

細胞内及び細胞外因子による神経幹細胞の分化制御機構の解明

佐野坂 司

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)

平成22年2月17日提出

序論

哺乳類中枢神経系を構成する主要細胞種であるニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは共通の神経幹細胞から分化・産生される。しかしながら、神経幹細胞の各細胞種の分化は時空間的に厳密に制御されている(Temple, 2001)。発生過程において神経幹細胞は胎生中期にはニューロンのみに分化するが、胎生後期においてはアストロサイトへの分化能を獲得し、多分化能を有した神経幹細胞となる。このように神経幹細胞は発生段階依存的に分化能を獲得していくが、この変化は増殖因子やサイトカイン等の細胞外因子と DNA メチル化といった細胞内在性プログラムが協調的に働くことにより制御されている(Edlund and Jessell, 1999; Hsieh and Gage, 2004; Takizawa et al., 2001)。

神経幹細胞のアストロサイト分化においては転写因子である STAT3 の活性化が重要である事が報告されており、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor ; LIF) や毛様体神経栄養因子 (ciliary neurotrophic factor ; CNTF) といったインターロイキン (Interleukin ; IL) -6 ファミリーサイトカインが janus kinase (JAK) –signal transducer and activator of transcription (STAT) 経路を介して神経幹細胞のアストロサイトへの分化を誘導することが知られている(Bonni et al., 1997; Rajan and McKay, 1998)。実際に、LIF や LIF 受容体 β 、共通信号伝達受容体である gp 130、STAT3 といった因子の knock out マウスにおいて、神経幹細胞のアストロサイト分化の減少が報告されており、その重要性が示されている(Bugga et al., 1998; He et al., 2005; Koblar et al., 1998; Nakashima et al., 1999a)。さらに、形質転換増殖因子 (transforming growth factor- β ; TGF- β) スーパーファミリーに属する骨形成蛋白質 (bone morphogenetic protein ; BMP) もアストロサイトへの分化を誘導するサイトカインであることが分かっている。また、これら異なるサイトカインである LIF、BMP2 は、それぞれの下流転写因子である STAT3 と Smad1 が核内転写共役因子 p300/CBP を介して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の転写を相乗的に誘導するためと考えられている(Nakashima et al., 1999b)。

このような細胞外因子による作用に加え、細胞内在性プログラムも神経幹細胞の分化制御に重要な役割を果たしている。神経幹細胞のアストロサイト分化において、活性化された STAT3 はアストロサイト特異的遺伝子である *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って転写を促進するが、この STAT3 認識配列への結合は DNA のメチル化によって制御されている。DNA のメチル化は、DNA メチル基転移酵素によってメチル基が付加されることによって生じるが、これまでに DNA メチル基転移酵素としてヘミメチル化された DNA にメチル基を導入する維持型 Dnmt1 (DNA-methyltransferase 1) と、新規にメチル基を導入する新規型 Dnmt3a 及び

Dnmt3b が知られている(Bestor, 2000)。胎生中期の神経幹細胞においては、*Gfap* プロモーター上の STAT3 認識配列は高頻度メチル化されているため、例え STAT3 を活性化するサイトカインで刺激しても、STAT3 認識配列に結合できない(Takizawa et al., 2001)。そのため *Gfap* の発現に至らず、結果としてニューロン分化が優位となる。発生の進行に伴い、STAT3 認識配列を含む領域が脱メチル化されるため、胎生後期の神経幹細胞においては STAT3 の活性化に伴い神経幹細胞は GFAP 陽性のアストロサイトへと分化する。このように、神経幹細胞の発生段階依存的なアストロサイト分化においては、転写因子 STAT3 の活性化と、DNA のメチル化といったエピジェネティックなゲノム修飾が重要な役割をはたしている事が知られている。しかしながら、この神経幹細胞の発生段階依存的な DNA メチル化制御機構については、未だ不明な点が多い。また、このようなエピジェネティクス変動を伴った神経幹細胞の多分化能獲得に、どのような転写調節因子群が関与しているかについてはほとんど明らかにされていない。

これまでに、胎生 10.5、13.5、17.5 日目終脳由来神経幹細胞を培養し、幹細胞の表面マーカーである SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen 1) を用いてソーティング後、マイクロアレイ解析により各胎生期神経幹細胞特異的に発現しているマーカー因子の探索をした報告や、胎生 12.5、14.5、16.5 日目のそれぞれのマウス皮質において神経幹細胞が存在する ventricular zone (VZ) より単離した細胞を用いて、ニューロンのサブタイプの違いに関与する因子をマイクロアレイ解析によりスクリーニングした報告がなされている(Abramova et al., 2005; Ajioka et al., 2006)。このように、各胎生期の神経幹細胞での遺伝子発現を Gene Chip を用いて網羅的に解析した報告はあるが、神経幹細胞の分化制御に関与する因子の同定には至っていない。

そこで本研究は、アストロサイト分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞と、獲得していない胎生中期神経幹細胞において、特異的に発現している遺伝子を GeneChip を用いた DNA マイクロアレイ解析により比較し、神経幹細胞の発生段階依存的なアストロサイト分化制御を担う因子の同定を試みた。神経幹細胞は胎生期によって分化傾向が違うことから、各胎生期特異的な遺伝子発現を網羅的に解析できる GeneChip を用いた解析は非常に有効であると考えられる。また、遺伝子発現の解析においてはサンプル間での発現量の補正が重要な要素となることから、Perccellome 解析を用いることにより 1 細胞当たりでの発現量を計算した(Kanno et al., 2006)。さらに、GeneChip による各胎生期特異的発現遺伝子の一次的スクリーニングに加え、それら遺伝子を in situ hybridization により発現時期及び発現領域を特定するといった二次的スクリーニングを行うことで、候補遺伝子の数を絞った。その結果、胎生中期特異的に発現し、神経幹細胞の存在する脳室周囲部に強い発現を示す *N-myc* 及び *Hmga2* を同定した。*N-myc* は bHLH 型転写因子で、E-box に結合することで転写活性化作用を示し、細胞の増殖や分化を促進することが知られている(Knoepfler et al., 2002; Saiki et al., 2000;

Sawai et al., 1990)。Hmga2 はクロマチンリモデリング因子であり、DNA の AT rich な領域に結合することでアダプターとして機能する。そこに他の様々なタンパク質をリクルートすることでクロマチン状態を変化させ、転写活性化・抑制の両方に機能することが報告されている。また、幹細胞において特異的に発現し、分化した細胞では発現していないことが報告されている(Sock et al., 2004; Zhou et al., 1995)。

胎生中期で高発現している *N-myc* 及び *Hmga2* を、これら因子の発現の低い胎生後期神経幹細胞にレトロウィルスを用いて発現させ、神経幹細胞の分化傾向にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、これら因子の発現により神経幹細胞のアストロサイト分化の抑制が観察された。胎生後期神経幹細胞においては、*Gfap* プロモーター上の STAT3 認識配列は脱メチル化されているため、これら因子の発現によって STAT3 認識配列周辺が再びメチル化された可能性が考えられたが、bisulfite sequence の結果から、メチル化状態は変化していなかった。そのため、神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得には、発生段階依存的な DNA 脱メチル化だけでなく、それに伴って変化する転写調節因子の発現も関与している事が示唆された。

一方で、神経幹細胞のアストロサイトへの分化には、アストロサイト特異的遺伝子の脱メチル化が必須である。発生過程において、神経幹細胞から最初に分化・産生される細胞がニューロンであることから、このニューロンが残存する神経幹細胞に作用し、次に産生されるべき細胞系譜であるアストロサイトへの分化能獲得に重要な役割を果たしていると考えられた。アストロサイトへの分化能を獲得していない胎生中期神経幹細胞を先に産生された胎生期ニューロンと共培養した結果、LIF に応答したアストロサイト分化が見られることが判明した。ニューロンとの共培養で変化が見られたことから、細胞接着によって活性化される Notch シグナルの関与が考えられた。隣り合う細胞間で作用する細胞間情報伝達分子である Notch は、一回膜貫通型タンパク質でリガンドの結合により細胞内領域が切断され、核内へ移動し標的遺伝子の転写を活性化する(Nakayama et al., 2008)。胎生期ニューロンの作用が Notch の活性化阻害剤によって阻害されたことから、胎生期ニューロンが Notch シグナルを介して、残存する神経幹細胞に次に産生されるべき細胞系譜であるアストロサイトへの分化能の獲得を促していることを明らかにした。また、この Notch シグナルが誘導する脱メチル化は、Notch シグナルによって発現が誘導される転写因子である NFIA の、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合により、維持メチル化酵素である DNMT1 のゲノム DNA 上からの解離を誘導し、結果的に脱メチル化を促進するという新規メカニズムを明らかにした(Namihira et al., 2009)。

しかし、神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得するといった性質変化において、このような DNA 脱メチル化がゲノム全体でどの程度起こっているのかは明らかにされていない。そのため、神経幹細胞の性質変化の完全な理解には至っていない。それらをより詳細に理解するために、細胞全体でメチル化がどの程度変化するのか、

またその変動と遺伝子発現がどの程度相関するのかを把握する必要がある。そこで、本研究では神経幹細胞特異的発現が認められる Sox2 遺伝子プロモーターの下流に EGFP 遺伝子を組み込んだ (Sox2-EGFP) トランスジェニックマウス (D'Amour and Gage, 2003) を用いて解析を行った。この Sox2-EGFP マウスを用いることにより、神経幹細胞を GFP の蛍光を指標にセルソーターを用いて生体内より直接単離できるため、今まで困難であった神経幹細胞の生体脳での変化をより正確に解析できる。予備的実験として、各胎生期 Sox2-EGFP マウス脳より単離した神経幹細胞からゲノム DNA を回収し、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターのメチル化状態を解析した結果、胎生中期 (E11.5) 神経幹細胞では高頻度にメチル化されているものの、発生段階の進行に伴う DNA 脱メチル化が観察された。このことは、生体内でもエピジェネティックな修飾が神経幹細胞の多分化能獲得に重要な役割を果たしていることを示唆している。

前述のように、神経幹細胞は発生段階の進行に伴い DNA 脱メチル化が生じ、胎生後期神経幹細胞では多分化能を持った神経幹細胞として成熟するが、最終的にアストロサイトへの分化を誘導するシグナルがどこから来るのかについては解明されていない。アストロサイト分化に必須である STAT3 活性化サイトカイン (IL-6 ファミリーサイトカイン) の発現については、神経幹細胞自身が IL-6、LIF、CNTF を発現しているという報告やニューロンが CT-1 (Cardiotrophin-1) を発現しているという報告もあるが、実際に *in vivo* でどのような細胞がアストロサイト分化誘導に働いているのかは不明な点が多い (Ohno et al., 2006; Uemura et al., 2002 {Barnabe-Heider, 2005 #61})。アストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞は放射状 (ラジアル) グリアという形態をとり、ラジアルファイバーを伸ばして髄膜に接している。髄膜形成不全のマウスではラジアルグリアの形成に異常が起こることや神経幹細胞の増殖が減少することから、髄膜がラジアルグリアに作用している可能性が示唆されている (Zarbalis et al., 2007)。このことは、最近、髄膜が RA を分泌し神経幹細胞のニューロン分化を制御していることが報告されたことから示唆される (Siegenthaler et al., 2009)。そこで、本研究ではアストロサイトへの分化を誘導する因子として終脳を覆う髄膜に着目し、神経幹細胞の分化制御における髄膜の役割を解明することを目的とした。髄膜細胞と E14.5 マウス終脳由来神経上皮細胞を共培養した結果、髄膜細胞と共培養した神経幹細胞においてはアストロサイト分化が誘導されることを発見した。髄膜の培養上清 (CM) を用いた場合にも神経幹細胞のアストロサイト分化が観察されたため、髄膜細胞が分泌している因子が重要と考えられた。さらに髄膜細胞より回収した CM にどのような因子が含まれているかを検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に *GFAP* プロモーターを組み込んだレポーターコンストラクトを用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、CM によりプロモーター活性の上昇が確認された一方、優性抑制型 STAT3 及び IL-6 ファミリーサイトカインの共通信号伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体によってその効果が抑えられた。この結果から、

髄膜細胞が分泌している IL-6 ファミリーサイトカインがラジアルグリアに作用し、最終的なアストロサイトへの分化を誘導していることが示唆された。これらの示唆をもとに、本論文では、細胞内及び細胞外因子による神経幹細胞の分化制御機構について考察する。

材料と方法

1：実験動物及び細胞培養

1-1：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 11.5 および 14.5 日の ICR マウスを日本エスエルシーまたは日本クレアから購入した。

1-2：使用細胞

胎生中期神経幹細胞：胎生 11.5 日目マウス終脳から神経幹細胞を単離し、bFGF 存在下で 1 日間単層培養後、各種アッセイに用いた。

胎生後期神経幹細胞：胎生 14.5 日のマウス終脳から神経幹細胞を単離し、bFGF 存在下で 4 日間単層培養を行い増殖させた後、各種アッセイに用いた。

1-3：神経上皮細胞の単離・培養

胎生中期神経幹細胞：妊娠マウス（妊娠 11.5 日）を頸椎脱臼後、開腹し、子宮を取り出し氷上に置いた培養皿中の PBS に移した。子宮から胎仔を取り出し、氷上に置いた 60mm 培養皿中の HBSS に移した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて胎仔から脳を摘出し、チップの先端をカットした 1ml 用ピペットマンを用いて氷上に置いた 1.5ml チューブに移した。Trypsine-EDTA (GIBCO) を 200μl 加え室温で 10 分間静置後、Trypsine Inhibitor (SIGMA) を 200μl 加え氷上に置いた。チップの先端をカットした 1ml ピペットマンを用いて脳を氷上に置いた 60mm 培養皿中の HBSS に移した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて終脳のみを分離するために髄膜を取り除き、15ml チューブに移した。1ml 用ピペットマンを用いて 15ml チューブに入っている終脳を全量 900μl の HBSS でピペッティングすることにより細胞を分散させた後、1,300rpm で 5 分間遠心した。上清を吸引除去し、1ml ピペットマンを用いて細胞を 1ml の bFGF (10ng/ml) 含有 N2/DMEM/F12 培地に懸濁させた。細胞数を計測し、必要細胞数を各種アッセイ用に O/F コートした培養皿等に播種した。

