

低酸素刺激によるマウス胚性幹細胞の
神経分化に対する影響

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

趙

陽

筑波大学

博士（医学）学位論文

目次

低酸素刺激によるマウス胚性幹細胞の 神経分化に対する影響

I. 序論

1. 胚性幹細胞
2. 発生と酸素環境
3. 低酸素応答転写因子
4. 細胞の未分化性と低酸素
5. 神経分化と低酸素
6. ES 細胞の神経分化培養法
7. 本研究の目的

II. 実験方法

1. 細胞培養
 - ① 胚性幹細胞の維持培養

- ② 神経分化培養
- ③ 培養時の酸素条件
- 2. 免疫染色解析
- 3. Alkaline Phosphatase 染色
- 4. Hypoxy probe を用いた低酸素領域の解析
- 5. Western blot 解析
- 6. 遺伝子発現解析
 - ① RNA 抽出および cDNA 合成
 - ② RT-PCR
 - ③ リアルタイム PCR
- 7. 神経分化における低酸素応答転写因子 HIF-1 α の機能解析
 - ① HIF-1 α knock-down ES 細胞株の作製
 - ② HIF-1 α 強制発現
- 8. クロマチン免疫沈降解析 (Chromatin Immunoprecipitation CHIP assay)
- 9. Luciferase assay
- 10. FACS 解析
- 11. 統計処理

III. 結果

1. 低酸素環境下での ES 細胞の維持培養
2. SFEBq 分化培養法による ES 細胞の神経分化
3. SFEBq 分化培養時の細胞塊内の酸素環境

SFEBq 分化培養と接着培養の比較

通常酸素と低酸素条件下での接着培養の比較

4. 低酸素と初期神経分化（神経分化の第一段階）
5. HIF-1 α Knock-down ES 細胞を用いた解析
6. HIF-1 α と BMP4 についての解析
7. HIF-1 α の強制発現 ES 細胞を用いた解析
8. HIF-1 α が直接に初期神経マーカーの発現を制御するメカニズム

免疫沈降解析

Luciferase Assay

IV. 考察

1. マウス ES 細胞の未分化性と低酸素
2. 神経分化と低酸素
 - ① 神経分化第一段階

② 神經分化第二段階

V. 結論

VI. 謝辭

VII. 参考文献

I. 序論

1. 胚性幹細胞

胚性幹細胞（Embryonic stem cells：ES 細胞）は、発生初期の胚盤胞期の胚から内部細胞塊を取り出して樹立した細胞株であり、3 胚葉の様々な細胞に分化できる分化多能性を持つ（Evans, 1981）。ES 細胞は自己複製能を持ち、試験管内で体を作る全ての細胞に分化させることが理論上可能であることから、再生医療への応用が注目されている。

また、マウス由来の ES 細胞は、分化に長い期間を要しないことから、初期発生の試験管内モデル系として、広く発生の研究分野で用いられている。

2. 発生と酸素環境

哺乳類胚の初期発生では、胚盤胞の内部細胞塊が外胚葉、中胚葉、内胚葉の 3 胚葉に運命付けられ、それぞれが異なる組織に分化する。外胚葉は神経系、感覚器、表皮を、中胚葉は血管系、血球系、骨格系、脂肪を、内胚葉は消化管系を形成する（Stephen et al., 2002）。

子宮内の酸素濃度は約 3%であることから（Rodesch et al., 1992）、胚の循環系が形成されるまで、発生初期の細胞分化は低酸素環境下で進んでいると考えられる。つまり、ES 細胞を用いた 3 胚葉への分化実験は、通常酸素条件下（20% O₂）ではなく、低酸素条件下で行う方が実際の生体内の環境に近いと考えられる。このため、本研究で行った低酸素条件培養は、報告された子宮内酸素濃度と同じ 3%に設定した。

Morriss らは、ラットの 9.5 日胚を子宮から分離し、試験管で培養すると、通常酸素条件下では胚の神経管発生に異常が見られるが、低酸素条件下では胚の神経管発生は正常に行われることを報告した (Morriss et al., 1979)。この報告は、低酸素環境が胚の初期発生に密接に関わっていることを初めて示したものである。この発見を機に、発生と低酸素環境に関する研究が注目され、細胞の低酸素応答性に関する分子メカニズムの解明が進んだ。

近年、酸素濃度は発生の様々な過程において重要な役割を果たすことが分かってきた。

血管系の発生：血管系の発生において VEGF (Vascular endothelial growth factor: 血管内皮増殖因子) は非常に重要な因子である。酸素濃度は VEGF の発現を制御し、血管の発生を調節していると報告されている (Shweiki et al., 1992; Forsythe et al., 1996)。

胎盤形成：胎盤の発生も酸素濃度に影響されている。低酸素条件下では胎盤の栄養芽層細胞は増殖するが、酸素濃度を上げると、細胞は胎児側の細胞へ分化すると報告されている (Genbacev et al., 1997)。

軟骨形成：酸素濃度は軟骨の形成にも影響している。低酸素条件は軟骨細胞の分化を促進していること、低酸素応答転写因子 HIF-1 α 発現異常マウスの軟骨細胞の数が著しく低下し、四肢が短くなることが報告されている (Rajpurohit et al., 1996)。

このように、酸素濃度は様々な組織の発生に影響を及しているが、その分子制御メカニズムの実体は、主に以下に述べる低酸素応答転写因子 HIFs 経路であると考えられる。

3. 低酸素応答転写因子

これまで、分化発生時における細胞の低酸素応答の分子メカニズムとして、低酸素応答転写因子 HIFs (Hypoxia Inducible Factors) の反応経路が報告されている (Simon and Keith, 2008)。

HIFs は、 α 及び β サブユニットから成るヘテロ二量体構造の転写因子である。 α サブユニットには、HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α の 3 つのサブタイプが報告されている (Gu et al., 1998; Wang et al., 1993)。 β サブユニットは、Arnt (Arylhydrocarbon nuclear transporter) が同定されており、これは上述の 3 つの α サブユニットに共通して用いられている (Wang et al., 1993)。

通常酸素条件下で、HIFs は PHD (prolylhydroxylase) に酸素濃度依存的に水酸化され、ユビキチン化酵素活性を有する pVHL (von Hippel-Lindau protein) 複合体と結合することによって分解される。HIFs は、FIH (Factor of inhibiting HIF) によっても水酸化されるが、この時、転写コアクチベーターである CBP/p300 の結合が阻害されることによって転写活性も抑制されている。低酸素条件下では水酸化は起こらず、核輸送された HIFs は HRE (Hypoxia Response Element) と呼ばれる DNA エlement に結合し、強い転写活性を示すようになる (Ivan et al., 2001; Lando et al., 2002)。

4. 細胞の未分化性と低酸素

ES 細胞の未分化性と低酸素との関係について、近年いくつかの報告が成されている。

低酸素条件下において、ヒト ES 細胞は低酸素応答転写因子 HIF-2 α により、

未分化性の維持が促進されることが報告された (Forristal et al., 2010)。山中からは、低酸素条件下での人工多能性幹細胞 iPS 細胞 (Induced pluripotent stem cells) の樹立効率が、通常酸素条件下に比較して高いと報告した (Yoshida et al., 2009)。詳細なメカニズムは不明であるが、低酸素刺激がヒトの細胞において未分化性維持を促進する働きがあるようである。

これに対し、マウス ES 細胞においては、低酸素刺激は ES 細胞の未分化性の維持の阻害に作用することが報告されている。低酸素条件下で維持培養した ES 細胞は、低酸素応答転写因子 HIF-1 α の活性化により、LIF (Leukemia inhibitory factor) の伝達経路が阻害され、ES 細胞の未分化性維持が抑制されると報告された (Jeong et al., 2007)。

このように、ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞の未分化性維持における低酸素刺激の効果について異なる報告が成されたが、その生物学的意義はまだ明らかになっていない。また、低酸素条件が ES 細胞の分化に与える影響についても、まだ不明な点が多い。

5. 神経分化と低酸素

試験管内における神経分化と低酸素の関係については、成体由来の神経前駆細胞の神経細胞への分化が、低酸素条件下で促進されるという報告が多く成されている (Morrison et al., 2000; Studer et al., 2000)。また、低酸素条件下で、低酸素応答転写因子 HIF-1 α の活性化により、神経前駆細胞からドーパミン神経への分化が促進されたという報告がある (Studer et al., 2000; Kim et al., 2008)。

これまで、低酸素条件が初期発生における神経分化及び脳形成に与える影響については、低酸素応答転写因子 HIF-1 α 欠損マウスが、循環器系の欠陥に加えて、神経管が閉じずに胚性致死になることが報告されている (Iyer et al., 1998)。さらに、神経細胞特異的な HIF-1 α ノックアウトマウスが神経細胞の減少を伴うことによる水頭症を発症することも示されている (Tomita et al., 2003)。

これらより、低酸素環境が初期発生における神経分化及び脳形成に深く関わっていることは明白であるが、その詳細な分子機構はまだ明らかにされていない。加えて、ES 細胞からの神経分化と低酸素条件の関係については殆ど報告されていないため、低酸素がどのように ES 細胞の神経分化に影響を及すかは不明である。

6. ES 細胞の神経分化培養法

本研究では ES 細胞の神経細胞分化法として、SFEBq (Serum-Free culture of Embryoid-Body-like aggregates) 培養法を用いた。この培養法は、誘導因子の添加を必要とせず、ES 細胞は自律的に神経細胞へ分化できると報告されている (Watanabe et al., 2005)。また、SFEBq での長期培養によって、マウス大脳皮質様の組織が構築されることも報告されている (Eiraku et al., 2008)。これらの報告は、SFEBq 分化培養法での神経分化が、生体内の発生環境に近い条件下で起きていることを示唆するが、その微小環境の分子実態は不明である。

本研究では、微小環境としての酸素条件が、神経発生に重要な役割を果たしていると予測し、解析を行った。

7. 本研究の目的

本研究は、微小環境としての低酸素条件に着目し、低酸素応答と ES 細胞の神経分化の関連性及びその分子メカニズムの解明を目的とする。

II. 実験方法

1. 細胞培養

本研究で用いたマウス ES 細胞は、理化学研究所の丹羽仁史先生により樹立された EB5 細胞株である。この細胞株はマウス 129 系統由来の細胞であり、LIF (Leukemia inhibitory factor) を添加することにより、未分化性が維持される。EB5 細胞株は Oct 3 のプロモーター下流に、薬剤耐性遺伝子 BSD (Blasticidin S Deaminase) がノックインされること (Oct3-IRES-BSD-pA) により、未分化細胞の選別が可能である。また、継代培養時に支持細胞を必要としない特徴を持つ。

ES 細胞は全て Olympus I X 71 microscope (Olympus) を用いて観察し、Olympus DP70 (Olympus) を用いて撮影した。

① 胚性幹細胞の維持培養

維持培地 : GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium Gibco) / 0.1 M NEAA (Gibco) / 1 mM Pyruvate (Sigma) / 0.1 μ M 2-ME (Wako) / 10% KSR (KnockOut Serum Replacement Gibco) / 1% FBS (Fetal Bovine Serum JRH) に LIF (最終濃度 2000 U/ml Chemicon) を添加し、0.1% Gelatin (Sigma) で薄層コーティングした細胞培養用ディッシュ (Sumitomo Bakelite) で維持培養した (20% O₂、5% CO₂、37°C)。EB5 細胞株は維持培養時に Blasticidin S (最終濃度 20 μ g/ml Funakoshi) を添加した。

② 神経分化培養

神経外胚葉への分化誘導を効率的に行うことが報告されている SFEBq 分化

培養法 (Watanabe et al., 2005; Eiraku et al., 2008) を用いて、ES 細胞の神経分化実験を行った。ES 細胞コロニーを 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) にて単一細胞へ分散した後、GMEM / 0.1 M NEAA / 1 mM pyruvate / 0.1 μ M 2-ME / 10% KSR の分化培地中で、浮遊培養用 U 字型 96-well プレート (Sumitomo Bakelite) に 3000 cells/well で播種し、3 日間ごとに培地を半量交換した。

③ 培養時の酸素条件

通常酸素条件 (Normoxia) : 20% O₂、5% CO₂、37°C

低酸素条件 (Hypoxia) : 3% O₂、5% CO₂、37°C

2. 免疫染色解析

SFEBq 培養で分化させた ES 細胞塊サンプルを回収し、4% PFA / PBS (Paraformaldehyde Nacalai tesque) で固定、15% Sucrose / PBS (Wako) で脱水処理し、OCT compound (Sakura Finetek) にて包埋後、クリオスタットを用いて凍結切片 (7 μ m) を作成した。

凍結切片を 0.05% TWEEN20 / PBS (15 分×3 回) と 0.3% Triton-x100 / PBS (室温、30 分 Nacalai tesque) で洗浄し、ブロッキングバッファー (2% skim milk / 0.3% Triton-x100 / PBS) で処理した (室温、1 時間)。その後、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体又は二次抗体にて抗体反応を行い、Dapi (4',6-diamino-2-phenylindole Nacalai tesque) にて細胞核を染色した。SlowFade Gold (Invitrogen) で封入後、BX51 microscope (Olympus) と蛍光装置 U-RFK-T (Olympus) を用いて観察し、DP72 (Olympus) にて撮影

