慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	STAT3/SOCS3経路は網膜視細胞の分化のタイミングを制御する
Sub Title	
Author	小澤, 洋子(Ozawa, Yoko)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2009
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.85, No.2 (2009. 4) ,p.179- 184
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	受賞記念講座(三四会奨励賞)
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20090400-0179

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・85(2)：179～184，2009

受賞記念講座（三四会奨励賞）

STAT3/SOCS3経路は網膜視細胞の分化のタイミングを制御する

慶應義塾大学医学部眼科学教室
小澤洋子（おざわようこ）

光は網膜視細胞を刺激し，網膜内の神経ネットワークを介して視覚を形成させる．なぜ，同じ生物種であれば，誰もが同じものを同じ形として見ることができるのか．言い換えれば，生物はどのようにして，同一企画の網膜という器官を形成するのだろうか．その答えの一端は非常に秩序だった網膜の各細胞の発生・発達機構にある．

網膜には6種のニューロンと1種のグリア細胞があるが，各種網膜細胞の分化の順番（図1）や数の制御については今までにも数々の報告がある．しかし，網膜細胞は光を受け取るだけでなくシナプスを介したネットワークを形成して情報処理もする複雑な器官であり，更に細かい分化のスケジュールが決まっているはずである．そこで我々は，網膜，特に視細胞の発生を解析し，視細胞分化のタイミングを細かく調節するメカニズムが存在することを明らかにした．運命が決まった細胞において，実際に分化し機能を持つ時期が調節を受けていることについては今まであまり注目されていなかった．しかし，最近の研究からは細胞分化の時期を同調させたりずらしたりすることは，網膜内のシナプスネットワーク形成の制御に関わる可能性があると考えられるようになっている[1]．つまり，分化時期の調節メカニズムも視覚形成に重要である可能性があるということである．

ここでは，桿体視細胞の分化開始のタイミングをSTAT3/SOCS3経路が調節する，という知見について，我々が発表した次の2つの原著論文[2,3]を元に解説する．

① “Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. (*Mol Cell Neurosci. 2004*)”

② “SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation. (*Dev Biol. 2007*)”

1. 網膜では，共通の網膜前駆細胞が分裂し，特定の時期に特定の細胞種への分化の運命が決定される

網膜には光受容体であり一次ニューロンである視細胞の他に二次，三次ニューロンである双極細胞や神経節細胞，二種の介在ニューロン，ミューラーグリア細胞といった様々な細胞があるが，それらは皆，同一の網膜前駆細胞が起源であるということが知られていた[4,5]．更に，特定の時期に特定の細胞の分化の運命が決定することも知られていた[4,5]（図1）．その調節機構の一つとして，先に分化した細胞（網膜神経節細胞など）が後から分裂・分化する細胞（視細胞など）の数を制御する機構[6]や，サイトカインなどの特定の細胞外液性因子による制御の機構[7,8]が報告されていた．一方，各種網膜細胞の運命決定には，特定の転写因子の発現が重要な役割を果たす（Hatakeyama and Kageyama, 2004），つまり細胞内因子により分化調節される機構の研究も進められていた．しかし，細胞外—細胞内因子間の関係に関する分子レベルの研究や，同一種類の個々の細胞の分化時期の調節機構についての研究はほとんどされていなかった．

2. 最終分裂を終えた予定視細胞は，時間をかけて分化の過程を完了する

網膜前駆細胞が何度も分裂を繰り返し，もうこれ以上は分裂しないという最終分裂をして視細胞へと運命決定すると，予定視細胞と呼ばれる．マウスでは予定視細胞は胎生13日目（embryonic day 13；E13）から出生後4日目（postnatal day 4；P4）くらいまでの間に誕生して徐々に増えていくが，桿体視細胞の最終分化マーカーであるロドプシンの発現はP0以降に限られることが知られていた（図1）．ロドプシンの上流の転写因子

