

<特集「個体発生と細胞分化の医学」>

中枢神経系の発生における細胞の分化と系譜解析

後藤 仁志, 小野 勝彦*

京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学

Developmental Cell Lineage in the Central Nervous System

Hitoshi Gotoh and Katsuhiko Ono

Department of Biology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

発生期中枢神経において細胞系譜を理解することは、複数の細胞種からなる複雑な組織構築の過程を理解する上で重要な知見である。細胞系譜の解析は、神経系の発生のみならず、様々な組織器官で古くから行われてきた。近年では、遺伝子改変マウスなどの新しい技術の進歩によって神経系細胞の系譜に関する様々な新規知見が次々と報告されている。本稿では、細胞系譜解析（方法）の歴史や古典的手法について紹介し、それによって得られる知見や問題点について議論する。更に、近年頻繁に行われる、遺伝子導入を用いた様々な細胞系譜解析法とその特徴について紹介する。また、このような新しい技術を用いて得られた我々の最近の知見も紹介する。

キーワード：細胞系譜, 神経, 遺伝子改変マウス, Nkx2.2, Olig2.

Abstract

Analyzing cell lineage during neural development is important for understanding how the complex brain is organized. The development of methods for cell lineage analysis revealed novel origin (s) of certain cell type. In this review, we summarize the classical techniques for cell lineage analysis and their problem. Then, we describe some of the key genetic techniques that are recently established. Finally, we describe and discuss about our recent results about cell lineage of Nkx2.2-expressing and Olig2-expressing neural progenitor cells by using genetically-defined lineage tracing methods.

Key Words: Lineage tracing, Central nervous system, Mouse genetics, Nkx2.2, Olig2.

はじめに

動物の発生の過程で、卵割の終わった受精卵の細胞やその後続く胚の細胞が、成体のどの組織や体のどの部分を作るかということは、発生学の大きなテーマのひとつである。古くには両生類神経胚の細胞を局所生体染色することにより調べられた¹⁾。また、線虫ではどの細胞がどの時期に分裂しどこへ移動するか、顕微鏡を使っての丹念な観察から明らかにされた²⁾。一方で、羊膜類の細胞系譜の解析は、初期胚が非常に小さいことや発生に時間がかかることなどから局所生体染色や直接の観察がむづかしく、遺伝子導入技術の進歩を待たなければならなかった。P1 フェージの Cre リコンビナーゼが loxP 配列を認識して DNA 組み換えを誘導することが個体レベルで用いられるようになると、特定の遺伝子を発現する細胞で Cre を発現するマウス (Cre ドライバーマウス) と LacZ や GFP の遺伝子を loxP 配列の下流に挿入した flox レポーターマウスとを交配させることにより、特定の遺伝子を発現する細胞を永続的に標識して細胞を追跡することが可能となった。また、電気穿孔法は簡便に生体組織に遺伝子導入する方法として繁用される技術で、これも細胞系譜解析には重要な手法である。本稿では、細胞系譜解析の方法の発達とこれを用いた我々の最近の所見とを紹介したい。

細胞系譜解析の方法

1. 細胞系譜マーカーの発現を指標とした解析

神経幹細胞 / 前駆細胞を特定の細胞に分化させる機能を持つ転写 (調節) 因子は細胞系譜マーカーとしてしばしば用いられる。このような分子発現を経時的に追跡してその系譜を明らかにする方法は比較的簡便であり、神経系の形成における特定の細胞グループの全体像を明らかにすることができる。しかし、単一細胞のレベルでは途中で発現を終えるものやオシレートするものもあり、分子の発現特性に注意する必要がある (後述)。

2. ニワトリ・ウズラのキメラ動物を用いた解析

ニワトリとウズラはいずれもキジ科に属している。初期胚で両者の組織を入れ替え移植すると、異種の組織でも綺麗に融合して発生を続ける。それぞれの種に由来する細胞は、フォイルゲン染色で核を染めると、クロマチンの凝集パターンから、区別することができる。これを用いて、胚の特定の領域 (例えば特定の菱脳分節) に由来する細胞が成体のどこの構造を作り出すか調べられた³⁾。一方で、この方法を適用できる動物は限られており、特に哺乳動物への応用は困難である。

