

論文の内容の要旨

論文題目：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

氏名：村山 秀之

【背景・目的】

生体内のすべての細胞に分化が可能な多能性幹細胞は naïve 型と primed 型に大別することができる。マウス胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells: ESCs) は着床前胚盤胞の内部細胞塊から樹立され、内部細胞塊の特徴を保っていることから naïve 型多能性幹細胞とも称され、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor: LIF) を含んだ適切な培養条件で naïve 型多能性状態が維持される。一方、マウスエピブラスト幹細胞 (Epiblast stem cells: EpiSCs) は着床後のエピブラスト胚から樹立されることから primed 型多能性幹細胞とも称され、増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF) に依存して primed 型多能性状態が維持される。このような多能性維持に必要な因子の差の他に、マウスの ESCs と EpiSCs は遺伝子発現プロファイルによっても区別することができる。また、naïve 型多能性幹細胞と primed 型多能性幹細胞の決定的な違いに、胚盤胞に移植した際にキメラを形成できるか (キメラ形成能) がある。マウス ESCs は着床前胚と協調的に発生に寄与してキメラ個体を形成するが、マウス EpiSCs はキメラを形成することがほとんどできない。従って、キメラ形成能は多能性状態を決定するための重要な判断基準となる。現在、naïve 型の性質を有し、胚盤胞へ移植した際にキメラ個体の作製が可能な多能性幹細胞はマウス・ラットにおいてしか樹立されていない。一方で、ヒトを含めた他の動物種の多能性幹細胞はその特徴から primed 型であると考えられており、それらの ESCs からキメラ個体が作製されたとの報告はない。このことは、げっ歯類以外の動物でノックアウトやトランスジェニックの研究が遅れている理由の一つになっている。従って、primed 型多能性幹細胞を naïve 型多能性幹細胞へ変換させる

技術開発は、生物学の発展に寄与するものと考えられる。これまでの報告から、マウス EpiSCs から ES 細胞様細胞 (reprogrammed epiblast to ES-cell-like cells: rESCs) と称される naïve 型多能性幹細胞への変換は、LIF-STAT3 シグナルの活性化に応答して引き起こされることが報告されているが、長期間の培養を必要とし変換効率が低いという問題があった。そこで本研究では、マウス EpiSCs から rESCs へ高効率に変換させる新しい誘導条件を探索することで、多能性状態変換のメカニズムを考察することにした。

【結果 1】

これまでに、E-cadherin は LIF 受容体に作用して LIF-STAT3 シグナルを活性化させるとの報告や、iPS 細胞誘導過程において、E-cadherin を初期化因子と共に発現させると iPS 細胞の出現頻度が上昇するとの報告もある。そこで、EpiSCs のリプログラミングにおける E-cadherin の役割を検討した。

レンチウイルスベクターを用い、Doxycycline (Dox) 依存的に E-cadherin を発現する EpiSCs を作製した (図 1A)。naïve 型への変換過程における E-cadherin 過剰発現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。培養条件は、primed 型の培養条件 (+bFGF) または naïve 型の培養条件 (+LIF) で、それぞれ Dox 添加群と非添加群で比較検討した。

その結果、LIF が含まれている naïve 型の培養条件において E-cadherin を過剰発現させた EpiSCs が naïve 型マウス ES 細胞のマーカである CD31 (Pecam1) 陽性の細胞へ 7 日間という短期間で効率的に変化した (図 1B)。

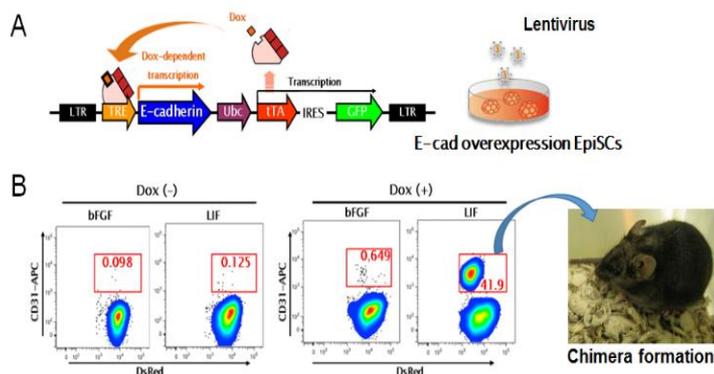


図 1. EpiSCs の E-cadherin 過剰発現効果

本研究ではこの細胞を E-cadherin overexpressed rESC (E-cad-rESCs) と命名した。この E-cad-rESCs はキメラ形成能を有することが確認できた (図 1B)。以上のことは、LIF 存在下で E-cadherin を発現増加させることで、primed 型から naïve 型へ高効率に変換できることを示している。