Crxも，分裂後早期から低レベルで発現を開始するものの，ロドプシンの発現に必要な高レベルの発現を開始するまでには数日かかることが報告されていた[9,10]．つまり，最終分裂後に視細胞に分化する運命が決まり，Crxを低レベルで発現した予定視細胞は，その後数日間，分化の過程を完了できず，最後にCrxの発現が急に上昇してロドプシンを発現し始める（ここではこれを，分化を開始したとよぶ），という過程をたどるのである．また，分裂後に分化を開始するまでの時間は，胎生期に誕生した細胞の方がP0以降に誕生した細胞より長いことが報告されていた[11]．すなわち，分化を止められている期間が，予定視細胞の誕生時期により異なっていたのである．

これとは別に初代培養の実験から，予定視細胞はciliary neurotrophic factor（CNTF）存在下では，ロドプシンの発現を可逆的に抑制され，CNTFの除去により分化を開始しうることが知られていた[12]．つまり細胞外因子であるCNTFは視細胞の分化過程を抑制することができたわけである．しかし，このときの分化に必要な細胞内因子の動向については，未だ解析されていなかった．

ところで，発達期網膜でのCNTFの発現については，胎生期終盤で高値を示し，P0以降に急激に低下すると言うことが報告されていた[13]．CNTFはその受容体を通して膜貫通型受容体gp130を活性化するが，このCNTF/gp130シグナルが視細胞の分化の開始を負に調節する可能性があった．そこで，マウス網膜器官培養とノックアウトマウスを用い，視細胞の分化時期の調節機構につき次のような研究をした．

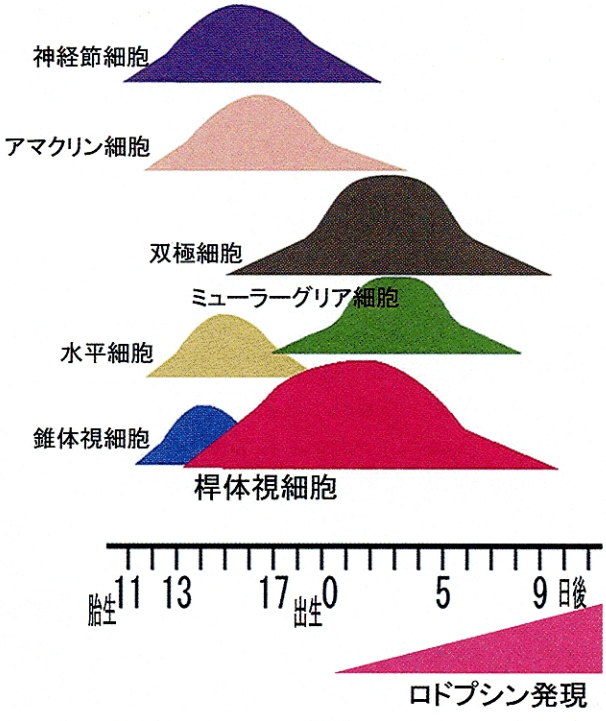

図1　各網膜細胞の誕生時期．網膜では，胎生期後期から出生後にかけて，特定の時期に特定の種類の細胞運命が決定されて分化を開始する．視細胞の最終分化マーカーであるロドプシンは出生0日目以降に発現する．（Marquardt et al. *Trends in Neurosciences 2002* より改変）

3. CNTF/gp130シグナル下流のSTAT3がCrx・ロドプシンの発現を抑制し，視細胞の分化を抑制した

CNTF/gp130シグナルの下流では細胞内でJAK/STAT3経路，SHP2/MAPK経路が活性化しうるが，そのいずれがCrx・ロドプシンの発現を抑制し，視細胞の分化を抑制するかは，不明であった．そこで我々はまずこの点を，網膜の発達をよく再現することで知られる網膜器官培養（retinal explant）の系[14]を用いて解析した．我々はこのretinal explantに直接，遺伝子をエレクトロポレーションにより導入する方法を開発し，ドミナントネガティブ型STAT3（STAT3F）[15]を導入した．すると，STAT3Fを導入された予定視細胞では，CNTFを添加しても，STAT3の活性化は抑制され，ロドプシンを発現することができたのである．もう一つの

