

Mini Review

視細胞の分化調節機構—活性化STAT3による負の制御—

小澤洋子^{1,2,3)}, 中尾啓子^{1,3)}, 島崎琢也^{1,3)}, 岡野栄之^{1,3)}¹⁾慶應義塾大学医学部生理学²⁾慶應義塾大学医学部眼科学³⁾独立行政法人科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業*Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina*

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) has been known to inhibit the differentiation of presumptive rod photoreceptor cells; however, the underlying mechanisms have remained to be elucidated. We demonstrated that STAT3 activation, but not SHP2 activation, is responsible for the CNTF/gp130 signaling that inhibits expression of Rhodopsin and its upstream activator, *crx*, in the retinal explants derived from P0 mice (P0 retinal explants), utilizing STAT3-deficient retina and electroporation of dominant-negative form of STAT3 (STAT3F). We also demonstrated that STAT3 activation in presumptive rod photoreceptor cells at E18.5 is rapidly downregulated at P0, when Rhodopsin expression starts during retinal development. Persistent STAT3 activation in the P0 retinal explants prevented Rhodopsin expression and rapid upregulation of *crx* expression. STAT3-deficient retinas did not exhibit precocious Rhodopsin expression, although they exhibited precocious upregulation of *crx* mRNA. Thus, we conclude that downregulation of STAT3 activation is required, but insufficient, for rod photoreceptor cell differentiation in the postnatal retina.

Rec.11/1/2004, Acc.11/29/2004, pp118-122

Yoko Ozawa^{1,2)}, Keiko Nakao^{1,3)}, Takuya Shimazaki^{1,3)} and Hideyuki Okano^{1,3)}¹⁾Department of Physiology, Keio University School of Medicine²⁾Department of Ophthalmology, Keio University School of Medicine³⁾Core Research for Evolutional Science and Technology(CREST), Japan Science and Technology Agency(JST)**Key words** retina, stem cell, microenvironment, STAT3, photoreceptor cell

神経幹細胞の研究が進むにつれ、中枢神経系でも組織再生治療の開発を期待されるようになっている^{1,2)}。網膜でも、特殊条件下でなら、分裂・分化して網膜細胞になりうる「網膜幹細胞様細胞」の存在が報告され^{3,4)}、再生に向けた研究が盛んになりつつある。網膜を構成する細胞のうち、最も多数を占め、視機能を大きく左右するのは光受容体である視細胞である。しかし、現時点ではこれを安定し

て分化誘導させる方法が確立していない。また、分化誘導のための基礎データも不足しているのが実情である。そこで我々はまず、マウス視細胞(rod)の正常発生の過程を観察し、細胞分化を調節する因子の一端を解明した⁵⁻⁷⁾。

マウス網膜視細胞(rod)の最終分裂は胎生後期から順次生じるものの、最終分化マーカーであるロドプシンの発現は

胎生期にはほとんどみられず、出生以降に開始することが知られていた⁸⁾。従来、その一因として、胎生期網膜にはロドプシン発現を抑制し得る外的因子の活性が高く、出生後に下がることが考えられていた。ただし、胎生期網膜細胞を出生後網膜の環境下においても、早期に分化を始めることはなく、一定の時間をかけた十分な細胞内因子の蓄積の必要性も考えられていた^{9,10)}。Ciliary neurotrophic factor (CNTF)は、細胞外液性因子の一つであり、その発現が胎生期後期に網膜内で高く、出生とともに急激に低下することが知られていた。さらに、CNTFは、*in vitro*で、出生後の最終分裂後の網膜細胞においてもロドプシン発現を抑制し、未分化状態を維持させ得ることが報告されていた¹¹⁾ため、抑制系外的因子の候補の一つと考えられた。

一方、CNTFは一般に、gp130 レセプターを介し、細胞内で JAK/STAT 経路、SHP2/MAPK 経路を活性化し得ることが知られていた。しかし、いずれの経路がロドプシンの発現を抑制し得るかは知られていなかった。

そこで、CNTFがロドプシンの発現を抑制する細胞内経路を明らかにし、視細胞の分化調節機構の一端を解明した⁵⁾。

CNTFは*in vitro*で、STAT3の活性化を介することで、ロドプシン発現を抑制していた

我々が用いた器官培養系 retinal explant culture では、正常の網膜層構造をほぼ保ったまま培養でき、生理的状态に近い発達過程を観察できることが報告されていた¹²⁾。また、今回の解析の対象は、CNTFにより分化マーカーを発現しなくなる細胞であったが、分散培養の系と異なり、層構造という位置情報から予定視細胞層を判断するために、解析することが可能であった。