胎生後期神経幹細胞：頸椎脱臼し、開腹した妊娠マウス（妊娠 14.5 日）から子宮を取り出し、氷上に置いた培養皿中の PBS に移した。子宮から胎仔を取り出し、氷上に置いた 60mm 培養皿中の HBSS に移した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて胎仔から脳を摘出し、終脳のみ（図 4 の点線で囲んだ部分）を分離した。終脳を HBSS とともに 1ml 用ピペットマンで 15ml チューブに移し、全量 900μl の HBSS を用いてピペッティング（～5,6 回）することにより細胞を分散させた後、1,300rpm で 3 分間遠心した。上清を吸引除去し、10μl ピペットを用いて細胞を 6μl の bFGF (10ng/ml) 含有 N2/DMEM/F12 培地に懸濁させ、O/F コートした 90mm 培養皿に播種した（培養 0 日

目)。神経上皮細胞の未分化状態と増殖能を維持するため、培養液への bFGF の継続的添加を行った（培養 1 日目と 3 日目に bFGF (5ng/ml) を追加）。培養 2 日目には新しい 10ng/ml bFGF 含有 N2/DMEM/F12 培地に交換した。本研究の神経上皮細胞はすべて 37℃、CO₂ 濃度 5% のインキュベータにて培養した。培養 4 日目に培養皿に付着した神経上皮細胞を HBSS で 2 回洗浄後に、再度 HBSS を 3ml 加え、CO₂ インキュベータ内で数分間インキュベートした。ピペットマンで HBSS を吹き付けることで細胞を培養皿からはがし、15ml チューブに回収した。回収した細胞は 1,500rpm で 5 分間遠心し上清を吸引除去した後、bFGF (10ng/ml) 含有 N2/DMEM/F12 培地に懸濁させ、細胞数を計測し、必要細胞数を各種アッセイ用に培養皿等に播種した。

1-4：培養皿のコーティング

培養皿をオルニチン/ファイブロネクチンコート (O/F コート) することにより神経上皮細胞の接着性を増強させた。滅菌水で 15μg/ml に希釈したポリ-L-オルニチン (SIGMA) 溶液を培養皿に加え、37℃の CO₂ インキュベータ内で 2 時間以上インキュベートした。ポリ-L-オルニチン溶液を培養皿から吸引除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline ; PBS) (TaKaRa) で 3 回洗浄後、PBS で 1μg/ml に希釈したフィブロネクチン (SIGMA) 溶液を培養皿に加え、CO₂ インキュベータ内で 2 時間以上インキュベートした。フィブロネクチン溶液を培養皿から吸引除去し、乾燥を防いだ状態で使用するまで 4℃で保存した。チャンバースライド (Nunc) のコーティングも同様に行った。

1-5：培地及び緩衝液

神経上皮細胞の N2/DMEM/F-12 培地を以下の工程で作成した。滅菌水に DMEM/F-12 (GIBCO) を攪拌溶解し、DMEM/F-12 培地とした。D-MEM/F-12 培地に NaHCO₃ (nacalai tesque)、insulin (SIGMA ; 25mg/ml)、apo-Transferrin (SIGMA ; 100mg/ml)、putrescin (SIGMA ; 100mM)、sodium selenite (SIGMA ; 30nM)、progesterone (SIGMA ; 20nM) を添加しよく攪拌後、NaOH 溶液で pH7.2 に調整した。培地を 0.22μm のフィルターで濾過し、4℃で保存した。使用直前には、bFGF (PEPRO TECH EC ; 10ng/ml) と Antibiotic-Antimycotic [penicillin G sodium ; 10mg/ml、streptomycin sulfate ; 25mg/ml、amphotericin B (GIBCO)] を添加した。bFGF はあらかじめ 0.1%BSA/PBS にて 10μg/ml に調整したものを使用した。

緩衝液として使用したハンクス平衡緩衝塩溶液 (Hank's Balanced Salt Solution ; HBSS) を以下の工程で作成した。滅菌水に HBSS (SIGMA) を攪拌溶解し、NaHCO₃ を添加後、HCl で pH7.2 に調整した。調整後、HBSS 溶液を 0.22μm のフィルターで濾過し、4℃で保存した。

2：コンストラクト作成

2-1：RNA の抽出

胎生中期神経幹細胞を培養した培養皿を PBS で 2 回洗浄後、Sepazol (nacalai tasque) を 500 μ l 加えた。次に、Cell Lifter (Corning)を用いて細胞を剥がし、1.5ml チューブに回収後、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌及びシリンジを用いて細胞をホモジナイズした。室温で 5 分間静置後、クロロホルムを 200 μ l 加え軽く転倒攪拌し室温で 3 分間静置した。15000rpm で 15 分間遠心後、回収した水層に 2-プロパノールを 500 μ l 加え混合し、転倒攪拌した。室温で 10 分間静置後、15000rpm、4℃で 10 分間遠心した。上清を除去し 70%エタノール 1ml を加え、15000rpm、4℃で 5 分間遠心した。上清を除去し RNA ペレットを 5 分間風乾させ、滅菌水 40 μ l で溶解した。さらに、このサンプルに DNase 処理 (Promega) を行うことでゲノム DNA の混入による結果への影響を排除した。

2-2：逆転写反応

パーソナルスペクトルモニター Gene Quant pro (Amersham Biosciences)にて RNA の濃度測定を行い、5ug 分の total RNA を用いて逆転写反応を行った。まず、5ug 分の total RNA 溶液に 0.5ug 分の Oligo dT primer (Invitrogen) 溶液および 10mM dNTP (Invitrogen) を加え、全量 12 μ l になるよう RNase free 水を加え、70℃で 10 分間加温後、氷中に静置した。さらに、5 $\times$ 1st strand buffer を 4 μ l、0.1M DTT を 2 μ l、40 unites RNase OUTTM Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen)を加え 42℃で 2 分間加温し、さらに逆転写酵素 SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen) を 1 μ l 加え 42℃で 1 時間加温することで逆転写反応を行った。逆転写酵素を 70℃で 15 分間加温することで失活させ、滅菌水を 40 μ l 加えたこの cDNA 溶液を以下の実験で用いるまで -20℃で保存した。

2-3：遺伝子クローニング

各遺伝子特異的プライマーを設計し、KOD-Plus-DNA Polymerase (TOYOBO)を用いて PCR 増幅を行った。cDNA 2 μ l、10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ l、2.0mM dNTPs 2.5ml、25mM MgSO₄ 1.5 ml、20mM forward プライマー、20mM reverse プライマーそれぞれ 0.75ml、DMSO 1.0ml、Taq 0.5 ml、滅菌水 14.5ml を混合し、合計 25ml で PCR 反応を行った。PCR 反応は iCycler (Bio Rad)を用いて、95℃ 4 分の後、94℃ 15 秒、60℃ 20 秒、68℃ 3 分のサイクルを 40 回行い、最後に 68℃ 7 分の反応を行った。増幅サンプルを 1.2% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅 DNA バンドを切り出した。切り出したゲルは 1.5ml チューブに移し、NaI (Q-BIOGENE)を 500ml 加え、60℃で静置し完全に溶解させた。その後、Wizard Minipreps DNA Purification Resin (Promega)を 1ml 加えてよくピペッティングし、Wizard minicolumn (Promega)をセットした 2.5ml シリンジ (TERUMO) に Resin 混合溶液を全量入れ、カラム精製を行った。その後、Column Wash

Solution (Promega)を 2ml シリンジに入れてカラムを洗浄し、カラムからシリンジをはずした。カラムを 1.5ml チューブに載せた状態で、室温、12000rpm で 1 分間遠心することにより、カラム内に残留していた Column Wash Solution を除去した。その後、新しい 1.5ml チューブにカラムを載せ、65℃の滅菌水 20 μ l をカラムに注ぎ、室温、12000rpm で 1 分間遠心することで DNA 溶液を回収した。回収した DNA および目的のベクター (pMYs IRES GFP)を制限酵素で処理し、制限酵素処理後、1.2%アガロースゲルにて電気泳動し、目的 DNA バンドを切り出した。DNA の精製は、上記方法と同様に行い、回収した。回収した DNA 増幅溶液をインサート液とし、制限酵素処理した pMYs IRESGFP vector を 1 μ l インサート液を 3 μ l、Ligation High (TOYOBO)を 2 ml ずつ 1.5ml チューブに入れ、16℃の水槽で 3 時間ライゲーション反応を行った。コンピテントセル DH5 α (TOYOBO) 10 μ l にライゲーション液を 1 μ l 加え、氷上で 20 分間静置した。その後、42℃で 45 秒間ヒートショックを与え、すぐに氷上に移して 2 分間静置した。そして LB 培地(1%トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)を 120 ml 添加し、37℃で 10 分間インキュベートした。インキュベート中に LB 寒天培地 (+Ampicillin)に X-gal を 50 μ l 塗布し、インキュベートした菌液を全量プレーティングし、37℃で一晩培養した。

2-4 : コロニーのピックアップ及びプラスミドの抽出

前日培養したプレートから、白色コロニーを 20 個ずつピックアップし、2ml の LB 培地 (+Ampicillin)の入ったユニットチューブ中で、37℃で一晩培養した。プラスミドの抽出は、KURABO 社の Automatic DNA Isolation System PI-200 と、そのプロトコルに従った。抽出したプラスミドを制限酵素処理し、電気泳動によってインサートチェックを行った。その後、インサートが挿入されている事が確認されたものを Sequence 解析した。

2-5 : Sequence 解読

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を 2.5 μ l、Big Dye Terminator v1.1, 3.1 5 $\times$ Sequencing Buffer (Applied Biosystems)を 2 μ l、2 mM Primer (GFm2-3')を 1.6 μ l、Plasmid DNA を 2 μ l、滅菌水 1.9 μ l の合計 10 μ l で PCR 増幅を行った。PCR 反応は iCycler (Bio Rad)を用いて、96℃ 2 分の後、95℃ 10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 4 分のサイクルを 25 回行い、その後 4℃で保存した。PCR 反応後、3M 酢酸ナトリウムを 1 μ l、0.125M EDTA を 1 μ l、100%エタノールを 50 μ l 加え、ボルテックスで攪拌後、4℃、15000rpm で 15 分間遠心した。上清除去後、70%エタノールでリンス後、室温で 5 分間乾燥させた。その後、ホルムアミドを 15 μ l 加え、95℃で 2 分間熱変性を行った後すぐに氷冷した。サンプルを 96 穴プレートに移した後、3100 Genetic Analyzer (HITACHI)で解析を行った。Sequence データは、付属ソフトである 3100 Data

Collection により解析した。

3 : PlatE 細胞の培養とレトロウィルスの調整・感染

レトロウィルスの作成に使用した PlatE 細胞は、東京大学医科学研究所の北村俊雄先生より供与頂いた(Morita et al., 2000)。

3-1 : PlatE 細胞の継代

培地 [DMEM (SIGMA)、10% Fetal Bovine Serum (GIBCO)、1ug/ml Puromycin (SIGMA)、10ug/ml Brastacidin (Invitrogene)、0.1% Gentamicin (nacalai tesque)]を吸引し、3ml の PBS で 2 回洗浄した。次に、0.05%Trypsin-EDTA (GIBCO)を 90mm 培養皿に対して 2ml 添加し、培養皿全体に馴染ませた直後に吸引し、37℃で 5 分間インキュベートした。培養皿の周りを叩いて細胞を剥がし、培地を 5ml 加えピペッティングすることで細胞を剥がした。また、細胞液を上下にピペッティングすることで細胞を完全にバラバラにした。新しい 90mm 培養皿に培地を 5.5μl 入れ、懸濁した細胞液を 0.5ml 滴下して合計 6ml で培養し、継代とした。また、90mm 培養皿に培地 DMEM / 10%FBS / 0.1%Gentamycine を 4.5ml 入れ、細胞懸濁液を 1.5ml 滴下して合計 6ml としたものを Transfection 用とし、その翌日に使用した。

3-2 : PlatE 細胞へのコンストラクトの導入

コンストラクトの導入には、TransIT-293 (Mirus)のプロトコルに従った。血清使用量低減培地 Opti-MEM (GIBCO) 800μl と、カチオン性脂質遺伝子導入試薬 TransIT-293 12μl をよく混合し室温で 5 分間静置した。次に transfect するコンストラクトを 6μg 分加え、転倒混和し 15 分間静置した。前日に播種しておいた PlatE 細胞の培地交換を行い、そこに混合溶液を添加後一晩 37℃で培養した。翌日、培地を吸引し、PBS で 2 回洗浄後、bFGF(10ng/ml)を含む N2/DMEM/F-12 培地を加えた。さらに一晩培養し、ウィルス液の回収に移行した。

3-3 : ウィルス液の回収及び濃縮

PlatE 細胞の上清を回収し、0.45μm のフィルター (Pall)でウィルス溶液を遠心管に filtrate し、6000g、4℃で 16 時間遠心した。遠心後、1ml だけ残して上清を除去し、残りの 1ml の溶液で沈殿を懸濁後、15ml チューブに入れて-80℃で保存した。

3-4 : ウィルスの感染

ウィルス溶液に 37℃に温めた bFGF (10ng/ml)を含む N2/DMEM/F-12 培地を加え、軽くピペッティングした。そして、神経幹細胞の培養液をウィルス溶液に交換し、37℃で 4 時間インキュベートすることによりウィルスを感染させた。その後、bFGF (10ng/ml)を含む N2/DMEM/F-12 培地に交換し一晩培養した。翌日、レポーターにより

