

レチノイン酸による神経幹細胞の
アストロサイト分化制御機構の解明

浅野 弘嗣

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学講座

(中島 欽一教授)

目次

I. Introduction (序論)

II. Materials and methods (材料と方法)

1. 実験動物
2. 神経幹細胞の単離と培養
3. 免疫染色
4. RT-PCR
5. Luciferase assay
6. クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)
7. In vivo electroporation
8. IP-Western blotting

III. Result (結果)

1. 神経幹細胞は RARs と RXRs を発現している
2. RA と LIF は相乗的に神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導する
3. RA と LIF は相乗的に *gfap* プロモーターを活性化する
4. STAT3 の活性化は RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化に必須である
5. STAT3 の認識配列への結合は RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化に必須である
6. *Gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE は RA と LIF による相乗的活性化に関与している
7. 新生仔の前脳領域の細胞は RA シグナルに応答している
8. RA は *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストン H3 アセチル化を亢進する
9. RA は *gfap* 遺伝子プロモーター上への STAT3 の結合を増強する
10. HDAC 抑制剤は神経幹細胞のアストロサイト分化を促進する

IV. Discussion (考察)

V. Acknowledgments (謝辞)

VI. Reference (参考文献)

I. Introduction (序論)

哺乳類中枢神経系は膨大な数のニューロンが存在しており、複雑かつ精密なネットワークの形成により高度な情報処理が可能となっている。その神経ネットワークの構築には、ニューロンの生存や機能の維持、また信号伝達能の正確性の確保等を行っているアストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞の存在も必須である。これらの異なる神経系細胞は共通の神経幹細胞から分化・産生される。しかしながら、神経幹細胞は胎生初期においては多分化能を有してはならず、胎生中期にまずニューロンへのみの分化能を獲得する。そして発生が進み、胎生後期になるとアストロサイトやオリゴデンドロサイトなどのグリア細胞への分化能を獲得する (Qian et al, 2000; Sauvageot et al, 2002)。このような時空間的な神経幹細胞の分化はサイトカインなどの細胞外因子と、エピジェネティック修飾などの細胞内在性プログラムの協調作用によって制御されていることが知られてきているが未だ不明な点が多い (Miller et al., 2007; Takizawa et al., 2001; Hsieh et al., 2004; Namihira et al., 2008)。

インターロイキン-6 (IL-6) ファミリーサイトカインは共通の膜受容体糖タンパク質 gp130 を介してそのシグナルを細胞内へ伝達する。リガンドと結合した受容体は下流の Janus kinase (JAK) – signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路を活性化し、神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することが知られている (Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999a; Nakashima et al., 2002)。IL-6 ファミリーサイトカインの一員である白血病抑制因子 (LIF) は、LIF 受容体 (LIFR) β と gp130 のヘテロダイマー形成を誘導し、それにより相互に近接した JAK が自己リン酸化すると共に受容体細胞内領域のチロシン残基をリン酸化することでシグナル伝達を開始される。非刺激時には細胞質に存在していた STAT3 が自身の SH2 ドメインを介してチロシンリン酸化された受容体に結合し、JAK によりチロシンリン酸化を受け活性化する。活性化した STAT3 はホモダイマーを形成した後核内移行し、アストロサイト特異的遺伝子であるグリア線維性酸性タンパク質 (*gfap*) を含む標的遺伝子の発現を誘導する。LIF、LIFR β 、gp130、STAT3 の遺伝子欠損マウスは生体内においてアストロサイト分化に障害が起きていることが報告されている (Nakashima et al., 1999a; Bugga et al., 1998; Koblar et al., 1998; He et al., 2005)。これらの報告は JAK-STAT シグナ

ル経路が中枢神経系におけるアストロサイトの発生に重要である事を示している。IL-6 ファミリーサイトカインとは異なる細胞外因子である骨形成因子 (BMP) 2 は、その下流転写因子である Smad1 が転写共活性化因子 p300/CREB-binding protein (CBP) により架橋されることで STAT3 と複合体を形成することにより、アストロサイト特異的遺伝子発現を相乗的に上昇させることが知られている (Nakashima et al., 1999b; Sun et al., 2001)。

細胞内在性プログラムの一つであるエピジェネティクス機構としては、DNA メチル化やヒストンのアセチル化・メチル化・リン酸化・ユビキチン化による遺伝子発現制御が知られている (Jaenisch et al., 2003; Li et al., 2007)。胎生期神経幹細胞のアストロサイトの分化は DNA メチル化により制御されていることが既に報告されている。胎生中期の神経幹細胞において、アストロサイト特異的遺伝子である *gfap* 遺伝子プロモーターの STAT3 認識配列内の CpG 配列が高度にメチル化されており、そのため STAT3 が結合できず IL-6 ファミリーサイトカインによる *gfap* 遺伝子の発現誘導が抑制されている。アストロサイトへと分化できる胎生後期以降の神経幹細胞では、STAT3 認識を含む周辺領域が脱メチル化されており、IL-6 ファミリーサイトカインにより活性化した STAT3 が *gfap* 遺伝子プロモーターに結合し、その発現を誘導できることが報告されている (Takizawa et al., 2001; Fan et al., 2005; Namihira et al., 2009; Sanosaka et al., 2009)。これらの発見は、発生段階依存的な DNA 脱メチル化が神経幹細胞のアストロサイト分化において決定的な細胞内在性因子の一つであることを示唆している (Takizawa et al., 2001; Namihira et al., 2008)。

もうひとつのエピジェネティクス機構であるヒストン修飾はクロマチン構造変換を介して遺伝子発現を制御している。ヒストン修飾の一つであるヒストンアセチル化は、p300/CBP のようなヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) により誘導され、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) により脱アセチル化されることが知られている。また、遺伝子発現の活性化されている領域のヒストンは高度にアセチル化されているのに対し、転写抑制状態にある遺伝子制御領域ではほとんどアセチル化されておらず、遺伝子発現とヒストンアセチル化に相関があることが報告されている (Jaenisch et al., 2003; Li et al., 2007)。さらに、転写抑制因子 Nuclear receptor corepressor (N-CoR) や neuron-restrictive silencer factor/repressor element-1 silencing transcription factor

(NRSF/REST)は多くの遺伝子制御領域において HDACs と複合体を形成し遺伝子発現に対して抑制的に働くことが知られている (Hermanson et al., 2002; Ballas et al., 2005)。しかしながら、ヒストンアセチル化がクロマチン構造を脱凝縮することが明らかにされているものの、なぜそれが転写活性化を誘導するかについて詳細な分子メカニズムの理解は未だ明らかにされていない。

近年、レチノイン酸受容体 (RAR) を介したレチノイン酸 (RA) シグナルがクロマチン構造変換を伴う転写制御を行っていることが報告されてきている。核内受容体ファミリーに属する RAR は RA 受容体応答配列 (RARE) にレチノイド X 受容体 (RXR) とヘテロダイマーを形成し結合している。RA 非存在下において、RARs は転写共抑制因子である N-CoR や silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors (SMRT) と結合しており、HDAC を含む転写抑制複合体を形成し、標的遺伝子の発現を抑制している (Freedman et al., 1999; Aranda et al., 2001; Gronemeyer et al., 2004; Bastien et al., 2004; Jepsen et al., 2007)。しかしながら、RA が RAR に結合すると、HDAC を含む転写抑制複合体は解離し、HAT 活性を有する p300/CBP を含む転写活性化複合体を形成し、標的遺伝子の発現を上昇させる (Freedman et al., 1999; Aranda et al., 2001; Gronemeyer et al., 2004; Bastien et al., 2004)。さらに、HDAC により制御されている遺伝子の多くは RAR の標的遺伝子であることが報告されている (Epping et al., 2007)。

胎生期の脳内において、RA 合成酵素、RA 分解酵素、RAR の発現が知られている (Mollard et al., 2000; Sakai et al., 2001; Niederreither et al., 1997; Koide et al., 2001; Sirbu et al., 2005; Rawson et al., 2007)。また、RA シグナルに応答して発現するレポーター遺伝子を組み込んだ遺伝子改変マウスの解析から、胎仔脳において神経幹細胞を含む領域で RA シグナルが活性化されていることが明らかになっている (Rawson et al., 2007; Rossant et al., 2007; Haskell et al., 2005)。また、RA 合成酵素や分解酵素、RAR の遺伝子欠損マウスは発生期中枢神経系において、前後軸の形成異常を含む脳発生障害が報告されている (Sakai et al., 2001; Sirbu et al., 2005; Halilagic et al., 2007; Dupé et al., 1999; Wendling et al., 2001; Ribes et al., 2006; White et al., 1998)。また、神経幹細胞における RA の作用として、神経幹細胞のニューロンへの分化を誘導することが知られているが、アストロサイトやオリゴデンドロサイト分化への RA の関与についてはほとんど明らかになっていない (Jepsen et al., 2007;

Takahashi et al., 1999)。

そこで本研究は、RAによるヒストンアセチル化の亢進が神経幹細胞のアストロサイト分化へ及ぼす役割とその詳細な分子メカニズムの解明を目的に研究を行ってきた。本研究により、RAがアストロサイト分化誘導因子であるLIFと相乗的に働くことで、神経幹細胞のアストロサイト分化を促進することを発見した。また、この相乗効果の詳細な分子メカニズムの解明に取り組んだところ、RAとLIFは*gfap*遺伝子プロモーターを相乗的に活性化し、その相乗効果には*gfap*遺伝子プロモーター上のRAREの関与が示唆された。RAは*gfap*遺伝子プロモーター上のSTAT3認識配列周辺領域のヒストンアセチル化が亢進し、STAT3の認識配列への結合を増強させた。さらに、ヒストンアセチル化を亢進することが知られているHDAC阻害剤バルプロ酸(VPA)がRAと同様に、LIFによる活性化したSTAT3の認識配列への結合を増強させ、アストロサイト分化を促進させることを明らかにした。以上の結果から、RAはヒストンアセチル化の亢進によるクロマチン構造の脱凝縮を誘導し、*gfap*遺伝子プロモーターへのSTAT3の結合を増強させることにより、神経幹細胞のアストロサイト分化を促進することが示唆された。

II. Materials and Methods (材料と方法)

1. 実験動物

業者によるプラグ確認日を胎生 0.5 日とした妊娠 14.5 日の ICR マウスの胎仔、または出産 1 日目の ICR マウス (日本 SLC) を使用した。本研究における実験方法は奈良先端科学技術大学院大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

