

博士論文

エピブラスト幹細胞から胚性幹細胞様細胞への
効率的変換法の開発

村山 秀之

エピブラスト幹細胞から胚性幹細胞様細胞への
効率的変換法の開発

所属 病因・病理学専攻
指導教員 中内 啓光
申請者 村山 秀之

目次

略語一覧	・ ・ ・ 2
要旨	・ ・ ・ 5
序論	・ ・ ・ 6
材料と方法	・ ・ ・ 16
結果	・ ・ ・ 25
考察	・ ・ ・ 43
結論	・ ・ ・ 50
図・表	・ ・ ・ 51
引用文献	・ ・ ・ 67
謝辞	・ ・ ・ 77

略語一覽

APC	adenomatous polyposis coli
CAG	cytomegalovirus enhancer and chicken β -actin promoter
Dox	doxycycline
DsRed	discosoma sp.red fluorescent protein
E 6.5 - 13.5	embryonic day 6.5 - 13.5
E-cad-rESC	E-cadherin overexpressed rESC
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ESC	embryonic stem cell
EpiSC	epiblast stem cell
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
FGF	fibroblast growth factor
GFP	green fluorescent protein
GSK-3 β	glycogen synthase kinase-3 β
ICM	inner cell mass
IRES	internal ribosomal entry site

JAK	janus kinase
KO	knock out
LEF	lymphoid enhancing factor
LIF	leukemia inhibitory factor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEF	mouse embryonic fibroblast
PBS	phosphate buffered saline
Pecam1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
PSC	pluripotent stem cell
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Rosa	reverse orientation with splice acceptor
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TCF	T-cell factor
TRE	tetracycline responsive element
Wnt	Wingless-related MMTV integration site
XCI	X-chromosome inactivation
bFGF	basic fibroblast growth factor
dpc	days post-coitum

iPSC	induced pluripotent stem cell
p-STAT3	phospho-Stat3
rESC	reprogrammed epiblast to ES-cell-like cell
tTA	tetracycline trans activator
tdTomato	tandem dimeric Tomato
wnt-rESC	wnt inhibitor-treated rESC

要旨

本論文は、キメラ形成能力のない primed 型多能性幹細胞（エピブラスト幹細胞: EpiSC）を効率的に naïve 型の胚性幹細胞（ESC）様細胞に変換するための制御機構に関する成果を纏めたものである。私は、E-cadherin の過剰発現によって、EpiSC がキメラ形成能力を備えた ESC 様細胞に効率よく変換することを発見した。さらに、そのメカニズムが LIF-STAT3 シグナルの活性と β -catenin の核内移行の抑制に起因することを明らかにした。本研究で得られた結果は、primed 型多能性幹細胞から naïve 型 ESC 様細胞への変換制御機構の解明に資する新しい知見の提供に繋がるものと考えられる。

序論

1. 再生医療、生命科学分野における多能性幹細胞の重要性

生体内のすべての細胞に分化が可能な多能性幹細胞 (Pluripotent Stem Cell: PSC) の研究は、1981 年に Evans らによってマウス胚盤胞から胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell: ESC) が樹立されて以来¹、飛躍的に発展し続けている。ESC は分化多能性に加えて安定した自己複製能力を保持しており、その有用性から再生医療のソースとして世界的に注目されている。また ESC で強く発現している転写因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) を体細胞に導入することにより、ESC と同等の多分化能をもつ誘導型多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPSC) が作製され^{2,3}、患者自身の細胞を用いた自家移植医療が現実的な目標となってきた。また、マウス ESC の特徴である桑実胚や胚盤胞との間に全身性のキメラ個体を形成できる性質 (以下「キメラ形成能」と称する) を利用することで、遺伝子改変動物の作製が可能となった。このように、多能性幹細胞を用いた技術は再生医療や生命科学分野において重要な地位を占めつつある。

2. 多能性幹細胞の性質維持機構とその分類

2-1. マウス ESC の性質維持機構と naïve 型多能性状態

着床前胚盤胞の内部細胞塊 (inner cell mass: ICM) から樹立されるマウス ESC は、サイトカインである白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) 存在下で多分化能を維持しながら培養することが可能である^{4,5}。LIF が Gp130 / LIFR β ヘテロ二量体からなる LIF 受容体に結合すると、JAK が活性化して STAT3 がリン酸化される。リン酸化された STAT3 は二量体を形成し核内移行することでシグナルを伝達し、Klf4、Sox2、Oct3/4 といった多能性維持に必要な転写ネットワークを活性化する。この JAK-STAT3 シグナルを抑制すると、LIF 存在下でも ESC の分化が誘導されてしまう⁶。逆に、STAT3 を人為的に活性化することで LIF 非存在下でも多能性の維持は可能である⁷。これらのことは、マウス ESC の多能性維持に LIF-STAT3 シグナルが必要かつ十分であることを示唆している。

また、Wnt シグナルが ESC の多能性維持に関わることも知られている。通常、 β -catenin は細胞質内で adenomatous polyposis coli (APC) と axin タンパクの複合体にリクルートされ glycogen synthase-3 β (GSK-3 β) の働きによって分解される。しかし、Wnt シグナルが入力されると Frizzled と Lrp5/6 からなる受容体をへて GSK-3 β の機能が抑制され β -catenin が安定化する。安定して蓄積された β -catenin

は核内へ移行し、T-cell factor (TCF) と Lymphoid enhancer-binding factor (LEF) ファミリーに属する転写因子と強調して標的遺伝子の活性を制御する⁸⁻¹⁰。この GSK-3 β の抑制剤である BIO (6-bromo-indirubin-3'-oxime) の添加はマウス ESC の未分化維持に寄与することが報告された¹¹。さらに Ying らは、GSK-3 β の抑制剤 CHIR99021 (CHIR) と FGF-MAPK シグナル阻害剤 PD0325901 (PD) の同時添加が LIF 非存在下での ESC の多能性維持を可能にすると報告した¹²。この条件は、2i (2 inhibitors) 培養法として ESC の培養に広く支持されている。また、TCF ファミリーに属する TCF3 は転写抑制因子として働き、核内の β -catenin と結合することでその機能が抑制されることが知られている¹³。ついで、TCF3 によって転写抑制される *Esrrb* 遺伝子の人為的な発現は、ESC の多能性維持における GSK-3 β 抑制剤の効果を代替できると報告された¹⁴。このことから、Wnt / β -catenin シグナルはその標的である *Esrrb* の発現誘導を介して多能性の維持に関与すると考えられている。しかし、*Esrrb* を欠損させても LIF シグナルが活性化していれば ESC の維持は可能であることから、Wnt / β -catenin シグナルが ESC の性質維持に直接的に貢献しているかどうかは定かではない。これらの知見により、マウス ESC の多能性維持に重要な細胞内シグナル経路が徐々に明らかになってきた。

マウス ESC は、桑実胚や胚盤胞に注入すると、すべての組織に寄与し全身性

のキメラ個体を形成できる。これはマウス ESC が内部細胞塊の性質を保っていることを示し、その多能性状態は naïve 型 (naïve pluripotent state) と定義された¹⁵。マウス iPS 細胞も naïve 型多能性状態にある naïve 型多能性幹細胞株である。マウス ESC は、Oct4 や Nanog、Sox2 といった多能性維持に必要な因子の発現に加え、Rex1、Pecam1 などの naïve 型特異的遺伝子の発現を示す。培養・維持されているマウス ESC は重層 (ドーム状) のコンパクトなコロニー形態を示す。また、雌性のマウス ESC は X 染色体が両方とも活性化しているなど、着床前段階特有の性質を保持している。

2-2. マウスエピブラスト幹細胞の性質維持と primed 型多能性状態

一方、2007 年、少し発生の進んだ着床後の胚である発生 5.5~7.5 日目のエピブラストからも多能性幹細胞が樹立された^{16,17}。この細胞はエピブラスト幹細胞 (Epiblast stem cell: EpiSC) と命名され、異所性移植による奇形腫形成において三胚葉分化を示す。しかし、EpiSC を胚盤胞へ注入してもほとんどキメラ個体を形成することはできない。また、EpiSC の多能性維持は LIF には依存せず、アクチビンおよび basic FGF (basic fibroblast growth factor: bFGF) に依存する。しかしながら、これらの因子がどのようにネットワークを構築して多能性維持に関わっているかは解明されていない。

EpiSC は、Oct4 や Nanog、Sox2 といった多能性維持に関わる因子を発現するものの、naïve 型であるマウス ESC とは遺伝子発現プロファイルが異なり、Lefty1、Fgf5 などの特異的な遺伝子発現を示す。また、雌性の EpiSC では 1 本の X 染色体の不活性化が起こっている。これらの形質が着床後胚のエピブラストの特徴を反映したものであったことから、naïve 型多能性状態に比し、primed 型 (primed pluripotent state) と定義された¹⁵。また、培養・維持されている EpiSC は単層のコロニー形態を示す。

2-3. 動物種によって異なる多能性幹細胞の性質

このように naïve 型と primed 型は、遺伝子発現の特性やその多能性状態を維持するためのシグナル経路の違いによって明確に区別される。また、両者における決定的な違いは、反映する発生段階に起因するキメラ形成能の有無である。

現在、キメラ形成能を有する多能性幹細胞はマウスやラットといったげっ歯類においてしか樹立されていない。1998 年、胚盤胞からヒト ESC が樹立されたが¹⁸、その培養条件はマウス ESC とは異なり、アクチビンおよび bFGF を含むものであった。他の動物種から樹立された ESC も、その性質維持は LIF に非依存であった¹⁵。X 染色体の活性化状態や遺伝子発現プロファイルからも、げっ歯類以外の動物種の ESC はマウスの EpiSC に類似している。従って、ヒトを含

めた他の動物種の多能性幹細胞はキメラ形成能力がない primed 型と想定されており¹⁵、実際にげっ歯類以外の ESC からキメラ動物が形成されたとの報告はない。このように、げっ歯類とそれ以外の種では ESC の性質に明らかな違いが存在する。

3. naïve 型多能性幹細胞の実用性

実用性の面から重要な naïve 型多能性幹細胞の特性の一つは、高い相同組換え効率である。実際に、primed 型多能性幹細胞における相同組換えを用いた遺伝子ターゲティングは困難とされている。このことは、げっ歯類以外の動物で相同組換えを利用したノックアウト動物やトランスジェニック動物を用いた研究が遅れている理由の一つになっている。

また、naïve 型多能性幹細胞のキメラ形成能による遺伝子改変動物作成も重要である。すなわち、桑実胚や胚盤胞への注入といった簡便な操作によって、キメラ個体を經由して遺伝子組換え動物を作出できることである。ブタやウシ、マウスでは核移植による遺伝子改変動物作出も可能であるが、技術的な難易度は高い。

私の所属する研究グループは、臓器欠損動物胚に naïve 型多能性幹細胞を注入することで注入した細胞由来の臓器を丸ごと作製できる「胚盤胞補完法」を開発した¹⁹。本法によって患者の iPS 細胞から臓器が作り出せれば臓器移植における圧倒的なドナー不足が解消でき、さらに移植後も免疫抑制剤の必要のない理想的な再生医療となることが期待される。しかし、上述したように現行のヒト ES / iPS 細胞は primed 型でキメラ形成能力を持たないことが予想されるため、胚

盤胞補完をヒト臓器作製に応用するためにはnaïve型ヒト多能性幹細胞が必要である。

このような理由からげっ歯類以外の種におけるnaïve型多能性幹細胞の必要性は高く、世界的に盛んに研究されている分野である。

4. primed 型多能性幹細胞から naïve 型多能性幹細胞への変換

過去のマウスにおける研究から、primed 型多能性幹細胞である EpiSCs は ESC 様細胞 (reprogrammed epiblast to ES-cell-like cells: rESCs) と称される naïve 型多能性幹細胞へ変換できることがわかっている。Silva らは、naïve 型の ESCs で発現の高い Nanog や Klf4 を EpiSCs に過剰発現させることでその多能性状態が naïve 型に変化したことを報告した²⁰。一方、Gillich らは始原生殖細胞で特異的に発現している Prdm14 と Klf2 を同時に過剰発現させることで EpiSCs を ESCs と同等の性質を持つ細胞へ変換できることを報告した²¹。これらは EpiSC に特定の遺伝子を強制発現させることで高効率に naïve 型に変換するものであるが、遺伝子操作を必要としない naïve 型への変換も報告されている。EpiSCs を LIF 存在下で培養すると長期間の培養を経てマウス ESC 様の多能性幹細胞へと低頻度に移行するというものである²²。これは、EpiSCs が LIF-STAT3 シグナルの活性化によって rESCs への変換が起こることを示しているが、なぜ変換効率が低いのかは不明である。

5. 本研究の目的とアプローチ

本研究では、代表的な primed 型多能性幹細胞であるマウス EpiSCs からキメラ形成能を持つ naïve 型多能性幹細胞である rESC への効率的な変換を可能にする新しい誘導条件を探索し、多能性状態変換のメカニズムを解明することを目的とした。

上述したように、EpiSCs は LIF-STAT3 シグナルの活性化によって低頻度に naïve 型へ移行することが知られている。最近、E-cadherin が LIF 受容体に作用し、LIF-STAT3 シグナルを活性化させるという報告がされた²³。また、初期化因子 (Oct 3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を用いた iPS 細胞の作製過程において LIF を含んだ培養条件下で E-cadherin を過剰発現させると、体細胞から iPS 細胞への変換効率が上昇するという報告がされた²⁴。これらの知見から私は、E-cadherin は LIF-STAT3 シグナルを活性化させることでリプログラミングに寄与するのではないかと考えた。そこで、primed 型から naïve 型への変換過程において E-cadherin の過剰発現が優位に働くと推測し、研究を開始した。

本研究により、EpiSCs から rESC への高効率な変換が可能となれば primed 型から実用的な naïve 型多能性幹細胞作製のための新しい知見の提供に繋がることが期待される。

材料と方法

実験動物

C57BL/6、BDF1、ICR の各系統のマウスは日本 SLC (Shizuoka, Japan)より購入した。動物を用いた全ての実験は東京大学医科学研究所の実験動物安全委員会の規定に則って行った。

Doxycycline 依存性 E-cadherin 発現レンチウイルスベクターの作製

E-cadherin 誘導性レンチウイルスベクターは、Doxycycline 依存的に発現を誘導できるシステムを組み込んだ SIN(Self-inactivating)レンチウイルスベクター CS-TRE-PRE-Ubc-rtTA-I2G²⁵ を用いて作製した。PCR 反応で以下のプライマーセットを用いてマウス E-cadherin の cDNA を増幅させた。(下線部は付加した制限酵素サイトを示す)

Fw: 5'-CGTACGCCACCATGGGAGCCCGGTGCCGCAG-3'

Rv: 5'-GAATTCCTAGTCGTCCTCACCACCGC-3'

増幅した E-cadherin 配列をクローニングベクター PCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に挿入した。制限酵素サイト BsiWI – EcoRI で TOPO E-cadherin を CS-TRE-PRE-Ubc-rtTA-I2G に挿入し、CS-TRE-mouse

E-cadherin-PRE-Ubc-rtTA-I2G を作製した。

レンチウイルスの産生は既報の方法に従って行った^{25 26}。簡単に述べると、293T 細胞 (Clontech、Mountain View、CA、USA) に、理化学研究所バイオリソースセンター 三好浩之先生より供与頂いたパッケージングプラスミド (pCAG-HIVgp)、VSVG、Rev プラスミド (pCMV-VSV-G-RSV-Rev)、本研究で作製した SIN ベクタープラスミド (CS-TRE-mouse E-cadherin-PRE-Ubc-tTA-I2G) を、リン酸カルシウム法で導入した。48 時間培養し、ウイルス含有培養上清を回収した後、40,000 x g、20°C で 2 時間超遠心を行い濃縮した。上清を吸引除去し、沈殿物を PBS に懸濁した。