3. レトロウイルスベクターを用いた系譜解析とクローン解析

レトロウイルスは、一本鎖 RNA ウイルスであり、感染細胞のゲノムに遺伝子を組み込むことが知られている。レトロウイルスのうち、レンチウイルスは非分裂細胞にも感染するのに対して、モロニーマウス白血病ウイルスやニワトリレトロウイルスは分裂能を持つ細胞にのみ感染する。また、レトロウイルスの感染能の半減期は短いため、レトロウイルスベクターは多くのグループによって神経前駆細胞の系譜解析にパルス標識的に用いられてきた。細胞系譜解析に用いるレトロウイルスベクターは、レトロウイルスの自己増殖に必要な遺伝子を LacZ や GFP といったマーカー遺伝子で置換し、自己増殖能を不可能にしたものを用いることが多い。神経管の内腔 (脳室) や脳実質などに、マーカー遺伝子を持ったレトロウイルス粒子を注入すると、分裂期の細胞に感染し、この細胞に由来する細胞は全てマーカー分子を持続的に発現する⁴⁾⁵⁾。更に、レトロウイルスを限界希釈することによって、ごく少数 (理論的には 1 個) の神経前駆細胞を標識し、この細胞から分化する細胞を追跡してどのような細胞を作り出すかを調べることが可能である。これはクローン解析と呼ばれている。

レトロウイルスを用いた系譜解析では、脳定位置置などを用いて特定の場所にウイルスを注入する試みが行われているものの、最初に感染

した細胞を特定できないことが問題となる。このことを克服するために、ニワトリのレトロウイルスに対する受容体をマウスの特定の細胞に異所的に発現させ、受容体発現細胞にのみウイルスを感染させるシステムが用いられている⁶⁾。また、筆者らは、マウスのレトロウイルスが野生型のニワトリ細胞に感染しないことを利用し、マウスレトロウイルス受容体をニワトリの特定の細胞に発現させることにより、特定細胞への感染を可能とする細胞系譜解析システムを開発した(図1)⁷⁾。これらの手法によって、ウイルスに対する受容体を異所的に発現した分裂細胞からの細胞系譜を解析することが可能となっている。

4. 電気穿孔法によるレポーター分子の導入

電気穿孔法は、発現ベクターを脳室内に注入した後、電極を胚の近傍に静置し、電気パルスをかけることによって *in vivo* で効率良く遺伝子を導入する方法である⁸⁻¹⁰⁾。DNAは負電荷を持ち陽極側に向かって動くことから、導入時に陽極と陰極の電極の位置を調節することで、目的の限局した領域に導入することが可能である。例えば、発生期の脳皮質の細胞系譜を解析するために、背側皮質の細胞と腹側の線条体原基由来の細胞(介在神経細胞やオリゴデンドロサイトの前駆細胞)を別々に標識することや¹¹⁾、

脳幹の菱脳唇を限局して標識することができ¹²⁾¹³⁾。前項のレトロウイルスベクターと異なり、導入された遺伝子は細胞分裂を経ることによって、細胞中で希釈されるために神経細胞以外の分裂細胞(グリア細胞)の系譜を解析するためにはベクター側に工夫が必要である。その際には、ゲノムに目的遺伝子を導入できるトランスポゾンベクターを用いることが多い¹⁴⁾¹⁵⁾。更に、細胞特異的プロモーターとレポーター遺伝子を組み合わせたコンストラクトを作製し、電気穿孔法で導入することにより、特定の細胞種の細胞系譜を解析することも可能である¹⁶⁾。しかし、標識特異性は用いるプラスミドとその濃度にも依存し、次項で紹介する遺伝子組換えマウスを用いた方法のほうが高い特異性を示す。

5. 遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜解析

特定の遺伝子を発現する細胞の系譜とその挙動の解析のために、遺伝子改変マウスは非常に有用なツールである。遺伝子改変マウスを用いると、特定の遺伝子を発現する細胞を GFP や LacZ などのマーカー分子で標識することができる。これらのマーカー分子は、特定の遺伝子座へのノックインや、細胞特異的プロモーターあるいは組換え BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を用いたトランスジェ

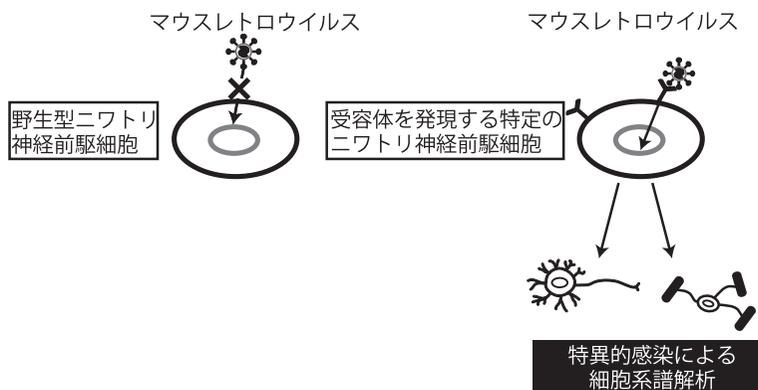


図1 異種レトロウイルスを用いた特異的細胞系譜解析⁷⁾

左) マウスのレトロウイルスは、受容体が存在しないため野生型のニワトリ細胞には感染しない。右) マウスのレトロウイルス受容体を異所的に発現させると、受容体発現細胞のみにウイルスが感染し、特異的な細胞系譜解析が可能である。