2. 神経幹細胞の単離と培養

妊娠 14.5 日目の胎仔の終脳を Hank's balanced salt solution (HBSS) 中で穏やかに懸濁した。遠心により懸濁した細胞を回収した後、poly-L-ornithine と fibronectin (Sigma-Aldrich) (O/F) をコーティングした培養皿に basic fibroblast growth factor (bFGF) (10ng/ml: R&D systems Inc.) を含む N2-supplemented Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with F12 培地で 4 日間培養した (Takizawa et al., 2001; Nakashima et al, 1999b)。HBSS で洗浄した後、ピペッティングにより培養皿から細胞回収し、コーティングした 8 well チャンバースライド、60mm 培養皿、12well プレート (Nunc) に bFGF を含む培養液で播種した。また、RA (1 μ M: Sigma-Aldrich)、LIF (50ng/ml: Chemicon)、VPA (1mM: Sigma-Aldrich)、TSA (10nM-30nM: Sigma-Aldrich) を各実験に沿って添加した。

3. 免疫染色

1 well 当たり 0.8×10^5 の細胞数で O/F コートした 8 well チャンバースライド (Nunc) に神経幹細胞を播き、培養液へそれぞれ RA (1 μ M)、VPA (1mM)、TSA (10nM-30nM) を LIF (50ng/ml) と単独または同時に添加した。培養 2 日後、培地を吸引し、細胞固定液 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) を加えた。室温で 20 分間静置した後に、PBS で 1 回洗浄し、ブロッキング溶液 (0.1% triton-X100、3% FBS / PBS) を加え、室温で 30 分静置した。次にブロッキング溶液で 2000 倍希釈した rabbit anti-GFAP 抗体 (DAKO) または 500 倍希釈した mouse anti-S100 β (Sigma-Aldrich) を用いて、室温で 1 時間半、1 次抗体反応を行った。1 次抗体反応後、PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液で 500 倍希釈した Donkey anti-rabbit-IgG Cy3-conjugated 2 次抗体 (Jackson)、Alexa488-conjugated 2 次抗体 (Molecular Probes) を用いて、室温で 1

時間半、2次抗体反応を行った。2次抗体反応後、PBSで3回洗浄し、PBSで希釈したHoechst33258 (1 μ g/ml:Nacalai Tesque)を用いて、室温で10分間静置し核染色を行った。PBSで1回洗浄後、shandon Immu-Mount (Thermo electron #9990412)をカバーガラスの上に載せ、気泡が入らないようにカバーガラスをかけた後、マニキュアで封入した。作成したスライドは、蛍光顕微鏡 (Axiovert 200M ;Zeiss)で観察した。

4. RT-PCR

神経幹細胞をO/Fコートした60mmの培養皿に 2×10^6 の細胞数で播種した。翌日、RA (1 μ M)またはLIF (50ng/ml)を添加し、8時間培養した細胞からSepazol (Nacalai Tesque)を用いてTotal RNAを回収した。回収したTotal RNAはSuper Script II (Invitrogen)を用いて逆転写反応しcDNAを合成した。その後、Amplify Gold (Applied Biosystems)によりPolymerase chain reaction (PCR)反応を行った。PCR反応は下記のプライマーを用いて行った。

For RT-PCR

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
RAR α 1	tacgccttcttcttcccc	tgtagctctctgagcactc
RAR α 2	cttttataaccagaaccgggc	tgtagctctctgagcactc
RAR β 1	tggacacatgactcactacc	tctctgtgcattcctgctttg
RAR β 2	atgttctgtcagtgagtecc	tctctgtgcattcctgctttg
RAR γ 1	agatgctgagccctagcttc	ttacagcttccttggacatgcc
RAR γ 2	ttactacgcagagccactgg	ttacagcttccttggacatgcc
RXR α	caatggcgtcctcaagggttc	actccacctcgttctcattc
RXR β	caactccacagtgtcgtctcc	ccgttgacgctcctcctgaa
RAR γ	cgctgccagtagtctcgtctac	tggcataaaccttctctcgaagagt
G3PDH	accacagtccatgccatcac	tccaccacctgttgctgta
GFAP	cacgaacgagtccttagagc	tcacatcaccacgtccttg

5. Luciferase assay

神経幹細胞をO/Fコートした12Wellプレートに1Wellあたり 4×10^5 の細胞数で播種した。翌日、レポーター及び優性抑制型STAT3を

TransIT-LT1 を用いて遺伝子導入した。レポーターとして、*gfap* 遺伝子プロモーターの転写開始点上流約 2.5b (GF1L) (Nakashima et al., 1999b)、1.9b (GF1LB) (Nakashima et al., 1999b) の下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター、GF1L 内の STAT3 認識配列を 4 塩基置換した変異レポーター (GF1L-SBSPM) (Takizawa et al., 2001)、RARE に 4 塩基置換した変異レポーター (GF1L-RAREPM) を用いた。内部コントロールとして、ヒト elongation factor 1 α の遺伝子発現制御領域の下流にウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター (R-luc) を同時に遺伝子導入した (Nakashima et al., 1999b)。また、STAT3 の活性化を抑制するために優性抑制型の STAT3 を共発現させた (Nakashima et al., 1999b)。翌日、RA (1 μ M)、LIF (50ng/ml) で 8 時間刺激した細胞を、Dual Luciferase reporter assay system (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。測定機器として Wallac 1420 ARVO/Light (PerkinElmer Life and Analytical Science) を使用した。

6. クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

ChIP 法は Upstate Biotechnology により報告されている方法に従った。神経幹細胞を O/F コートした 60mm 培養皿に 2×10^6 の細胞数で播種した。翌日、RA (1 μ M) または VPA (1mM) を添加し 1 時間後に、LIF (50ng/ml) で 20 分間刺激した。神経幹細胞は終濃度 1% のホルムアルデヒドで 10 分間固定した後、PBS で回収し、プロテアーゼ抑制剤 (Nacalai Tesque) を含む溶解液 (1% SDS、10mM EDTA、50mM Tris-HCl [pH 8.1]) で細胞を溶解した。細胞溶解液は超音波破碎装置 SONIFIER450 (BRANSON) を用いてゲノム DNA を 500-1000bp に切断した (出力 3 で 10 秒処理後、45 秒氷中でチューブを冷却。3 サイクル)。上記処理を行った細胞溶解液を 12000rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心後、上清 180 μ l を 2ml チューブに回収し、ChIP dilution buffer (50mM Tris-HCl (pH8.1)、167mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% NaDOC) を 1800 μ l 加え軽く混合した。この時、インプットとして全量の 2.5% を分注し -30 度で保存した。非特異的結合を減少させるために残りの試料を Salmon sperm DNA/protein A agarose (Upstate Biotechnology) と前反応を行った後、2 μ g の抗アセチル化 H3 抗体 (Upstate Biotechnology)、抗 STAT3 抗体、抗 RAR α 抗体、抗 RAR β 抗体、抗 RXR 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗原抗体反応のコントロールとして control IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を混合後、4 $^{\circ}$ C で一晩ローテートした。

翌日、免疫複合体を 50 μ l の Salmon sperm DNA/protein A agarose により回収し、次の洗浄液により洗浄した。Low-Salt buffer (50mM Tris- HCl (pH8.0)、150 mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、0.001% SDS、0.001% NaDOC)、High-Salt buffer(50mM Tris-HCl(pH8.0)、500 mM NaCl、1mM EDTA、1% Triton X-100、0.001% SDS、0.001% NaDOC)、LiCl wash buffer (250mM LiCl (nacalai tasque)、5mM NP-40、0.5% NaDOC、1mM EDTA、10mM Tris-HCl (pH8.0))、TE buffer (10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA (pH8.0)) で 2 回洗浄し、Input サンプルと共に Direct elution buffer (0.5% SDS、10mM Tris-HCl (pH8.0)、5 mM EDTA、0.3M NaCl) を 250 μ l 加え、65 $^{\circ}$ C で 4 時間または、一晩加温した。翌日、RNA 分解酵素 RNase A (10mg/ml ; nacalai tasque) を 1 μ l 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間加温した。次にプロテアーゼ K (10mg/ml; nacalai tasque) を 1 μ l 加え、45 $^{\circ}$ C で 1 時間加温した。PCI (Nacalai tesque) によりタンパク質を除去した後、TE 50 μ l で溶解した。PCR は RT-PCR と同様の方法で行った。また、qPCR は SYBR-premix ExTaq II を用いて、以下に使用した primer の配列を示す。PCR 反応は、RT-PCR 法における逆転写後の PCR の条件と同様に行った。

PCR for ChIP

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
RARE 周辺	cacaggaggtgtggtggcta	ggtttgcagcaacgctgga
STAT3 認識配列周辺	taagctgaagacctggcagtg	tgctgaatagagccttgttctc

qPCR for ChIP

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
RARE 周辺	gcttaaggctggaagacacag	ctggatctaggacttgcttctg
STAT3 認識配列周辺	tgactcaccttgcatagacat	ctgcttttatcccaggatgc

7. In vivo electroporation

生後 1 日目のマウス前脳側脳室に DNA 混合液 (pGL3 promoter と pRL-CMV (Promega)、または pGL3-RARE (AGGTTACCGAAAGTTCAC TCG \times 3) と pRL-CMV) を優性抑制型 RAR (pCAG-RAR403) と共にをインジェクションした。その後、Square-pulse electroporator (CUY21-EDIT;Nepa gene) を用いてエレクトロポレーションした (66V 50ms-間

隔-950ms×6回)。この作業を二度繰り返した。24時間後、エレクトロポレーションした片脳を回収し、Dual luciferase reporter assay system によりルシフェラーゼ活性を測定した。

8. Western blotting

293T 細胞を DMEM/10%FBS 培養液で播種した。翌日、TransIT-293 を用いて発現コンストラクト（pEF-Myc-RAR α 、pEF-N-CoR-FLAG、pCMV β -p300-HA）を遺伝子導入し 48 時間培養した。RA で 3 時間刺激した後、細胞を溶解した。細胞溶解液を 1 μ g の抗 Myc 抗体により免疫沈降を行った。免疫沈降産物と全タンパク質は SDS-PAGE により分離した後、抗 FLAG 抗体（Sigma-Aldrich）、抗 hemagglutinin（HA）抗体（Santa Cruz Biotechnology Inc.）を用いて検出した。

III. Results (結果)

1. 神経幹細胞は RARs と RXRs を発現している。

本研究は核内受容体ファミリーに属する RAR を介した RA シグナルの胎生後期神経幹細胞の細胞系譜への役割とその分子基盤の解明を目的にしている。まず RA シグナルによる神経幹細胞の細胞系譜への役割を検討する前に、本研究で用いている初代培養系の胎生期神経幹細胞で RARs や RXRs を発現の有無を RT-PCR 法により確認した。RAR と RXR にはそれぞれ 3 つの異なった遺伝子 (α 、 β 、 γ) があり、スプライシングの違いによる幾つかのアイソフォームが存在する。そこで様々な種類の RAR と RXR 認識する特異な配列を持つプライマーを設計し、それらを用いた RT-PCR 法により、神経幹細胞の RAR および RXR の発現を確認した。電気泳動にてそれらの発現を調べたところ、RAR α 、RAR β 、RAR γ 、RXR α 、RXR β 、RXR γ 、並びに RAR の各アイソタイプ 1 と 2 の発現が確認された (図 1)。この結果、胎生期神経幹細胞は RA シグナルへの応答能を有していることが示唆された。