まず、生後0日目(P0)のマウス神経網膜を器官培養し(5~9日間)、CNTF存在下ではロドプシンの発現が抑制されることを確認した。また、ロドプシンの上流にあり、視細胞特有の転写因子、*crx*の発現も低下していることを明らかにした(図1)。さらに、培養の途中でCNTFを除去すると、ほとんど全ての予定視細胞でロドプシンを発現し始めた(data not shown)ことから、CNTFによるこの発達時期の視細胞への分化抑制は、可逆的な変化と考えられた。また、本来視細胞に分化するはずだったが、CNTFによりロドプシン発現の抑えられた細胞では、STAT3が活性化されていた(図1)。これは、CNTFによりSTAT3が活性化されたために視細胞分化が抑えられた、という可能性を示した。

そこで、網膜特異的にSTAT3を発現しない conditional knock-out (KO) マウスの網膜を器官培養すると、CNTFが

存在しても *crx*、ロドプシンの発現が抑制されなかった(図2)。つまり、CNTFが視細胞への分化を抑制するには、STAT3の活性化が必要であることが明らかになった。これに対し、SHP2リン酸化能を欠く gp130 レセプター変異マウスの網膜をCNTF存在下に器官培養すると、正常網膜と同様、*crx*、ロドプシンの発現が抑制された。すなわち、SHP2の活性化は、CNTFによる視細胞の分化抑制に必要ではないといえた。

さらに、このメカニズムを確認するために、リン酸化能を持たないドミナント-ネガティブ STAT3 変異型遺伝子を器官培養下に正常神経網膜に導入し、CNTF存在下で器官培養した。すると遺伝子導入された細胞では、CNTF存在下でも一部でロドプシン発現が可能になり、*crx*の発現も保たれた。つまり、この方法でも、CNTFが *crx* とロドプシンの発現を抑制したのは、STAT3 活性化によるものであることが示されたのである。conditional KO マウスの網膜では、胎生後期から STAT3 の活性化が抑制されているため、間接的影響を否定できないが、ドミナント-ネガティブ型遺伝子を導入された細胞で STAT3 の活性化が抑制されるのは、導入された遺伝子が発現してからであり、STAT3 の活性化の影響がより直接的に示されたことになる。

予定視細胞層では、視細胞の分化開始に先駆けて、活性化STAT3がdownregulationしていた

正常発生の予定視細胞層における活性化STAT3とロドプシンの発現の時間的關係を示す。ロドプシンは、胎生18日目(E18)にはまだ発現していないが、P0には少数の細胞で発現を開始していた。これに対し、活性化STAT3は、E18には明らかに存在したが、P0には認められなかった(図3)。つまり、*in vivo*で、発生期のマウス網膜では活性化STAT3のdownregulation後にロドプシンの発現が開始していた。*in vitro*の結果からは、P0以降の網膜でも、STAT3が活性化し続けると視細胞の分化が起こらない、といえた。したがって、視細胞の分化には、活性化STAT3のdownregulationが必要であると結論することができた。

発生過程においても、STAT3の活性化は視細胞の分化に対し、抑制的に影響していた

次に、活性化STAT3が *in vivo*で、発生期の視細胞分化にどのように影響するかを解析した。網膜特異的 STAT3 conditional KO マウスのE18の網膜では、すでにSTAT3は活性化していない。つまり、予定より早期に活性化STAT3の発現が低下していることになる。