した。抗体条件は下記に記述する（表 1）

表 1

	一次抗体	二次抗体
Nanog	Reprocell #RCAB0001P 1000 倍希釈	抗ウサギ IgG (Invitrogen) 1000 倍希釈
Sox1	Stemgent #09-0084 200 倍希釈	抗ウサギ IgG (Invitrogen) 1000 倍希釈
Nestin	Millipore #MAB353 200 倍希釈	抗マウス IgG (Invitrogen) 1000 倍希釈
Pax6	R&D Systems #MAB1260 500 倍希釈	抗マウス IgG (Invitrogen) 1000 倍希釈
Tuj-1	Covance #MMS435-P 1000 倍希釈	抗マウス IgG (Invitrogen) 1000 倍希釈

3. Alkaline Phosphatase 染色

Alkaline Phosphatase 染色には Leukocyte Alkaline Phosphatase kit (Sigma)

を用いた。Citrate Working Solution (Citrate Concentrated Solution を滅菌水で 50 倍希釈したもの) と Acetone を 2:3 で混合し、Fixative Solution を作成した。Naphthol AS-MX Phosphate Alkaline Solution と Diazonium Salt Solution を 1:24 で混合し、Staining mix を作成した。

ES 細胞を 0.1% Gelatin でコートしたディッシュに播種し、4 日間維持培養の後、PBS で洗浄、Fixative Solution にて室温で 30 秒固定した。滅菌水で洗浄後、Staining mix にて室温で 15 分間遮光反応させた。滅菌水で洗浄し、BX51 microscope (Olympus) を用いて観察し、DP72 (Olympus) を用いて撮影した。

4. Hypoxy probe を用いた低酸素領域の解析

Hypoxyprobe 解析は細胞の酸素濃度状況を可視化させる染色方法である。本研究では Hypoxyprobe-1 kit (Hypoxyprobe Inc.) を用いて解析を行った。

ES 細胞塊を回収する 1 時間前に labeling buffer (Hypoxyprobe-1 最終濃度 60ng/ml) を培地に添加し、低酸素領域 (酸素濃度 1% 以下) をラベルした。サンプルを回収し、4% PFA で固定した後、凍結切片を作成した (前述の方法と同様)。

凍結切片を 0.05% TWEEN20 / PBS と 0.3% Triton-x100 / PBS で洗浄し、ブロッキングバッファー (2% skim milk / 0.3% Triton-x100 / PBS) で処理した (室温、1 時間)。その後、ブロッキングバッファーで 1/500 に希釈した MAb-1 (Hypoxyprobe-1 抗体) を用い、一晚 (4°C) の抗体反応を行った。二次抗体反応は、ブロッキングバッファーで 1000 倍希釈した抗マウス IgG を用いて行っ

た（室温、1時間）。SlowFade Gold（Invitrogen）で封入後、BX51 microscope（Olympus）と蛍光装置 U-RFK-T（Olympus）を用いて観察し、DP72（Olympus）にて撮影した。

5. Western blot 解析

細胞を回収し、低張液[10mM HEPES (Dojindo) pH7.9 / 10mM KCl (Wako) / 0.1mM EDTA (Dojindo) / 1mM DTT (Wako) / 1×Protease inhibitor cocktail (Nacalai tesque)] に曝し、氷上で15分間処理した。NP-40を1%添加により細胞膜を破壊した後、遠心分離（15000 rpm, 4°C）し、沈殿に高張液 [20mM HEPES pH7.9 / 400mM NaCl (Wako) / 1mM EDTA / 1mM DTT / 1×Protease inhibitor cocktail] を添加した。2分ごとに攪拌しながら氷上で15分処理し、核内タンパク質を抽出した。遠心分離（15000 rpm, 4°C）にて核膜を除き、核内タンパク質を精製した。

ブラッドフォード法にてタンパク質濃度を計測し、各サンプル 20 μ g の抽出タンパクを、1×SDS loading buffer 中にて 95°C、15分間処理した。各サンプルを 7.5% SDS-アクリルアミドゲルによって分離し、セミドライトランスファーにて PVDF メンブレン（Polyvinylidene fluoride Millipore）へ転写した。メンブレンをブロッキングバッファー [5% skim milk / TBST (Tris-buffered saline / 0.1% Tween-20) / 2% FBS] で処理した後、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体を添加し、4°Cで一晩抗体反応を行った。メンブレンを TBST で洗浄後、5% skim milk / TBST で二次抗体を希釈し、室温で1時間反応させた。

メンブレンを TBST で洗浄後、発色基質 HRP (Millipore) で発色処理し、XAR フィルム (Biomax XAR Film; Kodak) にて撮影した。抗体条件は以下に記述する (表 2)。

表 2

	一次抗体	二次抗体
Smad1	Cell Signaling #9743 2000 倍希釈	HRP 標識抗ウサギ IgG (Zymed) 10000 倍希釈
P-Smad1	Cell Signaling #9511 2000 倍希釈	HRP 標識抗ウサギ IgG (Zymed) 10000 倍希釈
Tuj-1	Covance #MMS435-P 1000 倍希釈	HRP 標識抗マウス IgG (Santa Cruz) 10000 倍希釈
HIF-1 α	Abcam #ab1 1000 倍希釈	HRP 標識抗マウス IgG (Santa Cruz) 10000 倍希釈
Lamin B	Santa Cruz Biotechnology #sc-6217 3000 倍希釈	HRP 標識抗ヤギ IgG (Zymed) 10000 倍希釈

6. 遺伝子発現解析

① RNA 抽出および cDNA 合成

RNeasy Micro kit (QIAGEN) を用いて、細胞サンプルから RNA 抽出と精製を行った。抽出した全 RNA 2 μ g を SuperScript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

② RT-PCR

PCR 反応は Ex Taq (TAKARA) を用いて行った。PCR 産物は 2% Agarose gel (Nippon Gene) で電気泳動後、0.5 mg/ml Ethidium Bromide (Invitrogen) にて染色を行い、トランスイルミネーター (FAS-III TOYOBO) を用いて撮影した。

反応条件: 94°C 30 秒 → (94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒) × N cycles
→ 72°C 1 分 → 4°C

機器: GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem)

プライマー配列は下記に記述する (表 3)。

表 3

18S rRNA	Fwd	5'-TATCAGATCAAAACCAACCCGGTGAGC-3'
23 cycles	Rev	5'-CCAATTACAGGGCCTCGAAAGAGTCCT-3'

GAPDH	Fwd	5`-GTGAAGGTCGGTGTGAACG-3`
	22 cycles	Rev
Fgf4	Fwd	5`-TACTGCAACGTGGGCATCGGA-3`
	38 cycles	Rev
Fgf5	Fwd	5`-ACCCTTTGAGCTTTCTACCC-3`
	35 cycles	Rev
Oct3/4	Fwd	5`-GTGGGTTACCTTCATGGTAGG-3`
	25 cycles	Rev
Rex-1	Fwd	5`-GGAACTCGCTTCCAGAACCT-3`
	28 cycles	Rev
Nanog	Fwd	5`-CGGTTCATCATGGTACAGTC-3`
	28 cycles	Rev
HIF-1 α	Fwd	5`-CAAGATCTCGGCGAACGAAAGAGTCTGA-3`

35 cycles	Rev	5`-GAAGCACCTTCCACGTTGCTGACTTGAT-3`
Sox1 30 cycles	Fwd	5`-CAATCTGCATCCCGGTTC-3`
	Rev	5`-ACCCAGGTCTTATCCCATCC-3`
Map2 35 cycles	Fwd	5`-ACCAAGCCCTAAGCTTCGACTAA-3`
	Rev	5`-AAGGCCAAGAACACACGATTG-3`
Nestin 25 cycles	Fwd	5`-GCTACATACAGGACTCTGCTG-3`
	Rev	5`-AAACTCTAGACTCACTGGATTCT-3`
BMP4 30 cycles	Fwd	5`-GACTACTGGACACCAGACTAGTCCATC-3`
	Rev	5`-GGTGATCAGCCAGTGGAAAGGGACAGT-3`
LIF-r 28 cycles	Fwd	5`-CTGACATATCCCAGAAGACACT-3`
	Rev	5`-GCATCTGTGGCTTATAGCCT-3`

③ リアルタイム PCR

リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行った。

機器：7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)

プライマー配列は下記に記述する (表 4)。

表 4

GAPDH	Fwd	5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACG-3'
	Rev	5'-GGTGAAGACACCAGTAGACTC-3'
Nanog	Fwd	5'-ACCTGAGCTATAAGCAGGTTAAGAC-3'
	Rev	5'-GTGCTGAGCCCTTCTGAATCAGAC-3'
Oct3/4	Fwd	5'-CACGAGTGGAAAGCAACTCA-3'
	Rev	5'-AGATGGTGGTCTGGCTGAAC-3'
Sox1	Fwd	5'-CAATCTGCATCCCGGTTC-3'
	Rev	5'-ACCCAGGTCTTATCCCATCC-3'
BMP4	Fwd	5'-TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT-3'
	Rev	5'-CTTCCCGGTCTCAGGTATCA-3'
Zfp521	Fwd	5'-GAGCGAAGAGGAGTTTTGG-3'

	Rev	5'-AGTTCCAAGGTGGAGGTCAC-3'
Fgf-5	Fwd	5'-GCTGTGTCTCAGGGGATTGT-3'
	Rev	5'-CACTCTCGGCCTGTCTTTTC-3'
Sox21	Fwd	5'-CCTGGGCAGCGTGGCGGA-3'
	Rev	5'-CAGACTGCGGGAAGAAGACG-3'
Smad7	Fwd	5'-AGATGGGGGAAGTGCTTTTT-3'
	Rev	5'-GCGTGTCCAAAAGGCTAGAG-3'

7. 神経分化における低酸素応答転写因子 HIF-1 α の機能解析

① HIF-1 α knock-down ES 細胞株の作製

本研究で short hairpin RNA (shRNA) を用いて HIF-1 α の knock-down 細胞株を作製した。HIF-1 α shRNA 導入済みのレンチウイルスシステム (Santa Cruz Biotechnology) を使用し、80%コンフルエントの ES 細胞 (24-well dish) に 1×10^4 のレンチウイルスと Polybrene (最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ Santa Cruz Biotechnology) を添加した。さらに、Puromycin (最終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$) 条件下で薬剤選択を行った後、顕微鏡下でコロニーピックアップを行った。得られた細胞を増やし、HIF-1 α の RNA とタンパク質の発現を解析した。コントロール

細胞株は Control shRNA Lentiviral Particles (Santa Cruz Biotechnology) を用いて作製した。

② HIF-1 α 強制発現

本研究では、EF1 α プロモーターを用いて HIF-1 α を強制発現した。HIF-1 α の ORF 配列は pEF1 α -IRES-AcGFP1 vector (Clontech) に組み込み、pEF1 α - HIF-1 α (pEF1 α - HIF-1 α -IRES-AcGFP1) を作成した。Plasmid purification kit (QIAGEN) で精製後、塩基配列を確認した。1 \times 10⁶ cells/ml で ES 細胞を 60 mm ディッシュに播種し、5 時間後に Xfect mESC Transfection Reagent (Clontech) を用いて遺伝子導入を行った。48 時間後、細胞を回収し、FACS 解析を行った。

8. クロマチン免疫沈降解析 (Chromatin Immunoprecipitation ChIP assay)

クロマチン免疫沈降解析は ChIP-IT Express Enzymatic kit (Active Motif) を用いて行った。SFEBq 分化培養 3.5 日目のマウス ES 細胞塊よりクロマチンを回収し、Protein-G Magnetic Beads、抗 Hif-1 α 抗体、抗 RNA polymerase II 抗体を用いて、免疫沈降反応を行った。ネガティブコントロールとして mouse IgG を用いた。

免疫沈降解析で使用したプライマー配列は下記に記述する：

Sox1 (forward: 5'-AGAGTAAATTGGCACCTGAC-3', reverse: 5'-GCAAAGGCCTTTACAGATTC-3')

Zfp521 (forward: 5'-CTTGGTTCATTCCATGACTTGT-3', reverse: 5'-AGAATTTCTGGGTAATGCTGGT-3')。

9. Luciferase assay

KOD-plus Neo (TOYOBO)を用いて、Sox1 遺伝子上流の目的領域 (Chromosome8 NC_000074.6, 12391934-12392297) を PCR で増幅後、Luciferase reporter (pGL3-promoter vector Promega) に挿入し、pGL3-Sox1 プラスミドを作成した。KOD-Plus Mutagenesis Kit (TOYOBO)を用いて、目的領域に存在する2ヶ所の Hypoxia Responsible Element (HRE) 配列に変異を導入した。pGL3-Sox1-mutN では、5'側の HRE 配列 (CGACGT) を CGAAAT に変異させた。pGL3-Sox1-mutC では3'側の HRE 配列 (ACGT) を AAAT に変異させた。pGL3-Sox1-mutNC は、2ヶ所の HRE 配列を変異させた。作成した全てのプラスミドは plasmid purification kit (QIAGEN) を用いて精製し、塩基配列の確認を行った。

HEK293T 細胞を 24 well プレート (Sumitomo Bakelite)に播種し、250 ng の Hif-1 α 強制発現プラスミド (pEF1 α -Hif1 α)、250 ng の上記作成したレポータープラスミド及び100 pg の Renilla luciferase construct (Promega) を同時に HEK293T 細胞に導入した。細胞導入試薬は Xfect reagent (Clontech)を用いた。