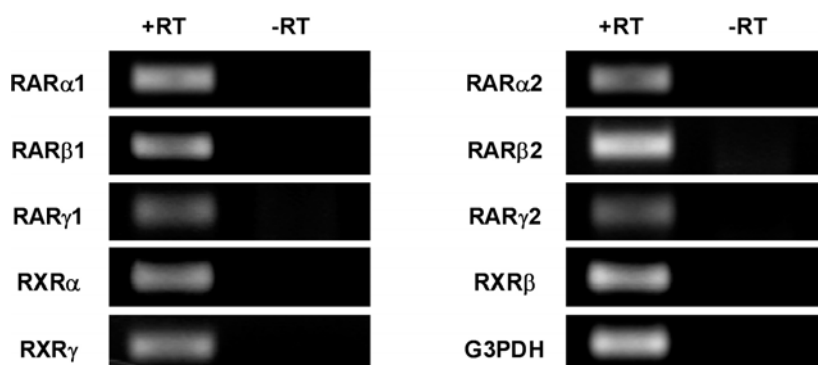


図 1.胎生期神経幹細胞の RARs、RXRs の発現

胎生 14.5 日目の終脳由来の神経前駆細胞から Total RNA を回収し、RAR α 、RAR β 、RAR γ 、RXR α 、RXR β 、RXR γ mRNA を特異的に認識するプライマーを用いた RT-PCR 法により解析した。

2. RA と LIF は相乗的に神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導する

1. で示されたように胎生期神経幹細胞では、各 RARs、RXRs が発現しており RA シグナルが神経幹細胞の遺伝子発現に影響している可能性が考えられる。そこで次に、神経幹細胞のアストロサイト分化における RA の作用を検討した。神経幹細胞のアストロサイト分化は LIF

などの IL-6 ファミリーサイトカインによる誘導と、その下流転写因子 STAT3 の活性化が必須であることが知られている。また、LIF により活性化した下流転写因子 STAT3 は、BMP2 のような全く異なる細胞外因子の下流転写因子 Smad1 と協調的に働くことで相乗的にアストロサイト分化を促進することが知られている (Nakashima et al., 1999b)。本研究においても、RA が他の細胞外因子と協調的に働くことで作用していることも考えられる。そこで、胎生期神経幹細胞を RA 及び LIF を単独添加、または同時に添加し 2 日間培養した後、アストロサイト特異的遺伝子 GFAP を認識する抗 GFAP 抗体を用いた免疫染色法により神経幹細胞のアストロサイトへの分化傾向を観察した。その結果、RA 単独添加群では GFAP 陽性細胞は観察されなかったものの (図 2A,B)、RA と LIF の同時添加群において、LIF 単独添加群と比較して GFAP 陽性細胞の劇的な増加が観察された (図 2 C,D)。実際に総細胞数における GFAP 陽性細胞数を測定すると、LIF 単独添加群では約 2% であったのに対して、RA と LIF の同時添加群は約 10% と劇的な増加が見られた (図 2 E)。

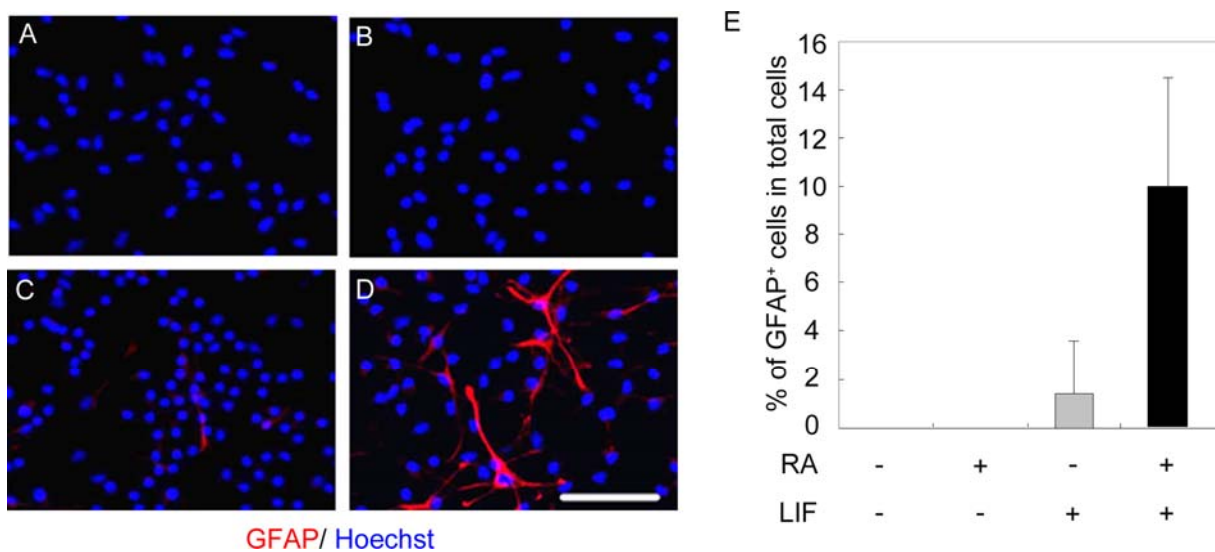


図 2. 神経幹細胞の RA と LIF による細胞系譜

胎生期神経幹細胞を A) 未処理、B) RA (1 μM)、C) LIF (50 ng/ml)、D) RA (1 μM) + LIF (50 ng/ml) 存在下で 2 日間培養後固定した。その細胞を抗 GFAP 抗体 (赤) と Hoechst33258 (青) を用いて染色し観察した。Scale bar = 50 μm E) 全細胞における GFAP 陽性細胞数の割合を示した。

次に、GFAP 以外のアストロサイト特異的遺伝子の発現が RA により制御されているかを検討するために、他のアストロサイト特異的遺伝

子 S100 β の発現を免疫染色法により観察した。その結果、RA 単独添加により GFAP 陽性細胞の増加は観察されなかったのに対し、S100 β 陽性細胞は RA 単独添加により有意に増加していた（図 2 A,B、図 3）。これは S100 β が GFAP より早期に発現する遺伝子であり、S100 β 発現に必要な構成因子が既に存在しているため RA 単独添加で発現誘導されたのではないかと考えられる（Burette et al., 1998）。

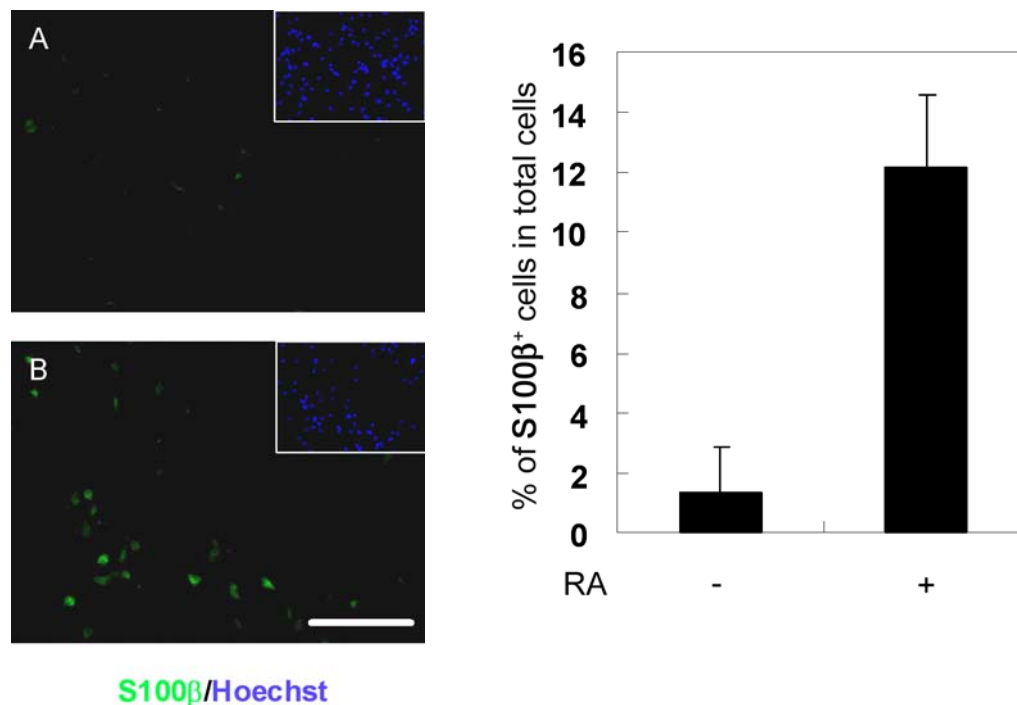


図 3. 神経幹細胞の RA による S100 β の発現

胎生期神経幹細胞を A) 未処理、B) RA (1 μ M) 存在下で 2 日間培養後固定した。その細胞を抗 S100 β 抗体（緑）と Hoechst33258（青）を用いて染色し観察した。Scale bar= 50 μ m

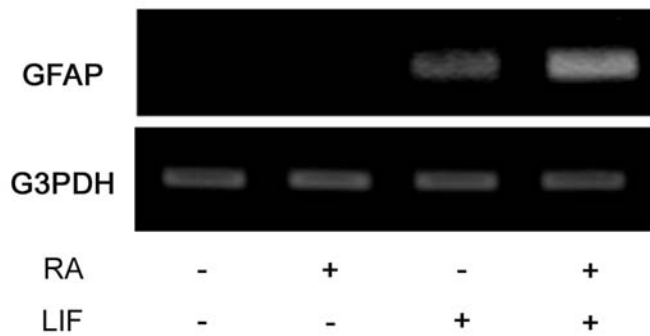
E) 全細胞における S100 β 陽性細胞数の割合を示した。

これらの結果は、RA の単独添加群で GFAP 陽性細胞が観察されなかったことから、RA はアストロサイト分化誘導因子ではないことが考えられる。しかしながら、RA と LIF の同時添加群において劇的な GFAP 陽性細胞の増加が観察されたことから、RA は LIF による神経幹細胞の GFAP 陽性アストロサイト分化を促進する作用があることが示唆された。

3. RA と LIF は相乗的に GFAP プロモーターを活性化する

2で示されたように、RAはLIFによる神経幹細胞のアストロサイト分化を促進する作用があることが示唆された。次に、この分子基盤を解明するため、*gfap* 遺伝子の転写制御に注目して解析を進めることにした。RAは核内受容体であるRARを介したシグナルにより転写制御をしていることが知られている (Freedman et al., 1999; Aranda et al., 2001; Gronemeyer et al., 2004; Bastien et al., 2004; Jepsen et al., 2007)。そこで、RAが*gfap* 遺伝子の転写を促進しているかをRT-PCR法により検討した。その結果、RA単独添加群ではほとんど変化がないのに対して、RAとLIFの同時添加群ではLIF単独添加群と比較して*gfap* mRNA量の劇的な増加が検出された (図4A)。この結果は、免疫染色法による結果と同様に、RAはLIFと協調的に働くことで神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子の発現を促進することを明らかにした。さらに*gfap* 遺伝子プロモーター活性への関与を検討するために、転写開始点から上流約2.5kbを*gfap* 遺伝子プロモーターとし、ルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポーターコンストラクト (GF1L) を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した (Takizawa et al., 2001; Nakashima et al., 1999b)。その結果、RA単独添加群は*gfap* 遺伝子プロモーターをわずかに活性化させたのに対して、RAとLIFの同時添加はLIF及びRAの単独添加群と比較して劇的な*gfap* プロモーター活性の上昇が測定された (図4B)。これらの結果から、RAとLIFは協調して働くことにより*gfap* 遺伝子プロモーターを相乗的に活性化していることが示唆された。