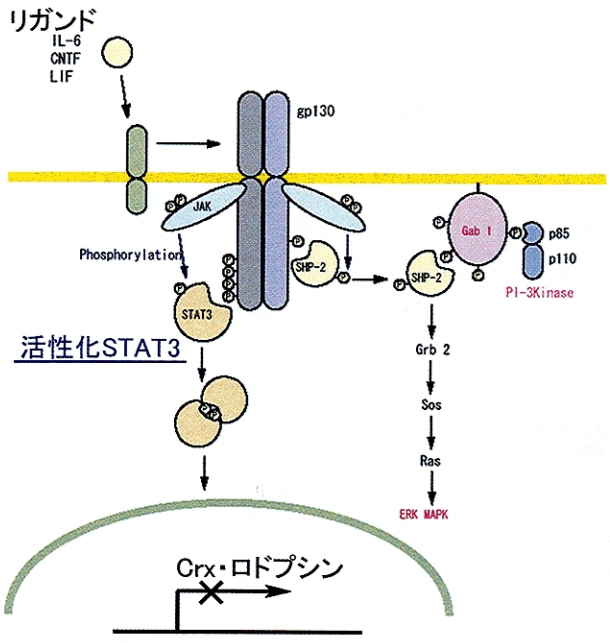

図2　炎症性サイトカインとして知られ，細胞外液性因子であるCNTFなどは膜貫通型受容体gp130を介して細胞内でSTAT3を活性化し，予定視細胞でのCrx・ロドプシンの発現を抑制する．

経路，SHP2/MAPK 経路を抑制しても，CNTF の視細胞分化抑制効果を相殺することはできなかった．よって，視細胞の分化は CNTF が予定視細胞内で STAT3 を活性化することで抑制される，ということが明らかになった（図2）．

4. E18 の予定視細胞では STAT3 が活性化しているが，P0 になると大きく低下した

マウスでは最終的に形成される視細胞の約半数が，胎生期に予定視細胞として誕生するが，ロドプシン発現は P0 まで始まらない．それでは，胎生期（E18 まで）の予定視細胞では STAT3 が活性化しているのか．興味深いことに，実際，胎生期の予定視細胞層ではほぼすべての細胞で STAT3 が活性化しており，P0 で急激に下がっていることが，活性化 STAT3 の免疫組織染色により明らかになった（図3）．

5. 網膜特異的 STAT3 ノックアウトマウスでは，視細胞分化の開始が早まっていた

では，STAT3 が胎生後期に活性化していなければ，視細胞の分化は早く開始するのか．STAT3 のノックアウトマウスは胎生致死で解析ができないため，我々は網膜特異的 STAT3 ノックアウト（α-Cre STAT3$^{flox/flox}$）マウスを用いて解析した．このマウスでは，E12 から STAT3 を発現しなくなるのだが，E18 でロドプシンの上流転写因子の *crx* の発現が上昇していた．このことから，生体内でも実際に，誕生した予定視細胞は活性化 STAT3 により分化過程を途中で止められており，それが解除されることで視細胞分化が開始する（図4）ことが示された．ただし，もし胎生後期に STAT3 が活性化されていなくても，予定視細胞の誕生後直ちに視細胞の分化が開始するわけではなかった．すなわち，分化の開始にはいくつかの条件が整う必要があり，活性化 STAT3 の発現が低下しても充分ではないが，低下しない限り分化の開始に必要な条件がそろわないといえた．

6. P0 で網膜内 STAT3 活性が急に低下しても，すべての予定視細胞が同時に分化を開始するわけではなかった

前述のように P0 で網膜内 STAT3 活性は急激に低下するが，そのわりには P0 以降にロドプシンを発現し始める細胞は急激には増加しない（図3）．そこで我々は，リガンドの発現低下以外に，さらに細かく細胞ごとに STAT3 活性を調節する分子があるに違いないと考えた．

一方，STAT3 活性を抑制する分子の一つに SOCS3 があった．STAT3 はリガンドが gp130 受容体を活性化すると働く Janus kinase（JAK）により活性化され