48 時間後、Luciferase 活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて解析した。

10. FACS 解析

HIF-1 α 強制発現プラスミドをES細胞へ遺伝子導入48時間後、細胞を0.25% Trypsin-EDTAにて単一細胞へ分散させ、2% FBS / PBSで洗浄した。その後セルソーターにてGFP陽性の細胞を分取した。

機器 : MoFlo XDP (Beckman Coulter Inc)

11. 統計処理

各データは、実験を3回以上行い、means \pm standard deviation (SD) を算出し、表示している。統計解析には Student's t-test 及び ANOVA (分散分析) を用いた。p < 0.05 の統計結果を有意とした。分散分析ツールは「anova4 on the web」 <http://www.hju.ac.jp/~kiriki/anova4/> を利用した。

III. 結果

1. 低酸素環境下での ES 細胞の維持培養

低酸素条件とマウス ES 細胞の関連性について、これまでに、低酸素応答転写因子 HIF-1 α が ES 細胞の未分化性維持を負に制御しているという報告がある (Jeong et al., 2007)。本研究で用いる EB5 細胞株において、この報告を確認するため、低酸素条件下で ES 細胞を維持培養し解析を行った。

まず、低酸素条件下で維持培養した ES 細胞における低酸素応答を確認するために、3% O₂ の低酸素条件下で 6 時間、24 時間維持培養した細胞を回収し、Western blot 法を用いて HIF-1 α のタンパク質レベルでの発現を解析した。その結果、低酸素条件下 6 時間、24 時間共に核内 HIF-1 α の発現量が上昇したことが分かった (図 1 A)。

次に、ES 細胞の未分化性を確認するため、Alkaline Phosphatase (AP) 染色を行った。通常酸素条件下においては殆どの ES 細胞コロニーが AP 染色陽性であり、細胞の未分化性が維持されていることが示された (図 1 B 左)。これに対し、低酸素条件下で 4 日間維持培養したところ、AP 染色陰性のコロニー及び細長く分化した形態を示した細胞が観察された (図 1 B 右)。

さらに、RT-PCR 法を用いて、細胞の未分化マーカーの発現について解析した。その結果、未分化マーカーの Rex-1 及び Fgf4 の mRNA 発現は、通常酸素条件下で培養した場合に比べ、低酸素条件下で培養した細胞において有意に減少していることが認められた (図 1 C)。

以上の解析結果から、低酸素条件下でマウス ES 細胞(EB5 株)において低酸素応答 (HIF-1 α の活性化) が起こり、細胞の未分化性維持が抑制されること

が確認された。この結果を踏まえ、低酸素条件と神経分化の関連性について、さらに解析を行った。

2. SFEBq 分化培養法による ES 細胞の神経分化

本研究において、神経分化法として SFEBq 分化培養法を用いた。通常酸素条件下で維持培養した ES 細胞コロニーを単一細胞へ分散させ、U 字型の 96-well プレートに細胞を播種し、浮遊培養を行った (図 2 A)。ES 細胞は、播種後に凝集し、細胞塊を形成した。培養日数が進むに連れて、細胞塊は大きくなり、培養 11 日目には直径が約 1.7 mm の球状に成長した (図 2 B)。

免疫染色法を用いて、細胞塊における各種マーカーの発現を調べた結果、未分化マーカー Nanog の発現が分化日数とともに減少し、分化 4 日目に初期神経マーカー Sox1、分化 8 日目に神経前駆細胞マーカー Nestin、分化 11 日目に神経細胞マーカー Tuj-1 の発現が検出された (図 3 A-C)。

さらに、RT-PCR 法でより詳細な遺伝子発現解析を行ったところ、Epiblast マーカー Fgf5 の発現が分化 3 日目以降に低下し、それに続き初期神経マーカー Sox1 の発現が上昇したことが確認された (図 4 A)。Sox1 の発現上昇に伴い、神経前駆細胞マーカー Nestin の発現も上昇し、ES 細胞は神経前駆細胞へ分化することが分かった (図 4 A)。その後、分化 8 日目から神経細胞マーカー Map2 の発現が検出され、ES 細胞は神経細胞へと分化していくことが確認された (図 4 B)。

以上の結果から、ES 細胞の神経分化は、大きく二つの段階に分けられると考えられる (図 17)。第一段階では、ES 細胞の未分化性が低下し、初期神経

マーカー (Sox1) の発現が上昇し、神経外胚葉へ運命付けられ、神経前駆細胞へと分化する。第二段階では、神経細胞マーカーの発現が上昇し、神経前駆細胞から成熟した神経細胞へと分化する。

本研究は、神経分化と低酸素条件の関連性について解析を行った。

3. SFEBq 分化培養時の細胞塊内酸素環境

はじめに、低酸素条件と神経分化の関連性を調べるために、SFEBq 分化培養時の細胞塊内酸素環境を調べた。

まず、Hypoxy probe を用いて細胞塊内における低酸素領域を確認した。Hypoxyprobe 法は、低酸素条件下の細胞・組織から代謝物質として 2-Nitroimidazole と呼ばれる低酸素マーカーが出現する現象を利用し、免疫染色により、細胞・組織の低酸素領域を可視化する方法である。分化 2、3、4 日目の細胞塊を回収し、染色を行ったところ、分化 2 日目から Hypoxyprobe 陽性の低酸素部位を持つ細胞塊が検出され始め、分化 3 日目以降はすべての細胞塊に低酸素領域が見られ (図 5A)、4 日目には細胞塊全体に低酸素領域が形成された (図 5C 左)。

さらに、Western blot により低酸素応答転写因子 HIF-1 α のタンパク質発現を確認した。分化 3 日目の細胞塊を回収し解析したところ、核抽出タンパク質で HIF-1 α が検出された (図 5B)。

免疫染色法を用いて神経系マーカー発現を確認したところ、分化 4 日目に神経分化の初期マーカー Sox1 の陽性細胞が Hypoxyprobe 陽性領域と重なることが観察された (図 5C 右)。

以上の結果から、SFEBq 分化培養時、分化 2-3 日目から低酸素応答が起きることが明らかとなった。また、初期神経マーカー Sox1 の陽性領域と低酸素領域が重なることから、神経分化の初期マーカーの発現と低酸素応答の関連性が示唆された。

4. 低酸素と初期神経分化（神経分化の第一段階）

神経分化初期マーカー Sox1 の発現と低酸素の関連性が示唆されたため、低酸素環境が初期の神経分化に与える影響について、さらに解析を行った。

SFEBq 分化培養と接着培養の比較

通常酸素条件下で、同じ培地を用いて、SFEBq 分化培養と接着培養の比較解析を行った（図 6 A）。接着培養群は SFEBq 培養群と異なり、分化 3 日目に HIF-1 α のタンパク質発現が検出されなかった（図 6 B）。さらに、リアルタイム PCR 法を用いて分化 4 日目の遺伝子発現を調べたところ、SFEBq 分化培養群は、接着培養群に比べ、Sox1 の発現が顕著に上昇し、未分化マーカー Nanog と Oct3/4 の発現が有意に低下していることが分かった（図 6 C）。

通常酸素と低酸素条件下での接着培養の比較

SFEBq 分化培養法と同じ培地を用いて、接着培養を行い、通常酸素または低酸素条件下にて分化培養を行った（図 7 A）。Western blot 解析で、低酸素群の分化 3 日に HIF-1 α のタンパク質発現が検出された（図 7 B）。リアルタイム PCR 法を用いて分化 4 日目の遺伝子発現を調べたところ、通常酸素群に比べ、低酸素群は Sox1 の発現が有意に高く、逆に未分化マーカー Nanog と Oct3/4 の発現は低いことが分かった（図 7 C）。

以上の結果から、低酸素応答が検出された ES 細胞群では Sox1 の発現が上昇し、逆に未分化マーカーの発現が低下したことが分かり、HIF-1 α が初期神経分化を正に制御する可能性が示唆された。

5. HIF-1 α Knock-down ES 細胞を用いた解析

HIF-1 α が、どのようなメカニズムを通じて初期神経分化（神経分化の第一段階）を制御するかを調べるため、HIF-1 α の Knock-down ES 細胞を作製し、解析を行った。

shRNA を用いて HIF-1 α の knock-down ES 細胞を樹立し、RT-PCR 及び Western blot 解析で、HIF-1 α の発現低下が確認された（図 8 A, B）。

作製した HIF-1 α Knock-down ES 細胞を用いて、SFEBq 分化培養を行い、分化 4 日目の遺伝子発現解析を行ったところ、Knock-down 細胞群において、神経系マーカー Sox1、Sox21 と Zfp521 の発現が著しく低下したことが分かった。一方、未分化マーカー Nanog と Oct3/4、Epiblast マーカー Fgf-5、神経分化抑制因子 BMP4 の発現は、コントロール細胞群に比べ有意に高くなっていること明らかになった（図 9 A）。

さらに、免疫染色で各種神経分化マーカーのタンパク質レベルでの発現を確認したところ、HIF-1 α Knock-down ES 細胞において、Sox1、Pax6、Nestin の陽性細胞は検出されなかった（図 9 B）。

以上の結果から、HIF-1 α は神経分化マーカーの発現及び神経分化抑制因子 BMP4 の発現制御に関与していることが示唆された。

6. HIF-1 α と BMP4 についての解析

HIF-1 α と BMP4 の関連性を調べるために、まず、通常 of SFEBq 分化培養時における BMP4 の発現を確認した。図 10A で示すように内在性の BMP4 の発現は分化の進行に伴い低下する。BMP4 を添加した SFEBq 培養では Sox1 の発現が低下していることが確認された (図 10 B)。次に BMP4 が神経分化抑制に働く時期について詳細に調べたところ、分化 2 日目から 4 日目の期間に添加した場合に、神経分化が抑制されることが明らかとなった (図 10 C)。この期間は細胞塊内低酸素領域が形成され、HIF-1 α が活性化される (図 5 A, B) 時期でもある。

図 9 A のデータから、HIF-1 α Knock-down ES 細胞で BMP4 の発現が高いことが分かったため、BMP シグナルの下流因子である Smad の活性についてさらに調べた。その結果、HIF-1 α Knock-down ES 細胞において、Smad7 の遺伝子発現が上昇し (図 11 A)、Smad1 タンパク質のリン酸化レベルも有意に高いこと (図 10 B) が分かった。

以上の結果から、HIF-1 α が BMP シグナルを負に制御していることが強く示唆された。この結論を確認するために、BMP シグナルの抑制剤として知られている Noggin を、HIF-1 α Knock-down ES 細胞を用いた SFEBq 培養時に添加する実験を行った。その結果、Noggin を添加することで、初期神経マーカー Sox1 と Zfp521 の発現が有意に回復することが分かった (図 12)。

以上の結果から、HIF-1 α が神経分化の第一段階において、BMP シグナルを負に制御することが明らかとなり。HIF-1 α が BMP シグナルの抑制を介して初期神経マーカーの発現を促進することが示唆された。

7. HIF-1 α 強制発現 ES 細胞を用いた解析

Hif-1 α の強制発現実験を行うため、ES 細胞内で強い転写活性を持つ EF1 α プロモーター下流に Hif-1 α 配列を組み込んだ pEF1 α -HIF-1 α -IRES-AcGFP1 ベクターを作成し、ES 細胞に導入を試みた。導入 48 時間後、蛍光顕微鏡観察により、ES 細胞内における GFP の発現が確認され、さらに Western blot 法で HIF-1 α タンパクの発現を確認した (図 13 A, B)。次にセルソーターで GFP 陽性細胞を分取し、HIF-1 α 強制発現 ES 細胞を回収した (図 13 C)。

回収した HIF-1 α 強制発現 ES 細胞のリアルタイム PCR 解析を行ったところ、HIF-1 α 強制発現細胞群はコントロール細胞群に比べ、未分化マーカー Nanog と Oct3/4 の発現が有意に低下し、BMP4 の発現は検出されず、Sox1 の発現が著しく高くなっていることが分かった (図 14)。

以上の結果からも、HIF-1 α が BMP4 の発現を抑制し、初期神経マーカー Sox1 の発現を促進することが確かめられた。

8. HIF-1 α が直接に初期神経マーカーの発現を制御するメカニズム

これまでの結果から、HIF-1 α が BMP4 の発現を抑制すること、及び初期神経マーカーの発現を促進することが分かった (図 9, 11, 14)。BMP シグナルは初期神経マーカー Sox1 の発現を抑制する活性を持つこと (図 10) から、HIF-1 α が内在性 BMP シグナルの抑制を介して、Sox1 の発現を促進する可能性が考えられる。

また、HIF-1 α は転写因子であるため、BMP シグナルの制御を介する以外に、初期神経マーカーの遺伝子座に結合し、その発現を直接に制御する可能性も考

えられる。そこで、初期神経マーカー（Sox1、Zfp521）の発現が直接に HIF-1 α によって制御されているかどうかを明らかにするため、以下の実験を行った。

クロマチン免疫沈降解析

SFEBq 分化培養 3.5 日目の ES 細胞塊由来のクロマチンを抽出し、クロマチン免疫沈降解析を行った。その結果、HIF-1 α は初期神経マーカーの一つである Zfp521 ではなく、Sox1 の遺伝子座に特異的に結合していることが明らかになった（図 15）。

