

# 博士論文

多能性幹細胞への初期化機構の解析と

経済的な心筋分化誘導法の開発

(Analysis of reprogramming process to pluripotent  
stem cells and development of the economical  
myocardial differentiation method)

2023年9月

立命館大学大学院生命科学研究科

生命科学専攻博士課程後期課程

石田 智明

立命館大学審査博士論文

多能性幹細胞への初期化機構の解析と  
経済的な心筋分化誘導法の開発

(Analysis of reprogramming process to pluripotent  
stem cells and development of the economical  
myocardial differentiation method)

2023 年 9 月

September 2023

立命館大学大学院生命科学研究科  
生命科学専攻博士課程後期課程

Doctoral Program in Advanced Life Sciences

Graduate School of Life Sciences

Ritsumeikan University

石田 智明

ISHIDA Tomoaki

研究指導教員：川村 晃久 教授

Supervisor : Professor KAWAMURA Teruhisa

# 目次

略語.....	2
要旨.....	4
第1章 緒言	
1.1. 幹細胞と再生医療.....	6
1.2. 多能性幹細胞の医療応用.....	7
1.3. 多能性幹細胞の作製とその分化制御.....	8
第2章 miR-17-92 cluster と iPS 細胞形成との関わり	
2.1. 背景.....	9
2.2. 実験方法と材料.....	11
2.3. 実験結果.....	20
2.4. 結果のまとめ.....	39
第3章 多能性幹細胞からの心筋分化誘導における人工 Wnt3a キメラ受容体の応用	
3.1. 背景.....	41
3.2. 実験方法と材料.....	47
3.3. 実験結果.....	53
3.4. 結果のまとめ.....	77
第4章 考察	
4.1. miR-17-92 とその標的遺伝子 <i>Pten</i> 、 <i>p21</i> の iPS 細胞形成における役割.....	78
4.2. 人工 Wnt3a キメラ受容体の細胞分化制御における意義.....	79
4.3. 多能性幹細胞の安全かつ効率的な医療応用へ向けて.....	80
第5章 結語.....	82
謝辞.....	83
参考文献.....	84

## 略語

APC, adenomatous polyposis coli

BMP, bone morphogenetic protein1

BSA, bovine serum albumin

CAG, cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$  actin

cDNA, complementary DNA

ceRNA, competing endogenous RNA

ChIP, chromatin immunoprecipitation

CRD, cysteine-rich domain

CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DAB, diaminobenzidine

DAPI, 4', 6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DAVID, Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery

Dkk, Dickkopf1

EB, embryoid body

EGF, epidermal growth factor

ES, embryonic stem

4F, four-factor

FL, Fluorescein

FZD, Frizzled

FZD8L, FZD8 with long extracellular domain

FZD8S, FZD8 with short extracellular domain

GO, Gene ontology

GSK3, glycogen synthase kinase 3

iPS, induced pluripotent stem

IRES, internal ribosome entry site

LDLR, low-density lipoprotein receptor

LIF, leukemia inhibitory factor

LRP, low-density-lipoprotein receptor-related protein

LRP6L, LRP6 with long extracellular domain

LRP6M, LRP6 with middle extracellular domain

LRP6S, LRP6 with short extracellular domain

miRNA, microRNA

MEF, mouse embryonic fibroblast

PCP, planar cell polarity

PCR, polymerase chain reaction

scFv, single-chain fragment variable

S.D., standard deviation

sgRNA, short guide RNA

TCF, T cell factor

UTR, untranslated region

## 要旨

幹細胞は自己と同一の細胞を産生する自己複製能、自己と異なる細胞を産生する分化能を兼ね備えた細胞である。幹細胞の中でも、胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞、人工多能性幹 (induced pluripotent stem, iPS) 細胞は多能性幹細胞と呼ばれ、欠損あるいは機能喪失した生体組織に対する再生医療の新たな細胞供給源として強い期待が寄せられている。

iPS 細胞は、体細胞を培養皿上で初期化し作製することが出来るが、その作製効率の低さやがん化のリスクといった課題を抱えている。そこで、本論文の前半では、microRNA (miRNA) による iPS 細胞形成における遺伝子発現制御に着目した研究結果をまとめた。未分化な多能性幹細胞で高発現する miR-17-92 cluster において、その過剰発現は iPS 細胞形成を促進し、発現阻害は iPS 細胞形成を抑制した。また、*in silico* 解析及びマイクロアレイ解析の結果から、miR-17-92 cluster を構成する miRNA のうち、miR-17 及び miR-20a が共通の標的としてがん抑制遺伝子 *Pten* 及び *p21* にはたらきかけ iPS 細胞形成に関与していることが見い出された。さらに、PTEN mRNA と p21 mRNA は miR-17-92 cluster に対する競合内因性 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) として iPS 細胞形成の抑制因子であることも示唆された。

さらに、再生医療への応用にあたっては多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞からの効率的かつ経済的な分化誘導法の開発が肝要である。心筋再生に関しては、分化誘導早期の古典的 Wnt 経路活性化による心筋分化の促進が報告されている。一方、Wnt タンパク質の精製は費用が大きいため、経済的な心筋分化誘導法の開発にも期待が寄せられている。そこで、本論文の後半では安価な代替リガンドに対する一本鎖の抗体断片 (single-chain fragment variable, scFv) を含む人工 Wnt3a キメラ受容体を構築し、これを安定発現させた ES 細胞から効率的な心筋分化誘導が可能か否かを検証した研究結果をまとめた。人工 Wnt3a キメラ受容体を導入した ES 細胞を代替リガンドで刺激した結

果、自己拍動を呈する胚様体（embryoid body, EB）の割合が増加し、心筋マーカー遺伝子の発現増加やカルシウムオシレーションを認めた。以上の結果から、本研究で構築した人工 Wnt3a キメラ受容体は、効率的かつ経済的に多能性幹細胞を心筋細胞へ分化誘導するのに有用なツールとなることが示された。

以上より、本論文は、iPS 細胞の効率的な作製に向けた miR-17-92 cluster を介した初期化制御機構について、多能性幹細胞の経済的な心筋分化誘導に向けた人工キメラ受容体の応用について、それぞれ研究成果を示すものであり、多能性幹細胞を用いた再生医療の促進に寄与すると考えられる。

# 第1章 緒言

## 1.1. 幹細胞と再生医療

疾患や傷害により喪失した生体組織を細胞や生体材料などによって再生・修復する医療を「再生医療」と呼ぶ。再生医療では生体の損傷あるいは欠損部位の機能を回復するに足る十分量の細胞を準備する必要がある、その細胞リソースとして「幹細胞」が着目されてきた。幹細胞とは、自己と同一の細胞を産生する自己複製能、自己と別種の細胞を産生する分化能を併せもつ細胞のことであり、生体組織中に存在する幹細胞を成体幹細胞と呼ぶ。成体幹細胞は組織幹細胞とも呼ばれ、骨髄中に存在する造血幹細胞、脳の側脳室の脳室下帯及び海馬歯状回の顆粒細胞下帯に存在する神経幹細胞などが知られている。生体組織中の組織幹細胞は前駆細胞の供給源として機能することで各組織の機能維持や修復を司っており、例えば、造血幹細胞は赤血球や白血球、血小板に分化することで造血を、神経幹細胞は神経細胞やグリア細胞に分化することで脳の機能維持を担っている。また、間葉系幹細胞と呼ばれる組織幹細胞は骨髄や骨格筋など複数の組織に存在し、中胚葉由来の細胞への分化能（多分化能）を有する（Liechty et al., 2000）。脂肪組織から採取される間葉系幹細胞は脂肪組織由来幹細胞と呼ばれ、脂肪細胞をはじめとする中胚葉由来の細胞へ分化可能である。脂肪組織由来幹細胞は脂肪吸引手術によって安全に十分量の細胞を採取することができる一方で、組織幹細胞は存在する組織によっては採取が困難な場合がある。また、特定の細胞種へのみ分化可能であるという点から、組織幹細胞は再生医療に求められる分化細胞の供給源としての利便性に欠ける。



## 1.2. 多能性幹細胞の医療応用

成体幹細胞が抱える課題を解決できる新たな細胞源として、多能性幹細胞が挙げられる。多能性幹細胞は自己複製能に加え、培養条件によって三胚葉性の細胞種に分化する能力（多能性）を有する幹細胞のことである。代表的な多能性幹細胞として知られる ES 細胞は、1981 年にマウス胚から樹立された（Evans and Kaufman., 1981; Martin., 1981）。1998 年にはヒト ES 細胞がはじめて樹立され（Thomson et al., 1998）、2000 年代にはカニクイザル ES 細胞が樹立された（Suemori et al., 2001）。その後、複数のグループがヒト ES 細胞の樹立に成功した（Cowan et al., 2004; Suemori et al., 2006）。ES 細胞はその樹立過程において受精卵を破壊する必要があることから、ES 細胞の医療応用にあたっては倫理的問題が存在する。また、ES 細胞由来の細胞を患者に移植する場合、他家移植となることからドナーとレシピエント間の主要組織適合遺伝子複合体の相違による免疫拒絶反応が起こるという問題がある。

これら ES 細胞が抱える課題の解決に向けて、2006 年にマウスの線維芽細胞に 4 種類の転写因子（Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc）を強制的に発現させることで ES 細胞と同等の性質を有する多能性幹細胞が樹立され、この新たな多能性幹細胞は人工多能性幹細胞（iPS 細胞）と命名された（Takahashi and Yamanaka, 2006）。体細胞から iPS 細胞への転換を促進する 4 種類の転写因子は初期化 4 因子（four-factor, 4F）と呼ばれ、2007 年にはヒトの線維芽細胞に 4F を導入することでヒト iPS 細胞が樹立されることが報告された（Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007）。iPS 細胞は、樹立過程で受精卵を破壊する必要がなく、また自己の体細胞を用いることで免疫拒絶の課題を解決することができる。

### 1.3. 多能性幹細胞の作製とその分化制御

多能性幹細胞由来の分化細胞を再生医療に応用する場合、十分量の多能性幹細胞を作製することに加え、それらを機能的に成熟した細胞へ分化誘導することが必要不可欠である。

先述した通り、iPS 細胞は体細胞に 4F を導入することで樹立することが可能である。しかしながら、iPS 細胞が形成される効率は数%未満と低いことが知られている。医療応用を目指した十分量の iPS 細胞の供給を実現するにあたり、体細胞から iPS 細胞が形成される過程（初期化過程）の分子機構の詳細を明らかにすることが重要である。また、多能性幹細胞由来の分化細胞を移植する際、移植片に未分化な多能性幹細胞が混入していた場合は移植後の組織内で腫瘍を形成するリスクが生じる。特に、iPS 細胞ではその作製にあたり初期化因子としてがん原遺伝子 c-Myc を用いることから、iPS 細胞由来の移植片はがん化の危険性を常に抱えている。これらの課題を解決するために、胚発生のメカニズム研究に基づき、多能性幹細胞の分化誘導法の検討がなされてきた。例えば、種々の成長因子を介したシグナル伝達を制御することで多能性幹細胞から心筋細胞を効率的に分化誘導することが可能であることが明らかにされている (Protze et al., 2019)。一方で、複数種の組換えタンパク質や低分子化合物の利用は高コストとなることから、経済的かつ効率的な多能性幹細胞の分化誘導法の開発に期待が寄せられている。

以上のことから、本博士論文の第 2 章では、iPS 細胞の効率的な作製に向けて、初期化過程における miR-17-92 cluster の役割に着目した研究について論じた。第 3 章では、多能性幹細胞の効率的かつ経済的な分化誘導法の開発に向けて、古典的 Wnt 経路を活性化する人工キメラ受容体の構築と、これを導入した多能性幹細胞からの心筋分化誘導について論じた。これらの研究は多能性幹細胞の医療応用における種々の問題点の解決に寄与するものとして極めて意義の深いものと考えられる。

## 第2章 miR-17-92 cluster と iPS 細胞形成との関わり

### 2.1. 背景

#### 2.1.1. iPS 細胞について

線維芽細胞などの体細胞へ初期化 4 因子 (4F) を導入することで iPS 細胞を樹立することができる (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007)。4F の導入により、体細胞において核内の遺伝情報が初期化され、ES 細胞と同等の自己複製能と多分化能 (多能性) が獲得される。胚盤胞の内部細胞塊から樹立される ES 細胞と比較して、自己由来の体細胞から樹立される iPS 細胞は倫理的懸念が少なく、免疫拒絶の問題も克服される。さらに、患者由来の体細胞から作製される iPS 細胞は疾患に関連する遺伝情報を保持していることから、再生医療以外にも、創薬スクリーニングや病態解析への応用をはじめとして、先進医療の発展に大きく寄与している。しかしながら、iPS 細胞への初期化効率の低さやがん化のリスクといった課題について、十分に解決されたとは言えない。これらの課題解決には、体細胞から iPS 細胞への初期化の分子機構に関する検証が必要不可欠である。

#### 2.1.2. iPS 細胞への初期化における miRNA の役割について

iPS 細胞への初期化過程では、細胞の機能的・形態的变化に加え、網羅的な遺伝子発現の変化が生じる。iPS 細胞形成に必要な遺伝子発現の変化は、転写に関わるエピゲノムの変化だけでなく転写後の遺伝子発現制御に重要な非コード RNA の発現が関与することが知られている。miRNA は非コード RNA の一種で、タンパク質をコードしない長さ 20 塩基前後の小分子 RNA である。RNA ポリメラーゼによって pri-miRNA が転写されると、核内エンドヌクレアーゼ Drosha と二本鎖 RNA 結合タンパク質 DGCR8 からなる複合体によって切断され、pre-miRNA が生成される。次に核輸送タンパク質である

Exportin-5 により細胞質に輸送され、pre-miRNA は Dicer によって、短い二本鎖 RNA に切断される。この二本鎖 RNA のうち片方が miRNA として機能して、メッセンジャー RNA (mRNA) の分解及び翻訳阻害をすることにより、標的遺伝子の発現が負に制御される。miRNA は遺伝子の発現調節を介して、多くの生命現象に関わっていることが知られており、近年の研究から iPS 細胞形成においても重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。

### 2.1.3. iPS 細胞形成と miR-17-92 cluster との関わり

miR-17-92 cluster は、ゲノム上の特定の領域から 6 つの miRNA が同時に転写される miRNA 群であり、それぞれ miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a、miR-19b、miR-92 が発現する領域が密集しクラスターを形成している (Hayashita et al., 2005)。これらの miRNA 群 (miR-17-92) は、B 細胞リンパ腫や肺癌において発現上昇しており、細胞増殖やアポトーシスに関わっているとの報告もなされている (Hayashita et al., 2005)。また、神経前駆細胞において、癌抑制遺伝子 *PTEN* などの発現を負に制御することで、幹細胞の性質の維持や増殖能に関与していることを報告されている (Liu et al., 2013)。さらに、miR-17-92 は多能性幹細胞である ES 細胞において高発現していることも知られている (Jouneau A et al., 2012)。しかしながら、ES 細胞と同様な性質を持つ iPS 細胞において、その形成過程である初期化における miR-17-92 の果たす役割については不明な点が多い。

### 2.1.4. 研究目的

第 2 章では、初期化過程において miR-17-92 が iPS 細胞形成に果たす役割を明らかにすることを目的とする。はじめに、miR-17-92 の上流として c-Myc による発現制御機構を解析し、次に、初期化過程における miR-17-92 の下流標的 mRNA 群の同定とこれらの mRNA の競合的關係についても検証を行った。

## 2.2. 実験方法と材料

### 2.2.1. プラスミド構築

マウス iPS 細胞の誘導に必要な初期化因子を遺伝子導入するためのレトロウイルスベクターを作製するプラスミドとして、pMX-mouse Oct4、pMX-mouse Sox2、pMX-mouse Klf4、pMX-mouse c-Myc、pMX-null (Kawamura et al., 2009) を用いた。miR-17-92 cluster を発現するレンチウイルスベクターを作製するためのプラスミドは、マウスゲノムより polymerase chain reaction (PCR) により cluster 領域を増幅させて過去の報告に従って構築した (Liu et al., 2013)。miRNA を単独で発現するプラスミドは pEGP を用いて作製し、この発現カセットをレンチウイルスベクター作製のプラスミドへも移し変えた。3'側非翻訳領域 (3' untranslated region, UTR) のレポータープラスミドについては、PTEN mRNA 及び p21 mRNA の 3' UTR に該当する領域をマウスゲノムから PCR により増幅して、ホタルルシフェラーゼあるいは赤色蛍光タンパク質 DsRed2 の遺伝子の終止コドンの後に結合させ、これを pcDNA3 のクローニングサイトに挿入して作製した。さらに、PTEN 3' UTR については a~f の 6 つの領域に区分して PCR で増幅し、これらをホタルルシフェラーゼあるいは赤色蛍光タンパク質 DsRed2 の遺伝子の終止コドンの後に挿入してレポータープラスミドを作製した。また、miR-17-92 の吸着を目的としたベクターについては、DsRed2 遺伝子と 3' UTR を発現するカセットをレンチウイルスベクター作製のプラスミドへ挿入することで作製した。

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /Cas9 システムによるゲノム編集で用いるレンチウイルスベクターは、pLentiCRISPR プラスミド (Addgene) を用いて作製した。このプラスミドに搭載されている Cas9 の塩基配列には、化膿レンサ球菌由来 Cas9 の complementary DNA (cDNA) に核移行シグナルと Flag tag をコードする塩基配列が付加されている。さらに、口蹄疫ウイルス由来 P2A 配列を介して Puromycin 耐性遺伝子も同時に発現する。また、同一のベクターから U6 プロモーター

の制御下に short guide RNA (sgRNA) も発現するシステムとなっている。過去の論文に従い (Sanjana et al., 2014)、目的の sgRNA に該当するセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチド鎖をアニーリングさせ、これを pLentiCRISPR の *BsmBI* サイトへ挿入してプラスミドを構築した。目的のゲノム領域に二本鎖切断を誘導するための sgRNA の塩基配列に関しては、CRISPR design tool (<https://crispr.dbcls.jp/>) を用いて設計した。

### 2.2.2. 細胞培養

C57BL/6 系統の野生型マウスにおける胎生 13.5~14.5 日の胎仔から mouse embryonic fibroblasts (MEFs) を採取して初期化誘導に用いる体細胞とした。この MEFs の初代培養は、基本培地 Dulbecco's modified eagle Medium (ナカライテスク) に fetal bovine serum (ニチレイバイオサイエンス)、L-glutamine (GlutaMAX, GIBCO)、Penicillin-Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬) を含む培地を用いて行った。また、MEF の継代回数は 3~6 回の範囲内で実験を施行した。iPS 細胞への初期化誘導法については、基本的に過去の報告に従い実施した (Kawamura et al., 2009; Kida et al., 2015)。簡潔に述べると、初期化 4 因子である Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc を発現するレトロウイルスベクターを製作するために、これらの遺伝子発現カセットを組込んだ pMX プラスミドを HEK293T 系 packaging 細胞に Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて一過性発現させた。2 日後、この Packaging 細胞の培養上清を採取して 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターにて濾過し、ポリブレン (Sigma-Aldrich) を添加したものを MEFs に感染させた。レンチウイルスベクターによる遺伝子導入実験は、HEK293T 系 packaging 細胞を用いて上記と同様の方法にて行った。感染 2 日目に新しい培養プレートに再播種し、培地に 1000 unit/mL の白血病阻止因子 (leukemia inhibitory factor, LIF、和光純薬工業) を添加して培養を施行した。未分化マウス ES 細胞 (CGR8 系統細胞株) 及び未分化マウス iPS 細胞 (Kawamura et al., 2009) も、LIF (Chemicon) を終濃度 1000 unit/mL になるよう添加した培地の中で培養した。MEFs 及び HEK293T 細胞の培養、iPS 細胞の誘導と未分化維持のための培養、未分化 ES 細胞の培養で用いた培地の組成は表 1 に示す。すべての細胞培養は 37 °C、20% O<sub>2</sub>、

5% CO<sub>2</sub> の条件下で十分量の湿度のもと、専用の細胞培養器内で行った。

表 1. MEF と HEK293T 細胞の培養及び iPS 細胞の誘導で用いた培地組成

MEF、HEK293T 細胞培養培地

	終濃度
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, ナカライテスク)	
Fetal Bovine Serum (ニチレイバイオサイエンス)	10%
GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)	1%
Penicillin-Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬)	1%