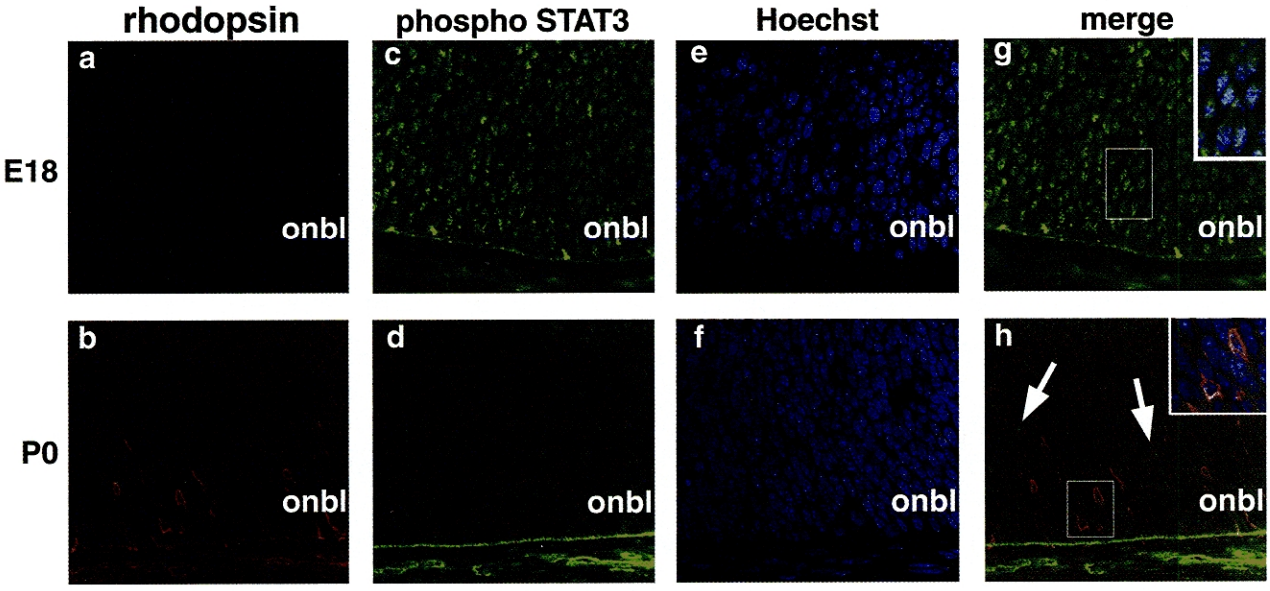

図3　E18 には予定視細胞で STAT3 が活性化しており（c, g. g；活性化 STAT3 は核内移行していた），ロドプシンの発現は見られないが（a, g），P0 では急激に活性化 STAT3 の発現が低下し（d, h），一部の予定視細胞でロドプシンの発現が開始した（b, h）．P0 でわずかに活性化 STAT3 が残存する細胞では，ロドプシン発現は見られなかった（h, 矢印）．Hoechst；核染色．（Ozawa et al. *Mol Cell Neurosci.* 2004 より）

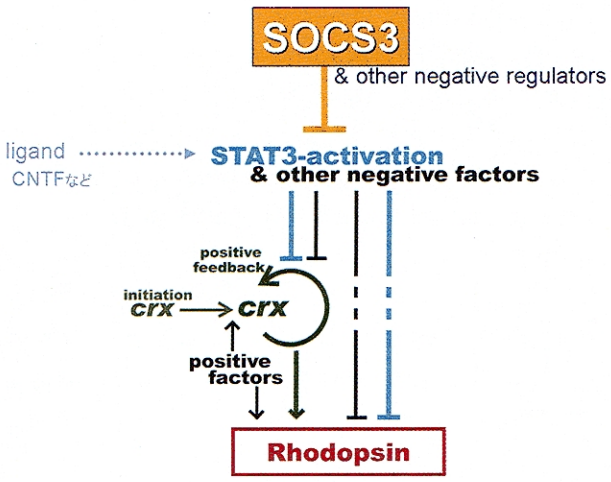

図4　予定視細胞では，低発現していたCrxが（おそらくpositive feedback機構により）急激に発現上昇するとロドプシンの発現が開始し分化するが，STAT3が活性化していると，Crxは低発現のままで発現上昇せず，ロドプシンの発現が開始しない．これに対しSOCS3は，STAT3の活性化を抑えるため，Crxの急激な発現上昇を促しロドプシンの発現，つまり視細胞の分化を開始させる．（Ozawa et al. *Mol Cell Neurosci. 2004* より改変）

