Disordered Proteins of Myelin in Health and Disease. *Cells* 9.
- Radtke C, Sasaki M, Lankford KL, Gallo V, Kocsis JD (2011) CNPase expression in olfactory ensheathing cells. *J Biomed Biotechnol* 2011.
- Rafalski VA, Ho PP, Brett JO, Ucar D, Dugas JC, Pollina EA, Chow LML, Ibrahim A, Baker SJ, Barres BA, Steinman L, Brunet A (2013) Expansion of oligodendrocyte progenitor cells following SIRT1 inactivation in the adult brain. *Nat Cell Biol* 15:614-624. Available at:  
<https://doi.org/10.1038/ncb2735>.
- Raff M (1998) Cell suicide for beginners. *Nature* 396:119-122. Available at:  
<https://doi.org/10.1038/24055>.
- Rebsam A, Seif I, Gaspar P (2002) Refinement of thalamocortical arbors and emergence of barrel domains in the primary somatosensory cortex: A study of normal and monoamine oxidase A

- knock-out mice. *J Neurosci* 22:8541–8552 Available at:  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-19-08541.2002>.
- Reese BE (1986) The topography of expanded uncrossed retinal projections following neonatal enucleation of one eye: differing effects in dorsal lateral geniculate nucleus and superior colliculus. *J Comp Neurol* 250:8–32 Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.902500103>.
- Rhoades RW, Mooney RD, Fish SE (1985) Subcortical projections of area 17 in the anophthalmic mouse. *Brain Res* 349:171–181 Available at: [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90141-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90141-5).
- Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I (2011) NG2-glia as Multipotent Neural Stem Cells: Fact or Fantasy? *Neuron* 70:661–673 Available at:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.05.013>.
- Rivell A, Petralia RS, Wang YX, Clawson E, Moehl K, Mattson MP, Yao PJ (2019) Sonic hedgehog expression in the postnatal brain. *Biol Open* 8:bio040592 Available at:  
<https://doi.org/10.1242/bio.040592>.
- Rivers LE, Young KM, Rizzi M, Jamen F, Psachoulia K, Wade A, Kessar N, Richardson WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci* 11:1392–1401 Available at:  
<https://doi.org/10.1038/nn.2220>.
- Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N (2002) Hedgehog–GLI signaling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci* 3:24–33.
- Rusnakova V, Honsa P, Dzamba D, Ståhlberg A, Kubista M, Anderova M (2013) Heterogeneity of Astrocytes: From Development to Injury - Single Cell Gene Expression. *PLoS One* 8.
- Sakry D, Neitz A, Singh J, Frischknecht R, Marongiu D, Binamé F, Perera SS, Endres K, Lutz B, Radyushkin K, Trotter J, Mittmann T (2014) Oligodendrocyte Precursor Cells Modulate the Neuronal Network by Activity-Dependent Ectodomain Cleavage of Glial NG2. *PLoS Biol* 12.
- Samanta J, Grund EM, Silva HM, Lafaille JJ, Fishell G, Salzer JL (2015) Inhibition of Gli1 mobilizes endogenous neural stem cells for remyelination. *Nature* 526:448–452 Available at:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14957>.
- Sánchez-Arrones L, Nieto-Lopez F, Sánchez-Camacho C, Carreres MI, Herrera E, Okada A, Bovolenta P (2013) Shh/Boc signaling is required for sustained generation of ipsilateral projecting ganglion cells in the mouse retina. *J Neurosci* 33:8596–8607 Available at:  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2083-12.2013>.
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P (2008) Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135:3531–3541 Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.023663>.
- Sanchez MA, Armstrong RC (2018) Postnatal Sonic hedgehog (Shh) responsive cells give rise to

- oligodendrocyte lineage cells during myelination and in adulthood contribute to remyelination. *Exp Neurol* 299:122–136 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.10.010>.
- Schumacher M, Hussain R, Gago N, Oudinet JP, Mattern C, Ghomari AM (2012) Progesterone synthesis in the nervous system: Implications for myelination and myelin repair. *Front Neurosci* 6:1–22 Available at: <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00010>.
- Sharma P, Cline HT (2010) Visual Activity Regulates Neural Progenitor Cells in Developing *Xenopus* CNS through Musashi1. *Neuron* 68:442–455 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.028>.
- Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL (2012) Self-Renewal and Differentiation of Reactive Astrocyte-Derived Neural Stem/Progenitor Cells Isolated from the Cortical Peri-Infarct Area after Stroke. *J Neurosci* 32:7926–7940 Available at: <http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.4303-11.2012>.
- Simmons PA, Lemmon V, Pearlman AL (1982) Afferent and efferent connections of the striate and extrastriate visual cortex of the normal and reeler mouse. *J Comp Neurol* 211:295–308 Available at: <https://doi.org/10.1002/cne.902110308>.
- Simon C, Götz M, Dimou L (2011) Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia* 59:869–881 Available at: <https://doi.org/10.1002/glia.21156>.
- Sipe GO, Lowery RL, Tremblay M, Kelly EA, Lamantia CE, Majewska AK (2016) Microglial P2Y<sub>12</sub> is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex. *Nat Commun* 7:1–15 Available at: <https://doi.org/10.1038/ncomms10905>.
- Sirko S et al. (2013) Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog glia. *Cell Stem Cell* 12:426–439.
- Sofroniew M V. (2020) Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol* 41:758–770 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>.
- Stallcup WB (2002) The NG2 proteoglycan: Past insights and future prospects. *J Neurocytol* 31:423–435.
- Stingo S, Masullo M, Polverini E, Laezza C, Ruggiero I, Arcone R, Ruozi E, Dal Piaz F, Malfitano AM, D’Ursi AM, Bifulco M (2007) The N-terminal domain of 2’,3’-cyclic nucleotide 3’-phosphodiesterase harbors a GTP/ATP binding site. *Chem Biol Drug Des* 70:502–510.
- Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y ichi (2002) The basic helix-loop-helix factor Olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 12:1157–1163 Available at: [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00926-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00926-0).
- Tanaka Y, Tozuka Y, Takata T, Shimazu N, Matsumura N, Ohta A, Hisatsune T (2009) Excitatory

- GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Cereb Cortex* 19:2181-2195. Available at: <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn238>.
- Tomassy GS, Berger DR, Chen H-H, Kasthuri N, Hayworth KJ, Vercelli A, Seung HS, Lichtman JW, Arlotta P (2014) Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 344:319-324. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1249766>.
- Tong CK, Fuentealba LC, Shah JK, Lindquist RA, Ihrle RA, Guinto CD, Rodas-Rodriguez JL, Alvarez-Buylla A (2015) A dorsal SHH-dependent domain in the V-SVZ produces large numbers of oligodendroglial lineage cells in the postnatal brain. *Stem Cell Reports* 5:461–470 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.013>.
- Trapp BD, Bernier L, Andrews SB, Colman DR (1988) Cellular and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and its mRNA in the rat central nervous system. *J Neurochem* 51:859–868.
- Trotter J, Karram K, Nishiyama A (2010) NG2 cells: Properties, progeny and origin. *Brain Res Rev* 63:72-82. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.006>.
- Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R, Fancy SPJ (2016) Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* 351:379-384. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aad3839>.
- US National Research Council Committee (2011) *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US). Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>.
- Van den Brink GR, Hardwick JCH, Tytgat GNJ, Brink MA, Ten Kate FJ, Van Deventer SJH, Peppelenbosch MP (2001) Sonic hedgehog regulates gastric gland morphogenesis in man and mouse. *Gastroenterology* 121:317-328. Available at: <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26261>.
- Viganò F, Möbius W, Götz M, Dimou L (2013) Transplantation reveals regional differences in oligodendrocyte differentiation in the adult brain. *Nat Publ Gr* 16:1370–1372 Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3503>.
- Viganò F, Schneider S, Cimino M, Bonfanti E, Gelosa P, Sironi L, Abbracchio MP, Dimou L (2016) GPR17 expressing NG2-Glia: Oligodendrocyte progenitors serving as a reserve pool after injury. *Glia* 64:287-299.
- Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2014) Interleukin-1 $\beta$  induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One* 9:e110024 Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110024>.
- Watanabe M, Toyama Y, Nishiyama A (2002) Differentiation of proliferated NG2-positive glial progenitor cells in a remyelinating lesion. *J Neurosci Res* 69:826–836 Available at:

- <https://doi.org/10.1002/jnr.10338>.
- Wiesel TN, Hubel DH (1963) Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *J Neurophysiol* 26:1003–1017 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14084161>.
- Wojtowicz JM, Kee N (2006) BrdU assay for neurogenesis in rodents. *Nat Protoc* 1:1399–1405 Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.224>.
- Xiao L, Ohayon D, Mckenzie IA, Sinclair-Wilson A, Wright JL, Fudge AD, Emery B, Li H, Richardson WD (2016) Rapid production of new oligodendrocytes is required in the earliest stages of motor-skill learning. *Nat Neurosci* 19:1210-1217. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.4351>.
- Yadavilli S, Hwang EI, Packer RJ, Nazarian J (2016) The role of NG2 proteoglycan in glioma. *Transl Oncol* 9:57–63 Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.12.005>.
- Yang C, Qi Y, Sun Z (2021) The Role of Sonic Hedgehog Pathway in the Development of the Central Nervous System and Aging-Related Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Biosci* 8:1–7.
- Yang H, Feng G-D, Olivera C, Jiao X-Y, Vitale A, Gong J, You S-W (2012) Sonic hedgehog released from scratch-injured astrocytes is a key signal necessary but not sufficient for the astrocyte de-differentiation. *Stem Cell Res* 9:156–166 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2012.06.002>.
- Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB, Dunn SJ, Cossell L, Attwell D, Tohyama K, Richardson WD (2013) Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: Evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77:873–885 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.006>.
- Zangemeister-Wittke U, Simon HU (2001) Apoptosis - Regulation and clinical implications. *Cell Death Differ* 8:537-544. Available at: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400844>.
- Zerlin M, Levison SW, Goldman JE (1995) Early patterns of migration, morphogenesis, and intermediate filament expression of subventricular zone cells in the postnatal rat forebrain. *J Neurosci* 15:7238-7249. Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-11-07238.1995>.
- Zezula J, Casaccia-Bonnel P, Ezhevsky SA, Osterhout DJ, Levine JM, Dowdy SF, Chao M V., Koff A (2001) P21cip1 is required for the differentiation of oligodendrocytes independently of cell cycle withdrawal. *EMBO Rep* 2:27–34 Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/embo-reports/kve008>.
- Zhang S, Zhu X, Gui X, Croteau C, Song L, Xu J, Wang A, Bannerman P, Guo F (2018) Sox2 is essential for oligodendroglial proliferation and differentiation during postnatal brain myelination and CNS remyelination. *J Neurosci* 38:1802–1820 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1291-17.2018>.
- Zhao C, Ma D, Zawadzka M, Fancy SPJ, Elis-Williams L, Bouvier G, Stockley JH, de Castro GM, Wang B, Jacobs S, Casaccia P, Franklin RJM (2015) Sox2 sustains recruitment of