Luciferase Assay

Sox1 配列の上流に HRE（Hypoxia Responsive Element）配列が 2 ヶ所存在していることから、Luciferase Assay を用いて、HIF-1 α がこれらの HRE 配列を介して、Sox1 の発現を直接に制御しているかどうかを解析した。図 16A で 2 ヶ所の HIF-1 α 結合領域 HRE 配列を示している。HRE 配列を含むゲノム領域を PCR で増幅し、Luciferase reporter plasmid に組み込んだ（図 16A）。さらに、2 ヶ所の HRE 配列のそれぞれ片方に変異を入れたプラスミドと、両方に変異を入れたプラスミドを作成した（図 16A）。これらのプラスミドを HEK293T 細胞に導入し、同時に HIF-1 α 強制発現プラスミド（pEF1 α -HIF-1 α ）も導入した。導入細胞での HIF-1 α の発現は、Western blot 解析にて確認した（図 16B）。

図 16C に Luciferase Assay の結果を示す。コントロール群に比べ、HRE 配列を導入した細胞群の Luciferase 活性が有意に上昇した。これに対し、2 ヶ所の HRE 配列両方に変異を入れた細胞群においては、Luciferase 活性の上昇が見られなかった。このことより、HIF-1 α は両方の HRE 配列への結合

を介し、Sox1 の発現を促進していることが分かった。

以上より、HIF-1 α は BMP シグナルの抑制だけでなく、直接に初期神経マーカー Sox1 の遺伝子座上流の HRE 配列に結合し、Sox1 の発現を正に制御することにより、初期神経分化を促進することが分かった。

IV. 考察

1. ES 細胞の未分化性と低酸素

序論で述べたように、これまで、ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞の未分化維持における低酸素刺激の効果が異なると報告されている。さらに、ヒト ES 細胞とマウス ES 細胞が異なる性質をもつ報告もあり、ヒト ES 細胞では bFgf シグナル、マウス ES 細胞では LIF シグナルといった、それぞれ異なる未分化性維持機構が働いている (Hanna et al., 2010)。これが未分化維持における低酸素刺激の効果が異なる原因の一つの可能性がある。

また、低酸素応答転写因子 HIFs には HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α のサブタイプが存在することから (Gu et al., 1998; Wang et al., 1993)、それぞれのサブタイプが未分化性維持に対して異なる影響を与えることも考えられる。これまで、HIF-2 α が ES 細胞の未分化マーカー Oct-4 の発現を制御し、細胞の未分化性維持を促進することが報告されている (Covello et al., 2006; Forristal et al., 2010)。また、HIF-1 α はマウス ES 細胞において、LIF シグナルを阻害し、未分化性維持を抑制する報告が成されている (Jeong et al., 2007)。これらの報告から、HIF-1 α と HIF-2 α は ES 細胞の未分化性維持において異なる役割を持つことが考えられる。

本研究ではマウス ES 細胞を用いて、まず維持培養時における細胞の未分化性維持と低酸素の関連性を図 1 の実験で確認した。Jeong らの論文の結果と一致し、低酸素刺激により、維持培養時の ES 細胞 (EB5 株) で未分化性が低下したことが確認された (Jeong et al., 2007)。

つづいて、分化培養時における ES 細胞の未分化性の低下と低酸素の関連性について解析し、以下の結果を得た。

通常酸素条件下における接着分化培養と SFEBq 分化培養の比較実験では、低酸素応答転写因子 HIF-1 α の発現が確認される SFEBq 分化培養細胞群において、Nanog、Oct3/4 の発現がより低い値を示した (図 6C)。また、同じ接着培養でも、低酸素条件下で培養し、HIF-1 α の発現が確認された細胞群において、Nanog、Oct3/4 の発現が低下した (図 7C)。これらの実験結果は、分化培養時においても、HIF-1 α はマウス ES 細胞の未分化性維持を抑制することを示唆する。

さらに、HIF-1 α の Knock-down ES 細胞を用いた分化実験では、コントロール細胞群に比べて、Knock-down ES 細胞群の未分化マーカーの発現が高いことが分かった (図 9A)。また、HIF-1 α 強制発現細胞においては、逆に未分化マーカーの発現が低下することが分かった (図 14)。これらの結果は、神経分化培養時においても、HIF-1 α は ES 細胞の未分化性維持を抑制する因子であることを示すものである。

維持培養時における未分化性の抑制メカニズムについて、Jeong らは、HIF-1 α が LIF-r (LIF レセプター) のプロモーター領域に結合し、LIF-r の発現を低下させることにより LIF/LIF-r 伝達経路を阻害し、マウス ES 細胞の未分化性維持を抑制すると報告した (Jeong et al., 2007)。本研究でも、このことを RT-PCR により確認している (図 1C)。

しかし、本研究において、神経分化培養時に LIF は添加されておらず、また、LIF/LIF-r 伝達経路の下流にある Stat3 の活性は、低酸素刺激に関係なく低下すること (data not shown) を明らかにしていることから、神経分化時に見られ

た低酸素応答による未分化性の低下は、LIF 伝達経路の抑制によるものではないと考えられる。つまり、維持培養時と異なり、神経分化時の ES 細胞の未分化性維持は、LIF/LIF-r 伝達経路を通じて調節されるのではなく、低酸素応答による他の経路を経由して調節が行われている可能性が示唆された。

マウス ES 細胞の未分化性維持に関しては、LIF 伝達経路以外に BMP シグナルの関与が報告されている (Ying et al., 2003)。HIF-1 α Knock-down ES 細胞において、分化時に BMP シグナルの上昇が見られたことから (図 9A, 11)、分化時の未分化性維持の抑制メカニズムとして、HIF-1 α を介した BMP シグナル経路の負の調節が考えられる。この点については、今後さらなる解析が必要である。

2. 神経分化と低酸素

図 17 で示す様に、ES 細胞の神経分化は二つの段階に分けられる。第一段階では、未分化マーカーの発現の低下に伴って初期神経マーカーの発現が上昇し、ES 細胞の神経外胚葉への分化が決定され、神経前駆細胞へと分化する。第二段階では、神経前駆細胞マーカーの発現の低下と共に、神経マーカーの発現が上昇し、成熟した神経細胞へと分化する。本研究は、神経分化の二つの段階において、低酸素環境が与える影響について検討した。

① 神経分化第一段階

ES 細胞の神経分化の第一段階では、未分化マーカー及び Epiblast マーカーの発現が低下し、初期神経マーカーである Sox1 の発現が上昇することで、神経外胚葉へと運命決定される (図 3A, 4A)。その後、Sox1 の発現は徐々に低

下し、分化 6 日目前後に神経前駆細胞マーカーである Nestin の発現が上昇する (図 4A)。

通常酸素条件における SFEBq 培養と接着培養の比較実験において、HIF-1 α が細胞自律的に発現する SFEBq 培養群は、接着培養に比べて初期神経マーカー Sox1 の発現が著しく上昇した (図 6C)。また同じ接着培養であっても、低酸素環境下で培養することで HIF-1 α が発現する低酸素培養細胞群は、通常酸素培養細胞群に比べ Sox1 の発現が有意に上昇した (図 7B,C)。これらの実験結果から、HIF-1 α は ES 細胞の神経分化を促進する因子である可能性が示唆された。

更に、HIF-1 α の Knock-down 及び強制発現 ES 細胞を用いて神経分化を調べたところ、コントロール細胞群に比べて、Knock-down ES 細胞群の Sox1 と Zfp521 の発現が著しく低下し、免疫染色で Sox1 タンパク質の発現も認められなかった (図 9)。また、分化 4 日目にコントロール細胞群で既に発現がほとんど見られない Epiblast マーカー Fgf5 が Knock-down ES 細胞群では認められた (図 9A)。このことは、HIF-1 α が欠損した ES 細胞が、神経へ分化できず、Epiblast の状態で発生が止まっている可能性を示唆した。また、FACS で分取した HIF-1 α 強制発現細胞において、維持培養条件下にも関わらず Sox1 の発現が著しく上昇した (図 14)。

これらの結果より、HIF-1 α は Sox1 の発現を正に制御し、ES 細胞の神経分化決定にとって必須の因子であることが示された。

HIF-1 α による神経分化促進の分子メカニズムに関しては、HIF-1 α Knock-down ES 細胞群において神経分化抑制活性を有する BMP4 の発現が上昇したこと (図 9A)、HIF-1 α 強制発現細胞において BMP4 の発現が抑制

されたこと（図 14）より、HIF-1 α が BMP シグナルの抑制を介して、Sox1 の発現を促進する可能性が考えられた。

しかし、HIF-1 α Knock-down ES 細胞における Sox1 の発現は、コントロール細胞に比べて 100 倍減少したの（図 9A）に対して、BMP シグナルの抑制剤 Noggin を添加した HIF-1 α Knock-down ES 細胞の Sox1 発現は Knock-down ES 細胞群に比べ、約 40 倍の上昇しか見られなかった（図 12）。この結果は、HIF-1 α による Sox1 の発現制御は、BMP シグナルの負の制御を介することだけではなく、Sox1 の発現を HIF-1 α が直接に制御するメカニズムが存在することを予想させた。

そこで、HIF-1 α が直接に神経分化初期マーカー（Sox1, Zfp521）の発現を制御しているかどうかをクロマチン免疫沈降解析と Luciferase Assay で調べたところ、HIF-1 α は Sox1 遺伝子上流 2 カ所の HRE 配列への結合を介し、その発現を特異的に制御していることが示された（図 15, 16）。

以上より、第一段階の神経分化決定期において、低酸素環境（HIF-1 α の活性化）は神経分化の抑制シグナル BMP4 を阻害し、さらに直接に初期神経マーカー Sox1 の遺伝子座に結合することにより、Sox1 の発現を正に制御し、初期神経分化（第一段階）を促進することが明らかとなった（図 18）。

② 神経分化第二段階

第二段階においては、神経前駆細胞へ分化した ES 細胞は神経細胞へ分化し、神経の成熟とも言える。この段階で、神経細胞マーカーの発現が上昇し、細胞は神経細胞へ分化する。

これまで、低酸素条件が成体由来の神経幹細胞の神経細胞分化を促進すると

いう報告がなされており (Morrison et al., 2000; Studer et al., 2000)、HIF-1 α の関与も報告されている (Studer et al., 2000; Kim et al., 2008)。これらの報告から、ES 細胞由来の神経幹細胞の神経細胞への成熟においても、低酸素環境 (HIF-1 α) が関与している可能性が高いと考えられる。

低酸素条件下 (3% O₂、5% CO₂、37°C) で SFEBq 分化培養を行い、通常酸素条件下の細胞群と比較したところ、分化 8 日目以降、低酸素条件下で培養した細胞群において、神経細胞マーカー Map2 と Tuj-1 の発現が上昇したことが見られた (data not shown)。この結果から、低酸素環境が神経前駆細胞から神経細胞への分化を促進する可能性が示唆された。

今後、ES 細胞由来の神経前駆細胞を樹立し、神経細胞への分化と低酸素の関連性及びその分子メカニズムについての検討が期待される。

V. 結論

これまで、ES細胞の神経分化と低酸素条件の関連性については殆ど不明であり、本研究はその関連性及び分子メカニズムについて解析し、以下の結論を得た。

1. ES細胞の維持培養において低酸素刺激は未分化維持を阻害した
2. SFEBq分化培養法において、分化初期から細胞塊内で低酸素応答反応が見られた
3. 低酸素応答により活性化した HIF-1 α は、神経分化の抑制シグナル BMP4 を阻害し、さらに直接に初期神経マーカー Sox1 の遺伝子座に結合することにより、Sox1 の発現を正に制御し、初期神経分化（神経分化第一段階）を促進した

以上の結論から、低酸素刺激がマウス胚性幹細胞の神経分化を正に制御していることが明らかとなった。

VI. 謝辞

本研究は大根田修教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学研究室）のご指導の元に行ったものであり、深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を頂きました高崎真美助教（同人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学研究室）に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、御指導、御助言を頂きました山下年晴助教（同人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学研究室）、長野真澄博士助教（同人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学研究室）に深く感謝の意を表します。

温かく見守って頂きました筑波大学再生幹細胞生物学研究室のスタッフならびに大学院生、大学学部生の皆様に深く感謝の意を表します。

VII. 参考文献

Covello KL., Kehler J., Yu HW., Gordan JD., Arsham AM., Hu CJ., Labosky PA., Simon MC., and Keith B.

HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth.

Genes Dev. (2006) 20: 557-570

Eiraku M, K Watanabe, M Matsuo-Takasaki, M Kawada, S Yonemura, M Matsumura, T Wataya, A Nishiyama, K Muguruma and Y Sasai.

Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals.

Cell Stem Cell. (2008). 3:519-532.

Evans M.

Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture.

J. Reprod. Fertil. (1981). 62: 625-31.

Forristal CE., Wright KL., Hanley NA., Oreffo RO., and Houghton FD.

Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions.

Reproduction (2010). 139: 85-97.

Forsythe JA., Jiang BH., Iyer NV., Agani F., Leung SW., Koos RD., and Semenza GL.

Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.

Mol. Cell. Biol. (1996). 16: 4604–13.

Genbacev O., Zhou Y., Ludlow JW., and Fisher SJ.

Regulation of human placental development by oxygen tension.

Science (1997). 277: 1669–72.

Gu YZ., Moran SM., Hogenesch JB., Wartman L., and Bradfield CA.

Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha.

Gene Expr. (1998). 7: 205-13.

Hanna J., Cheng AW., Saha K., Kim J., Lengner CJ., Soldner F., Cassady JP., Muffat J., Carey BW., and Jaenisch R.

Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs

Proc Natl Acad Sci USA. (2010), 107(20):9222-7.

Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara JM., Lane WS., and Kaelin WG. Jr.

HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing.

Science (2001). 292: 464-8.