A



B

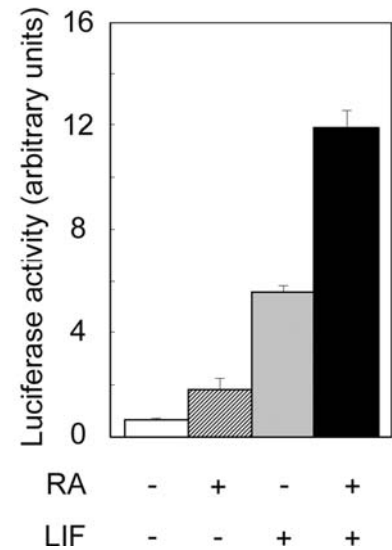


図4. RAとLIFによる転写とプロモーター活性

A) 神経神経幹細胞をRA、LIF、RAとLIFの同時により処理し8時間培養した。それらの細胞からTotal RNAから回収し、*gfap*と*g3pdh*を特異的に認識するプライマーを用いてRT-PCR法により解析した。

B) 転写開始点から上流約2.5kbの*gfap*遺伝子プロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター(GF1L)と内部コントロールとしてR-Lucを神経幹細胞に導入し、RA及びLIFにより8時間刺激しルシフェラーゼ活性を測定した。

4. STAT3の活性化はRAとLIFによる*gfap*遺伝子プロモーターの相乗的活性化に必須である

STAT3はLIFを含むIL-6ファミリーサイトカインによるアストロサイト分化のために必須な下流転写因子として働いている。LIFは細胞膜上の受容体に結合することにより細胞質に存在する転写因子STAT3を活性化し、活性化したSTAT3は核内に移行した後、*gfap*プロモーター上に存在するSTAT3認識配列に結合することにより*gfap*の転写を活性化することが知られている(Takizawa et al., 2001; Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999a, Nakashima et al., 1999b)。そこで、STAT3の活性化がRAとLIFによる*gfap*プロモーターの相乗的活性化に必須であるかを確認するために、内在性STAT3の活性化(705番目のチロシン残基のリン酸化)を抑制することが報告されている優性抑制型STAT3(DN-STAT3; Tyr⁷⁰⁵→Phe⁷⁰⁵) (Nakashima et al., 1999b)を神経幹細胞内に過剰発現させ、GF1Lを用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、DN-STAT3の過剰発現はLIF単独添加群のみではなく、

RA と LIF による *gfap* プロモーターの相乗的な活性化も劇的に減少させた (図 5)。この結果は、STAT3 の活性化が RA と LIF による *gfap* プロモーターの相乗的な活性化に必須であることを明らかにした。

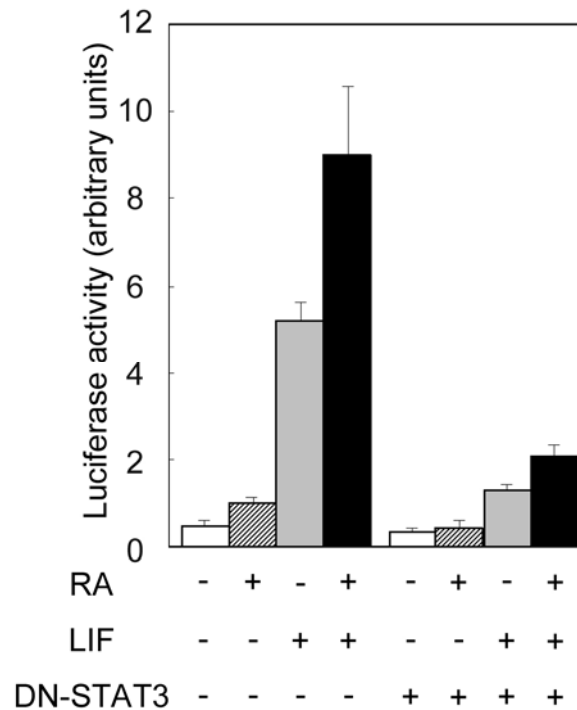


図 5. 優性抑制型 STAT3 を用いた *gfap* 遺伝子プロモーター活性の測定

神経幹細胞に GF1L と R-Luc と共に優性抑制型 STAT3 (DN-STAT3) を過剰発現し、RA および LIF により 8 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

5. STAT3 の認識配列への結合は RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化に必須である

IL-6 ファミリーサイトカインによる *gfap* 遺伝子プロモーターの活性化には、転写開始点から上流約 1.5kb に存在する STAT3 認識配列が重要である。そこで、RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的な活性化に *gfap* 遺伝子プロモーターへの STAT3 の結合が必須であるかを検討するために、*gfap* 遺伝子プロモーターの STAT3 認識配列に変異を導入したレポーターコンストラクト (GF1L-SBSPM: TTCCGAGAA → CCAAGAGAA) を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、STAT3 認識配列への変異の導入により LIF 単独添加群のみ

ではなく、RA と LIF による *gfap* プロモーターの相乗的な活性化も劇的に減少させた (図 6A,B)。以上により、*gfap* 遺伝子プロモーター上への STAT3 の結合が RA と LIF による *gfap* プロモーターの相乗的な活性化に必須であることを明らかになった。

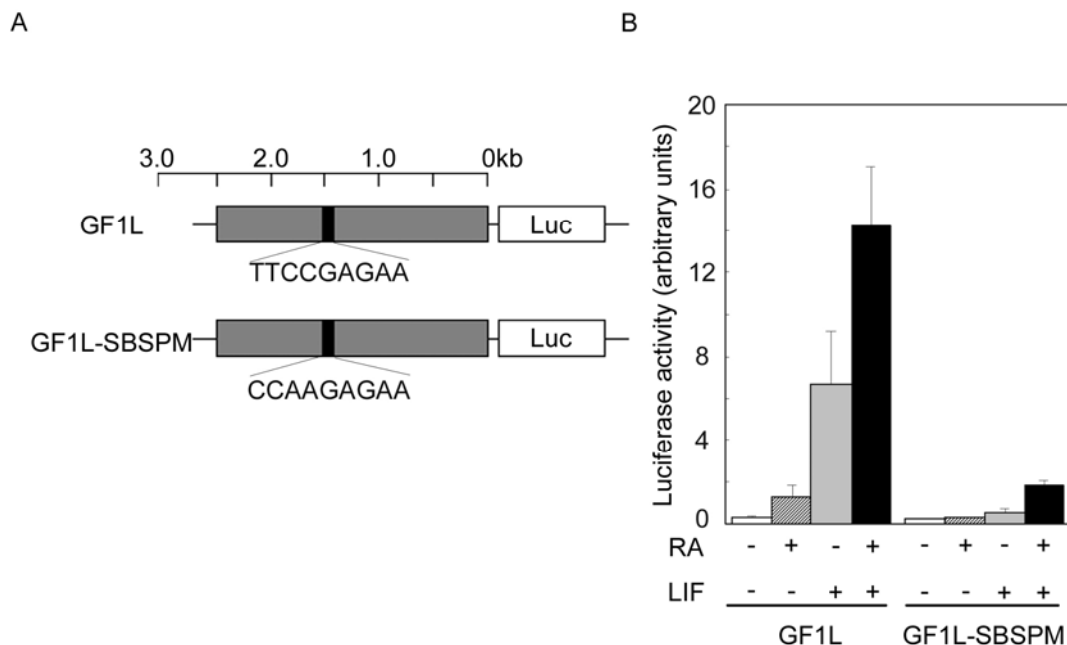


図 6 . STAT3 認識配列変異レポーターを用いた *gfap* 遺伝子プロモーター活性の測定

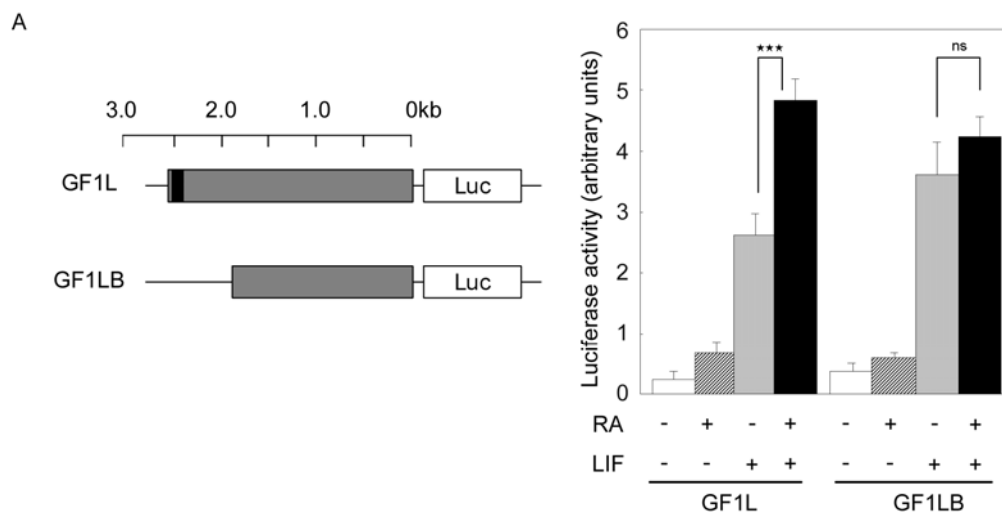
A) 転写開始点から上流約 2.5kb の *gfap* 遺伝子プロモーターを組み込んだレポーターコンストラクト (GF1L) と上流約 1.5kb 付近の STAT3 認識配列に 4 塩基変異を導入したレポーターコンストラクト (GF1L-SBSPM) の模式図

B) GF1L と GF1L-SBSPM を神経幹細胞に導入し、RA 及び LIF により 8 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

6 . *Gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE は RA と LIF による相乗的活性化に関与している。

次に RA シグナルが RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化にどのように関与しているかを検討することにした。RA は核内受容体である RAR を介して転写制御していることが知られている。RAR は RXR とヘテロダイマーを形成し、RA 受容体応答配列 RARE に結合している。RA 非存在下において、RAR/RXR は転写共抑制因子である N-CoR や SMRT と共に複合体を形成し転写を抑制している。RA