ニック法によって細胞特異的に発現させる。特に、BACトランスジェニック法は、特異的のプロモーターやエンハンサーを同定することなく、特異性高くマーカー分子を発現させることが可能であり、近年頻繁に用いられている¹⁷⁾。これらの方法で発現したマーカー分子によって、短時間の細胞系譜解析が可能である。特に、LacZなどはタンパク質の安定性が高いため、本来の遺伝子の発現が消失した後も一定期間細胞がLacZタンパク質を保持しており、その分化や分裂、移動を短期間解析することが可能である¹⁸⁾。

更に長期の系譜解析には、Cre-loxPなどを用いた系譜解析システムを用いる。これは、冒頭で述べたように、現在最も広範に用いられている信頼性の高い方法である。DNAの組換え酵素とその認識配列を組み合わせた、Cre-loxPやFlp-frtシステムによる組換えを利用している。例えば、特定の細胞種に組換え酵素であるCreやFlpを発現させたドライバーマウス系統と、レポーター遺伝子を持つマウスとを交配させることによって、発生段階のいずれかのステージで組換え酵素を発現したことがある細胞全てが

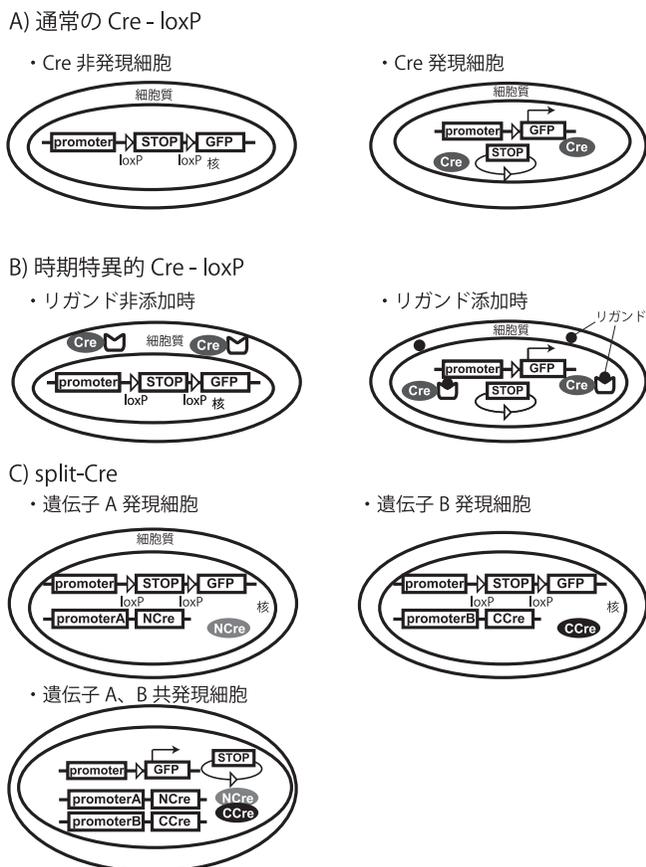


図2 様々な Cre 由来タンパク質による組換え

A) Cre を発現しない細胞では組換えが起こらず、Cre を発現する特定の細胞でのみ組換えが起こり、レポーター分子が発現する。B) 時期特異的 Cre は、リガンド非存在下では細胞質に存在するが、リガンド依存的に核内移行を示し、組換えを誘導する。C) それぞれ活性をもたない部分長 Cre (NCre, CCre) を 2 種類のプロモーターなどによって発現させる。2 種類の部分長 Cre を同時に発現する細胞でのみ、活性のある Cre タンパク質となり、組換えを誘導する。

レポーター陽性となる (図 2A). 遺伝子の発現を指標としてレポーター遺伝子の組換えを誘導するので, 最終分裂を終えた細胞の挙動を観察することも可能である. このことは, 分裂細胞しか標識できないレトロウイルスによる標識法との相違点である.