EB3DR EpiSC 株の樹立と多能性幹細胞の培養

DsRed で蛍光標識された EpiSC 株を樹立するため、理化学研究所発生・再生研究センター 丹羽仁史先生より供与頂いた CAG プロモーター下で DsRed を発現する ESC 株である EB3DR^{27,28} を胚盤胞へ注入し、着床後の卵筒胚 (E6.5) のエピブラストから既報の方法¹⁶に従って EpiSC 株を樹立した。簡単に述べると、子宮から E6.5 の卵筒胚を取り出し、胚体外外胚葉とエピブラストをピンセットで切り分け、エピブラストをマイトマイシン-C 処理を施したマウス胎仔繊維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblasts : MEFs) フィーダー上に播種した。未分化維持

のために、DMEM-F12 に 20% knock-out serum replacement、1mM sodium pyruvate、1 x non-essential amino acids、0.66mM 2-mercaptoethanol (全て Invitrogen)、用時調整で 5ng/ml の human basic FGF (bFGF: Peprotech、Rocky Hill、NJ、USA) を加えた培地 (以下 ESM + bFGF と称する) で培養した。EpiSC 樹立後、DsRed を発現している細胞を FACS (Fluorescence-activated cell sorting) によってクローニングし、単一細胞から EB3DR EpiSC 株を樹立した。

全てのマウスおよびラットの ESC 株は、0.1%ゼラチンコートしたディッシュ上に、1,000U/ml LIF (Millipore、Bedford、MA、USA) を含んだ N2B27 培地^{5,12}にて培養した。

本研究では、1 μ M PD0325901 (Axon、Groningen、The Netherlands)、3 μ M GSK-3 β CHIR99021 (Axon)、5nM ないしは 2 μ M IWP-2 (Wako)、10 μ M XAV939 (Sigma-Aldrich、S.Louis、MO、USA) を用いて、EpiSCs から ESC 様細胞への変換、及び naïve 型 ESC の性質維持における効果を検討した。

テトラプロイドレスキュー法による **Rex1-GFP EpiSC** 株の樹立

4 倍体胚の作製は、既報の方法²⁹に従って行われた。簡単に述べると、BDF1 マウスと C57BL/6 マウスを交配させ、臍栓がついた日を 0.5 dpc とし、1.5 dpc の卵管から 2 細胞期の胚を M2 培地 (Millipore) に回収した。これらの胚は 0.28M

mannitol (D-mannitol; Sigma-Aldrich)、0.15mM MgSO₄、0.01% polyvinylalcohol (Sigma-Aldrich) を含んだ培地で 1 分間平衡化し、fusion チャンバーに移行させた。パルス発生装置 (ECM 2001 Electro Cell Manipulator; BTX, San Diego, CA, USA) を用いて電気刺激を行い (100 V for 30 μsec)、卵割球を融合させた。割球が融合され 4 倍体になった胚は、KSOM-AA 培地 (Millipore) で 24 時間培養し、桑実胚期まで発生させた。マイクロマニピュレーションのため、ケンブリッジ大学 ウェルカム・トラスト幹細胞研究センター Austin Smith 教授より供与頂いた Rex1-GFP ESC を 0.05% トリプシン/EDTA (Invitrogen) 処理によりディッシュより剥がし、培地に懸濁した。ピエゾマイクロマニピュレーター (Prime Tech, Tokyo, Japan) を用いて顕微鏡下で胚の透明体に穴を開け、7 個の Rex1-GFP ESC を注入した。注入後、胚盤胞期まで一晩培養し、胚移植を行った。移植のレシピエントには精管結紮雄マウスとの交配後 2.5 日目の ICR 系統の雌マウスを用いた。着床後のエピブラスト胚 (E6.5) から上述の方法で Rex1-GFP EpiSC 株を樹立した。

本研究で用いた EpiSC 株と ESC 株

本研究では、primed 型の EpiSC として、上述の方法によって得られた CAG プロモーター下で DsRed を発現する EB3DR EpiSC 株、naïve 型で特異的に発現する Rex1 遺伝子座に GFP がノックインされた Rex1-GFP EpiSC 株、そして広く

EpiSC 株として認知されている Tesar らによって樹立された EpiSC 株¹⁶を標準株として用いた。また naïve 型多能性幹細胞株として、マウス ESC である EB3DR 株、Rex1-GFP 株、ラット ESC である BLK-RT2³⁰ 株を用いて実験を行った。

キメラ形成のための胚操作

キメラ形成評価のためのマウス胚操作は既報の方法¹⁹に従って行った。まず BDF1 と C57BL/6 マウスを交配させ、2.5 dpc の卵管および子宮から 8-cell 期 / 桑実胚期の胚を M2 培地 (Millipore) に回収した。回収した胚は KSOM-AA 培地 (Millipore) に移し、5%CO₂、37°C で一晩培養した。マイクロマニピュレーションのため、各細胞は 0.05% トリプシン / EDTA (Invitrogen) 処理によりディッシュより剥がし、各々の培地に懸濁した。ピエゾマイクロマニピュレーター (Prime Tech) を用いて顕微鏡下で胚の透明体に穴を開け、10 個の細胞を注入した。注入後、1 時間培養し、胚移植を行った。移植のレシピエントには精管結紮雄マウスとの交配後 2.5 日目の ICR 系統の雌マウスを用いた。

キメラの判定は、胎仔や新生仔の蛍光観察 (胚盤胞へ注入した細胞の蛍光標識) や成体の毛色で行った。

Flow-cytometry での解析

フローサイトメーターでの解析のため、細胞は Accutase (Innovative cell technologies, San Diego, CA, USA) によって解離し、剥がして懸濁した。これらを APC 標識 抗マウス CD31 抗体 (BD Biosciences, San Diego, CA)、APC 標識 CD324 (E-cadherin) 抗体 (BD Biosciences) を用いて染色した。解析と分取は FACSCalibur (BD Biosciences) と FACS Aria II (BD Biosciences) を用いて行った。

ウエスタンブロット法によるタンパク質発現解析

溶解バッファー complete Lysis-M, EDTA-free (Roche, Mannheim, Germany) を用いて細胞全体のライセートを作製した。核分画、細胞質分画の分離には Nuclear / Cytosol Fractionation Kit (Bio Vision, Mountain View, CA, USA) を用いてライセートの作製を行った。遠心後、SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を行うため、ライセートを Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に希釈した。SDS-PAGE によって分離されたライセートは、PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン (Millipore) に転写後、スキムミルク溶液でブロッキングを行い、1 次抗体反応を 1 時間行った。続いて、horseradish peroxidase 標識 2 次抗体 (GE Healthcare UK, Little Chalfont, UK) を用いて 30 分間反応させた。タンパクの検出には SuperSignal West Pico Chemiluminescent

Substrate (Thermo, Rockford, IL, USA) を用いた。1 次抗体は、抗 β -catenin (1:1000)、non-phospho (active) β -catenin (1:1000)、E-cadherin (1:1000)、Stat3 (1:2000)、p-Stat3 (1:2000)、 β -actin (1:1000)、histone H3 (1:2000) を使用した (全て Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)。タンパク発現レベルの解析と定量には、LAS 4000 equipment (GE Healthcare) および ImageQuant TL software (GE Healthcare) を用いた。ローディング・コントロールのシグナル強度と β -catenin のシグナル強度の比によって、 β -catenin タンパク発現の相対値を算出した。

アルカリフォスファターゼ染色

10%中性緩衝ホルマリン液で細胞を固定後、1-Step NBT/BCIP (Thermo) を用いてアルカリフォスファターゼ染色を行った。

不活性 X 染色体の免疫染色

細胞を 4%パラホルムアルデヒド液で固定後、Permeabilization 溶液 (0.1% Triton X-100 in PBS) を加え 10 分間静置し、4% goat serum で 30 分間ブロッキングした。1 次抗体として抗-H3K27me3 抗体 (1:200 dilution; Abcam, Cambridge, UK) を加え、1 時間反応させた。2 次抗体には Alexa488 標識 抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を用いて遮光して 1 時間反応させた。細胞核を DAPI

で1分間染色した後、蛍光顕微鏡にて観察した。

RT-PCR と定量 PCR による遺伝子発現解析

cDNA は、RNAeasy kit (Qiagen、Valencia、CA、USA) を用いて抽出した RNA より、SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて調整した。RT-PCR は rTaq (Takara Bio、Otsu、Japan) を用いて、サイクル設定は 94°C30 秒、55°C30 秒、72°C60 秒の 30 cycles 行った。用いたプライマーは表 2 に示した。多能性遺伝子発現プロファイルの解析は、TaqMan Mouse Stem Cell Pluripotency Array v2.0 (Applied Biosystems、Foster City、CA、USA) を用いて定量リアルタイム PCR によって行った。

TOPFlash 解析法による TCF / LEF 活性の測定

TCF / LEF 転写活性は TOPFlash 法によって検出した。Neon 遺伝子導入システム (Invitrogen) を用いて、M50 Super 8x TOPFlash プラスミド (Addgene plasmid 12456; Addgene、Cambridge、MA、USA) または M51 Super 8x FOPFlash プラスミド (Addgene plasmid 12457; Addgene) を Renilla 発現ベクター (pRL-TK Vector; Promega、Madison、WI、USA) と同時に細胞に導入した。ルシフェラーゼ発光の測定は遺伝子導入して 2 日後に Dual-Glo Luciferase Assay System

(Promega) を用いて行った。ルシフェラーゼ活性は、Firefly (FOPFlash) : Renilla と Firefly (TOPFlash) : Renilla の発光比で算出した。

統計解析

解析結果は平均値±標準誤差 (SEM) で表した。有意差検定には Student's two-tailed non-paired t-test を用いた。本稿の図で示している結果は、独立実験を最低3回以上行ったうちの代表例を示している。

結果

1. E-cadherin 過剰発現による EpiSCs の多能性状態変化

1.1 Doxycycline 依存型 E-cadherin 過剰発現 EpiSC の樹立

E-cadherin の発現上昇と LIF による刺激の組み合わせが primed 型多能性幹細胞から naïve 型への変換を促進するのではないかという仮説を確かめるため、マウス EpiSC における E-cadherin 発現上昇の効果を LIF の有無で比較検討した。

細胞のキメラ形成能を評価する際、マウス EpiSC 由来の細胞と移植するホスト胚由来の細胞を区別するため蛍光タンパク質等で標識が施された EpiSC が必要である。そこでまず私は、DsRed を恒常的に発現する EB3 ESC (EB3DR ESC)^{27,28} から EpiSCs を樹立し株化した (EB3DR EpiSC line; 樹立方法は材料と方法を参照)。EB3DR EpiSCs およびそれに由来する細胞は恒常的に DsRed を発現するが、胚盤胞へ注入したところ、DsRed を発現するキメラ胚は得られなかった (表 1)。

次に、E-cadherin を過剰発現させるため、Doxycycline (Dox) 依存的に E-cadherin の発現を誘導できるシステムを組み込んだレンチウイルスベクターを作製した (図 1-1A)。本ベクターは、ユビキチン-C (Ubc) プロモーター下で

rtTA (reverse tetracycline-controlled transactivator)と EGFP (green fluorescent protein) が IRES 配列を介して共に発現するシステムである²⁵。従って、ベクター配列がゲノムに導入された細胞は恒常的に EGFP 蛍光を示す。このレンチウイルスベクターを EB3DR EpiSC 株に感染させ、FACS によって EGFP を発現する細胞を分離し、E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を樹立した。この細胞が Dox 依存的に E-cadherin の発現を誘導できることをウエスタンブロットとフローサイトメーターによって確認した。EB3DR ESCs、EB3DR EpiSCs、そして E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox 添加 (Dox(+))、無添加 (Dox(-)) 条件下で 2 日間培養してウエスタンブロットで解析した。その結果、EB3DR EpiSCs や Dox 無添加のコントロールと比較し、Dox の添加によって E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs の E-cadherin タンパクの発現量上昇が確認された (図 1-1B)。同様の細胞を E-cadherin 抗体によって染色しフローサイトメーターで解析したところ、Dox 添加による E-cadherin 発現レベルの上昇が確認された (図 1-1C)。

1.2 様々な培養条件下での EpiSCs における E-cadherin 過剰発現効果

次に、naïve 型への変換過程における E-cadherin 発現上昇の効果を調べるために、様々な培養条件下で EpiSCs から rESCs への変換を試みた。すなわち、bFGF を含んだ primed 型培養条件 (ESM + bFGF) または LIF と MEK 阻害剤

(PD0325901; 以下 PD と称する) 及び GSK-3 β 阻害剤 (CHIR99021; 以下 CHIR と称する)を含んだ naïve 型培養条件 (N2B27 + LIF) で、それぞれ Dox 添加群と非添加群で比較検討した (図 1-2A)。naïve 型への移行は、細胞表面マーカーである Pecam1 (CD31) の発現を指標としてフローサイトメーターで解析した。各々の培養条件で 7 日間培養した結果、LIF を含んだ naïve 型の培養条件下で E-cadherin を過剰発現させた EpiSCs の約 40%が CD31 陽性の細胞へ変化した (図 1-2B)。LIF 存在下で E-cadherin を過剰発現している EpiSCs においては、他の培養条件と比較して CD31 を発現している細胞の頻度が有意に上昇した (図 1-2C、1-2D)。検討した四条件の中では、LIF による刺激と E-cadherin の過剰発現の組み合わせが最も効率的に EpiSCs を naïve 型マーカー陽性の細胞に変化させることが示された。

1.3 E-cad-rESC のキメラ形成能の評価

LIF 存在下で E-cadherin を過剰発現させることにより得られた CD31 陽性の細胞は、マウス ESC に類似したドーム状のコンパクトなコロニー形態を示した (図 1-3A)。本研究ではこの細胞を、E-cadherin overexpressed rESC (E-cad-rESC) と命名した。

E-cad-rESC が naïve 型の重要な指標であるキメラ形成能を有するかを評価する

ため、胚盤胞に注入し、偽妊娠マウスに移植した。その結果、DsRed を発現する新生仔が得られた(図 1-3B)。また、BDF1 x C57BL/6 マウスの胚盤胞 (コートカラー : black) に EB3DR EpiSC (コートカラー : agouti) 由来の E-cad-rESCs を注入することにより、成熟したマウスのコートカラーから E-cad-rESCs のキメラへの寄与が確認された (図 1-3C、表 1)。以上から、E-cad-rESCs はキメラ形成能を有することが示された。

1.4 EpiSCs のリプログラミングによる X 染色体の再活性化

2007 年、Tesar らによって初めて報告された EpiSC 株は¹⁶、世界で広く標準株として認識されている (以下、標準 EpiSC)。この標準 EpiSC 株を用いて E-cadherin の過剰発現が同様の効果をもたらすかを検討した。フィーダー細胞である Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) と区別するため、標準 EpiSCs に CAG プロモーター下で tdTomato を発現するレンチウイルスベクターを感染させた。この細胞に Doxycycline 依存性 E-cadherin 発現レンチウイルスベクターを感染させ、E-cadherin 誘導性-標準 EpiSCs を樹立した。この細胞を 2 日間培養し、E-cadherin のタンパク発現量をウェスタンブロットで解析した結果、Dox の添加によって E-cadherin タンパクの発現上昇が確認された (図 1-4A)。この細胞を、LIF と PD 及び CHIR を含んだ培養条件下で Dox の添加、非添加の両条件で 7 日間培養し、