マウス iPS 細胞培養培地

	終濃度
Dulbecco's Modified Eagle Medium (ナカライテスク)	
KnockOut Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific)	7.5%
Fetal Bovine Serum (ニチレイバイオサイエンス)	5%
GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)	1%
Penicillin-Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬)	1%
100 mmol/L Sodium Pyruvate Solution (富士フィルム和光純薬)	1 mmol/L
MEM NEAA (Thermo Fisher Scientific)	1%
EmbryoMax® Nucleosides (Merck Millipore)	1%
2-Mercaptoethanol 55 mmol/L in D-PBS (Thermo Fisher Scientific)	0.2%

マウス ES 細胞の培養で用いた培地組成

	終濃度
Dulbecco's Modified Eagle Medium (ナカライテスク)	
Fetal Bovine Serum (ニチレイバイオサイエンス)	10%
GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific)	1%
Penicillin-Streptomycin Solution (富士フィルム和光純薬)	1%
100 mmol/L Sodium Pyruvate Solution (富士フィルム和光純薬)	1 mmol/L
MEM NEAA (Thermo Fisher Scientific)	1%
EmbryoMax <sup>®</sup> Nucleosides (Merck Millipore)	1%
2-Mercaptoethanol 55 mmol/L in D-PBS (Thermo Fisher Scientific)	0.2%



### 2.2.3. 定量 RT-PCR

目的の培養細胞から全 RNA を Tripure Isolation Reagent (SIGMA) を用いて回収した。その後、miRNA に対する発現量解析では、10~500 ng の Total RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription kit と TaqMan microRNA assay の 5×プライマーを用いて逆転写を行い、逆転写反応物 1.33  $\mu$ L に TaqMan microRNA assay の 20×プライマー 1  $\mu$ L、TaqMan Universal PCR Master Mix を 17.67  $\mu$ L 加え、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fischer Scientific) を用いて定量解析を行った。mRNA に対する発現量解析では、10~500 ng の Total RNA を High capacity cDNA Reverse Transcription kit と kit 付属のプライマーを用いて逆転写を行い、逆転写産物を 2  $\mu$ L、10  $\mu$ M のプライマーを 0.6  $\mu$ L、SYBR Green (SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) を 7.5  $\mu$ L に蒸留水を加え total 15  $\mu$ L にして、StepOnePlus リアルタイム PCR システムを用いて解析した。

### 2.2.4. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

miR-17-92 転写開始点より上流約 2.1 kb の領域の制御下にホタルルシフェラーゼ遺伝子を発現するレポータープラスミド 0.16  $\mu$ g、初期化 4 因子を発現するプラスミド合計 0.34  $\mu$ g、インターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を搭載した pSV40 Renilla-luc 0.0016  $\mu$ g を、Lipofectamine 2000 (Thermo Fischer Scientific) または、Polyethylenimine Max (Polysciences) を用いて MEFs または HEK293T 細胞へトランスフェクションした。3' UTR ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いた実験も同様に、ホタルルシフェラーゼ遺伝子を搭載したレポータープラスミド、miRNA を発現するプラスミド、インターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼを搭載した pSV40 Renilla-luc を HEK293T 細胞にトランスフェクションした。これらの細胞は、翌日培地を交換し一晩培養を継続した後、ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット (TOYO INK GROUP) を用いて回収し、ルミノメーター (Promega) を用いて発光強度を測定した。

### 2.2.5. クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP assay)

培養細胞に終濃度 1%になるようにホルムアルデヒドを加え、10 分間反応させ細胞を固定した。終濃度 125 mM になるようにグリシンを加えて反応を停止させ、リン酸緩衝生理食塩水 D-PBS(-)で 2 回洗浄した後、セルスクレーパーで細胞を回収した。回収した細胞ペレットを LB1 (50 mM HEPES pH7.9, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.5% NP-40, 0.25% Triton-X100, 10% Glycerol, 1 mM PMSF) に懸濁した。4°Cで 10 分間反応後、細胞質タンパク質を除去し、LB2 (10 mM Tris-HCl pH8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1 mM PMSF) で洗浄してから、LB3 (50 mM Tris-HCl pH7.6, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton-X100, 0.1% SDS, 1× Protease inhibitor cocktail) に懸濁し、4°Cで 10 分間反応させ核抽出液を採取した。次に、ゲノム DNA が 200~1000 bp になるように超音波破碎してから遠心分離し (1200 g, 4 °C, 10 分間)、上清を input として使用した。ChIP 反应用サンプルには、mouse normal IgG もしくは anti-Flag M2 IgG と Protein G が結合した抗体結合ビーズを LB3 と共に加えて 4°C overnight で反応させた。その後、ビーズを Low Salt buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X100, 0.1% SDS) で 1 回、High Salt buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton-X100, 0.1% SDS) で 2 回、RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1.0% NP-40, 0.1% SDS) で 4 回、TE50 buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA) で 1 回洗浄後、Elution buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 2 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁し振盪させながら 65°Cで 20 分間反応させて溶出し上清を ChIP 反応済サンプルとした。さらに、65°C overnight で反応後、RNase A を加えて 50°C で 1 時間、Proteinase K を加え 50°Cで 2 時間反応させた。最後に、PCR purification kit を用いて DNA を精製して定量 PCR により解析を行った。

### 2.2.6. 免疫染色 (ABC 法)

初期化効率を評価するために、4F 導入後 9~15 日目の培養細胞に多能性幹細胞特異

的マーカーNanog に対する免疫染色を、Avidin/Biotin Blocking kit (Vector Laboratories) 及び Diaminobenzidine (DAB) を発色基質とした DAB Substrate kit (Vector Laboratories) を用いて、過去の報告に沿って施行した (Kawamura T et al., 2009)。簡潔に述べると、iPS 細胞誘導を行った培養プレートから培地を除去して、D-PBS(-) (富士フィルム和光純薬) で1回洗浄したのち、10% ホルマリン溶液 (ナカライテスク) を D-PBS(-)で10倍希釈したものに室温、15分間浸すことで細胞を固定した。0.5% TritonX-100 (富士フィルム和光純薬) を終濃度 0.5%に D-PBS(-)で希釈した溶液を用いて室温、15分間の透過処理を行った。その後、過酸化水素水 (富士フィルム和光純薬) をメタノール (ナカライテスク) で終濃度 0.3%となるように希釈したもので室温、15分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した。次に、5%ウシ血清由来アルブミン (bovine serum albumin, BSA、富士フィルム和光純薬) でブロッキング反応を室温、45分間行い、Avidin と Biotin に対するブロッキング反応を市販キット推奨のプロトコルに沿って行った。一次抗体として Rabbit anti-mouse Nanog antibody (Cell Signaling Technology, 1:2000 希釈) を用いて 4 °C overnight で反応させた後、Biotin-conjugated anti-rabbit IgG antibody (Vector Laboratories, 1:1000 希釈) を用いた二次抗体反応を室温 45分間行い、Streptavidin-HRP complex (Vector Laboratories, 1:1000 希釈) で室温 30分間反応させた。最後に、DAB 溶液とサンプルを室温で 15~25分間程度反応させ、染色の濃淡が明瞭になった時点で、蒸留水で洗浄して反応を停止させた。

#### 2.2.7. DNA マイクロアレイ解析とデータベースによる *in silico* 解析

初期化誘導過程の細胞から全 RNA を TRIzol reagent (Thermo Fischer Scientific) を用いて抽出し、Ambion WT Expression Kit (Thermo Fischer Scientific) を用いて cDNA を調製した。キット推奨のプロトコルに従って、cDNA サンプルを GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array (Affymetrix) にハイブリダイゼーションさせた後、GeneChip Scanner (Affymetrix) を用いて画像化し、各条件間の発現差異についてデータを Expression Console software

(Affymetrix) により解析した。Cluster 3.0 software を用いて、ヒートマップの可視化のために階層的クラスタリングを行った。Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) software を用いて、Gene ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。miRNA の標的遺伝子を同定する目的として、3' UTR における miRNA 結合サイトを探索するためのデータベースとして、miRDB、miRanda、TargetScan を用いた。

### 2.2.8. Western blotting 法

目的の培養細胞からタンパク質を 2× SDS Lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH6.8、4% SDS) で可溶化した。回収した Lysate は超音波破碎によりゲノム断片化を行い、BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質濃度を計測した。Lysate はグリセロール、bromophenol blue、2-mercaptoethanol を含む溶液で混合して 95 °C、5 分間の熱処理を行った。タンパク質の分離については、10%または 12%のポリアクリルアミドゲルを用いてゲル 1 枚当たり 15 mA、約 100 分間の電気泳動にて行い、続いて、ニトロセルロースメンブレンに 90 V、60 分間で転写した。転写後のメンブレンは Ponceau Red (和光純薬工業) に室温で 1 分間浸して染色し、転写効率の確認を行った。メンブレンは一次抗体で反応 (4°C overnight) させた後、二次抗体で反応させ (室温 45 分間)、Pierce Western Blotting substrate (Thermo Fisher Scientific) によりシグナルを可視化し、LAS-4000 (Fuji Film) で検出した。一次抗体は、Anti-PTEN antibody (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈)、Anti-p21 antibody (Santa Cruz Biotechnology、1:1000 希釈)、Anti-β-actin antibody (SIGMA、1:5000 希釈)、Anti-histone H3 antibody (Cell Signaling Technology、1:1000 希釈) を用いた。

### 2.2.9. Cre リコンビナーゼコンディショナルノックアウトシステム

Cre リコンビナーゼコンディショナルノックアウトシステム (Cre/loxP システム) と

は loxP 配列と呼ばれる DNA 配列に対してバクテリオファージ P1 由来の DNA 組換え酵素 Cre リコンビナーゼがはたらくことにより生じる部位特異的組換え反応を利用した遺伝子組換え実験系である。Cre リコンビナーゼを発現させると、相同組換えにより loxP 配列で挟まれたゲノム領域が欠失して目的遺伝子が欠損する。第 2 章の研究では Cre により *Pten* 遺伝子のエキソンが欠失する *Pten*<sup>lox/lox</sup> MEF を用いた。

#### 2.2.10. 統計解析

2 群間の統計解析は Student's *t*-test により、3 群間の統計解析は Tukey–Kramer test により施行した。統計解析を施したデータは標準偏差 (standard deviation, S.D.) を伴う平均値で表され、 $p < 0.05$  であった際に統計的に有意な差があると判定した。

## 2.3. 実験結果

### 2.3.1. 初期化誘導過程における miR-17-92 の発現上昇

はじめに、4F による初期化誘導過程で発現が亢進する miRNA をマイクロアレイ解析により検索したところ、miR-17-92 cluster に属する miRNA 群 (miR-17-92) の発現量が亢進していることが確認された (図 1A)。次に、MEFs に初期化因子を単独あるいは 4F により導入して 5 日目における miR-17-92 の発現量を調べる目的で、miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a に関して定量 RT-PCR 法を用いた解析を行った。その結果、mock (空ベクター) を感染させた細胞における発現量と比較して、Oct4、Sox2、Klf4 の単独感染では発現量がいずれも軽度減少したが、c-Myc 単独感染及び 4F を感染した細胞では ES 細胞や iPS 細胞と同程度まで発現量の上昇を認めた (図 1B)。これらの結果から、初期化因子の中で、c-Myc が miRNA-17-92 の発現を誘導している主な因子であることが示唆された。c-Myc は転写因子として機能するため、miR-17-92 の発現には転写開始点上流のプロモーター・エンハンサー領域への c-Myc の結合が重要であることが推測される。そこで、初期化誘導過程で miR-17-92 発現上昇に重要な c-Myc 結合領域の同定を試みた。miR-17-92 の転写開始 (0) から上流 2100 bp は哺乳類で保存性の高い塩基配列を示しており、region #1 (-9~-1151)、region #2 (-1146~-1696)、region #3 (-1674~-2159) の 3 つに分けて、それぞれに対するルシフェラーゼ発現レポータープラスミドを作製した。そして、mock、初期化因子単独、OSK (c-Myc を除く 4F)、あるいは 4F (OSKM) をそれぞれ強制発現させた MEF を用いて、ルシフェラーゼアッセイを施行した。その結果、region #2 において c-Myc による転写活性が高くなることを見出された (図 1C)。さらに、region #2 に c-Myc 結合モチーフ E-box 配列が確認されたため、これを変異させたレポータープラスミドを作製し、HEK293T 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。変異のない場合、c-Myc の発現によりルシフェラーゼ活性は 10 倍程度にまで上昇したのに対して、E-box 配列を変異させることで活性上昇は 2 倍程度まで抑えられ

た (図 2A)。以上の結果より、初期化誘導過程で miR-17-92 発現上昇に重要な c-Myc 結合部位を含む領域を同定することに成功した。

次に、この c-Myc 結合部位が miR-17-92 発現と iPS 細胞形成効率に及ぼす影響を検証する目的で、region #2 に存在する E-box 配列の両端を切断するような 2 種類の sgRNA/Cas9 発現レンチウイルスベクターを設計した。この CRSIPR/Cas9 システムが機能するか否かを確認する目的で、c-Myc を発現させた HEK293T 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより miR-17-92 の転写活性を検証した。予想通り、sgRNA/Cas9 を発現した場合のルシフェラーゼ活性は、mock と比較して有意に低下した (図 2B)。続いて、c-Myc と Flag の融合タンパクである c-Myc-Flag を含む 4F を MEF ヘトロウイルスベクターにより導入し、誘導 5 日目に ChIP assay を実施した。CRSIPR/Cas9 システムにより region #2 の E-box を欠損させることで、初期化誘導細胞における region #2 の c-Myc 結合 DNA 量は有意に低下した (図 2C)。最後に、Nanog に対する免疫染色を用いて iPS 細胞コロニー数を計測することで初期化効率を評価したところ、上記の初期化誘導細胞では E-box 欠損により初期化効率が有意に低下することが見いだされた (図 2D)。以上の結果から、4F による初期化誘導過程で c-Myc が miR-17-92 の発現を転写レベルで亢進させることが iPS 細胞形成に関与することが示された。

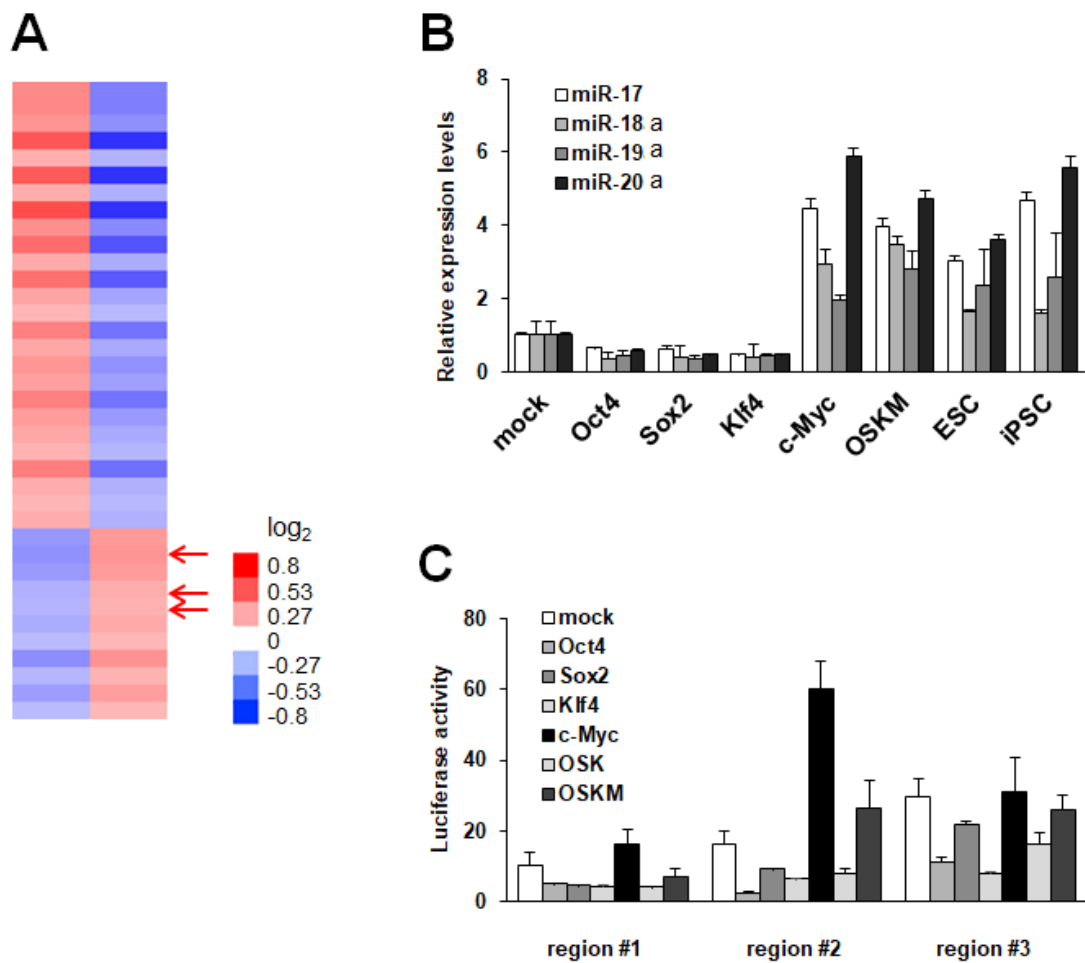


図 1. 初期化誘導過程で発現亢進する miRNA の解析と miR-17-92 の転写制御解析

(A) レトロウイルスベクターにより mock または 4F を MEF へ感染させた 5 日目の細胞から RNA を採取して、マイクロアレイにより miRNA の発現を解析した結果のヒートマップ。アレイ上に登録された miRNA のうち、mock (左レーン) と比べ 4F (右レーン) により発現亢進したものの中から、miR-17-92 cluster を構成するものを矢印で示す。

(B) 初期化誘導 5 日目における miR-17、miR-18a、miR-19a、miR-20a の発現量。

(C) MEF へ初期化因子を単独あるいは組みあわせて感染させた MEF におけるルシフェラーゼアッセイの結果。



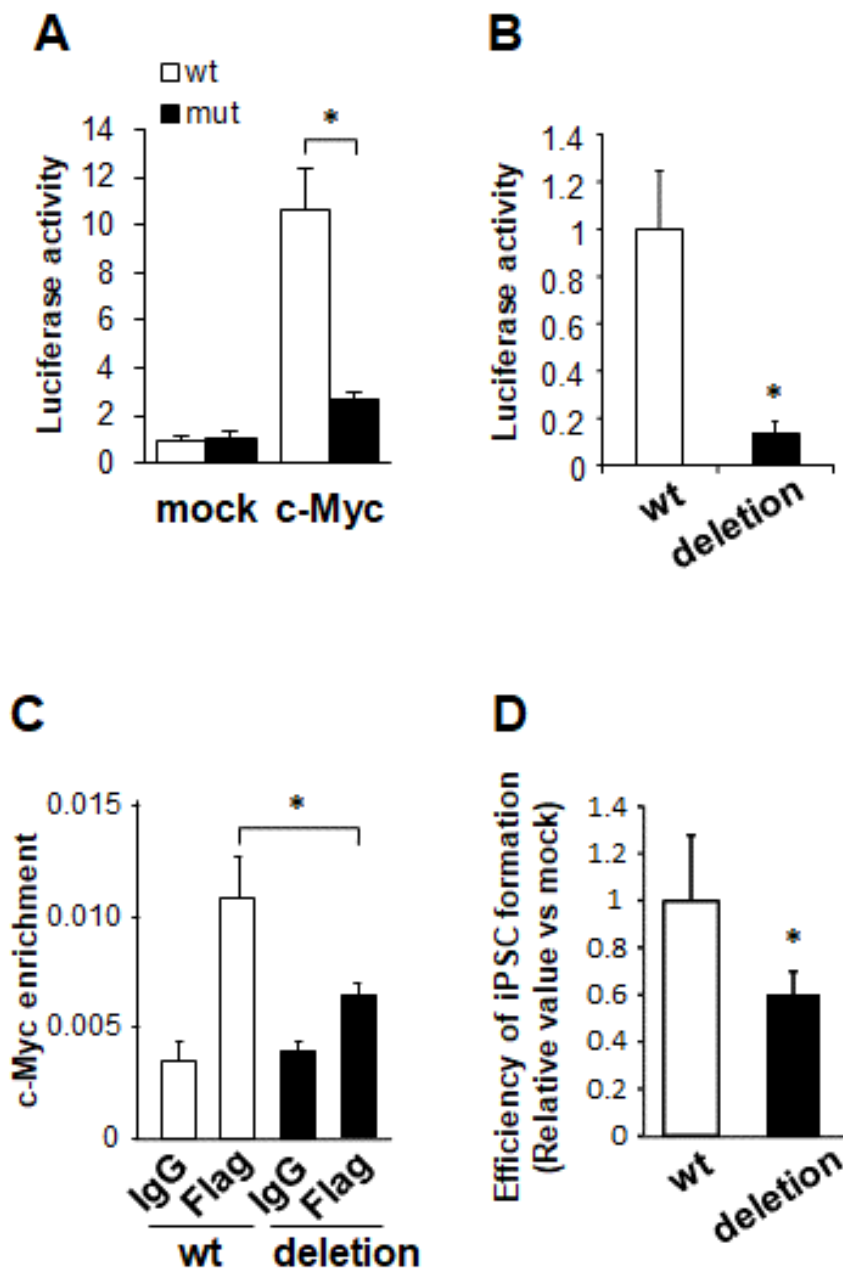


図 2. 初期化誘導過程における miR-17-92 の転写制御と iPS 細胞形成効率の解析

- (A) c-Myc 結合サイトの変異による miR-17-92 の転写活性の低下。
- (B) CRISPR/Cas9 で c-Mc 結合サイトを欠損させたルシフェラーゼアッセイの結果。
- (C) CRISPR/Cas9 で c-Mc 結合サイトを欠損させた ChIP assay の結果。
- (D) CRISPR/Cas9 で c-Mc 結合サイトを欠損させて誘導した iPS 細胞コロニー数。