更に, Cre とエストロゲンレセプター (ER) やプロゲステロンレセプター (PR) などの核内受容体の一部をつなぎあわせた融合タンパク質を利用することで, 特定の時期に特定の遺伝子を発現する細胞から分化する細胞を追跡することも可能となった. これらは CreER や CrePR と呼ばれ¹⁹⁾²⁰⁾, リガンドが無い状態では細胞質に局在して機能しないが, それぞれの合成リガンドであるタモキシフェンや RU486 などを投与すると核内移行し, 組換えを誘導する (図 2B). これらに用いられる核内受容体遺伝子には変異が導入され, 内在性のエストロゲンやプロゲステロンには結合しない. 組換え効率にはリガンドの濃度や目的とする組織に依存するが, Cre ほどの組換え効率は期待できない. さらに, Cre

を N 末端部分と C 末端側に分割し (Split-Cre), それぞれを別個のプロモーター下に発現させることによって, 2 つの遺伝子マーカを発現する細胞のみで組換えを起こし, 細胞系譜を解析することもできる (図 2C)²¹⁾.

レポーターマウスは, 様々なラインが開発され, マウスリソースバンクに保存されている. レポーターマウスは, すべての細胞で発現するプロモーターを用いたトランスジェニックマウスや, 同じく全ての細胞で発現する Rosa26 遺伝子座へのノックインマウスが用いられるが, レポーターラインによって組み換え効率や標識様式が異なるため, 目的にあったものを選択する必要がある. これらのうち, 強力な chicken beta-actin プロモーターの制御下に Cre 非存在下では lacZ 遺伝子を発現し Cre による組み換えによって EGFP を発現する Z/EG マウス²²⁾ や, Rosa26 遺伝子座に Cre 依存的に YFP を発現する遺伝子カセットがノックインされた Rosa26-YFP マウス²³⁾ などが広く用いられている (図 3A, B). 更には, 近年同一のマウスで複数の細

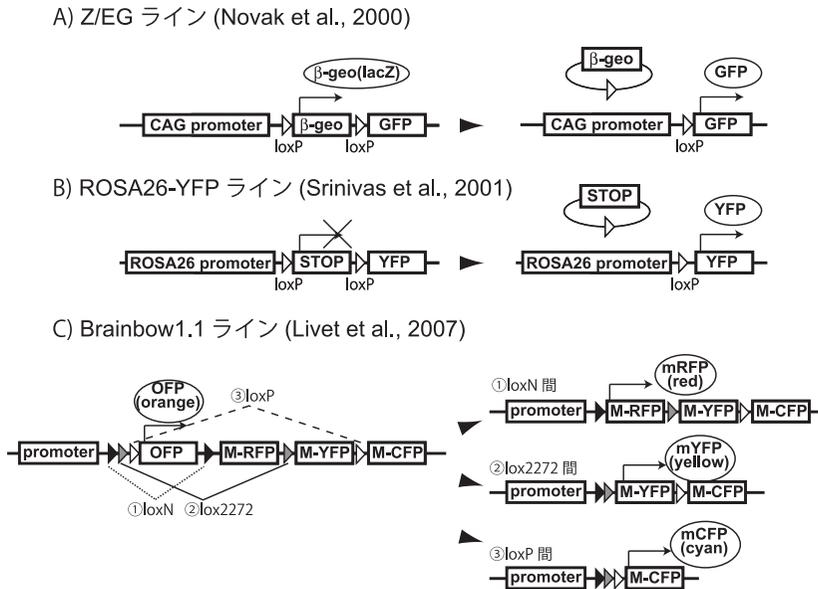


図 3 広範に用いられるレポーターマウスライン

A) Z/EG マウスラインは, Cre 依存的に GFP を発現するマウスである. B) Rosa26-YFP マウスラインでは, Cre 依存的に YFP を発現する. C) Brainbow ラインでは, loxP 類似配列間でランダムに組換えが起こるため, 様々な種類の蛍光タンパク質を発現する.

胞の解析をするためのレポーターマウスも開発されている。例えば、brainbow マウスは様々な loxP 類似配列と蛍光タンパク質を組み合わせることによって、マルチカラーの系譜解析を可能としている (図 3C)²⁴。Cre の基質として、loxP や類似配列 (loxN など) が知られているが、Cre 依存的に同種配列間でランダムに組換わることを利用して、図 3C のベクター配列から 3 パターンの組換えが起こることが予想される。そのため、時期特異的 Cre などによって、低頻度の組換えを誘導すると、マルチカラーのクローン解析を行うことが可能であると考えられる。また、MADM (Mosaic Analysis with Double Marker) システムを用いると Cre 遺伝子を発現する細胞系譜でモザイク解析を行うことができる²⁵。