CD31 の発現をフローサイトメーターで解析した。その結果、Dox の添加によって CD31 陽性細胞への変換効率が有意に上昇した (図 1-4B、1-4C)。標準 EpiSC 株は雌性の細胞であることから、X 染色体の活性化状態によっても naïve 型に変換されたか否かを判断することができる。そこで、E-cadherin の過剰発現によって CD31 陽性となった細胞を FACS で分離し、X 染色体の不活性化状態 (X-chromosome inactivation: XCI) を評価した。ヒストン H3 の 27 番リジンのトリメチル化 (H3K27me3) に対する抗体によって XCI を評価した。その結果、通常の標準 EpiSCs では核内において XCI を示す H3K27me3 抗体によるスポット状の強い染色が認められたが、E-cad-rESC s ではそのような染色が認められなかった (図 1-4D)。このことは、CD31 陽性へ変換された細胞は X 染色体が再活性化したことを示唆している。これらの結果から、EB3DR EpiSC と同様に、標準 EpiSC 株においても E-cadherin の過剰発現と LIF 刺激の組み合わせが naïve 型への変換を促進することが明らかになった。

以上の結果から、LIF 存在下の培養条件で人為的に E-cadherin を過剰発現させると、EpiSCs が ESC 様細胞へ効率的に変換することが示された。

2. β -catenin の核局在制御による EpiSCs の多能性状態変化

2.1 E-cadherin の過剰発現による細胞内シグナル経路への影響

前述のように、マウス ESC において E-cadherin は LIF 受容体に結合し、LIF シグナルの活性化に関与していると報告された²³。従って、EpiSC での E-cadherin 過剰発現によって LIF-STAT3 シグナルが活性化することを確認するため、リン酸化型 Stat3 (phospho-Stat3: p-Stat3) のタンパク発現量をウェスタンブロットで定量した。E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox の添加と非添加の両条件で 2 日間培養した結果、LIF を含んだ培養条件下において Dox の添加により p-Stat3 が増加することが確認された(図 2-1A)。

一方で、E-cadherin は細胞内でカドヘリン関連タンパクである β -catenin と特異的に結合し、 β -catenin の核内移行を制御することが知られている³¹⁻³³。通常、 β -catenin は細胞質内で GSK-3 β によってリン酸化され分解されるが、リン酸化されずに安定して蓄積された β -catenin は核内へ移行し、標的遺伝子の活性を制御することが知られている⁸⁻¹⁰。つまり、E-cadherin 過剰発現は β -catenin の核内移行を抑制することで、 β -catenin シグナルに抑制的に働いている可能性が考えられた。そこで、E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox 添加 (Dox(+))、無添加 (Dox(-)) の両条件で 2 日間培養し、細胞質分画および核分画における β -catenin

とリン酸化を受けていない活性型 β -catenin (non-phosphorylated β -catenin: active β -catenin) のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した。その結果、Dox 添加による E-cadherin の過剰発現によって核分画の β -catenin および活性型 β -catenin のタンパク量が通常の EB3DR EpiSCs や Dox 無添加群と比較して減少していることがわかった (図 2-1B)。つまり、EpiSCs においても E-cadherin の過剰発現は β -catenin の核内移行を抑制することが示された。

2.2 Wnt シグナル阻害剤 IWP-2 による EpiSCs のリプログラミング効果

ここまでの結果から、E-cadherin の過剰発現によって EpiSCs における LIF-STAT3 シグナルが活性化され、さらに β -catenin の核内移行が抑制されることが明らかとなった。では、E-cadherin 過剰発現による EpiSCs から rESC への変換促進は、LIF-STAT3 シグナルの活性と β -catenin シグナルの抑制のどちらが主な要因となっているのだろうか。この疑問に答えるため、 β -catenin の蓄積を阻害する低分子化合物に着目した。Wnt 阻害剤として知られている IWP-2 は、膜結合型アシル基転移酵素である Porcupine による Wnt タンパク質のパルミチル化を抑制することで、Wnt シグナルの活性を抑制し β -catenin の蓄積を阻害する低分子化合物である³⁴。ウエスタンブロットの結果、E-cadherin を過剰発現させた場合と同様に、IWP-2 の添加によって EpiSCs の β -catenin の核内移行が抑制さ

れた (図 2-2A)。そこで rESCs への変換効率への IWP-2 の効果を検証した。前述のように、naïve 型多能性状態の維持に広く用いられている 2i のうち、CHIR は β -catenin の核内移行を促進させる効果を有するため、IWP-2 との対照区として用いた。もうひとつの対照区として各低分子化合物の溶媒である Dimethyl sulfoxide (DMSO) を添加した群を用意した (図 2-2B)。細胞のコロニー形態を観察したところ、培養 7 日目で IWP-2 添加群においてドーム状のコンパクトなコロニーが認められた。培養 14 日目に naïve 型多能性幹細胞様のコロニー数をカウントしたところ、IWP-2 添加群において出現頻度が対照区と比較して有意に上昇した (図 2-2C)。次に、Pecam1 の発現をフローサイトメーターで解析したところ、IWP-2 の添加によって EB3DR EpiSCs が 7 日間で Pecam1 陽性細胞へ変換され、その変換効率はコントロールと比較して有意に高かった (図 2-2D、2-2E)。これらの結果から、EB3DR EpiSC は IWP-2 処理によって、E-cadherin 過剰発現と同様に、短期間で高効率に naïve 型への変換を促進できることが示された。

2.3 wit-rESCs のキメラ形成能の評価

EpiSCs から IWP-2 で誘導された Pecam1 陽性の細胞は、マウス ESC 様のコロニー形態を示した (図 2-3A)。本研究ではこの細胞を Wnt inhibitor-treated rESCs (wit-rESCs) と命名した。

wit-rESCs が真の naïve 型多能性幹細胞であるかを確かめるために、キメラ形成能を評価した。wit-rESC を胚盤胞へ注入し、E12.5 で胎仔解析を行ったところ、DsRed を発現する胎仔が得られた (図 2-3B)。また、新生仔や成熟したマウスのコートカラーで wit-rESCs のキメラへの寄与を確認することができた (図 2-3C、2-3D)。さらに、この wit-rESCs から作製されたキメラマウスを交配させ次世代のマウスを作製した結果、生殖系譜への寄与が確認できた (図 2-3E)。

2.4 リプログラミングによる naïve 型マーカー Rex1 の発現定量

Rex1 (Zfp42) は、マウスにおいて naïve 型と primed 型を区別する際によく用いられる naïve 型多能性状態のマーカー遺伝子であり、着床前胚や ESC において高発現しているが、着床後胚やマウス EpiSC では急速に発現を失うことが知られている^{35,36}。そこで、Rex1 遺伝座に GFP をノックインしたレポーターESC 株である Rex1GFPd2¹³ から EpiSC を樹立し、IWP-2 による EpiSCs のリプログラミング促進効果の再現性と naïve 型変換のより詳細なマーカーの評価を試みた。まず、Rex1GFPd2 細胞を 4 倍体 (4N) 胚に注入し、E6.5 の円筒胚から Rex1-GFP EpiSC 株を樹立した (図 2-4A)。4 倍体胚が胚体外組織にしか寄与できないことを利用し、4 倍体胚に高品質な naïve 型の多能性幹細胞を注入することで胚体が全て注入した細胞由来の個体を作製することができる²⁹。こうして樹立された

Rex1-GFP EpiSCs は、GFP を発現しておらず、primed 型であることが確認された (図 2-4B、2-4C)。この Rex1-GFP EpiSCs を用いて naïve 型への変換における IWP-2 の効果を検討した。その結果、LIF 存在下で培養後 7 日目の段階で、IWP-2 添加群は対照群より GFP、Pecam1 染色両陽性細胞の割合が有意に上昇した (図 2-4D、2-4E)。また、Pecam1 または GFP いずれかを発現する細胞がほとんど存在しなかったことから、これまで指標としてきた Pecam1 発現が naïve 型への変換の指標として適切であることが確認された。

2.5 Wnt シグナル阻害剤 XAV939 による EpiSCs のリプログラミング効果

β -catenin の核内移行抑制による EpiSCs のリプログラミング促進効果を再検証するため、IWP-2 以外の Wnt / β -catenin シグナル阻害剤として知られている XAV939 を用いて実験を行った。XAV939 は、細胞質内で axin タンパクを安定化させ β -catenin の分解を刺激して核内移行を抑制する低分子化合物である³⁷。EB3DR EpiSCs を LIF、XAV939 を添加した培養条件下で 7 日間培養したところ、IWP-2 添加群と同様に ESC 様のコロニーが出現した (図 2-5A)。次に Pecam1 の発現をフローサイトメーターで解析したところ、やはり IWP-2 添加群と同様に XAV939 添加群は対照群より著しく Pecam1 陽性細胞への変換が起こっていた (図 2-5B)。さらに、この Pecam1 発現細胞を胚盤胞へ注入してキメラ形成能を評価した結果、

DsRed を発現するキメラ新生仔を得ることができた (図 2-5C)。作用点が異なる β -catenin の核内移行阻害剤である IWP-2 と XAV939 が同様の結果を示したことから、EpiSC から ESC 様細胞への変換には β -catenin の核内移行阻害が優位に働くことが強く示唆された。

3. 遺伝子発現による naïve 型の評価

EpiSCs 由来の E-cad-rESC および wit-rESC が naïve 型多能性幹細胞の遺伝子発現プロファイルを示すことを確認するために逆転写 PCR および定量 PCR を用いて解析した。逆転写 PCR の結果、naïve 型特異的な多能性因子である *Stella*、*Rex1* の発現が E-cad-rESC および wit-rESC の全ての細胞株で確認された (図 3A)。定量 PCR の結果、ESC と同様、E-cad-rESC および wit-rESC では naïve 型特異的な因子である *Pecam1*、*Rex1*、*Kit* (*c-kit*)、*Lifr* の高い発現が確認されたが (図 3C)、primed 型のマーカー遺伝子である *Lefty1*、*Fgf5* の発現は低いことがわかった (図 3B)。また、主要な多能性関連因子である *Nanog*、*Sox2* の発現が EpiSCs と比較して上昇していることも確認できた (図 3C)。以上から、E-cad-rESC、wit-rESC の遺伝子発現プロファイルが ESC と類似し、EpiSCs とは異なることが示された。

4. TCF / LEF 活性への影響

通常、核内へ移行した β -catenin は、T-cell factor (TCF) と Lymphoid enhancer-binding factor (LEF) ファミリーに属する転写因子と協調して標的遺伝子の活性を制御することが知られている^{8,9}。そこで、E-cadherin の過剰発現や Wnt シグナル阻害剤が EpiSCs の TCF / LEF の転写活性に影響を与えているかをルシフェラーゼレポーターによる TOPFlash 解析法³⁸を用いて検討した。TOPFlash は TCF / LEF 結合領域の下流にルシフェラーゼを有するレポータープラスミドであり、TCF / LEF による転写活性をルシフェラーゼ活性として検出できるシステムである。

まず、TCF / LEF レポータープラスミドベクターを EB3DR EpiSCs および E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs に導入し Dox の添加、無添加の両条件で 2 日間培養後、TOPFlash 解析を行った。その結果、Dox の有無に関わらず E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs と通常の EB3DR EpiSCs の間でルシフェラーゼ活性に有意な変化は認められなかった (図 4A)。次に、TCF / LEF レポータープラスミドベクターを導入した EB3DR EpiSCs を CHIR、IWP-2, XAV939 をそれぞれ添加した培地で 2 日間培養し、TOPFlash 解析を行った。その結果、 β -catenin の核内移行を促進する CHIR で処理した EpiSCs は他の条件と比較してルシフェラーゼ

活性の有意な上昇を示したが、 β -catenin の核内移行を阻害する IWP-2, XAV939 で処理した EpiSCs のルシフェラーゼ活性に有意な変化は認められなかった (図 4B)。これらの結果は、E-cadherin の過剰発現や Wnt 阻害剤によって EpiSCs における β -catenin の核内移行が抑制されているにも関わらず (図 2-1B, 図 2-2A)、TCF / LEF 活性は影響を受けないことを示している。

Primed 型多能性状態にある EpiSC では TCF / LEF 活性が既に低いために、核内の β -catenin 量が減少しても TCF / LEF 活性として検出できなかった可能性を考え、マウス ESC について同様の TOPFlash 解析を行った (図 4C)。しかし、マウス ESC においても CHIR 処理群ではルシフェラーゼ活性は上昇するものの、IWP-2、XAV939 処理群ではルシフェラーゼ活性の変化は認められなかった。

以上から、E-cadherin 過剰発現および IWP-2 または XAV939 処理による rESC への変換促進作用は TCF / LEF 以外の機構によることが示唆された。

5. Wnt 阻害剤存在下での naïve 型マウス ESC の多能性維持

これまでの結果は、 β -catenin の核内移行の抑制が EpiSCs から rESC_s への変換を促進させることを示唆している。一方で、 β -catenin を分解する GSK-3 β の阻害剤である CHIR は、naïve 型マウス ESC_s の性質維持に有用であると考えられている¹²。そこで、マウス ESC_s の多能性維持に β -catenin シグナルが必要であるかを検証した。0.1%ゼラチンコートした培養プレートにフィーダー細胞なしの条件で、EB3DR ESC_s を LIF と PD を含んだ培地に CHIR ないしは IWP-2 を加え、コントロール (DMSO 添加) と比較した。EB3DR ESC_s における IWP-2 の効果を確認するため培養 2 日目にウエスタンブロットで β -catenin の核内局在を調べたところ、IWP-2 の添加により β -catenin および活性型 β -catenin の核内移行が抑制されていることがわかった (図 5-1A)。各条件下で 2 週間培養を続けたのち、多能性状態を検証した。アルカリフォスファターゼ染色を行ったところ、全ての培養条件下で ESC のコロニーが未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を示した (図 5-1B)。次に、多能性関連因子の発現を定量 PCR で調べた結果、IWP-2 処理した EB3DR ESC_s の Nanog や Sox2、naïve 型特異的因子である Pecam1 や Rex1 の発現は CHIR 処理群やコントロール群と比較して同等レベルであった (図 5-1C)。さらに、IWP-2 で処理された EB3DR ESC_s は、胚盤胞

に注入後キメラを形成した (図 5-1D、表 1)。

次に、Rex1-GFP ESC を用いて同様の実験を行った。Rex1-GFP ESC を LIF と PD を含んだ条件下で CHIR、IWP-2、XAV939 をそれぞれ加え、コントロールと比較した。各条件下で 2 週間培養した結果、全ての培養条件下の ESC は GFP 陽性であった (図 5-2A)。これは、Wnt 阻害剤である IWP-2 や XAV939 を添加した条件でも naïve 型多能性状態のマーカである Rex1 の発現が維持されたことを示している。さらに、IWP-2 処理と同様に XAV939 で処理された EB3DR ESCs もキメラ形成能を保持していた (図 5-2B、表 1)。

以上から、マウス ESC の naïve 型多能性状態維持に β -catenin の核局在は必ずしも必要ではないことが示唆された。

6. Wnt 阻害剤存在下におけるラット ESC の多能性維持と異種間キメラの作製

マウスの他にキメラ動物作製が可能な naïve 型多能性幹細胞が報告されているのは、ラットのみである。また、GSK-3 β の阻害剤である CHIR はラット ESC の多能性維持に必要であると考えられている^{39,40}。マウス ESC と同様に、IWP-2 または XAV939 存在下でもラット ESC の性質維持が可能かを検討した。