### 2.3.2. miR-17-92 の共発現による iPS 細胞形成効率の増加

miR-17-92 を初期化因子と共発現させることにより、iPS 細胞形成効率が上昇するか否かを検証した。c-Myc を含まない OSK あるいは 4F (OSKM) はレトロウイルスベクターにより、mock または miR-17-92 はレンチウイルスベクターにより MEF へ共感染させて初期化誘導を行ったところ、予想通り、OSK 及び OSKM いずれの場合も miR-17-92 により Nanog 陽性 iPS 細胞コロニーの数は有意に増加した (図 3A, B)。増加する程度は、OSK に c-Myc を共感染させたときのほうが顕著であり、c-Myc の存在下では内因性の miR-17-92 が発現亢進するためと考えられる。しかし、miR-17-92 を構成する各 miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92) のうちどれが iPS 細胞形成に重要であるかは不明である。そこで、OSK に上記の各 miRNA を 1 つずつ加えて共感染させた場合の Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数を計測したところ、miR-17、miR-18a または miR-20a と共感染させた場合にコロニー数が増加する傾向がみられた (図 3C)。

次に、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム上の miR-17-92 cluster 領域を欠損させて iPS 細胞誘導効率を検証したところ、Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数は有意に減少した (図 3D)。続いて、miR-17-92 を欠損させて OSKM と共に miR-17-92 あるいは各 miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92) を感染させることで iPS 細胞を誘導する救済実験を施行したところ、miR-17-92、miR-17、miR-18a、miR-20a の共感染により有意な形成効率の上昇を認めた (図 3E, F)。この結果は、OSK に加えて miR-17-92 を強制発現させた場合と同様の結果であった。

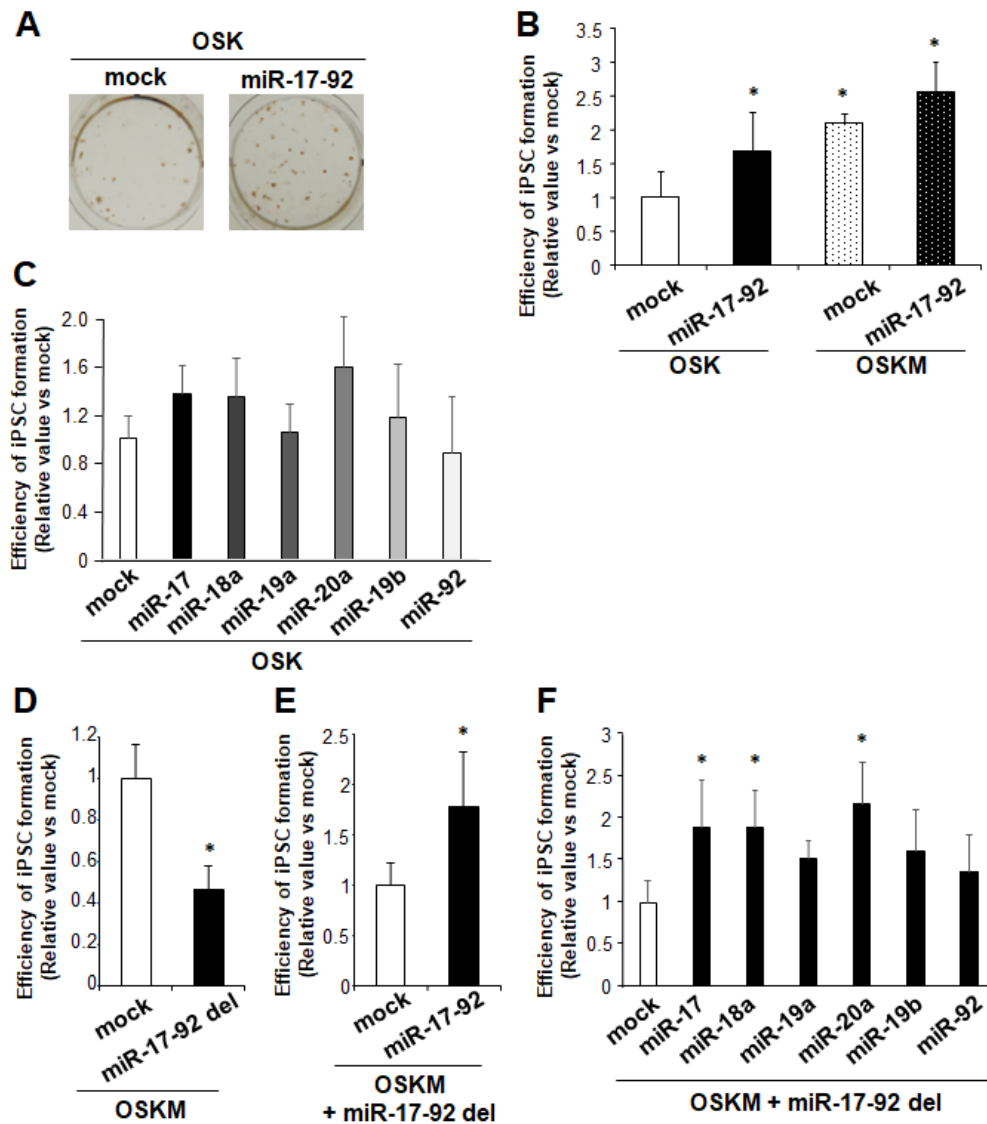


図3. miR-17-92 の過剰発現による iPS 細胞形成効率の亢進

(A, B) OSK あるいは OSKM に miR-17-92 を共発現させたときの iPS 細胞コロニー数 (OSK + mock に対して\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す)。

(C) OSK に各 miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92) を共発現させたときの iPS 細胞コロニー数 (エラーバーは S.D.を示す)。

(D) miR-17-92 欠損で OSKM による初期化誘導したときの iPS 細胞コロニー数 (\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す)。

(E, F) miR-17-92 欠損で OSKM と miR-17-92 (E) または各 miRNA (F) を共発現させたときの iPS 細胞コロニー数 (mock に対して\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す)。

### 2.3.3. 初期化誘導過程における miR-17-92 の標的遺伝子の探索

miR-17-92 を構成する各 miRNA の標的候補遺伝子を調べるため、バイオインフォマティクス的手法によって網羅的に探索した。4F あるいは mock を導入した細胞全体から RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。マイクロアレイにおいて 4F で発現亢進している遺伝子の中から、データベースを用いて miR-17-92 の各 miRNA の標的配列を有する候補遺伝子を抽出した (図 4A)。miR-17 と miR-20a は共通の標的配列をもち、4F で発現亢進する遺伝子のうち 221 個が標的候補であった。さらに、miR-18a の標的候補として 55 個、miR-19a/b の標的候補として 90 個、miR-92 の標的候補として 180 個の遺伝子が抽出された。これらの標的遺伝子の中で各 miRNA に共通する遺伝子は 2 個であり、このうちの 1 つにがん抑制遺伝子である *PTEN* が含まれていた (図 4B)。

さらに、それぞれの miRNA の標的遺伝子の生物学的機能に関して、DAVID を用いて GO\_term\_Direct に属する without children GO\_term\_Biological Process 毎に分類した (表 2.1~2.4)。各 miRNA の標的候補因子を GO term 毎に分類し、個数の大きいものから順に 20 個のカテゴリーを並べた (図 4C)。すると、miR-17-92 を構成する miRNA の中でも初期化効率促進効果の高い miR-17、miR-20a の標的配列を持つ因子群では、他の miRNA と比較して細胞周期制御関連の GO term に属する遺伝子群が豊富に存在することが示された。続いて、GO term を用いて「regulation of cell cycle」に属する遺伝子を調べたところ、miR-17-92 を構成する各 miRNA の標的候補が複数見付き、miR-17/miR-20a では 24 個の標的候補が見い出された (表 3.1~3.4)。



表 2.1. miR-17、miR-20a の標的遺伝子  
がもつ生物学的機能

Term	Count
regulation of transcription, DNA-templated	63
transcription, DNA-templated	57
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	31
multicellular organism development	24
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	18
cell differentiation	18
positive regulation of transcription, DNA-templated	17
negative regulation of transcription, DNA-templated	17
apoptotic process	16
cell cycle	13
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	12
positive regulation of cell proliferation	11
nervous system development	10
cellular response to DNA damage stimulus	10
heart development	9
negative regulation of cell proliferation	9
mRNA processing	8
regulation of cell cycle	7
negative regulation of gene expression	7
Wnt signaling pathway	6

表 2.2. miR-18a の標的遺伝子がもつ  
生物学的機能

Term	Count
transcription, DNA-templated	16
regulation of transcription, DNA-templated	16
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	8
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	6
multicellular organism development	6
nervous system development	5
apoptotic process	5
brain development	4
positive regulation of apoptotic process	4
dephosphorylation	3
neuron projection development	3
cellular response to magnesium ion	2
magnesium ion homeostasis	2
multicellular organismal response to stress	2
adult heart development	2
retinal ganglion cell axon guidance	2
startle response	2
positive regulation of osteoclast differentiation	2
endothelial cell migration	2
positive regulation of axonogenesis	2

表 2.3. miR-19a/b の標的遺伝子がも  
つ生物学的機能

Term	Count
regulation of transcription, DNA-templated	18
transcription, DNA-templated	15
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	9
intracellular signal transduction	7
positive regulation of transcription, DNA-templated	7
negative regulation of transcription, DNA-templated	7
protein phosphorylation	6
positive regulation of apoptotic process	5
memory	4
neuron projection development	4
brain development	4
membrane fusion	3
social behavior	3
skin development	3
learning	3
negative regulation of cell migration	3
post-embryonic development	3
positive regulation of cytoplasmic mRNA processing	2
body assembly	2
intracellular cholesterol transport	2
synapse maturation	2

表 2.4. miR-92 の標的遺伝子がもつ  
生物学的機能

Term	Count
regulation of transcription, DNA-templated	43
transcription, DNA-templated	42
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	24
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	19
multicellular organism development	14
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	13
positive regulation of transcription, DNA-templated	13
apoptotic process	11
phosphorylation	11
negative regulation of cell proliferation	9
brain development	8
positive regulation of gene expression	8
covalent chromatin modification	7
regulation of gene expression	7
nervous system development	7
rhythmic process	6
hippocampus development	5
cellular response to insulin stimulus	5
microtubule cytoskeleton organization	5
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	5

表 3.1. 細胞周期制御因子に関する miR-17/miR-20a の標的候補

GO: regulation of cell cycle

Arid4b	Myo9a
Bid	Plcb1
Ccnd1	<b>Pten</b>
<b>Cdkn1a</b>	Ptpn3
<b>(p21)</b>	Pura
Clock	Rb1
E2f2	Rbl2
Fzd3	Rpa2
Kat2b	Tal1
Kif13a	Trim37
Kif23	Trp53inp1
Mecp2	Ubxn2b
Myo19	

表 3.2. 細胞周期制御因子に関する miR-18a の標的候補

GO: regulation of cell cycle

Fam83d
Hecw2
Hnrnpu
L3mbtl
Mecp2
Plcb1
<b>Pten</b>
Trp53inp1
Ubxn2b

表 3.3. 細胞周期制御因子に関する miR-19a/b の標的候補

GO: regulation of cell cycle

Jmy
Mecp2
Notch2
<b>Pten</b>
Zfp207

表 3.4. 細胞周期制御因子に関する miR-92 の標的候補

GO: regulation of cell cycle

Btg2
Cdk6
Ddx3x
Fbxw7
Hnrnpu
Jmy
Kat2b
Kif4
Mdm4
<b>Pten</b>
Rad21
Rbl2
Stag2

#### 2.3.4. miR-17 と miR-20a による PTEN と p21 の発現抑制

先述の 24 個の候補のうち、各 miRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, miR-92) で共通の標的候補である PTEN と、miR-17/miR-20a の標的候補である Cyclin-dependent kinase inhibitor 1, p21 に着目して解析を行った。所属研究室を含むこれまでの先行研究から、p53-p21 経路を含むがん抑制遺伝子経路は iPS 細胞形成を負に制御していることが示している (Kawamura T et al., 2009)。また、p53-p21 経路上流の正の制御因子として PTEN が存在し、これが iPS 細胞形成を抑制していることも知られている (Liao et al., 2013)。はじめに、PTEN 及び p21 が miR-17-92 の標的であるか否かをルシフェラーゼアッセイにより検証した。

ルシフェラーゼ遺伝子の終止コドンの後ろに PTEN または p21 の 3' UTR を結合させたレポータープラスミドに、mock または miR-17-92 を発現するプラスミドを HEK 293T 細胞に発現させてルシフェラーゼによる発光強度を測定した。miRNA は標的遺伝子の mRNA 3' UTR に結合することで mRNA の分解や翻訳阻害を介して遺伝子発現を抑制することが知られているため、PTEN 3' UTR または p21 3' UTR に miR-17-92 の標的配列が存在する場合にはルシフェラーゼの活性が減少すると考えられる。実験の結果、予想通り、有意なルシフェラーゼ活性の低下が認められた (図 5A)。

次に、iPS 細胞誘導過程の各時相において miR-17-92 が如何に PTEN と p21 に対して抑制的に機能しているかを検証するため、PTEN 及び p21 の mRNA レベルとタンパク質レベルの変化を経時的に解析した。OSK に mock を共感染させたコントロール群と OSK に miR-17-92 を共感染させた初期化誘導細胞において、誘導 0、2、5、7、9、12 日目で RNA を回収した後、定量 RT-PCR を施行した。その結果、miR-17-92 を導入した iPS 細胞誘導群において、誘導 7 日目以降で PTEN の mRNA の発現が抑制され、誘導 5 日目以降で p21 の mRNA の発現が抑制された (図 5B)。また、誘導 0、5、7、9 日目でタンパク質を回収した後、PTEN 及び p21 に対する Western blotting を行ったところ、miR-17-92 を導入した初期化誘導細胞では、mRNA の発現パターンと連動して誘導 7 日



目以降で PTEN タンパク質の発現が、誘導 5 日目以降で p21 タンパク質の発現がそれぞれ抑制された。着目すべきは、p21 は誘導 5 日目で抑制されて誘導 7 日目で抑制が弱まるのに対して、PTEN では誘導 5 日目では抑制されずに 7 日目以降で抑制が強くなることが見い出された (図 5C)。

続いて、miR-17-92 を構成する各 miRNA のうち、どれが PTEN 及び p21 の発現抑制に関与しているかについて検討した。約 6.0 kb ある PTEN 3' UTR を 1.0 kb ずつ 6 つの領域 (a, b, c, d, e, f) に分けると、各領域 a~f に異なる miRNA の結合領域が存在し、生物種間で標的部位に高い保存性が認められた。p21 3' UTR は約 0.8 kb と短く、データベース上は miR-17 と miR-20a の結合配列のみが存在するが、少なくともげっ歯類では保存されていることが確認された。そこで、PTEN 3' UTR のうちどの領域が miR-17-92 の標的になっているかについて検証するため、PTEN 3' UTR の各領域をルシフェラーゼ遺伝子と繋げたレポータープラスミドを作製し、これを HEK 293T 細胞へ発現させて解析を行った。その結果、領域 a、e において miR-17-92 によるルシフェラーゼ活性の減少が見られた (図 5D)。領域 a、e には miR-17-92 を構成する各 miRNA が含まれており、特に miR-17、miR-20a は複数の標的配列をもち、miR-18a、miR-19a/b、miR-92 と比較して PTEN の発現抑制に強く関与していることが示された。

最後に、各 miRNA の発現プラスミドを作製し、PTEN 3' UTR 及び p21 3' UTR レポーターとともに強制発現させてルシフェラーゼ解析を行なった。PTEN 3' UTR レポーターを用いた場合、いずれの miRNA もルシフェラーゼ活性を低下させたが、miR-17 と miR-20a において有意な減少を認めた (図 5E)。また、p21 3' UTR レポーターを用いた場合、miR-17 と miR-20a のみ有意にルシフェラーゼ活性を減少させた (図 5F)。以上の結果から、miR-17-92 による PTEN と p21 の発現抑制は主に miR-17 と miR-20a を介していることが見い出された。

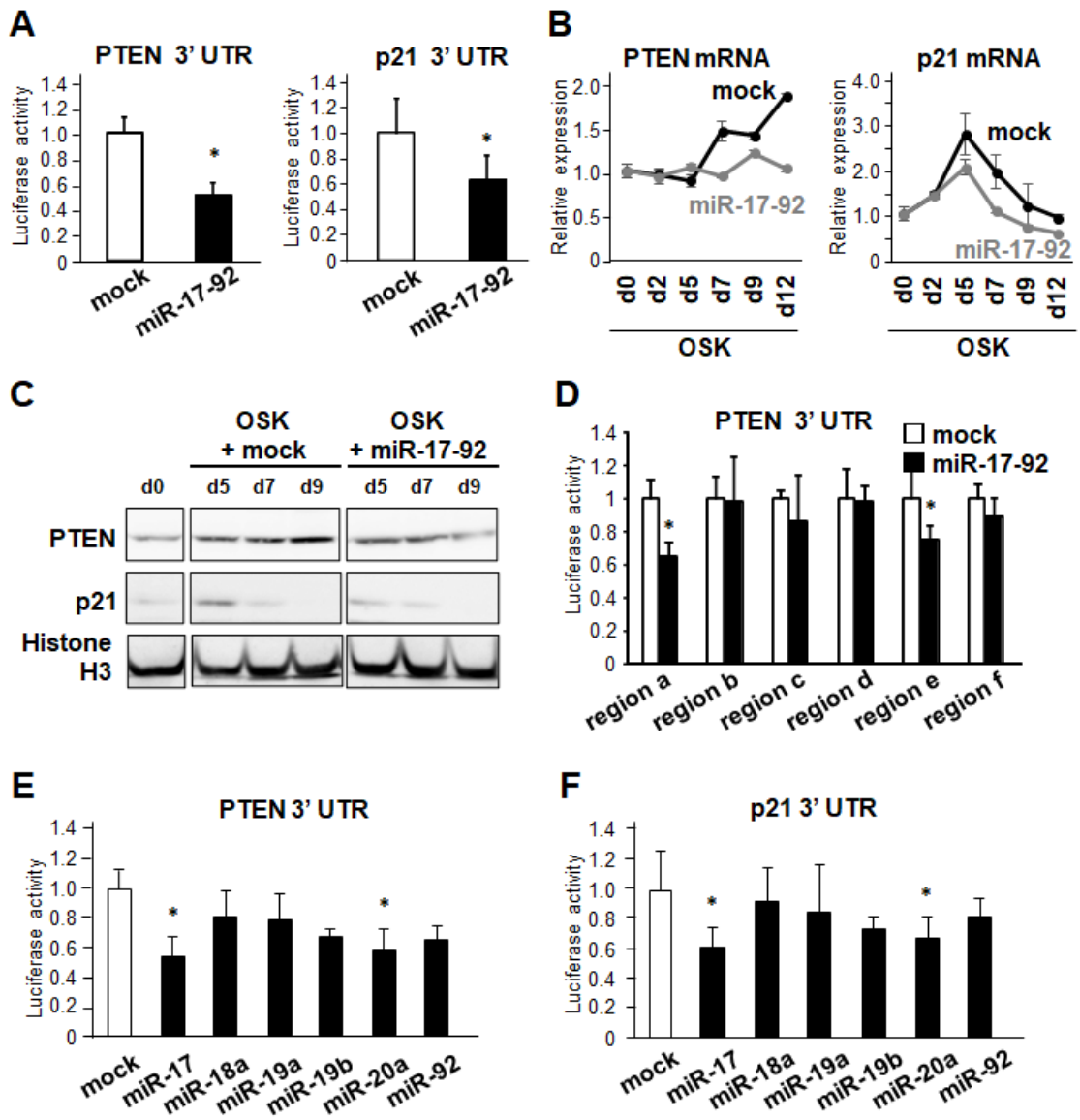


図 5. miR-17 と miR-20a による PTEN と p21 の発現抑制

(A) 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイによる PTEN と p21 の発現抑制解析の結果。miRNA を発現しない空ベクター (mock) との相対値を示す。

