

## ゲノム構築に基づいた場の情報シグナルによる細胞系譜制御プログラムの解析

●田賀 哲也

熊本大学発生医学研究センター

### 〈研究の目的と進め方〉

個体発生に伴う生体内各器官・組織の形成においては様々な細胞系譜の厳密な制御プログラムの基盤となるゲノム構築システムの存在が必須である。各々の器官・組織を構成する種々の細胞系譜のもととなる器官・組織特異的幹細胞の分化制御はそれら幹細胞が存在する場に働く増殖分化因子や接着因子などからの細胞外来性の情報シグナルによる遺伝子の発現制御が重要な役割を担っていると考える。また、場の情報シグナルという細胞外来性のシグナルとは別に、ゲノム情報の発現制御にはDNAメチル化やヒストンアセチル化などのエピジェネティックな修飾に代表される細胞内在性のプログラムも重要な役割を果たしている。本研究はこのような背景をもって、細胞系譜制御機構をゲノム情報の制御という観点から明らかにすることを目的として実施された。

### 〈研究開始時の研究計画〉

- (1) 神経幹細胞の多分化能維持に關与するゲノム情報を調べるため、マウス中枢神経系幹細胞培養法を用いて、多分化能維持培養系と分化誘導培養系という細胞環境の違いで発現が変化する遺伝子群を探索する。
- (2) 神経系の細胞系譜決定に關与するゲノム構築の特質を知るため、ニューロン発生からアストロサイト発生への細胞系譜のシフトという現象に伴って変化するゲノム情報を解析する。
- (3) 中枢神経系におけるグリア系とニューロンの可塑性を生じる場の特質を探り、さらに系譜転換時に発現プロファイルが変化する遺伝子群の探索を行う。

### 〈研究期間の成果〉

計画1について：中枢神経系幹細胞の多分化能維持に必要な因子basic FGFを添加した神経幹細胞培養画分とbasic FGFを除いた培養画分からmRNAを抽出してマイクロアレイで解析した。両者に発現量の変化のあるクローンを幾つか見だし、時空間的発現解析と機能解析を実施した。

計画2について：(計画2、その1) 生体内各器官の形成過程では、幹細胞がゲノム構築に基づいて正しく分化の運命付けがなされる仕組み等が重要である。生体内には種々のシグナルが共存することを考慮し、本計画はゲノム構築に基づく共役シグナルのクロストークによる細胞機能制御メカニズムを解明する目的で、主として胎生期マウスの中枢神経系を対象にして策定され、実施された。中枢神経系を構成するニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトは神経幹細胞から分化成熟する。胎生14.5日のマウス終脳の神経上皮細胞初代培養系にサイトカインbone morphogenetic protein-2 (BMP2)を添加するとニューロンへの分化が抑制された。未分化神経系前駆細胞のマーカーnestin陽性細胞も減少した。逆にアストロサイトの系譜にある細胞マーカーS100-beta陽性細胞が増加した。この系にBMP2とは異なるファミリ

ーに属するサイトカインleukemia inhibitory factor (LIF)をさらに添加すると成熟アストロサイトマーカーGFAP陽性細胞が出現した。BMP2は神経上皮細胞でnegative helix-loop-helix (HLH) 蛋白Hes5, Id1, Id3の発現誘導を導くこともわかった。これらの結果は、BMP2がnegative HLH蛋白の発現を介してニューロン分化に必要なbasic HLH型転写因子の作用を阻害することで、ゲノム情報発現プロファイルの上ではニューロンへの細胞系譜に向かうことが運命付けられつつある細胞をアストロサイトの細胞系譜に向かわせるものと考察される。そこにさらにLIFが加わるとシグナルの共役によりアストロサイトに成熟するのであろう。BMP2が分化転換作用を発揮するにあたりゲノム情報発現プロファイルだけでなくクロマチン状態についても変化を来すことが考察される。(計画2、その2) ニューロンやアストロサイトのもとになる前駆細胞は共通でありながら胎生中期の脳ではニューロン分化は盛んに生じるがアストロサイト分化は皆無で、一方胎生終期になるとニューロン分化は殆ど見られず代わってアストロサイト分化が優位となる点に着目した研究を実施した。アストロサイト特異的マーカー分子GFAPの遺伝子プロモーターにはGFAP遺伝子発現にクリティカルな転写因子STAT3の認識配列が存在する。そのSTAT3認識配列に存在するシトシンが胎生中期では高度にメチル化され、胎生後期にはそのメチル化が外れることと、そのSTAT3認識配列のメチル化がSTAT3のDNA結合と転写活性化とを阻害することを見いだした。これらの結果はアストロサイトの細胞系譜の制御にDNAメチル化というエピジェネティックなシグナル制御機構が関与することを示している。