中枢神経系での細胞系譜解析

1. 脊髄での Nkx2.2 細胞の系譜解析：ニューロンやグリアの新たな起源

上述の神経系の細胞系譜解析法を用いて、最近得られた結果について紹介したい。脊髄神経管では底板と蓋板から分泌されるモルフォゲンの濃度依存的に転写因子を発現し、神経前駆細胞は背腹軸方向にドメイン構造を形成する²⁶。それぞれのドメインからは異なる神経細胞が産み出され、神経細胞産生が終了した後におこるグリア細胞産生時にもドメイン構造に依存して様々なサブタイプのグリア細胞が産生されることが報告されている^{27,28}。ミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの前駆細胞は、発生初期に Olig2 転写因子を発現する pMN ドメインにある神経前駆細胞群から発生することが知られている (詳細は後述)。Nkx2.2 転写因子は、pMN ドメインの腹側に存在する p3 ドメインの神経前駆細胞のマーカであるとともに、分化途中のオリゴデンドロサイト系譜の細胞にも発現することが知られている (図 4A)²⁹。これまでにニワトリ胚では、Nkx2.2 と未成熟なオリゴデンドロサイトマーカである O4 とが脳室層の細胞で共発現することが知られていた³⁰ が、実際に脳室層の Nkx2.2 陽性前駆細胞がオリゴデ

ンドロサイト系譜を産生するか否かは不明であった。そこで、脳室層で Nkx2.2 を発現する細胞の細胞系譜を解析するために、新規の細胞系譜解析法を開発した⁷。マウスレトロウイルスがニワトリ胚に感染しないことを利用し、nkx2.2 遺伝子特異的エンハンサー³¹ 制御下にマウスレトロウイルスに対する受容体³² をもつベクターを作製し、ニワトリ胚に電気穿孔法を用いて導入した。24 時間後に、マウスのレトロウイルスを感染させレポーター分子で標識した。孵化直前の孵卵 18 日目の脊髄では、標識された細胞の大部分は成熟したオリゴデンドロサイトであり、少数のアストロサイトも観察された (図 4)。こういった観察から、p3 ドメインの神経前駆細胞は、pMN ドメインとは異なる新たなオリゴデンドロサイトの発生活起源であることが示唆された。更に発生初期の神経細胞産生期の系譜解析を行うと、Nkx2.2 を発現する p3 ドメインの細胞はこれまで考えられていた脊髄介在ニューロンの前駆細胞として働くのみならず、pMN ドメイン由来であると考えられていた運動ニューロンの別個の発生活起源であることを見出した (図 4A)³³。このように、細胞系譜解析の結果、細胞の新たな発生活起源を明らかとすることで、細胞による組織構築のメカニズムや発生活起源が異なることによる分化細胞の機能的差異を解析するための手がかりとなると考えられる。

2. Olig2 細胞の系譜解析：ニューロングリアスイッチと細胞系譜マーカーの発現様式

Olig2 は、オリゴデンドロサイト系譜に特異的な bHLH 型転写因子として 3 つのグループで同時に同定・単離された。さらに同じグループから同時に遺伝子欠損マウスが報告され、Olig2 はオリゴデンドロサイトと脊髄運動ニューロンの分化に必須の分子であることが示された (総説 34 を参照)。Takebayashi らは Olig2 遺伝子座に CreER 遺伝子をノックインしたマウスを作製した³⁵。このマウスを flox レポーターマウスと交配させ、任意の時期にタモキシフェンを投与することにより、時期特異的に Olig2 細胞を標識し、脳の様々な領域でその系譜の追跡や Olig2 機能を調べた^{28,34-36}。