図5　STAT3は，細胞外因子（リガンド）がgp130受容体を活性化すると働くJanus kinase（JAK）により活性化される．SOCS3は，STAT3活性化により転写活性が上昇し誘導され，JAKの活性を抑制することでSTAT3の活性化を抑制する．

るが，このJAKの活性を抑制するのがSOCS3である（図5）．またSOCS3は活性化STAT3により転写を促進されるので，STAT3のnegative feedback modulatorの一つとされている．興味深いことに，SOCS3はP0以降，常にロドプシンの発現開始に先んじて予定視細胞層で発現していた（図6E，F）．すなわちSOCS3が発現してSTAT3を抑制した細胞でのみ，視細胞の分化を開始できる可能性があった．

7. 網膜器官培養において，SOCS3機能を抑制すると，視細胞の分化は抑制された

上述の仮説を証明するために，我々は再度retinal explantに直接，遺伝子をエレクトロポレーションで導入する方法を用いて解析した．これにより，SOCS3を強制発現した細胞はCNTFを添加してもSTAT3の活性化は抑制され，視細胞分化を開始できることを示した．更に，ドミナントネガティブ型SOCS3（F59D-JAB）によりSOCS3の機能を抑制すると，CNTFを添加しない通常の培養条件下であっても，視細胞の分化は開始できないことを示した．

8. 網膜特異的SOCS3ノックアウトマウスでは，視細胞分化の開始が遅延していた

SOCS3が欠損していると，生体内でも視細胞の分化が抑制されるのか．P3の網膜で比較すると網膜特異的SOCS3ノックアウト（α-Cre SOCS3$^{flox/flox}$）マウスでは活性化STAT3は高値を，Crx・ロドプシンの発現は低値を示した（図6）．すなわち，P0以降，たとえリガンド発現の大幅な低下により活性化STAT3が胎生期に比べると大きく低下しても，SOCS3を欠損すると，ある閾値以上のSTAT3活性が残存していて視細胞の分化を開始することができないと考えられた．P0以降残存した活性化STAT3をシャットダウンし，視細胞の分化を開始させるには，SOCS3が必要であった（図4）．

P3より後，このマウスでの視細胞の分化は成体になるまでに野生型に追いついて行くが，その速さは個体によってまちまちであった．一方，分化する細胞の順番から，各細胞のシナプスネットワークを形成する相手を見間違わないようにしている可能性があることは，他の現象の解析からも考えられている[1]．そのため，網膜全体に敷き詰められるように存在する視細胞が正常な順番で，上位ニューロンとタイミングを合わせて分化することで，正常なシナプスを形成する可能性がある．事実，網膜特異的SOCS3ノックアウトマウスの成体では，ロドプシンの発現は野生型と同様にまで追いついていたが，二次ニューロン以上の機能を網膜電図で見ると低下していることを，我々は最近明らかにした[17]．

9. 生体内のSOCS3の発現は，転写後調節を受けていた

従来SOCS3は活性化STAT3により転写活性が上昇して誘導されるnegative feedback modulatorとして知られている[16]．ということは，STAT3活性の高い胎生後期（E18まで）でSOCS3が誘導されてしまうはずである．しかし，実際には生体内のSOCS3タンパクの発現はP0以降に始まった（上述6.参照）．そこで我々は，E18までは*SOCS3* mRNAは誘導されても転写後抑制によりSOCS3タンパクが誘導されないという仮説