- oligodendrocyte progenitor cells following CNS demyelination and primes them for differentiation during remyelination. *J Neurosci* 35:11482–11499 Available at: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3655-14.2015>.
- Zhao N, Huang W, Cătălin B, Scheller A, Kirchhoff F (2021) L-Type Ca<sup>2+</sup> Channels of NG2 Glia Determine Proliferation and NMDA Receptor-Dependent Plasticity. *Front Cell Dev Biol* 9:759477 Available at: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.759477>.
- Zhou Q, Anderson DJ (2002) The bHLH transcription factors OLIG2 and OLIG1 couple neuronal and glial subtype specification. *Cell* 109:61–73 Available at: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00677-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00677-3).
- Zhu X, Bergles DE, Nishiyama A (2008) NG2 cells generate both oligodendrocytes and gray matter astrocytes. *Development* 135:145–157 Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.004895>.
- Zhu X, Hill RA, Dietrich D, Komitova M, Suzuki R, Nishiyama A (2011) Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development* 138:745-753. Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.047951>.
- Zhu X, Zuo H, Maher BJ, Serwanski DR, Loturco JJ, Lu QR (2012) Olig2-dependent developmental fate switch of NG2 cells. *Development* 139:2299–2309 Available at: <https://doi.org/10.1242/dev.078873>.
- Ziskin JL, Nishiyama A, Rubio M, Fukaya M, Bergles DE (2007) Vesicular release of glutamate from unmyelinated axons in white matter. *Nat Neurosci* 10:321-330. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn1854>.
- Zonouzi M, Renzi M, Farrant M, Cull-Candy SG (2011) Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells. *Nat Neurosci* 14:1430-1438. Available at: <https://doi.org/10.1038/nn.2942>.

## H. 謝辞

本論文は筆者が創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻教授 川井先生には指導教官として本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行にあたって終始、ご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

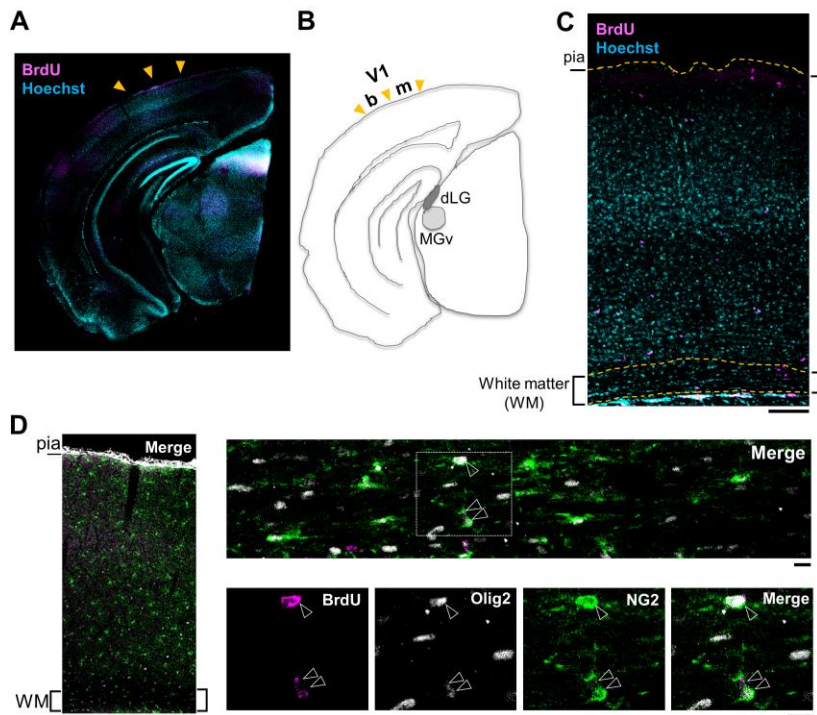
同専攻教授 中嶋先生、並びに、同専攻教授 西原先生には副査としてご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴いた。ここに深謝の意を表す。

本研究の細胞種同定の実験では同専攻元教授 渡邊先生に多数の細胞種特異的抗体を提供して戴いた。ここに深謝の意を表す。

本専攻 川井研究室の各位には研究遂行にあたり日頃より有益なご討論・ご助言を戴いた。ここに感謝の意を表す。

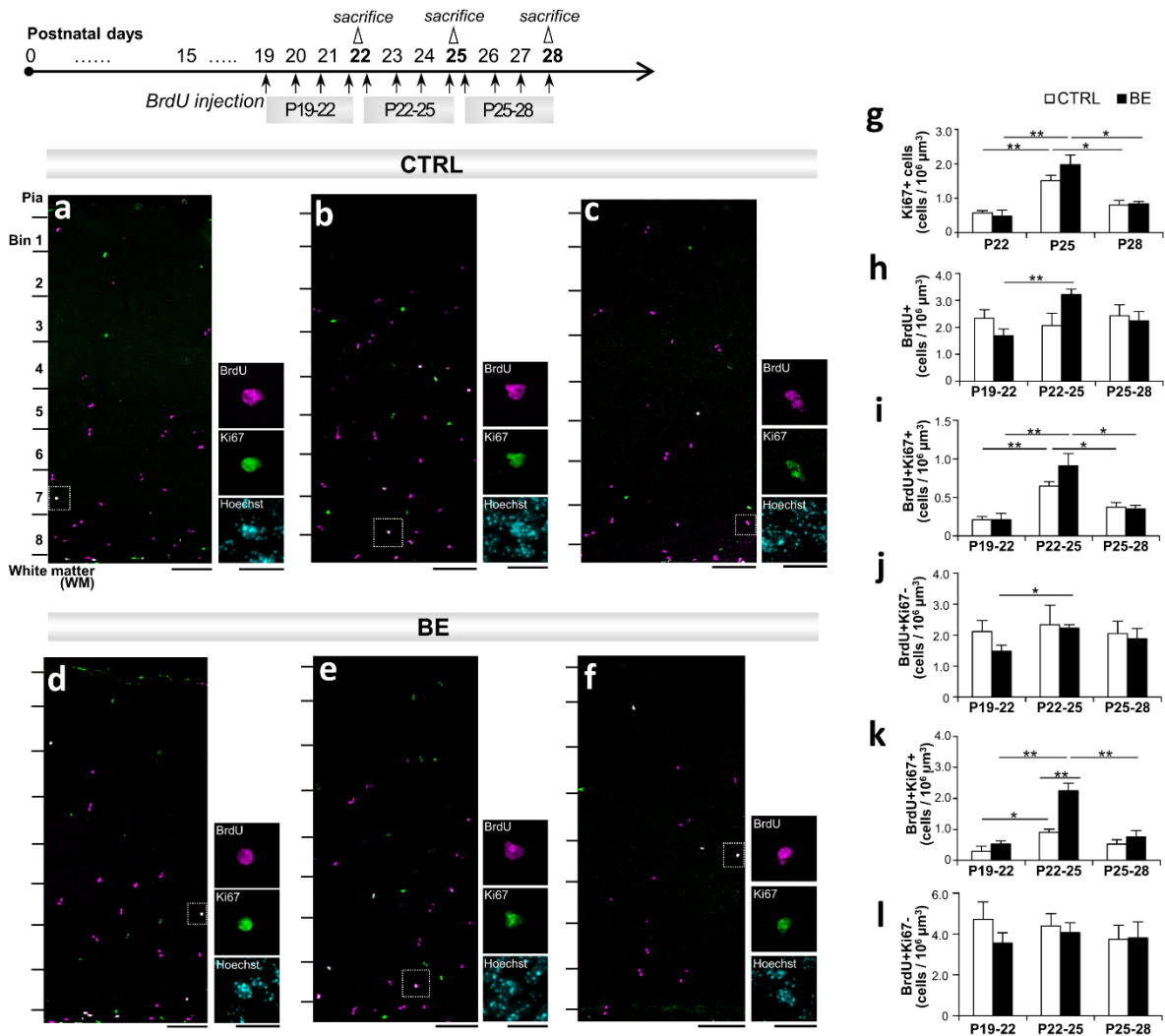
本研究の一部は公益財団法人 日本科学協会笹川科学研究助成(一般科学研究・生物系部門、No. 28-411) によった。

# I. 図



**Figure 1. 解析領域の位置と P25 に BrdU 標識細胞種の同定**

- A.** P25 マウスの冠状脳切片の皮質半球における代表的低倍率画像を示し、Hoechst（シアン色）と BrdU（マゼンタ）で染色されている。黄色い矢じり（arrowhead）は V1 における両眼領域（左）と単眼領域（右）のおおよその境界線を指す。
- B.** 内側膝状体（MGv）の腹側部と外側膝状体（dLG）の腹側部である V1 の両眼領域（b）と単眼領域（m）の位置を示す A の画像の図。
- C.** 細胞密度分析に使用される V1 の両眼領域の拡大画像。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。
- D.** マウス V1 の両眼領域（左）と皮質下白質（White matter, WM）の拡大画像（右上）。BrdU（マゼンタ）、Olig2（灰色）、NG2（緑色）、およびオーバーレイ（マージ）に対して免疫蛍光染色されたボックス領域（右下）の拡大画像。スケールバー：100  $\mu\text{m}$ 。



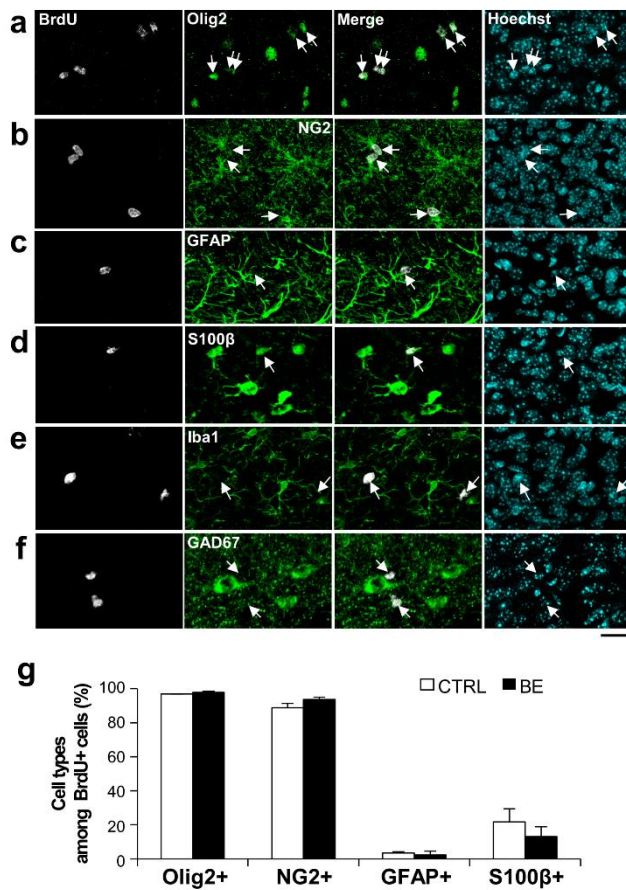
**Figure 2. マウス V1 の生後発達期における増殖細胞の分析また視覚剥奪の影響**