感染が確認されてから、実験に用いた。

4：免疫染色

4-1：免疫染色法

4% paraformaldehyde (SIGMA)で細胞を固定し、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 20 分静置した。次にブロッキング溶液で倍希釈した一次抗体液に交換し、室温で 1 時間半もしくは 4℃で一晩 1 次抗体反応を行った。一次抗体反応後、PBS で 3 回洗浄し、ブロッキング溶液で希釈した二次抗体を用いて、室温で 1 時間半 2 次抗体反応を行った。二次抗体反応後、PBS で 3 回洗浄し、PBS で 1000 倍希釈した Hoechst33258 (1mg/ml) を用いて、室温で 15 分間静置し核染色を行った。PBS で 1 回洗浄後、イムノマウント液 [shandon Immu-Mount (Thermo electron)]で包埋し、マニキュアで封入した。作成したスライドは、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS 社の BX50 または Carl Zeiss 社の Axiovert 200M) で観察した。

4-2：使用抗体

一次抗体

GFAP [Rabbit IgG 1:2000 (DAKO #Z0334)], GFP [Chicken IgY 1:500 (Aves labs #GFA)], Sox2 [Rabbit IgG 1:1000 (CHEMICON #AB5603)]

二次抗体

Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (Invitrogen #A21206)

FITC-conjugated donkey anti-chicken-IgY (Jackson ImmunoReserch #703-096-155)

Cy3-conjugated donkey anti-rabbit-IgG (Jackson ImmunoReserch #711-166-152)

核染色

Bisbenzimidazole H33258 Fluorochrome Trihydrochloride 1:1000 (nacalai tesque)

5：GeneChip 解析

5-1：細胞回収と DNA 測定

各胎生期神経幹細胞を培養した培養皿を PBS で 2 回洗浄後、2-メルカプトエタノール (SIGMA)を 100 倍希釈した RLT Lysis buffer (QIAGEN)を 500μl 培養皿に添加し、5 分間室温で静置した。その後、細胞液を 1.5ml チューブに移し、-80℃で保存した。各サンプルから溶液を 10μl ずつ回収し、DNase-free RNase A (Nippon Gene)により 37℃で 30 分間インキュベートし、その後、Proteinase K (Roche)を加えて 55℃で 3 時間インキュベートした。それらサンプルを 96-well black plate に移し、PicoGreen fluorescent dye (Molecular Probes)を各 well に加え、10 秒間の震とうを 4 回行い、30℃で 2 分間インキュベートした。その後、DNA の濃度を fluorescence plate reader を用いて測定した。こ

の際、コントロールとして lamda phage DNA を使用した。

5-2 : GeneChip analysis

適当量の spike RNA cocktail を各サンプルに加え、RNeasy mini Kit (Qiagen)とそのプロトコルに従って RNA を抽出した。その後、5 mg の RNA と 200U の SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen)、100pM T7-(dT)₂₄ プライマーを用いて逆転写反応を行った。二本鎖の合成後、二本鎖 cDNA を Gene Chip Sample Cleanup Module (Affymetrix)を用いて精製し、BioArray HighYield RNA transcript labeling kit (Enzo Diagnostics)を用いて in vitro 転写反応を行うことによりラベルされた cRNA を合成した。合成した cRNA は、Gene Chip Sample Cleanup Module 及び 1×fragmentation buffer (40mM acetate, 100mM KOAc, 30mM MgOAc)で精製し、94℃で 35 分間インキュベートした。GeneChip Mouse Expression 430 Array (Affymetrix)とハイブリット形成させるため、15mg の cRNA プローブ、50pM control oligonucleotide B2、eukaryotic hybridization control (1.5pM BioB, 5pM BioC, 25pM BioD, 100pM Cre)、0.1mg/ml herring sperm DNA、0.5mg/ml acethylated BSA 及び hybridization buffer の混合溶液を、45℃で 16 時間反応させた。洗浄及び染色は GeneChip Fluidic Station (Affymetrix)とそのプロトコルに従った。アレイデータのスキャン及び解析は、GeneChip Operating Software (Affymetrix)を用いて行った。

6 : RT-PCR

6-1 : RNA の抽出及び逆転写反応

胎生期神及び胎生後期経幹細胞より、2-1 と同様に RNA を抽出し、2-2 と同様の方法で逆転写反応を行った。

6-2 : PCR (ポリメラーゼ連鎖反応)

Real Time PCR : SYBR Premix Ex Taq (TAKARA)を使用した。cDNA 1μl、2×Premix 12.5μl、20μM forward プライマー、20μM reverse プライマーそれぞれ 0.25μl、DMSO 1.0μl、ROX Dye II 0.5μl、滅菌水 9.5μl を混合し、合計 25μl で PCR 反応を行った。PCR 反応は STRATAGENE 社の Mx 3000p を用いて、95℃ 20 秒の後、95℃ 10 秒、62℃ 30 秒のサイクルを 40 回行い、解析ソフト Max Pro (STRATAGENE)を用いて RNA の発現を解析した。

7 : In situ hybridization

7-1 : 脳切片の作成

胎生 11.5、14.5 日マウス脳切片 : 頸椎脱臼し、開腹した妊娠マウスから子宮を取り出し、氷上に置いた 90mm 培養皿中の PBS に移した。子宮から胎仔を取り出し、氷上に置いた 60mm 培養皿中の PBS に移した。実体顕微鏡下でピンセットを用いて脳

を取り出し、氷上に置いてある 15ml チューブの 4%PFA 中に移した。

胎生 17.5 日マウス脳：頸椎脱臼し、開腹した妊娠マウスから子宮を取り出し、氷上に置いた 90mm 培養皿中の PBS に移した。子宮から胎仔を取り出し、氷上に置いた 60mm 培養皿中の PBS に移した。まず、胎仔を開腹し、注射器を用いて PBS、4%PFA の順に適量を心臓に入れ、還流固定を行った。その後、断頭し、ピンセットを用いて終脳を取り出し、氷上の 4%PFA 中に移した。

上記の方法によって取り出した脳を、4%PFA、10%Sucrose (nacalai tesque)、20%Sucrose の順に一晩ずつ 4℃で rotate した。その後、OCT Compound (Tissue-Tek) の入った Cryomold (Tissue-Tek) に固定した脳を入れて凍結ブロックを作成し、-80℃で保存した。CM 1800 (Leica) を用いて凍結ブロックを厚さ 12 μm に切り、脳スライスをスライドガラス(MATSUNAMI)に貼り付けた。スライドガラスは 37℃で一晩乾燥させ、その後-80℃で保存し、その後の実験に使用した。

7-2：プローブの作成

各々の遺伝子の目的配列を PCR により増幅後、pT7Blue vector (Novagen) に挿入した。その後、制限酵素サイトから切り出し、pBluescript II KS vector に移した。まず、10μg のプラスミド DNA を制限酵素を用いて合計 300μl で直鎖化し、1.2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、直鎖化できているかどうかを確認した。その後、Proteinase K (10mg/ml) 2μl、10%SDS 3μl を加え、55℃で 30 分間インキュベートした。PCI (フェノール・クロロホルム・イソアミルアルコール、25:24:1) を等量加え、ボルテックスで攪拌後、室温、15000rpm で 10 分間遠心した。上清を 250μl 回収後、3M 酢酸ナトリウム 25μl、100%エタノール 650μl を加え、4℃、15000rpm で 15 分間遠心した。析出した DNA を 70%エタノールでリンスし、室温で 5 分間乾燥後、DEPC 水を 14μl 加え、in vitro 転写反応に使用した。直鎖化した plasmid DNA は-30℃で保存した。

In vitro 転写反応：1μg のプラスミド DNA を用い、合計 20μl で in vitro 転写反応を行った。直鎖化した plasmid DNA 1μg、10×buffer (Roche) 2μl、DIG RNA labeling mix (Roche) 2μl、T3 及び T7 RNA polymerase (Roche) 1.5μl に滅菌水を加えて合計 20μl にし、37℃で 90 分間インキュベート後、0.8%アガロースゲル電気泳動にてプローブの合成状態を確認した。確認後、3M 酢酸ナトリウム 2μl、100%エタノール 80μl を加え、4℃、15000rpm で 15 分間遠心した。上清を除去し、70%エタノールでリンス後、250ng/μl になるように DEPC 水で希釈した。合成したプローブは-80℃で保存した。

7-3：In situ hybridization

<Day1>

凍結切片を 37℃で 30 分間インキュベートし、完全に乾燥させた。以降の操作は、基本的に染色バット中で、反応は室温で行った。また、緩衝溶液の組成は下に記した。

脱包埋剤処理：スライドガラスを PBT の入った染色バットに入れ、15 分間の脱包埋剤処理を 2 回行い、その後、PBS で 5 分間洗浄した。

固定 1：4%PFA / PBS により 10 分間固定し、その後、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回繰り返した。

プロテアーゼ処理：10mg/ml Proteinase K / PBS で 3 分間処理し、その後、0.2% Glycine / PBS に移し、プロテアーゼ反応をとめた。

固定 2：4%PFA / PBS により 10 分間固定し、その後、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。

Prehybridization：Hybridization buffer で、70℃で 60 分間インキュベートした。

Hybridization：Hybridization buffer にプローブを 300ng/ml になるように調製し、70℃で 16 時間インキュベートした。

<Day2>

洗浄：Wash solution1 により 70℃で 20 分間の洗浄を 3 回行い、Wash solution3 により 30 分間の洗浄を 2 回行った。その後、buffer を TBST に交換した。

ブロッキング：ブロッキング溶液 (10% sheep serum を含む TBST) で 30 分間ブロッキングし、抗体反応に移った。

抗体反応：ブロッキング溶液で希釈した抗体反応液(anti-DIG 抗体 1:1000)に交換し、4℃で一晩抗体反応を行った。

<Day3>

洗浄：TBST により、15 分間の洗浄を 4 回行った。

発色：NTM で 15 分間前処理後、発色液に移し、発色反応を行った。

固定：シグナルが検出できることを顕微鏡を用いて確認し、確認後、4%PFA で 20 分間固定した。その後、PBS で 5 分間洗浄し、イムノマウント液 [shandon Immu-Mount (Thermo electron)]で包埋後、マニキュアで封入した。

<緩衝溶液の組成>

20×SSC (pH4.5)：[3M NaCl, 0.3M Na₃ citrate 3H₂O]

Hybridization buffer：[50% Formamide, 50mg/ml tRNA, 1% SDS, 50mg/ml Heparin, 25% 20×SSC (pH4.5)]

Wash solution1：[50% Formamide, 1% SDS, 25% 20×SSC (pH4.5)]

Wash solution3：[50% Formamide, 10% 20×SSC (pH4.5)]

TBST：50mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.1% Tween20

NTM：100mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH9.5), 50mM MgCl₂

発色反応液；NBT 45ml, BCIP 35ml を 10ml の NTM で希釈

8：蛍光セルソーターを用いた細胞回収

8-1：細胞の準備

＜Sox2-EGFP マウスからの回収＞

各胎生期 Sox2-EGFP マウスより終脳を 15ml チューブに回収した。1ml の HBSS でピペッティングし、回収した細胞を室温、1500rpm、で 7 分間遠心し、上清除去後、HBSS (2% FBS) 1ml でピペッティングし、フィルターキャップ付 5ml チューブ (FALCON)にうつした。さらに 1ml の HBSS (2% FBS)を添加し、フィルターに残っている細胞を通過させ、氷上に静置した。

＜レトロウイルス感染細胞の回収＞

90mm 培養皿で培養した細胞を、4ml の HBSS で 2 回洗浄し、0.05%Trypsin-EDTA (GIBCO)を 2ml 加えて 37℃で 5 分間インキュベートした。その後、Trypsin Inhibitor を 2ml 加え、1ml 用ピペットマンを用いてピペッティングすることにより、細胞を培養皿から剥がし、15ml チューブに移した。さらに、1ml の HBSS でピペッティングする操作を 2 回繰り返す、培養皿に残っている細胞を完全に回収した。15ml チューブに回収した細胞を室温、1500rpm、で 7 分間遠心し、上清除去後、HBSS (2% FBS) 1ml でピペッティングし、フィルターキャップ付 5ml チューブ (FALCON)にうつした。さらに 1ml の HBSS (2% FBS)を添加し、フィルターに残っている細胞を通過させ、氷上に静置した。

8-2：セルソーティング

GFP 陽性細胞のソーティングを行う際には、BECTON DICKINSON 社の FACS Vantage SE および解析ソフト Cell Quest とそのプロトコルに従った。また、PI 染色により、死んでいる細胞を除外した。回収した細胞は、氷上で保存し、Bisulfite Sequence 解析用のサンプルとして使用した。

9：Bisulfite Sequence

9-1：ゲノム抽出

細胞の入ったチューブを 4℃、3000rpm で 5 分間遠心し、上清除去後、Tail Lysis buffer (100mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 200mM NaCl, 0.2% SDS)を 500μl 加え、55℃で 30 分間攪拌した。等量の TE 飽和フェノールを加え、2 分間攪拌後、4℃、15000rpm で 5 分間遠心した。上清を 1.5ml チューブに回収し、PCI (フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール、25:24:1)を等量加え、2 分間攪拌後、4℃、15000rpm で 5 分間遠心した。上清を 1.5ml チューブに回収後、70%エタノールでリンスした。室温で 5 分間乾燥後、TE を 100μl 加え、65℃で 10 分間静置した。その後、DNA の濃度を測定し、1μg/μl になるように TE で希釈し、4℃で保存した。