Iyer NV., Kotch LE., Agani F., Leung SW., Laughner E., Wenger RH., Gassmann M., Gearhart JD., Lawler AM., Yu AY., and Semenza GL.

Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α .

Genes Dev. (1998). 12: 149-62.

Jeong CH., Lee HJ., Cha JH., Kim JH., Kim KR., Kim JH., Yoon DK., and Kim KW.

Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway.

J. Biol. Chem. (2007). 282: 13672-9.

Kim TS., Misumi S., Jung CG., Masuda T., Isobe Y., Furuyama F., Nishino H., and Hida H.

Increase in dopaminergic neurons from mouse embryonic stem cell-derived neural progenitor/stem cells is mediated by hypoxia inducible factor-1alpha.

J. Neurosci. Res. (2008). 86: 2353-62.

Lando D., Peet DJ., Whelan DA., Gorman JJ., and Whitelaw ML.

Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxia switch.

Science (2002). 292: 858-61.

Morrison SJ., Csete M., Groves AK., Melega W., Wold B., and Anderson DJ.

Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells.

J. Neurosci. (2000). 20: 7370-6.

Morriss GM., and New DA.

Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos.

J. Embryol. Exp. Morphol. (1979). 54: 17–35.

Niwa H., Ogawa K., Shimosato D., and Adachi K.

A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells.

Nature (2009). 460: 118-22.

Rajpurohit R., Koch CJ., Tao Z., Teixeira CM., and Shapiro IM.

Adaptation of chondrocytes to low oxygen tension: relationship between hypoxia and cellular metabolism.

J. Cell Physiol. (1996). 168: 424–32.

Rodesch F., Simon P., Donner C., and Jauniaux E.

Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy.

Obstet. Gynecol. (1992). 80: 283–5.

Shweiki D., Itin A., Soffer D., and Keshet E.

Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.

Nature (1992). 359: 843–845.

Simon MC., and Keith B.

The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. (2008). 9: 285-96.

Stephen JR., Steven JK., Joy R., and Peter DR.

Embryonic stem cell differentiation and the analysis of mammalian development.

Int. J. Dev. Biol. (2002). 46: 449–58.

Studer L., Csete M., Lee SH., Kabbani N., Walikonis J., Wold B., and McKay R.

Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen.

J. Neurosci. (2000). 20: 7377–83.

Tomita S., Ueno M., Sakamoto M., Kitahama Y., Ueki M., Maekawa N., Sakamoto H., Gassmann M., Kageyama R., Ueda N., Gonzalez FJ., and Takahama Y.

Defective brain development in mice lacking the Hif-1alpha gene in neural cells.

Mol. Cell Biol. (2003). 23: 6739-49.

Wang GL., and Semenza GL.

General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1993). 90: 4304-8.

Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K., and Sasai Y.

Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells.

Nat. Neurosci. (2005). 8: 288-96.

Williams RL., Hilton DJ., Pease S., Willson TA., Stewart CL., Gearing DP., Wagner EF., Metcalf D., Nicola NA., and Gough NM.

Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells.

Nature. (1988). 336(6200):684-7.

Ying QL., Nichols J., Chambers I., and Smith A.

BMP Induction of Id Proteins Suppresses Differentiation and Sustains Embryonic Stem Cell Self-Renewal in Collaboration with STAT3.

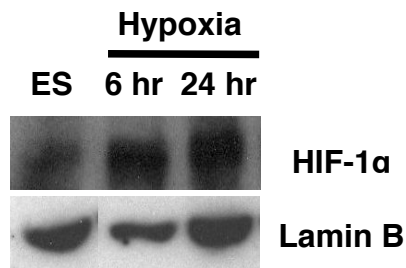
Cell. (2003). 115(3):281-92.

Yoshida Y., Takahashi K., Okita K., Ichisaka T., and Yamanaka S.

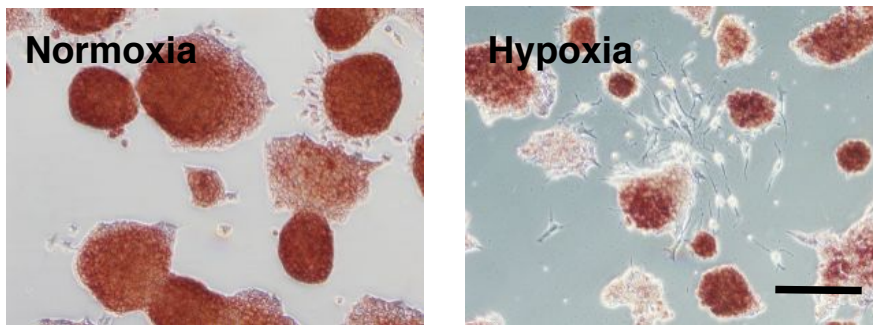
Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells.

Cell Stem Cell (2009). 5: 237-41.

A



B



C

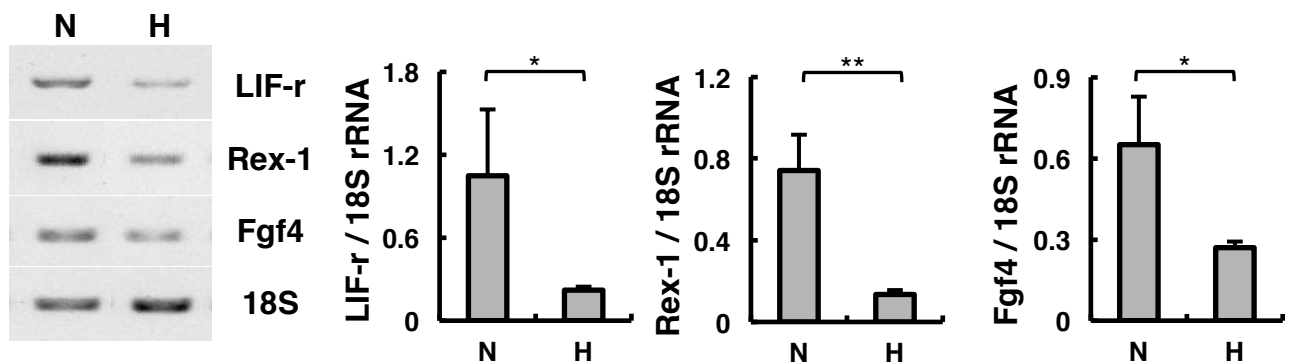
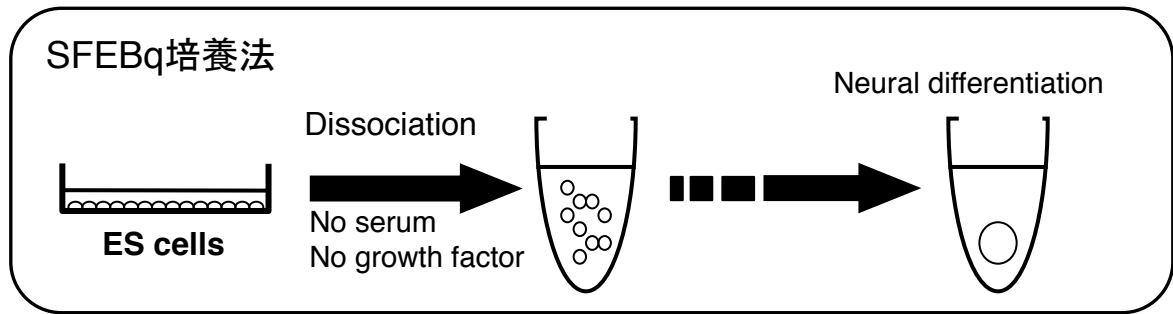


図 1 低酸素条件下でのES細胞の維持培養

- A. Western blot法により、低酸素条件下(3% O₂)で維持培養6, 24時間後のES細胞におけるHIF-1αのタンパク質の発現を解析した。
- B. 維持培養4日間後にAlkaline Phosphatase染色法により細胞の未分化性を解析した。左: 通常酸素条件(Normoxia)、右: 低酸素条件(Hypoxia) (scale bar = 1 mm)
- C. 維持培養4日間後、RT-PCRより、未分化性関連マーカーのmRNA発現を解析した。
 Normalization: 18S; LIF-r (N: 1.05±0.48 v.s. H: 0.22±0.02); Rex-1 (0.74±0.17 v.s. 0.14±0.02); Fgf4 (0.65±0.18 v.s. 0.27±0.02) * p<0.05, ** p<0.01 (Student's t-test)

略語: N, Normoxia; H, Hypoxia

A



B

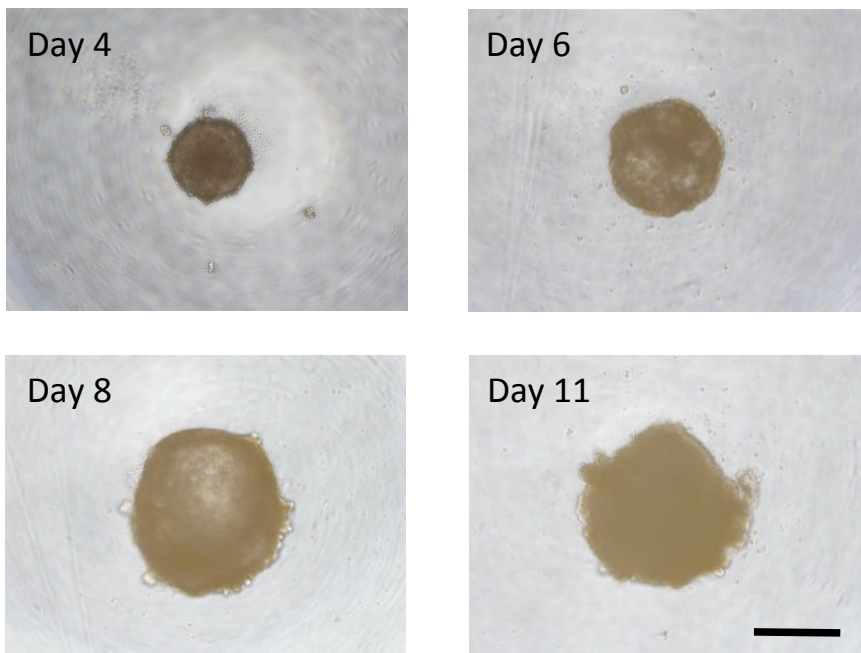
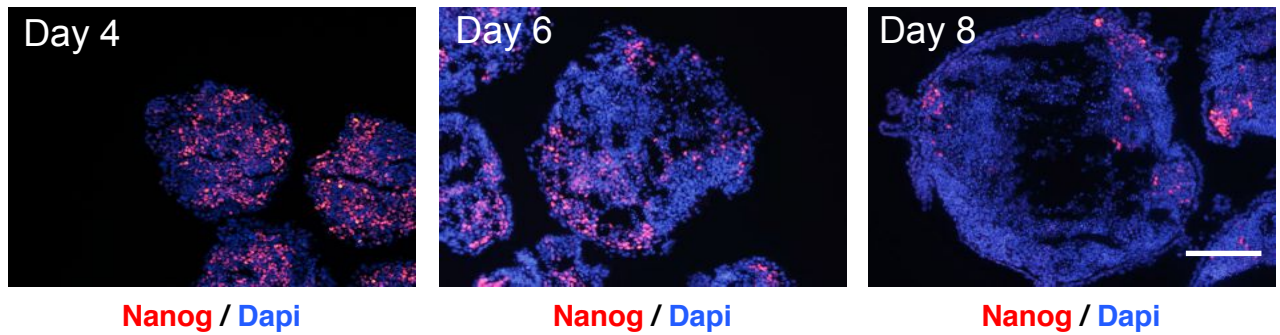


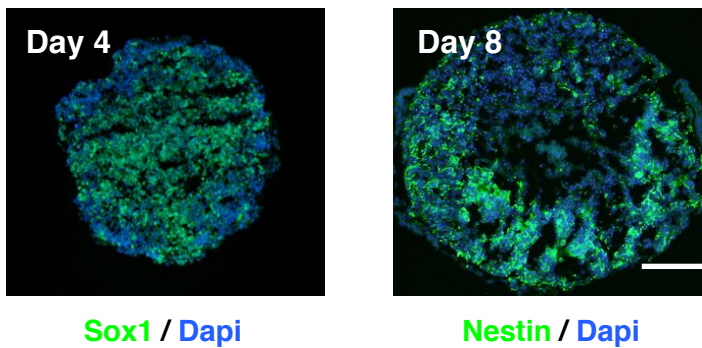
図 2 SFEBq分化培養法

- A. ES細胞を分散させ、U字型の96-wellプレートを用いて、SFEBq分化培養法で神経分化を行った。
- B. SFEBq分化培養法により形成されたES細胞塊の形態 (scale bar = 1 mm)

A



B



C

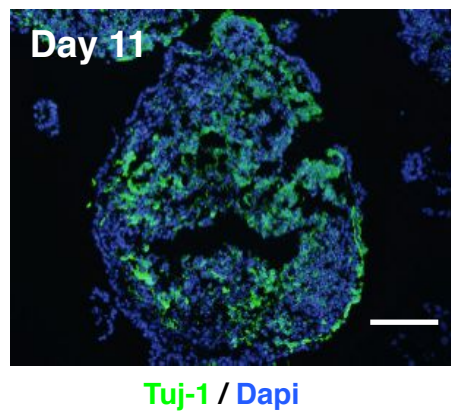
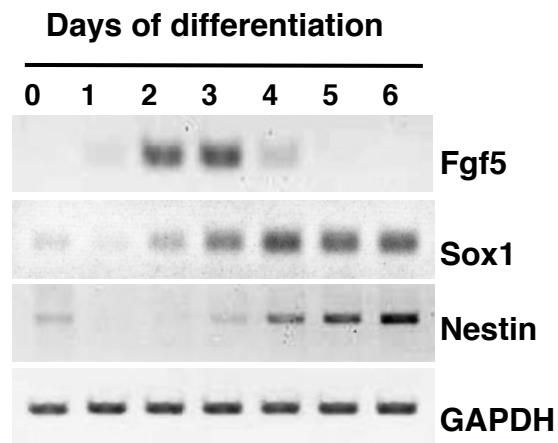