【結果 2】

E-cadherin は β -catenin と結合することで β -catenin の核内移行を抑制することが知られていることから、結果 [1] で認められた E-cadherin 過剰発現による rESC への高効率な変換が β -catenin が関与するシグナル経路に起因する可能性を考えた。そこで、細胞質分画と核分画での β -catenin タンパク量の変化をウエスタンブロットで解析したところ、Dox 処理による E-cadherin の過剰発現によって EpiSCs の核内の β -catenin および活性型 β -catenin のタンパク量が減少した (図 2A)。E-cadherin の過剰発現による変換効率の向上が β -catenin の核内移行の抑制によるものか確かめるため、Wnt/ β -catenin シグナルの抑制剤である IWP-2 が同様の効果を示すか検討した。その結果、LIF 存在下で IWP-2 を添加することで EpiSCs のコロニーの形態が ES 細胞様に変化し (図 2B 矢じり)、7 日以内に CD31 陽性細胞が出現した (図 2C)。本研究ではこの細胞を Wnt inhibitor-treated mouse EpiSCs reprogrammed to ES-like cells (wit-rESCs) と命名した。この wit-rESCs はキメラ形成能を有することが

確認できた (図 2D)。以上の結果は β -catenin シグナルの抑制が EpiSCs の rESC への変換を促進させる主要因であることを示唆している。

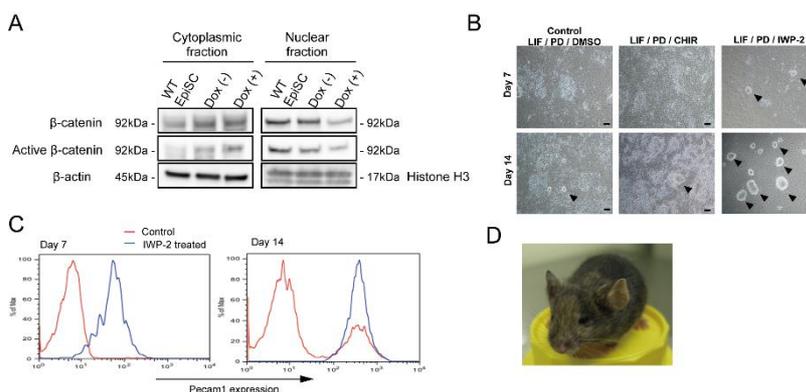


図 2. IWP-2 によるリプログラミング促進効果

【結果 3】

次に、得られた rESC 株の遺伝子発現の特性を調べた (図 3)。定量 PCR 解析の結果、E-cad-rESCs と wit-rESCs では ES 細胞と同様に naïve 型多能性幹細胞のマーカー遺伝子である *Pecam1*、*Zfp42*、*Kit*、*Lifr* の高い発現が確認でき、primed 型特異的な多能性因子である *Lefty1*、*Fgf5* の発現は低いことがわかった。また、主要な多能性関連因子である *Nanog*、*Sox2* の発現が E-cad-rESCs と wit-rESCs において EpiSCs と比較して上昇していることが確認できた。以上から、E-cad-rESCs と wit-rESCs は naïve 型多能性幹細胞様の遺伝子発現プロファイルを示すことが確認された。

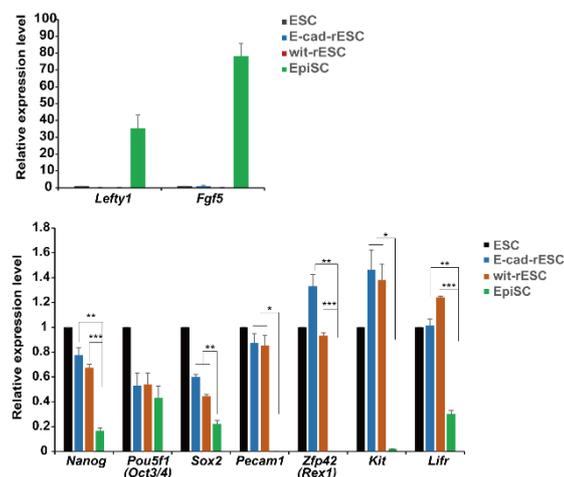


図 3. 遺伝子発現プロファイル

【結論・考察】

本研究によって、LIF シグナルの活性化に加えて E-cadherin を過剰発現させることが EpiSC から rESC への変換効率を劇的に向上させることが示された。さらに、その結果引き起こされる β -catenin の核内移行の抑制が変換効率向上の主因であることを示した。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と考えられる。また、今後この知見を応用してげっ歯類以外のキメラ形成が可能な naïve 型多能性幹細胞の樹立が可能となれば、ノックアウトやトランスジェニック研究の発展に貢献できると期待される。