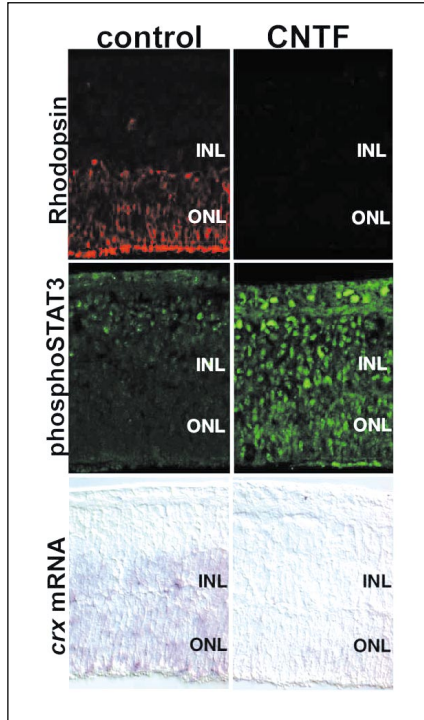
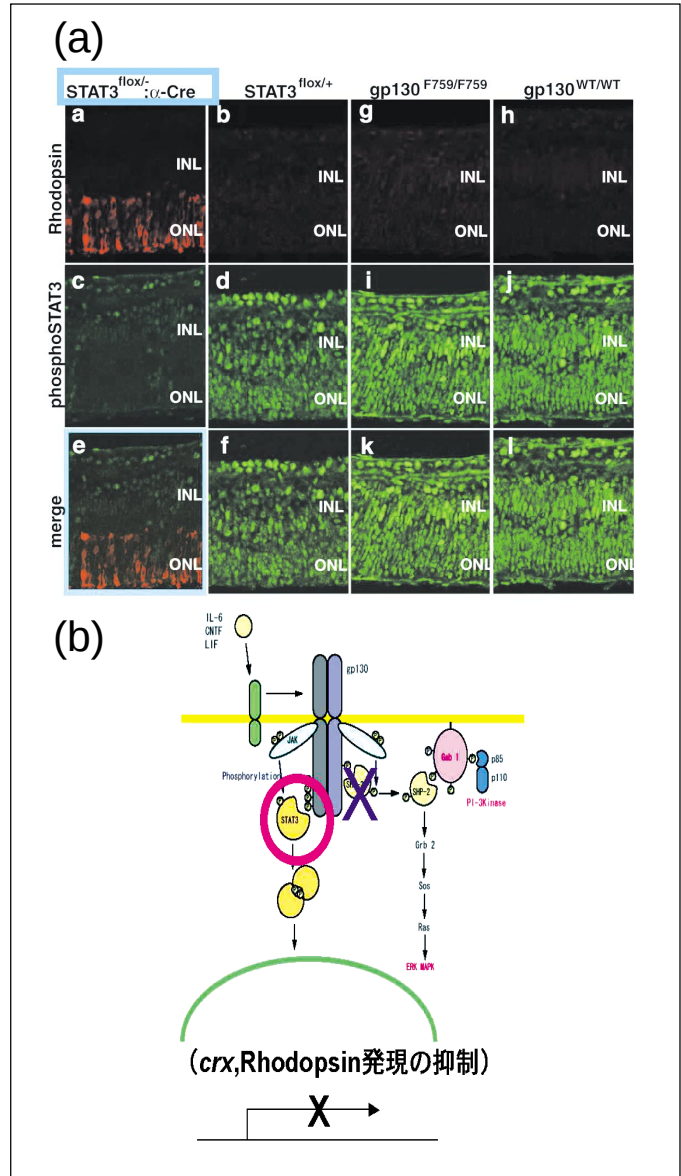


図1 CNTF存在下での網膜器官培養
CNTFにより，視細胞層では，ロドプシンと *crx* の発現が抑制され，STAT3 が活性化していた．ONL: 視細胞層を示す．

図2

(a)CNTF/gp130 signal変異マウスのCNTF存在下での網膜器官培養．STAT3 conditional KO マウスの網膜では，CNTF 存在下でもロドプシン発現の抑制は生じなかった．(b)CNTF/gp130 シグナル伝達機構と *crx*・ロドプシンの発現抑制の関係．STAT3 の活性化を介した効果であった．



正常では，*crx* mRNA は，胎生後期には発現が低く，P0以降，急激に増加することが知られているが，この conditional KO マウスでは，*crx* mRNA の発現が，E18 の時点ですでに高値を示していることがリアルタイム PCR により明らかになった．つまり，正常より早期に *crx* mRNA の発現が上昇しているといえた．ロドプシンの発現開始時期には，明らかな変化はみられなかったものの，その上流転写因子 *crx* 発現の変化は，正常発生においても活性化 STAT3 の downregulation が，視細胞の分化開始時期に関与していることを示した．