図 3 通常酸素条件下でのSFEBq分化培養における未分化及び神経系マーカー発現の免疫染色解析

- A. ES細胞塊内における未分化マーカーNanogの発現を免疫染色法で解析した。(scale bar = 500 μ m)
- B. 免疫染色法より、細胞塊内の初期神経マーカーSox1及び神経前駆細胞マーカーNestinの発現を解析した。(scale bar = 200 μ m)
- C. 培養11日目の細胞塊における神経細胞マーカーTuj-1の発現を免疫染色法で解析した。(scale bar = 500 μ m)

A



B

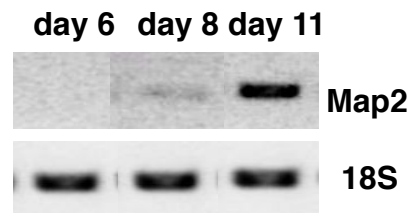
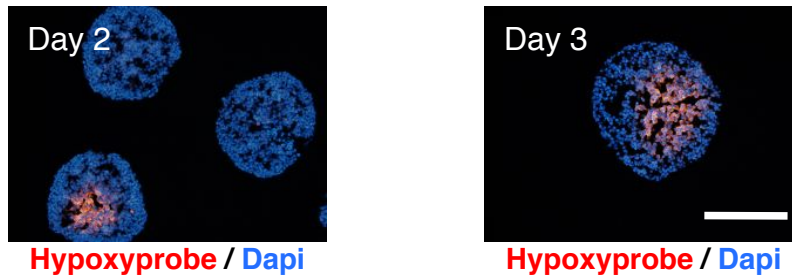


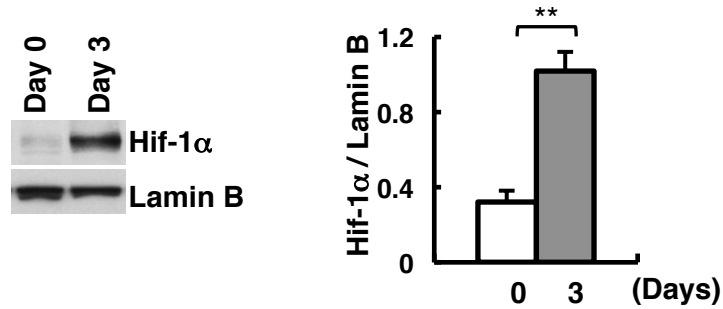
図 4 SFEBq分化培養における神経系マーカー発現のRT-PCR解析

- A. RT-PCR法より、SFEBq分化培養6日目までの初期神経マーカーのmRNA発現を解析した。
- B. RT-PCR法より、SFEBq分化培養6、8、11日目における神経細胞マーカーMap2のmRNA発現を解析した。

A



B



C

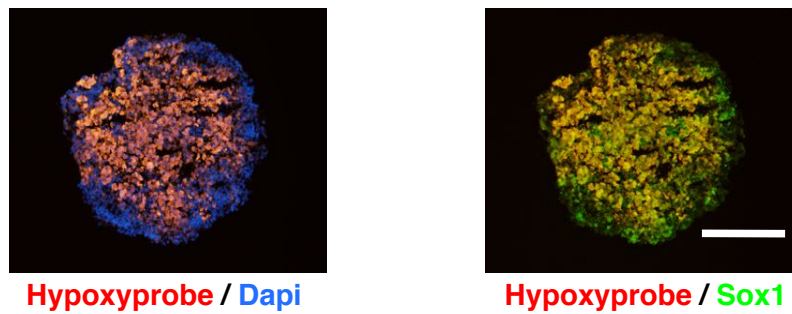
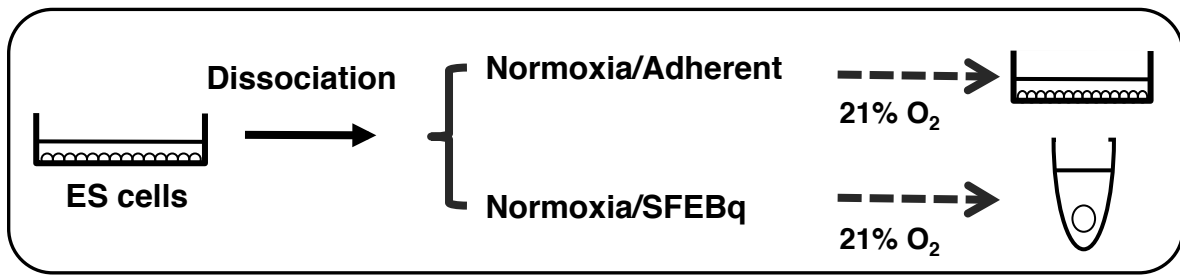


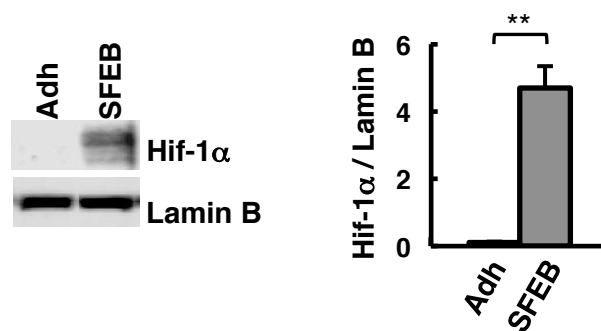
図 5 SFEBq分化培養における低酸素応答の解析

- A. Hypoxyprobe法により、SFEBq分化培養2日目、3日目の細胞塊内の酸素濃度状況を解析した。分化2日目からHypoxyprobe陽性の低酸素部位を持つ細胞塊が検出され (25%, n=12)、分化3日目以降、すべての細胞塊に低酸素領域が見られた (100%, n=14)。(scale bar = 200 μ m)
- B. Western blot法より、分化3日目のES細胞塊でのHIF-1 α のタンパク質の発現を解析した。Day 0: 0.32 \pm 0.06 v.s. Day 3: 1.02 \pm 0.11 ** p<0.01 (Student's t-test)
- C. 分化培養4日目のHypoxyprobe解析及び初期神経マーカーSox1の免疫染色。Sox1の陽性細胞がHypoxyprobe陽性領域と重なることが観察された(右図)。(scale bar = 100 μ m)

A



B



C

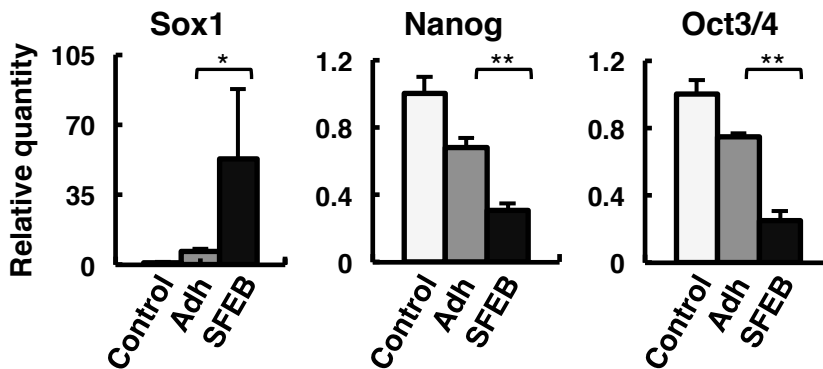
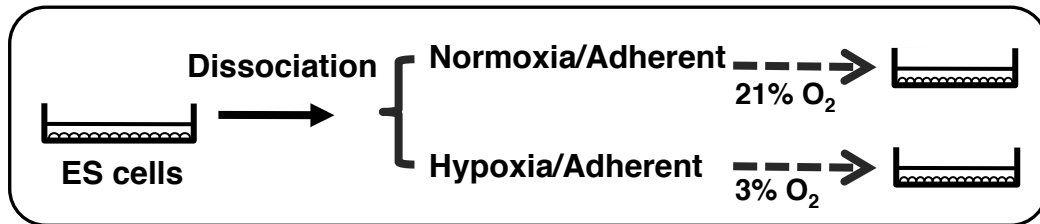


図 6 SFEBq分化培養と接着培養の比較

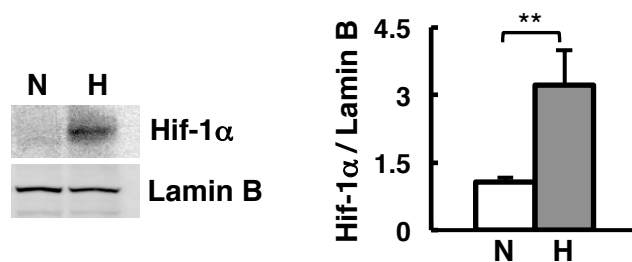
- A. 通常酸素条件下でSFEBq分化培養と接着培養の比較解析を行った。
- B. Western blot法により、SFEBq分化培養3日目の細胞塊でHIF-1 α のタンパク質の発現が確認された。Adh: 0.1 ± 0.03 v.s. SFEB: 4.69 ± 0.65 ** $p < 0.01$ (Student's t-test)
- C. 分化4日目の細胞を回収し、リアルタイムPCR法を用いて、初期神経マーカーSox1及び未分化マーカーNanog、Oct3/4の発現を解析した。Sox1 (Adh: 6.78 ± 1.03 v.s. SFEB: 53.06 ± 27.54); Nanog (0.68 ± 0.06 v.s. 0.31 ± 0.04); Oct3/4 (0.75 ± 0.02 v.s. 0.25 ± 0.06)
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (ANOVA)

略語: C, Control (ES細胞); Adh, adherent culture

A



B



C

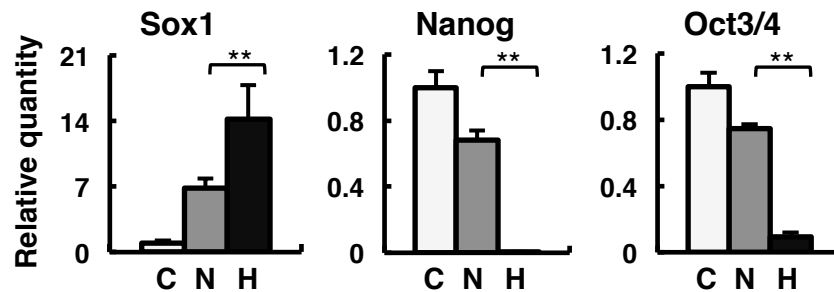
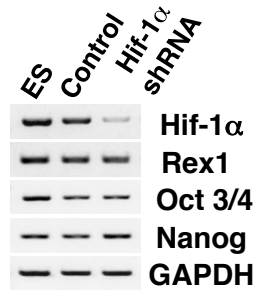


図7 通常酸素及び低酸素条件下での接着培養の比較

- A. 通常酸素又は低酸素条件下でES細胞の接着培養を行い、比較解析を行った。
- B. Western blot法により、低酸素条件下で培養した細胞でHIF-1 α のタンパク質の発現が確認された。N: 1.06 ± 0.11 v.s. H: 3.21 ± 0.79 ** $p < 0.01$ (Student's t-test)
- C. 分化4日目の細胞を回収し、リアルタイムPCR法を用いて、初期神経マーカーSox1及び未分化マーカーNanog、Oct3/4の発現を解析した。Sox1 (N: 6.78 ± 1.03 v.s. H: 14.19 ± 3.64); Nanog (0.68 ± 0.06 v.s. 0.005 ± 0.002); Oct3/4 (0.75 ± 0.02 v.s. 0.09 ± 0.02) ** $p < 0.01$ (ANOVA)