増殖した細胞のラベルのため、実験計画をスキームとして表した。マウスに BrdU を~72 時間、毎日一回腹腔内投与を行い、P22、P25、P28 における増殖細胞を観察した。

**a-f.** 増殖細胞をマーカー Ki67 (緑色) と BrdU (マゼンタ) を免疫蛍光染色手法でラベルし、共焦点レーザー顕微鏡で P22 (a, d)、P25 (b, e)、P28 (c, f) の健常 (CTRL) マウスと BE マウスの V1 を撮影したイメージ。拡大した BrdU+Ki67+ 細胞 (矢印) のイメージは、細胞の核染色である Hoechst (シアン色) 染色と共に右側に表す。スケールバー: 50 μm (左) & 20 μm (右)。

**g-j.** マウス V1 における Ki67+ (g)、BrdU+ (h)、BrdU+Ki67+ (i)、BrdU+Ki67- 細胞 (j) の細胞密度 (N = 4 for P22; N = 10 for P25; N = 4 for P28 per group)。

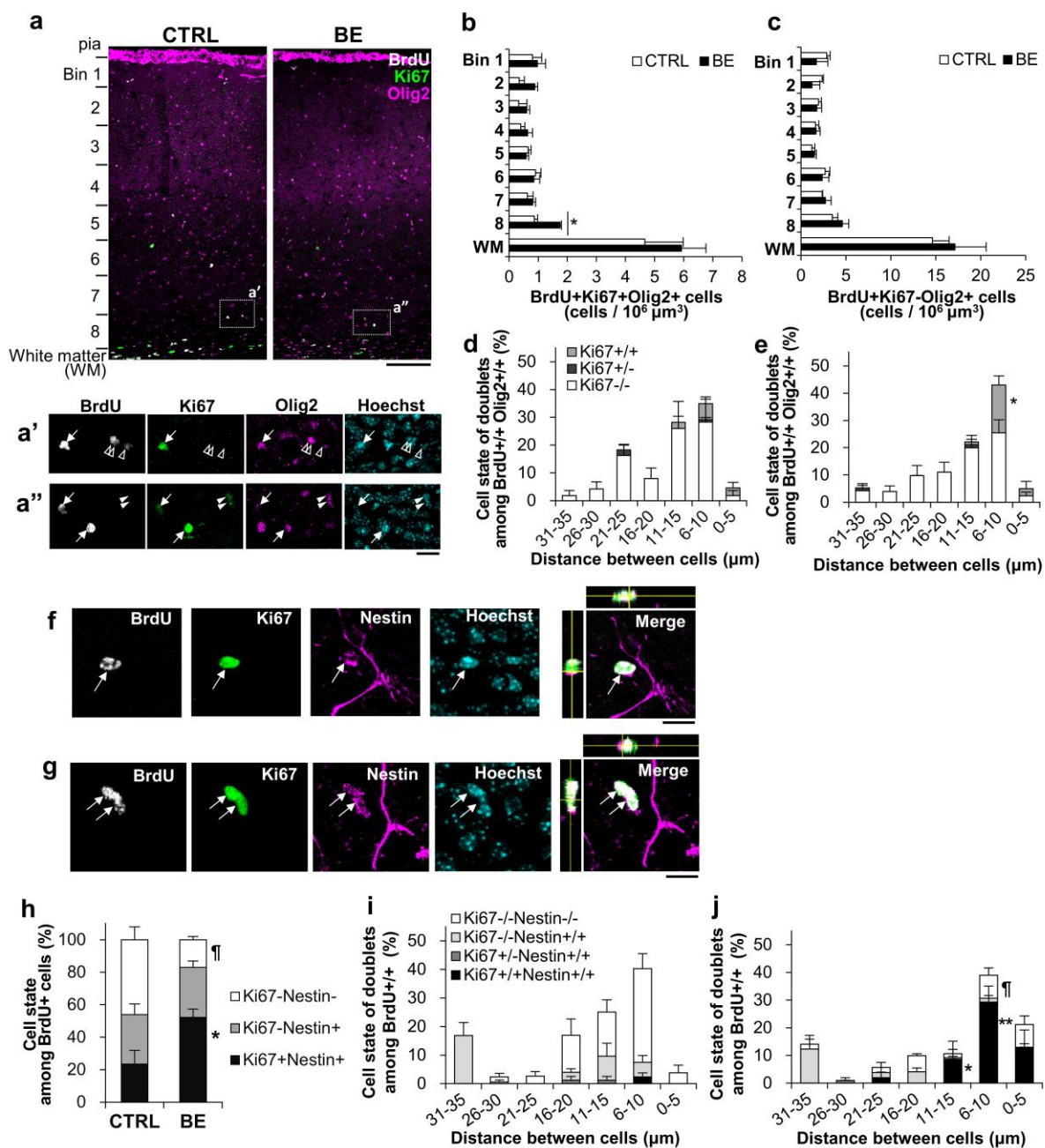
**k-l.** V1 下部の Bin 8 における BrdU+Ki67+ cells (k) and BrdU+Ki67- 細胞 (l) の細胞密度。\*\*\*p < 0.001 one-way ANOVA; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, Tukey-Kramer post hoc tests after two-way ANOVA.



**Figure 3. P25 の BrdU+細胞の細胞種同定**

**a-f.** P25 の V1 下層である Bin 8 にある BrdU+ 細胞 (灰色、矢印)の中、各種細胞種の特異的マーカー、Olig2+ (a)、NG2+ (b)、GFAP+ (c)、S100β+ (d)、Iba1+ (e)、GAD67+ (f) 細胞 (緑色)と共に免疫蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって撮影した画像。スケールバー、20 μm。

**g.** BrdU+細胞の中、Olig2+、NG2+、GFAP+、S100β+細胞の占める割合フラフ(N = 6 for Olig2+; N = 5 for NG2+; N = 3 for GFAP+; N = 5 for S100β+)。Unpaired Student's t-test,  $p > 0.05$ .



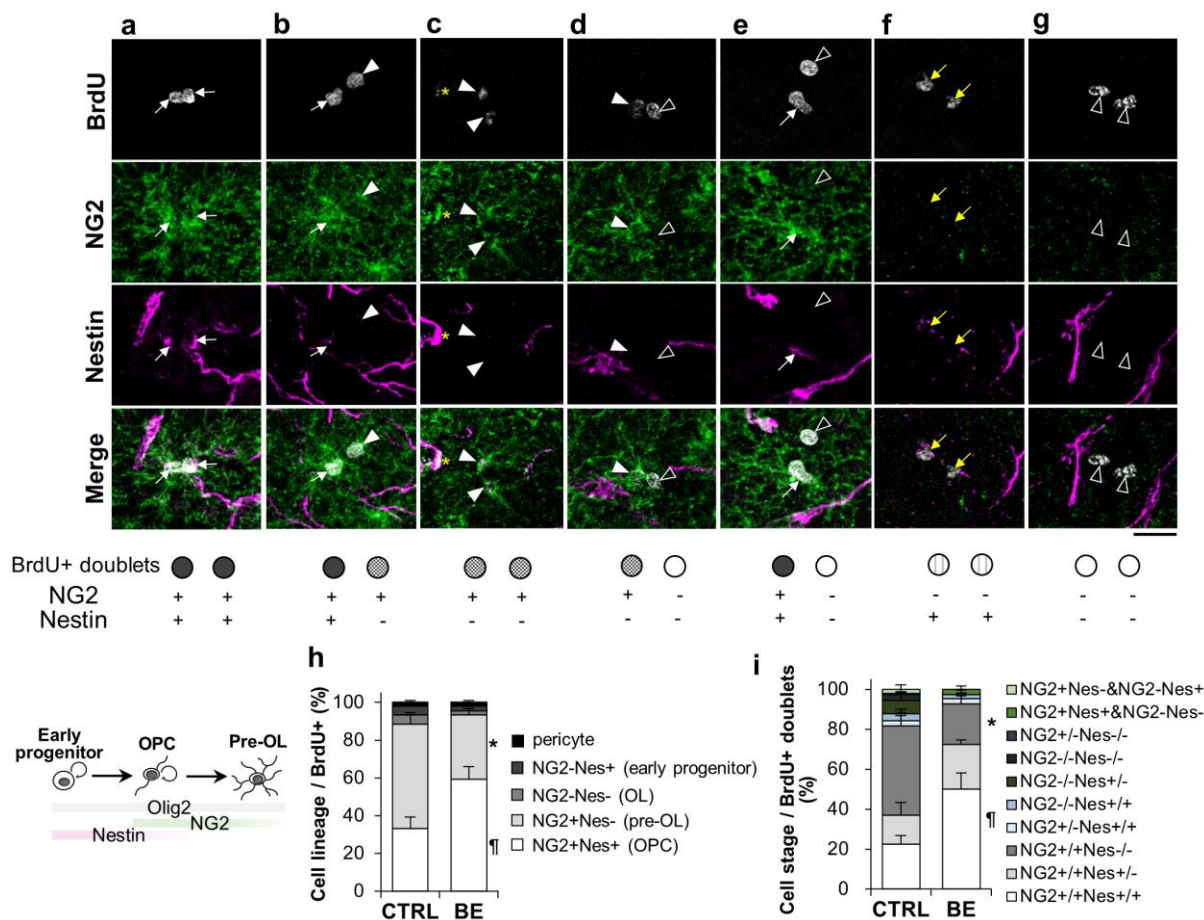
**Figure 4. P25 の増殖細胞の未分化性状態及びその細胞分裂の対称性**

**a-c.** P25 マウスの V1 における BrdU+ (灰色)、Ki67+ (緑色)、Olig2+ (マゼンタ)細胞の各層別解析。画像の中にあるボックスは、下段に BrdU+Ki67+Olig2+細胞(矢印)を拡大して表し(a'&a'')、BrdU+ Ki67- Olig2+細胞(開いた矢印)、および BrdU-Ki67+ Olig2+細胞(閉じた矢印)を示す。スケールバー: 100 μm (a) & 20 μm (a', a'')。V1 の各層における Ki67+増殖状態 (b)と Ki67- (c) OL 系細胞の定量化。N = 5 per group, one-way ANOVA,  $F(1, 8) = 51.91$ ,  $*p = 0.000092$ 。

**d-e.** Ki67 発現有無による bin 8 における BrdU+Olig2+ 娘細胞の増殖性状態の分析。細胞同士の細胞間距離を 5 μm 間隔で細分化し、そして対称的に増殖する細胞

(Ki67+/+), 増殖性と分化性に分かれる非対称性ダブレット(Ki67+/-), 対称的に分化した細胞 (Ki67-/-)を健常マウス(*d*) と盲目マウス (*e*) における比較。one-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test:  $F(1, 8) = 7.94$ ,  $*p = 0.023$ ,  $N = 5$  for each mouse group.

