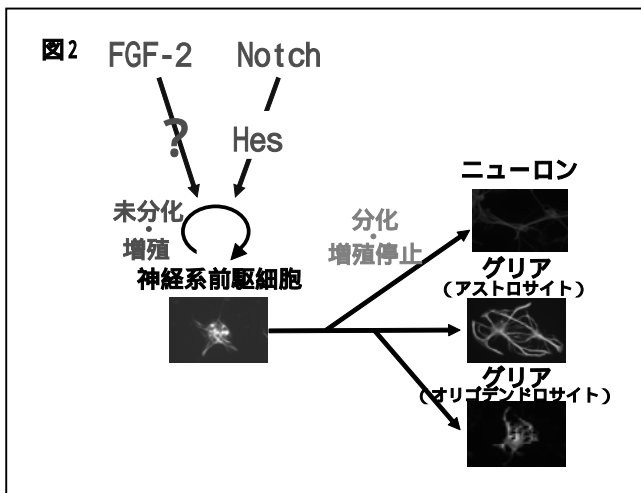
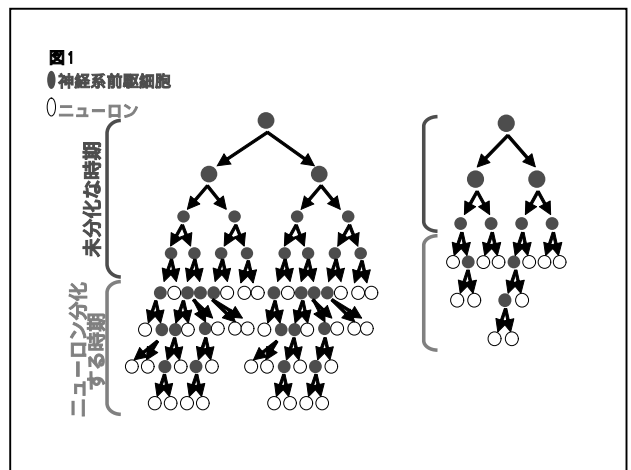


神経系前駆細胞の未分化性を制御する分子機構の解析

吉松 剛志

【目的】

中枢神経系は脳と脊髄からなり、初期胚の神経板から形成される。内腔側の分裂能を持った層は脳室帯と呼ばれる。脳室帯の分裂能力をもった細胞は神経系前駆細胞と呼ばれ、未分化性を維持したまま増殖し、ニューロンとグリアを含む数種の分化細胞を生み出す多分化能を有する細胞である。脳という組織が機能するためには、各部位においてニューロンやグリアが適正な数生み出されることが重要である。そのためには、神経系前駆細胞がどの程度未分化性を維持したまま増殖し、その数を増やすかが厳密に制御されていると考えられる(図1)。例えばもし、すべての神経系前駆細胞が1回多く分裂すれば、最終的なニューロンの数は倍に増えてしまうことになるからである。神経系前駆細胞の未分化状態を制御する分子として、FGF(Fibroblast Growth Factor)-2などの増殖因子や、Notchシグナルがよく知られている(図2)。Notchシグナルはその下流でHes遺伝子の転写を活性化する。Hesは、ニューロン分化を誘導する転写因子であるNgnなどの活性を抑制し、ニューロン分化を抑制していることがわかっている。一方、FGF-2などの増殖因子は、培養系で神経系前駆細胞の未分化状態を維持したまま増殖させることができ、広く用いられている。しかしながら、その下流のメカニズムについてはこれまで全く不明であった。そこで、本研究では、前半に、FGF-2はどのようなメカニズムで神経系前駆細胞の未分化状態を維持しているかについて解析を行った。