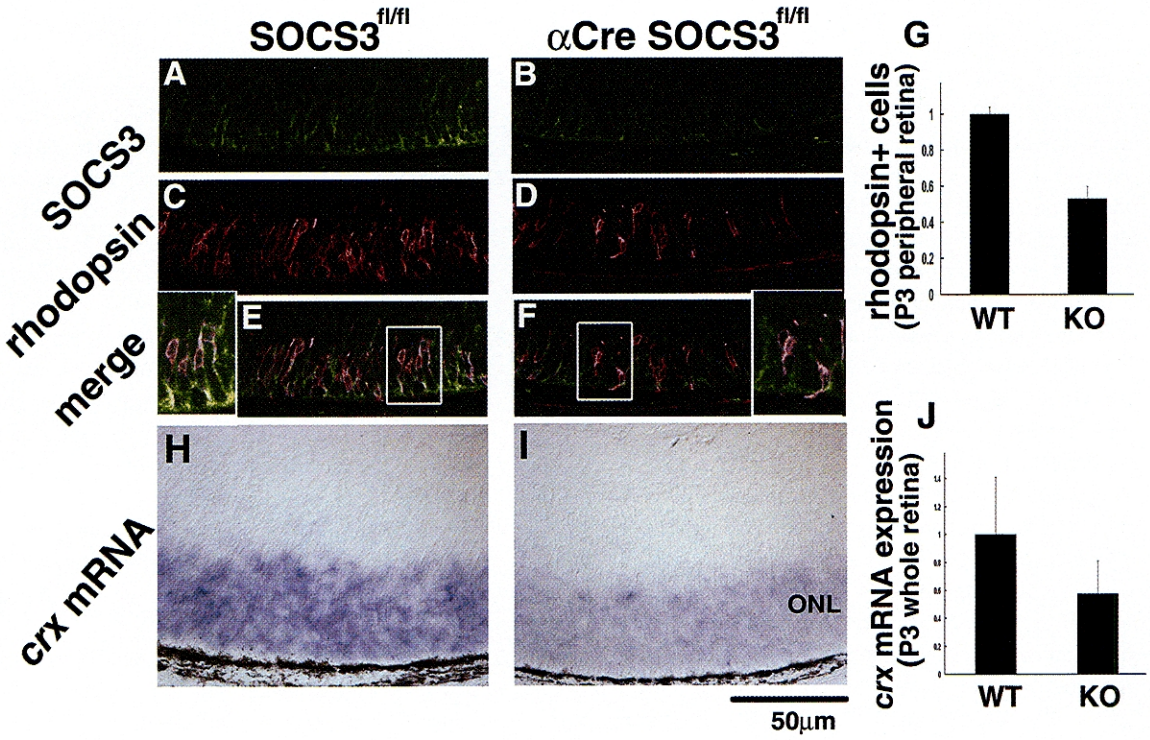

図6　網膜で SOCS3 発現が著しく低下したα-Cre SOCS3$^{flox/flox}$ マウスの網膜では（A, B），P3 でロドプシンを発現する細胞数が低下していた（C, D, E, F, G）．ロドプシンは，SOCS3 を発現した細胞の一部で発現していた（E, F）．α-Cre SOCS3$^{flox/flox}$ マウスの網膜ではロドプシンの上流転写因子，Crx の発現が低下していた（H, I, J）．SOCS3$^{flox/flox}$；野生型マウス，α-Cre SOCS3$^{flox/flox}$；網膜特異的 SOCS3 ノックアウトマウス（Ozawa et al. *Dev Biol. 2007* より）

を立て，これを解析した．すると仮説の通り，E18 では既に *SOCS3* mRNA の発現は P0 と同様の値にまで上昇していたが，SOCS3 タンパクの発現は P0 の半分以下に抑えられていた．このように転写後抑制があることで，SOCS3 タンパクが E18 以前に誘導されて STAT3 の活性化が抑制されることはなく，視細胞の分化開始時期を P0 以降にそろえることができたのである．その上，胎生期に mRNA をすでに発現していることは P0 から quick & timely に SOCS3 タンパクの発現を開始することに貢献していたのである．この転写後抑制のメカニズムは今のところわかっていないが，タンパク合成の抑制による可能性があった．