存在下では、RAR/RXR に転写共活性化因子である p300/CBP や PCAF と結合し転写を促進していることが知られている (Freedman et al., 1999; Jepsen et al., 2007; Xu et al., 1999; Perissi et al., 1999)。そこで、*gfap* 遺伝子プロモーターを解析した所、転写開始点から上流約 2.5kb 付近に推定される RA 受容体応答配列 (RARE) (AGTTCAAGGTCA) を同定した。そこで、*gfap* 遺伝子プロモーター上のこの RARE が RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化に重要であるかを検討するために、RARE を含まない転写開始点から上流約 1.9kb のレポーターコンストラクト (GF1LB) (Nakashima et al., 1999b) または推定上の RARE に変異を導入したレポーターコンストラクト (GF1L-RAREPM : AGTTCAAGGTCA→AGTTTGGAGTCA) を用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した。その結果、RA と LIF の同時添加群と LIF 単独添加群のルシフェラーゼ活性を比較した所、RA による LIF 誘導性活性の上昇を確認することはできなかった (図 7A,B)。この結果から、*gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE は RA と LIF による相乗的なプロモーターの活性化に関与していることが示唆された。



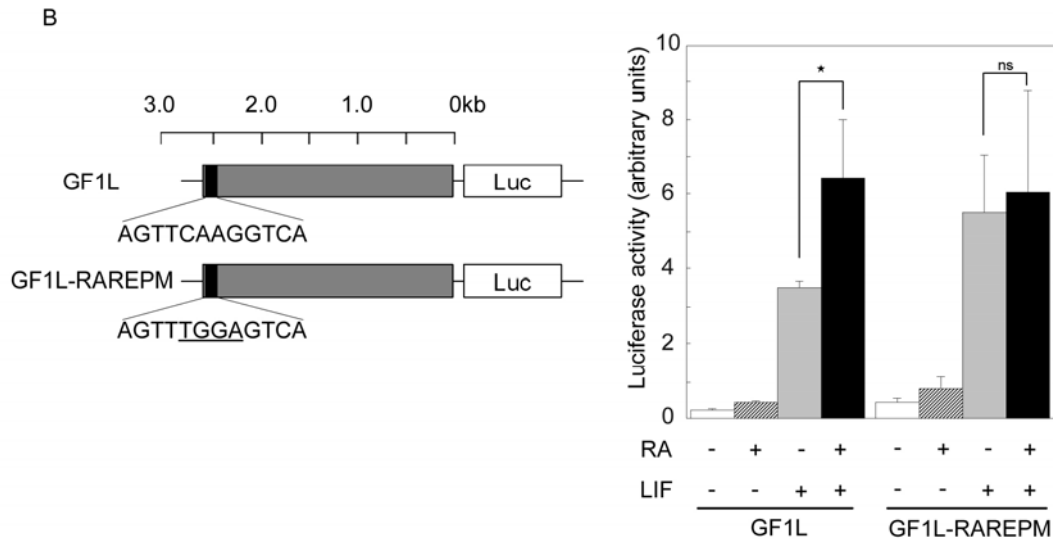


図 7. RARE 欠損型及び変異型レポーターを用いた *gfap* 遺伝子プロモーター活性の測定

A) *gfap* 遺伝子の転写開始点から上流約 2.5kb 付近の推定される RARE を含まない上流約 1.9kb の RARE 欠損型レポーターコンストラクト (GF1LB) または GF1L を R-Luc と共に神経幹細胞に導入し、RA および LIF で 8 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。(P=.143)

B) *gfap* 遺伝子プロモーター中の推定される RARE に 4 塩基変異を導入した変異型レポーターコンストラクト (GF1L-RAREPM) または GF1L を R-Luc と共に神経幹細胞に導入し、RA および LIF で 8 時間刺激し、ルシフェラーゼ活性を測定した。(P=.248)

7. *Gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE には RAR α 、RAR β 、RXR が結合している。

gfap 遺伝子プロモーター上の RARE が RA と LIF による相乗的なプロモーターの活性化に関与していることが示唆されたことから、RARs や RXRs が *gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE に結合していることが示唆された。そこで、*gfap* プロモーター上の RARE に RAR/RXR が結合しているかを検討するために、RAR α 、RAR β 、RXR を特異的に認識する抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により解析した。その結果、*gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE 周辺領域において RAR α 、RAR β 、RXR の結合が検出された (図 8A)。これらの結果は、*gfap* 遺伝子プロモーター上の推定上の RARE に RAR/RXR が結合しており、機能していることを示唆している。

7. 新生仔の前脳領域の細胞は RA シグナルに応答している

マウスにおけるアストロサイト産生は胎生後期から生後にかけて産生されることが知られているが、その中でも生後1-3日の時期にアストロサイトが最も産生されることが報告されている (Sauvageot et al., 2002; Parissi et al., 1999)。そこで、アストロサイト産生時期である生後1日目の脳内の細胞で実際にRAシグナルが活性化されているかどうかを検討することにした。まず、生体内においても *gfap* 遺伝子プロモーター上に RAR/RXR が結合していることを確認するために P1 マウスの前脳からの試料を RAR α 、RAR β 、RXR を特異的に認識する抗体を用いた ChIP 法により解析した。その結果、P1 マウスの前脳領域においても、*gfap* 遺伝子プロモーターの RARE 周辺領域に RAR/RXR が結合していることを明らかとなった (図 8B)。

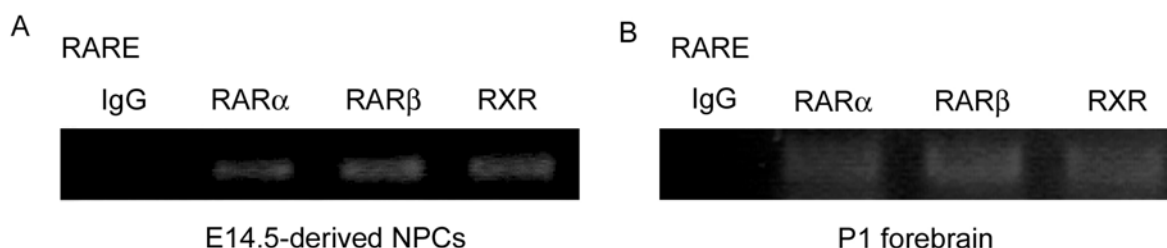


図 8. 胎生期神経幹細胞および P1 前脳の細胞における *gfap* 遺伝子プロモーターへの RAR/RXR 結合の検討

E14.5 由来神経幹細胞と P1 前脳からの細胞をホルムアルデヒドにより固定した後、抗 RAR α 抗体、抗 RAR β 抗体、抗 RXR 抗体、コントロール IgG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法による検討

次に、前脳領域の細胞が生体内の RA に応答しているかを検討するために、RA に応答して上昇する 3 × RARE をルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポーターコンストラクト (pGL3-RARE) またはコントロールコンストラクト (pGL3-promoter) を P1 マウス前脳にエレクトロポレーションにより導入した。また、RAR α の活性化ドメインを欠損させた優性抑制型 RAR α (RAR403) を同時に導入した (Ghaffari et al., 1999)。その結果、コントロールコンストラクトと比較して、RARE を含むレポーターは約 7 倍のルシフェラーゼ活性を示した。さらに、

RAR403 によりその RARE によるルシフェラーゼ活性の上昇が完全に抑制された (図 9)。これらの結果、アストロサイト産生期の脳内においても、神経幹細胞のアストロサイト分化に RA シグナルが関与していることが示唆された。

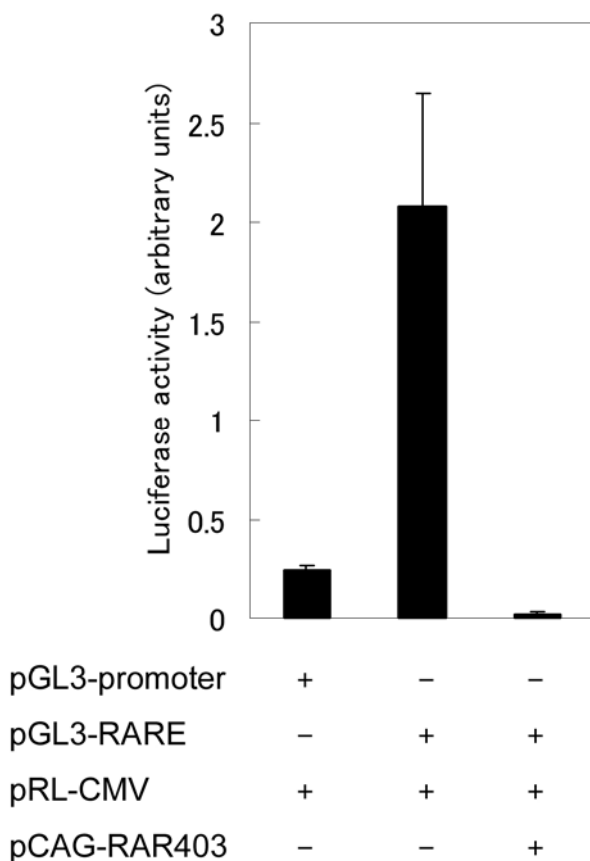


図 9 . In vivo エレクトロポレーション法を用いた新生仔前脳領域の RA シグナル活性の測定

生後 1 日目 (P1) のマウス前脳に 3 × RARE をルシフェラーゼ遺伝子の upstream に組み込んだ RARE レポーター (pGL3-RARE) または pGL3-promoter を pRL-CMV および pCAG-RAR403 と共にインジェクションし、エレクトロポレーション法により P1 マウス前脳に導入した。翌日、導入した側の片脳を溶解し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

8 . RA は *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストン H3 アセチル化を亢進する

RAR/RXR に RA が結合すると N-CoR を含む転写抑制複合体が解離すると共に、HAT 活性を有する p300/CBP を含む転写活性化複合体を形成

することで転写を正に制御することが知られている (Freedman et al., 1999; Jepsen et al., 2007; Xu et al., 1999; Perissi et al., 1999)。そこでまず、報告されているこの RA シグナル伝達機構の再現性をとるために、293T 細胞に Myc-RAR α 、N-CoR-FLAG、p300-HA を過剰発現し、RA 添加した細胞の全タンパク質を免疫沈降し、ウエスタンブロッティング法により解析した。その結果、他の研究グループからの報告と同様に、RA 非存在下においては RAR に転写共抑制因子である N-CoR と結合していたのに対して、RA を添加すると RAR と N-CoR との結合は減弱し、p300 との結合が増強した (図 10)。