本研究室で樹立された Rosa26 遺伝子座に蛍光タンパクである tdTomato をノックインさせ恒常的に tdTomato を発現するラット ESC (BLK-RT2 ESC)³⁰を用いて、LIF と PD を含んだ条件下に CHIR、IWP-2、XAV939 をそれぞれ加え、DMSO 添加をコントロールとして MEF 上で培養して比較した。Wnt 阻害剤がラット ESC でも作用するかどうかを確かめるため培養 2 日目にウエスタンブロットで活性化型 β -catenin の核内局在を調べた結果、IWP-2 および XAV939 の添加により活性化型 β -catenin の核内移行が抑制されることがわかった (図 6A)。これらの条件で 2 週間培養した結果、全ての培養条件下でラット ESC のコロニーは未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を示した (図 6B)。次に、マウスとラットの異種間キメラの作製¹⁹を試みた。Wnt 阻害剤で処理したラット BLK-RT2 ESCs (コートカラー : black) を ICR マウスの胚盤胞 (コートカラー : white) へ注入し偽妊娠マウスの子宮へ移植した (図 6C)。発生過程の胎仔 (E13.5) を解析し

た結果、蛍光顕微鏡によって tdTomato の発現が確認された (図 6D)。さらに、
出産後のコートカラーにより Wnt 阻害剤で処理したラット BLK-RT2 ESCs (コ
ートカラー : black) の異種間キメラへの寄与が確認された (図 6E、表 1)。

以上から、マウス ESC と同様にラット ESC の naïve 型多能性状態の維持に
 β -catenin の核局在が必ずしも必要ではないことが示唆された。

考察

1. EpiSC から ESC 様細胞への効率的誘導法

これまで、primed 型の EpiSCs から naïve 型の ESC 様細胞への変換は LIF-STAT3 シグナルに反応して起こることが知られていたが、変換効率は低く 20 日以上 of 長期間培養を必要とした²²。しかし、本研究では、LIF を含む naïve 型の培養条件下で EpiSCs に E-cadherin を過剰発現させると 7 日以内で著しく効率的に naïve 型多能性幹細胞へ変換できることを明らかにした。E-cadherin は、体細胞から iPS 細胞の作製を促進させる作用があることが知られている²⁴。これらのことから、E-cadherin はリプログラミング過程に優位に働くことが強く示唆された。さらに本研究は、EpiSCs における E-cadherin の過剰発現が LIF-STAT3 シグナルを増強させることを示した。マウス ESCs において、E-cadherin は LIF 受容体に結合することで LIF-STAT3 シグナルを活性化する作用があることが報告された²³。従って、EpiSCs においても同様の作用があると考えられる。近年、LIF-STAT3 シグナルの下流の主要な標的因子として Tfc2l1 が同定された⁴¹。この報告において、Tfc2l1 が EpiSCs を naïve 型へ変換させるための主要な役割を果たしていることが示されている。従って、E-cadherin の過剰発現によって LIF-STAT3 シグナルが刺激され、その下流の Tfc2l1 が活性化することで naïve 型への変換が促進

された可能性が考えられた。さらに本研究結果から、EpiSC の生得的な E-cadherin の発現レベルは株間によって異なることが示された。故に、EpiSCs にもともと備わっている E-cadherin の発現レベルに依存することなく、人為的な E-cadherin の過剰発現がリプログラミングの促進に作用していると考えられる。

また、本研究は、EpiSCs における E-cadherin の過剰発現が β -catenin の核内移行を抑制することも示した。実際に、LIF 存在下で Wnt 阻害剤を用いて β -catenin の核内移行を抑制したところ、EpiSC が ESC 様細胞へ効率的に変換された。この ESC 様細胞は、キメラ形成にみならず生殖系譜への寄与も確認できたことから、高品質な naïve 型多能性幹細胞であることが示された。すなわち、E-cadherin 過剰発現による naïve 型への変換促進効果は β -catenin の核内移行抑制に起因する可能性も考えられる。

本研究結果と一致して、LIF 非存在下では、Wnt 阻害剤によって β -catenin シグナルを抑制させても EpiSCs は naïve 型へ移行しないことが報告されている^{42,43}。このことから、LIF-STAT3 シグナルの活性化と β -catenin シグナルの不活性化の組み合わせが、naïve 型への変換効率向上のための重要な原因となっていると考えられる。このようにして私は、primed 型多能性幹細胞からキメラ形成能を有する naïve 型多能性幹細胞への効率的な変換を可能にする新しい培養条件を確立することに成功した。

本研究において、E-cadherin の過剰発現や Wnt 阻害剤の添加によって EpiSCs における β -catenin の核局在は阻害されたが、その下流と考えられる TCF / LEF を介した転写調節には影響がなかった。近年、Kim らは、 β -catenin の核内移行による TCF の活性化は EpiSCs の分化誘導を促進し、逆に β -catenin の核内移行抑制は TCF を介した転写調節に影響することなく EpiSCs の多能性維持に寄与すると報告した⁴²。これらの知見は、 β -catenin の核局在の阻害は必ずしもその下流にある TCF / LEF 活性に影響を与えるわけではないことを示唆している。従って本研究の結果から、EpiSC から ESC 様細胞への効率的な変換は、TCF / LEF 非依存的な β -catenin シグナルが要因である可能性が示唆された。

多能性状態変換の分子メカニズムに β -catenin の核局在抑制がどのように関与するのか、その解明が今後の課題である。

2. EpiSC における E-cadherin の過剰発現とキメラ形成

Ohtsuka らは、primed 型の培養条件下で EpiSCs に 2 日間 E-cadherin を過剰発現させると、primed 型の多能性状態を維持したまま (naïve 型に変換されることなく) EpiSCs が胚盤胞注入後に内部細胞塊に取込まれ、キメラマウスが作製できたと報告した⁴⁴。しかしながら、本研究では 2 日間 E-cadherin を過剰発現した EpiSCs を胚盤胞へ注入してもキメラを形成することはなかった (表 1)。その理

由として、二つの可能性が考えられた。一つは、培養条件の違いである。Ohtsukaらはフィーダー細胞なしの条件で bFGF およびアクチビンを含んだ培地で EpiSCs を維持したのに対し、本研究ではフィーダー細胞上で bFGF を含んだ培地で EpiSCs を維持した。異なる培養条件は EpiSCs の性質をわずかに変化させ、E-cadherin 過剰発現後のキメラ形成能に異なる結果を与えたのかも知れない。もう一つは、E-cadherin 過剰発現のために用いたベクターシステムの違いである。本研究では tet-on システムを組み込んだレンチウイルスベクターを使用した。Ohtsukaらは piggyBack transposon システムを使用した。Ohtsukaらの報告では、E-cadherin を過剰発現した EpiSCs における E-cadherin の発現レベルは naïve 型の ESCs とほぼ同等であった。それに対して本研究では、E-cadherin 誘導性 EpiSCs における E-cadherin の発現は ESCs とは異なるレベルであった (図 1-1B)。これらのことから、naïve 型の ESCs と同等レベルの E-cadherin の発現が EpiSCs の内部細胞塊への取込みを可能にすると考察された。

3. naïve 型多能性幹細胞の性質維持における β -catenin シグナルの必要性

β -catenin を分解する GSK-3 β の阻害剤 (CHIR) は、naïve 型マウス ESC の多能性維持に有用とされている¹²。また、Wnt シグナルがマウス ESC の多能性維持に寄与しているという報告もある¹¹。このような報告を基に、naïve 型 ESC の多

能性維持には Wnt / β -catenin シグナルが有用であると世界的に考えられている。

一方で、 β -catenin シグナルの標的遺伝子 *Esrrb* を欠損させても、LIF 存在下でマウス ESC は多能性が維持可能であるということが報告された¹⁴。また、マウス ESC の自己複製に β -catenin は必要ではないという報告がなされた⁴⁵。さらに、Porcupine (Wnt タンパクの分泌に必要な膜結合型アシル基転移酵素) を仲介する Wnt シグナルはマウス ESC の多能性維持に必須ではないという報告もある⁴⁶。これらの知見と一致して、本研究は LIF 存在下で β -catenin の核局在を阻害した場合でもマウス ESC の naïve 型多能性状態の維持は可能であることを示した。

マウス ESC のみならずラット ESC もキメラ動物作製可能な naïve 型の多能性幹細胞であり、CHIR はラット ESC の性質維持にも有用であると考えられている^{39,40}。しかし、本研究では、LIF 存在下で β -catenin の核局在を抑制したラット ESC でも異種間キメラの作製が可能であることを示した。

上述したように、STAT3 の標的である *Tfcp2l1* は、多能性維持に必要な遺伝子ネットワークを構築する最も重要な因子であり、*Tfcp2l1* の活性化は naïve 型 ESC の多能性維持に必要十分であると考えられている⁴¹。故に、LIF-STAT3 シグナルが活性化していれば、 β -catenin シグナルは必ずしも naïve 型多能性状態の維持に必要ではないと考えられる。

naïve 型多能性幹細胞の性質維持における β -catenin シグナルの正確な役割につ

いては議論の余地が残されているものの、本研究結果はキメラ形成に必要な多能性制御機構を理解するうえで重要な知見になり得る。

4. 本研究の意義 今後の発展の方向性

これまで、EpiSCs から naïve 型 ESC 様細胞への効率的変換には、特定の遺伝子導入が用いられてきた^{20,21}。しかし、外来性遺伝子のゲノムへの挿入は挿入部位による遺伝子変異や腫瘍形成能等のリスクを上昇させる恐れがある。従って、本研究で得られた遺伝子導入を必要としない効率的な naïve 型への変換法は、得られた naïve 型多能性幹細胞を動物作製や細胞治療などに用いる場合により望ましい手法である。また、LIF-STAT3 シグナルの活性と β -catenin シグナルの抑制が primed 型から naïve 型への多能性状態変換に有用に働き、LIF 存在下で β -catenin シグナルを抑制させても naïve 型多能性状態を維持できるという知見を見出した本研究成果は、naïve 型多能性制御機構の解明に資する新しい知見に繋がるかも知れない。

最近、特定の遺伝子操作や培養条件を調節することによってヒトの多能性幹細胞を naïve 型様に変換できたという報告が相次いでいる⁴⁷⁻⁵²。これらの報告は何れも Wnt / β -catenin シグナルを活性させる培養条件が用いられているが、その優位性については不明である。実際に、ごく最近 Theunissen らによって報告

された変換法は、GSK-3 β 阻害剤 CHIR の濃度が低い方が効果的であるとされている⁵¹。従って、ヒト naïve 型多能性幹細胞樹立における β -catenin シグナルの役割を再評価する必要があると考えられる。

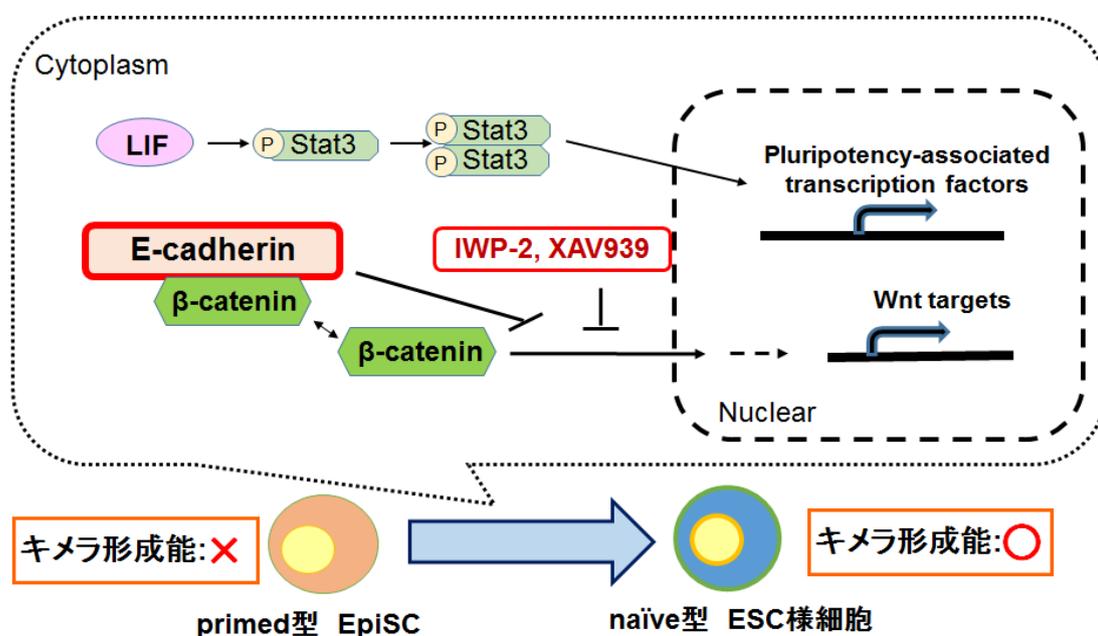
ヒトの多能性幹細胞は倫理的な問題からキメラ動物を作製することができず、真の（キメラ形成が可能な）naïve 型多能性状態を評価することは難しい。しかし、ヒトの多能性幹細胞と酷似していることが知られているマーマセツト⁵³ やアカゲザル⁵⁴、カニクイザル⁵⁵ といったその他の霊長類の多能性幹細胞でも未だ胚盤胞注入によるキメラ動物は作製できていない。故に、これらの多能性幹細胞をキメラ形成可能な真の naïve 型へ変換させるための技術開発が今後望まれる。

本研究から得られた知見を応用して他の動物種でキメラ形成能を持つ naïve 型多能性幹細胞の樹立が可能となれば、ノックアウト動物やトランスジェニック動物の作製が可能となり、遺伝子改変動物を用いた研究の発展に繋がる。また、naïve 型多能性幹細胞の作製技術の向上が、胚盤胞補完法による臓器再生実現に貢献することを期待したい。