9-2 : Bisulfite 処理

Bisulfite 処理は、Methylamp DNA modification Kit (EPIGENTEK)を用い、そのプロトコルに従った。具体的には、1 μ g のゲノム DNA に滅菌水を加え、合計 24 μ l にした。そこに、R1 を 1ml 加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートした。その間に、1.1ml の R3 を R2 に加え、vortex で 2 分間攪拌し、さらに R1 を 40 μ l 加え軽く vortex で攪拌した。インキュベート後、R1, R2, R3 混合液 125 μ l を加え、vortex 後、65 $^{\circ}$ C で 90 分間インキュベートした。インキュベート後、300 μ l の R4 をインキュベートしたサンプルに加え、その全量を collection tube に載せた spin column に移し、室温、12000rpm で 15 秒間遠心後した。200 μ l の R5 を spin column に加え、室温、12000rpm で 15 秒間遠心した。R1 10ml と 1.1ml の 90%エタノールを混合し、そのうち 50 μ l を spin column に加えて室温で 8 分間静置後、室温、12000rpm で 15 秒間遠心した。90%エタノール 200 μ l を spin column に加え、室温、12000rpm で 15 秒間、さらに、90%エタノール 200 μ l を spin column に加え、室温、12000rpm で 35 秒間遠心した。その後、spin column を 1.5ml チューブに載せ、R6 を 10 μ l 加え、室温、12000rpm で 20 秒間遠心することにより DNA 溶液を回収した。

9-3 : Bisulfite 処理したゲノム DNA のクローニング

GFAP プロモーター上の STAT3 認識配列およびその周辺の CpG サイトを含むようにプライマーを設計し、8-2 で回収した DNA をテンプレートにして PCR 増幅を行った。PCR 反応液は、AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems)を用いて、ゲノム DNA 5 μ l、2 $\times$ Master Mix 25 μ l、20 μ M forward プライマー (GFm2-5': GGG ATT TAT TAG GAG AAT TTT AGT AAG TAG)、20 μ M reverse プライマー (GFm2-3': TCT ACC CAT ACT TA ACT TCT AAT ATC TAC)それぞれ 2.0 μ l、DMSO 2.0 μ l、滅菌水 14 μ l を混合し、合計 50 μ l で PCR 反応を行った。PCR 反応は iCycler (Bio Rad)を用いて、95 $^{\circ}$ C 9 分の後、94 $^{\circ}$ C 20 秒、58 $^{\circ}$ C 20 秒、72 $^{\circ}$ C 60 秒のサイクルを 40 回行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 3 分の反応を行った。増幅サンプルを 1.2%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅 DNA バンドを切り出した。切り出したゲルは 1.5ml チューブに移し、NaI (Q-BIOGENE)を 500 μ l 加え、60 $^{\circ}$ C で静置し完全に溶解させた。その後、Wizard Minipreps DNA Purification Resin (Promega)を 1ml 加えてよくピペッティングし、Wizard minicolumn (Promega)をセットした 2.5ml シリンジ (TERUMO) に Resin 混合溶液を全量入れ、カラム精製を行った。その後、Column Wash Solution (Promega)を 2ml シリンジに入れてカラムを洗浄し、カラムからシリンジをはずした。カラムを 1.5ml チューブに載せた状態で、室温、12000rpm で 1 分間遠心することにより、カラム内に残留していた Column Wash Solution を除去した。その後、新しい 1.5ml チューブにカラムを載せ、65 $^{\circ}$ C の滅菌水 20 μ l をカラムに注ぎ、室温、12000rpm で 1 分間遠心することで DNA 溶液を回収した。

回収した DNA 溶液をインサート液とし、T-vector (pT7Blue vector: Novagen)を 1 μ l、インサート液を 3 μ l、Ligation High (TOYOBO)を 2 μ l ずつ 1.5ml チューブに入れ、16°C の水槽で 3 時間ライゲーション反応を行った。コンピテントセル DH5 α (TOYOBO) 10 μ l にライゲーション液を 1 μ l 加え、氷上で 20 分間静置した。その後、42°C で 45 秒間ヒートショックを与え、すぐに氷上に移して 2 分間静置した。そして LB 培地(1% トリプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)を 120 μ l 添加し、37°C で 10 分間インキュベートした。インキュベート中に LB 寒天培地 (+Ampicillin)に X-gal を 50 μ l 塗布し、インキュベートした菌液を全量プレーティングし、37°Cで一晩培養した。

9-4 : コロニーのピックアップ及びプラスミドの抽出

前日培養したプレートから、白色コロニーを 20 個ずつピックアップし、3ml の LB 培地 (+Ampicillin)の入ったユニットチューブ中で、37°Cで一晩培養した。プラスミドの抽出は、KURABO 社の Automatic DNA Isolation System PI-200 と、そのプロトコルに従った。抽出したプラスミドを用いて制限酵素処理を行い、電気泳動によってインサートチェックを行った。そのうち、16 個を Sequence 解析のサンプルとして使用した。

9-5 : Sequence 解読

Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を 2.5 μ l、Big Dye Terminator v1.1, 3.1 5 $\times$ Sequencing Buffer (Applied Biosystems)を 2 μ l、2 μ M Primer (GFm2-3')を 1.6 μ l、Plasmid DNA を 2 μ l、滅菌水 1.9 μ l の合計 10 μ l で PCR 増幅を行った。PCR 反応は iCycler (Bio Rad)を用いて、96°C 2 分の後、95°C 10 秒、50°C 5 秒、60°C 4 分のサイクルを 25 回行い、その後 4°C で保存した。PCR 反応後、3M 酢酸ナトリウムを 1 μ l、0.125M EDTA を 1 μ l、100%エタノールを 50 μ l 加え、ボルテックスで攪拌後、4°C、15000rpm で 15 分間遠心した。上清除去後、70%エタノールでリンス後、室温で 5 分間乾燥させた。その後、ホルムアミドを 15 μ l 加え、95°C で 2 分間熱変性を行った後すぐに氷冷した。サンプルを 96 穴プレートに移した後、3100 Genetic Analyzer (HITACHI)で解析を行った。Sequence データは、付属ソフトである 3100 Data Collection により解析した。

10 : Luciferase assay

神経上皮細胞を 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 2.5 kb (GF1L) (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を用いた。内部コントロールとして、ヒト elongation factor 1 a 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。翌日、LIF(50ng/ml)及び各細胞より調整した培養上清で刺激し、その翌日 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。

結果

1. 胎生中期特異的発現遺伝子の同定

まず本研究で用いる各胎生期マウス終脳より調整した細胞が、本培養条件においてどの程度神経幹細胞を含んでいるのかを検討した。アストロサイトへの分化能を獲得していない胎生中期（胎生 11.5 日目）およびアストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期（胎生 14.5 日目）のマウス終脳より神経幹細胞を調製し、神経幹細胞特異的発現タンパク質である SOX2（SRY-box containing gene 2）に対する抗体を用いて免疫染色法を行った。その結果、胎生中期、胎生後期どちらの条件においても、8 割程度が SOX2 陽性の神経幹細胞であることが観察され、本培養条件下において多くの胎生中期、胎生後期神経幹細胞が含まれていることを確認した。

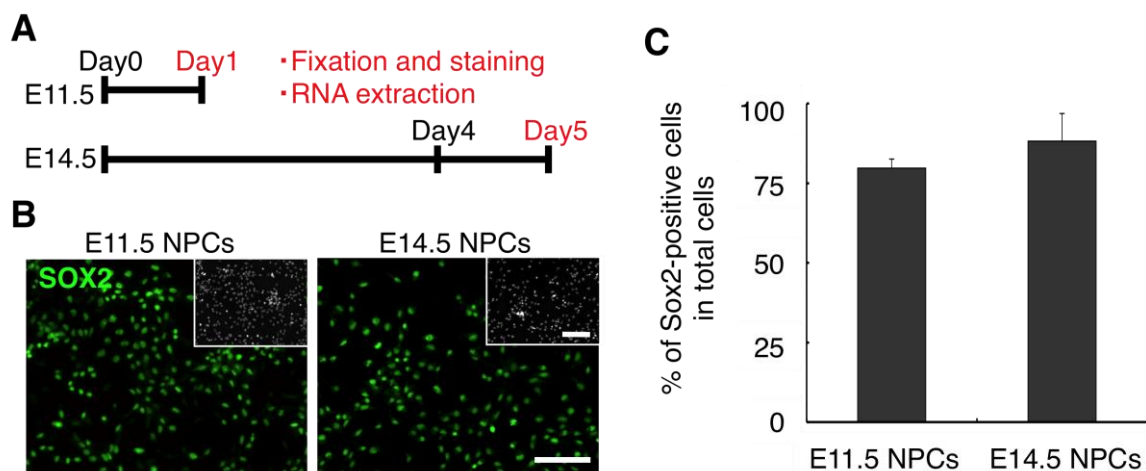


図 1：胎生中期および胎生後期神経幹細胞の培養

(A)実験条件の模式図。胎生中期の神経幹細胞は調製・bFGF 存在下で培養開始 1 日後、胎生後期の神経幹細胞は調製・bFGF 存在下に 4 日間培養後再播種し、その翌日に細胞を染色および Gene Chip に用いるサンプルとして回収し RNA を抽出した。(B)サンプル回収時の免疫染色。Sox2(緑)に対する抗体を用いて免疫染色を行った。(C)B においてそれぞれの抗体陽性細胞数をカウントした。

そこで次に、上述培養条件で得られた各胎生期の神経幹細胞を多含する細胞集団より RNA を抽出し、Affymetrix 社製 GeneChip (Mouse Expression Set 430 arrays)を用いて遺伝子の発現レベルを網羅的に解析した(Kanno et al., 2006)。胎生中期と胎生後期の細胞集団における発現量を比較し、信頼性の得られる値として各胎生期で発現量が少なくとも 5 倍以上変化している遺伝子群に着目した。その際、発現量が 5 倍以上変化している遺伝子においても、発現量が極端に低い遺伝子については解析から除外した。それにより、胎生中期で高発現している遺伝子 194 個、胎生後期で高発現している遺伝子 55 個をそれぞれ同定した (図 2)。さらに、これら遺伝子をもとにその機能によりカテゴリーごとに分類し、その中でも DNA に直接結合でき、DNA メチル化変動に関与し得ると考えられる転写調節因子群を抽出した。その結果、胎生中期神経幹細胞で高発

現している転写調節因子 21 個、また、胎生後期神経幹細胞において高発現している転写調節因子を 5 個同定した (図 2, 表 1)。今回、これらの転写調節因子群の中から、他の幹細胞において細胞増殖や分化、クロマチンリモデリングに関与すると報告のある因子 (*N-myc*, *Hmga2*, *Bcl11a*, *Sox11*, *Bhlhb5*) に着目した (Brunelli et al., 2003; Knoepfler et al., 2002; Saiki et al., 2000; Sawai et al., 1990; Sock et al., 2004; Zhou et al., 1995)。

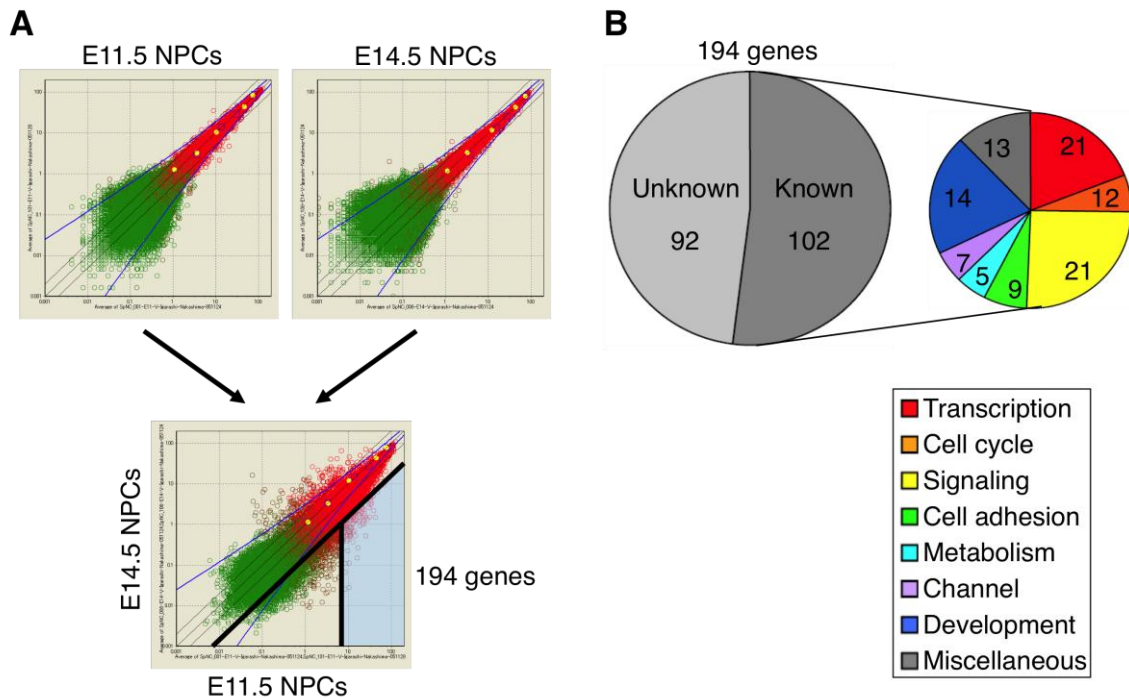


図 2：マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

各胎生期神経幹細胞での全遺伝子の発現レベルを比較し、発現量が 5 倍以上変化している遺伝子に着目した。また、発現量が極端に少ない遺伝子については解析から除外した。胎生中期および胎生後期の神経幹細胞における全遺伝子の発現レベルを比較し、胎生中期において胎生後期よりも発現量が 5 倍以上(A)、または胎生後期において胎生中期よりも発現量が 5 倍以上の変化が認められた遺伝子を示した(B)。さらに、それら遺伝子をもとにその機能によりカテゴリーごとに分類した。