略語: C, Control (ES細胞); N, Normoxia; H, Hypoxia

A



B

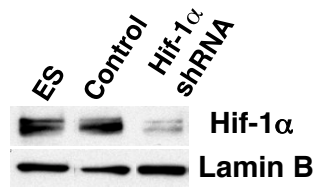
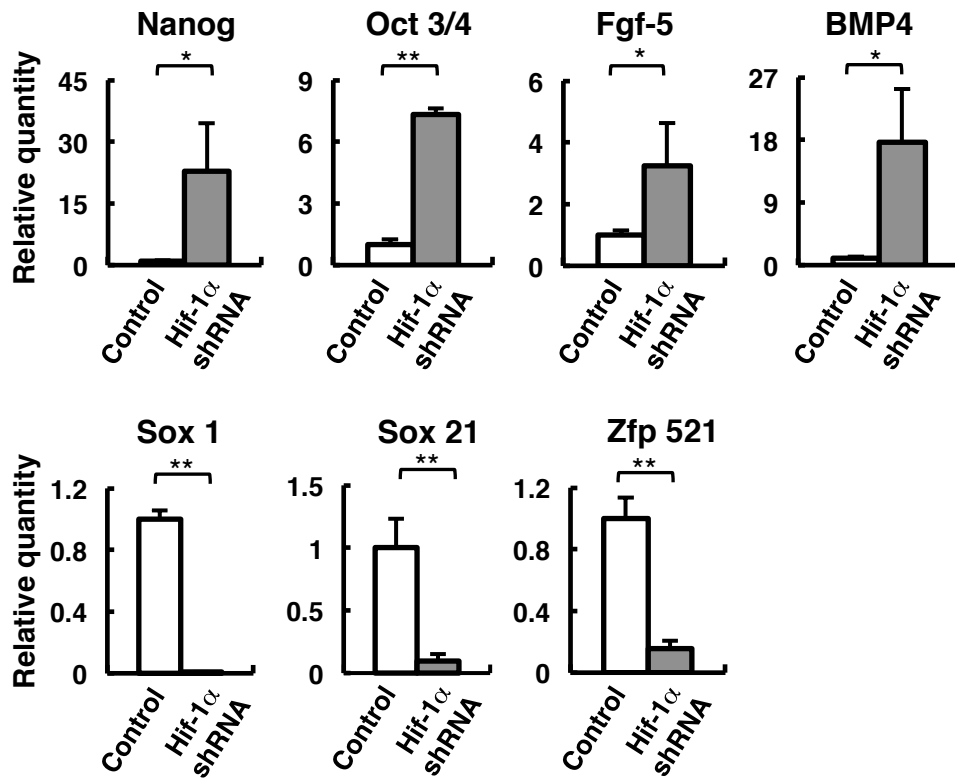


図 8 HIF-1 α knock-down ES細胞におけるHIF-1 α 発現の確認

- A. RT-PCR法より、HIF-1 α knock-down ES細胞のHIF-1 α 及び未分化マーカーのmRNAの発現を確認した。
- B. Western blot法より、knock-down ES細胞のHIF-1 α タンパク質の発現を確認した。

A



B

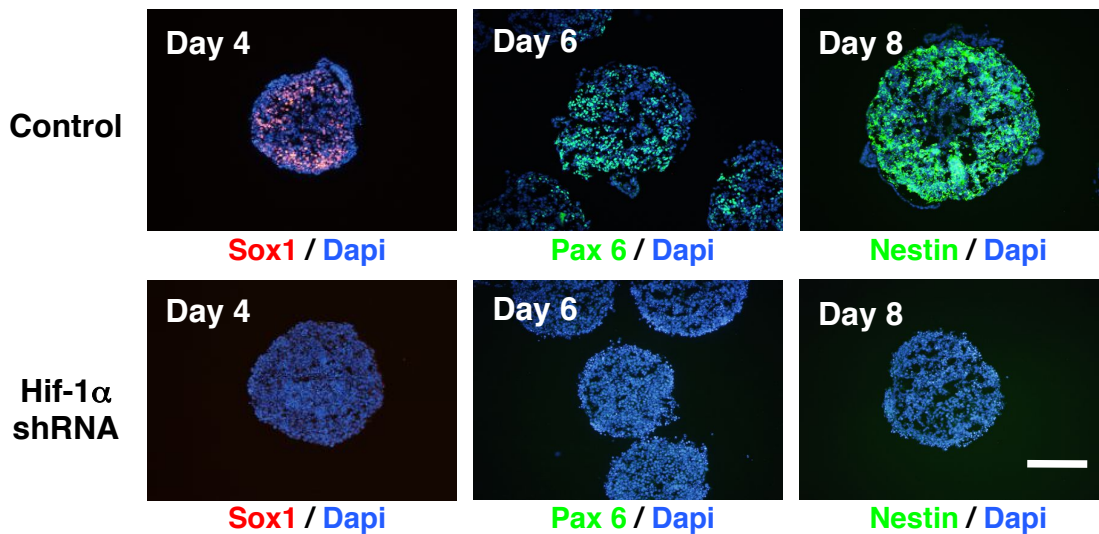
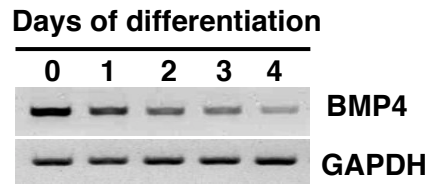


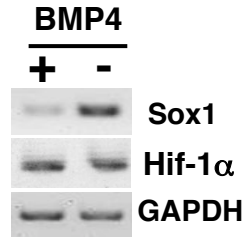
図 9 HIF-1 α knock-down ES細胞のSFEBq分化培養での各種マーカー発現の解析

- A. リアルタイムPCRより、SFEBq分化培養4日目のHIF-1 α knock-down ES細胞の各種マーカーのmRNA発現を解析した。Nanog (Control: 1 ± 0.28 v.s. Hif-1 α shRNA: 22.92 ± 11.51); Oct3/4 (1 ± 0.25 v.s. 7.34 ± 0.3); Fgf-5 (1 ± 0.16 v.s. 3.26 ± 1.37); BMP4 (1 ± 0.27 v.s. 17.71 ± 7.58); Sox1 (1 ± 0.06 v.s. 0.009 ± 0.003); Sox21 (1 ± 0.23 v.s. 0.09 ± 0.06); Zfp521 (1 ± 0.14 v.s. 0.15 ± 0.05) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)
- B. 免疫染色法より、SFEBq分化培養4日目のHIF-1 α knock-down ES細胞におけるSox1、分化6日目のPax6及び分化8日目のNestinのタンパク質発現を解析した。(scale bar = 200 μ m)

A



B



C

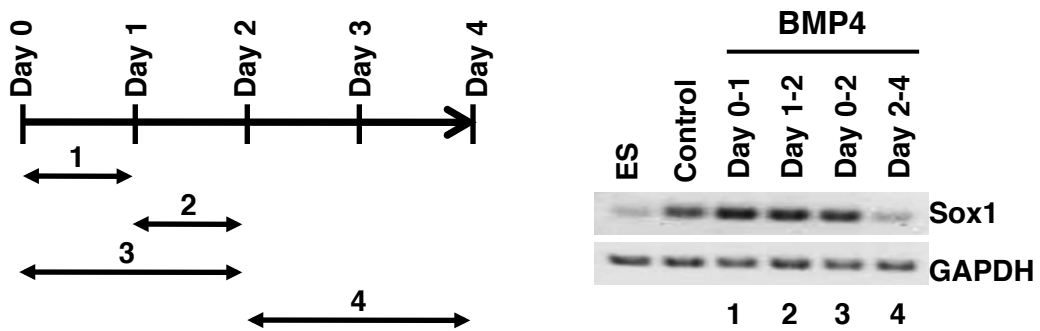
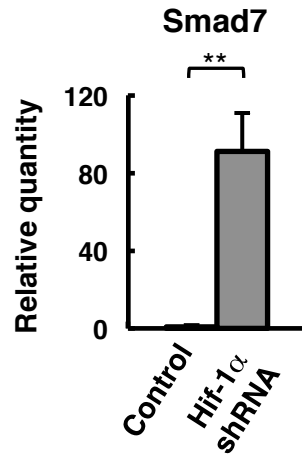


図 10 SFEBq分化培養における、BMP4による神経分化抑制効果の解析

- A. RT-PCRより、SFEBq分化培養4日目までのBMP4のmRNA発現を解析した。
- B. RT-PCRより、BMP4添加下(0.5nM)のSFEBq分化培養4日目に、初期神経マーカーSox1及びHIF-1αのmRNA発現を解析した。
- C. RT-PCRより、異なる時期にBMP4を添加し、初期神経マーカーSox1の発現を分化4日目に解析した。

A



B

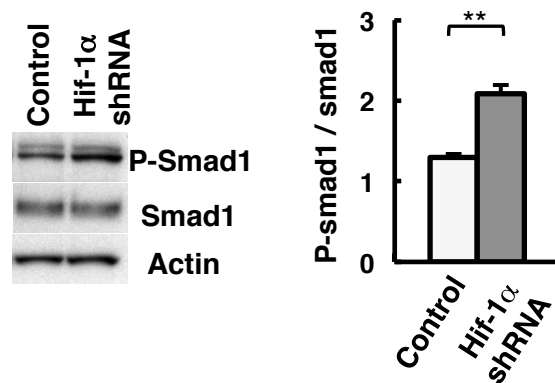


図 11 HIF-1 α knock-down ES細胞のSFEBq分化培養におけるBMPシグナルについての解析

- A. リアルタイムPCRより、SFEBq分化培養4日目にHIF-1 α knock-down ES細胞においてBMPシグナル下流にあるSmad7のmRNA発現を解析した。Control: 1 ± 0.7 v.s. Hif-1 α shRNA: 90.93 ± 20.03 ** $p < 0.01$ (Student's t-test)
- B. Western blot法より、SFEBq分化培養4日目にHIF-1 α knock-down ES細胞においてBMPシグナル下流のSmad1のリン酸化レベルを確認した。Control: 1.3 ± 0.05 v.s. Hif-1 α shRNA: 2.09 ± 0.1 ** $p < 0.01$ (Student's t-test)

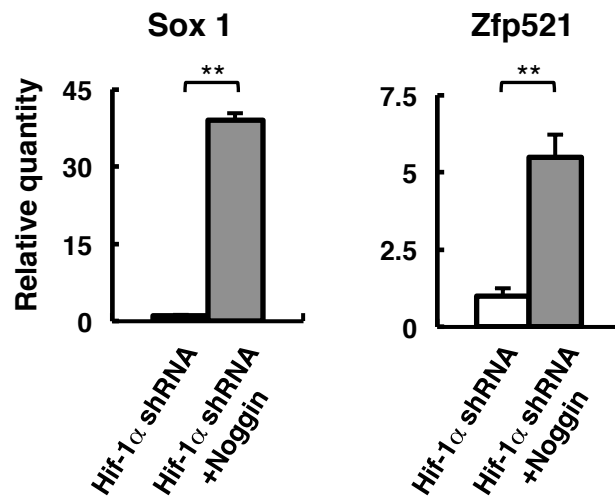
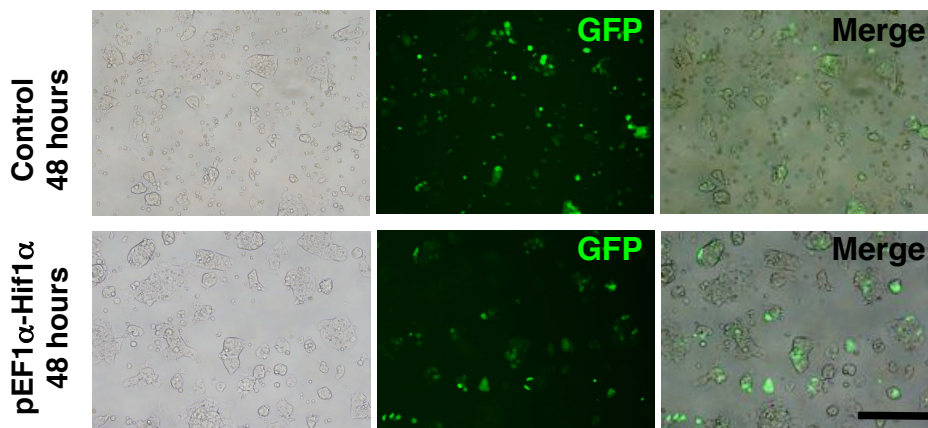


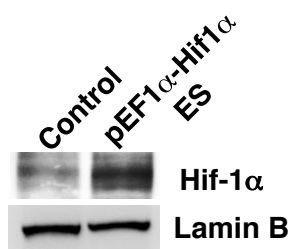
図 12 HIF-1 α knock-down ES細胞のSFEBq分化培養におけるNoggin添加実験

- A. HIF-1 α knock-down ES細胞を用いたSFEBq分化培養で、BMPシグナルの抑制剤として知られているNogginを添加し、4日目の初期神経マーカーのmRNA発現をリアルタイムPCRで解析した。Sox1 (Hif-1 α shRNA: 1 \pm 0.16 v.s. Hif-1 α shRNA + Noggin: 40 \pm 1.3); Zfp521 (1 \pm 0.25 v.s. 5.50 \pm 0.74) ** p<0.01 (Student's t-test)

A



B



C

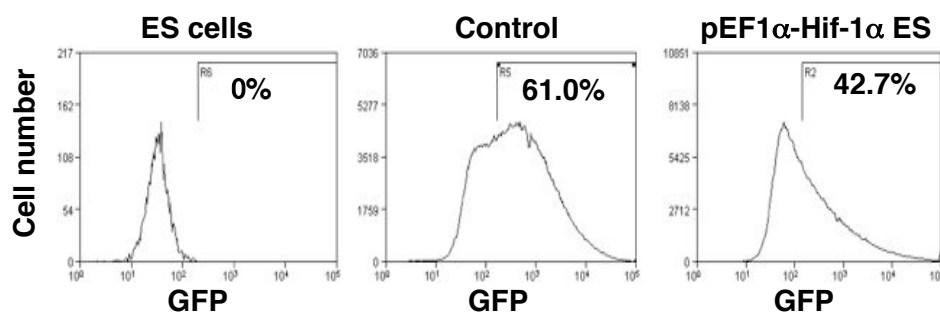


図 13 ES細胞におけるHIF-1 α の強制発現及び強制発現細胞の分取

- A. pEF1 α -HIF-1 α -IRES-AcGFP1 をES細胞に導入し、48時間後、蛍光顕微鏡下で GFP陽性細胞を確認した。(scale bar = 1 mm)
- B. Western blot法より、HIF-1 α 強制発現細胞におけるHIF-1 α のタンパク質の発現を確認した。
- C. FACSセルソーターにてHIF-1 α 陽性(GFP陽性)細胞を分取した。