結論

本研究によって、LIF の添加と E-cadherin 過剰発現の組み合わせが EpiSC から ESC 様細胞への変換効率を劇的に向上させることが証明された。さらに、その結果引き起こされる LIF-STAT3 シグナルの活性と β -catenin の核内移行の抑制が変換効率向上の要因であることが明らかとなった。また、LIF-STAT3 シグナルの活性下では、 β -catenin シグナルが naïve 型多能性幹細胞の維持に必ずしも必要でないことを示した。

primed 型から naïve 型へのリプログラミングを制御する新しい知見を見出した
本研究成果は、多能性制御機構の理解の提供に繋がる。



本研究で示されたキメラ形成を可能にするための効率的な多能性状態変換法

図・表

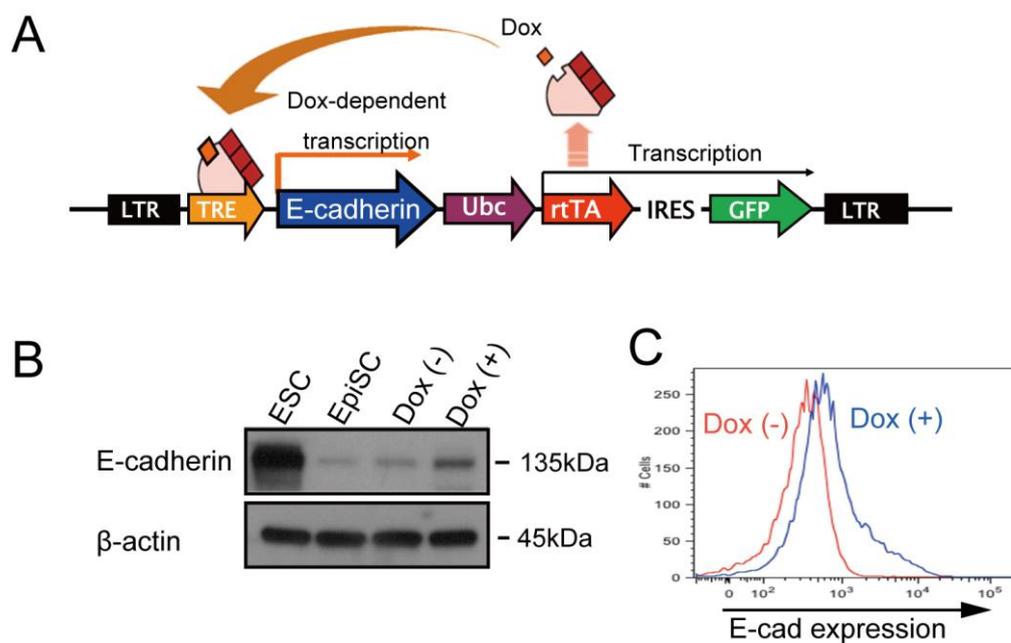


図 1-1. E-cadherin 過剰発現 EB3DR EpiSCs の樹立

- (A) レンチウイルスベクターの構造。ウイルスの感染により Doxycycline (Dox) 依存的に E-cadherin を発現する (tet-on システム)。rtTA の発現を Ubc プロモーター下で、E-cadherin の発現を TRE プロモーター下で行った。
- (B) EB3DR ESCs、EB3DR EpiSCs および E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+))と無添加(Dox(-)) 群で2日間培養し E-cadherin のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した結果。 β -actin はローディング・コントロールとして用いた。
- (C) E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+): 青のライン)と無添加 (Dox(-): 赤のライン) 群で2日間培養し E-cadherin の表面マーカーをフローサイトメーターで解析した結果。

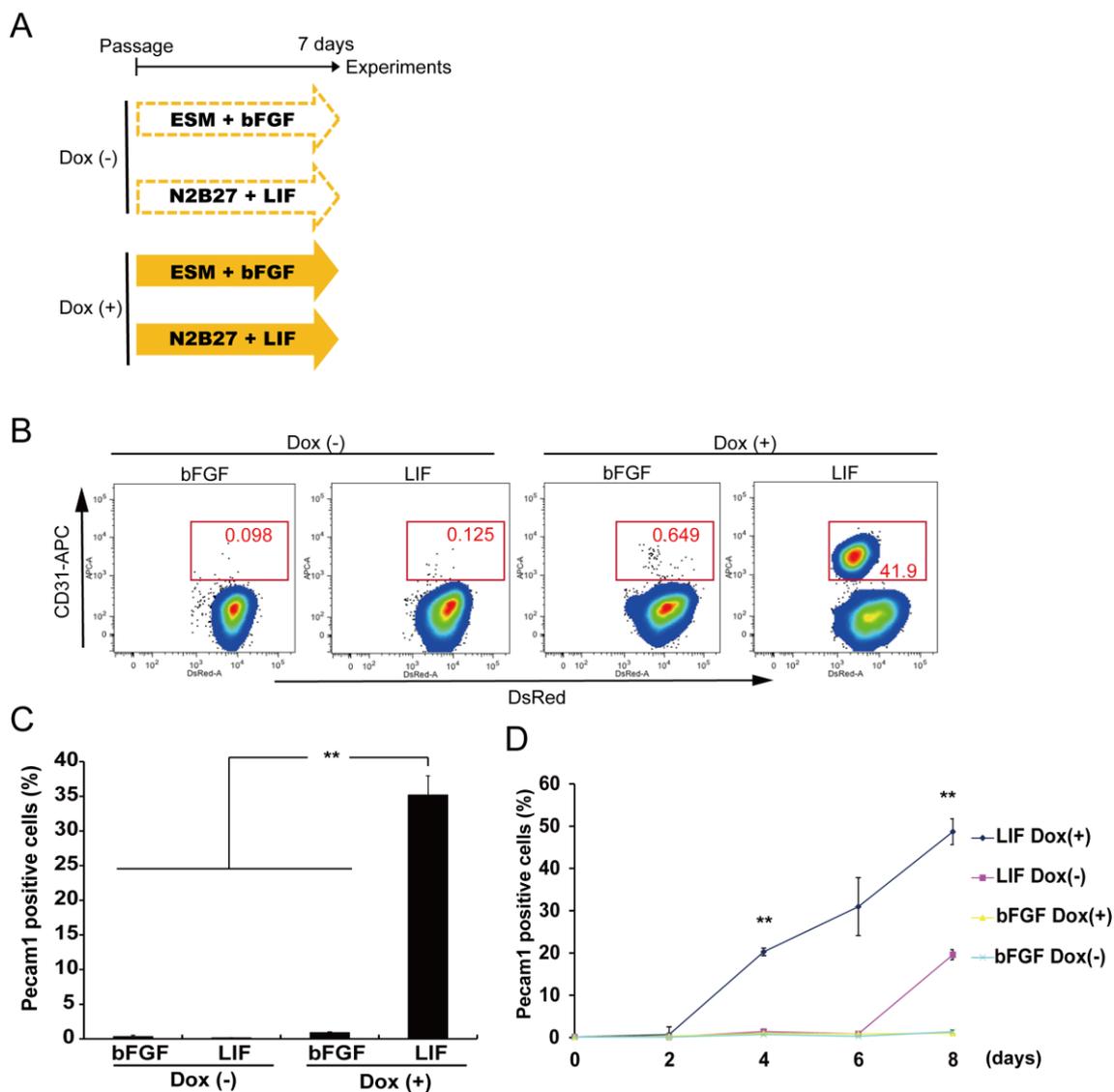


図 1-2. EB3DR EpiSCs における E-cadherin 過剰発現効果

- (A) 実験系のデザイン。primed 型の培養条件 (ESM+bFGF) または naïve 型の培養条件 (N2B27+LIF) で Dox 添加群と非添加群で比較検討した。
- (B) 培養 7 日目における EB3DR EpiSCs (DsRed 陽性) の CD31 (Pecam1) の発現解析をフローサイトメーターで行った結果。
- (C) 培養 7 日目における Pecam1 陽性細胞の出現頻度。LIF 存在下で E-cadherin を発現上昇した EpiSCs は Pecam1 陽性細胞の出現頻度が有意に上昇した (n = 3, **p < 0.01; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。
- (D) Pecam1 発現解析のタイムコース。LIF 存在下で E-cadherin を発現上昇した EpiSCs は他の条件と比較して Pecam1 陽性細胞への有意な変換を示している (n = 3, **p < 0.01; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。

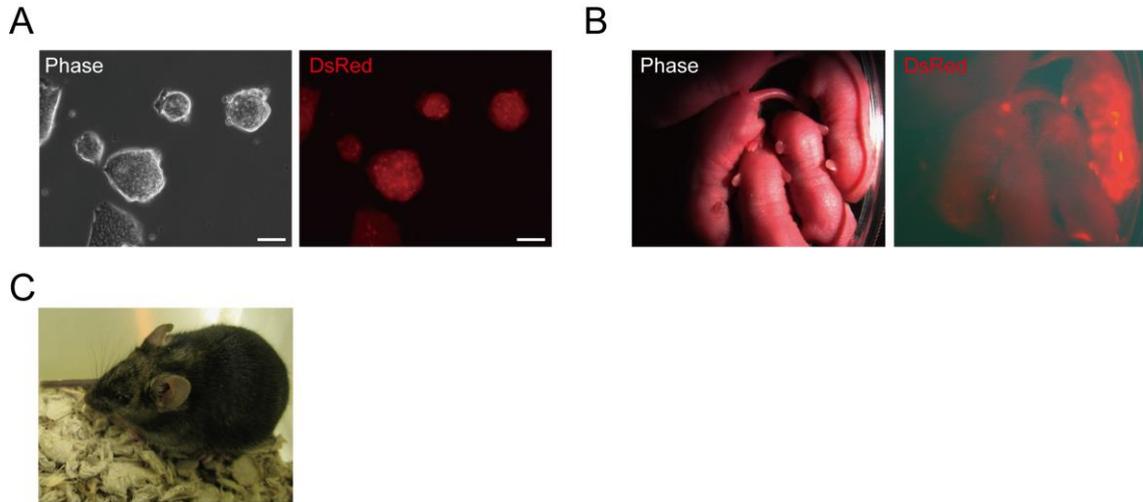


図 1-3. E-cad-rESCs のキメラ形成能の評価

- (A) LIF 存在下で E-cadherin を過剰発現させたことによって得られた CD31 陽性細胞のコロニー (E-cad-rESCs)。ドーム状のコンパクトなコロニー形態を示した。スケールバーは 50 μm を示す。
- (B) E-cad-rESCs (DsRed で標識されている) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ新生仔。
- (C) E-cad-rESCs (コートカラー : agouti) を BDF1 x C57BL/6 胚盤胞 (コートカラー : black) に注入することにより得られたキメラマウス。

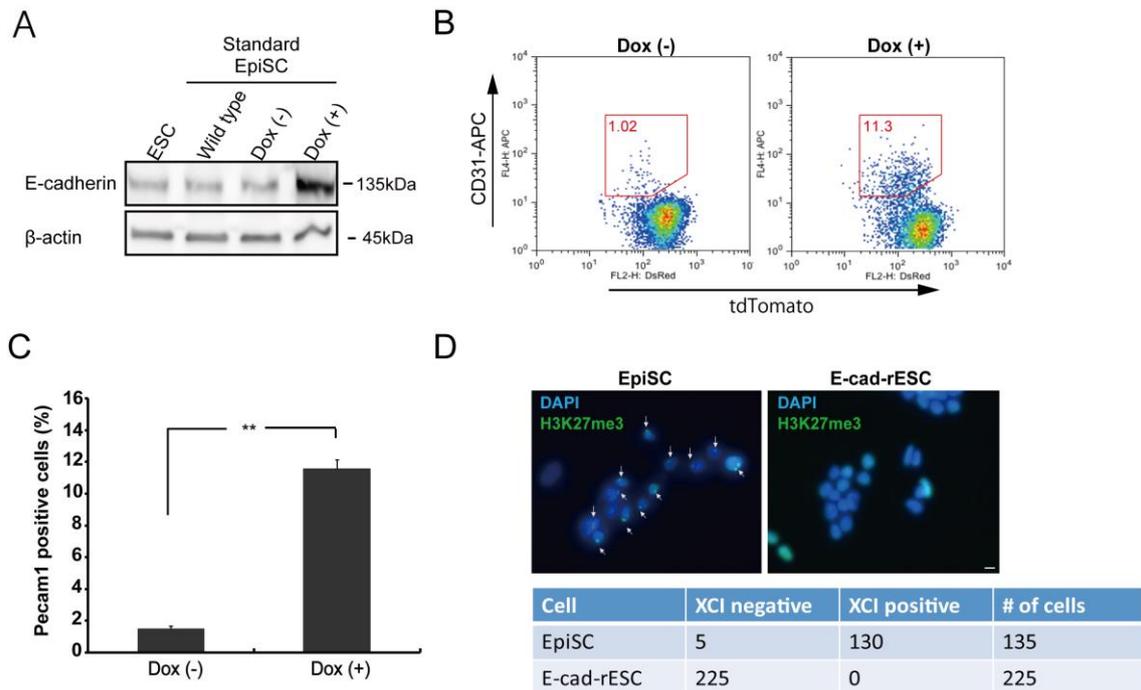
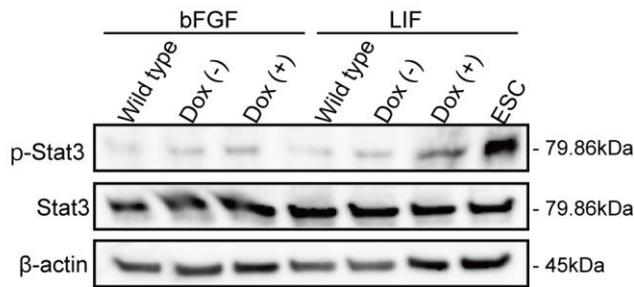


図 1-4. 標準 EpiSC 株における E-cadherin 過剰発現効果

- (A) EB3DR ESCs、標準 EpiSCs および E-cadherin 誘導性 標準 EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+))と無添加 (Dox(-)) 群で 2 日間培養し E-cadherin のタンパク発現量をウェスタンブロットで解析した結果。 β -actin はローディング・コントロールとして用いた。
- (B) LIF 存在下での培養 7 日目における E-cadherin 誘導性 標準 EpiSCs (tdTomato 陽性) の CD31 (Pecam1) の発現解析をフローサイトメーターで行った結果。
- (C) Dox の添加 (Dox(+))と非添加 (Dox(-)) 群での Pecam 1 陽性細胞の比較。LIF 存在下で 7 日間培養した結果、Dox の添加によって Pecam1 発現細胞の比率が有意に上昇した (n = 3, **p < 0.01; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。
- (D) 標準 EpiSCs および 標準 EpiSCs 由来 E-cad-rESC を H3K27me3 抗体によって染色した。細胞核は DAPI により染色した。白い矢印は H3K27me3 陽性の X 染色体不活性化 (X-chromosome inactivation: XCI) を示す。スケールバーは 10 μ m を示す。

A



B

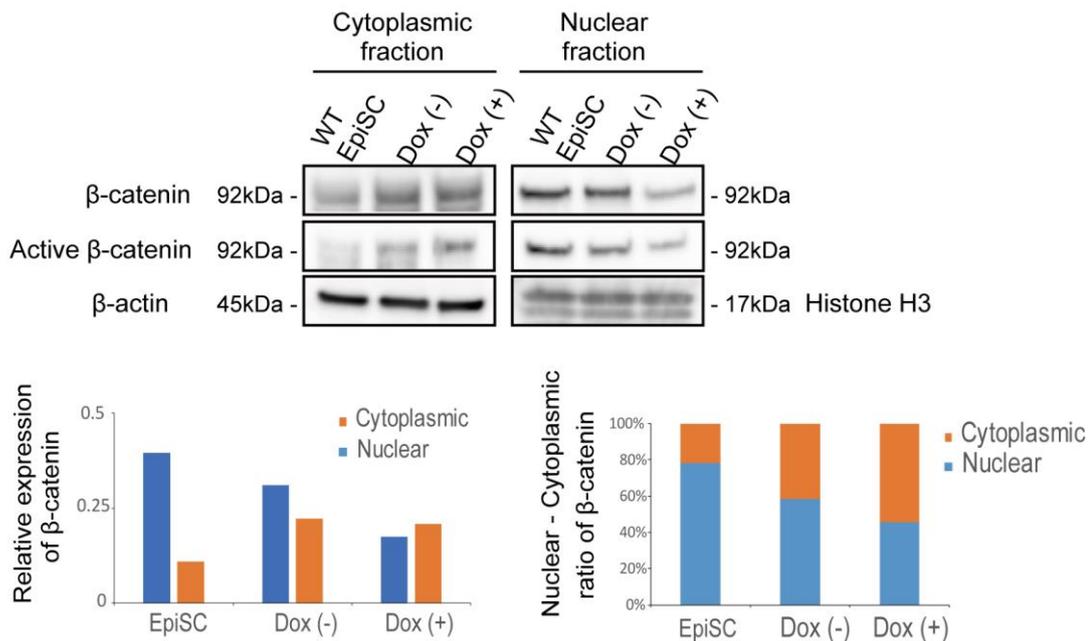


図 2-1. E-cadherin の発現上昇による細胞内シグナルへの影響

(A) EB3DR EpiSCs および E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+))と無添加 (Dox(-)) 群で 2 日間培養し phospho-STAT3 のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した結果。β-actin はローディング・コントロールとして用いた。