神経系前駆細胞は発生中期においてはニューロンを主に産生し、後期(周産期以降)においてアストロサイトを主に産生する。発生中期において神経系前駆細胞は、すべての細胞がいっせいにニューロン分化するのではない。一部の細胞が選択されニューロン分化し、残りの細胞は未分化状態を維持したまま増殖する(図1)。そして発生後期においてアストロサイトへと分化する。このとき、神経系前駆細胞が分化する割合は、最終的なニューロンとアストロサイトの数を決定するのに非常に重要であると考えられる。そこで本研究の後半において、ニューロン分化する細胞の割合を制御

しているメカニズムについて解析を行った。

【結果】

FGF-2 による神経系前駆細胞の未分化性の維持には JAK2 の活性が必要である

FGF-2 が神経系前駆細胞の未分化状態を維持する際に必要なシグナルを調べるために neurosphere assay を行った。マウス胎生 1 2 日目胚から神経上皮細胞を単離し、FGF-2 存在下にて浮遊培養し、MEK 阻害剤(U0126)、PI3K 阻害剤(LY294002)、JAK2 阻害剤(AG490)を 1 日作用させた。その後、形成される neurosphere (secondary neurosphere) の数を数えた。すると、JAK2 阻害剤の添加によって、secondary neurosphere の数を顕著に減少することがわかった。このことから、FGF-2 依存的な神経系前駆細胞の未分化状態の維持に JAK2 の活性が必要であることが示唆された。

FGF-2 による神経系前駆細胞の未分化性の維持には STAT3 が必要である

次に、JAK2 のターゲット因子としてよく知られている STAT3 が神経系前駆細胞の未分化状態の維持に必要である可能性について検討した。STAT3 遺伝子をコンディショナルにノックアウトできる STAT3 flox/flox マウスを用いて STAT3 の必要性を検討した。STAT3 flox/flox マウス神経上皮細胞を単離し、レトロウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを導入し STAT3 遺伝子をノックアウトした。その後、FGF-2 存在下にて低密度浮遊培養を行った。すると、形成される neurosphere の数が減少することがわかった。

in vivo においても神経系前駆細胞の未分化性の維持には STAT3 が必要である

脳発生 (in vivo) においても実際に STAT3 が神経系前駆細胞の未分化状態の維持に必要であるかを検討した。in utero エレクトロポレーション法を用いて遺伝子導入実験を行った。STAT3 flox/flox マウス胎生 1 4 日目胚の脳室に Cre リコンビナーゼ発現プラスミドを GFP 発現プラスミドとともにインジェクトし、エレクトロポレーションにより脳室に面した脳室帯の細胞に遺伝子を導入した。その後 2 日間発生させた後に大脳切片を作成し解析した。すると、Cre リコンビナーゼが導入された領域において神経系前駆細胞マーカーである Nestin が減少し、脳室帯において異所的に TuJ1 陽性細胞が存在していることがわかった。このことから、in vivo においても STAT3 は神経系前駆細胞の未分化状態の維持に必要であることが示唆された。

STAT3 は周囲の細胞の未分化状態を維持する

前の実験において Cre リコンビナーゼが導入された領域を観察すると、STAT3 がノックアウトされている GFP 陽性細胞の周囲の細胞においても TuJ1 陽性細胞が存在していることがわかった。このことより、STAT3 は周囲の細胞の未分化状態を維持するのに必要である可能性が示唆された。

STAT3 が周囲の細胞に与える影響を共培養実験により検討した。活性型 STAT3 を発現している細胞と、GFP のみを導入した細胞とを共培養し、GFP 陽性細胞のニューロン分化の割合を数えた。すると、周囲の細胞において活性型 STAT3 が導入されていると、GFP 陽性細胞のニューロン分化細胞の割合が抑制された。このことから、STAT3 は周囲の細胞の未分化状態を維持できることが支持された。

STAT3 は Delta-like1(Dll1)の発現を制御する

これまで、周囲の細胞の未分化状態を維持する分子として Notch のリガンドである Dll1 がよく知られている。そこで、STAT3 が Dll1 の発現を制御している可能性について検討した。

