

氏 名 成瀬 雅衣

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 967 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Regulation of oligodendrogenesis in the developing  
forebrain

論文審査委員	主 査 教授	井本 敬二
	教授	池中 一裕
	助教授	窪田 芳之
	教授	和中 明生(奈良県立医科大学)

## 論文内容の要旨

### Reguration of oligodendrogenesis in the developing forebrain

The mammalian brain is composed of neurons, astrocytes and oligodendrocytes, which are generated from self-renewing neural stem cells under the regulation of a variety of extrinsic signals. Neural stem cells give rise first to a variety of neurons and then switch to produce astrocytes and oligodendrocytes. Several extrinsic factors are known to regulate glial induction, differentiation, and maturation from neural stem/progenitor cells, for example, bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), fibroblast growth factor 2 (FGF2), and Sonic hedgehog (Shh). In this study, she tried to clarify these two questions concerning the regulation of oligodendrocyte generation, differentiation, and maturation. In the first part of this study, she answered the first question; whether or not cystatin C regulates oligodendrocytic differentiation in addition to astrocytic differentiation during gliogenesis in embryonic stage of the brain. In the latter part of her study, she investigated why the embryonic dorsal neural stem/progenitor cells do not generate oligodendrocyte progenitors *in vivo*.

Cystatin C, an endogenous cysteine protease inhibitor, was originally identified as a factor promoting astrocyte development their laboratory, and it was also reported that cystatin C has a role in regulating the proliferation of adult neural stem cells as a cofactor of FGF-2. Given cystatin C promotes neural stem cells proliferation and induces the differentiation towards astrocytes, it may also affect the induction, proliferation or maturation of oligodendrocytes. She hypothesizes that cystatin C regulates oligodendrocyte differentiation in early embryonic stage, when glial induction and fate determination occur. To examine this hypothesis, she used dissociation cell culture and neurosphere culture of E14.5 mouse ganglionic eminence. Treatment with an anti-cystatin C neutralizing antibody into dissociation cell culture increased the number of PDGFR $\alpha$  oligodendrocyte progenitors and O4<sup>+</sup> oligodendrocyte, and in contrast, addition of exogenous cystatin C suppressed O4<sup>+</sup> oligodendrocytes differentiation from neurospheres derived from embryonic neural stem cells. These results suggested that cystatin C suppressed the differentiation of oligodendrocyte progenitors.

During embryonic development, oligodendrocyte progenitors appear from the ventral part of the spinal cord and forebrain under the regulation of Shh and migrated tangentially into the dorsal part. Nkx2.1 is an upstream factor that plays a critical role in the induction of Shh, especially in the forebrain. Nkx2.1-deficient mouse, in which telencephalic expression of Shh is selectively lost, demonstrates that early oligodendrocyte progenitors are lost *in vivo*. However, oligodendrocyte progenitors were generated *in vitro* culture from Nkx2.1-deficient mouse ventral forebrain, suggesting that an alternative pathway for oligodendrocyte progenitor generation may exist. Indeed, *in vitro* treatment of dorsal neuroepithelial cells with FGF-2 resulted in the oligodendrocyte progenitors. To investigate whether or not dorsal induction of oligodendrocyte progenitors occurs *in vivo* by FGF-2, she used *in utero* microinjection technique and injected FGF-2 into the lateral ventricles of mouse fetal forebrain. A single injection of FGF-2 at E13.5 resulted in the generation of Olig2<sup>+</sup> or

*PDGFR* $\alpha$  oligodendrocyte progenitors in the dorsal ventricular zone at E15.5, and the oligodendrocyte progenitors, which were generated from dorsal ventricular zone, matured into O4<sup>+</sup> early oligodendrocytes *in vitro*. These findings suggest that embryonic dorsal neural stem/precursor cells can generate oligodendrocyte progenitors under the influence of increased levels of FGF-2. *In utero* microinjection of FGF-2 into lateral ventricles did not induce dorsal expression of *Shh*, *Patched1* or *Nkx2.1*. Furthermore, *in utero* microinjection of *Shh* into the lateral ventricles of E13.5 mouse forebrain did not induce oligodendrocyte progenitor cell generation from the dorsal forebrain, suggesting that *Shh* signaling is not involved in this FGF-2-mediated dorsal induction of oligodendrocyte progenitors. These results demonstrate that the dorsal neuroepithelial cells *in vivo* have a potential to generate oligodendrocyte progenitors simply by increasing the concentration FGF-2.