(B) EB3DR EpiSCs および E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+))と無添加(Dox(-)) 群で 2 日間培養し、細胞質分画および核分画における β-catenin および活性型 β-catenin のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した結果。β-actin、Histon H3 はローディング・コントロールとして用いた (上)。細胞質分画、核分画それぞれでの β-catenin の相対値 (下の左)、比率 (下の右) を示した。

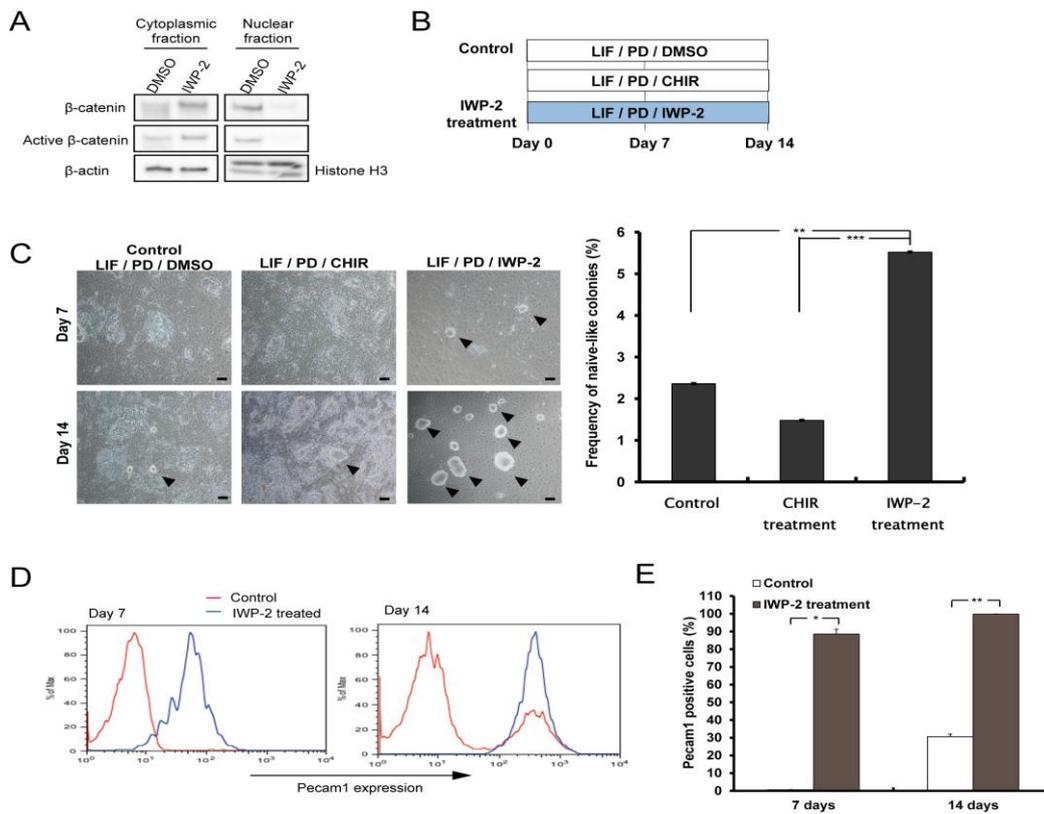


図 2-2. IWP-2 による EB3DR EpiSCs のリプログラミング効果

- (A) EB3DR EpiSCs を IWP-2 (5nM) の添加と非添加 (DMSO) 群で 2 日間培養し、細胞質分画および核分画における β -catenin および活性型 β -catenin のタンパク発現量をウェスタンブロットで解析した結果。 β -actin、Histone H3 はローディング・コントロールとして用いた。
- (B) naïve 型への誘導条件。LIF 存在下で 5nM IWP-2 と 1 μ M PD0325901 を添加した。コントロールは DMSO 添加、比較対照を 3 μ M CHIR99021 添加とした。
- (C) EpiSCs のコロニー形態変化 (左)。naïve 様のコンパクトなコロニーを矢じりで示した。14 日目における naïve 様コロニーの出現効率 (右)。初めに播種した細胞数と出現した naïve 様コロニー数の比で算出した ($n = 3$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$; 4 回の独立実験を行ったうちの代表例)。スケールバーは 100 μ m を示す。
- (D) EB3DR EpiSCs を IWP-2 の添加 (青のライン) と非添加 (赤のライン) 群で 7 日間または 14 日間培養し Pecam1 の発現をフローサイトメーターで解析した結果。
- (E) 培養 7 日目または 14 日目における Pecam1 陽性細胞の割合。IWP-2 処理による Pecam1 陽性細胞の有意な上昇を示している ($n = 3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。

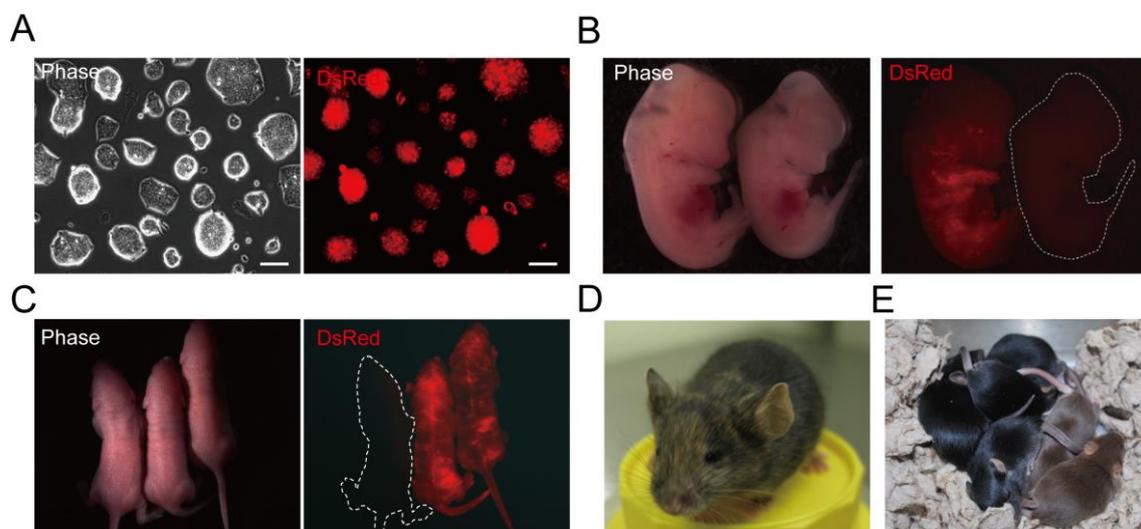


図 2-3. wit-rESCs のキメラ形成能の評価

- (A) LIF 存在下で IWP-2 を添加することによって得られた CD31 陽性細胞のコロニー (wit-rESCs)。ドーム状のコンパクトなコロニー形態を示した。スケールバーは 100 μm を示す。
- (B) wit-rESCs (DsRed で標識されている) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ胎仔 (E12.5)。点線はキメラではない胎仔を示す。
- (C) wit-rESCs (DsRed で標識されている) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ新生仔。点線はキメラではない新生仔を示す。
- (D) wit-rESCs (コートカラー : agouti) を BDF1 x C57BL/6 胚盤胞 (コートカラー : black) に注入することにより得られたキメラマウス。
- (E) キメラマウスを交配させ作製した次世代マウス。全身 agouti のマウスは、wit-rESCs の生殖系譜への寄与を示している。

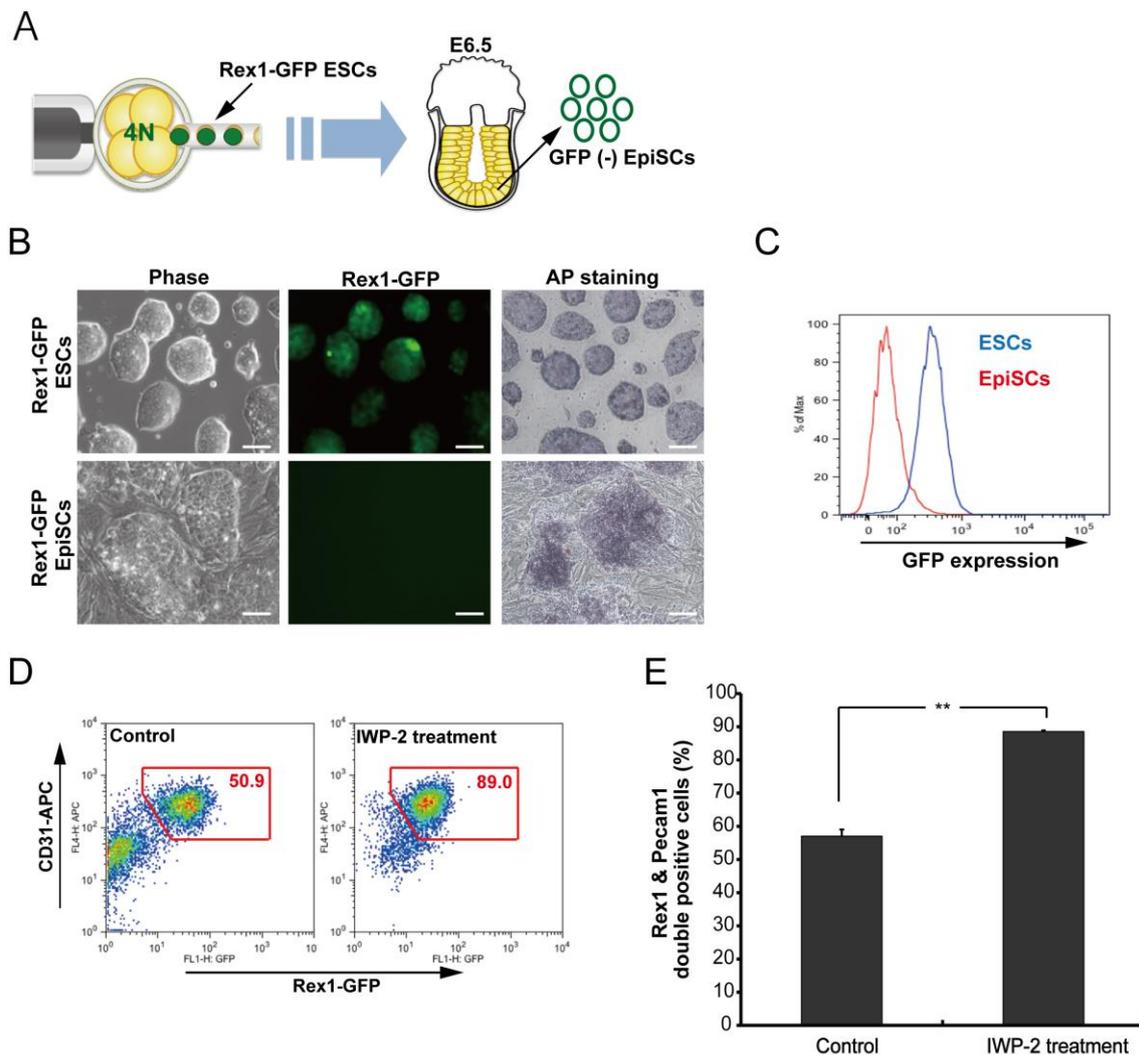


図 2-4. IWP-2 による Rex1-GFP EpiSCs のリプログラミング効果

- (A) Rex1-GFP EpiSCs 作製の概略図。Rex1-GFP ESCs を 4 倍体胚に注入し着床後の E6.5 のエピブラストから EpiSCs を樹立した。
- (B) Rex1-GFP ESCs および Rex1-GFP EpiSCs のコロニー形態 (左)、蛍光顕微鏡による GFP 発現の観察 (中)、アルカリフォスファターゼ染色 (右)。スケールバーは 50 μm を示す。
- (C) Rex1-GFP ESCs (青のライン) および Rex1-GFP EpiSCs (赤のライン) における GFP の発現をフローサイトメーターで解析した結果。
- (D) LIF 存在下での培養 7 日目における Rex1-GFP EpiSCs の GFP および CD31 (Pecam1) の発現解析をフローサイトメーターで行った結果。
- (E) 培養 7 日目における GFP および Pecam1 の両陽性細胞の割合。IWP-2 処理による両陽性細胞の有意な上昇を示している ($n = 3$, $**p < 0.01$; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。

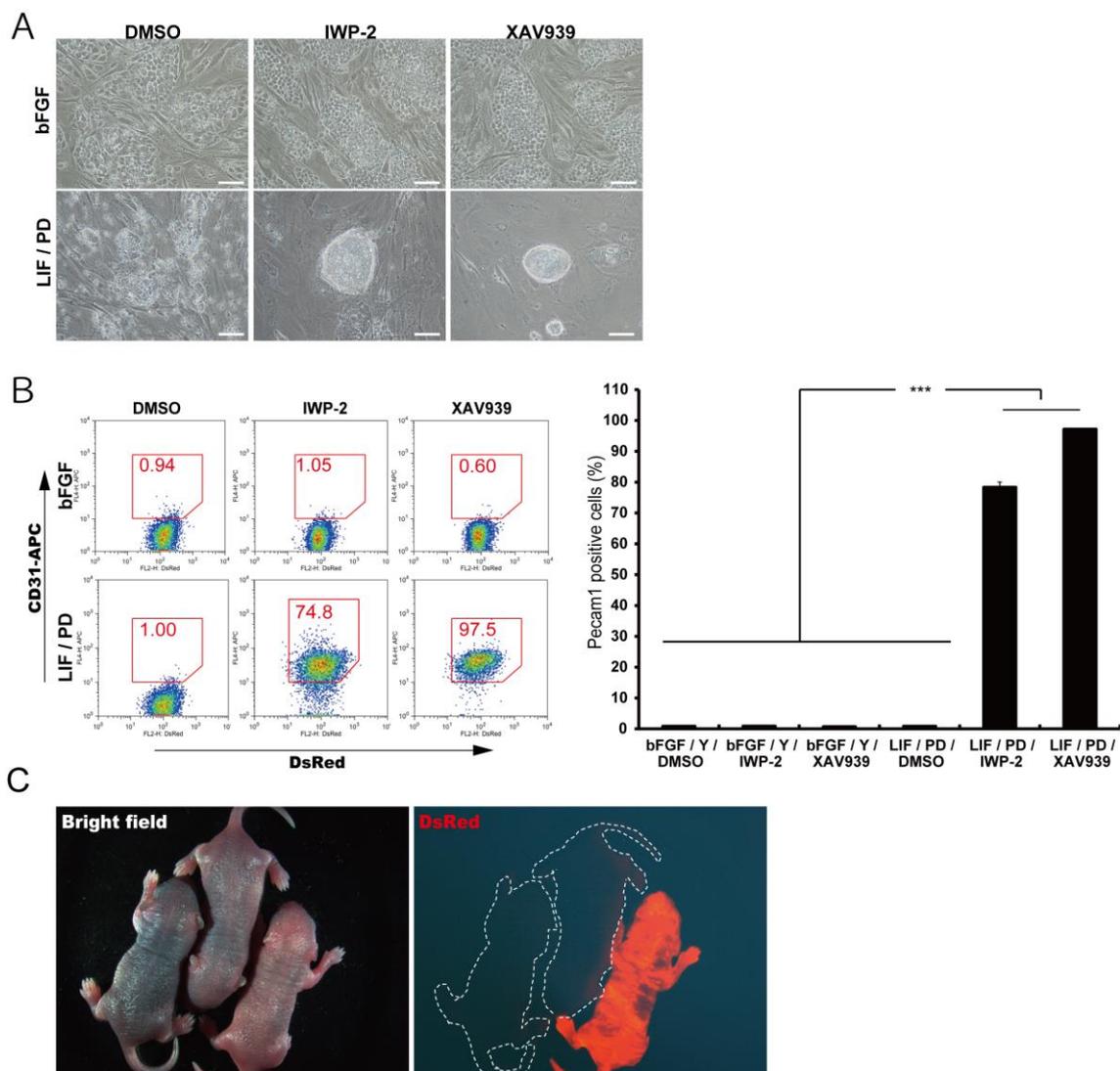


図 2-5. XAV939 による EB3DR EpiSCs のリプログラミング効果

- (A) 各培養条件における EpiSCs のコロニー形態 (7 日間培養)。LIF / PD 存在下で IWP-2 (5nM) や XAV939 (10 μ M) を添加することによりコンパクトなコロニー形態を示した。スケールバーは 50 μ m を示す。
- (B) 各条件での培養 7 日目における EB3DR EpiSCs (DsRed 陽性) の CD31 (Pecam1) の発現解析をフローサイトメーターで行った結果 (左)。Pecam1 陽性細胞の出現頻度 (右)。LIF 存在下で Wnt 阻害剤を添加した EpiSCs は Pecam1 陽性細胞の出現頻度が有意に上昇した (n = 3、***p < 0.001; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。
- (C) XAV939 の添加により Pecam1 陽性となった EB3DREpiSCs (DsRed で標識されている) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ新生仔。点線はキメラではない新生仔を示す。