これらの結果から，STAT3 活性化と視細胞の分化には以下のような関係があることを示すことができる．

マウス視細胞(rod)の分化マーカーである *crx* およびロドプシンの発現には，活性化 STAT3 の発現低下が必要であった．*in vivo* マウス網膜でも，ロドプシン発現の開始する直前まで STAT3 は活性化しており，活性化 STAT3 の発現が低下すると，視細胞の分化が開始していた(図 4a)．仮に *in vitro* で CNTF の添加により STAT3 を活性化し続けると，正常では分化するはずの時期になっても分化せず(図 4b)，CNTF 除去により活性化 STAT3 の発現が低下すると，分化し始めた．また，胎生後期に活性化 STAT3 の発現がみられないと，分化の開始が早まる傾向にあった．しかし，活性化 STAT3 単独で最終分化マーカー，ロドプシンの発現開始を決定しているのではなく，他の因子もともに関与する可能性が考えられた．すなわち，活性化 STAT3

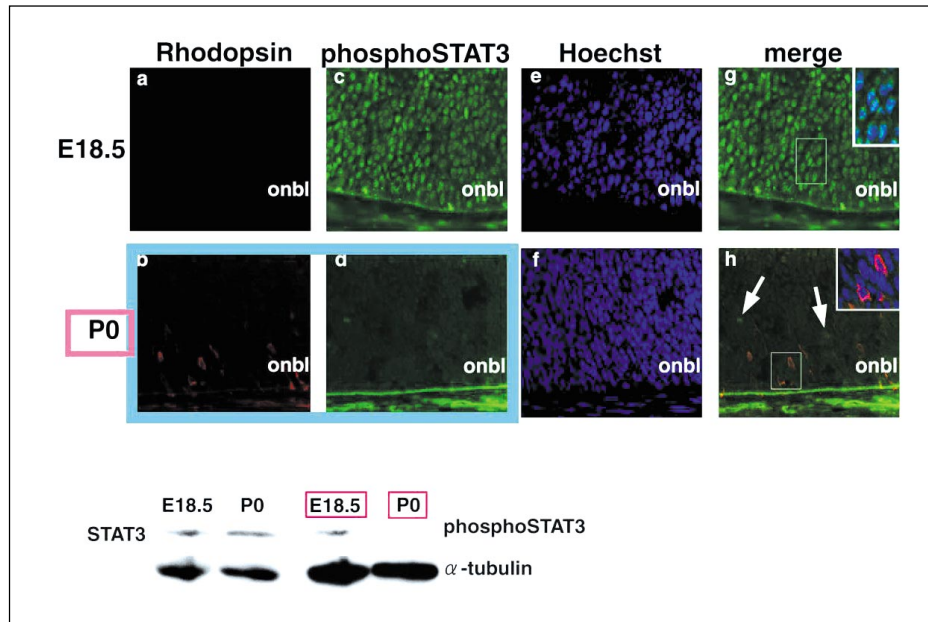


図3 網膜におけるSTAT3活性化とロドプシン発現の関係(*in vivo*)

網膜外層において, STAT3はE18.5では活性化されているが, P0ではされていない。一方, ロドプシンの発現はP0から始まった。

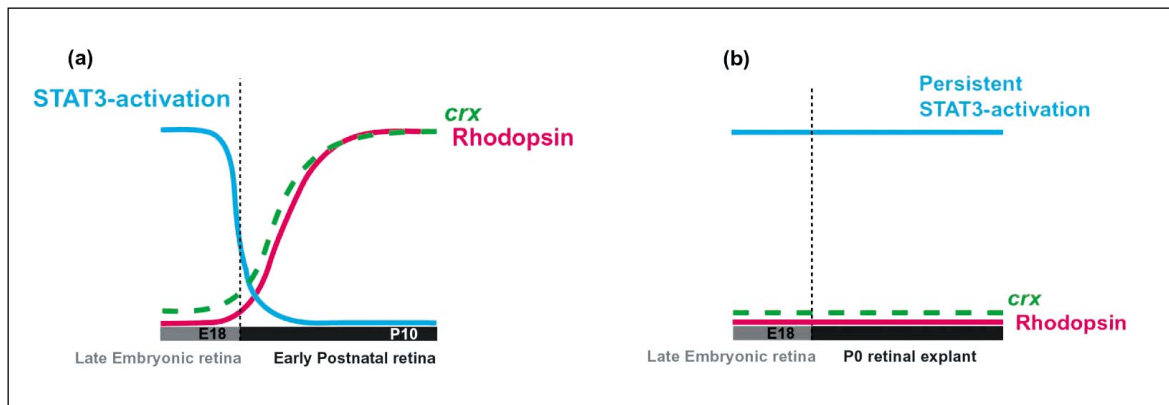


図4 予定視細胞層におけるSTAT3活性化と視細胞分化マーカーの発現の関係

(a) *in vivo* マウス網膜でも, ロドプシン発現の開始する直前まで STAT3 は活性化しており, 活性化 STAT3 の発現が低下すると, 急激に視細胞の分化が開始していた (b) 仮に *in vitro* で CNTF の添加により STAT3 を活性化し続けると, 正常で分化するはずの時期になっても分化しない。