**f-j.** Ki67 (緑色、増殖状態)とNestin (マゼンタ、未分化性)マーカーと共にBrdU+ (灰色)増殖細胞の分化性状態を健常マウス(*f*)と盲目マウス(*g*)のbin 8 における分析。BrdU+細胞の中、Ki67+Nestin+ 細胞を矢印で示す。画像内のホワイトボックスは、x-z軸とy-z軸断面図の其々を上部と左側に示す。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。(*h*) BrdU+細胞の中、Ki67 及びNestinの発現有無による割合。  $N = 5$  for each mouse group, one-way ANOVA, Ki67+Nestin+細胞：  $F(1, 8) = 8.31$ ,  $*p = 0.020$ 、Ki67-Nestin-細胞：  $F(1, 8) = 12.41$ ,  $**p = 0.0078$ 。(*i, j*) BrdU+ダブレットの中、Ki67 及びNestinの発現有無による割合に対して健常マウス(*d*)と盲目マウス(*e*)の比較。  $N = 5$  per group, One-way ANOVA, Ki67-/-Nestin+/-細胞：  $F(1, 8) = 10.27$ ,  $*p = 0.013$ 、Ki67+/-Nestin+/+細胞：  $F(1, 8) = 5.75$ ,  $**p = 0.043$ 。



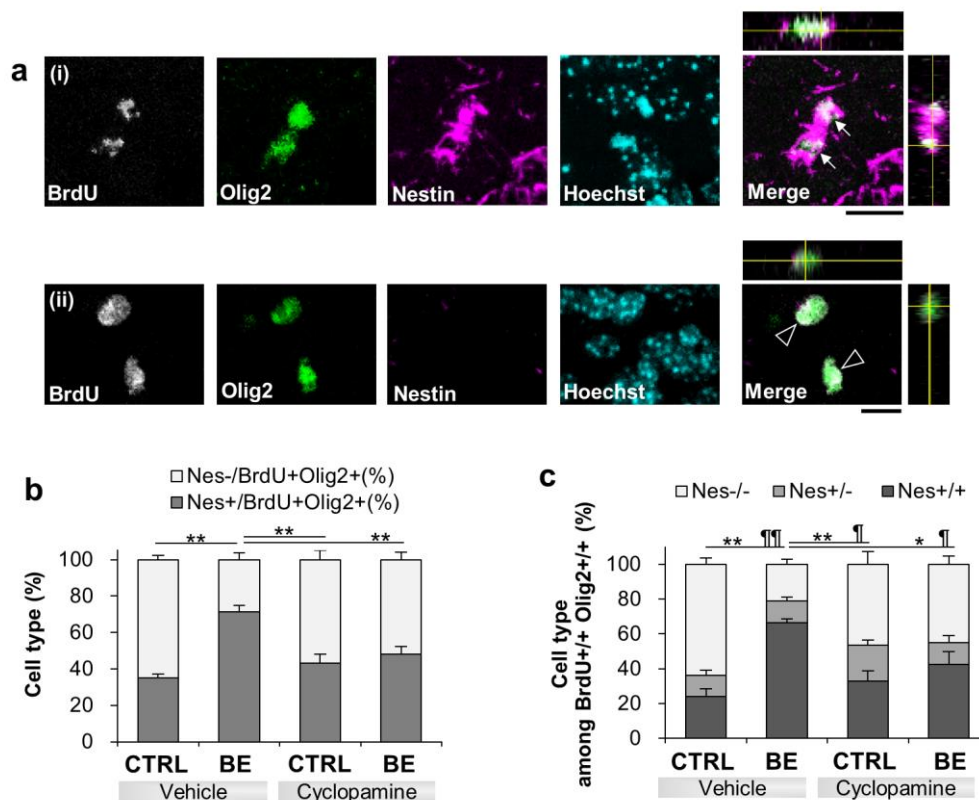
**Figure 5. P25 の増殖細胞における OL 系細胞の発達変遷**

**a-g.** NG2 (緑色)とNestin (Nes、マゼンタ)と共染色を行ったBrdU+ (灰色)娘細胞の共焦点顕微鏡によって取得した画像。BrdU+ダブルットの中の代表的画像: NG2<sup>+/+</sup>Nestin<sup>+/+</sup> (a)、NG2<sup>+/+</sup>Nestin<sup>+/-</sup> (b)、NG2<sup>+/+</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (c)、NG2<sup>+/-</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (d)、NG2<sup>+/+</sup>Nestin<sup>+/+</sup> & NG2<sup>-/-</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (e)、NG2<sup>-/-</sup>Nestin<sup>+/+</sup> (f)、NG2<sup>-/-</sup>Nestin<sup>-/-</sup> (g)。其々の矢印と矢じりは、NG2<sup>+</sup>Nestin<sup>+</sup> (白色矢印)、NG2<sup>+</sup>Nestin<sup>-</sup> (閉じた白色の矢じり)、NG2<sup>-</sup>Nestin<sup>-</sup> (開いた白色の矢じり)、NG2<sup>-</sup>Nestin<sup>+</sup> (黄色の矢印)を示す。黄色い星印は、NG2とNestinによって共染色された周皮細胞(pericyte)を示す。スケールバー: 20 μm。概略図は左側に示し、OL系細胞の発達中に現れる可能な発現パターンに基づく推定的細胞種の定義を表す。

**h.** V1 下層のBin 8 におけるBrdU+細胞の中、NG2 やNestinの発現有無による割合フラフ。染色パターンによる推定的細胞種を括弧内に表示し、又健常マウスと盲目マウスにおける比較。One-way ANOVA,  $F(1, 8) = 7.89$ ,  $*p = 0.023$ ,  $F(1, 8) = 7.49$ ,  $\uparrow p = 0.026$ 。

**i.** BrdU+娘細胞のダブルット割合分析。健常 vs 盲目マウス:  $N = 5$  per group, One-way ANOVA,  $F(1, 8) = 8.28$ ,  $*p = 0.021$ ,  $F(1, 8) = 9.28$ ,  $\uparrow p = 0.016$ 。

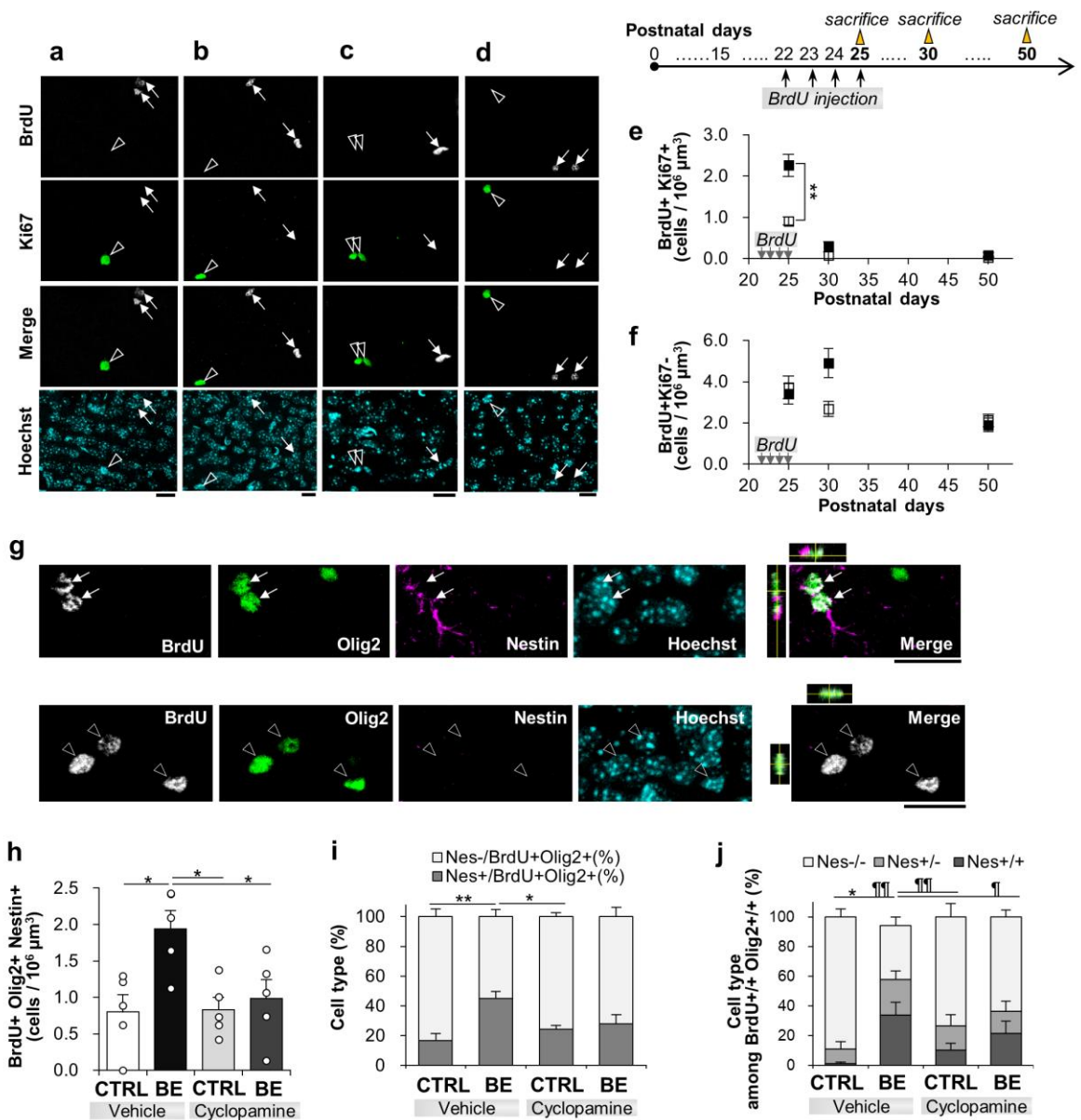




**Figure 6.** V1 下層において、視覚剥奪による P25 の OPC 未分化性維持と Shh シグナルの役割

Shh シグナル経路の Smoothened (Smo)受容体に結合してシグナル活性を抑制する Cyclophamide(25 mg/kg/day)を P22~25 に毎日一回腹腔注入をし、P25 のマウスを用いて細胞の未分化性の変化を観察した。