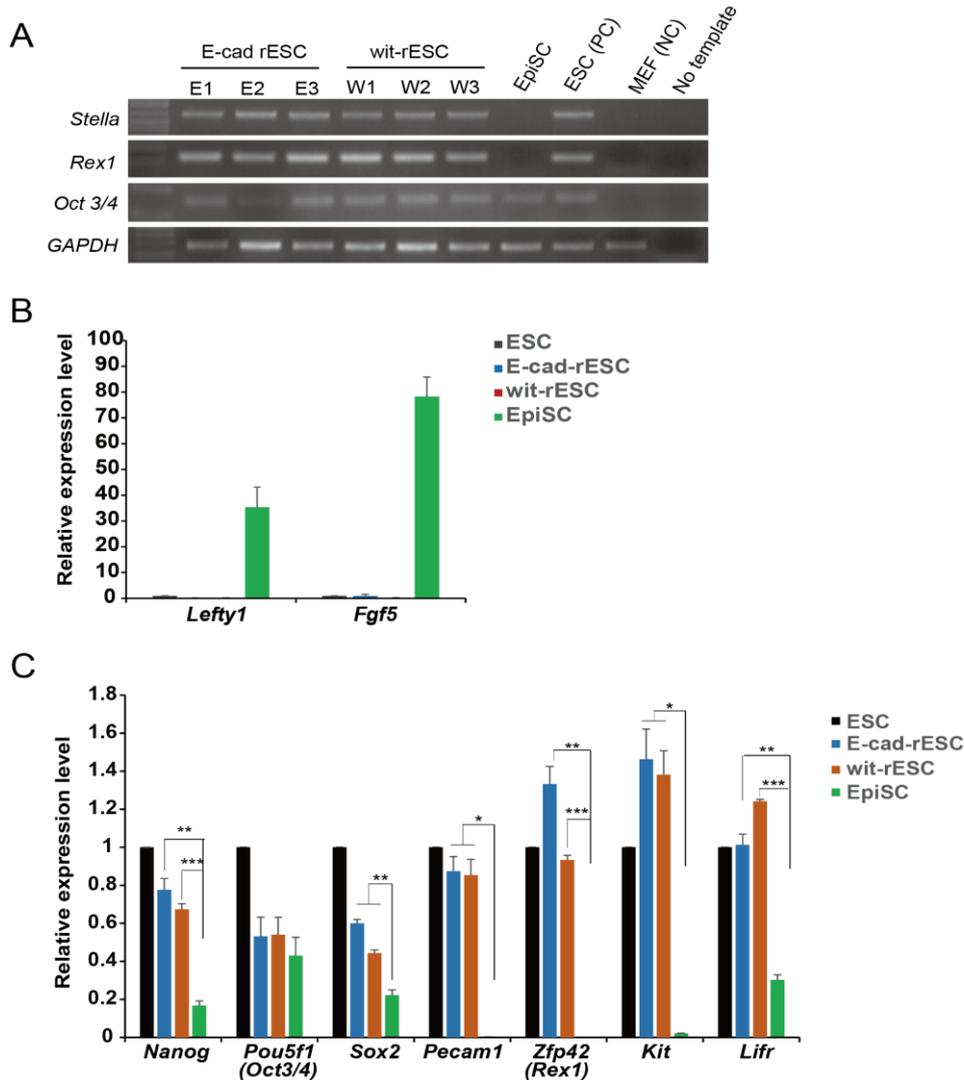


図 3. 遺伝子発現プロファイル

- (A) EB3DR EpiSC 由来 rESC 株における RT-PCR の結果。樹立された E-cad-rESC 株と wit-rESC 株において naïve 型 ESC 特異的に発現する *Stella*、*Rex1* の発現を示した。EpiSC は EB3DR EpiSC 株、ESC は EB3DR ESC 株を示している。
- (B) primed 型特異的な多能性因子である *Lefty1*、*Fgf5* の定量 PCR の結果。EB3DR ESC 株、EB3DR EpiSC 由来 rESC 株 (E-cad-rESC、wit-rESC)、EB3DR EpiSC 株での結果を示している。ESC での発現を 1 とした場合の発現レベルを示す。内部標準遺伝子 *GAPDH* で標準化した ($n = 3$)。
- (C) 主要な多能性関連因子の定量 PCR の結果。EB3DR ESC 株、EB3DR EpiSC 由来 rESC 株 (E-cad-rESC、wit-rESC)、EB3DR EpiSC 株での結果を示している。ESC での発現を 1 とした場合の発現レベルを示す。内部標準遺伝子 *GAPDH* で標準化した ($n = 3$ 、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$)。

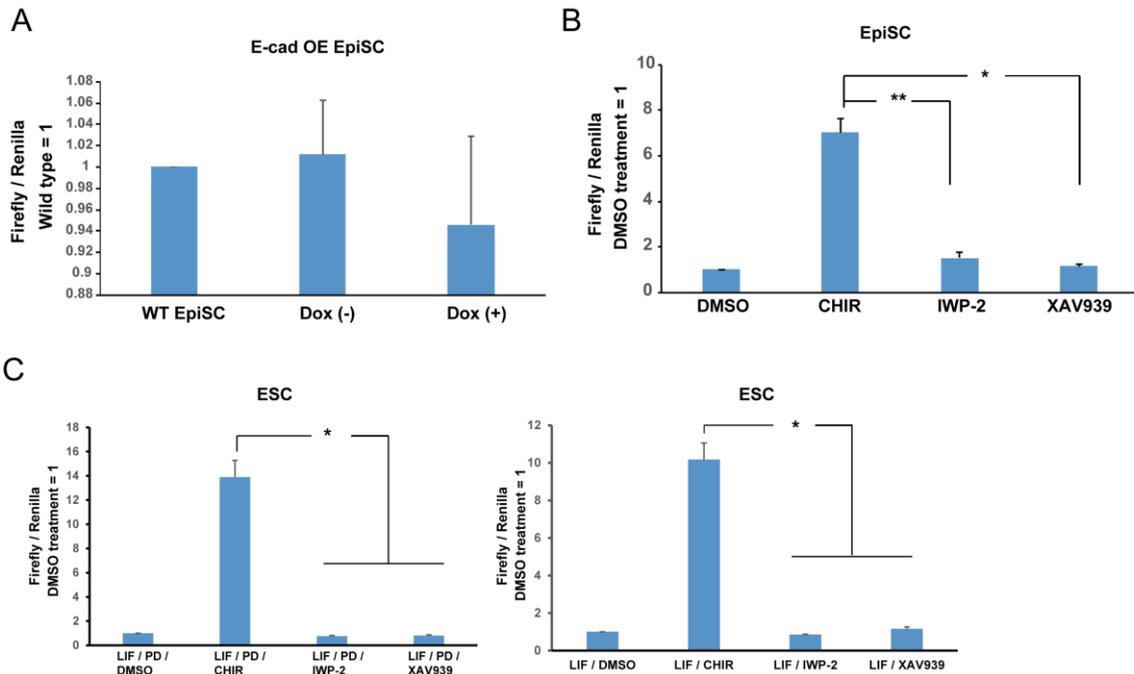


図 4. TOPFlash 解析法による TCF / LEF 活性の測定

- (A) EB3DR EpiSCs および E-cadherin 誘導性 EB3DR EpiSCs を Dox (2 μ g/ml) の添加 (Dox(+))と非添加 (Dox(-)) 群で 2 日間培養し TOPFlash 解析を行った結果。EB3DR EpiSCs での値を 1 としたときの発光レベルを示した (n = 3; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。
- (B) EB3DR EpiSCs に CHIR (3 μ M)、IWP-2 (5nM)、XAV939 (10 μ M)をそれぞれ添加し 2 日間培養して TOPFlash 解析を行った結果。DMSO 処理での値を 1 としたときの発光レベルを示した(n = 3、*p < 0.05、**p < 0.01; 3 回の独立実験を行ったうちの代表例)。
- (C) EB3DR ESCs に CHIR (3 μ M)、IWP-2 (5nM)、XAV939 (10 μ M)をそれぞれ添加し 2 日間培養して TOPFlash 解析を行った結果。DMSO 処理での値を 1 としたときの発光レベルを示した (n = 3、*p < 0.05、**p < 0.01)。

ルシフェラーゼ活性は、Firefly (FOPFlash) : Renilla と Firefly (TOPFlash) : Renilla の発光比で算出した。

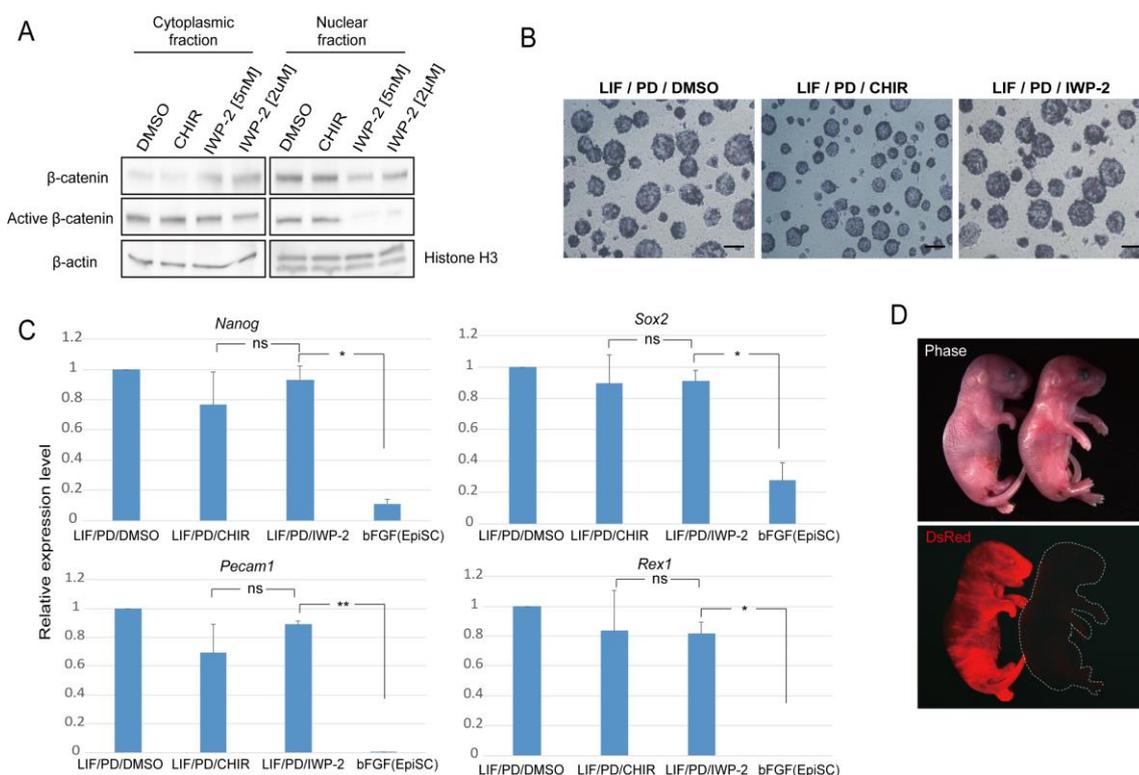
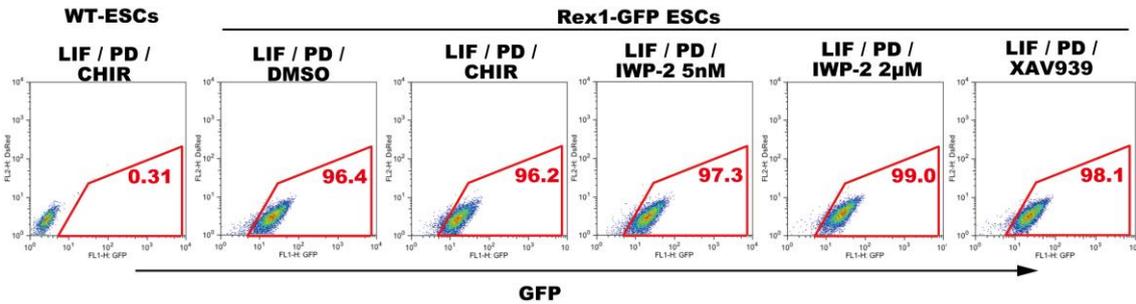


図 5-1. IWP-2 存在下での naïve 型マウス ESC の多能性維持

- (A) EB3DR ESCs を DMSO、CHIR (3 μ M)、IWP-2 (5nM、2 μ M) の各添加群で 2 日間培養し細胞質分画および核分画における β -catenin および活性型 β -catenin のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した結果。 β -actin、Histone H3 はローディング・コントロールとして用いた。
- (B) EB3DR ESCs を各培養条件でアルカリフォスファターゼ染色を行った結果。IWP-2 (5nM) の有無に関わらず、ESC はアルカリフォスファターゼ陽性を示している。
- (C) 各培養条件で 2 週間培養し多能性関連因子の定量 PCR を行った結果。IWP-2 存在下でも ESC は naïve 型の多能性因子を発現している。DMSO 処理したサンプルの発現を 1 とした場合の各条件での発現レベルを示す。内部標準遺伝子 GAPDH で標準化した (n = 3、*p < 0.05、**p < 0.01)。
- (D) IWP-2 処理した ESC (DsRed 陽性) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ新生仔。点線はキメラではない新生仔を示す。