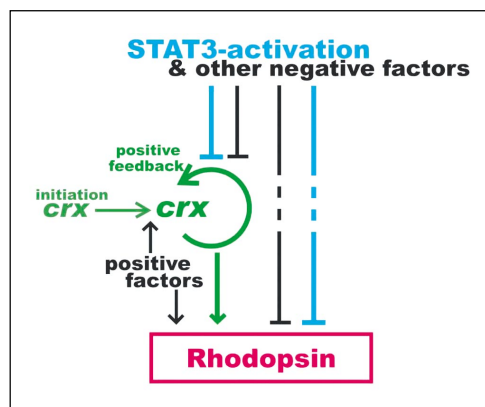


図5 網膜視細胞の分化調節機構のモデル

STAT3の活性化は, *crx*の発現上昇を抑制するために rod 視細胞の最終分化マーカーであるロドプシンの発現を抑制する。しかし, 他にも分化調節に関わる正または負の因子の存在が示唆されている。

は発生過程において視細胞分化に対し抑制的に働き,その発現低下は視細胞の分化の時期を決める因子の一つとして,部分的に関与していると考えられた(図5)。

活性化 STAT3 は組織損傷・炎症時の網膜に発現していることが報告されている¹³⁾。そのため,損傷組織に対する再生医学を考える上でも,重要なシグナルである。

組織障害時に,網膜,特に視細胞を分化誘導するには,活性化 STAT3 があってはいけない。つまり,機能的網膜を分化・再生するには,本来の発生・分化に必要なシグナルを充足させることはもとより,炎症性サイトカインなどの病的な外部環境のコントロールも重要だということだ。確実な基礎データは,将来の臨床応用に貢献する。網膜再生のためには,さらに網膜前駆細胞の分化調節機構を解明する必要があるであろう。

文 献

- 1) 小沢洋子,岡野栄之:神経細胞の再生医学.ゲノム医学, 2(3): 297-302, 2002.
- 2) 小沢洋子,岡野栄之:神経幹細胞 - 基礎研究から再生医療への応用.医学のあゆみ, 199(13): 985-990, 2001.
- 3) Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D: Retinal stem cells in the adult mammalian eye. Science, 287(5460): 2032-2036, 2000.
- 4) Fischer AJ, Reh TA: Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. Nat Neurosci, 4(3): 247-252, 2001.
- 5) Ozawa Y, Nakao K, Shimazaki T, Takeda J, Akira S, Ishihara Hirano T, Oguchi Y, Okano H: Downregulation of STAT3-activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. Mol Cell Neurosci, 26(2): 258-270, 2004.
- 6) 小沢洋子:網膜再生.医学のあゆみ, 211(10): 920-925, 2004.
- 7) 小沢洋子,小口芳久,岡野栄之:網膜の発生と再生.神経眼科, 20(3): 272-280, 2003.
- 8) Morrow EM, Belliveau M, Cepko CL: Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. J Neurosci, 18(10): 3738-3748, 1998.
- 9) Belliveau MJ, Young TL, Cepko CL: Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. J Neurosci, 20(6): 2247-2254, 2000.
- 10) Cepko CL: Genomics approaches to photoreceptor development and disease. Harvey Lect, 97: 85-110, 2001-2002.
- 11) Ezzeddine ZD, Yang X, DeChiara T, Yancopoulos G, Cepko CL: Postmitotic cells fated to become rod photoreceptors can be respecified by CNTF treatment of the retina. Development, 124(5): 1055-1067, 1997.
- 12) Tomita K, Ishibashi M, Nakahara K, Ang SL, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R: Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. Neuron, 16(4): 723-734, 1996.
- 13) Peterson WM, Wang Q, Tzekova R, Wiegand SJ: Ciliary neurotrophic factor and stress stimuli activate the Jak-STAT pathway in retinal neurons and glia. J Neurosci, 20(11): 4081-4090, 2000.