(B) 初期化誘導過程における PTEN と p21 の mRNA 発現量の変化。

(C) 初期化誘導過程における PTEN と p21 のタンパク質発現量の変化。

(D) PTEN の 3' UTR を分割して解析したルシフェラーゼアッセイの結果。miRNA を発現しない空ベクター (mock) との相対値を示す。

(E, F) 3' UTR を用いたルシフェラーゼアッセイによる PTEN と p21 の発現抑制解析の結果。miRNA を発現しない空ベクター (mock) との相対値を示す。

\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す (A, B, D~F)。

### 2.3.5. miR-17-92 に対する競合内因性 RNA としての PTEN と iPS 細胞形成の関わり

ここでは、miR-17-92 が PTEN の抑制をどの程度介して iPS 細胞形成効率の亢進に貢献しているかを検証するため、Cre-loxP コンディショナルノックアウトシステムを用いた *Pten* ノックアウト実験を行った。*Pten*<sup>fllox/fllox</sup> マウスから採取した MEF に Cre リコンビナーゼを強制発現させると、組換えにより loxP 配列で挟まれた *Pten* 遺伝子のエクソンが欠失し (*Pten*<sup>-/-</sup>) タンパク質発現がほぼ消失する (図 6A)。そこで、Cre を発現しないベクターを導入したコントロールの MEF (*Pten*<sup>fllox/fllox</sup> MEF)、あるいは Cre の発現により PTEN が欠損した MEF (*Pten*<sup>-/-</sup> MEF) それぞれに対して、OSK をレトロウイルスベクターにより、mock または miR-17-92 をレンチウイルスベクターにより共感染させて初期化誘導を行い、Nanog に対する免疫染色により iPS 細胞形成効率を評価した。その結果、PTEN 欠損 MEF ではコントロール MEF ほど顕著ではないものの、軽度の iPS 細胞形成効率の上昇が確認された (図 6B)。この結果から、miR-17-92 は PTEN だけでなく他の標的遺伝子に対しても抑制効果を示すことによって、iPS 細胞形成効率を正に制御していることが考えられた。

次に、PTEN、p21 を含む miR-17-92 の標的遺伝子は miR-17-92 に対してお互いに競合している可能性について検証した。ある miRNA に対して共通の認識配列をもつ RNA の中には競合内因性 RNA (ceRNA) と呼ばれるものがあり、mRNA だけでなく偽遺伝子や長鎖非コード RNA (long non-coding RNA) も ceRNA として機能することが知られている (Salmena et al., 2011)。そこで、内因性 PTEN mRNA の競合相手として外因性の DsRed2-PTEN 3' UTR を用いて iPS 細胞誘導実験を行い、PTEN 3' UTR の 6 領域 (a~f) のうちどの領域が miR-17-92 に対して相互作用し iPS 細胞誘導効率に影響を及ぼしているかについて解析した。すなわち、DsRed2 遺伝子の終止コドンの後ろに PTEN 3' UTR の full length または各領域を結合させたレンチウイルスベクターと 4F を発現するレトロウイルスベクターを共感染させることで、内因性の miR-17-92 の PTEN に対する作用を競合阻害して iPS 細胞コロニー数を計測した (図 6C)。その結果、PTEN 3' UTR の full

length をもつ DsRed2-PTEN 3' UTR を共感染させることで有意な iPS 細胞コロニー数の低下を認めた (図 6D)。また、領域 a、c、e を 3' UTR とする DsRed を共感染させた場合も iPS 細胞コロニー数の減少傾向がみられた (図 6D)。外因性の PTEN 3' UTR を導入し内因性 miR-17-92 が吸着されることによって iPS 細胞誘導効率が減少したと考えられる。さらに、PTEN 3' UTR の中で miR-17-92 による iPS 細胞形成亢進に領域 a、c、e が関与することが示唆された。領域 a と e は、p21 の 3' UTR と同様、miR-17 と miR-20a が結合する認識配列をもつことから、miR-17-92 による iPS 細胞形成亢進には、これらの miRNA が PTEN と p21 を共通の標的として抑制していることが関与している可能性が考えられる。

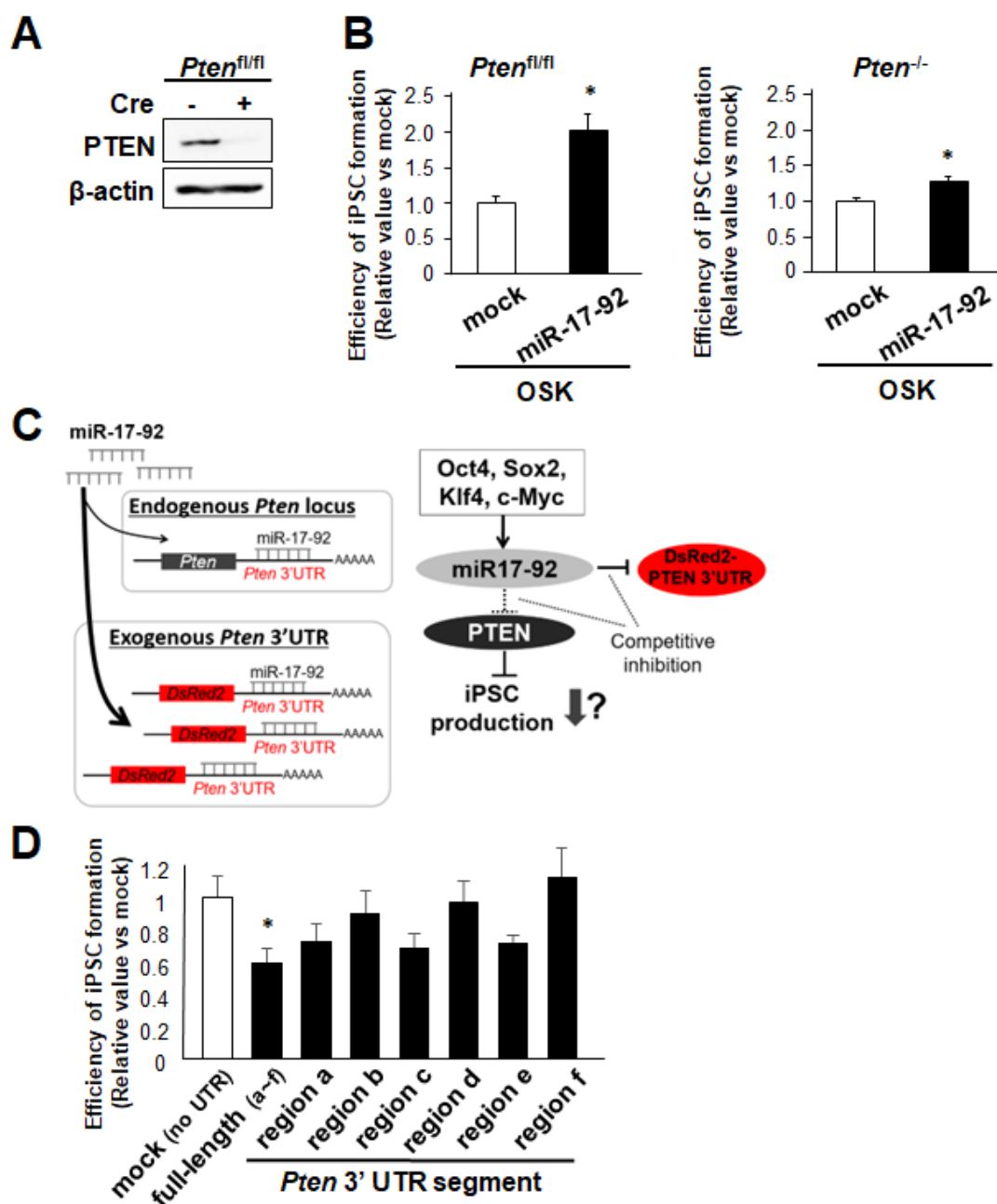


図 6. miR-17-92 に対する競合内因性 RNA による iPS 細胞コロニー形成への影響

(A) Cre リコンビナーゼによる PTEN 発現欠損の確認。

(B) コントロール MEF (*Pten*<sup>fl/fl</sup> MEF)、PTEN 欠損 MEF (*Pten*<sup>-/-</sup> MEF) それぞれで、miR-17-92 過剰発現による iPS 細胞コロニー数上昇の程度。空ベクター (mock) との相対値を示す (\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す)。

(C) 内因性 PTEN に対する miR-17-92 の抑制効果を阻害する実験方法の概要。

(D) PTEN 3' UTR 各領域を DsRed と共に強制発現させたときの iPS 細胞コロニー数の変化。PTEN 3' UTR のない mock との相対値を示す (\* $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を示す)。

### 2.3.6. 競合内因性 RNA としての PTEN と p21 の miR-17-92 による転写後制御

これまでの実験結果から、PTEN と p21 が miR-17 と miR-20a の共通の標的となっていることから、PTEN と p21 の mRNA が miR-17-92 に対して競合して作用している可能性が考えられる。そこで、miR-17-92 による PTEN 発現抑制に p21 mRNA の 3' UTR が競合的に関与するか否かを検証する目的で、内因性 p21 が低発現している HEK293T 細胞を用いて実験を行った (図 7A)。ルシフェラーゼ遺伝子の終止コドンの後に PTEN 3' UTR を結合させたレポータープラスミド (DsRed2-p21 3' UTR) に対して、競合相手として DsRed2 遺伝子の終止コドンに続けて p21 3' UTR を結合させた発現プラスミドを共発現させてルシフェラーゼアッセイを行い、PTEN 3' UTR 及び p21 3' UTR の競合作用を検証した。p21 3' UTR をもたない DsRed2 の共発現では、miR-17-92、miR-17、miR-20a がルシフェラーゼ活性を減少させるのに対して (図 7A、白塗りのグラフ)、DsRed2-p21 3' UTR の共発現によりその減少効果が阻害された (図 7A、黒塗りのグラフ)。

次に、PTEN の 3' UTR 存在下と非存在下において、miR-17-92 による p21 の発現抑制効果に変化するかについて検討した。Cre リコンビナーゼを用いて PTEN を欠損させた MEF では mRNA レベルで PTEN 3' UTR の発現量が低下していることを、PTEN 3' UTR に結合するプライマーを用いた定量 RT-PCR により確認した (図 7B)。続いて、PTEN 欠損 MEF (*Pten*<sup>-/-</sup> MEF) 及びコントロール MEF (*Pten*<sup>flax/flax</sup> MEF) の両者で、p21 3' UTR をルシフェラーゼ遺伝子の終止コドンの後に挿入したレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを施行したところ、PTEN 欠損 MEF でのみ miR-17-92 の強制発現によるルシフェラーゼ活性の有意な減少が認められた (図 7C)。

最後に、miR-17-92 による PTEN と p21 の発現抑制の関係をタンパク質レベルで検討するため、コントロール MEF と PTEN 欠損 MEF を用いてタンパク質を採取し Western blotting を行った。その結果、コントロール MEF では miR-17-92 を強制発現させると、PTEN で発現抑制が認められたが p21 の発現量の低下はみられなかった。一方で、PTEN 欠損 MEF では miR-17-92 を強制発現させると、p21 の発現レベルが軽度ではあるが低

下した (図 7D)。これらの結果から、PTEN と p21 は miR-17-92 の標的として相互に競合的な関係である可能性が示された。先述の図 5 で iPS 細胞誘導過程において miR-17-92 が PTEN と p21 の発現抑制に作用する時期が異なることを示したが、この理由の一つとして PTEN と p21 が互いに競合する関係である可能性が考えられる。

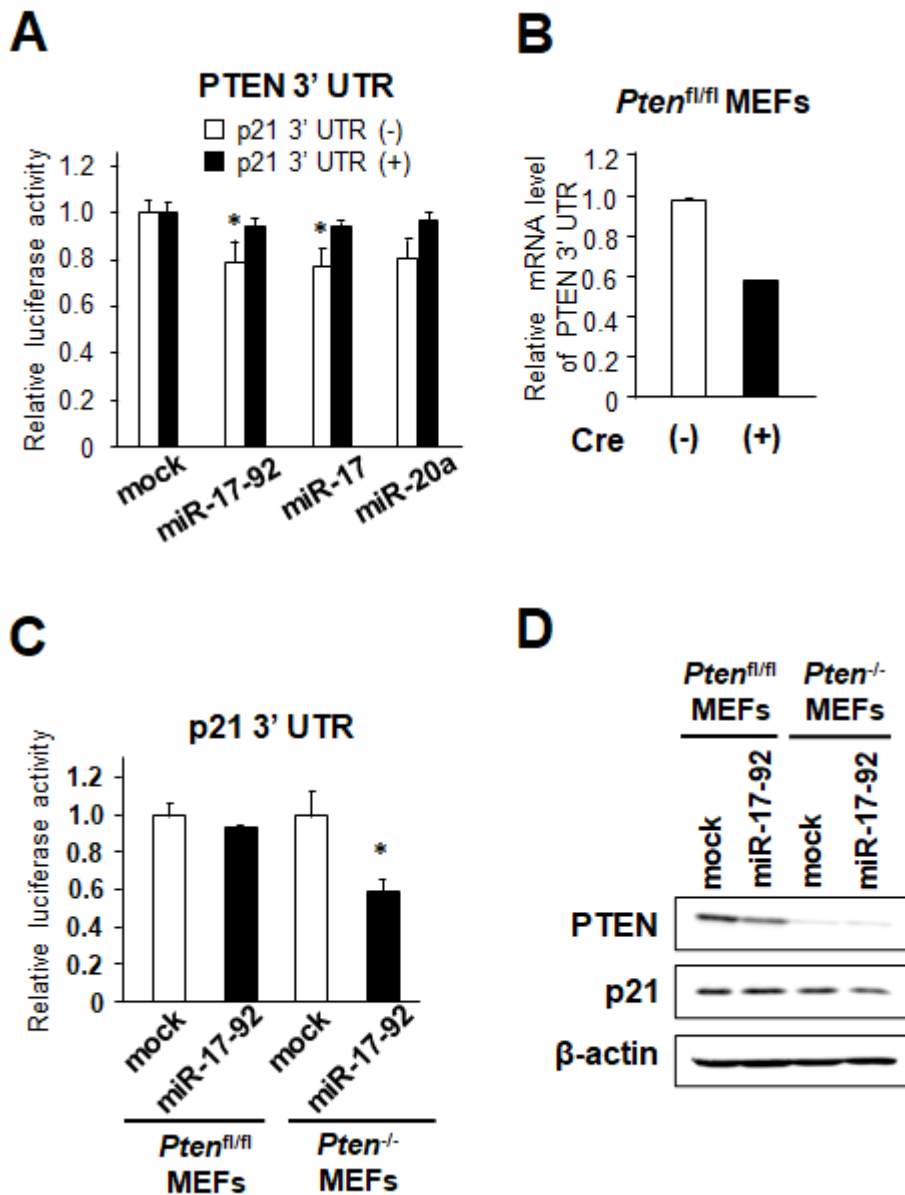


図 7. 競合内因性 RNA としての PTEN と p21 の miR-17-92 による転写後制御

(A) 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイによる PTEN 発現抑制解析の結果。miRNA を発現しない空ベクター (mock) との相対値を示す。

(B) 定量 RT-PCR による PTEN mRNA の 3' UTR 発現量の解析。

(C) 3' UTR ルシフェラーゼレポーターアッセイによる p21 発現抑制解析の結果。miRNA を発現しない空ベクター (mock) との相対値を示す。

(D) コントロール MEF (*Pten<sup>fl/fl</sup>* MEF) と PTEN 欠損 MEF (*Pten<sup>-/-</sup>* MEF) における miR-17-92 過剰発現による PTEN、p21、 $\beta$ -actin のタンパク質レベルの変化。



## 2.4. 結果のまとめ

第2章の研究では、マウス iPS 細胞への初期化における miR-17-92 の果たす役割について検証した。一点目として、初期化因子の一つである c-Myc により、miR-17-92 の発現は転写レベルで増加することが見いだされた。また、miR-17-92 cluster 転写開始点近傍の近位エンハンサー領域における c-Myc 結合部位が同定され、この結合部位が iPS 細胞形成に重要であることが判明した。二点目に、miR-17-92 の過剰発現が iPS 細胞コロニー数を増加させる一方で、CRISPR/Cas9 システムによる miR-17-92 cluster の欠損は iPS 細胞初期化効率を減少させた。注目すべきことに、miR-17-92 クラスターを構成する miRNA の中で、miR-17 あるいは miR-20a の過剰発現により、miR-17-92 欠損により減少した初期化効率が有意に回復した。三点目に、miRNA 標的遺伝子解析ツールにより、初期化誘導過程で発現上昇する遺伝子群の中から miR-17-92 の標的として *Pten* と *p21* が同定された。さらに、この二つは、miR-17 と miR-20a に共通の認識配列を 3' UTR にもつことから、miR-17-92 による発現抑制が競合的になされることも見いだされた。すなわち、miR-17-92 による発現抑制は、p21 は初期化過程の早期で、PTEN は中後期で観察され、この2つの mRNA が miR-17-92 に対して ceRNA の関係になっている可能性が見いだされた (図 8)。

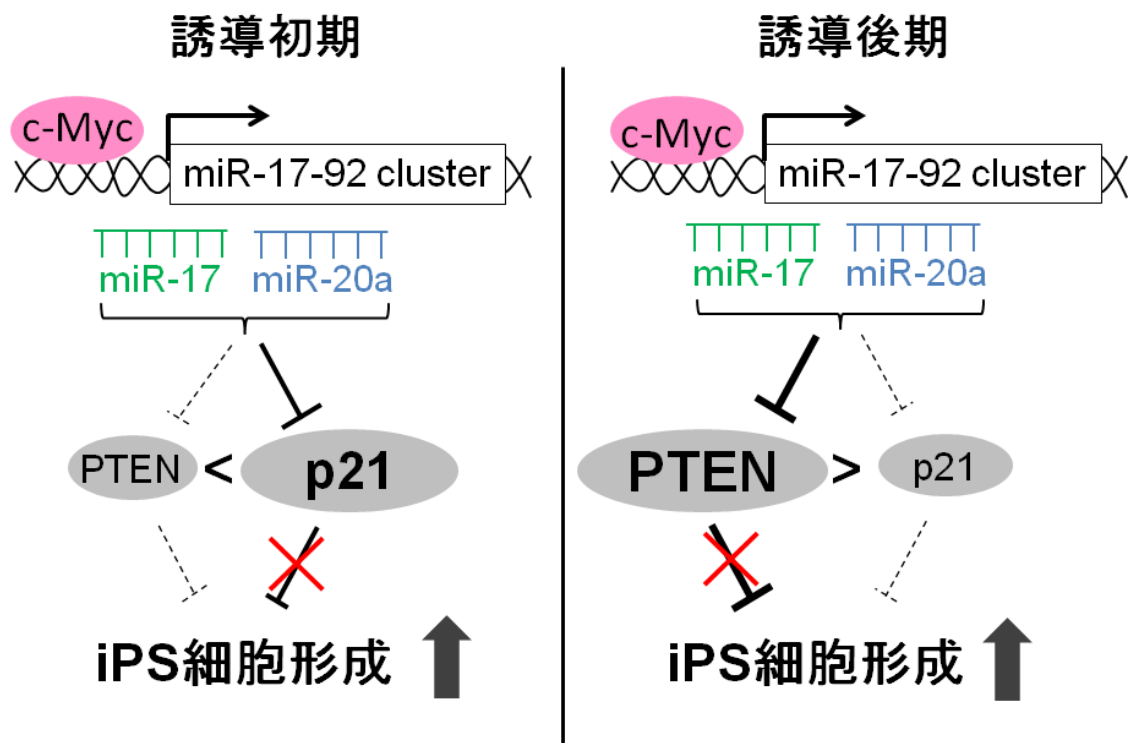


図 8. c-Myc/miR-17-92 軸による iPS 細胞形成促進のメカニズムの概略図

## 第3章 多能性幹細胞からの心筋分化誘導における人工 Wnt3a キメラ受容体の応用

### 3.1. 背景

#### 3.1.1. 古典的 Wnt シグナルについて

前章で述べた初期化による多能性幹細胞の誘導以外にも、多能性幹細胞の未分化性の維持や目的の細胞への分化誘導を制御する分子機構の解析が進められている。その1つに、Wnt によるシグナル伝達に着目した研究が挙げられる。