胎生中期および胎生後期神経幹細胞より RNA を抽出し、各々の遺伝子に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った (図 3)。その結果、マイクロアレイの結果と同様な各胎生期特異的な発現が認められた。これら転写調節因子の発現時期および発現領域をさらに詳細に検討するために、胎生 11.5, 14.5, 17.5 日目マウス脳切片を作成し、in situ hybridization を行った。その結果、*N-myc* および *Hmga2* は胎生 11.5 日目の神経幹細胞が局在する脳室周囲部に高発現していた (図 3)。それに対し、*Bcl11a*, *Sox11*, *Bhlhb5* は脳室周囲部だけでなく胎生 14.5 日目以降のニューロンが存在する領域においても発現が確認された (図 3)。この結果より *N-myc* および *Hmga2* は胎生中期の脳室周囲部に高発現していたことから、少なくとも胎生中期神経幹細胞において何らかの役割を果たしているものと推察された。

Probe set ID	Genbank ID	Gene symbol	E11.5 NPCs	E14.5 NPCs	E11.5/E14.5
1433919_at	AV302111	<i>Asb4</i>	9.8	0.5	19.6
1419406_a_at	NM_016707	<i>Bcl11a</i>	13.8	1.8	7.7
1418271_at	NM_021560	<i>Bhlhb5</i>	10.6	1.2	8.8
1452207_at	Y15163	<i>Cited2</i>	16.7	2.6	6.4
1449470_at	NM_010053	<i>Dlx1</i>	13.8	2.4	5.8
1448877_at	NM_010054	<i>Dlx2</i>	9.8	1.8	5.4
1449863_a_at	NM_010056	<i>Dlx5</i>	11.2	0.7	16.0
1459211_at	AW546128	<i>Gli2</i>	8.0	1.5	5.3
1456067_at	AW546010	<i>Gli3</i>	20.6	2.1	9.8
1422851_at	X58380	<i>Hmga2</i>	25.5	0.5	51.0
1450723_at	BQ176915	<i>Ils1</i>	8.6	0.1	86.0
1427300_at	D49658	<i>Lhx8</i>	10.5	0.1	105.0
1417155_at	BC005453	<i>N-myc</i>	8.2	1.2	6.8
1415811_at	BB702754	<i>NP95</i>	12.6	2.1	6.0
1421193_a_at	NM_016768	<i>Pbx3</i>	12.3	1.6	7.7
1417400_at	NM_030690	<i>Rai14</i>	11.0	1.6	6.9
1435856_x_at	AV310148	<i>Smarb1</i>	8.0	1.6	5.0
1431255_at	BB656631	<i>Sox11</i>	38.7	6.2	6.2
1450034_at	AW214029	<i>Stat1</i>	9.6	1.8	5.3
1416711_at	NM_009322	<i>Tbr1</i>	9.8	0.2	49.0
1423424_at	BB732077	<i>Zic3</i>	11.2	0.5	22.4

表 1 ; 胎生中期神経幹細胞特異的発現遺伝子

胎生中期特異的発現を示す 194 遺伝子のうち、転写関連因子 21 個を抽出した。また、既に他の幹細胞で増殖や分化に関与するものを太字で示した。

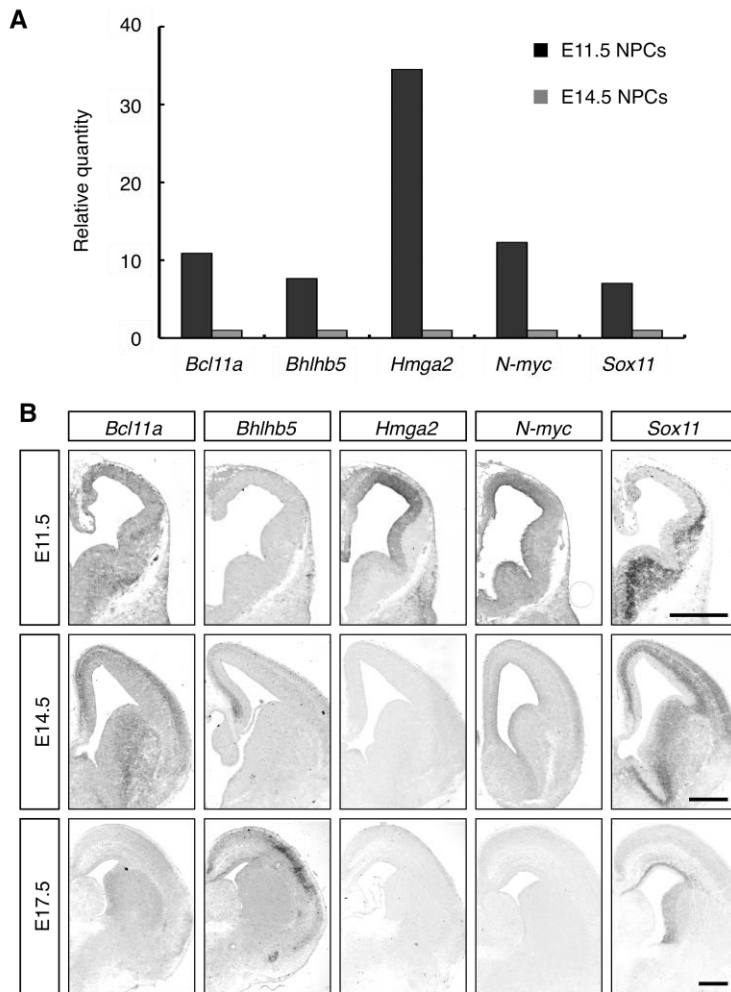


図 3: 胎生中期特異的発現遺伝子の発現領域の確認

(A)胎生中期及び胎生後期神経幹細胞より RNA を抽出し、各転写関連因子の発現量を定量的 PCR 法により比較した。

(B)胎生 11.5, 14.5, 17.5 日目マウス脳切片を作成し、in situ hybridization を行うことにより各遺伝子の発現時期、発現パターンを解析した。N-myc および Hmga2 においては、Gene Chip の結果と同様に胎生中期 (E11.5) の脳室周囲部に発現が認められたが、胎生後期 (E14.5, E17.5) においてはほとんど検出されなかった。Bcl11a, Bhlhb5, Sox11 については、神経幹細胞が存在する脳室周囲部だけではなくニューロンの存在する領域においても発現が認められた。

Scale bars = 1mm

2. 胎生中期特異的発現遺伝子による神経幹細胞のアストロサイト分化の抑制

今回同定した *N-myc* および *Hmga2* が高発現している胎生中期神経幹細胞は、ニューロンへは分化するもののアストロサイトへは分化しない。そこで、これら因子が神経幹細胞の分化傾向にどのような影響を与えるのかを検討した。レトロウィルスを用いてこれらの因子を、その発現が低い胎生後期神経幹細胞に異所的に発現させ、免疫染色法により分化傾向を観察した(図 4)。コントロールとして GFP のみを発現させた細胞では、LIF 刺激により GFAP 陽性のアストロサイトへと分化した細胞が多く観察されたが (42%)、N-MYC や HMGA2 を発現させた細胞においては、コントロールと比較して GFAP 陽性細胞への分化の抑制が認められた (N-MYC: 0.5%, HMGA2: 3%)。アストロサイトへの分化能を獲得している胎生後期神経幹細胞においては、*GFAP* プロモーター上の STAT3 認識配列は脱メチル化されているが、N-MYC や HMGA2 の高発現する胎生中期神経幹細胞においてその領域は高頻度メチル化されている。そのため、N-MYC 及び HMGA2 がアストロサイト分化を抑制するメカニズムとして、これら因子が高メチル化状態を作り出している可能性が考えられた。

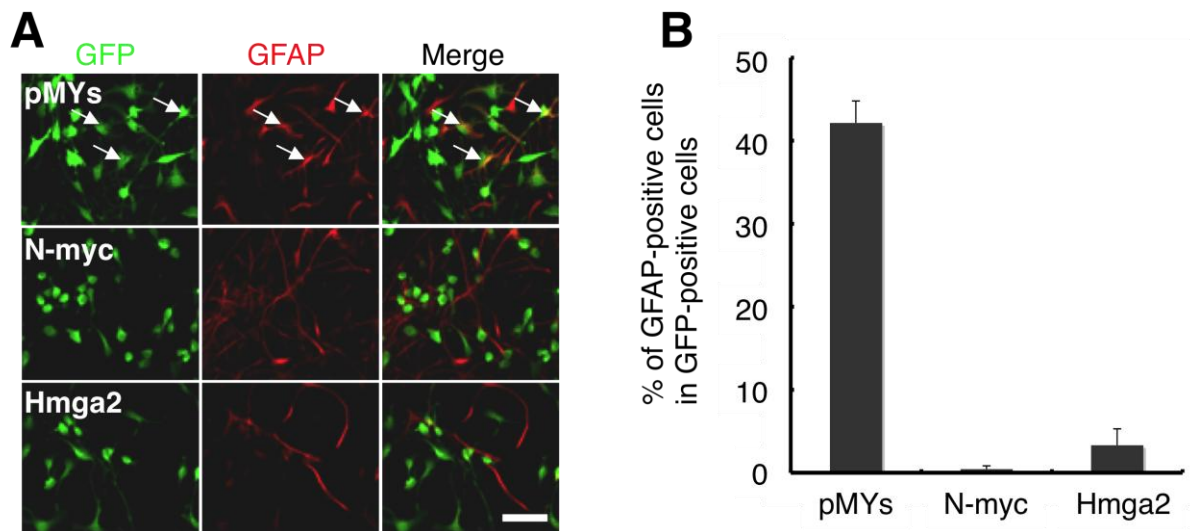


図 4：胎生中期特異的発現因子による神経幹細胞のアストロサイト分化抑制作用

(A)胎生後期の神経幹細胞を bFGF 存在下で 4 日間培養後、胎生中期特異的発現遺伝子のうち、N-myc および Hmga2 を gfp と共にレトロウィルスを用いて発現させた。さらに、LIF 存在下で 4 日間培養し、固定後 GFP と GFAP に対する抗体を用いて二重染色を行った。コントロールの GFP のみ (Control, 最上段) を発現させた細胞は LIF に応じた GFAP 陽性細胞 (赤) への分化が多く認められたが、N-myc および Hmga2 を過剰発現させた細胞においては LIF 存在下でも GFAP 陽性細胞への分化が抑制された。(B)A において、GFAP 陽性細胞数/GFP 陽性細胞数をカウントした。

3. N-myc 及び Hmga2 のメチル化への関与

そこで、N-MYC 及び HMGA2 の発現とメチル化状態の関与を検討するために、これら因子を発現させた神経幹細胞を GFP の蛍光を指標にセルソーターを用いて回収し、それら細胞からゲノム DNA を回収後、bisulfite sequence 法によって STAT3 認識配列のメチル化状態を解析した。その結果、N-myc や Hmga2 を発現させた細胞とコントロールとして GFP のみを発現させた細胞において、メチル化状態に差は認められなかった(図 5)。この結果より、これら転写調節因子の異所的な発現により、Gfap プロモーターの STAT3 認識配列が脱メチル化された状態にある胎生後期神経幹細胞においても、アストロサイトへの分化が抑制されることが示された。

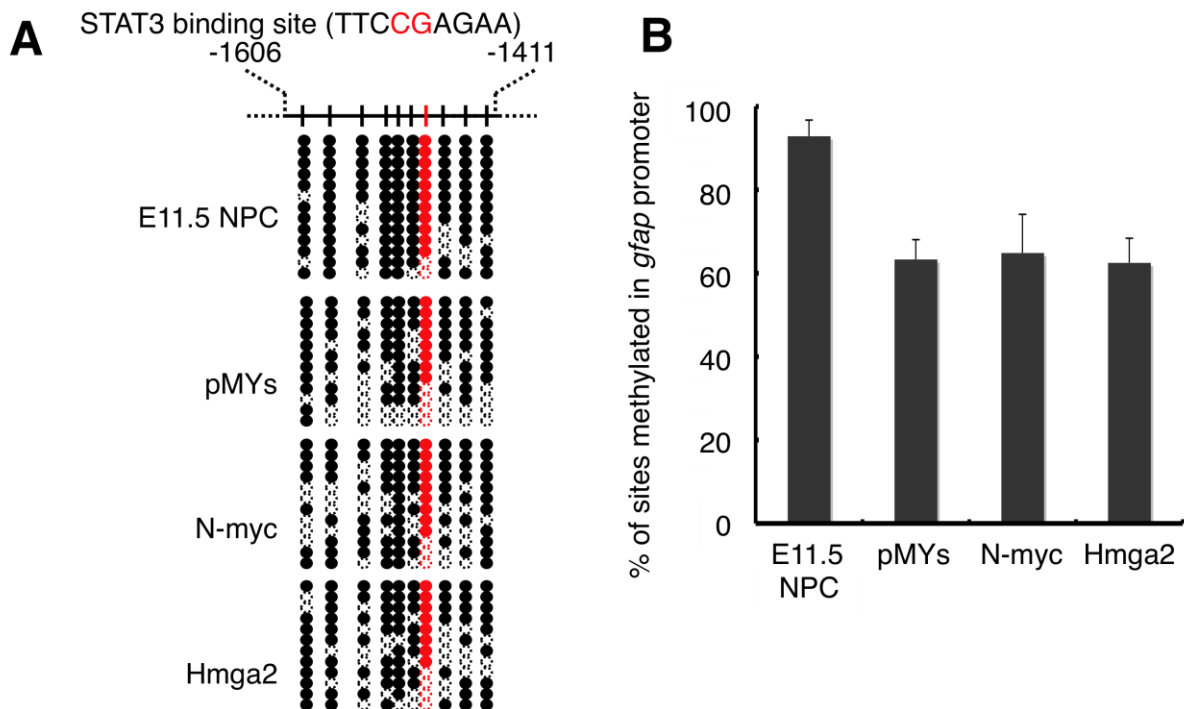


図 5 : N-myc 及び Hmga2 の発現によるメチル化状態への影響

胎生中期神経幹細胞を bFGF 存在下で培養開始 1 日後、レトロウィルスを用いて N-myc 及び Hmga2 を *gfp* と共に発現させた。その後、bFGF 存在下で 4 日間培養し、蛍光セルソーターを用いて GFP 陽性細胞をソーティングした。回収細胞からゲノム DNA を抽出し、Bisulfite Sequence 解析を行った結果、コントロールとして GFP のみを発現させた神経幹細胞と N-myc 及び Hmga2 を発現した細胞で有意な差は観察されなかった。(A)メチル化されている CpG サイトを●、脱メチル化されている CpG サイトを○で示した。(B)A におけるメチル化の割合を示した。