STAT3 をノックアウトした後に、定量的 RT-PCR、Western blotting を行い Dll1 の mRNA 量、タンパク質量を調べた。すると、Dll1 の mRNA もタンパクも減少することがわかった。このことより、Dll1 の発現に STAT3 が必要であることが示された。

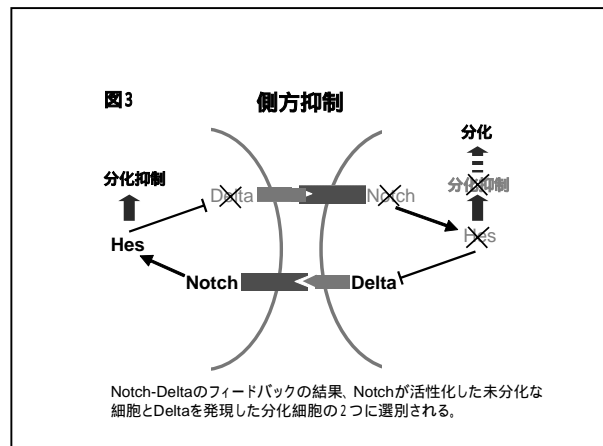
さらに、STAT3 は転写因子であるので Dll1 の発現を直接制御している可能性について検討した。Dll1 のプロモーター領域には STAT3 結合配列が 2 力所存在していた。そこで、その領域に内在性 STAT3 が

結合しているかをクロマチン免疫沈降法（ChIP）を用いて調べた。すると、STAT3 結合配列の存在する領域において STAT3 が結合していることがわかった。このことより、STAT3 が Dll1 の発現を直接制御している可能性が示唆された。

マウス大脳皮質発生において Delta-Notch の側方抑制機構が存在する

Notch シグナルはハエなどの系においては、側方抑制と呼ばれる機構により一部の細胞をニューロン分化させ、残りを未分化状態に保つことがよく知られている（図3）。マウス大脳皮質において同様の機構が存在する可能性はこれまで示唆されていた。しかし、Dll を発現している細胞と Notch シグナルが活性化している細胞が相互排他的に存在していることを示した報告はこれまでなかった。

そこで、側方抑制機構がニューロン分化抑制に関与しているかを詳細に検討するために、Dll1 を導入した細胞の運命を調べた。すると、Dll1 が導入された細胞においては、その後すべてニューロンへと分化するクローンとなる割合が増加した。このことから、Dll1 を導入することで細胞の運命がニューロン分化へと誘導されることがわかった。この効果が、側方抑制という、周囲の細胞との相互作用によるものか、Dll1 がそれを発現している細胞自身に直接およびしている作用なのかを検討した。大多数の細胞にウイルスを導入する実験を行った。すると、Dll1 を



導入した細胞においてニューロン分化が誘導されることはなかった。これは、大多数の細胞において Dll1 が導入されていると側方抑制機構が働かないためと考えられる。このことより、Dll1 をまばらに導入することで側方抑制機構が働き、ニューロン分化へと誘導されたことが示唆された。

このことより、側方抑制によって一部の細胞が選別され神経系前駆細胞の運命が決められる機構が存在することが示唆された。

【考察】

本研究によって、FGF-2 による神経系前駆細胞の自己複製促進効果に JAK2-STAT3 経路が必要であり、この時 STAT3 は Dll1 の発現を促進することで細胞非自律的に神経系前駆細胞の分化を抑制していることを明らかにした。FGF-2 は細胞外因子であり、それが作用する範囲において均一に働き STAT3 を介して Dll1 の発現を誘導することで神経系前駆細胞の未分化状態を維持していると考えられる。そしてさらにその細胞集団から Delta-Notch の側方抑制機構により分化する細胞が選別されるというモデルが考えられる（図4）。FGF-2 が STAT3 を介して Delta-Notch 経路に作用することは、FGF-2 の作用範囲が神経系前駆細胞の数を制御し、その集団の中で側方抑制機構がニューロン分化する細胞の割合を制御することで、発生において分化する細胞の数を制御するという意義があると考えられる。