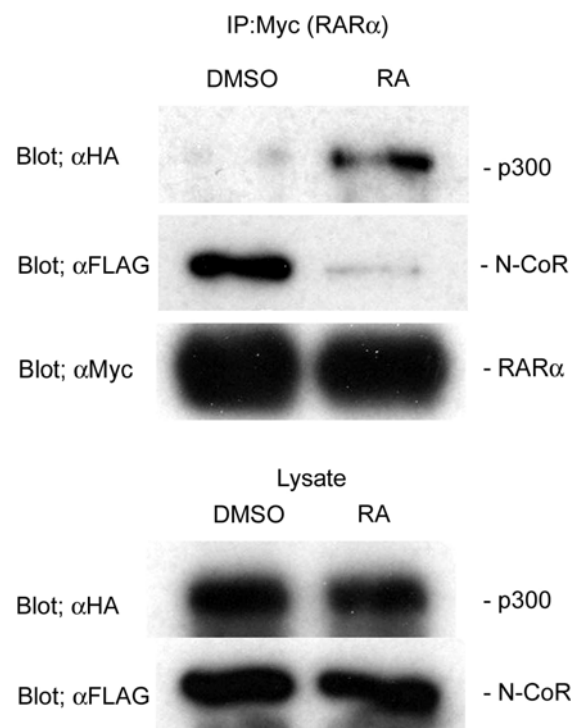


図 10. RA による RAR α 上の関与因子の交換

293T 細胞に pEF-Myc-RAR α 、pEF-N-CoR-FLAG and pCMV β -p300-HA を遺伝子導入し 48 時間培養した。その細胞を RA で 3 時間刺激し細胞溶解した。細胞溶解液は抗 Myc 抗体を用いて免疫沈降した後、SDS-PAGE により分離し、抗 HA 抗体、抗 FLAG 抗体、抗 Myc 抗体を用いて免疫反応させ検出した。

ヒストンアセチル化はアセチル基が持つ電荷作用により、クロマチンが脱凝縮し、転写を促進することが知られている (Li et al., 2007;

Bjorkund et al., 1999)。そこで、RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的な活性化にヒストンアセチル化が関与しているかを検討するためにヒストンアセチル化を特異的に認識する抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP 法により *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストンアセチル化の変化を検討した。その結果、RA 添加は *gfap* 遺伝子プロモーターの RARE 周辺領域におけるヒストンアセチル化を約 3 倍増加させた。さらに、RA は RARE 周辺領域のみではなく、STAT3 認識領域のヒストンアセチル化も亢進させることが明らかになった(図 11A B)。この結果から、RA によるヒストンアセチル化の亢進により、STAT3 認識領域を含む *gfap* 遺伝子プロモーターが脱凝縮していることが示唆された。

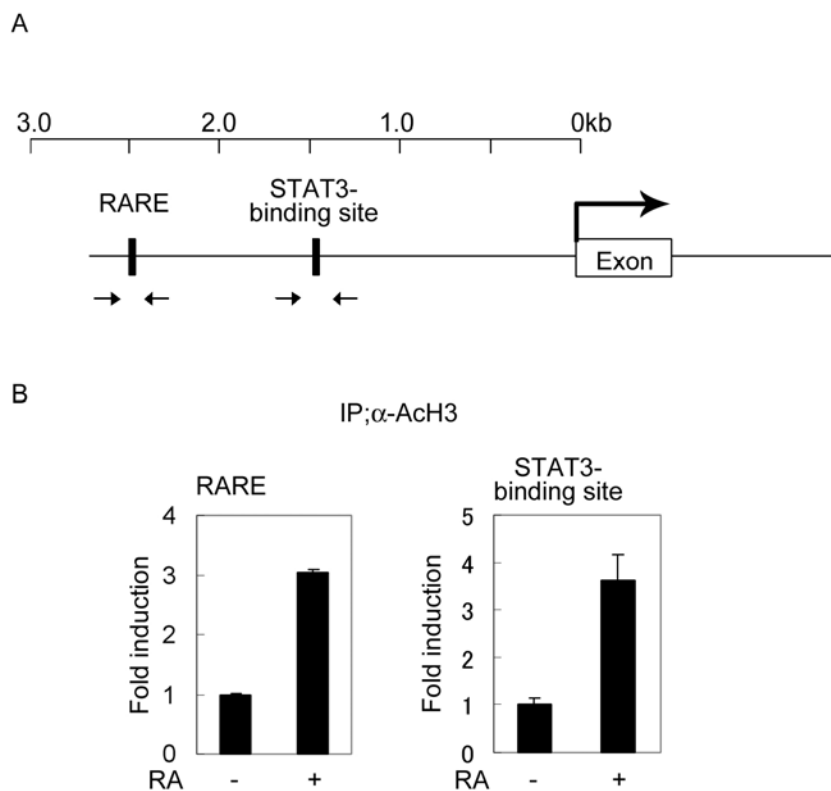


図 1 1 . *gfap* 遺伝子プロモーターのヒストン H3 のアセチル化への RA の作用

A) *gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE および STAT3 認識配列の模式図。矢印は図 11B 及び図 12 の ChIP 法で用いたプライマーの位置を示している。

B) 神経幹細胞を RA により 20 分間刺激し、抗アセチル化ヒストン H3 抗体またはコントロール IgG を用いて ChIP 法を行い、*gfap* 遺伝子プロモーター上の RARE 周辺及び STAT3 認識配列周辺領域を増幅するプライマーを用いた qPCR により解析した。

9 . RA は *gfap* 遺伝子プロモーター上への STAT3 の結合を増強する

RA が STAT3 認識配列を含む *gfap* 遺伝子プロモーターのヒストンアセチル化を亢進することが明らかになり、*gfap* 遺伝子プロモーターのクロマチンが脱凝縮していることが考えられた。この RA によるクロマチンの脱凝縮は STAT3 の認識配列への結合を増強していることが予測された。そこで、RA により、STAT3 の *gfap* 遺伝子プロモーター上の認識配列への結合の変化を検討するために、抗 STAT3 抗体を用いた ChIP 法により解析した。その結果、LIF 単独添加群と比較し、RA と LIF の共添加群は STAT3 の結合の増強が検出された (図 12)。これらの結果、RA と LIF による相乗的アストロサイト分化促進機構における RA の作用機序は、ヒストンアセチル化を介したクロマチンの脱凝縮により、STAT3 の認識配列への結合を増強させた結果であることが示唆された。

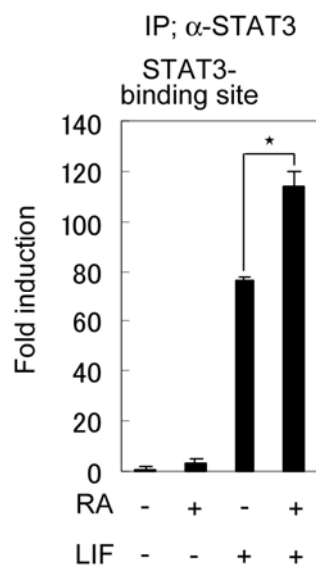


図 1 2 . *Gfap* 遺伝子プロモーターへの STAT3 の認識配列への RA の作用

神経幹細胞を RA および LIF により 20 分間刺激し、抗 STAT3 抗体またはコントロール IgG を用いて ChIP を行い、*gfap* 遺伝子プロモーター上の STAT3 認識配列周辺領域を増幅するプライマーを用いた qPCR により解析した。

1 0 . HDAC 抑制剤は神経幹細胞のアストロサイト分化を促進する。

ヒストンのアセチル化は p300 などの HAT によりアセチル化され、HDAC により脱アセチル化される可逆的な反応である。そのため、HDAC 阻害剤として知られているバルプロ酸 (VPA) やトリコスタチン A (TSA) による HDAC の阻害はヒストンアセチル化を亢進することが知られている (Gottlicher et al., 2001)。そこで、HDAC 抑制剤によるヒストンアセチル化の亢進が、神経幹細胞のアストロサイト分化を促進するかを検討するために、VPA 及び TSA を LIF と同時に添加し 2 日間培養した細胞の分化傾向を免疫染色法により観察した。その結果、VPA 及び TSA 単独添加では GFAP 陽性細胞は観察されなかったが、LIF 単独添加群と比較して、VPA と LIF の同時添加群および TSA と LIF の同時添加群において、劇的な GFAP 陽性細胞の増加が観察された (図 13 A-E、 図 14)。これらの結果、HDAC 阻害剤は RA と同様に、LIF による神経幹細胞のアストロサイト分化を促進することを明らかになった。

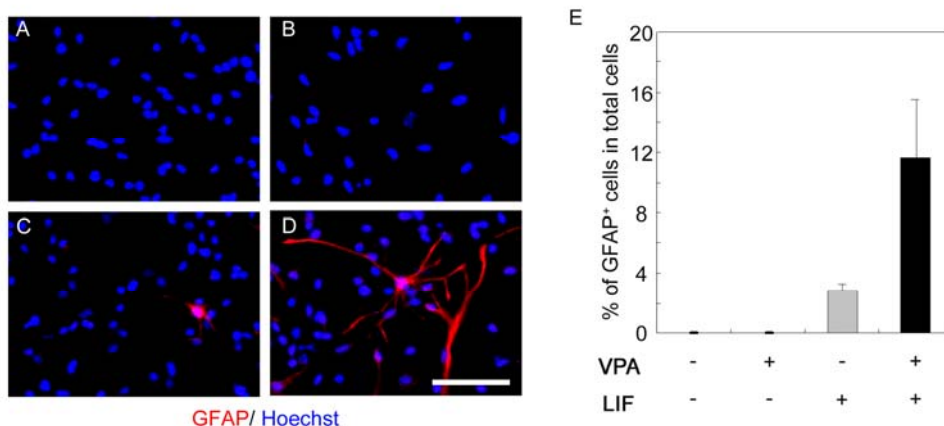


図 1 3 . 神経幹細胞の VPA と LIF による細胞系譜

胎生期神経幹細胞を A) 未処理、B) VPA (1mM)、C) LIF (50ng/ml)、D) VPA (1mM) + LIF (50ng/ml) 存在下で 2 日間培養後固定した。その細胞を抗 GFAP 抗体 (赤) と Hoechst33258 (青) を用いて染色し観察した。Scale bar = 50 μ m E) 全細胞における GFAP 陽性細胞数の割合を示した。

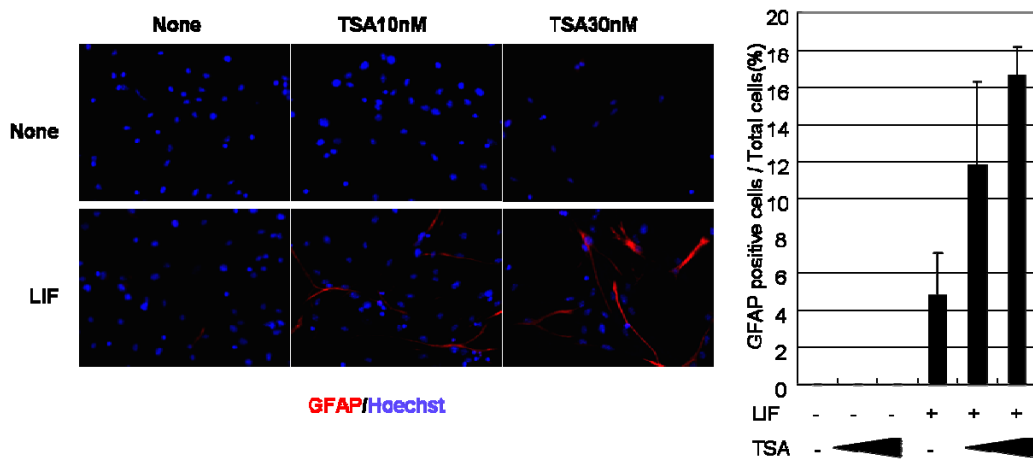


図 1 4 . 神経幹細胞の TSA と LIF による細胞系譜

胎生期神経幹細胞を A) 未処理、B) TSA (10nM,30nM)、C) LIF (50ng/ml)、D) TSA (10nM,30nM) + LIF (50ng/ml) 存在下で 2 日間培養後固定した。その細胞を抗 GFAP 抗体 (赤) と Hoechst33258 (青) を用いて染色し観察した。E) 全細胞における GFAP 陽性細胞数の割合を示した。