4. Notch シグナルは神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化を誘導する

一方で、神経幹細胞の多分化能獲得においては、アストロサイト特異的遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化が必須である。この発生段階依存的な DNA 脱メチル化のメカニズムに関して、波平昌一助教らと協同して、Notch シグナルによる以下のモデルを報告した (図 6)。神経中期幹細胞は非対称分裂により、神経幹細胞とニューロンを産生するが、ニューロンは Notch のリガンドである Dll1 (Delta-like 1) や Jag1 (Jagged 1) を発現している。そのため、近接する神経幹細胞に Notch シグナルを入れ、その下流で転写因子 NFIA の発現を誘導する。最終的に NFIA が神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化を誘導することで、多分化能を持った神経幹細胞として成熟する。

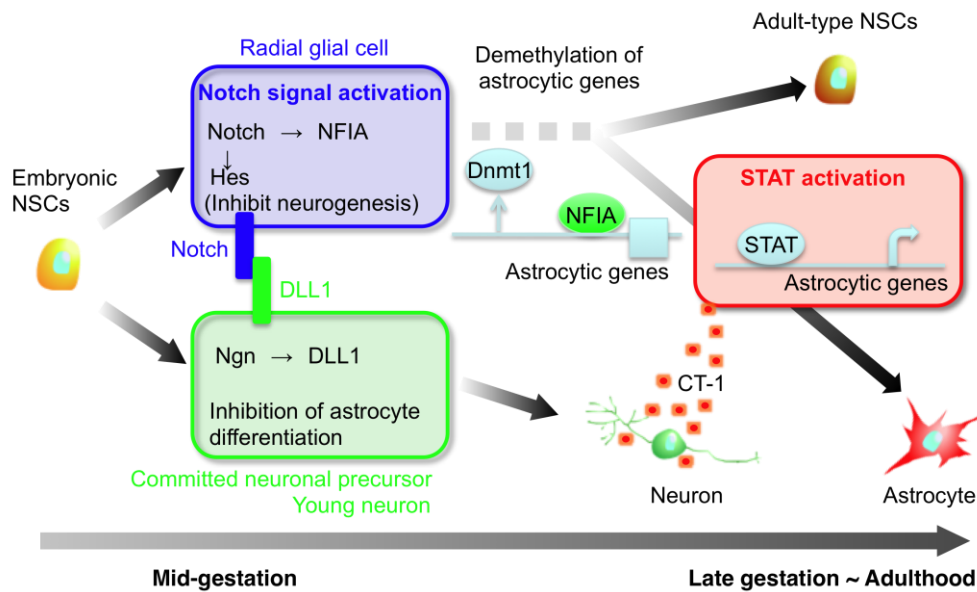


図 6：神経幹細胞の発生段階依存的変化

神経幹細胞から早期に生まれたニューロンが残存する神経幹細胞に働きかけ、次に産生されるべきアストロサイトで特異的に発現される遺伝子の脱メチル化を誘導することにより、神経幹細胞のアストロサイトへの分化能を付与する。その後、神経幹細胞はニューロンから分泌された CT-1 の刺激に応じてアストロサイトへ分化する。

5. 生体内より直接回収した神経幹細胞におけるメチル化解析

このように、神経幹細胞は発生過程の進行に伴い Notch シグナルを介してアストロサイト特異的遺伝子の脱メチル化を誘導するが、この DNA メチル化の変化がゲノム全体でどの程度生じているのかについては分かっていない。神経幹細胞の未分化性維持や多分化能獲得といった性質変化を詳細に捉えるためには、ゲノム全体における DNA のメチル化状態の変化を把握し、その変化が遺伝子発現とどの程度関連しているかを解析する必要があると考えられる。また、その変化が実際に生体脳でどう変化するかを解析するために、神経幹細胞を生体脳から直接抽出する必要がある。そこで、本研究では Sox2 プロモーター制御下に EGFP を組み込んだ Sox2-GFP トランスジェニックマウス(D'Amour and Gage, 2003)を用いて解析を行った。胎生 11.5, 14.5, 18.5 日目及び生後 3 日目マウス脳より終脳を単離し、FACS Vantage を用いて GFP 陽性細胞を回収することにより各胎生期神経幹細胞を調整した。それら細胞からゲノム DNA を抽出し、bisulfite sequence 法によりメチル化状態を解析した結果、胎生中期 (E11.5) 神経幹細胞では *Gfap* プロモーターの転写調節領域は高頻度にメチル化されているものの、発生の進行に伴い脱メチル化が生じ、出生後 3 日目においては完全に脱メチル化された状態になっていることが分かった (図 7)。この *Gfap* プロモーターのメチル化状態の変化は脳皮質形成過程において神経幹細胞がアストロサイトへの分化能を獲得するタイミングと一致しており、生体内においても実際にエピジェネ

ティクス機構が神経幹細胞の性質変換に関与することが示唆された。現在、特定領域のメチル化ではなく、ゲノム全体での変化を解析するため、東京大学理学系研究科の伊藤隆司教授との共同研究により bisulfite 処理したゲノム DNA をショットガン・シーケンシング法を用いて全ゲノム配列のメチル化状態の解析を進めている。さらに、そのメチル化の変化と遺伝子発現の変化を解析するため、同様の神経幹細胞から抽出した RNA を用いてマイクロアレイ解析を行っている。

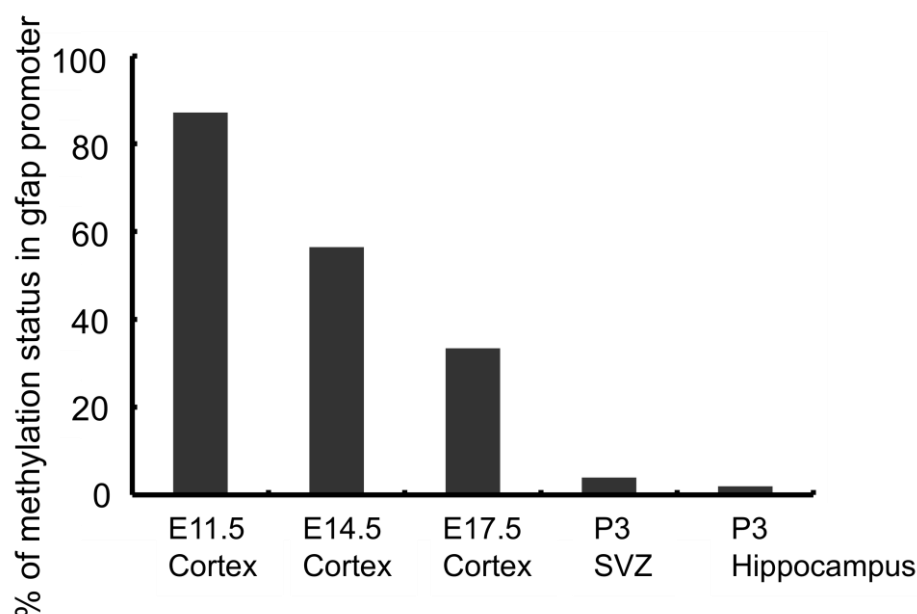


図7：Gfapプロモーターの生体内でのメチル化変動

各ステージの Sox2 マウス脳より神経幹細胞を単離し、bisulfite sequence 法を用いて DNA メチル化状態を解析した結果、発生段階の進行に伴う脱メチル化が観察された。

6. 髄膜細胞による神経幹細胞のアストロサイト分化

前述結果より、神経幹細胞の脱メチル化機構は解明されつつあるものの、脱メチル化された神経幹細胞において、アストロサイト分化を誘導する IL6-FC がどこから分泌されているのかという問題が残されている。アストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞は放射状（ラジアル）グリアという形態をとり、ラジアルファイバーを伸ばして脳を覆っている髄膜に接しているが、髄膜形成不全のマウスではラジアルグリアの形成に異常が起ることやラジアルグリアの増殖能力が低下することが報告されている(Zarbalis et al., 2007)。IL6-FC (IL-6 family cytokine) が神経幹細胞の増殖にも関与している(Hatta et al., 2002)ことから、髄膜がラジアルグリアに作用している可能性が考えられた。そこで、神経幹細胞の分化制御における髄膜細胞の関与を検討した。髄膜細胞と E14.5 マウス終脳由来神経上皮細胞を共培養した結果、髄膜細胞と共培養した神経幹細胞においてはアストロサイト分化が誘導されることを発見した（図8）。

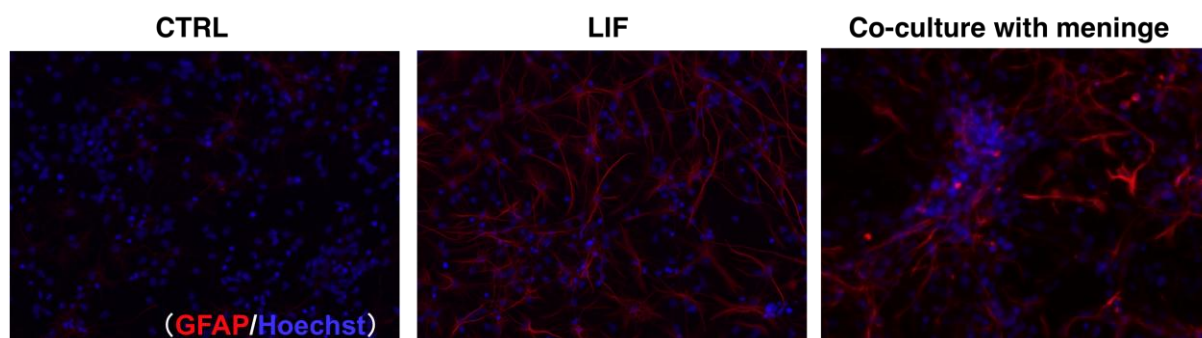


図 8：髄膜細胞による神経幹細胞のアストロサイト分化

胎生 14.5 日目マウスより回収した髄膜細胞と神経幹細胞を共培養した結果（右）、LIF 刺激（中）と同様に、GFAP 陽性アストロサイトへの分化が観察された。

7. 髄膜培養上清は IL6-FC を分泌し、アストロサイト分化を誘導する

前述の作用が髄膜細胞と神経幹細胞の接触が重要なのか、髄膜細胞が分泌している因子が重要なのかを検討するため、髄膜細胞の培養上清（CM: conditioned medium）を用いて神経幹細胞の分化傾向を観察した。その結果、髄膜細胞の CM を用いた場合にも神経幹細胞のアストロサイト分化が観察されたため、髄膜細胞が分泌している因子が重要と考えられた（図 9）。現在までに、ニューロンや神経幹細胞自身がアストロサイト分化誘導サイトカインである IL6-FC を分泌している事が報告されている。そこで、神経幹細胞やニューロンを培養し、それら細胞より調整した CM を用いてアストロサイト分化を検討した。しかしながら、ニューロンや神経幹細胞より調整した CM では神経幹細胞のアストロサイト分化が観察されなかった（図 9）。

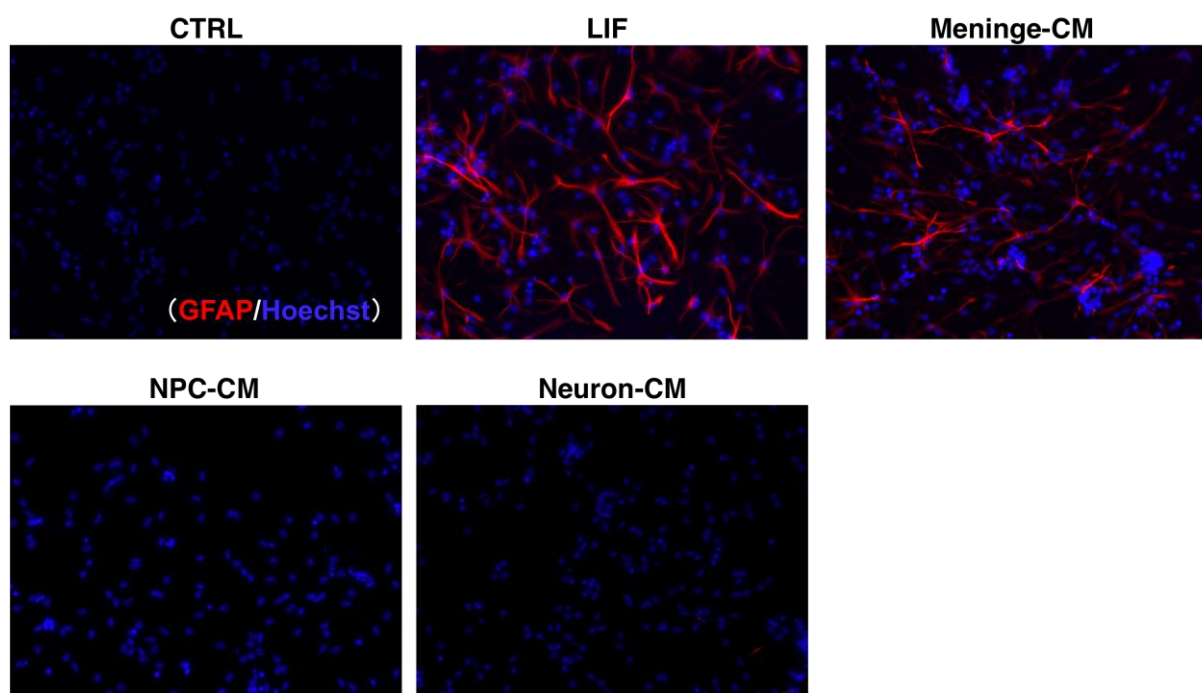


図 9：髄膜培養上清による神経幹細胞のアストロサイト分化

髄膜細胞、神経幹細胞、ニューロンを培養し、それら培養上清を用いて神経幹細胞の分化傾向を検討した。髄膜培養上清は LIF と同様に神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導したが、神経幹細胞やニューロンの培養上清ではアストロサイト分化は観察されなかった。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子上流に *Gfap* 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) を用いたルシフェラーゼアッセイを行ったところ、免疫染色法で得られた結果同様、髄膜細胞の CM によりプロモーター活性の上昇が見られた (図 10)。しかし、免疫染色の結果同様、ニューロンや神経幹細胞から調整した CM ではプロモーター活性の上昇は観察されなかった (図 10)。