**a-d.** vehicle 投与マウスにおいて、BrdU (灰色)、Olig2 (緑色)、Nestin (Nes、マゼンタ)、Hoechst (シアン色)による免疫蛍光共同染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡によって取得した画像。上段右側のマージされた画像は、分かりやすくするためにHoechstを省略した。マージされた画像の x-z 軸および y-z 軸の断面図は、それぞれ画像の上部と右側に表す。白い矢印 (ai) と開いた矢印 (aii) は、それぞれ BrdU + Olig2 + Nestin + および BrdU + Olig2 + Nestin-細胞を示す。スケールバー：50 $\mu$ m。 (b,c) vehicle か Cyclophamide を投与した健常・盲目マウスの 4 条件における BrdU + Olig2 + 細胞 (b) およびダブレット細胞 (c) の中、Nestin を発現する細胞の割合分析。Nestin+ か Nestin+/+細胞：\*p < 0.05; \*\*p < 0.01、¶p < 0.05; Nestin-/-細胞：¶¶p < 0.01、two-way ANOVA and Tukey-Kramer post hoc test, N = 5 per condition。



**Figure 7. P22-25に増殖したOPCの経時的変化**

**a-d.** 健常マウス(a, c)と盲目マウス(b, d)におけるP30 (a, b)やP50 (c, d)時に、Bin 8におけるBrdU+ (灰色)、Ki67+ (緑色)、Hoechst (シアン色)に対して免疫蛍光染色された画像。マージされた画像は、明確にするためにヘキストを省略した。スケールバー：10μm。右側のスキームは、マウスにBrdUをP22~25に~72時間 (矢印)、毎日一回注入し、P25、P30、P50 (三角形) における増殖細胞の経時的な分化状態の変化を観察する実験手法を示す。

**e.f.** BrdU+Ki67+ (e)と BrdU+Ki67- 細胞(f)の定量化した細胞密度のグラフ。

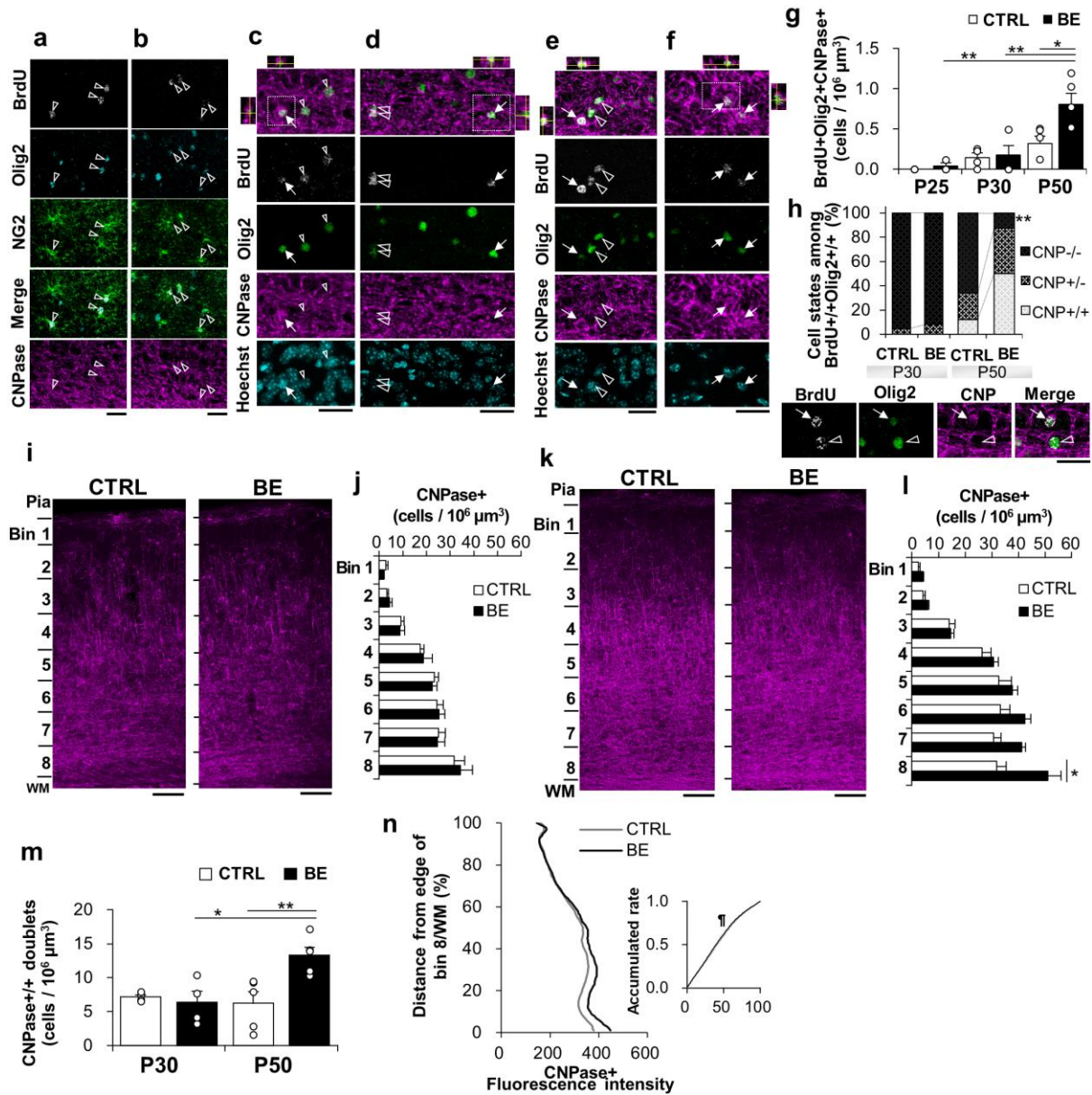
\*\*p < 0.01, Tukey-Kramer post hoc tests following two-way ANOVA, N = 10 for P25, N = 4 for P30, N = 5 for P50.

**g.** P30 のマウスにおいて、BrdU (灰色)、Olig2 (緑色)、Nestin (マゼンタ)、Hoechst (シアン色) で共染色された共焦点画像。マージされた画像は、明確にする

ためにヘキストを省略した。白色の矢印と開いた矢じりは、それぞれ BrdU+ Olig2+ Nestin+と BrdU+ Olig2+ Nestin-細胞を示す。白いボックスにおける x-z 軸と y-z 軸の断面図は、其々ボックスの上部と右側に表す。スケールバー：20 $\mu$ m。

**h.** 異なる4条件における BrdU+ Olig2+ Nestin+細胞を定量化した細胞密度グラフ。

**i, j.** 上記の4条件のBrdU+ Olig2+細胞 (*i*) とダブレット細胞 (*j*) においてNestinを発現する細胞の割合グラフ。Nestin+ or Nestin+/+細胞：\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 、Nestin-/-細胞：¶ $p < 0.05$ , ¶¶ $p < 0.01$ 、two-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc test, N = 5 per condition。



**Figure 8. V1下層におけるP22~25に増殖したOPCの成熟**

**a, b.** 健常(a)と盲目(b)マウスにおける P25 の BrdU (灰色)、Olig2 (シアン色)、NG2 (緑色)、CNPase (マゼンタ)、Hoechst (シアン色)の免疫蛍光染色の共焦点画像。BrdU+細胞の殆んどは、Olig2+NG2+CNPase- 細胞であった。但し、マージされた画像は明確にするために CNPase が省略されている。矢じりは BrdU+Olig2+NG2+CNPase- 細胞を示す。スケールバー：20 $\mu$ m。

**c-f.** P30 (c, d)と P50(e, f)の健常マウス(c, e)と盲目マウス(d, f)において、V1 の Bin 8 における BrdU (灰色)、Olig2 (g 緑色)、CNPase (マゼンタ)、Hoechst (シアン色)を共染色した共焦点画像。但し、マージされた画像は明確にするために Hoechst が省略されている。矢印と開いた矢じりは、其々成熟オリゴデンドロサイト(BrdU+Olig2+CNPase+)と、OPC 或いは pre-OL(BrdU+Olig2+CNPase-)を示す。白色ボックスの x-z 軸(上部)と y-z 軸(左側/右側)の断面図を表示。スケールバー：20  $\mu$ m。

**g.** P25、P30、P50 における成熟オリゴデンドロサイト (BrdU+Olig2+CNPase+)の細胞密度グラフ。

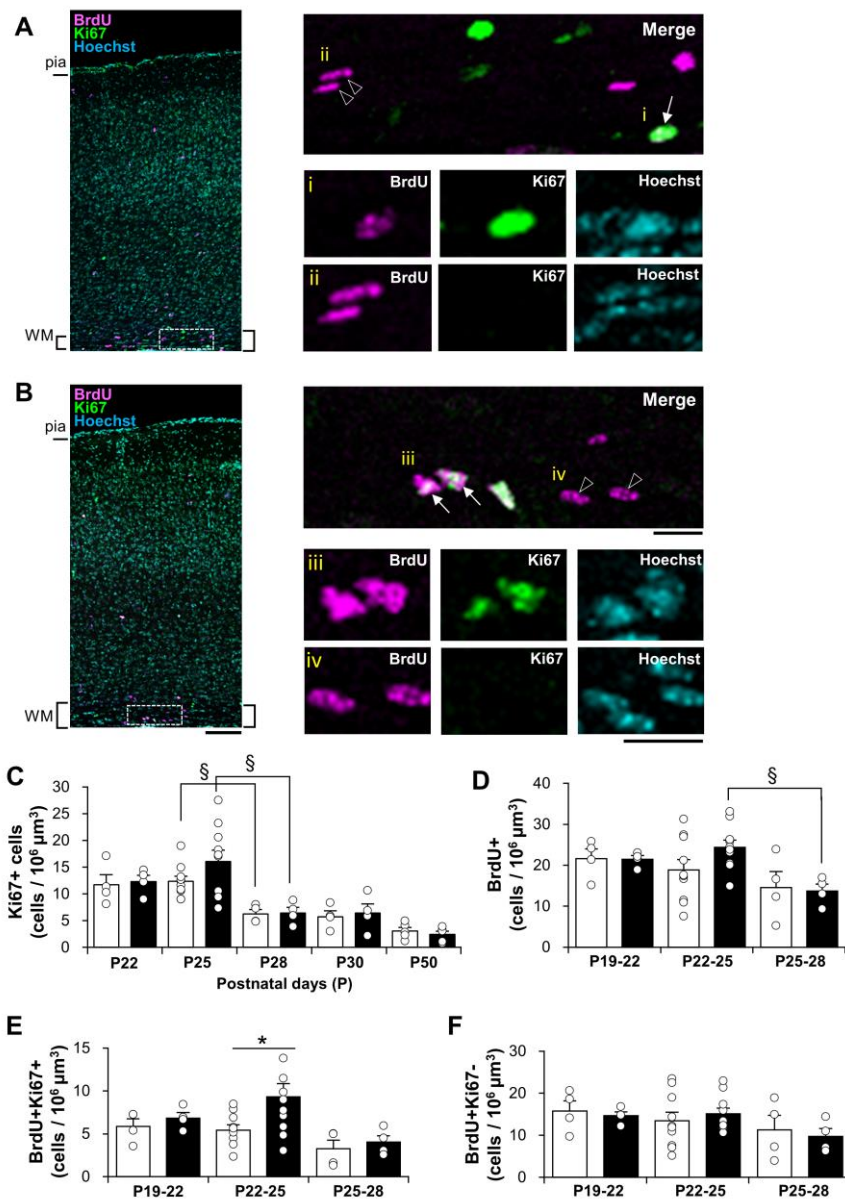
**h.** P30 と P50 における BrdU+Olig2+ダブレット細胞中、CNPase 発現有無の割合グラフ。