A



B

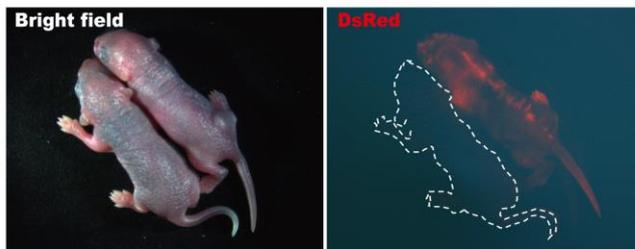


図 5-2. Wnt 阻害剤存在下での Rex1-GFP の発現およびキメラ形成能

- (A) Rex1-GFP ESCs を DMSO、CHIR (3µM)、IWP-2 (5nM、2µM)、XAV939 (10µM) の各添加群で 14 日間培養し、GFP の発現をフローサイトメーターで解析した結果。IWP-2 および XAV939 存在下でも GFP が発現することを示している。
- (B) XAV939 存在下で 2 週間培養した EB3DR ESC (DsRed 陽性) を胚盤胞に注入することにより得られたキメラ新生仔。点線はキメラではない新生仔を示す。

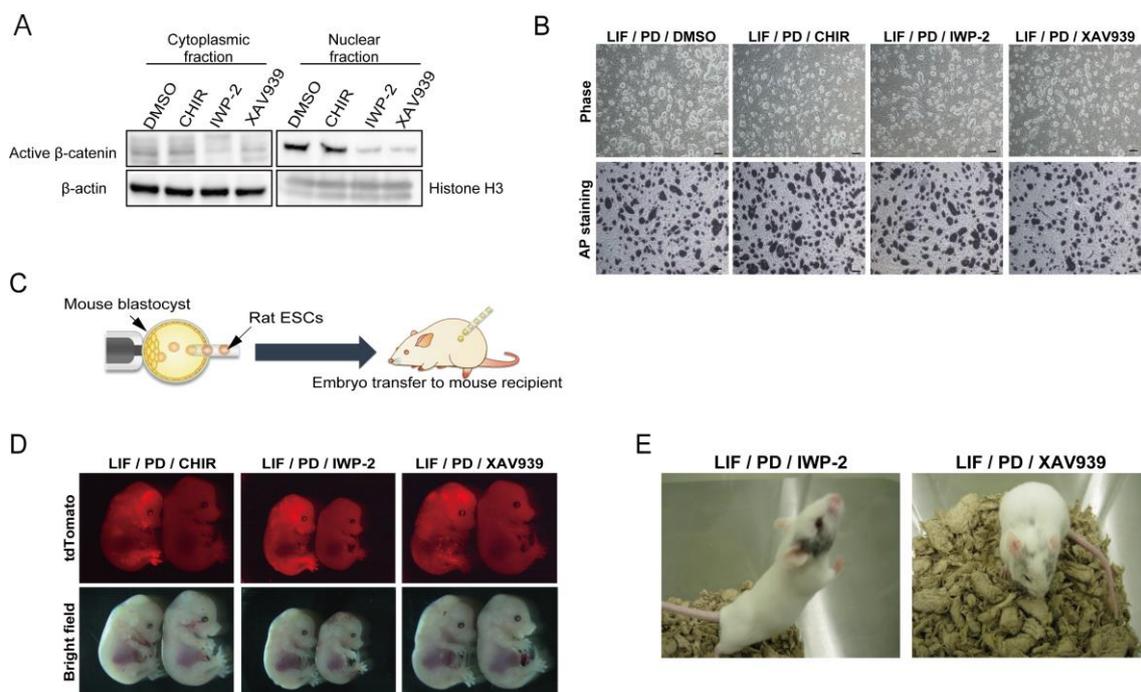


図 6. Wnt 阻害剤存在下での naïve 型ラット ESC の多能性維持

- (A) BLK-RT2 ESCs を DMSO、CHIR (3 μ M)、IWP-2 (5nM)、XAV939 (10 μ M) の各添加群で 2 日間培養し細胞質分画および核分画における活性型 β -catenin のタンパク発現量をウエスタンブロットで解析した結果。 β -actin、Histone H3 はローディング・コントロールとして用いた。
- (B) BLK-RT2 ESCs を各培養条件で 2 週間培養し、コロニー形態の観察 (上) とアルカリフォスファターゼ染色 (下) を行った結果。IWP-2 や XAV939 存在下でも ESC はアルカリフォスファターゼ陽性を示している。
- (C) マウス-ラット異種間キメラ作製の概略図。各条件で 2 週間培養した BLK-RT2 ESCs (ラット ESC) をマウス ICR の胚盤胞に注入し偽妊娠マウスの子宮へ移植した。
- (D) BLK-RT2 ESCs (tdTomato で標識されている) をマウス胚盤胞に注入することにより得られたキメラ胎仔 (E13.5)。点線はキメラではない胎仔を示す。IWP-2 や XAV939 処理を施した ESC でも異種間キメラ胎仔の作製が可能であることを示している。
- (E) BLK-RT2 ESCs (ラット ESC、コートカラー: black) をマウス ICR 胚盤胞 (コートカラー: white) に注入し得られたキメラ個体。IWP-2 や XAV939 処理を施した ESC でも異種間キメラ個体の作製が可能であることを示している。

表 1.
キメラ形成効率

Cell type	Injected Cell line (culture condition)	Transferred embryos	Analyzed stage	Pups (Fetus)	Chimeras	Chimera rate	Associated figure
マウス ESC	EB3DR ESC (LIF/PD/CHIR)	48	E13.5 embryo	26	15	57.7 %	
	EB3DR ESC (LIF/PD/IWP-2)	36	Neonate	15	7	46.7 %	☒ 5-1 (D)
	EB3DR ESC (LIF/PD/XAV939)	40	Neonate	17	8	47.1 %	☒ 5-2 (B)
マウス EpiSC	EB3DR EpiSC	40	E9.5 embryo	26	0	0.0 %	
	E-cad OE EpiSC (Day2, bFGF)	40	E13.5 embryo	22	0	0.0 %	
	E-cad OE EpiSC (Day2, LIF)	40	E13.5 embryo	21	0	0.0 %	
マウス rESC	E-cad-rESC	44	Neonate	18	5	27.8 %	☒ 1-3 (B)(C)
	wit-rESC (IWP-2 treatment)	14	E13.5 embryo	2	1	50.0 %	☒ 2-3 (B)
	wit-rESC (IWP-2 treatment)	40	Neonate	26	11	42.3 %	☒ 2-3 (C)(D)
	wit-rESC (XAV939 treatment)	36	Neonate	16	5	31.3 %	☒ 2-5 (C)
ラット ESC	BLKRT2 ESC (LIF / PD / DMSO)	18	Neonate	6	2	33.3 %	
	BLKRT2 ESC (LIF / PD / CHIR)	18	Neonate	5	1	20.3 %	
	BLKRT2 ESC (LIF / PD / IWP-2)	20	Neonate	7	1	14.3 %	☒ 6 (E)
	BLKRT2 ESC (LIF / PD / XAV939)	20	Neonate	4	1	25.0 %	☒ 6 (E)

表 2.

RT-PCR で用いたプライマー配列

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Stella</i>	GCAATCTTGTTCCGAGCTAG	CTGGATCGTTGTGCATCCTA
<i>Rex1</i>	CGTGTAACATACACCATCCG	GAAATCCTCTTCCAGAATGG
<i>Oct4</i>	TCTTTCCACCAGGCCCCCGGCTC	TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
<i>GAPDH</i>	TGCACCACCAACTGCTTAG	GGATGCAGGGATGATGTTC

引用文献

- 1 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156 (1981).
- 2 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
- 3 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 4 Smith, A. G. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-690, doi:10.1038/336688a0 (1988).
- 5 Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-292 (2003).
- 6 Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. & Smith, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes &*

- Development* **12**, 2048-2060 (1998).
- 7 Matsuda, T. *et al.* STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *The EMBO Journal* **18**, 4261-4269, doi:10.1093/emboj/18.15.4261 (1999).
- 8 Moon, R. T., Kohn, A. D., De Ferrari, G. V. & Kaykas, A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nature Reviews. Genetics* **5**, 691-701, doi:10.1038/nrg1427 (2004).
- 9 Nelson, W. J. & Nusse, R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* **303**, 1483-1487, doi:10.1126/science.1094291 (2004).
- 10 Staal, F. J., Noort Mv, M., Strous, G. J. & Clevers, H. C. Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Reports* **3**, 63-68, doi:10.1093/embo-reports/kvf002 (2002).
- 11 Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nature Medicine* **10**, 55-63, doi:10.1038/nm979 (2004).
- 12 Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-523, doi:10.1038/nature06968 (2008).

- 13 Wray, J. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nature Cell Biology* **13**, 838-845, doi:10.1038/ncb2267 (2011).
- 14 Martello, G. *et al.* Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **11**, 491-504, doi:10.1016/j.stem.2012.06.008 (2012).
- 15 Nichols, J. & Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **4**, 487-492, doi:10.1016/j.stem.2009.05.015 (2009).
- 16 Tesar, P. J. *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**, 196-199, doi:10.1038/nature05972 (2007).
- 17 Brons, I. G. *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191-195, doi:10.1038/nature05950 (2007).
- 18 Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
- 19 Kobayashi, T. *et al.* Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* **142**, 787-799,

- doi:10.1016/j.cell.2010.07.039 (2010).
- 20 Silva, J. *et al.* Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* **138**, 722-737, doi:10.1016/j.cell.2009.07.039 (2009).
- 21 Gillich, A. *et al.* Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors. *Cell Stem Cell* **10**, 425-439, doi:10.1016/j.stem.2012.01.020 (2012).
- 22 Bao, S. *et al.* Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **461**, 1292-1295, doi:10.1038/nature08534 (2009).
- 23 del Valle, I. *et al.* E-cadherin is required for the proper activation of the Lifr/Gp130 signaling pathway in mouse embryonic stem cells. *Development* **140**, 1684-1692, doi:10.1242/dev.088690 (2013).
- 24 Chen, T. *et al.* E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* **28**, 1315-1325, doi:10.1002/stem.456 (2010).
- 25 Yamaguchi, T. *et al.* Development of an all-in-one inducible lentiviral vector for gene specific analysis of reprogramming. *PLoS One* **7**, e41007, doi:10.1371/journal.pone.0041007 (2012).
- 26 Shibuya, K. *et al.* CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte

- function-associated antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* **198**, 1829-1839, doi:10.1084/jem.20030958 (2003).
- 27 Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A. G. & Miyazaki, J. i. Phenotypic Complementation Establishes Requirements for Specific POU Domain and Generic Transactivation Function of Oct-3/4 in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 1526-1536, doi:10.1128/mcb.22.5.1526-1536.2002 (2002).
- 28 Ogawa, K., Matsui, H., Ohtsuka, S. & Niwa, H. A novel mechanism for regulating clonal propagation of mouse ES cells. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* **9**, 471-477, doi:10.1111/j.1356-9597.2004.00736.x (2004).
- 29 Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J. C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 8424-8428 (1993).
- 30 Kobayashi, T. *et al.* Identification of rat Rosa26 locus enables generation of knock-in rat lines ubiquitously expressing tdTomato. *Stem Cells and*

- Development* **21**, 2981-2986, doi:10.1089/scd.2012.0065 (2012).
- 31 Stockinger, A., Eger, A., Wolf, J., Beug, H. & Foisner, R. E-cadherin regulates cell growth by modulating proliferation-dependent beta-catenin transcriptional activity. *The Journal of Cell Biology* **154**, 1185-1196, doi:10.1083/jcb.200104036 (2001).
- 32 Sasaki, C. Y., Lin, H., Morin, P. J. & Longo, D. L. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Research* **60**, 7057-7065 (2000).
- 33 Conacci-Sorrell, M. *et al.* Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *The Journal of Cell Biology* **163**, 847-857, doi:10.1083/jcb.200308162 (2003).
- 34 Chen, B. *et al.* Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature Chemical Biology* **5**, 100-107, doi:10.1038/nchembio.137 (2009).
- 35 Wray, J., Kalkan, T. & Smith, A. G. The ground state of pluripotency. *Biochemical Society Transactions* **38**, 1027-1032, doi:10.1042/bst0381027 (2010).

- 36 Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K. & Niwa, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**, 909-918, doi:10.1242/dev.017400 (2008).
- 37 Huang, S. M. *et al.* Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature* **461**, 614-620, doi:10.1038/nature08356 (2009).
- 38 Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. & Moon, R. T. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Current Biology : CB* **13**, 680-685 (2003).
- 39 Li, P. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1299-1310, doi:10.1016/j.cell.2008.12.006 (2008).
- 40 Buehr, M. *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* **135**, 1287-1298, doi:10.1016/j.cell.2008.12.007 (2008).
- 41 Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *The EMBO Journal* **32**, 2561-2574, doi:10.1038/emboj.2013.177 (2013).
- 42 Kim, H. *et al.* Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nature Communications* **4**, 2403, doi:10.1038/ncomms3403 (2013).

- 43 Sumi, T., Oki, S., Kitajima, K. & Meno, C. Epiblast ground state is controlled by canonical Wnt/beta-catenin signaling in the postimplantation mouse embryo and epiblast stem cells. *PLoS One* **8**, e63378, doi:10.1371/journal.pone.0063378 (2013).
- 44 Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. & Niwa, H. E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One* **7**, e45220, doi:10.1371/journal.pone.0045220 (2012).
- 45 Okumura, N. *et al.* beta-catenin functions pleiotropically in differentiation and tumorigenesis in mouse embryo-derived stem cells. *PLoS One* **8**, e63265, doi:10.1371/journal.pone.0063265 (2013).
- 46 Biechele, S., Cockburn, K., Lanner, F., Cox, B. J. & Rossant, J. Porcn-dependent Wnt signaling is not required prior to mouse gastrulation. *Development* **140**, 2961-2971, doi:10.1242/dev.094458 (2013).
- 47 Gafni, O. *et al.* Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **504**, 282-286, doi:10.1038/nature12745 (2013).
- 48 Hanna, J. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 9222-9227,

- doi:10.1073/pnas.1004584107 (2010).
- 49 Li, W. *et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* **4**, 16-19, doi:10.1016/j.stem.2008.11.014 (2009).
- 50 Takashima, Y. *et al.* Resetting Transcription Factor Control Circuitry toward Ground-State Pluripotency in Human. *Cell* **158**, 1254-1269, doi:10.1016/j.cell.2014.08.029 (2014).
- 51 Theunissen, T. W. *et al.* Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* **15**, 471-487, doi:10.1016/j.stem.2014.07.002 (2014).
- 52 Ware, C. B. *et al.* Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 4484-4489, doi:10.1073/pnas.1319738111 (2014).
- 53 Thomson, J. A. *et al.* Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biology of Reproduction* **55**, 254-259 (1996).
- 54 Thomson, J. A. *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 7844-7848 (1995).

55 Suemori, H. *et al.* Establishment of embryonic stem cell lines from cynomolgus monkey blastocysts produced by IVF or ICSI. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **222**, 273-279, doi:10.1002/dvdy.1191 (2001).

謝辞

本研究を進めるにあたり直接ご指導を頂きました 東京大学 医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療分野 中内啓光教授に心より感謝申し上げます。また、終始にわたり熱心にきめ細かくご指導頂きました 同准教授の山口智之先生、研究員の正木英樹博士に深い感謝の意を表します。

本研究に必要な不可欠な細胞をご供与頂きました 理化学研究所発生・再生研究センター 丹羽仁史先生、ケンブリッジ大学 ウェルカム・トラスト幹細胞研究センター Austin Smith 教授に感謝致します。

また研究の遂行にあたり貴重なご意見・ご協力・ご支援を賜りました山崎祐治氏、佐藤秀征氏、石井有実子氏、藤田梓氏、葛西正孝先生、渡部素生先生をはじめ、幹細胞治療分野の皆様は厚く御礼申し上げます。

最後に、博士課程の進学を快く受け入れて下さりあらゆる面で支え、応援して下さいました両親に深く感謝し、謝辞とさせていただきます。

2015年3月 村山秀之