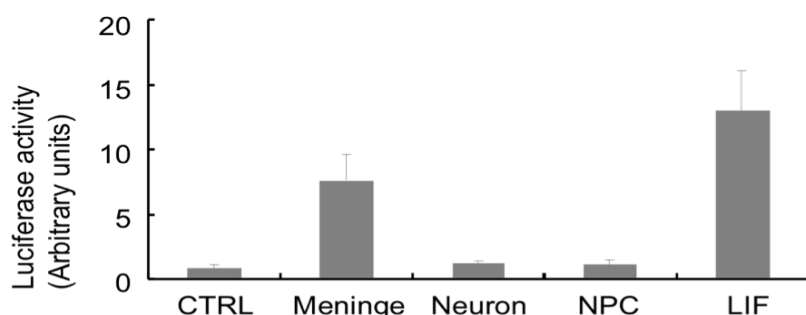


図 10：髄膜培養上清は *gfap* プロモーターを活性化する

ルシフェラーゼ遺伝子上流に *gfap* プロモーターを組み込んだコンストラクト (GF1L-pGL3) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。コンストラクトを神経幹細胞にトランスフェクション後、髄膜、神経幹細胞、ニューロンより調整した培養上清で刺激し、翌日にルシフェラーゼ活性を測定した。

図 10 で得られた結果が IL6-FC によるものかを確認するため、優性抑制型 STAT3 及び IL6-FC の共通信号伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体 (RX435) を使い、GF1L を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、プロモーター活性の上昇が抑制されたことから髄膜細胞の CM による作用は IL6-FC による可能性が示唆された (図 11)。

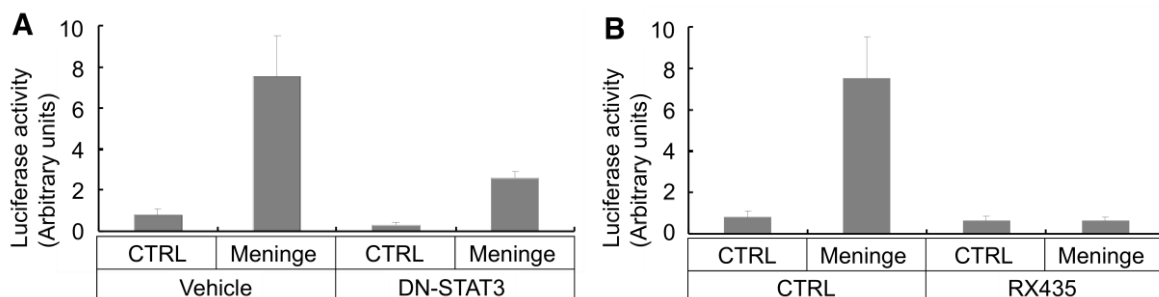


図 11：DN-STAT3 及び RX435 は、髄膜-CM によるプロモーター活性を抑制する

GF1L-PGL3 と同時に DN-STAT3 を発現させた場合(A)、及び、IL6-FC の共通伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体 (RX435) で処理することにより(B)、髄膜-CM によって観察された *Gfap* プロモーターのプロモーター活性が抑制された。

そこで、髄膜細胞がどのような IL6-FC を分泌しているのか、また、神経幹細胞やニューロンと比較してどの程度発現しているかを検討するため、各細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法により IL6-FC の発現量を解析した。その結果、IL6-FC のうち LIF、CNTF、CLC が髄膜細胞で高発現していることが観察された（図 12）。一方で、既にニューロンで発現していることが知られている CT-1(Barnabe-Heider et al., 2005)は、他のサイトカインと比較して発現量が低いことが示唆された。

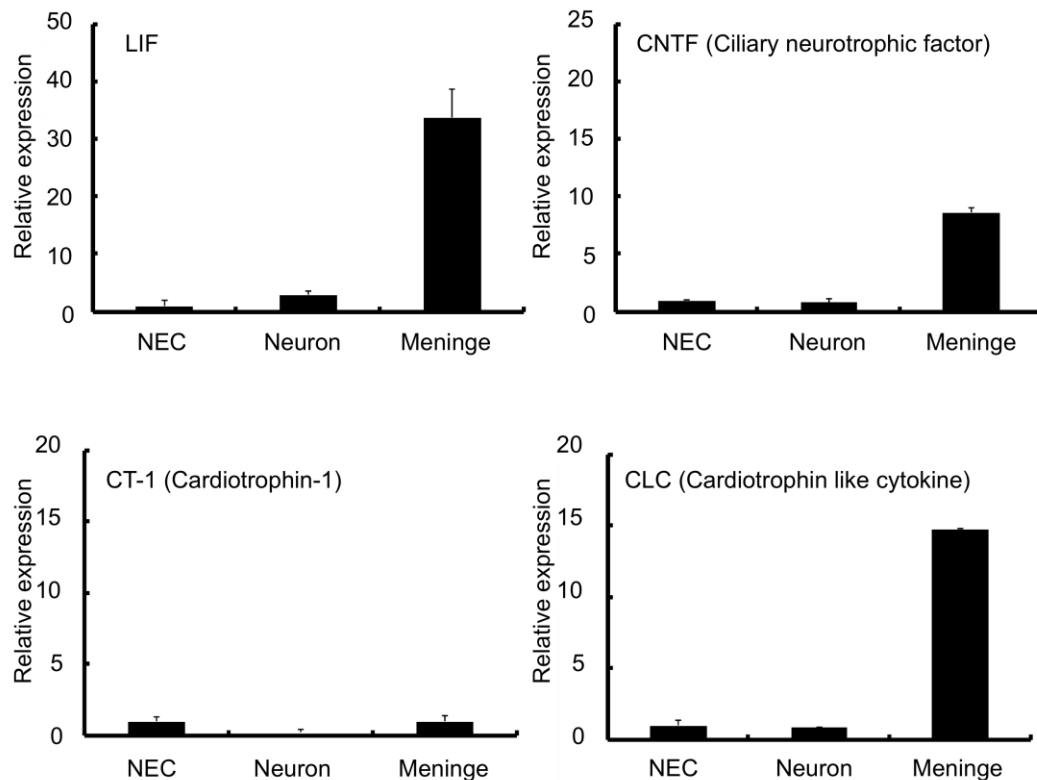


図 12：髄膜細胞は IL6-FC を高発現している

髄膜、神経幹細胞、ニューロンを培養後、それら細胞より RNA を回収し、IL6-FC の各種プライマーを用いて定量的 PCR を行った。

これらの結果から、神経幹細胞のアストロサイト分化に関して、Notch シグナルが神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化を誘導し、その神経幹細胞に対して髄膜から分泌された IL6-FC がアストロサイト分化を誘導する可能性が示唆された。

考察

本研究は、神経幹細胞の性質変化を制御するメカニズムを解明することを目的として実験を行った。その手法として、マイクロアレイによる網羅的解析法を用いて、胎生中期および胎生後期のマウス終脳から得られた細胞を培養し、各胎生期に特異的に発現する遺伝子を複数同定した（図 2）。しかし、マイクロアレイの解析に用いた細胞は、わずかではあるがニューロンが混在しているため（図 1）、マイクロアレイ解析の結果得られた遺伝子が必ずしも神経幹細胞のみに特異的に発現している遺伝子であるとは限らなかった。そこで今回は、神経幹細胞特異的に発現している遺伝子を同定するために、*in situ hybridization* によって発現部位を検討し、結果として *N-myc* と *Hmga2* を同定した。

今回の GeneChip 解析では、各 Array 間での遺伝子発現を *percellome* 法(Kanno et al., 2006)により用いて補正した。*percellome* 法では、各サンプルに *grade-dosed spike cocktail* (GSC)を加えることにより、サンプルに含まれる細胞数を測定することを可能としており、細胞 1 つ当たりでの遺伝子の発現量を推測できる。そのため、*percellome* 法を用いることにより、サンプルおよび *platform* の異なるデータにおいても比較解析が可能である。

胎生中期に高発現している転写調節因子 *N-myc* と *Hmga2* がアストロサイト分化を抑制するという結果を得たが、それら因子がどのようなメカニズムで神経幹細胞のアストロサイト分化を抑制するのかは分かっていない。神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得制御機構として、STAT3 活性化と *Gfap* プロモーターの STAT3 認識配列の DNA 脱メチル化が必須であることが知られている(Takizawa et al., 2001)。そのため、本研究で得られた転写因子群によるアストロサイト分化抑制機構としては、STAT3 の機能の抑制もしくは *Gfap* プロモーターのメチル化による制御の 2 通りが考えられる。しかし以前に、これら転写調節因子が高発現している胎生中期の神経幹細胞においても、LIF に応じた STAT3 の活性化が観察されることが報告されているため、STAT3 活性化阻害によるアストロサイト分化抑制機構は考えにくい(Takizawa et al., 2001)。*N-myc* や *Hmga2* の高発現する胎生中期神経幹細胞においては、STAT3 認識配列は高頻度メチル化されていることから、これら因子の発現とメチル化状態の関与が考えられた。しかしながら、*N-myc* や *Hmga2* を発現させ培養した神経幹細胞においても STAT3 認識配列の脱メチル化が観察され、コントロールと比較して差は見られなかった。以前にアストロサイト分化を抑制する転写因子として、*Ngn* が報告されている(Sun et al., 2001)が、本研究室の解析から、この *Ngn* を発現させた神経幹細胞においては、アストロサイト特異的遺伝子 *Gfap* のプロモーター領域が高頻度にメチル化された状態に保たれることが判明している。そのため、今回アストロサイト分化抑制作用を示

した *N-myc* および *Hmga2* は、神経幹細胞のアストロサイト分化制御機構において、STAT3 の活性化や DNA のメチル化といった今まで知られているメカニズムの他に、新たな制御機構が存在する可能性を示唆している。近年、*N-myc* や *Hmga2* が、がん抑制遺伝子である p16^{INK4a} や p19^{ARF} の発現を制御することが報告された(Nagao et al., 2008; Nishino et al., 2008)。*N-myc* が p19^{ARF}、*Hmga2* が p16^{INK4a} と p19^{ARF} の発現を抑制することにより、神経幹細胞の自己複製能を維持し、結果として分化を抑制することが示されている。神経幹細胞の増殖と分化の関係に関しては、薬剤投与により細胞周期を止めることで分化が促進されることや(Misumi et al., 2008)、逆に CDK (cyclin dependent kinase) 抑制因子である p27^{kip1} を抑制することで未分化状態が保たれ増殖が続けることが知られていることから(Mitsuhashi and Takahashi, 2009)、*N-myc* や *Hmga2* が神経幹細胞の増殖を促進させることによりアストロサイト分化を抑制した可能性が考えられる。

本研究では、胎生中期と胎生後期神経幹細胞での発現量の差が 5 倍以上あるものに注目した。すでにアストロサイト分化抑制能を持つ *Ngn* の変化は 3 倍程度であったため、それ以上変化している遺伝子に注目するために 5 倍以上としたが、実際にどの程度の発現変化が神経幹細胞の分化制御に影響するかは断言できない。そのため、2 倍、3 倍での発現変化についても解析も必要があると考えられる。また、胎生中期特異的発現遺伝子として、転写調節因子に焦点を絞った。その結果、DNA のメチル化変化だけでなく、転写調節因子 *N-myc* や *Hmga2* の発現によってもアストロサイト分化が抑制されることを示した。文献的に、神経幹細胞の分化制御には、Wnt などの様々な細胞外来性因子も関与することが知られている(Hirabayashi and Gotoh, 2005)。そのため、転写調節因子だけでなく、胎生中期神経幹細胞に特異的に発現している細胞外来性因子についても検討する必要があると考えられる。それらの結果をもとに、細胞外来性因子、転写調節因子、そしてエピジェネティクス機構がどのようにクロストークして発生段階依存的な神経幹細胞の多分化能獲得制御機構を制御しているかを体系的に明らかにする必要がある。

神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化機構は、Notch の下流で転写因子 NFIA の発現が誘導され、NFIA が神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの DNA 脱メチル化を誘導することが分かったが、NFIA がどのように脱メチル化を誘導するかについては解明されていない。また、何故アストロサイト特異的遺伝子プロモーターだけ脱メチル化されるのかという領域特異性に関しても不明な点が多い。メチル化を抑制する機構としては、NFIA の発現によってメチル基転移酵素である Dnmt1 がプロモーター領域から解離することから、クロマチン状態を変化させている可能性が考えられる。今後、NFIA がどのような機構で、神経幹細胞の脱メチル化を誘導するのか、さらに、その際どうやって領域特異性を生んでいるのかを明らかにする必要がある。

それらを解明するためには、発生段階の進行に伴う DNA 脱メチル化がゲノム全体でどの程度変動しているのかを把握する必要があるが、メチル化の変化と同時に遺伝子発現を比較し、メチル化と遺伝子発現にどの程度相関があるのかを検討することで、神経幹細胞の性質変化をより詳細に解析できると考えられる。その際に、解析対象の神経幹細胞として、各胎生期神経幹細胞を生体内より直接単離する事が望まれる。現在まで、発生段階の進行に伴う神経幹細胞の性質変化を解析した報告は数多くあるが、そのほとんどが増殖・成長因子により培養下で増殖させた神経幹細胞を解析対象としているため、実際の生体内に存在する神経幹細胞の性質の詳細な把握には至っていない。