**i-l.** P30 (*i*)と P50 (*k*)の V1 における CNPase (マゼンタ)の発現画像。スケールバー : 100  $\mu$ m。P30(*j*)およびP50(*l*)における V1 全体の CNPase 発現細胞の各層別分析。\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA。

(*m*) P30 と P50 における CNPase+/+ダブレットの細胞密度。

(*g*)、(*h*)、(*m*) : \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , two-way ANOVA with Tukey-Kramer post hoc tests, N = 3 for P25; N = 4 for P30; N = 5 for P50.

(*n*) P50 における V1 の CNPase+蛍光強度。挿入グラフ : コルモゴロフ-スミルノフ検定 (Kolmogorov-Smirnov test) を使用した累積分布分析は、盲目マウスでより強い CNPase 発現を示す。¶  $p = 0.00003$  (D-stat = 0.020, D-crit = 0.011)。

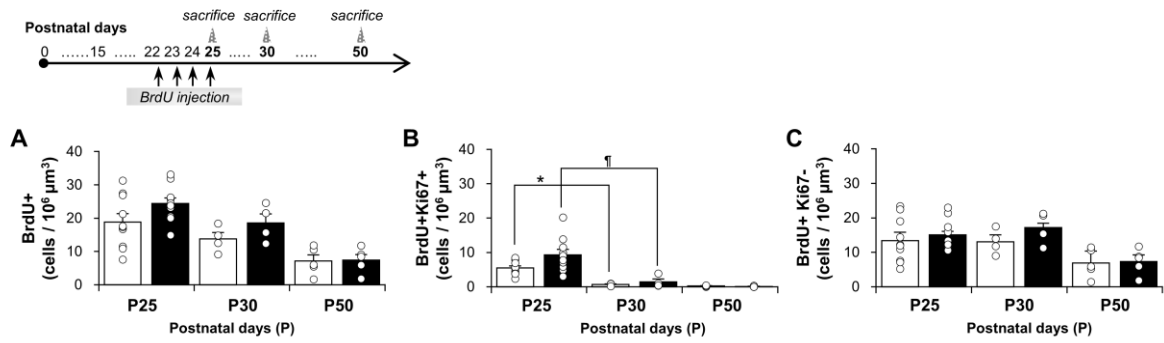


**Figure 9.** 生後4週目のマウスにおける皮質下白質の増殖細胞の増殖能。

**A, B.** P25の健常(CTRL)マウス(A)および盲目(BE)マウス(B)のV1b(左)および白質(右)においてBrdU(マゼンタ)、Ki67(緑色)、およびHoechst(シアン色)による免疫蛍光染色の共焦点画像。BrdU+Ki67+細胞(矢印)およびBrdU+Ki67-細胞(矢じり)は、下の拡大画像(i~iv)に示されている。スケールバー: 100 μm(左)、50 μm(右上)、および20 μm(右下)。

**C.** 健常(□)および盲目マウス(■)のKi67+細胞密度の経時変化。

**D-F.** P19(P19~22)、P22(P22~25)およびP25(P25~28)の各時期にBrdU注入後、P22、P25、およびP28で其々検出されたBrdU+(D)、BrdU+Ki67+(E)、およびBrdU+Ki67-(F)細胞の細胞密度。健常(□)マウスと盲目(■)マウスにおいて、P19-22はN=4、P22-25はN=10、P25-28はN=4。§p<0.05, one-way ANOVA, Tukey-Kramer test. \*p<0.05, unpaired Student's t-test。

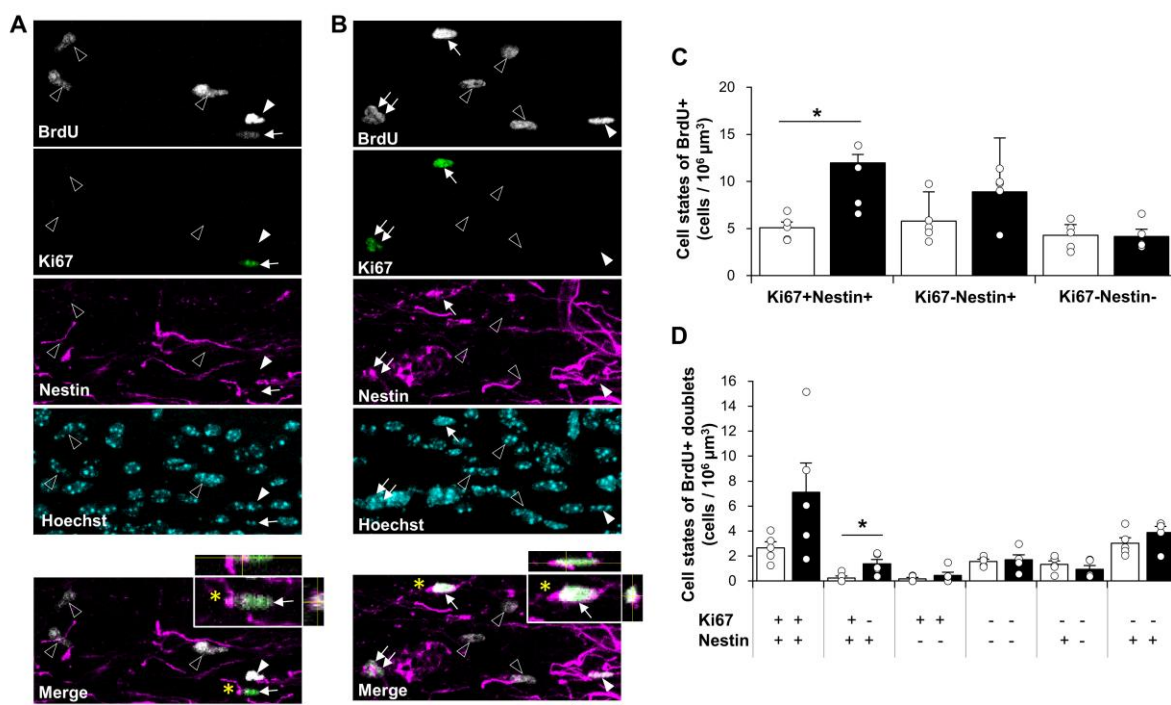


**Figure 10. マウス V1 下 WM の P22~25 増殖 OPC の増殖能と経時的変化**

経時的実験手法の模式図（左上）。

**A-C.** P22~P25 までの BrdU 注射後、P25、P30、P50 における BrdU + (A)、BrdU + Ki67 + (B)、BrdU + Ki67- (C) 細胞の細胞密度。健常 (□) および盲目 (■) マウスの場合、P25 は N = 5、P30 は N = 4、P50 は N = 5。

One-way ANOVA, \*F(2, 16) = 28.78, p = 0.00012, †F(2, 16) = 12.37, p = 0.0077。



**Figure 11. マウス V1 下 WM の P22~25 増殖 OPC の分化状態**

**A, B.** 健常 (A) および視覚剥奪 (B) マウスの V1 の白質における P22~25 BrdU+細胞と Ki67 および Nestin 染色を示す代表的な共焦点画像。BrdU+細胞中、Ki67+Nestin+ (矢印)、Ki67-Nestin+ (閉じた矢印)、および Ki67-Nestin- (開いた矢印) 細胞。BrdU+ Ki67+ Nestin+細胞 (アスタリスク) は、x-z 軸と y-z 軸の断面図を拡大して表示。スケールバー: 50 μm。

**C.** Ki67 および/または Nestin を発現する BrdU+細胞の細胞密度。

\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey-Kramer test。健常 (□) と盲目 (■) マウスの両方で  $N = 5$ 。