1982年に Nusse らがマウス乳癌にて、マウス乳癌ウイルスのプロウイルス DNA が宿主細胞の DNA に組込まれることで転写が亢進する遺伝子 *Int1* を同定した (Nusse and Varmus, 1982)。*Int1* はショウジョウバエにおいて同定されたセグメントポラリティ遺伝子 *wingless* のホモログであることが明らかにされ、*Wnt1* と名付けられた (Nusse et al., 1991; Rijsewijk et al., 1987)。ヒトをはじめ、哺乳類では 19 種類の *Wnt* 遺伝子が同定されている (Clevers and Nusse, 2012)。Wnt はシステインに富んだ分泌性のタンパク質であり、細胞内の小胞で脂質修飾を受けた Wnt は細胞外に分泌された後、細胞膜上の 7 回膜貫通型受容体の Frizzled (FZD) と 1 回膜貫通型受容体の低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 (Low-density-lipoprotein receptor-related protein, LRP) を架橋する形で結合することで細胞内へのシグナル伝達を開始される (Clevers and Nusse, 2012)。Wnt タンパク質によるシグナル伝達機構は細胞質の  $\beta$ -catenin のタンパク質発現量に依存する  $\beta$ -catenin 経路、依存しない平面内細胞極性 (planar cell polarity, PCP) 経路と  $\text{Ca}^{2+}$  経路の計 3 種類存在し、 $\beta$ -catenin 経路は古典的 Wnt 経路、PCP 経路及び  $\text{Ca}^{2+}$  経路は非古典的 Wnt 経路として知られている。古典的 Wnt 経路における  $\beta$ -catenin の安定性は、Axin と Adenomatous polyposis coli (APC) 及びセリントレオニンキナーゼであるグリコーゲン

合成酵素キナーゼ 3 (Glycogen synthase kinase 3, GSK3) などから構成される破壊複合体により制御される (図 9)。Wnt 非存在下では、Axin と結合した  $\beta$ -catenin は GSK3 によりリン酸化された後、ユビキチン化を受けることでプロテアソームに分解される (Aberle et al., 1997; Kitagawa et al., 1999; Liu et al., 2002)。一方で、Wnt タンパク質が FZD と LRP に結合すると、破壊複合体が細胞膜上に限局するため  $\beta$ -catenin が安定化し、細胞質内に蓄積した  $\beta$ -catenin は核内へ移行し T 細胞因子 (T cell factor, TCF) と相互作用して標的遺伝子の転写を活性化する (Azzolon et al., 2014; Li et al., 2012)。

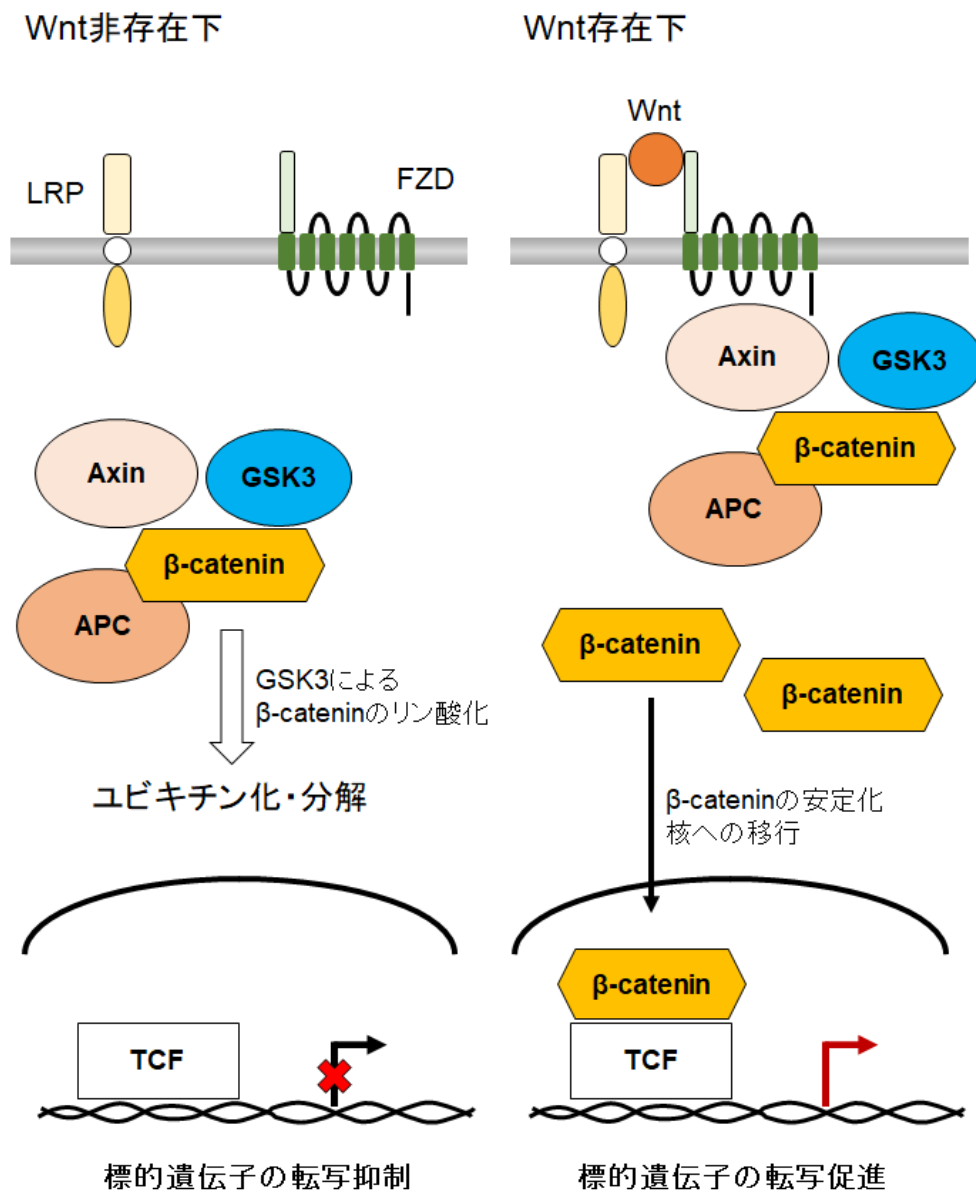


図9. Wnt 存在下、非存在下における古典的 Wnt 経路

Wnt 非存在下では、β-catenin は破壊複合体の構成因子の GSK3 によりリン酸化された後、ユビキチン化が誘導され最終的にプロテアソームによって分解される。一方で、Wnt 存在下では、Wnt が FZD と LRP に結合することで破壊複合体が細胞膜上に限局し、安定化した β-catenin は TCF と相互作用して核内で標的遺伝子の転写を活性化する。

### 3.1.2. 多能性幹細胞からの心筋分化誘導と Wnt シグナル

古典的 Wnt シグナルは胚発生の制御に関与し、胚発生の初期段階において Wnt やその受容体及び関連因子が転写レベルで検出されることが報告されている (de Jaime-Soguero et al., 2018)。また、胚発生における前後軸の決定に関与すること (Fossat et al., 2011; Tsakiridis et al., 2014)、*β-catenin* 欠損マウス胚で前後軸の決定や中胚葉の分化に異常が生じることも報告されている (Huelsen et al., 2000)。

さらに、古典的 Wnt 経路は多能性幹細胞の自己複製と分化の制御にも関与している。細胞内の *β-catenin* の安定性を制御する破壊複合体を構成する APC に関して、*Apc* 欠損マウス ES 細胞では核に *β-catenin* が蓄積すること、移植先で三胚葉性の奇形種を形成することができないことが報告されている (Kielman et al., 2002)。また、破壊複合体にて *β-catenin* のリン酸化を担う GSK3 $\beta$  に対して選択的な阻害剤を用いることで、LIF の非存在下であってもヒト及びマウス ES 細胞の多能性の維持が可能であることが報告された (Sato et al., 2004)。

一方、多能性幹細胞からの心筋分化については、マウス ES 細胞の分化誘導において、古典的 Wnt シグナル経路の活性化は誘導早期では心筋分化を促進する一方で、誘導後期では心筋分化に抑制的に作用することが報告されている (Naito et al., 2006; Ueno et al., 2007)。誘導早期における古典的 Wnt シグナル経路の活性化が中胚葉マーカー遺伝子、心筋マーカー遺伝子の発現量を増加させることに加え、*β-catenin* 経路を阻害する Dickkopf1 (Dkk1) 及び Wnt11 の発現量を増加させるネガティブフィードバック機構が存在することも明らかにされている (Ueno et al., 2007)。また、誘導後期における古典的 Wnt シグナルの活性化は骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein1, BMP) の発現を減少させることで心筋分化を抑制することが報告されている (Naito et al., 2006)。これらのことから、古典的 Wnt シグナル伝達を制御することで多能性幹細胞から心筋細胞を効率的に分化誘導することが可能になると考えられる。

### 3.1.3. 人工キメラ受容体について

前述のように、古典的 Wnt 経路は、胚発生において前後軸の決定や中胚葉の分化制御に関与することが明らかにされ、これらの知見が、多能性幹細胞から中胚葉由来の細胞への分化誘導の基礎となり心筋分化などに応用されている。しかし、古典的 Wnt シグナル伝達を介した心筋分化誘導を臨床応用する上でいくつかの課題が挙げられる。その1つが、組換え Wnt タンパク質の作製にかかるコストである。先述した通り、Wnt タンパク質は小胞体で脂質修飾を受けることで細胞外へ分泌される。脂質修飾は Wnt タンパク質の疎水性を高めることから精製にかかるコストが増大するため、細胞治療に向けた大量生産に適しているとは言い難い。この課題解決に向けて、破壊複合体の構成因子に対する阻害剤を用いることで古典的 Wnt シグナル伝達を制御することが試みられてきた (Naito et al., 2006; Sato et al., 2004)。

これらの課題に対して、人工キメラ受容体の応用が期待できる。人工キメラ受容体は、内在性の受容体のリガンド結合部位を、本来とは異なる分子をリガンドと認識・結合するよう設計された受容体である。人工キメラ受容体を標的細胞に導入し、対応するリガンドで刺激を行うことで、標的細胞内で特定のシグナル伝達を惹起することが可能となる。実際に、人工キメラ受容体のリガンド認識部位として scFv を採用し、人工キメラ受容体を導入した細胞で下流シグナル伝達を引き起こすことが可能であることが報告されている (Kaneko et al., 2012; Kawahara et al., 2011; Kawahara et al., 2014a; Kawahara et al., 2014b; Kawahara et al., 2008; Liu et al., 2008; Liu et al., 2009b; Nakabayashi et al., 2017; Nakabayashi et al., 2013; Nguyen et al., 2019; Sogo et al., 2009; Tanaka et al., 2009; Tone et al., 2013a; Tone et al., 2013b)。さらに、顆粒球コロニー刺激因子とその受容体を介した JAK/STAT 経路の活性化を代替リガンドと人工キメラ受容体により再現することで、人工キメラ受容体を導入したマウス iPS 細胞から心筋細胞を分化誘導できることが報告されている (Tsukamoto et al., 2020)。これらのことから、人工キメラ受容体は、それ自体に生理活性がなく安価な代替リガンドを採用することで組換えタンパク質の作製に

かかるコストを削減し、経済的なシグナル伝達の制御を可能にすると考えられる。

#### 3.1.4. 研究目的

第 3 章では、古典的 Wnt 経路が多能性幹細胞からの心筋分化誘導に果たす役割に着目し、人工キメラ受容体による古典的 Wnt シグナル伝達の活性化がマウス ES 細胞からの心筋分化誘導に及ぼす影響を検証した。ここでは、古典的 Wnt 経路に関して Wnt3a とその受容体である FZD8 及び LRP6 によるシグナル伝達に着目し、人工 Wnt3a キメラ受容体として代替リガンドに対する scFV と FZD8、LRP6 のそれぞれのキメラ体を設計・作製した。代替リガンドは、過去の研究で採用されていた蛍光色素分子 Fluorescein (FL) をウシ血清アルブミン (BSA) にコンジュゲートさせた BSA-FL を採用した。最終的には、人工 Wnt3a キメラ受容体を導入した多能性幹細胞を代替リガンド BSA-FL で刺激することで効率的に心筋分化誘導を行うことが可能か否かを検証した。



## 3.2. 実験方法と材料

### 3.2.1. プラスミド構築

野生型のマウス LRP6 を基に構築したアミノ酸鎖長の異なる 3 種類の人工 LRP6 ; LRP6S (LRP6 with short extracellular domain) ・ LRP6M (LRP6 with middle extracellular domain) ・ LRP6L (LRP6 with long extracellular domain) と、野生型のマウス FZD8 を基に構築したアミノ酸鎖長の異なる 2 種類の人工 FZD8 ; FZD8S (FZD8 with short extracellular domain) ・ FZD8L (FZD8 with long extracellular domain) を細胞に発現させるレンチウイルスベクターを作製するためのプラスミドを以下のように構築した。

人工 LRP6、人工 FZD8 の構成要素である、FL 分子に対する scFv (抗 FL-scFv) に相当する DNA 断片を表 4 に示すプライマーペアを用いて PCR により増幅させた。これを *Bst*BI 及び *Eco*RV により切断し得られた断片を、pLenti-CAG-IRES-Puro または pLenti-CAG-IRES-Blast の Cytomegalovirus early enhancer/chicken  $\beta$  actin (CAG) プロモーター下流に挿入した。これらのプラスミドは、Internal ribosome entry site (IRES) の後にピュエロマイシン耐性遺伝子あるいはブラストサイジン耐性遺伝子が配置されており、pLenti-CAG-scFv-IRES-Puro 及び pLenti-CAG-scFv-IRES-Blast と命名した。

人工 LRP6、人工 FZD8 のうち、内在性 LRP6、内在性 FZD8 の一部に相当する DNA 断片は、BL6 系統マウス心臓由来の全 RNA を鋳型として、逆転写を実施後、表 4 に示すプライマーペアを用いて PCR により取得した。次いで、*Eco*RV で切断した pLenti-CAG-scFv-IRES-Puro に LRP6M 断片あるいは LRP6L 断片を挿入することで、pLenti-CAG-scLRP6M-IRES-Puro または pLenti-CAG-scLRP6L-IRES-Puro を作製した。同様に、*Eco*RV で切断した pLenti-CAG-scFv-IRES-Blast に FZD8L 断片を挿入することで、pLenti-CAG-scFZD8L-IRES-Blast を作製した。一方、LRP6S 断片、FZD8S 断片は *Age*I で切断した後、*Bsp*EI で切断した pLenti-CAG-scFv-IRES-Puro、pLenti-CAG-scFv-IRES-Blast にそれぞれ挿入し、サブクローニングすることで、pLenti-CAG-scLRP6M-IRES-Puro 及び pLenti-

CAG-scFZD8S-IRES-Blast を作製した。mock ベクターには、ピューロマイシン耐性遺伝子のみを発現する pLenti-CAG-IRES-Puro 及びブラストサイジン耐性遺伝子のみを発現する pLenti-CAG-IRES-Blast を使用した。

表 4. 人工 Wnt3a キメラ受容体発現プラスミド構築に用いたプライマーリスト

Primer name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
scFv	GCCTTCGAAACCATGGGATGG AGCTGTATC	GCCGATATCCGGAACCTGCAGTCAAGAG
LRP6L	CGGTCCCCGAGGCTTTCCTTCT G	TCAGGAGGAGTCCGTGCAGGG
LRP6M	CGACGTGTTCTCCTCAGCAGT TTACC	TCAGGAGGAGTCCGTGCAGGG
LRP6S	GCCACCGGTACCAACACAGTT GGTTCTGTTATTGG	GCCACCGGTCAGGAGGAGTCCGTGCAGG G
FZD8L	CGAACCGCACCGACCTCACCA CG	TCAGACCTGGGACAATGGCATTTC
FZD8S	GCCACCGGTTTCACCGTCTTCT GGATCGG	GCCACCGGTCAGACCTGGGACAATGGCAT TTGC

### 3.2.2. 細胞培養

HEK293T 細胞、あるいは未分化マウス ES 細胞 (CGR8 系統細胞株) の培養については、第 2 章の研究と同様、表 1 で示された組成の培地を用いて、37 °C、20% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> の条件下で、湿度を十分に保ちながら、専用の細胞培養器内で行った。また、人工 LRP6 と人工 FZD8 をマウス ES 細胞へ遺伝子導入するために、レンチウイルスベクターを用いた。前項で作製したレンチウイルスベクター作製用プラスミドを Lipofectamine2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクションした 2 日後、0.45 μm のフィルターを用いて濾過した培養上清に、ポリブレン液を添加したものをウイルス溶液として未分化 ES 細胞に感染させた。ウイルスベクター感染後は抗生物質による細胞選択を行い、未分化状態で得られた細胞を安定発現株として実験に用いた。

### 3.2.3. ES 細胞からの分化誘導実験

マウス ES 細胞からの分化誘導は、ハンギングドロップ法による EB 形成を介して行った。簡潔に述べると、未分化状態で培養したマウス ES 細胞を D-PBS(-)で洗浄し、0.05w/v%トリプシン-0.53 mmol/L EDTA・4Na 溶液（富士フィルム和光純薬株式会社）で 37°C、3 分間の処理をした後、細胞を解離した。次に、LIF 無添加の培地 20  $\mu$ L 中に 750 個の細胞を含むドロップを 10 cm 浮遊培養皿 1 枚につき 56 個播種した。播種後 2 日目に新たな培地を 5 mL ずつ添加し、培養開始 6 日後に EB を回収し、ゼラチンでコーティングした 48-well plate に再播種して接着培養に移行した。培養中は顕微鏡下で経過観察を行い、細胞塊の自己拍動の有無を目視で記録した。

### 3.2.4. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

48-well plate に細胞を播種した翌日に、TCF/LEF 結合領域を含むホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子を搭載したレポータープラスミドを 0.5  $\mu$ g、インターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を搭載したプラスミド pSV40-Rluc を 0.05  $\mu$ g、Lipofectamine2000 Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いてトランスフェクションした。トランスフェクションした細胞は、翌日に培地を交換し引き続き一晩培養した後、第 2 章の研究と同様に、ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット（TOYO INK GROUP）を用いて解析を行った。

### 3.2.5. 免疫染色

分化誘導を行ったマウス ES 細胞を D-PBS(-)を用いて洗浄した後、10% ホルマリンを含む D-PBS(-)溶液に室温 15 分間浸漬することで細胞の固定を行った。D-PBS(-)で 2 回洗浄して残存するホルマリンを除去した後、0.5% TritonX-100 を含む D-PBS(-)溶液で室温 15 分間、細胞膜に対する透過処理を行った。その後、3%の正常ヤギ血清（富士フィルム和光純薬株式会社）を含む D-PBS(-)溶液で室温 45 分間のブロッキング処理を行っ

た。次に、0.5% BSA を含む D-PBS(-)溶液に一次抗体である Mouse anti-cardiac  $\alpha$ -actinin antibody (Abcam) を添加したもので 4 °C 一晩反応させた。洗浄後、二次抗体である anti-mouse IgG-Alexa594 antibody (Thermo Fischer Scientific) を 0.5% BSA を含む D-PBS(-)溶液で希釈させた溶液で、室温にて 1 時間反応させた。洗浄を経て、D-PBS(-)に 4', 6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI, Thermo Fischer Scientific) を添加したもので室温にて 3 分間反応させることで細胞核の可視化を行った。最後に、蛍光顕微鏡 BZ-X710 (キーエンス) を用いて観察し撮像を行った。

### 3.2.6. 定量 RT-PCR

分化誘導後の細胞から Tripure Isolation Reagent (SIGMA) を用いて回収した全 RNA のうち、10~500 ng を鋳型として Prime Script RT Master Mix (Takara Bio Inc.) を用いて逆転写反応を行った。次に、逆転写物に対し、10  $\mu$ M のプライマー溶液を 0.6  $\mu$ L、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Takara Bio Inc.) を 7.5  $\mu$ L 加えて、蒸留水にて全量 15  $\mu$ L とした後、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Thermo Fischer Scientific) を用いて、遺伝子発現量の解析を実施した。本研究で使用したプライマーペアを表 5 に示す。