次に実際に VPA が *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストンアセチル化を亢進しているかを確認するために、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いた ChIP 法により解析した。その結果、VPA 処理により *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストンアセチル化が亢進していることを確認した (図 14A)。さらに、VPA によるヒストンアセチル化の亢進が STAT3 の認識配列への結合に変化を与えているかを検討するために抗 STAT3 抗体を用いた ChIP 法により解析した。その結果、LIF 単独添加群と比較し、VPA と LIF の同時添加群で STAT3 の認識配列への結合の増強が検出された (図 14B)。

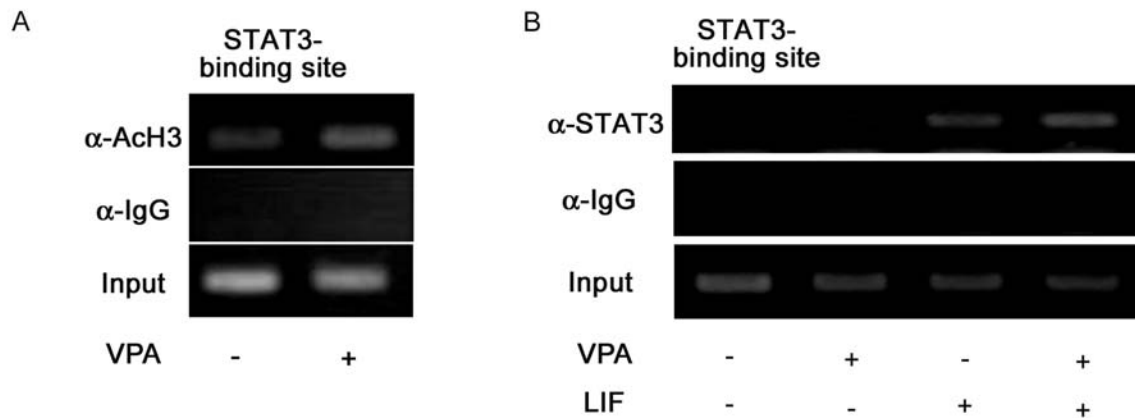


図 15. *gfap* 遺伝子プロモーターのヒストンアセチル化と STAT3 の認識配列へ結合への VPA の作用

A) 神経幹細胞を VPA で刺激し、抗アセチル化ヒストン H3 抗体またはコントロール IgG を用いて ChIP 法を行い、*gfap* 遺伝子プロモーター上の STAT3 認識配列周辺領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。

B) 神経幹細胞を VPA もしくは LIF で刺激し、抗 STAT3 抗体またはコントロール IgG を用いて ChIP 法を行い、*gfap* 遺伝子プロモーター上の STAT3 認識配列周辺領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行った。

以上の結果をまとめると RA は *gfap* 遺伝子プロモーター上のヒストンアセチル化を亢進することでクロマチン構造を脱凝縮させ、STAT3 の認識配列への結合を増強させることで *gfap* 遺伝子発現を促進させていることが示唆された (図 15)。

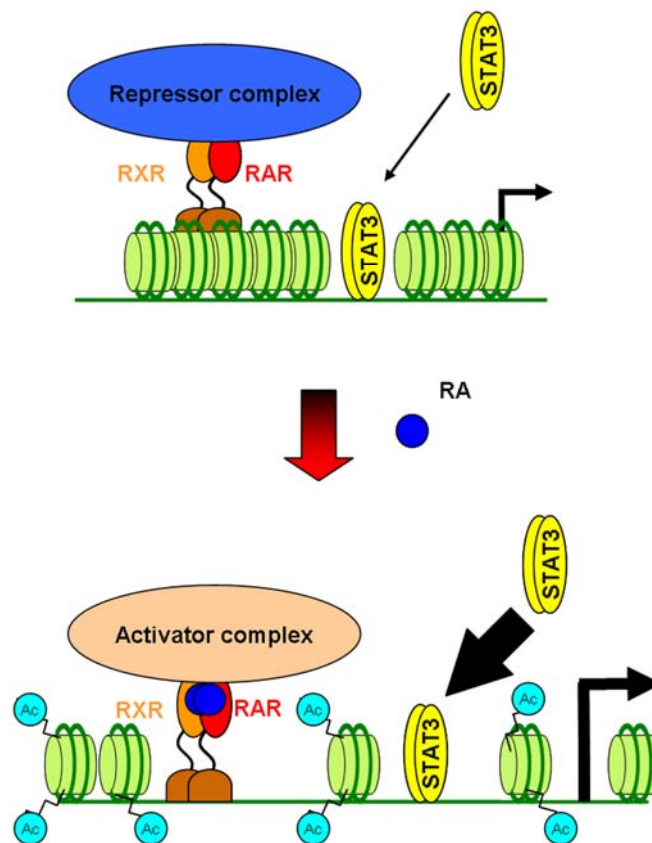


図 1 5 . RA と LIF による *gfap* 遺伝子プロモーターの相乗的活性化のモデル
 図

- 1) RA 非存在下時、RAR/RXR に転写抑制複合体が結合しており、クロマチン構造を凝縮状態に制御している。
- 2) RA シグナルを受け取ると、RAR/RXR から転写抑制複合体が解離し、代わりに転写活性化複合体が形成されヒストンアセチル化を亢進し、クロマチン構造を脱凝縮状態にする。
- 3) ヒストンアセチル化は LIF により誘導される STAT3 の認識配列への結合を増強し、*gfap* 遺伝子プロモーターの活性化を促進する。

IV. Discussion (考察)

最近、本研究の結果と一致して、LIFと同様に gp130-JAK-STAT 経路を活性化する IL-6 ファミリーサイトカインの一つである ciliary neurotrophic factor (CNTF) による神経幹細胞のアストロサイト分化が RA により促進されることが報告された (Faigle et al., 2008)。しかし、この論文では RA の作用機構については明らかにされていなかった。本研究は、RA が LIF と協調的に働くことでアストロサイト分化を相乗的に促進することを明らかにしたと共に、RA の作用機構が *gfap* 遺伝子プロモーターの STAT3 認識配列周辺領域のヒストンアセチル化を促進することにより、STAT3 の認識配列への結合をより亢進させることに起因していることを明らかにした。さらに、HDAC 阻害剤である VPA や TSA によるヒストンアセチル化の亢進が LIF 誘導性アストロサイト分化を促進することも示し、RA によるヒストンアセチル化の亢進が LIF による神経幹細胞のアストロサイト分化誘導の促進に重要な役割を果たすことを裏付ける結果も得ている。

O'Donnel らの研究グループは近年、ETS ドメイン転写因子 ELK1 により誘導されるヒストンアセチル化の亢進が、*c-fos* 遺伝子プロモーターへの核内因子 IA (NFIA) の結合を促進することを報告している (O'Donnel et al., 2008)。この報告と本研究で示されたようなメカニズム、すなわち一つ目の因子によりヒストンアセチル化が亢進し、全く異なる転写因子の結合を増強させることで転写を増強させるメカニズムは、ヒストンアセチル化により誘導される遺伝子発現で広く用いられていることが示唆される。

本研究において、RA と LIF は協調的に働きアストロサイト特異的遺伝子 *gfap* の発現を誘導することを明らかにした。しかしながら、異なるアストロサイト特異的遺伝子 *S100 β* の発現は RA 単独添加により誘導された。*S100 β* は早期に発現するアストロサイト特異的遺伝子として知られており、本研究で用いた神経幹細胞においては既に RA 単独添加で発現が誘導されるような状態にあることが考えられるが詳細は不明である (Burette et al., 1998)。

転写共抑制因子 N-CoR の遺伝子欠損マウスは、胎仔前脳領域においてアストロサイト産生の増加が報告されている。また、その遺伝子欠損マウスの神経幹細胞は自己複製能が低く、アストロサイトへの分化が亢進していることが明らかになっている (Hermanson et al., 2002)。

さらに、N-CoR の過剰発現は、CNTF 誘導性のアストロサイト分化を抑制することが示されている。本研究において、*gfap* 遺伝子プロモーターの RARE 周辺領域に RAR α 、RAR β 、RXR が結合していることが明らかとなった。また、コントロールレポーター (GF1L) の LIF 単独添加群と比較し、*gfap* 遺伝子プロモーターの欠損型レポーター (GF1LB) や RARE の変異型レポーター (GF1L-RAREPM) の LIF 単独添加群はルシフェラーゼ活性の上昇が確認された。これらの結果は、*gfap* 遺伝子プロモーターへの RAR/RXR の結合阻害によりその転写抑制作用が阻害された結果であると考えられる。(Freedman et al., 1999; Aranda et al., 2001; Gronemeyer et al., 2004; Bastien et al., 2004)。先に述べた報告と本研究をまとめると、RA 非存在下時の RAR/RXR に N-CoR を含む転写抑制複合体が結合しており、アストロサイト特異的遺伝子発現を抑制することで神経幹細胞の未分化性維持に関与しているものと思われる。

RAR α は STAT3 の Src homology two (SH2) ドメインと相互作用することが報告されている。また、RA 存在下時、RAR/RXR は p300/CBP を含む転写活性化複合体を形成することに加え、STAT3 が p300/CBP と相互作用することが報告されている (Yang et al., 2004; Nakashima et al., 1999b; Sun et al., 2001)。本研究における、RA と LIF の相乗的アストロサイト分化の促進機構に RAR/RXR、p300/CBP、STAT3 を含むような大きな転写活性化複合体が形成し、*gfap* 遺伝子発現を亢進している可能性も考えられるが現在のところは不明である。また、*gfap* 遺伝子プロモーターの欠損型レポーターや RARE の変異型レポーターにおいても、RA 単独添加でルシフェラーゼ活性の上昇がみられたという結果は、前述のような RAR/RXR、p300、STAT3 を含むような大きな転写活性化複合体に起因しているかもしれない。