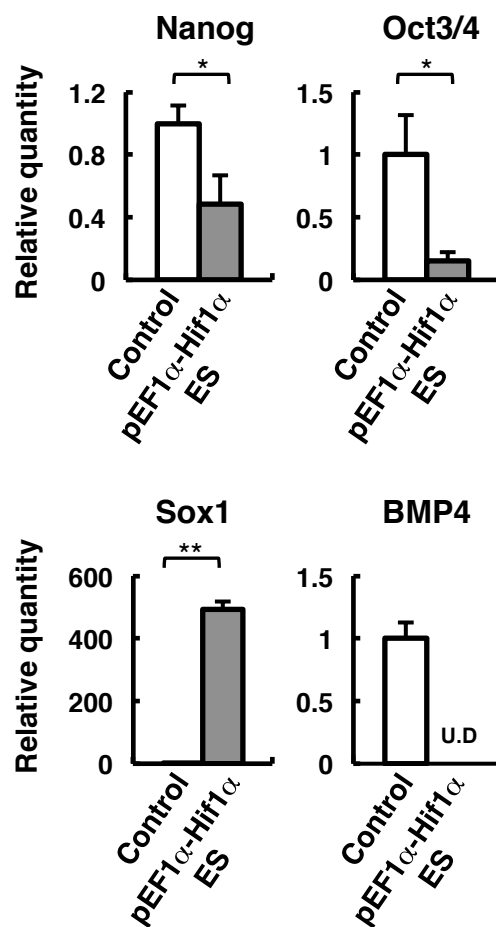


図 14 HIF-1 α 強制発現ES細胞における各種マーカー発現の解析

リアルタイムPCRより、分取したHIF-1 α 強制発現ES細胞における各種マーカーのmRNA発現を解析した。Nanog (Control: 1 ± 0.11 v.s. pEF1 α -Hif1 α ES: 0.48 ± 0.19); Oct3/4 (1 ± 0.32 v.s. 0.15 ± 0.07); Sox1 (1 ± 0.14 v.s. 494.28 ± 22.7); BMP4 (1 ± 0.13 v.s. Undetected) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Student's t-test)

略語: U.D, Undetected

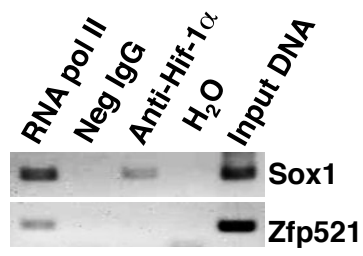
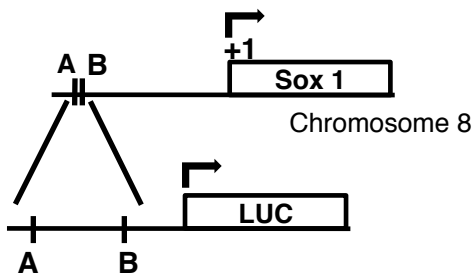


図 15 クロマチン免疫沈降解析

クロマチン免疫沈降法を用いて、HIF-1 α が初期神経マーカーSox1及びZfp521の遺伝子座に結合しているかについて解析した。

A



A: HRE6r

-3570 ACCTCTTCCGACGTTTCTTTA -3551

B: HRE4

-3250 ATGGTCCCCAACGTACCCAA -3231

pGL3-Sox1

-3575 CAAAGACCTCTTCCGACGTTC...CAACGTACCCAACTTGTTGG -3222

pGL3-Sox1-mutN

-3575 CAAAGACCTCTTCCGAXXTC...CAACGTACCCAACTTGTTGG -3222

→AA

pGL3-Sox1-mutC

-3575 CAAAGACCTCTTCCGACGTTC...CAAXXTACCCAACTTGTTGG -3222

→AA

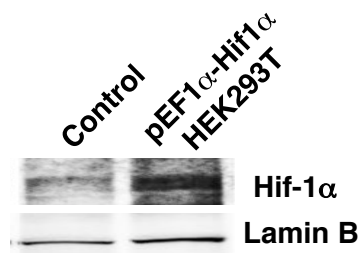
pGL3-Sox1-mutNC

-3575 CAAAGACCTCTTCCGAXXTC...CAAXXTACCCAACTTGTTGG -3222

→AA

→AA

B



C

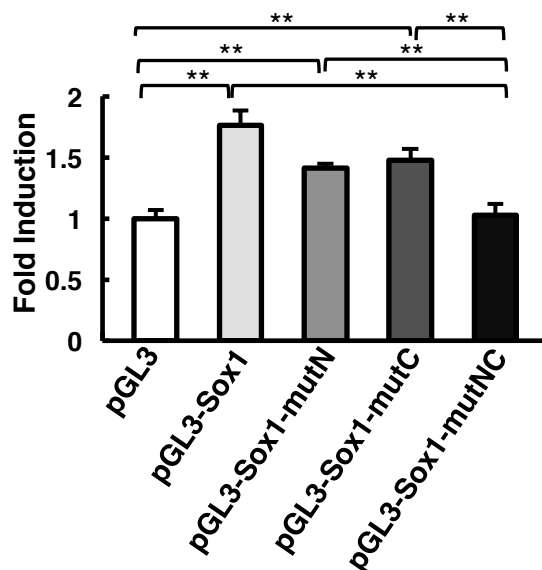


図 16 Luciferase assay

- A. Sox1の遺伝子座上流にHIF-1 α が結合するHRE領域が2ヶ所(A, B)存在している。pGL3-Sox1:2ヶ所のHRE領域を含む配列をLuciferase reporter plasmid(pGL3)に挿入した。pGL3-Sox1-mutN:HRE領域Aのみに変異を入れたpGL3-Sox1。pGL3-Sox1-mutC:HRE領域Bのみに変異を入れたpGL3-Sox1。pGL3-Sox1-mutNC:2ヶ所のHRE領域両方変異を入れたpGL3-Sox1。
- B. Western blot法より、pEF1 α -Hif1 α 導入48時間後、HEK293T細胞におけるHIF-1 α タンパク質の強制発現を確認した。
- C. Aで示したplasmidとpEF1 α -Hif1 α をHEK293T細胞に導入し、48時間後Luciferase assayを行った。pGL3: 1 \pm 0.07; pGL3-Sox1: 1.79 \pm 0.13; pGL3-Sox1-mutN: 1.43 \pm 0.04; pGL3-Sox1-mutC: 1.51 \pm 0.09; pGL3-Sox1-mutNC: 1.04 \pm 0.09 ** p<0.01 (ANOVA)

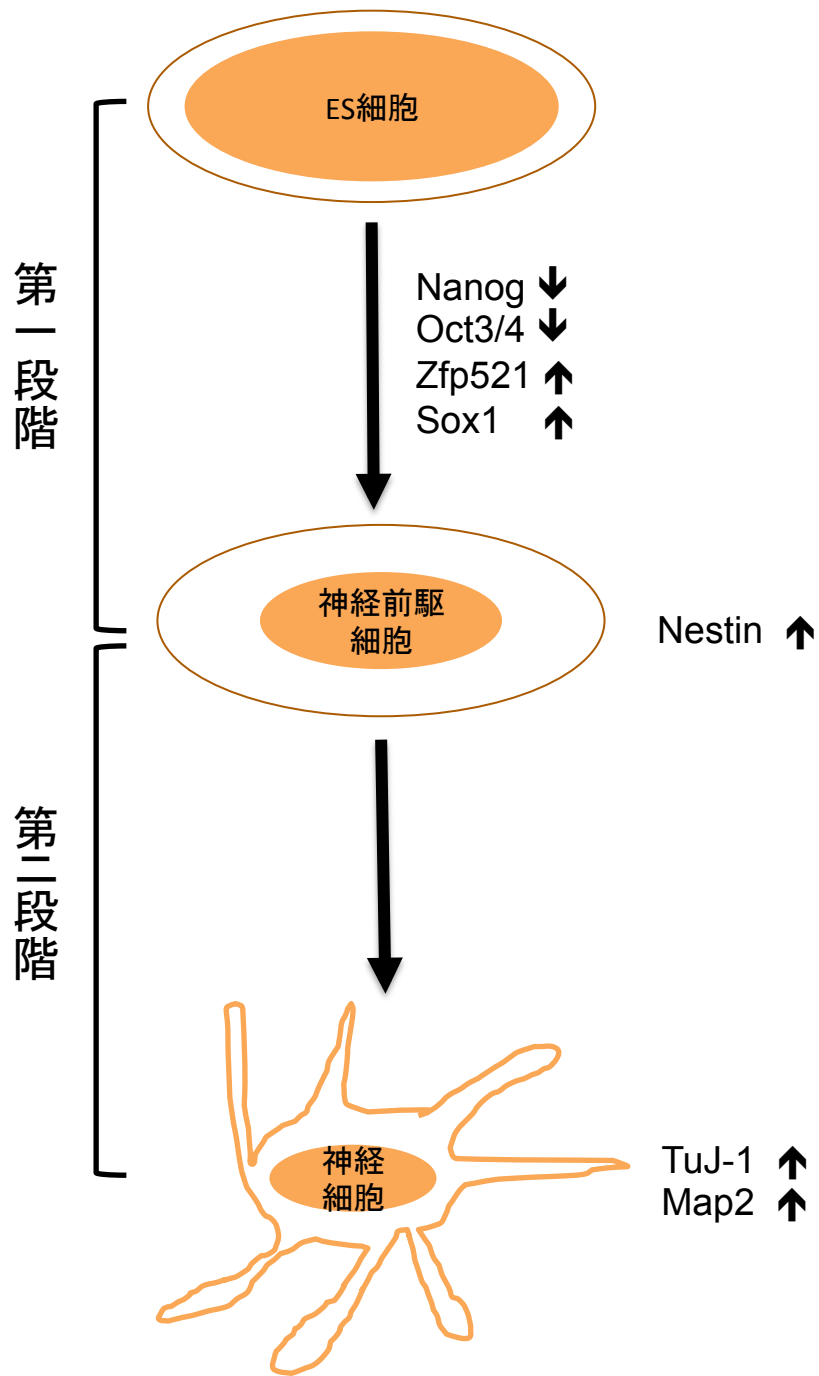


図 17 ES細胞の神経分化の二段階

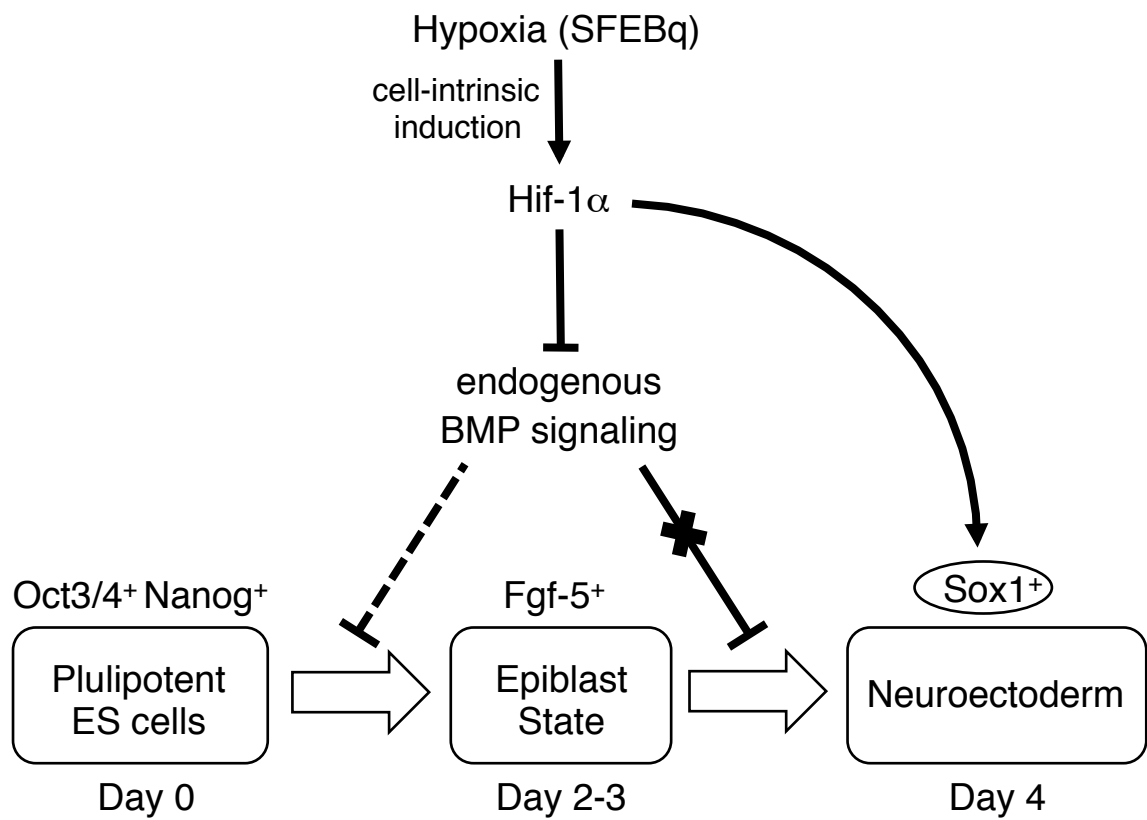


図 18 低酸素がES細胞の神経分化の第一段階を促進する分子メカニズム