**D.** Ki67 および/または Nestin 発現に関する BrdU+細胞のダブルット分析。

\* $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey-Kramer test。



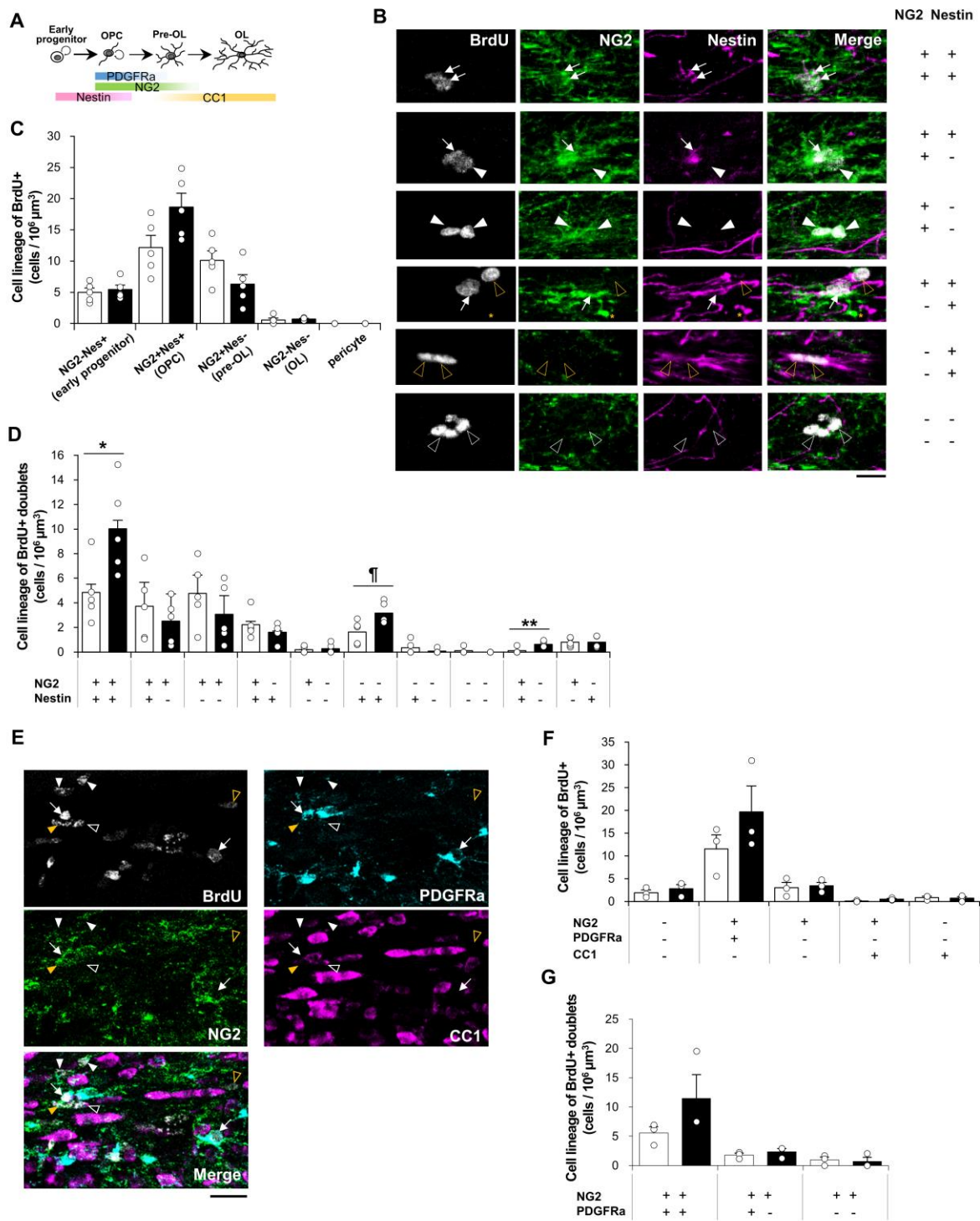


Figure 12. マウス V1 下 WM の P22~25 増殖細胞の発達進行

A. OL 系細胞における発達進行と、各細胞種における Nestin、PDGFR $\alpha$ 、NG2、CC1 の発現を示す模式図。

B. NG2 (緑色) および Nestin (マゼンタ) で染色された BrdU+ (灰色) 娘細胞の代表的な共焦点画像。右側は、ダブルットにおける NG2 と Nestin 発現を示している。

NG2+ Nestin+ (白色矢印)、NG2+ Nestin- (閉じた白色矢印)、NG2-Nestin+ (開いた黄色の矢印)、および NG2-Nestin- (開いた白色矢印)。スケールバー：20  $\mu\text{m}$ 。

**C.** BrdU+細胞の細胞密度。

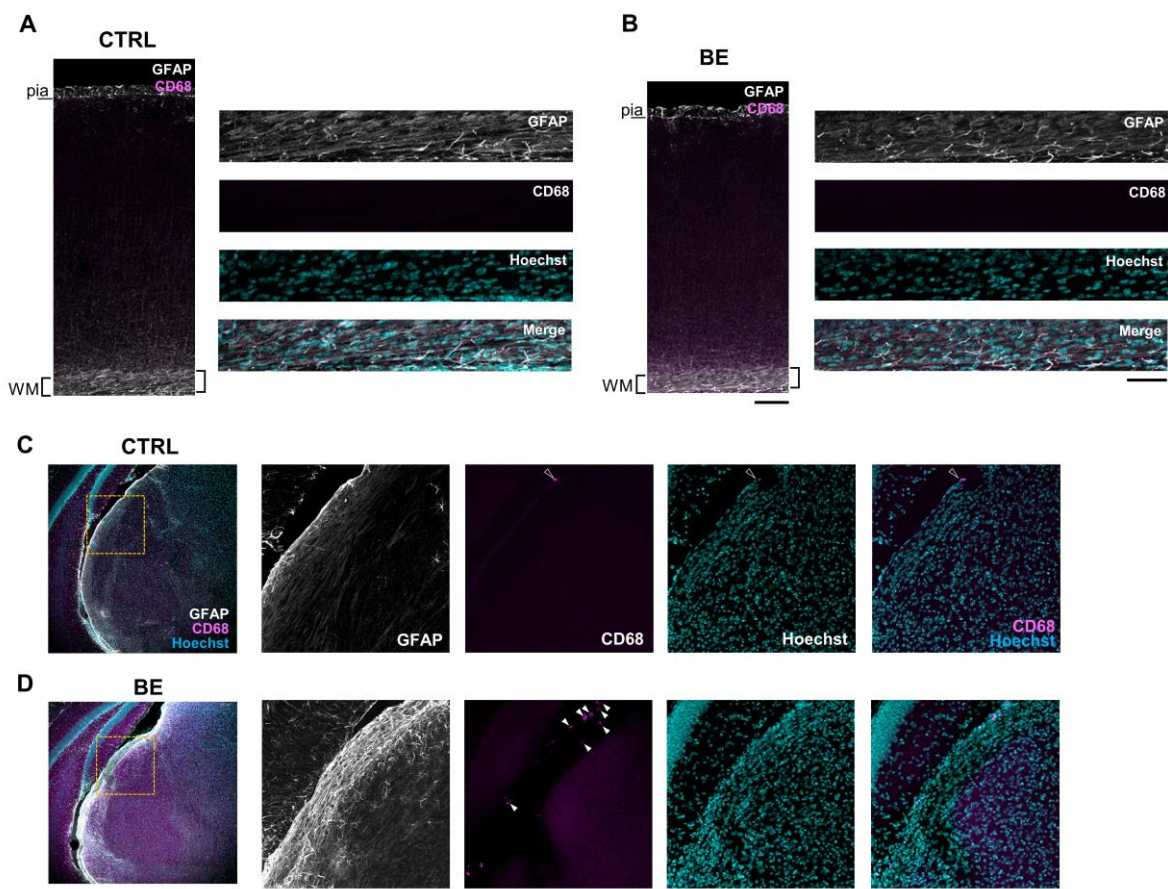
**D.** BrdU+ダブレットの細胞密度。

One-way ANOVA ; NG2+/+Nestin+/+ : \*F(1, 8) = 6.82, p = 0.031、NG2-/-Nestin+/+ :  $\nabla$ F(1, 8) = 7.19, p = 0.028、NG2+Nestin+&NG2-Nestin- : \*\*F(1, 8) = 8.93, p = 0.017。

**E.** BrdU (灰色)、PDGFR $\alpha$  (シアン色)、NG2 (緑色)、CC1 (マゼンタ)、およびオーバーレイ (マージ) 染色の共焦点画像。BrdU +細胞中、PDGFR $\alpha$ -NG2-CC1- (開いた黄色矢じり、早期前駆細胞)、PDGFR $\alpha$ + NG2+ CC1- (白色矢印、OPC)、PDGFR $\alpha$ -NG2+ CC1- (閉じた白色矢じり、Pre-OL 前半)、PDGFR $\alpha$ -NG2+ CC1+ (閉じた黄色矢印、Pre-OL 後半)、PDGFR $\alpha$ -NG2-CC1+ (開いた白色矢印、OL)。

**F.** P25 に PDGFR $\alpha$ 、NG2 および/または CC1 発現を伴う BrdU +細胞種の細胞密度分析。

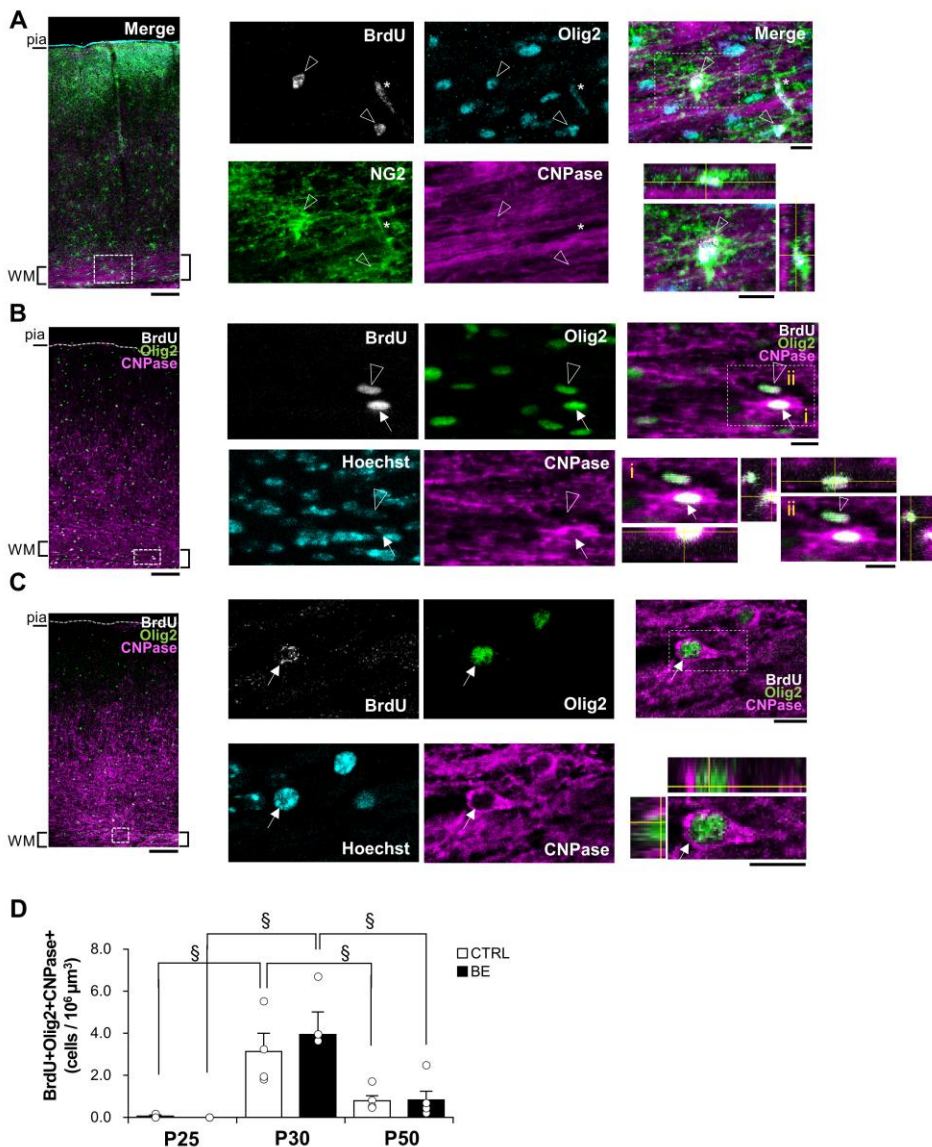
**G.** P25 に PDGFR $\alpha$  および/または NG2 発現を伴う BrdU +細胞種のダブレット分析。