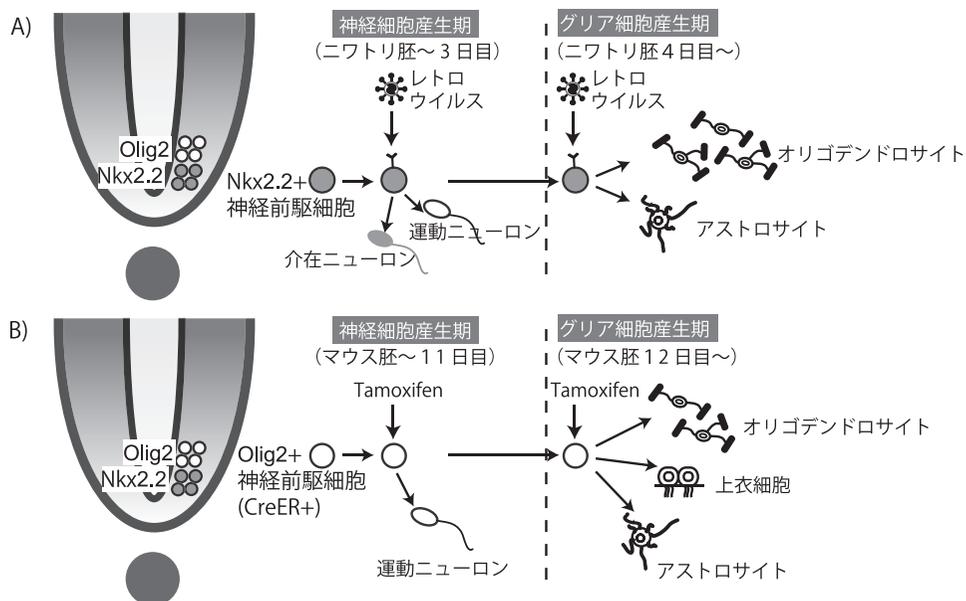


図4 発生期の腹側神経管における細胞系譜解析
 上段はニワトリ胚におけるNkx2.2系譜解析の結果を、下段はマウス胚におけるOlig2系譜解析の結果を模式図で示す。それぞれの転写因子を発現する神経前駆細胞から異なるサブタイプの細胞が産生される。

胎生期の脊髄では脳室層腹側部のpMNドメインからOlig2の発現が始まり、胎齢11日目(E11)以前では運動ニューロンが、E12以降ではオリゴデンドロサイトが主に生み出される(図4B)。このように、同じ転写因子を発現している前駆細胞でも、ニューロン-グリア細胞の運命スイッチが起こっていることが明らかにされた。また、脊髄のOlig2発現細胞は運動ニューロンとオリゴデンドロサイトの系譜細胞に特異的であると考えられていたが、アストロサイトや上衣細胞にも分化することが示された²⁸⁾。

前脳領域では、Olig2は線条体原基や腹側視床、視床下部の脳室層に発現しており、タモキシフェンを様々な時期の妊娠母獣に投与することで、Olig2発現細胞の細胞系譜が明らかにされた³⁶⁻³⁸⁾。すなわち、E12およびそれ以前では、終脳のOlig2細胞は大脳皮質と線条体のGABAニューロンに、間脳のものは視床網様核などのGABAニューロンと視床下部のグルタミン酸作

動性ニューロンに分化し、胎生の遅い時期になるとアストロサイトを中心としたグリア細胞に分化するものが増える。しかし、Olig2欠損マウスでもGABAニューロンの分布に大きな変化はなく、Olig2を欠損した細胞もGABAニューロンに分化することが示され、前脳でのニューロン分化におけるOlig2の機能は未だ明らかではない。興味深いことに、E9にタモキシフェンを投与してE14でレポーター分子を発現するOlig2系譜細胞を調べると、Olig2を発現している細胞はほとんど見られず、タモキシフェン投与後5日間ですべて発現を終えていることが明らかにされた。また、E13に投与した場合でも、3日後にOlig2の発現を継続しているOlig2系譜細胞は1/3程度であった³⁸⁾。これらの結果より、細胞系譜マーカーと呼ばれる分子が、同一の細胞で終生発現持続しているものばかりではないことが明らかになった。このような系譜解析や遺伝子欠損マウス脳の解析から、前脳領域におけるOlig2機能が徐々に明らかに

なるものと予想される。

おわりに

Vogt の生体染色に始まった細胞系譜解析は、細胞の分子・遺伝子発現解析の時代を経て Cre-loxP を個体レベルで用いる時代となった。細胞系譜マーカーといわれる分子の発現は、恒常的ではないことが明らかとなり、細胞系譜解析には genetic labeling が必須であることが示されている。Cre のみならず、CreER などの融合遺伝子や、Split-Cre を用いた複数の遺伝子発現を利用したりすることにより、細胞系譜解析は時間