表 5. 定量 RT-PCR に用いたプライマーペアの一覧

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
<i>Gapdh</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTIG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<i>Axin2</i>	TGACTCTCCTTCCAGATCCCA	TGCCCACACTAGGCTGACA
<i>EphA1</i>	CCGAGGAAGTCACTCTAATGGA	GGGGTGTCCCGTTTAGCAT
<i>Fgf8</i>	GAGACCGATACTTTTGAAGCA	TCTCTGTGAATACGCAGTCCT
<i>Fst</i>	GAGCAAGGAAGAGTGTTCAG	CTCACACGTTTCTTTACAAGGGA
<i>Wnt8a</i>	TCCAGACTCTTCGTGGACAGT	CAGGTCCTTTTCGTGGAGGC
<i>Gata4</i>	CGCCGGTTTTCTGGGAA	CACCGGCTAAAGAAGCCTA
<i>Isl1</i>	GGAAGAAACCAGCCTCAGTG	AGGATGGGAGGAGAGGCAA
<i>Mesp1</i>	CTACCCTAGACCCCGAGTC	CGGCGTCCAGGTTTCTAG
<i>Gata6</i>	ACCAGCAGCGACTAGCA	GGCGCTACTCCAACCTGA
<i>Flk1</i>	GGCGGTGGTGACAGTATCTT	CTCGGTGATGTACACGATGC
<i>Sox17</i>	GCTCCTGCTTTTGGTGTAGC	GTCCTTGGGCAGTCATTCAI
<i>Myh7</i>	CTACAGGCCTGGGCTTACCT	TCTCCTTCTCAGACTTCCGC
<i>Myh6</i>	GAGATTTCTCCAACCCAG	TCTGACTTTCGGAGGTA
<i>Actc1</i>	CCAGCCCAGCTGAATCC	CCATTGTCACACACCAAAGC
<i>Cdh5</i>	AGACACCCCAACATGCTAC	GCAAACCTCCTTGGAGCAC
<i>Cata3</i>	CTCGGCCATTTCGTACATGGAA	GGATACCTCTGCACCGTAGC
<i>Acta2</i>	CTGACAGAGGCACCACTGAA	AGAGGCATAGAGGGACAGCA
<i>Gata1</i>	AGCATCAGCACTGGCCTACT	AGGCCAGCTAGCATAAGGT
<i>Osx</i>	ATGGCGTCCTCTCTGCTTG	TGAAAGGTCAGCGTATGGCTT
<i>Runx2</i>	CGGCCCTCCCTGAACTCT	TGCCTGCCTGGGATCTGTA
<i>Afp</i>	TCCAGAAGGAAGAGTGGACAA	GCAGACTAGGAGAAGAGAAATAGTTGA
<i>Pdx1</i>	CCCCAGTTTACAAGCTCGCT	CTCGGTTCCATTCGGGAAAGG
<i>Pax6</i>	AAGGAGGGGGAGAGAACACC	TCTGAGCTTCATCCGAGTCTT
<i>Nestin</i>	CCCTGAAGTCGAGGAGCTG	CTGCTGCACCTCTAAGCGA
<i>Neurod1</i>	ATGACCAAATCATAACAGCGAGAG	TCTGCCTCGTGTTCTCTCGT

### 3.2.7. DNA マイクロアレイ解析

第2章の研究と同様の手法で実施した。簡潔に述べると、リガンド刺激後の細胞から全RNAを抽出し、Ambion WT Expression Kit (Thermo Fischer Scientific) を用いて cDNA を調製した。キット推奨のプロトコルに従って、cDNA サンプルを Affymetrix 社のマイクロアレイにハイブリダイゼーションさせた後、GeneChip 用のスキャナーで画像化した。各条件間の発現差異については、Expression Console software (Affymetrix) により解析した。データセット間の遺伝子発現プロファイルの類似度はピアソン相関係数解析により測定した。また、Cluster 3.0 software を用いて、ヒートマップの可視化のために階層的クラスタリングを行った。GO エンリッチメント解析は、DAVID software を用いて施行した。

### 3.2.8. カルシウムイメージング解析

培養中は顕微鏡により定期的な経過観察を行い、細胞塊の自己拍動が観察されたものについて、カルシウムイメージングによる解析を施行した。接着培養中の細胞の培地を、蛍光カルシウム指示薬である Fluo-8 AM (AAT Bioquest) 溶液を含む培地に交換し、細胞培養器で30分間培養することで Fluo-8 を細胞へ取り込ませた。その後、生細胞の状態で蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE) により観察し、蛍光強度を測定した。

### 3.2.9. 統計解析

2群間の統計解析は Student's *t*-test を用いて、3群間の統計解析では Tukey's multiple comparison test を用いて行った。統計解析を施したデータは標準偏差 (S.D.) を伴う平均値で表され、 $p < 0.05$  であった際に統計的に有意な差があると判定した。

### 3.3. 実験結果

#### 3.3.1. 人工 Wnt3a キメラ受容体の設計と構築

Wnt3a によるシグナル伝達を活性化する人工キメラ受容体の構築に向けて、LRP6、FZD8 の細胞外領域のすべてあるいは一部を抗体の抗原結合部位に置換したキメラ体をそれぞれ設計した (図 10A)。この人工キメラ受容体では、リガンド結合部位として代替リガンドである蛍光色素分子 FL に対する抗体の抗原結合部位にあたる可変部領域を用いた。具体的には、抗 FL 抗体の可変部の H 鎖由来の領域と L 鎖由来の領域をリンカーにより一本鎖の状態にした scFv をリガンド認識部位とした。内在性の LRP6 の細胞外領域は 4 つの上皮成長因子 (epidermal growth factor、EGF) 様反復配列と 3 つの low-density lipoprotein receptor (LDLR) 反復配列から成り、特に、最初の 2 つの EGF 反復配列はリガンドとの結合に必要である (Cong et al., 2004; Liu et al., 2009a; Willert et al., 2002)。また、内在性の FZD8 の細胞外領域はシステインリッチドメイン (cysteine-rich domain, CRD) を有しており、この CRD が Wnt3a/LRP6/FZD8 複合体の形成に必要であることが報告されている (Bourhis et al., 2010)。そこで、本研究ではキメラ抗原受容体を構成する人工 LRP6 を 3 種類、人工 FZD8 を 2 種類設計した (図 10B)。3 種類の人工 LRP6 は、内在性のマウス LRP6 の細胞外領域を全て欠損させた状態、EGF 反復配列を全て欠損させた状態、あるいは最初の 2 つの EGF 反復配列を欠損させた状態で抗 FL-scFv と結合させたもので、順に scLRP6S、scLRP6M、scLRP6L と呼称する。また、2 種類の人工 FZD8 は、内在性のマウス FZD8 の細胞外領域全てを欠損させた状態、あるいは CRD のみを欠損させた状態で抗 FL-scFv 領域を結合させたもので、それぞれ scFZD8S、scFZD8L と呼称する。

これら人工 LRP6、人工 FZD8 をマウス ES 細胞に導入するため、CAG プロモーターにより恒常的な発現が誘導され、IRES 配列を介して抗生物質耐性遺伝子を発現するレンチウイルスベクターを作製し、以後の実験に用いた。

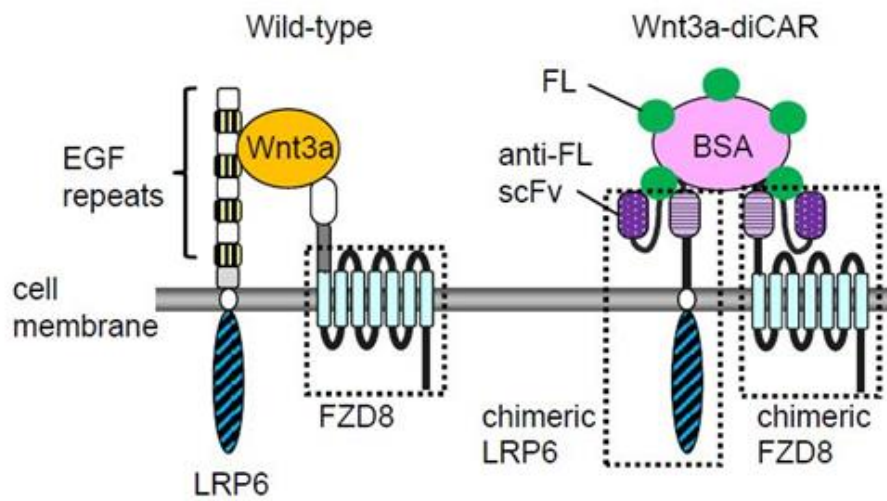
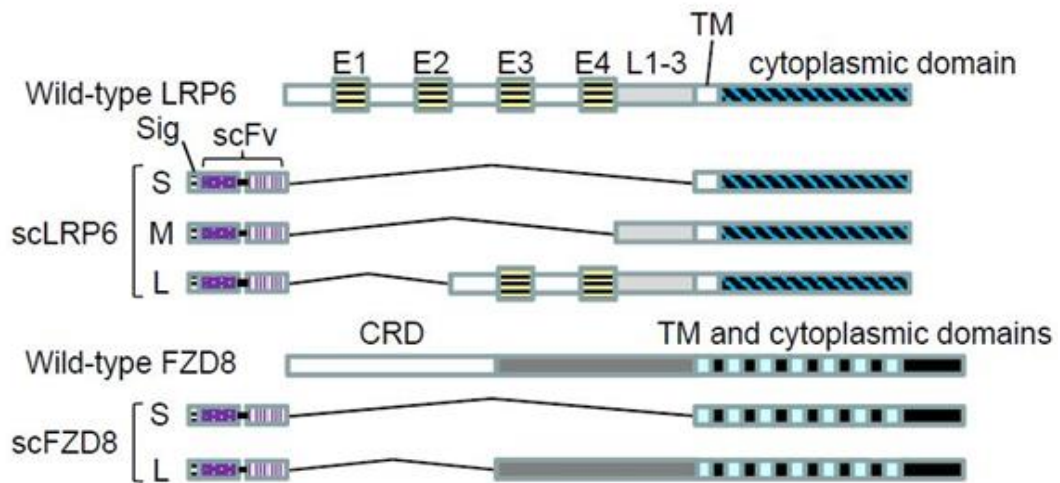
**A****B**

図 10. 内在性及び人工 Wnt3a キメラ受容体の模式図

(A) 内在性の Wnt3a 受容体及び第 3 章の研究で構築した人工 Wnt3a キメラ受容体の模式図。

(B) 人工 Wnt3a キメラ受容体を構成する LRP6、FZD8 それぞれの野生型とキメラ体の構造の模式図。CRD：システインリッチドメイン、E1～4：EGF 様反復配列、L1～3：LDLR 反復配列、Sig：免疫グロブリン重鎖シグナル配列、TM：膜貫通ドメイン。



### 3.3.2. 人工 Wnt3a キメラ受容体を構成する scLRP6/scFZD8 の組合せの検討

はじめに、リガンド刺激によるマウス ES 細胞の人工 Wnt3a キメラ受容体を介した細胞内シグナル伝達を解析した。本研究では、1 分子の BSA に複数の FL 分子が結合している BSA-FL をリガンドとして用いた。古典的 Wnt シグナル経路は LRP6 及び FZD8 に対して Wnt3a が結合し、Wnt3a/LRP6/FZD8 複合体が形成されることで開始される。そのため、人工 Wnt3a キメラ受容体に関しても、そのリガンドによって人工 LRP6 と人工 FZD8 の会合が誘導される必要があると推察される。したがって、本研究では多価結合が可能なリガンド分子として BSA-FL を採用した。

まず、計 6 通りの scLRP6/scFZD8 の組合せそれぞれをマウス ES 細胞に一過性に発現した際の、TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイによって測定した結果を図 11 に示す。scLRP6M あるいは scLRP6L を発現した細胞では、scFZD8 のタイプに関わらず TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性はリガンド非依存的に亢進した。一方で、scLRP6S/scFZD8S、scLRP6S/scFZD8L の組合せで発現させた細胞ではリガンド非刺激時の転写活性は低く、リガンド刺激によって転写活性が顕著に上昇した。このことから、抗 FL-scFv をリガンド結合部位にもつ人工 Wnt3a キメラ受容体に関して、scLRP6S/scFZD8S あるいは scLRP6S/scFZD8L の組合せが、BSA-FL を代替リガンドとして、TCF/ $\beta$ -catenin によるシグナル伝達を制御する可能性が示唆された。

次に、scLRP6S/scFZD8S あるいは scLRP6S/scFZD8L を発現するマウス ES 細胞の安定発現株を用いて、TCF/ $\beta$ -catenin によるシグナル伝達の BSA-FL に対する濃度依存性を解析した。ES 細胞の安定発現株は、scLRP6S/scFZD8S あるいは scLRP6S/scFZD8L を導入した後に抗生物質による細胞選択を行うことで作製した。これら 2 種類の安定発現株を、本研究ではそれぞれマウス ES/scLRP6S/scFZD8S 細胞、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞と記述する。両細胞株に 0、0.001、0.01、0.1、1、10  $\mu$ g/mL の BSA-FL を添加し、TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した (図 12)。一過性の導入実験の結果 (図 11) とは異なり、いずれの細胞株においてもリ

リガンド非刺激時の転写活性は、人工キメラ受容体を発現しない mock である ES/mock 細胞と同程度に低いものであった。BSA-FL 刺激に対して、マウス ES/scLRP6S/scFZD8S 細胞では TCF/ $\beta$ -catenin を介した転写活性への影響は僅かであったが (図 12A)、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞では濃度依存的に転写活性が亢進した (図 12B)。また、マウス ES/mock 細胞では、リガンド刺激の有無による転写活性の変動は観察されなかった。さらに、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞における TCF/ $\beta$ -catenin によるシグナル伝達の Wnt3a に対する濃度依存性を解析した。0、3、10、30、50、100 ng/mL の Wnt3a を添加し、TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検出した。その結果、マウス ES/mock 細胞と同様に、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞において Wnt3a の濃度依存的な転写活性の亢進が観察された (図 12C)。

以上の結果から、今回設計した scLRP6S 及び scFZD8L からなる人工 Wnt3a キメラ受容体を安定発現するマウス ES 細胞株が、代替リガンドである BSA-FL に対して濃度依存性をもって応答して TCF/ $\beta$ -catenin を介したシグナル伝達を惹起することが示された。以後の実験では、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞を用いて実施した。

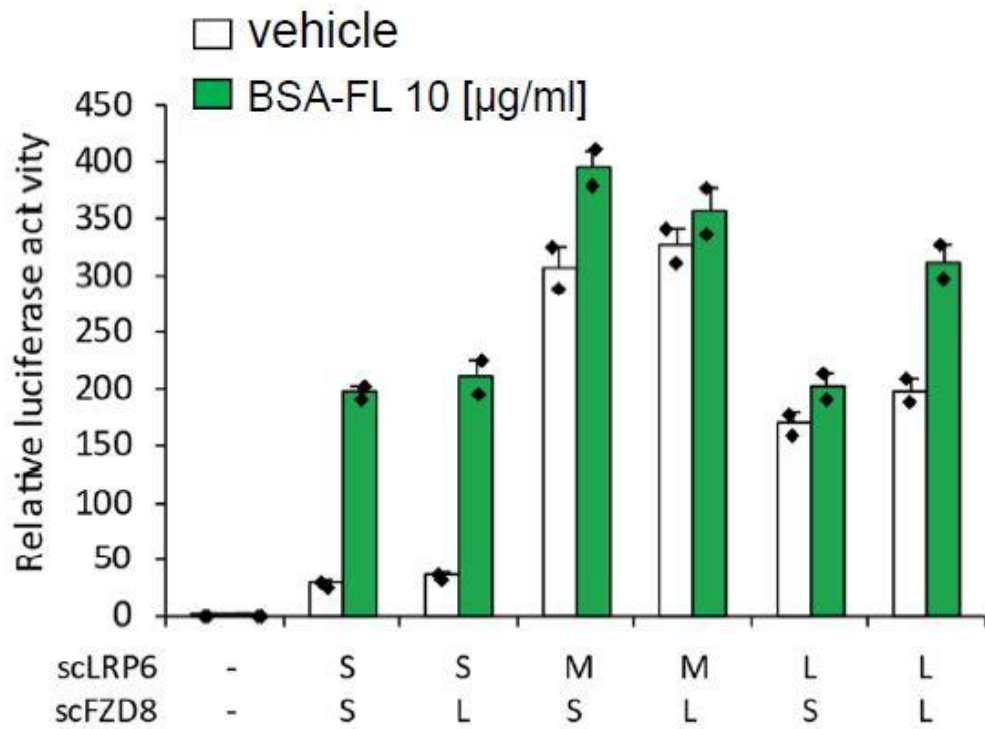


図 11. 人工 Wnt3a キメラ受容体を一過性に発現させた ES 細胞における TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性

人工 Wnt3a キメラ受容体を一過性に発現させたマウス ES 細胞に対して、代替リガンド BSA-FL で刺激した際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量化した。エラーバーは S.D.を表す。

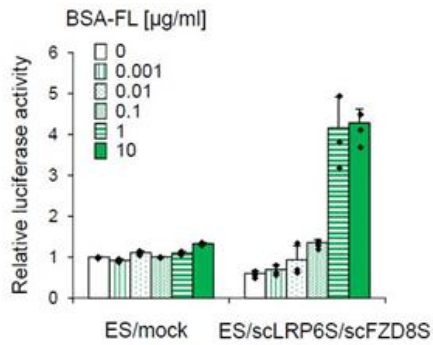
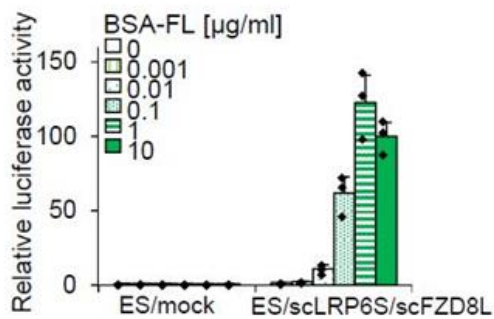
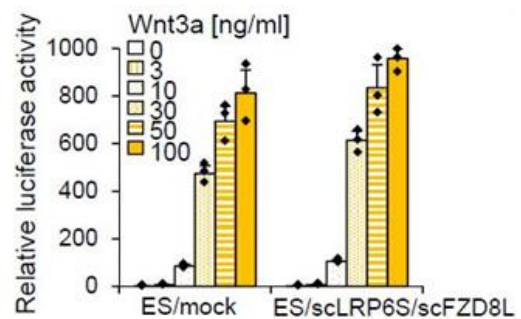
**A****B****C**

図 12. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞における TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性

(A) マウス ES/mock 細胞及びマウス ES/scLRP6S/scFZD8S 細胞を BSA-FL で刺激した際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性。エラーバーは S.D.を表す。

(B) マウス ES/mock 細胞及びマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞を BSA-FL で刺激した際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性。エラーバーは S.D.を表す。

(C) マウス ES/mock 細胞及びマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞を Wnt3a で刺激した際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性。エラーバーは S.D.を表す。

### 3.3.3. 人工 Wnt3a キメラ受容体発現 ES 細胞における代替リガンド刺激による遺伝子発現の変化

続いて、リガンド刺激時のマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞における遺伝子発現の変化を明らかにするため、DNA マイクロアレイを用いた解析を施行した。その結果を図 13 及び図 14 に示す。マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞では、BSA-FL で処置した場合と Wnt3a で処置した場合で mRNA 発現プロファイルが類似していた一方で、マウス ES/mock 細胞では類似していなかった (図 13)。BSA-FL あるいは Wnt3a 刺激により、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞にて発現量が増加した上位 50 種類の遺伝子の内、23 種類の遺伝子がオーバーラップしていることが示され、DAVID による GO 解析の結果から、BSA-FL 刺激によって発現量が増加した 38 種類の遺伝子、Wnt3a 刺激によって発現量が増加した 35 種類の遺伝子は BMP シグナル経路や細胞増殖、多細胞生物発生に関連する遺伝子セットに偏っていた (図 14)。本研究の DNA マイクロアレイ解析の結果と先行研究の報告 (Cole et al., 2008; Willert et al., 2002) に基づいて、*Axin2*、*EphA1*、*Fgf8*、*Follistatin*、*Wnt8a* を Wnt3a シグナル伝達の標的遺伝子として選出した。これら 5 種類の遺伝子の発現解析を定量 RT-PCR 法により施行した結果、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞では、Wnt3a で処置した場合と同様に、BSA-FL で処置することで各遺伝子の発現量が増加した (図 15)。なお、マウス ES/mock 細胞では BSA-FL 刺激による標的遺伝子の有意な変動は確認されなかった。