In conclusion her studies suggest that cystatin C and FGF-2 have opposite activities for oligodendrocyte differentiation; cystatin C suppresses differentiation of oligodendrocyte progenitors from ventral neuroepithelial cells *in vitro* and FGF-2 induces the oligodendrocyte generation from dorsal neuroepithelial cells *in vivo*. The oligodendrocyte development is under the regulation of by a series of extrinsic factors including cystatin C and FGF-2.

## 論文の審査結果の要旨

オリゴデンドロサイトは、通常、脳腹側領域より発生し背側へ移動し脳全体に広がると考えられている。その制御因子として、これまでに Sonic hedgehog (Shh)、bone morphogenetic protein (BMP) 等様々な因子が報告されている。本研究は、cystatin C と fibroblast growth factor 2 (FGF-2)のオリゴデンドロサイト発生・分化制御機能を検討したものである。

cystatin C は、アストロサイトの分化誘導因子として働く分泌型 cystein protease inhibitor であり、FGF-2 の co-factor として成体神経幹細胞に対して増殖促進作用を有することが報告されていたが、オリゴデンドロサイトへの作用は不明であった。胎齢 14.5 日齢の ganglionic eminence の細胞を用いた neurosphere assay をおこなったところ、cystatin C は primary neurosphere の数を濃度依存的に増加させたが、primary neurosphere から分化するオリゴデンドロサイトの数は減少させた。また胎齢 14.5 日齢の初代分散培養に cystatin C の中和抗体を添加すると、オリゴデンドロサイトの数は顕著に増加したが、増殖細胞数に変化は観察されなかった。これらの結果より、cystatin C はオリゴデンドロサイトへの分化を抑制する作用を持つ事が示唆された。

FGF-2 は背側由来の細胞よりオリゴデンドロサイト前駆細胞の産生を誘導する事が *in vitro* の実験で報告されている。発生期に FGF-2 は髄液中に存在しており、FGF-2、FGF receptor 共に腹側のみならず背側脳室層においても発現が観察される。胎齢 13.5 日齢の側脳室に過剰濃度の FGF-2 を子宮内投与し、胎齢 16.5 日齢まで発生させた後に BrdU を投与し、細胞増殖の程度を検討したところ、FGF-2 投与脳においては、特に脳室層/脳室下層において細胞増殖が顕著に亢進していた。また胎齢 15.5 日齢において、オリゴデンドロサイト前駆細胞のマーカーである *Olig2* と *PDGFR $\alpha$*  の発現を *in situ hybridization* 法により検討したところ、正常な胎仔の脳において、*Olig2*、*PDGFR $\alpha$*  陽性細胞は側脳室層には観察されないのに対して、FGF-2 投与脳では背側脳室層に異所性の *Olig2*、*PDGFR $\alpha$*  陽性細胞が観察された。この結果より FGF-2 が *in vivo* で背側脳室層細胞よりオリゴデンドロサイト前駆細胞の発生を誘導する活性を持つ事が示唆された。背側領域に Shh signal に関連する遺伝子発現が異所性に誘導される事はなく、また過剰量の Shh 側脳室投与によっても背側脳室層細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞の発生を誘導することは出来なかった。これらの結果により、*in vivo* で FGF-2 が、Shh に非依存的なオリゴデンドロサイト前駆細胞誘導活性を持つ事が示唆された。発生後期/生後にはオリゴデンドロサイト前駆細胞が背側領域から産生されることが最近報告されていることを考え合わせると、本研究の結果は、背側由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞の発生が FGF-2 によって誘導される可能性を示唆している。

以上のように、本論文は、未だ未解明の点が多いオリゴデンドロサイト発生過程に関して、背側領域からの発生の分子機序説明する有力な実験的証拠を示したものであり、優れた論文である。よって、審査委員会は、全員一致で、本論文が学位論文として相応しいものであると判断した。