的にも空間的にも特異的でより詳細な解析が可能となってきた。また、電気穿孔法はマウス以外の羊膜類でも細胞系譜解析を容易にした。従って、特定の遺伝子を発現する細胞の分化様式や機能を進化の視点をからも明らかにできるようになってきた。様々な動物種を用いた詳細な細胞系譜解析は、個体発生のみならず系統発生の視点からも新たな知見を提供してくれるものと考えられる。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Vogt W. Gestaltungsanalyse am Amphibienkeim mit örtlicher Vitalfärbung. II. Teil Gastrulation und Mesodermbildung bei Urodelen und Anuren. Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Org 1929; 120: 384-706.
- 2) Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. Dev Biol 1977; 56: 110-156.
- 3) Marin F, Puelles L. Morphological fate of rhombomeres in quail/chick chimeras: a segmental analysis of hindbrain nuclei. Eur J Neurosci 1995; 7: 1714-1738.
- 4) Price J, Turner D, Cepko C. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 156-160.
- 5) Sanes JR. Analysing cell lineage with a recombinant retrovirus. Trends Neurosci 1989; 12: 21-28.
- 6) Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. Cell 1999; 97: 703-716.
- 7) Gotoh H, Ono K, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K. Genetically-defined lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells in chick spinal cord. Dev Biol 2011; 349: 504-511.
- 8) Tabata H, Nakajima K. Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. Neuroscience 2001; 103: 865-872.
- 9) Saito T, Nakatsuji N. Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation. Dev Biol 2001; 240: 237-246.
- 10) Fukuchi-Shimogori T, Grove EA. Neocortex patterning by the secreted signaling molecule FGF8. Science 2001; 294: 1071-1074.
- 11) Nakahira E, Kagawa T, Shimizu T, Goulding MD, Ikenaka K. Direct evidence that ventral forebrain cells migrate to the cortex and contribute to the generation of cortical myelinating oligodendrocytes. Dev Biol 2006; 291: 123-131.
- 12) Ono K, Yasui Y, Ikenaka K. Lower rhombic lip-derived cells undergo transmedian tangential migration followed by radial migration in the chick embryonic brainstem. Eur J Neurosci 2004; 20: 914-922.
- 13) Kawauchi D, Taniguchi H, Watanabe H, Saito T, Murakami F. Direct visualization of nucleogenesis by precerebellar neurons: involvement of ventricle-directed, radial fibre-associated migration. Development 2006; 133: 1113-1123.
- 14) Yoshida A, Yamaguchi Y, Nonomura K, Kawakami K, Takahashi Y, Miura M. Simultaneous expression of different transgenes in neurons and glia by combining in utero electroporation with the Tol2 transposon-mediated gene transfer system. Genes Cells 2010; 15: 501-512.
- 15) Chen F, LoTurco J. A method for stable transgenesis of radial glia lineage in rat neocortex by piggyBac mediated transposition. J Neurosci Methods 2012;

- 207: 172-180.
- 16) Siddiqi F, Chen F, Aron AW, Fiondella CG, Patel K, Loturco JJ. Fate Mapping by PiggyBac Transposase Reveals That Neocortical GLAST⁺ Progenitors Generate More Astrocytes Than Nestin⁺ Progenitors in Rat Neocortex. *Cereb Cortex* 2012.
 - 17) Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N. A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature* 2003; 425: 917-925.
 - 18) Ding L, Takebayashi H, Watanabe K, Ohtsuki T, Tanaka KF, Nabeshima Y, Chisaka O, Ikenaka K, Ono K. Short-term lineage analysis of dorsally derived Olig3 cells in the developing spinal cord. *Dev Dyn* 2005; 234: 622-632.
 - 19) Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 752-757.
 - 20) Kellendonk C, Tronche F, Monaghan AP, Angrand PO, Stewart F, Schutz G. Regulation of Cre recombinase activity by the synthetic steroid RU 486. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 1404-1411.
 - 21) Hirrlinger J, Scheller A, Hirrlinger PG, Kellert B, Tang W, Wehr MC, Goebbels S, Reichenbach A, Sprengel R, Rossner MJ, Kirchhoff F. Split-cre complementation indicates coincident activity of different genes in vivo. *PLoS One* 2009; 4: e4286.
 - 22) Novak A, Guo C, Yang W, Nagy A, Lobe CG. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis* 2000; 28: 147-155.
 - 23) Srinivas S, Watanabe T, Lin CS, William CM, Tanabe Y, Jessell TM, Costantini F. Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus. *BMC Dev Biol* 2001; 1: 4.
 - 24) Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 2007; 450: 56-62.
 - 25) Zong H, Espinosa JS, Su HH, Muzumdar MD, Luo L. Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell* 2005; 121: 479-492.
 - 26) Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet* 2000; 1: 20-29.
 - 27) Hochstim C, Deneen B, Lukaszewicz A, Zhou Q, Anderson DJ. Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 2008; 133: 510-522.
 - 28) Masahira N, Takebayashi H, Ono K, Watanabe K, Ding L, Furusho M, Ogawa Y, Nabeshima Y, Alvarez-Buylla A, Shimizu K, Ikenaka K. Olig2-positive progenitors in the embryonic spinal cord give rise not only to motoneurons and oligodendrocytes, but also to a subset of astrocytes and ependymal cells. *Dev Biol* 2006; 293: 358-369.
 - 29) Qi Y, Cai J, Wu Y, Wu R, Lee J, Fu H, Rao M, Sussel L, Rubenstein J, Qiu M. Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development* 2001; 128: 2723-2733.
 - 30) Soula C, Danesin C, Kan P, Grob M, Poncet C, Cochard P. Distinct sites of origin of oligodendrocytes and somatic motoneurons in the chick spinal cord: oligodendrocytes arise from Nkx2.2-expressing progenitors by a Shh-dependent mechanism. *Development* 2001; 128: 1369-1379.
 - 31) Lei Q, Jeong Y, Misra K, Li S, Zelman AK, Epstein DJ, Matise MP. Wnt signaling inhibitors regulate the transcriptional response to morphogenetic Shh-Gli signaling in the neural tube. *Dev Cell* 2006; 11: 325-337.
 - 32) Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM. A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 1989; 57: 659-666.
 - 33) Gotoh H, Ono K, Nomura T, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K. Nkx2.2⁺ progenitors generate somatic motoneurons in the chick spinal cord. *PLoS One* 2012; 7: e51581.
 - 34) Ono K, Takebayashi H, Ikenaka K. Olig2 transcription factor in the developing and injured forebrain; cell lineage and glial development. *Mol Cells* 2009; 27: 397-401.
 - 35) Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, Chisaka O, Ikenaka K, Nabeshima Y. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol* 2002; 12: 1157-1163.
 - 36) Furusho M, Ono K, Takebayashi H, Masahira N, Kagawa T, Ikeda K, Ikenaka K. Involvement of the