以上の結果から、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞において、内因性の受容体と同様、人工キメラ受容体を介して Wnt3a シグナル伝達の標的遺伝子の転写が引き起こされることが示された。これは、本研究で設計・構築した人工 Wnt3a キメラ受容体が、意図する代替リガンドに応答して古典的 Wnt 経路を活性化することが検証されたことを示唆している。

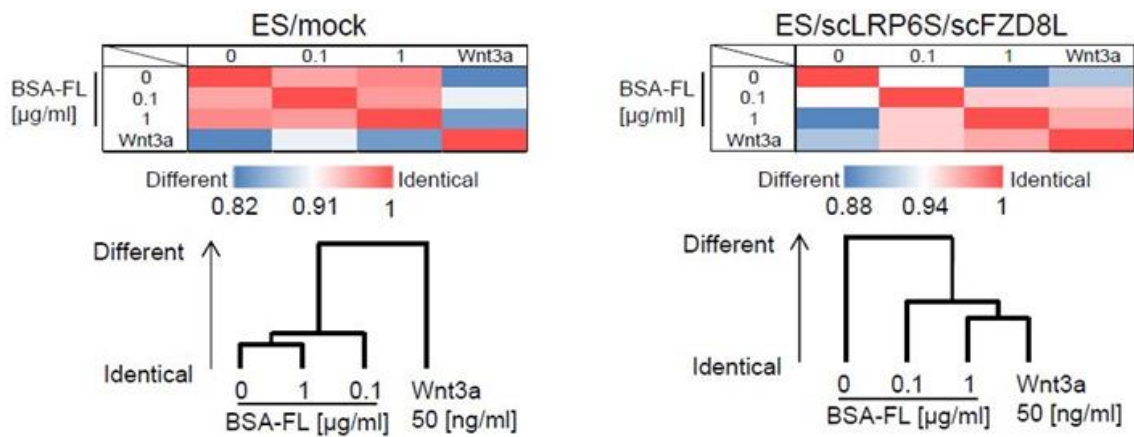


図 13. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞におけるリガンド刺激後の mRNA 発現プロファイル

マウス ES/mock 細胞、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞それぞれについて、無刺激、0.1 または 1  $\mu\text{g/ml}$  の BSA-FL 刺激、50  $\text{ng/ml}$  の Wnt3a 刺激を行い 24 時間後の mRNA 発現プロファイルを比較したヒートマップと樹状図を示す。

**A**



**B**

<u>Upregulated by BSA-FL (38 genes)</u>			
GO Term	Count	Size	P value
BMP signaling pathway	5	87	1.08E-05
response to corticosterone	3	21	5.12E-04
positive regulation of cell proliferation	6	542	1.55E-03
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	7	995	4.36E-03
multicellular organism development	7	1029	5.14E-03
<u>Upregulated by Wnt3a (35 genes)</u>			
GO Term	Count	Size	P value
BMP signaling pathway	5	87	8.06E-06
multicellular organism development	9	1029	8.99E-05
positive regulation of cell proliferation	7	542	1.22E-04
angiogenesis	5	239	4.11E-04
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	8	995	5.03E-04

図 14. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞でリガンド刺激により発現亢進する遺伝子群の GO 解析

(A) マウス ES/mock 細胞、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞それぞれで、BSA-FL 刺激 (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) あるいは Wnt3a 刺激 (50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) により発現が亢進した上位 50 種類の遺伝子の内訳を示すベン図。

(B) マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞を、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA-FL あるいは 50  $\text{ng}/\text{mL}$  Wnt3a で刺激した際に、発現亢進した遺伝子群における GO 解析の結果を示す。

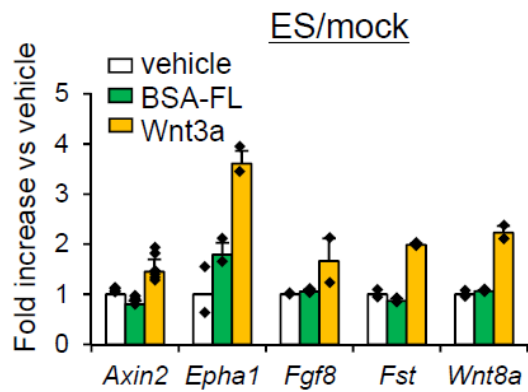
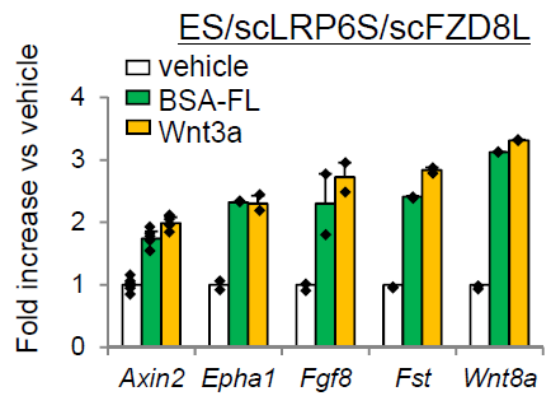
**A****B**

図 15. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞におけるリガンド刺激後の Wnt3a 標的遺伝子の発現解析

マウス ES/mock 細胞 (A) あるいはマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞 (B) において、溶媒、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BSA-FL、50  $\text{ng}/\text{mL}$  Wnt3a による 24 時間刺激後の mRNA 発現レベルを、既知の Wnt3a シグナル標的遺伝子について定量解析した。エラーバーは S.D.を表す。



### 3.3.4. 人工 Wnt3a キメラ受容体発現 ES 細胞における心筋分化効率

マウス ES 細胞から EB 形成による分化誘導を行い、人工 Wnt3a キメラ受容体を発現するマウス ES 細胞で、代替リガンド刺激により心筋細胞への誘導効率が亢進するか否かを検証した。ハンギングドロップ法による EB の形成過程において、ES 細胞の播種を EB 形成 0 日目とし、2 日目にリガンド刺激を行なった。6 日目に回収した EB をゼラチンでコーティングした培養プレートに再播種した後、7 日目から 12 日目まで顕微鏡下で観察を行い、心筋細胞の特徴である周期的な拍動が観察された EB の割合を自己拍動率として計測した (図 16A)。

まず、心筋分化誘導におけるリガンド刺激の至適時間を決定するために、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの EB 形成 2 日目に 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL を 24、48、96 時間暴露した。再播種後に自己拍動率を計測した結果、BSA-FL で 24 時間刺激した場合において、無処置の場合と比較して自己拍動率が顕著に上昇した。一方で、BSA-FL で 96 時間刺激した場合は、無処置の場合と比較して自己拍動率が低下した (図 16B)。先行研究の報告と一致して (Naito et al., 2006; Ueno et al., 2007)、これらの結果から、分化早期でのリガンド刺激がマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの心筋分化を促進する可能性が示唆された。

次に、心筋分化誘導におけるリガンド刺激の至適濃度を検討した。EB 形成 2 日目から 0.01、0.1、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL あるいは 50  $\text{ng}/\text{mL}$  の Wnt3a を 24 時間暴露し、6 日目から 12 日目まで自己拍動率を計測した結果を図 17 に示す。マウス ES/mock 細胞、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞いずれの細胞株由来 EB においても、Wnt3a 刺激によって無刺激の場合と比較して自己拍動率が顕著に上昇した。また、マウス ES/mock 細胞由来 EB では BSA-FL 刺激による自己拍動率の有意な変動はみられなかった (図 17A)。しかし、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来 EB では 0.1、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL 刺激によって、Wnt3a で刺激した場合と同程度に自己拍動率が増加することが確認された (図 17B)。これらのことから、BSA-FL の濃度依存的にマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞か

らの心筋分化が促進されることが示された。

以上の結果から、Wnt3a に対する人工 Wnt3a キメラ受容体の導入と代替リガンド刺激によって、組換え Wnt3a タンパク質による刺激と同程度に、マウス ES 細胞からの心筋分化が促進される可能性が示された。

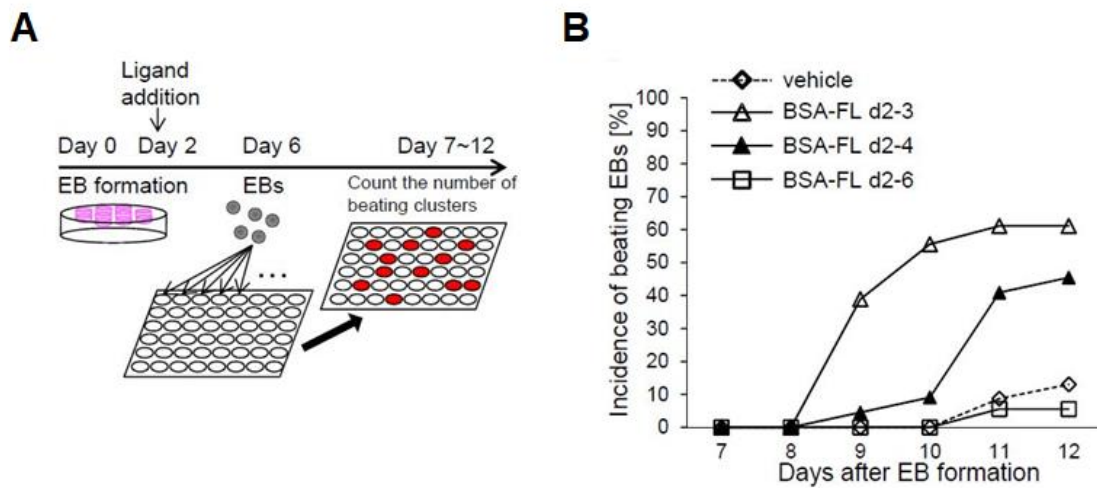


図 16. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞からの心筋分化誘導実験

(A) ES 細胞からの EB 形成を介した分化誘導法の模式図。

(B) マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの心筋分化誘導において、代替リガンド BSA-

FL 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の刺激時期が自己拍動を有する EB の割合に及ぼす影響を示す。

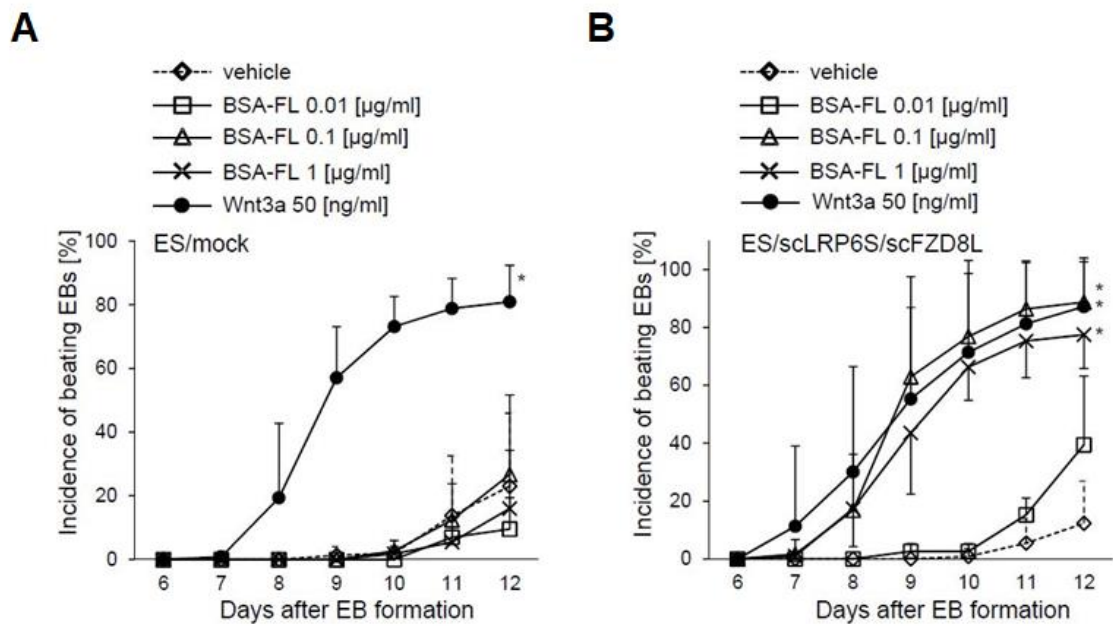


図 17. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞からの心筋分化誘導におけるリガンド刺激による自己拍動率の変化

マウス ES/mock 細胞 (A) またはマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞 (B) からの心筋分化誘導にて、BSA-FL あるいは Wnt3a で刺激した際の、自己拍動を有する細胞の割合。

\*無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

### 3.3.5. 人工 Wnt3a キメラ受容体発現 ES 細胞株由来心筋細胞の特性解析

前項で観察された自己拍動する細胞が心筋細胞としての特性を有するか否かを検証するため、種々の解析を行った。

まず、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞から誘導された自己拍動細胞について、免疫組織化学的な解析を行った。分化心筋の分子マーカーである cardiac  $\alpha$ -actin タンパク質に対する抗体を用いて、免疫染色を施した像を図 18A に示す。BSA-FL 処置を施した細胞では、vehicle 処置の場合と比較して cardiac  $\alpha$ -actin の陽性領域が広く、心筋分化の促進が認められた。

次に、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞から誘導された自己拍動細胞について、生理学的な機能解析を行った。具体的には、心筋に特徴的な細胞内カルシウム濃度の周期的変動に対するイメージングを試みた。心筋細胞は細胞外からの様々な刺激に応答して、細胞膜上のイオンチャネルが開口・閉鎖する。さらに、細胞質の筋小胞体を介したカルシウムイオンの流入・流出により細胞内カルシウムイオン濃度が変化し、活動電位が変化する。すなわち、カルシウムトランジェントと呼ばれる動きが心筋細胞の大きな特徴の一つである。このカルシウムトランジェントは、正常な心筋組織では協調的かつ反復的な変動であり、心筋収縮を一定間隔でもたらす要因となる (Bers, 2002)。細胞内カルシウムイオン濃度やそれに伴う活動電位の変化を個々の心筋細胞で測定するには、古くよりパッチクランプ法などの実験手法が知られているが、技術的に困難である。そこで、カルシウムイオンに対する蛍光インディケーター分子を用いた時空間イメージングによる間接的な手法を実施した。ここでは、蛍光インディケーター分子として、カルシウムイオンとの結合による蛍光強度の変化が大きい Fluo-8 を用いた (Manabe et al., 2012)。EB 形成を介した心筋分化誘導で自己拍動する細胞に Fluo-8 を添加して細胞内に取り込ませた後、蛍光観察を行い、自己拍動を呈する領域の蛍光強度を時間経過とともに定量化した (図 18B)。この結果、蛍光強度の変化が一定間隔の周期的な変動として捉えられており、BSA-FL で刺激したマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来の自己拍動細胞に

において、カルシウムオシレーションが生じていることが示された。

さらに、マウス ES/mock 細胞またはマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来の自己拍動細胞について、その分化誘導過程における遺伝子の発現解析を定量 RT-PCR 法により施行した。BSA-FL による影響を網羅的に解析するために、心筋マーカー遺伝子に加え、心筋マーカー以外の中胚葉マーカー遺伝子、内胚葉マーカー遺伝子、外胚葉マーカー遺伝子についても解析を行った。EB 形成 2 日目に 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の BSA-FL あるいは 50  $\text{ng}/\text{mL}$  の Wnt3a で 24 時間処置した後、6 日目あるいは 13 日目に細胞サンプルを回収し、分化マーカー遺伝子の発現解析を行った結果を図 19 に示す。分化中期にあたる 6 日目において、中胚葉前駆体マーカーである *Gata4* 遺伝子、*Isl1* 遺伝子、*Mesp1* 遺伝子、*Gata6* 遺伝子、*Flk1* 遺伝子、*Sox17* 遺伝子の発現は、BSA-FL 処置により有意に上昇した(図 19A)。一方、分化後期にあたる 13 日目では、成熟心筋マーカーである *Myh6* ( $\alpha$ -MHC) 遺伝子と *Actc1* ( $\alpha$ -cardiac actin) 遺伝子の発現が、BSA-FL 刺激により有意に上昇した(図 19B)。また、非心筋性の中胚葉マーカーについて解析した結果、血管系マーカーである *Cdh5* (VE-cadherin) 遺伝子、*Actc2* ( $\alpha$ -smooth muscle actin) 遺伝子、血球系マーカーである *Gata1* 遺伝子、*Gata3* 遺伝子、骨軟骨系マーカーである *Osx* 遺伝子、*Runx2* 遺伝子に関しては、BSA-FL 処置による顕著な変動は認めなかった(図 19C)。内胚葉マーカーである *Afp* 遺伝子、*Pdx1* 遺伝子についても BSA-FL 処置による有意な変動は観察されなかった(図 19D)。外胚葉マーカーに関しては、*Pax6* 遺伝子、*Nestin* 遺伝子に関しては有意な変動が観察されなかった一方で、*Neurod1* 遺伝子については BSA-FL 処置によって発現が低下した(図 19D)。

以上の結果から、人工 Wnt3a キメラ受容体を導入したマウス ES 細胞は、心筋分化誘導過程で代替リガンド刺激により、電気生理学的な特徴を有する自己拍動細胞数の上昇を認めること、中胚葉前駆体マーカー遺伝子が発現亢進を経て、成熟な心筋マーカー遺伝子の高発現に至ることが示された。

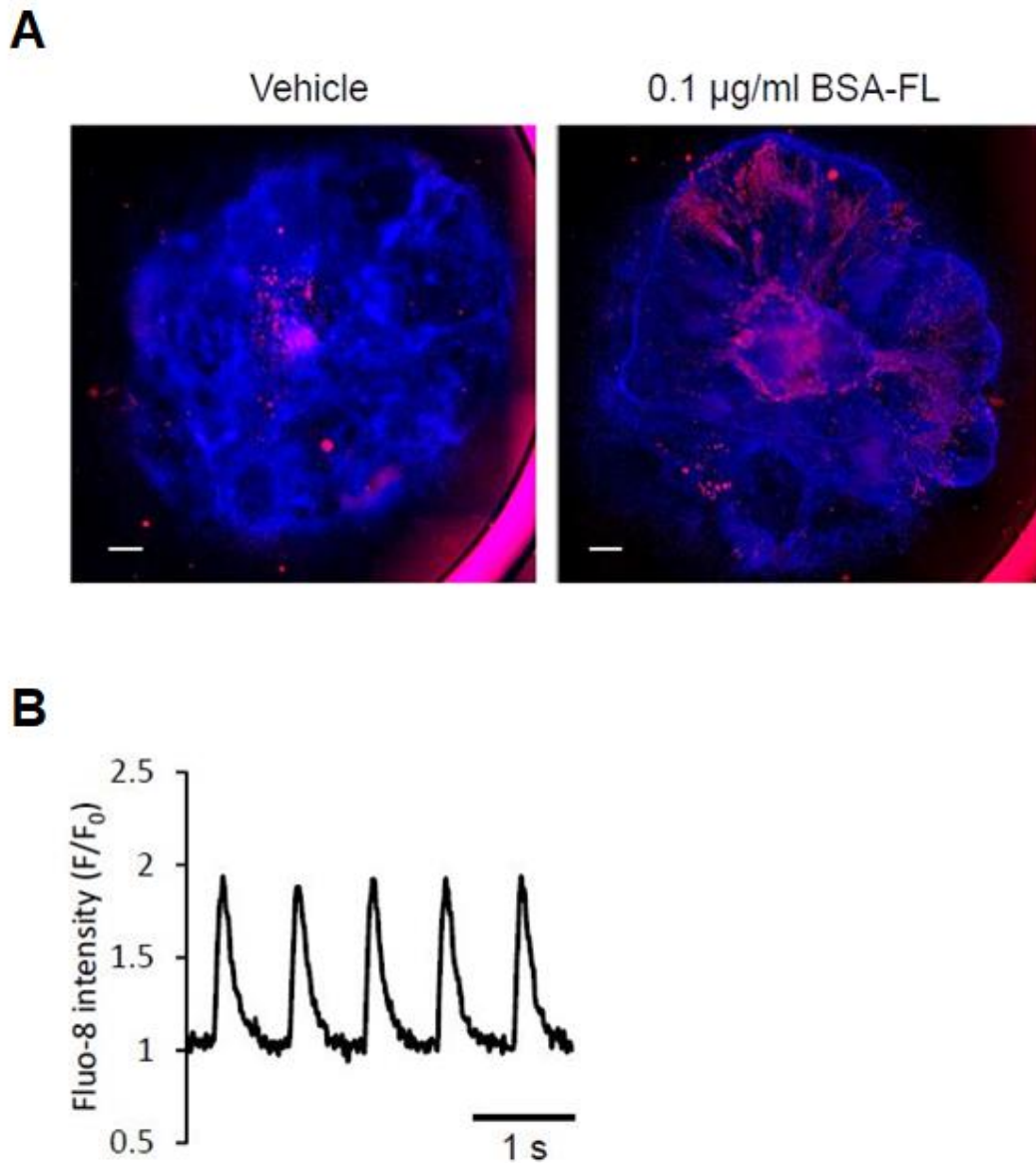


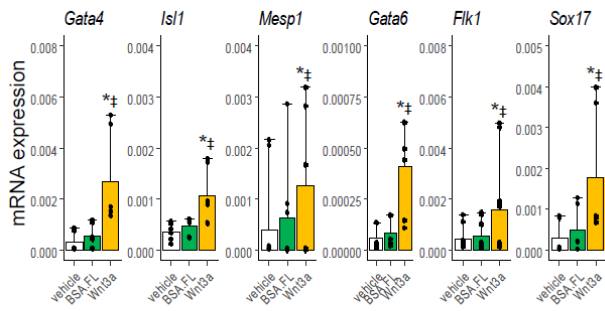
図 18. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞由来自己拍動細胞の免疫組織学的解析およびカルシウムイメージング