計画3について：アストロサイトを*in vitro*にて培養基質非接着性の細胞集塊形成培養することでニューロンのマーカーMAP2陽性細胞を出現させる現象を見いだした。

### 〈国内外での成果の位置付け〉

本研究に係る成果は査読制度のある英文学術雑誌に多く掲載され、国内はもとより国際的な評価は高いと考える。特に、胎生の進行に伴うメチル化の変遷がゲノム情報の選択的活用を制御することが細胞系譜を制御する、という研究成果を発表したDevelopmental Cell誌掲載論文はCell, Neuron, Nature Neuroscience, Development, PNAS誌などにおいて多くの引用を得ている。

### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

細胞系譜の可塑性については、マイクロアレイ解析を実施するほどの規模に行うことが難しかった。

### 〈今後の課題〉

本研究で見いだした細胞系譜制御におけるエピジェネティックなゲノム情報制御機構を、普遍的なものとして一般化することで一層興味深い重要な研究になると考える。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 受付番号：202191458：  
Matsuo R, Ochiai W, Nakashima K, Taga T: A new expression-cloning strategy for isolation of substrate-specific kinases by using phosphorylation site-specific antibody, *J Immunol Methods*, 247: 141-151, 2001
2. 受付番号：202191505：  
Yanagisawa M, Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Arakawa H, Taga T: Signaling crosstalk underlying synergistic induction of astrocyte differentiation by BMPs and IL-6 family of cytokines, *FEBS Letter*, 489: 139-143, 2001
3. 受付番号：202191510：  
Takizawa T, Yanagisawa M, Ochiai W, Yasukawa K, Ishiguro T, Nakashima K, Taga T: Directly linked soluble IL-6 receptor-IL-6 fusion protein induces astrocyte differentiation from neuroepithelial cells via activation of STAT3, *Cytokine*, 13: 272-279, 2001
4. 受付番号：202191515：  
Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M, Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T: BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 5868-5873, 2001
5. 受付番号：202191519：  
Ochiai W, Yanagisawa M, Takizawa T, Nakashima K, Taga T: Astrocyte differentiation of fetal neuroepithelial cells involving cardiotrophin-1-induced activation of stat3, *Cytokine*, 14: 264-271, 2001
6. 受付番号：202191525：  
Ueno M, Igarashi K, Kimura N, Okita K, Takizawa M, Nobuhisa I, Kojima T, Kitamura T, U Samulowitz, D Vestweber, Shimomura T, Suda T, Nakashima K, Taga T: Endomucin is expressed in embryonic dorsal aorta and is able to inhibit cell adhesion, *Biochem Biophys Res Commun*, 287: 501-506, 2001
7. 受付番号：202191529：  
J Nichols, I Chambers, Taga T, A Smith: Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines, *Development*, 128: 2333-2339, 2001
8. 受付番号：202191539：  
Koyama J, Abe T, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A: Brain from bone: Efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblast to neurons with noggin or a demethylating agent, *Differentiation*, 68: 235-244, 2001
9. 受付番号：202191543：  
Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, Ochiai W, Takizawa T, Ueno M, Takizawa M, Shibuya H, Taga T: Inhibition of BMP2-induced, TAK1-kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7, *Genes to Cells*, 6: 1091-1100, 2001
10. 受付番号：202191547：  
Yanagisawa M, Takizawa T, Ochiai W, Uemura A, Nakashima K, Taga T: Fate alteration of neuroepithelial cells from neurogenesis to astrocytogenesis by bone morphogenetic proteins, *Neurosci Res*, 41: 391-396, 2001
11. 受付番号：202191551：  
Takizawa T, Nakashima K, Namihira M, Ochiai W, Uemura A, Yanagisawa M, Fujita N, Nakao M, Taga T: DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain, *Dev Cell*, 1: 749-758, 2001
12. 受付番号：202191554：  
Nakashima K, Taga T: Mechanism underlying cytokine-mediated cell fate regulation in the nervous system, *Mol Neurobiol*, 25: 233-244, 2002
13. 受付番号：202191558：  
Kimura N, Takizawa M, Okita K, Natori O, Igarashi K, Ueno M, Nakashima K, Nobuhisa I, Taga T: Identification of a novel transcription factor, ELYS, expressed predominantly in mouse fetal hematopoietic tissues, *Genes to Cells*, 7: 435-446, 2002