

〔課程-2〕

## 審査の結果の要旨

氏名 村山 秀之

本研究は、多能性幹細胞を用いた動物作製技術を向上させるため、キメラ形成能のない primed 型多能性幹細胞であるマウスエピブラスト幹細胞 (EpiSC) からキメラ形成能を持つ naïve 型の胚性幹細胞 (ESC) 様細胞への効率的な変換を可能にする新しい誘導条件の開発を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 細胞接着因子 E-cadherin が体細胞の初期化に有用に働くという過去の知見を受け、本研究では 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。増殖因子 basic fibroblast growth factor (bFGF) または白血病抑制因子 leukemia inhibitory factor (LIF) を含んだ培養条件下で、Dox 添加群と非添加群でそれぞれ培養した結果、LIF が含まれている培養条件下において E-cadherin を過剰発現させた EpiSCs が naïve 型マウス ESC のマーカーである CD31 (Pecam1) 陽性の細胞へ7日間という短時間で効率的に変化した。これらの変換された細胞を胚盤胞へ注入したところ、キメラ形成能を有することが示された。
2. E-cadherin の過剰発現による細胞内シグナル経路への影響を調べたところ、LIF を含んだ培養条件下において E-cadherin を過剰発現させた EpiSCs のリン酸化型 Stat3の増加が示された。また、E-cadherin の過剰発現によって EpiSCs の核内の  $\beta$ -catenin および活性型  $\beta$ -catenin のタンパク発現量が減少する結果が得られ、E-cadherin の過剰発現は  $\beta$ -catenin の核内移行を抑制する作用があることが示された。
3. E-cadherin の過剰発現によるEpiSCs からESC 様細胞への変換効率の向上が  $\beta$ -catenin の核内移行の抑制によるものか確かめるため、Wnt /  $\beta$ -catenin シグナルの阻害剤である IWP-2 や XAV939 を用いて EpiSCs のリプログラミング効果を検討した。その結果、LIF 存在下でIWP-2 や XAV939 を添加することで EpiSCs のコロニー形態が ESC 様に変化し、7日以内に CD31 陽性の細胞へ変換

された。この細胞を胚盤胞へ注入したところ、キメラ形成能を有することが確認され、さらに生殖系譜への寄与が示された。

4. EpiSCs から誘導されたESC 様細胞の遺伝子発現の特性を調べたところ、naïve 型多能性幹細胞のマーカー遺伝子であるPecam1、Zfp42 (Rex1)、Kit、Lifr の高い発現が認められ、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示された。また、主要な多能性関連因子であるNanog、Sox2 の発現がprimed 型の EpiSC と比較して上昇していることが示された。

以上、本研究では、E-cadherin の過剰発現によって EpiSCs 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、その結果引き起こされる LIF-STAT3 シグナルの活性と  $\beta$ -catenin の核内移行の抑制が変換効率向上の要因であることを明らかにした。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は、未だ不明な点が多い多能性制御機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。