RAR や RA 合成酵素、分解酵素の遺伝子欠損マウスや RA の原材料となるビタミン A 欠乏マウスは前後軸の形成異常を含む脳発生障害が認められることが知られている (Sakai et al., 2001; Sirbu et al., 2005; Halilagic et al., 2007; Dupé et al., 1999; Wendling et al., 2001; Ribes et al., 2006; White et al., 1998)。しかし、これらの遺伝子欠損マウスにおける神経幹細胞への障害については未だ報告されていない。本研究は RA が LIF と協調的に働くことで神経幹細胞のアストロサイト分化を促進することを明らかにした。今後は RA シグナルの調節不全マウスを用いて、神経幹細胞からのアストロサイト分化を時空間的に解明していく必要がある。

これまでの報告と本研究をまとめると、胎生期の神経幹細胞は、**JAK-STAT** 経路を下記のような複数の段階で制御することにより、アストロサイトへの分化を制御されていることが示唆された。

- 1) DNAメチル化による制御 (Takizawa et al., 2001; Namihira et al., 2008)
- 2) ヒストン修飾による制御 (Donnel et al., 2008; Song et al., 2008; 本研究)
- 3) STATの活性化制御 (Bonni et al., 1997; Nakashima et al., 1999a)
- 4) 異なる転写因子との複合体の形成による制御 (Nakashima et al., 1999b)

このように、神経幹細胞のアストロサイト分化は細胞内在性プログラムや細胞外因子による複数の機構が協調的に働くことで複雑に制御されていると考えられた。

V. Acknowledgments (謝辞)

本研究を遂行するにあたり、御指導、御鞭撻を賜りました本学バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学講座 中島 欽一教授に深く感謝申し上げます。

波平昌一助教には、日々、技術的指導およびディスカッションをしていただき心から感謝申し上げます。

神山淳助教ならびに滝沢琢己助教には多くの御助言・御指導していただき、深く御礼申し上げます。

同期の佐野坂司君、辻村啓太君、裏山悟司には修士前期課程から 5 年間、共に研究する仲間として支えていただき、大変ありがとうございました。

分子神経分化制御学講座及び、遺伝子発現制御学講座の他の先輩・同期・後輩の方々には日々の実験やその他のいろいろなことに相談にのっていただきました。ありがとうございます。

遺伝子発現制御学講座 別所康全教授、松井貴輝助教には、合同で行われる実験報告会にて数々の御指導、御助言を賜りました。ここに改めて感謝申し上げます。

塩坂貞夫教授、稲垣直之准教授には、アドバイザーヒアリングにおいて適切なアドバイスをいただき、深く御礼申し上げます。

VI. Reference (参考文献)

Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 81, 1269-1304.

Ballas, N., and Mandel, G. (2005). The many faces of REST oversee epigenetic programming of neuronal genes. *Curr Opin Neurobiol* 15, 500-506.

Bastien, J., and Rochette-Egly, C. (2004). Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene* 328, 1-16.

Bjorklund, S., Almuzni, G., Davidson, I., Nightingale, K. P., and Weiss, K. (1999). Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell* 96, 759-767.

Bonni, A., Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D., and Greenberg, M. E. (1997). Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling

pathway. *Science* 278, 477-483.

Bugga, L., Gadiant, R. A., Kwan, K., Stewart, C. L., and Patterson, P. H. (1998). Analysis of neuronal and glial phenotypes in brains of mice deficient in leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol* 36, 509-524.

Burette, A., Jalenques, I., and Romand, R. (1998). Developmental distribution of astrocytic proteins in the rat cochlear nucleus. *Brain Res Dev Brain Res* 107, 179-189.

Dupe, V., Ghyselinck, N. B., Wendling, O., Chambon, P., and Mark, M. (1999). Key roles of retinoic acid receptors alpha and beta in the patterning of the caudal hindbrain, pharyngeal arches and otocyst in the mouse. *Development* 126, 5051-5059.

Epping, M. T., Wang, L., Plumb, J. A., Lieb, M., Gronemeyer, H., Brown, R., and Bernards, R. (2007). A functional genetic screen identifies retinoic acid

signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 17777-17782.

Faigle, R., Liu, L., Cundiff, P., Funa, K., and Xia, Z. (2008). Opposing effects of retinoid signaling on astroglialogenesis in embryonic day 13 and 17 cortical progenitor cells. *J Neurochem* *106*, 1681-1698.

Fan, G., Martinowich, K., Chin, M. H., He, F., Fouse, S. D., Hutnick, L., Hattori, D., Ge, W., Shen, Y., Wu, H., *et al.* (2005). DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development* *132*, 3345-3356.

Freedman, L. P. (1999). Increasing the complexity of coactivation in nuclear receptor signaling. *Cell* *97*, 5-8.

Ghaffari, M., Whitsett, J. A., and Yan, C. (1999). Inhibition of hSP-B promoter in respiratory epithelial cells by a dominant negative retinoic acid

receptor. *Am J Physiol* 276, L398-404.

Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O. H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J. P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P. G., and Heinzl, T. (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J* 20, 6969-6978.

Gronemeyer, H., Gustafsson, J. A., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950-964.

Halilagic, A., Ribes, V., Ghyselinck, N. B., Zile, M. H., Dolle, P., and Studer, M. (2007). Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev Biol* 303, 362-375.

Haskell, G. T., and LaMantia, A. S. (2005). Retinoic acid signaling identifies a distinct precursor population in the developing and adult

forebrain. *J Neurosci* 25, 7636-7647.

He, F., Ge, W., Martinowich, K., Becker-Catania, S., Coskun, V., Zhu, W., Wu, H., Castro, D., Guillemot, F., Fan, G., *et al.* (2005). A positive autoregulatory loop of Jak-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis. *Nat Neurosci* 8, 616-625.

Hermanson, O., Jepsen, K., and Rosenfeld, M. G. (2002). N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes. *Nature* 419, 934-939.

Hsieh, J., and Gage, F. H. (2004). Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev* 14, 461-469.

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.

Jepsen, K., Solum, D., Zhou, T., McEvelly, R. J., Kim, H. J., Glass, C. K.,

Hermanson, O., and Rosenfeld, M. G. (2007). SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature* 450, 415-419.

Koblar, S. A., Turnley, A. M., Classon, B. J., Reid, K. L., Ware, C. B., Cheema, S. S., Murphy, M., and Bartlett, P. F. (1998). Neural precursor differentiation into astrocytes requires signaling through the leukemia inhibitory factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3178-3181.

Koide, T., Downes, M., Chandraratna, R. A., Blumberg, B., and Umesono, K. (2001). Active repression of RAR signaling is required for head formation. *Genes Dev* 15, 2111-2121.

Li, B., Carey, M., and Workman, J. L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.

Miller, F. D., and Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: making

neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357-369.

Mollard, R., Viville, S., Ward, S. J., Decimo, D., Chambon, P., and Dolle, P. (2000). Tissue-specific expression of retinoic acid receptor isoform transcripts in the mouse embryo. *Mech Dev* 94, 223-232.

Nakashima, K., and Taga, T. (2002). Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol Neurobiol* 25, 233-244.

Nakashima, K., Wiese, S., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., Sendtner, M., and Taga, T. (1999a). Developmental requirement of gp130 signaling in neuronal survival and astrocyte differentiation. *J Neurosci* 19, 5429-5434.

Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., and Taga, T. (1999b). Synergistic signaling in

fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science* 284, 479-482.

Namihira, M., Kohyama, J., Abematsu, M., and Nakashima, K. (2008). Epigenetic mechanisms regulating fate specification of neural stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2099-2109.

Namihira, M., Kohyama, J., Semi, K., Sanosaka, T., Deneen, B., Taga, T., and Nakashima, K. (2009). Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell* 16, 245-255.

Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U. C., Chambon, P., and Dolle, P. (1997). Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62, 67-78.

O'Donnell, A., Yang, S. H., and Sharrocks, A. D. (2008). MAP

kinase-mediated c-fos regulation relies on a histone acetylation relay switch.

Mol Cell 29, 780-785.

Parnavelas, J. G. (1999). Glial cell lineages in the rat cerebral cortex. *Exp*

Neurol 156, 418-429.

Perissi, V., Staszewski, L. M., McInerney, E. M., Kurokawa, R., Krones, A.,

Rose, D. W., Lambert, M. H., Milburn, M. V., Glass, C. K., and Rosenfeld,

M. G. (1999). Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13, 3198-3208.

Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A., and

Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells.

Neuron 28, 69-80.

Rawson, N. E., and LaMantia, A. S. (2007). A speculative essay on retinoic

acid regulation of neural stem cells in the developing and aging olfactory system. *Exp Gerontol* 42, 46-53.

Ribes, V., Wang, Z., Dolle, P., and Niederreither, K. (2006). Retinaldehyde dehydrogenase 2 (RALDH2)-mediated retinoic acid synthesis regulates early mouse embryonic forebrain development by controlling FGF and sonic hedgehog signaling. *Development* 133, 351-361.

Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., and Giguere, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 5, 1333-1344.

Sakai, Y., Meno, C., Fujii, H., Nishino, J., Shiratori, H., Saijoh, Y., Rossant, J., and Hamada, H. (2001). The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev* 15, 213-225.

Sanosaka, T., Namihira, M., and Nakashima, K. (2009). Epigenetic mechanisms in sequential differentiation of neural stem cells. *Epigenetics* 4, 89-92.

Sauvageot, C. M., and Stiles, C. D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 12, 244-249.

Sirbu, I. O., Gresh, L., Barra, J., and Duester, G. (2005). Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development* 132, 2611-2622.

Song, M. R., and Ghosh, A. (2004). FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci* 7, 229-235.

Sun, Y., Nadal-Vicens, M., Misono, S., Lin, M. Z., Zubiaga, A., Hua, X.,

Fan, G., and Greenberg, M. E. (2001). Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell* *104*, 365-376.

Takahashi, J., Palmer, T. D., and Gage, F. H. (1999). Retinoic acid and neurotrophins collaborate to regulate neurogenesis in adult-derived neural stem cell cultures. *J Neurobiol* *38*, 65-81.

Takizawa, T., Nakashima, K., Namihira, M., Ochiai, W., Uemura, A., Yanagisawa, M., Fujita, N., Nakao, M., and Taga, T. (2001). DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell* *1*, 749-758.

Wendling, O., Ghyselinck, N. B., Chambon, P., and Mark, M. (2001). Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development* *128*, 2031-2038.

White, J. C., Shankar, V. N., Highland, M., Epstein, M. L., DeLuca, H. F., and Clagett-Dame, M. (1998). Defects in embryonic hindbrain development and fetal resorption resulting from vitamin A deficiency in the rat are prevented by feeding pharmacological levels of all-trans-retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13459-13464.

Xu, L., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-147.

Yang, L., Lian, X., Cowen, A., Xu, H., Du, H., and Yan, C. (2004). Synergy between signal transducer and activator of transcription 3 and retinoic acid receptor-alpha in regulation of the surfactant protein B gene in the lung. *Mol Endocrinol* 18, 1520-1532.