このように，網膜桿体視細胞の分化は，CNTF/gp130 受容体のリガンドである細胞外因子が，細胞内因子である STAT3 を活性化すると抑制され，SOCS3 のタンパク発現が始まると，細胞内での STAT3 活性化が抑制されることで細胞内因子である Crx・ロドプシンの発現が上昇し，開始していた（図4）．すなわち視細胞の分化は細胞外因子が細胞内因子に作用しつつ，調節されていることが示された．

さらにこのことは，発生という興味だけでなく，網膜再生法の開発のためにも重要な知見となったことを付け加えておきたい．網膜再生が必要な障害網膜では，各種炎症性サイトカインの発現が亢進しており，STAT3 は容易に活性化されうる．しかし，その微少環境下では，たとえ再生医療により新しい細胞が補填されても，視細胞として必要な Crx やロドプシンを発現すること，つまり分化誘導されることは難しいと言うことを意味していた．

謝　辞

この研究は生理学教室の岡野栄之教授と，眼科学教室の小口芳久名誉教授，坪田一男教授，およびそれぞれの教室のスタッフ・メンバーのご指導ご支援により達成されました．ここに深謝申し上げます．

文　献

1) Godinho L, *et al.* Nonapical symmetric divisions underlie horizontal cell layer formation in the developing retina in vivo. *Neuron* **56** : 597-603, 2007.
2) Ozawa Y, *et al.* SOCS3 is required to temporally fine-tune photoreceptor cell differentiation. *Developmental biology* **303** : 591-600, 2007.
3) Ozawa Y, *et al.* Downregulation of STAT3 activation is required for presumptive rod photoreceptor cells to differentiate in the postnatal retina. *Molecular and cellular neurosciences* **26** : 258-270, 2004.
4) Livesey FJ, Cepko CL. Vertebrate neural cell-fate determination : lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* **2** : 109-118, 2001.
5) Marquardt T, Gruss P. Generating neuronal diversity in the retina : one for nearly all. *Trends Neurosci* **25** : 32-38, 2002.
6) Mu X, *et al.* Ganglion cells are required for normal progenitor- cell proliferation but not cell-fate determination or patterning in the developing mouse retina. *Curr Biol* **15** : 525-530, 2005.
7) Levine EM, Fuhrmann S, Reh TA. Soluble factors and the development of rod photoreceptors. *Cell Mol Life Sci* **57** : 224-234, 2000.
8) Watanabe T, Raff MC. Rod photoreceptor development in vitro : intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* **4** : 461-467, 1990.
9) Furukawa A, Koike C, Lippincott P, Cepko CL, Furukawa T. The mouse Crx 5′-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells. *J Neurosci* **22** : 1640-1647, 2002.
10) Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL. Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* **91** : 531-541, 1997.
11) Morrow EM, Belliveau MJ, Cepko CL. Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* **18** : 3738-3748, 1998.
12) 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 (*Cambridge, England*) **124** : 1055-1067, 1997.
13) Kirsch M, Lee MY, Meyer V, Wiese A, Hofmann HD. Evidence for multiple, local functions of ciliary neurotrophic factor (CNTF) in retinal development : expression of CNTF and its receptors and in vitro effects on target cells. *Journal of neurochemistry* **68** : 979-990, 1997.
14) Tomita K, *et al.* Mammalian hairy and Enhancer of split homolog 1 regulates differentiation of retinal neurons and is essential for eye morphogenesis. *Neuron* **16** : 723-734, 1996.
15) Minami M, *et al.* STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93** : 3963-3966, 1996.
16) Yoshimura A, Mori H, Ohishi M, Aki D, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. *Current opinion in immunology* **15** : 704-708, 2003.
17) Ozawa Y, et al. Roles of STAT3/SOCS3 pathway in regulating the visual function and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of rhodopsin during retinal inflammation. *J Biol Chem.* **283** : 24561-24570, 2008