- Olig2 transcription factor in cholinergic neuron development of the basal forebrain. *Dev Biol* 2006; 293: 348-357.
- 37) Miyoshi G, Butt SJ, Takebayashi H, Fishell G. Physiologically distinct temporal cohorts of cortical interneurons arise from telencephalic Olig2-expressing precursors. *J Neurosci* 2007; 27: 7786-7798.
- 38) Ono K, Takebayashi H, Ikeda K, Furusho M, Nishizawa T, Watanabe K, Ikenaka K. Regional- and temporal-dependent changes in the differentiation of Olig2 progenitors in the forebrain, and the impact on astrocyte development in the dorsal pallium. *Dev Biol* 2008; 320: 456-468.

著者プロフィール



後藤 仁志 Gotoh Hitoshi

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科神経発生生物学・講師（学内）

略 歴：2002年3月 神戸大学農学部生物機能化学科卒業

2007年3月 大阪大学大学院理学研究科生物科学専攻修了，理学博士

2007年4月～2010年 自然科学研究機構生理学研究所研究員

2010年4月～ 現職

2012年9月～2013年2月 University of Connecticut, 訪問研究員

専門分野：神経発生学, グリア細胞

- 主な業績：1. Gotoh H, Ono K, Nomura T, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K. Nkx2.2+ progenitors generate somatic motoneurons in the chick spinal cord. *PLoS ONE* 2012; 7: e51581.
2. Tomita K, Gotoh H, Tomita K, Yamauchi N, Sanbo M. Multiple patterns of spatiotemporal changes in layer-specific gene expression in the developing visual cortex of higher mammals. *Neurosci Res* 2012; 73: 207-17.
3. Gotoh H, Ueda T, Uno A, Ohuchi H, Ikenaka K, Ono, K. Expression of myelin genes in the developing chick retina. *Gene Expression Pattern* 2011; 11: 471-475.
4. Gotoh H, Ono K, Takebayashi H, Harada H, Nakamura H, Ikenaka K. Genetically-defined lineage tracing of Nkx2.2-expressing cells in chick spinal cord. *Dev Biol* 2011; 349: 504-511.
5. 後藤仁志, 池中一裕. グリア細胞の発生・機能・分化 蛋白質・核酸・酵素 2008; 3: 400-405.
6. Gotoh H, Okumura A, Nagai K, Okumura N. Localization of phospho-tyrosine489-beta-adducin immunoreactivity in the hypothalamic tanycytes and its involvement in energy homeostasis. *Brain Res* 2008; 1228: 97-106.
7. Gotoh H, Okumura N, Yagi T, Okumura A, Shima T, Nagai K. Fyn-induced phosphorylation of beta-adducin at tyrosine 489 and its role in their subcellular localization. *Biochem Biophys Res Comm* 2006; 346: 600-605.