本研究では神経幹細胞のマーカーである Sox2 遺伝子のプロモーター制御下に EGFP を組み込んだ Sox2-GFP トランスジェニックマウス(D'Amour and Gage, 2003)を用いて、各胎生期マウス脳より直接神経幹細胞を単離した。それら細胞より抽出したゲノム DNA を用いて *Gfap* プロモーターのメチル化状態を解析した結果、発生段階依存的な DNA 脱メチル化が観察され、生体内においてもエピジェネティックな機構が神経幹細胞の性質変化に関与していることが分かった。今後は、特定領域のみの DNA メチル化変化だけでなく、ゲノム全体の変動を解析する。メチル化をゲノムワイドに解析する方法としては、抗メチル化シトシン抗体を用いてクロマチン免疫沈降法を行い、その配列を全ゲノム領域をカバーしたタイリングアレイを用いて ChIP on Chip 解析があるが、この方法では CpG アイランドのように CpG サイトを多含する領域しか検出できないといった問題点がある。しかし、*Gfap* 遺伝子のように GC リッチでないプロモーター中に起こる機能的に重要なメチル化を見落とし無く解析するために、本研究ではバイサルファイト処理したゲノムを次世代シーケンサーを用いて全配列解読するバイサルファイト・ショットガン・シーケンス法 (BSS) を用いる。この方法を用いてすべての CpG サイトのメチル化を定量的に解析し、その変化と遺伝子発現が相関する遺伝子を中心に今後解析を進めたい。

残された問題として、前述したように Notch シグナルは DNA 脱メチル化を誘導し、神経幹細胞のアストロサイトへの分化能獲得に重要な役割を果たすが、最終的にアストロサイトへ分化するためのシグナルがどの細胞から分泌されているのかは不明のままである。アストロサイト特異的遺伝子である *Gfap* の発現制御機構の解析から、転写因子 STAT3 の活性化とその調節領域への結合がアストロサイト分化に必須であることが報告されているが、生体内で STAT3 活性化サイトカインである IL6-FC がどの細胞から分泌されているかについての報告は数少ない(Barnabe-Heider et al., 2005; Takizawa et al., 2001)。本研究では、アストロサイトへの分化能を獲得した胎生後期の神経幹細胞が脳を覆う髄膜と接触していることや、髄膜形成不全マウスで神経幹細胞の増殖能が低下するといった報告から、髄膜が神経幹細胞の性質変化に関与している可能性を考えて実験を行った(Zarbalis et al., 2007)。髄膜細胞と神経幹細胞の共培養の

結果、神経幹細胞のアストロサイト分化が誘導されたが、この作用は髄膜細胞と神経幹細胞の接触による影響と、髄膜が分泌している因子による影響の両方が考えられた。細胞の接触による可能性として、Notch シグナルが DNA 脱メチル化を促進することによりアストロサイト分化を誘導する可能性が考えられたが、胎生中期 (E11.5) の神経幹細胞と髄膜細胞を共培養してもアストロサイト分化が誘導されないことから、髄膜細胞の作用は細胞の接触ではなくアストロサイト誘導サイトカインを分泌した結果と考えられた。実際に、髄膜細胞より調整した CM でアストロサイト分化が誘導されたことや、*Gfap* プロモーターをレポーターとしたルシフェラーゼアッセイの結果、優性抑制型 STAT3 や IL6-FC の共通信号伝達受容体である gp130 の特異的阻害抗体で髄膜細胞の効果が抑制されたことから、髄膜細胞の作用が IL6-FC の分泌を介したものであることが示唆された。RT-PCR 法により髄膜細胞が IL6-FC のち LIF, CNTF, CLC を発現していることを同定でき、その発現量は既に発現が報告されている神経幹細胞 (Uemura et al., 2002) やニューロン (Barnabe-Heider et al., 2005) と比較して非常に高いことが分かった。

近年、髄膜細胞がレチノイン酸を分泌し、胎生中期において神経幹細胞のニューロン分化に関与していることが報告された (Siegenthaler et al., 2009)。今回の実験ではレチノイン酸が分泌されているかは検討していないが、IL6-FC とレチノイン酸が協調的に働き神経幹細胞のアストロサイト分化を効率よく誘導することを当研究室の浅野らが報告していることから (Asano et al., 2009) も、髄膜細胞が IL6-FC とレチノイン酸の両方を分泌し、協調的に働いている可能性がある。今後、これらが実際に生体内で働いているかを検討する予定である。

これまでの結果に基づき、神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得から実際に分化するまでをモデル図に示した (図 13)。神経中期幹細胞は非対称分裂により、神経幹細胞とニューロンを産生するが、ニューロンは Notch のリガンドである Dll1 や Jag1 を発現している。そのため、近接する神経幹細胞に Notch シグナルを入れ、その下流で転写因子 NFIA の発現を誘導する。最終的に NFIA が神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝プロモーターの DNA 脱メチル化を誘導することで、多分化能を持った神経幹細胞として成熟する。その神経幹細胞に対し、髄膜から分泌された IL6-FC が作用し、STAT3 の活性化に応じてアストロサイトへ分化する。

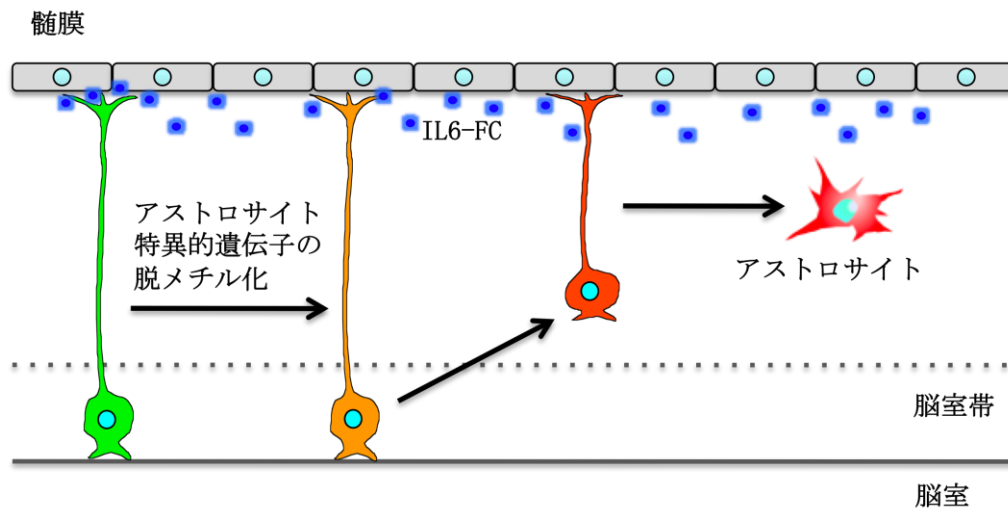


図 13 : 神経幹細胞のアストロサイト分化のモデル図

発生段階の進行に伴い、神経幹細胞のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターの脱メチル化が生じ、胎生後期には多分化能を持った神経幹細胞として成熟する。髄膜が IL6-FC を分泌するため、神経幹細胞は STAT3 の活性化に応じてアストロサイトへ分化する。

謝辞

本研究を進める上で、辛抱強く御指導、ご鞭撻を賜りました中島欽一教授に厚く御礼申し上げます。また、波平昌一助教、滝沢琢己助教、神山淳助教には、実験指導を含め様々なアドバイスを頂き、感謝致します。

さらに、アドバイザー委員の先生方には、貴重な意見を頂き、本研究をスムーズに遂行することができました。有り難うございました。

本研究で必要不可欠である Sox2-GFP トランスジェニックマウスは、ソーク研究所の Fred Gage 教授より供与して頂きました。

マイクロアレイ解析では、国立医薬費食品衛生研究所、安全性生物試験研究センター、毒性部、五十嵐 勝秀 主任研究官に協力して頂き、percellome 解析を行っていただきました。

また、メチル化解析では、東京大学大学院理学系研究科 伊藤隆司教授、三浦史仁助教に解析を行って頂き深く感謝致します。

参考文献

- Abramova, N., Charniga, C., Goderie, S.K., and Temple, S. (2005). Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. *Dev Biol* 283, 269-281.
- Ajioka, I., Maeda, T., and Nakajima, K. (2006). Identification of ventricular-side-enriched molecules regulated in a stage-dependent manner during cerebral cortical development. *Eur J Neurosci* 23, 296-308.
- Asano, H., Aonuma, M., Sanosaka, T., Kohyama, J., Namihira, M., and Nakashima, K. (2009). Astrocyte differentiation of neural precursor cells is enhanced by retinoic acid through a change in epigenetic modification. *Stem Cells* 27, 2744-2752.
- Barnabe-Heider, F., Wasylnka, J.A., Fernandes, K.J., Porsche, C., Sendtner, M., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2005). Evidence that embryonic neurons regulate the onset of cortical gliogenesis via cardiotrophin-1. *Neuron* 48, 253-265.
- Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2395-2402.
- 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.
- Brunelli, S., Innocenzi, A., and Cossu, G. (2003). Bhlhb5 is expressed in the CNS and sensory organs during mouse embryonic development. *Gene Expr Patterns* 3, 755-759.

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.

D'Amour, K.A., and Gage, F.H. (2003). Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 *Suppl* 1, 11866-11872.

Edlund, T., and Jessell, T.M. (1999). Progression from extrinsic to intrinsic signaling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96, 211-224.

Hatta, T., Moriyama, K., Nakashima, K., Taga, T., and Otani, H. (2002). The Role of gp130 in cerebral cortical development: in vivo functional analysis in a mouse exo utero system. *J Neurosci* 22, 5516-5524.

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.

Hirabayashi, Y., and Gotoh, Y. (2005). Stage-dependent fate determination of neural precursor cells in mouse forebrain. *Neurosci Res* 51, 331-336.

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

Kanno, J., Aisaki, K., Igarashi, K., Nakatsu, N., Ono, A., Kodama, Y., and Nagao, T. (2006). "Per cell" normalization method for mRNA measurement by quantitative PCR and microarrays. *BMC Genomics* 7, 64.

Knoepfler, P.S., Cheng, P.F., and Eisenman, R.N. (2002). N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev* 16, 2699-2712.

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.

Misumi, S., Kim, T.S., Jung, C.G., Masuda, T., Urakawa, S., Isobe, Y., Furuyama, F., Nishino, H., and Hida, H. (2008). Enhanced neurogenesis from neural progenitor cells with G1/S-phase cell cycle arrest is mediated by transforming growth factor beta1. *Eur J Neurosci* 28, 1049-1059.

Mitsuhashi, T., and Takahashi, T. (2009). Genetic regulation of proliferation/differentiation characteristics of neural progenitor cells in the developing neocortex. *Brain Dev* 31, 553-557.

Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 7, 1063-1066.

Nagao, M., Campbell, K., Burns, K., Kuan, C.Y., Trumpp, A., and Nakafuku, M. (2008). Coordinated control of self-renewal and differentiation of neural stem cells by Myc and the

p19ARF-p53 pathway. *J Cell Biol* 183, 1243-1257.

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.

Nakayama, K., Nagase, H., Hiratochi, M., Koh, C.S., and Ohkawara, T. (2008). Similar mechanisms regulated by gamma-secretase are involved in both directions of the bi-directional Notch-Delta signaling pathway as well as play a potential role in signaling events involving type 1 transmembrane proteins. *Curr Stem Cell Res Ther* 3, 288-302.

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.

Nishino, J., Kim, I., Chada, K., and Morrison, S.J. (2008). Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135, 227-239.

Ohno, M., Kohyama, J., Namihira, M., Sanosaka, T., Takahashi, J.A., Hashimoto, N., and Nakashima, K. (2006). Neuropoietin induces neuroepithelial cells to differentiate into

astrocytes via activation of STAT3. *Cytokine* 36, 17-22.

Rajan, P., and McKay, R.D. (1998). Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *J Neurosci* 18, 3620-3629.

Saiki, Y., Yamazaki, Y., Yoshida, M., Katoh, O., and Nakamura, T. (2000). Human EVI9, a homologue of the mouse myeloid leukemia gene, is expressed in the hematopoietic progenitors and down-regulated during myeloid differentiation of HL60 cells. *Genomics* 70, 387-391.

Sawai, S., Kato, K., Wakamatsu, Y., and Kondoh, H. (1990). Organization and expression of the chicken N-myc gene. *Mol Cell Biol* 10, 2017-2026.

Siegenthaler, J.A., Ashique, A.M., Zarbalis, K., Patterson, K.P., Hecht, J.H., Kane, M.A., Folias, A.E., Choe, Y., May, S.R., Kume, T., *et al.* (2009). Retinoic acid from the meninges regulates cortical neuron generation. *Cell* 139, 597-609.

Sock, E., Rettig, S.D., Enderich, J., Bosl, M.R., Tamm, E.R., and Wegner, M. (2004). Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Mol Cell Biol* 24, 6635-6644.

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.

Takizawa, T., Nakashima, K., Namiyama, 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.

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.

Uemura, A., Takizawa, T., Ochiai, W., Yanagisawa, M., Nakashima, K., and Taga, T. (2002). Cardiotrophin-like cytokine induces astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells via activation of STAT3. *Cytokine* 18, 1-7.

Zarbalis, K., Siegenthaler, J.A., Choe, Y., May, S.R., Peterson, A.S., and Pleasure, S.J. (2007). Cortical dysplasia and skull defects in mice with a *Foxc1* allele reveal the role of meningeal differentiation in regulating cortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14002-14007.

Zhou, X., Benson, K.F., Ashar, H.R., and Chada, K. (1995). Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376, 771-774.