**Figure 13.** P25のV1と視床における神経膠症

**A,B.** 健常 (CTRL、*A*) または視覚剥奪マウス (BE、*B*) において、V1b (左) や皮質下 WM (右) における GFAP (灰色)、CD68 (マゼンタ)、Hoechst (シアン色)、及びオーバーレイ染色 (マージ) の代表的な共焦点画像。スケールバー：100  $\mu\text{m}$  (左)、50  $\mu\text{m}$  (右)。

**C,D.** 健常 (CTRL、*C*) および視覚剥奪 (*D*) マウスの MGv や dLG を含む視床における GFAP (灰色)、CD68 (マゼンタ)、Hoechst (シアン色) 及びオーバーレイ染色 (マージ) の代表的な画像。ボックス領域は dLG が拡大された (右の 4 つの画像)。CD68 と Hoechst の画像を統合して、食細胞ミクログリア (閉じた白色矢じり) を特定した。健常マウスの非特異的な汚れ (開いた白色矢じり)。スケールバー：100  $\mu\text{m}$  (左)、50  $\mu\text{m}$  (右)。



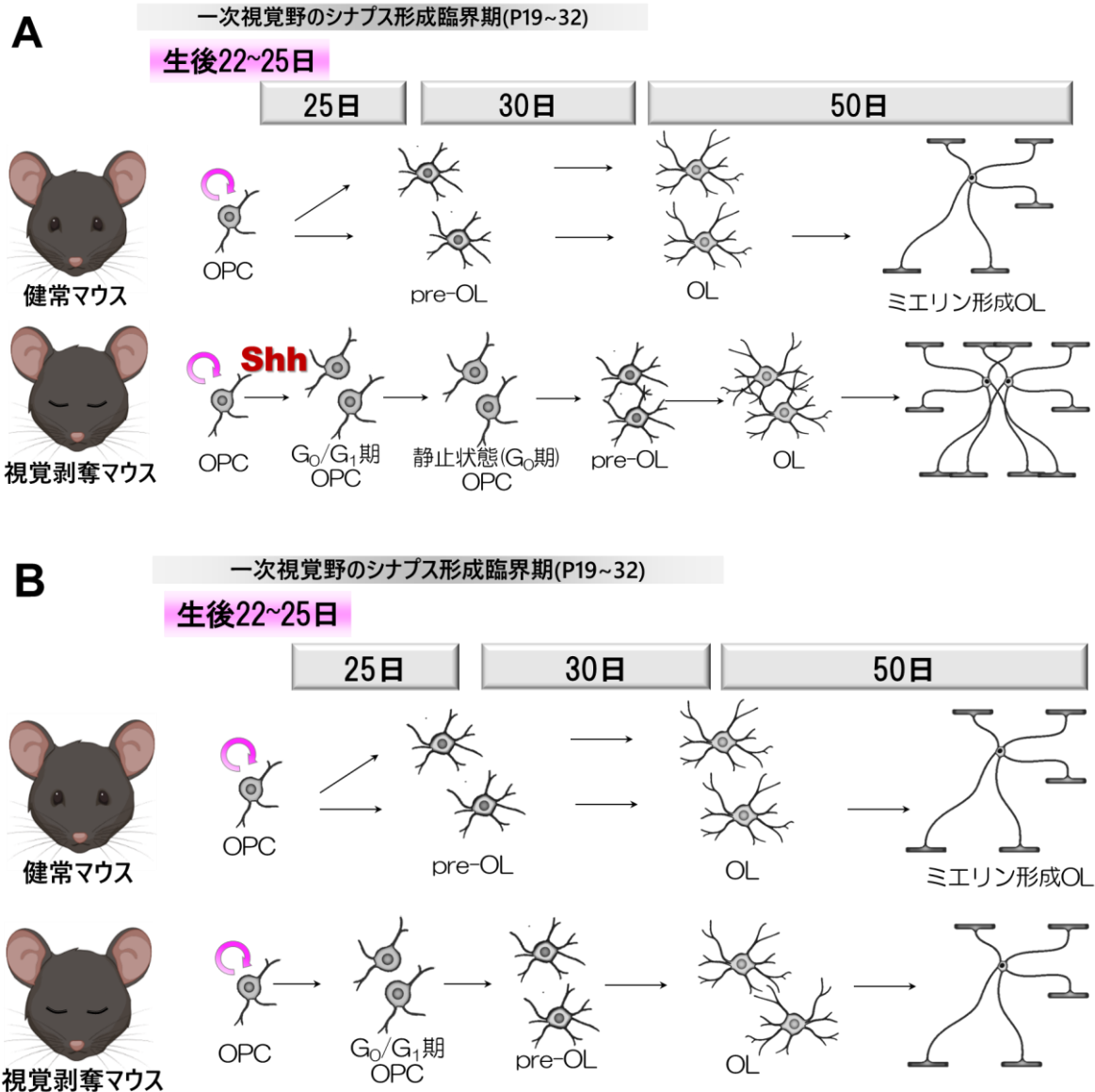
**Figure 14. V1下WMにおけるP22-25増殖OPCの成熟に対する経時的変化**

**A.** P25のV1b (左) とWMにおけるBrdU (灰色)、Olig2 (シアン色)、NG2 (緑色)、CNPase (マゼンタ) およびオーバーレイ (マージ) の代表的な画像。ボックス領域は、NG2がOlig2を取り囲んでいる事を示すために拡大したが、CNPaseは細胞質では発現されていない。開いた白色矢じりは、BrdU+ Olig2+ NG2+ CNPase-細胞を示す。白いボックスの画像のx-z軸およびy-z軸の断面図は、それぞれ拡大画像の上部と右側に表示。スケールバー：10 μm。

**B,C.** P30 (B) およびP50 (C) のV1b (左) やWM (右) における代表的な画像。BrdU (灰色)、Olig2 (緑色)、CNPase (マゼンタ)、Hoechst (シアン)。BrdU+ Olig2+ CNPase+細胞 (矢印) とBrdU+ Olig2+ CNPase-細胞 (開いた白色矢じり) を拡大した。スケールバー：10 μm。

**D.** 健常 (□) および視覚剥奪 (■) マウスにおけるP25、P30、P50の成熟OLの細胞密度。P25はN=3、P30はN=4、P50はN=5。

§  $p < 0.05$ , one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-hoc tests.



**Figure 15. 本研究結果のまとめ**

**A.** 灰白質 (Bin 8) 結果のまとめの模式図。P22~25 に BrdU を注入し、BrdU 標識細胞を P25、P30、P50 で V1 の Bin 8 において調べた。健常マウス(CTRL)における BrdU+OL 系細胞の経時的発達と、視覚剥奪(BE)による影響を検討した。

**B.** 白質結果のまとめの模式図。P22~25 に BrdU で標識され細胞を V1 皮質下白質において、P25、P30、P50 の時期で調べた。健常マウス(CTRL)における BrdU+OL 系細胞の経時的発達と、視覚剥奪(BE)による影響を検討した。

## J. 表

Table 1. 免疫蛍光染色に用いた一次・二次抗体のリスト

RESOURCES		SOURCE		IDENTIFIER
Antigen	Species	Dilution, 1:		
BrdU [BU1/75(ICR1)]	Rat	500	GeneTex	Cat# GTX26326, RRID:AB_1081056
BrdU [BU1/75(ICR1)]	Rat	500	Abcam	Cat# ab6326, RRID:AB_305426
Ki67	Rabbit	1000	Leica Microsystems	Cat# NCL-Ki67p, RRID:AB_44210
Ki67	Mouse	2000	BD Biosciences	Cat# 556003, RRID:AB_396287
Nestin (Clone rat-401)	Mouse	200	Millipore	Cat# MAB353, RRID:AB_94911
Nestin (Clone rat-401)	Mouse	200	DSHB	Cat# Rat-401, RRID:AB_2235915
PDGFR $\alpha$	Goat	200	R&D Systems	Cat# AF1062, RRID:AB_2236897
NG2	Rabbit	400	Millipore	Cat# AB5320, RRID:AB_91789
Olig2	Rabbit	1000	Millipore	Cat# AB15328, RRID:AB_2299035
OLIG2 (C-17)	Goat	50	Santa Cruz Biotechnology	Cat# sc-19969, RRID:AB_2236477
APC (clone CC1-1)	Mouse	400	Millipore	Cat# OP80, RRID:AB_2057371
CNPase (clone 11-5B)	Mouse	400	Millipore	Cat# MAB326, RRID:AB_2082608
Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Rabbit	400	Millipore	Cat# AB5804, RRID:AB_2109645
S100 $\beta$	Mouse	1000	Sigma-Aldrich	Cat# S2532, RRID:AB_477499
Iba1	Rabbit	500	Wako	Cat# 019-19741, RRID:AB_839504
GAD67	Mouse	1000	Millipore	Cat# MAB5406, RRID:AB_2278725
Neuronal nuclear antigen (NeuN)	Mouse	1000	Millipore	Cat# MAB377, RRID:AB_2298772
Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Rabbit	500	Cell Signaling Technology	Cat# 9661, RRID:AB_2341188
CD68 (clone ED-1)	Mouse	100	Millipore	Cat# MAB1435, RRID:AB_177576
Acetyl-Histone H3 (AcH3)	Rabbit	500	Millipore	Cat# 06-599, RRID:AB_211528
p15 INK4b	Rabbit	2000	Abcam	Cat# ab53034, RRID:AB_2078578
Sonic hedgehog (Shh)	Mouse	200	DSHB	DSHB Cat# 5E1, RRID:AB_528466

	<b>target antigen</b>	<b>Dilution, 1:</b>		
DyLight™ 405 AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Rat IgG (H+L)	500	Jackson Immunoresearch	Cat# 112-475-167, RRID:AB_2338314
AMCA-AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L) antibody	Rat IgG (H+L)	500	Jackson Immunoresearch	Cat# 112-155-003, RRID:AB_2338221
Alexa Fluor 488-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)	Rabbit IgG (H+L)	500	Jackson Immunoresearch	Cat# 111-545-144, RRID:AB_2338052
Cy3-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)	Mouse IgG (H+L)	500	Jackson Immunoresearch	Cat# 115-165-166, RRID:AB_2338692
Alexa Fluor 647-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG, Fc Fragment Specific	Goat IgG Fc	500	Jackson Immunoresearch	Cat# 115-605-071, RRID:AB_2338909
Alexa Fluor 633 Goat anti-Rat IgG (H+L)	Rat IgG (H+L)	500	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-21094, RRID:AB_2535749
Alexa555 Donkey Anti-Goat IgG(H+L)	Goat IgG (H+L)	500	Abcam	Cat# ab150130, RRID:AB_2715537