(A) BSA-FL 刺激下あるいは非刺激下における、マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来の自己拍動細胞が呈する cardiac  $\alpha$ -actin の免疫染色像（赤色蛍光）を示す。青色蛍光は DAPI による核染色像を示す。

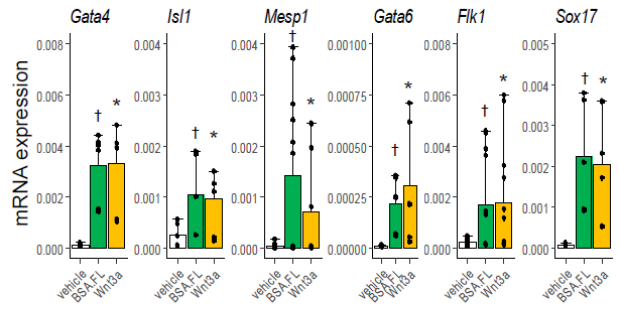
(B) カルシウム指示薬 Fluo-8 を取り込ませたマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来の自己拍性の細胞における、自己拍動に伴った蛍光強度の周期的変化を示す

**A**

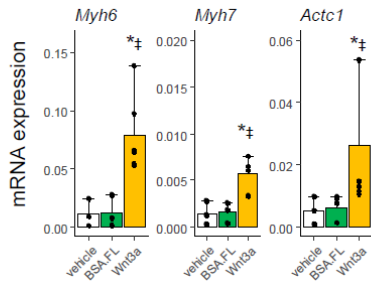
ES/mock



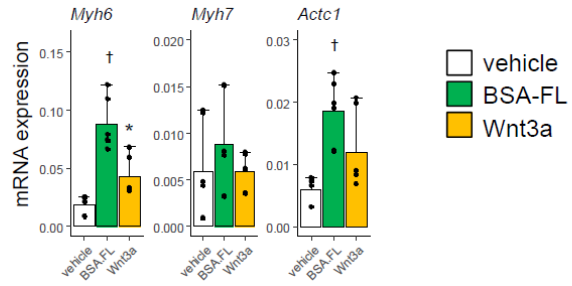
ES/scLRP6S/scFZD8L

**B**

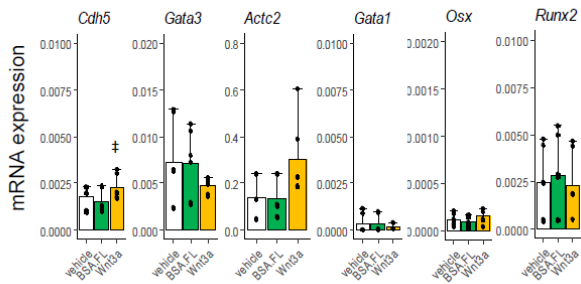
ES/mock



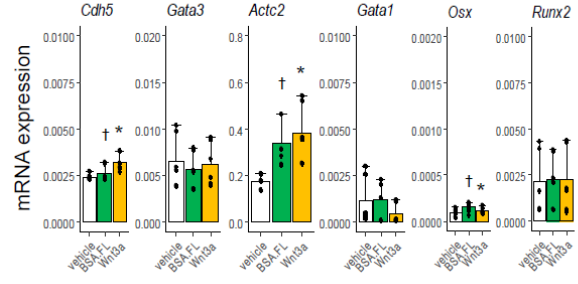
ES/scLRP6S/scFZD8L

**C**

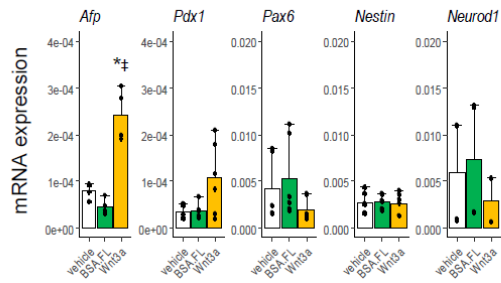
ES/mock



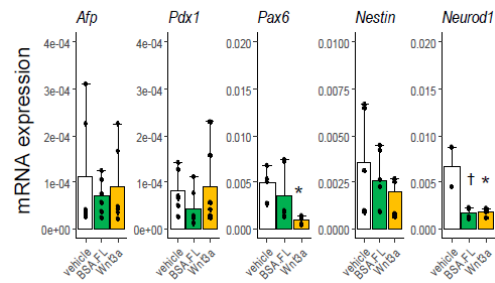
ES/scLRP6S/scFZD8L

**D**

ES/mock



ES/scLRP6S/scFZD8L





### 図 19. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞由来自己拍動細胞の遺伝子発現解析

マウス ES/mock 細胞由来あるいはマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞由来の自己拍動を呈する細胞の分化誘導 6 日目における (A) 中胚葉前駆体マーカー遺伝子、分化 13 日目における (B) 心筋関連マーカー遺伝子、(C) 心筋以外の中胚葉マーカー遺伝子、(D) 内胚葉マーカー遺伝子及び外肺葉マーカー遺伝子の発現レベル。\*Wnt3a の無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、†BSA-FL 刺激の無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

### 3.3.6. 人工 Wnt3a キメラ受容体を介したシグナル伝達を阻害するリガンド分子の解析

内在性の LRP6 及び FZD8 を介したシグナル伝達が、人工 Wnt3a キメラ受容体を介したシグナル伝達に与える影響を明らかにする目的で、Wnt3a に対するアンタゴニスト、Dkk1 の添加実験を行った。Dkk1 は内在性の LRP6 の細胞外領域に結合することで Wnt3a によるシグナル伝達を競合的に阻害する (Foley and Mercola, 2004; Mummery et al., 2012)。本研究で設計・構築した scLRP6S は内在性の LRP6 由来の細胞外領域を有しておらず、よって BSA-FL により惹起される人工 Wnt3a キメラ受容体下流のシグナル伝達は Dkk1 による阻害を受けないことが推測される (図 20)。そこで、0.5 mg/mL の Dkk1 の存在下または非存在下で、0.1 µg/mL の BSA-FL あるいは 50 ng/mL の Wnt3a で処置したマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞において、TCF/β-catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検出した。その結果、Dkk1 の存在下では Wnt3a 処置による転写活性の亢進が抑制される一方で、BSA-FL 処置による転写活性の亢進は維持された (図 20)。このことから、BSA-FL と人工 Wnt3a キメラ受容体を介したシグナル伝達は、内在性の LRP6 及び FZD8 とは独立して、古典的 Wnt シグナル経路を活性化することが示された。

古典的 Wnt シグナル経路は LRP6 及び FZD8 に対して Wnt3a が結合し、Wnt3a/LRP6/FZD8 複合体が形成されることで開始される。そこで、本研究で確認された BSA-FL と人工 Wnt3a キメラ受容体を介したシグナル伝達が、BSA-FL/scLRP6/scFZD8 複合体の形成により惹起されるか否かを検証する目的で、FL 単量体の添加実験を行った。BSA-FL に対して FL 単量体が高濃度で存在すると、FL 単量体が scLRP6S、scFZD8L それぞれの scFV 領域に結合し、BSA-FL/scLRP6S/scFZD8L 複合体の形成を防ぐことが推測される (図 21)。十分量の FL 単量体の存在下あるいは非存在下で、1 µg/mL の BSA-FL で処置したマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞において、TCF/β-catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより検出した。その結果、BSA-FL 刺激による転写活性の亢進は FL 単量体の濃度依存的に阻害された (図 21)。このことから、

BSA-FL と人工 Wnt3a キメラ受容体を介したシグナル伝達は、BSA-FL/scLRP6S/scFZD8L 複合体が形成されることで惹起されることが示唆された。

次に、Dkk1 及び FL 単量体が人工 Wnt3a キメラ受容体を導入した ES 細胞からの心筋分化効率に与える影響を検証した (図 22)。マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞から EB を形成する過程で、Dkk1 の存在下あるいは非存在下で Wnt3a、BSA-FL 刺激を行った結果、Wnt3a 処置による自己拍動率の増加が Dkk1 により消失した (図 22A) 一方で、BSA-FL 処置による自己拍動率の増加は Dkk1 により阻害されなかった (図 22B)。また、FL 単量体の存在下あるいは非存在下で BSA-FL 刺激を行った結果、BSA-FL 処置による自己拍動率の亢進は単量体 FL の添加により抑制された (図 22C)。これらの結果から、内在性の LRP6 及び FZD8 とは独立して、BSA-FL と人工 Wnt3a キメラ受容体が複合体を形成することで古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、心筋分化を促進することが示された。

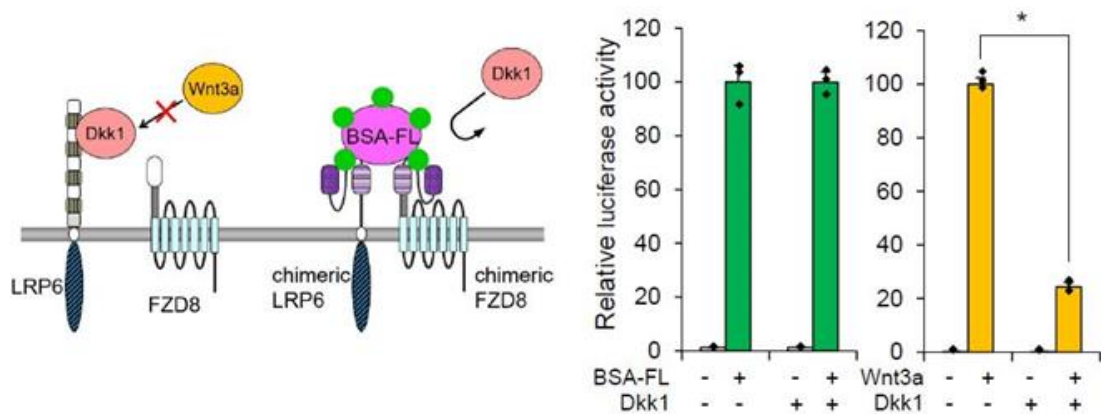


図 20. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞における、リガンド刺激による TCF/ $\beta$ -catenin 依存性転写活性に対する Dkk1 添加の影響

マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞に対して、BSA-FL あるいは Wnt3a の刺激と同時に Dkk1 刺激を行った際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量化した。\*Dkk1 の無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

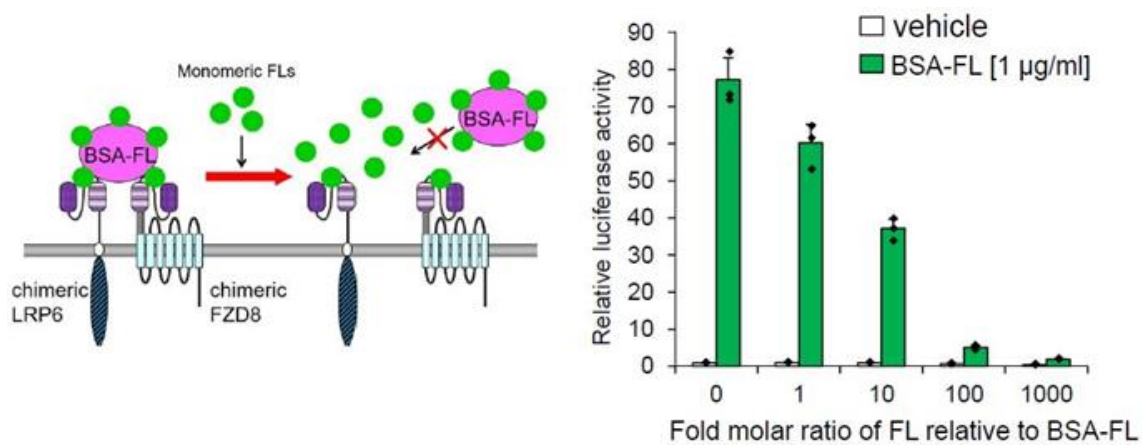


図 21. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞における、リガンド刺激による TCF/ $\beta$ -catenin 依存性転写活性に対する FL 単量体添加の影響

マウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞に対して、BSA-FL と FL 単量体で同時に刺激を行った際の TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより定量化した。エラーバーは S.D.を表す。

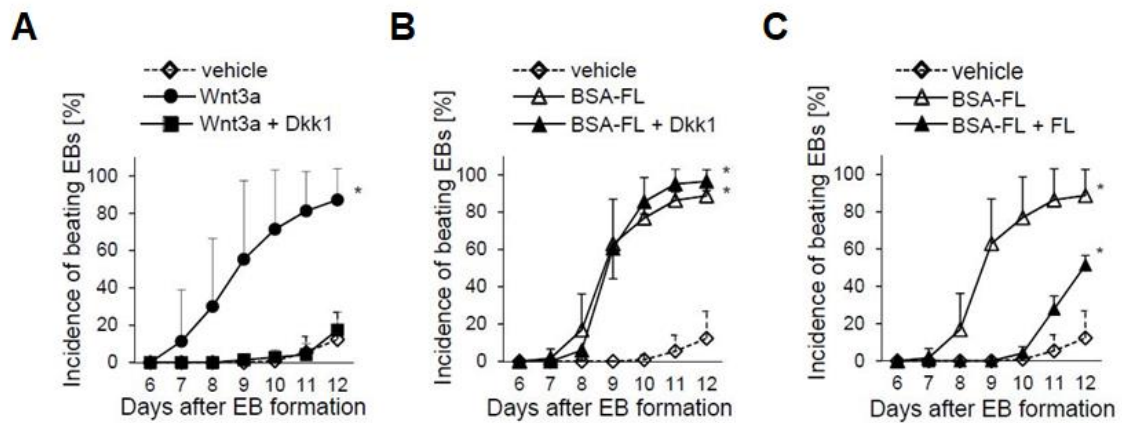


図 22. 人工 Wnt3a キメラ受容体導入 ES 細胞からの心筋分化誘導において、リガンド刺激に対して Dkk1 及び FL 単量体の添加が及ぼす影響

(A) Wnt3a 刺激によるマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの心筋分化誘導に対して、Dkk1 の刺激による自己拍動性を有する細胞の割合。\*無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

(B) BSA-FL 刺激によるマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの心筋分化誘導に対して、Dkk1 の刺激による自己拍動性を有する細胞の割合。\*無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

(C) BSA-FL 刺激によるマウス ES/scLRP6S/scFZD8L 細胞からの心筋分化誘導に対して、FL 単量体の刺激による自己拍動性を有する細胞の割合。\*無刺激時に対して  $p < 0.05$ 、エラーバーは S.D.を表す。

### 3.4. 結果のまとめ

本研究では、古典的 Wnt シグナル経路と同様なシグナル伝達が可能で、心筋分化の促進効果が期待できる人工 Wnt3a キメラ受容体の開発を試みた。代替リガンドとして BSA-FL を採用し、抗 FL 抗体の抗原結合部位を細胞外領域に有する 3 種類の人工 LRP6 (scLRP6S/M/L) 及び 2 種類の人工 FZD8 (scFZD8S/L) を作製した。内在性のマウス LRP6 の細胞外領域を全て欠損させた状態で抗 FL-scFv と結合させた scLRP6S と、FZD8 の細胞外領域を一部残した状態で抗 FL-scFv と結合させた scFZD8L のペアからなる人工 Wnt3a キメラ受容体をマウス ES 細胞に導入することで、リガンド刺激に応答した TCF/ $\beta$ -catenin 依存性の転写活性の亢進が見い出された。

DNA マイクロアレイ及び定量 RT-PCR 法による解析の結果、scLRP6S/scFZD8L を安定発現するマウス ES 細胞株において、BSA-FL 添加に応答して古典的 Wnt 経路と類似のシグナルが活性化することを明らかにした。また、分化誘導早期で BSA-FL 刺激を施すことで、scLRP6S/scFZD8L を安定発現するマウス ES 細胞株から自己拍動を呈する細胞の出現効率が上昇した。加えて、自己拍動に伴って心筋マーカーの発現亢進とカルシウムオシレーションが観察されたことから、代替リガンドに応答して人工 Wnt3a キメラ受容体を導入した ES 細胞から心筋細胞が誘導されることが見い出された。さらに、Wnt3a に対するアンタゴニストの Dkk1 や、FL 単量体の添加実験の結果から、内在性の LRP6 及び FZD8 とは独立して、BSA-FL が人工 Wnt3a キメラ受容体と複合体を形成することで古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、マウス ES 細胞からの心筋分化を促進することが示された。

以上より、本研究で構築した人工 Wnt3a キメラ受容体は、毒性がなく安価な代替リガンドである BSA-FL に応答して古典的 Wnt シグナル経路を活性化し心筋分化を促進することが示された。今後、人工キメラ受容体を用いた経済的な心筋再生療法を確立できる可能性が期待される。

## 第4章 考察

### 4.1. miR-17-92 とその標的遺伝子 *Pten*、*p21* の iPS 細胞形成における役割

体細胞へ初期化 4 因子を導入することで iPS 細胞は樹立される。iPS 細胞は再生医療や創薬研究に加え、疾患モデル作製への応用及び実用化が期待されているが、iPS 細胞は樹立効率の低さやがん化のリスクといった課題を抱えている。これらの課題解決に向けて、iPS 細胞への初期化メカニズムの分子レベルでの解明が強く望まれている。これまでの研究から、iPS 細胞への初期化において、がん抑制因子 p53 の欠損によりアポトーシスと細胞周期停止が阻害されることで、初期化効率が劇的に増加すること、さらに、p53 の下流標的である p21 の発現により iPS 細胞形成が有意に抑制されることが示された (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marion et al., 2009; Utikal et al., 2009)。PTEN もまたがん抑制因子であり、ES ユビキチンリガーゼである MDM2、MDMX の不活性化を通して p53 を安定化する (Wade et al., 2013)。故に、miR-17-92 は PTEN と p21 を標的として発現を抑制することで iPS 細胞の形成を促進するものと考えられる。

第2章の研究から、miR-17-92 は初期化誘導過程の初期では p21 の発現を、後期では PTEN の発現をそれぞれ時期特異的に抑制することが見いだされた。miR-17-92 は複数の標的をもつことから、初期化誘導過程における時期特異的な抑制効果は標的となる mRNA が ceRNA として相互に作用していることが原因と考えられる。一般的に、miRNA は標的遺伝子の認識配列に結合し、RNA 誘導性サイレンシング複合体を形成することにより、mRNA を分解したり翻訳を阻害したりすることで遺伝子発現を負に制御する。ceRNA は、共通の miRNA 認識配列を有する長鎖非翻訳 RNA や mRNA を含む RNA であり、miRNA に対して競合的に作用する (Nishizawa and Kimura, 2015; Salmena et al., 2011)。ヒト細胞では、*PTEN* 遺伝子に類似した塩基配列をもつ偽遺伝子 *PTENPI* から長鎖非コード RNA が転写され、これが miR-17-92 に対する ceRNA として機能し PTEN mRNA と競合的に作用する (Pink et al., 2011; Poliseno et al., 2010)。偽遺伝子 *PTENPI* は



マウスゲノムでは保存されていないが、ZEB2 mRNA がマウス細胞における PTEN の ceRNA として報告されている (Karreth et al., 2011)。ZEB2 mRNA は親和性の高い miRNA を吸着することで、その標的遺伝子の発現抑制が阻害される。ZEB2 の減弱は、PTEN の発現低下から PI3K/Akt 経路の活性化を起し、ヒトメラノーマの細胞形質転換を促進する (Karreth et al., 2011)。第 2 章の研究結果から、初期化誘導過程において、miR-17-92 のスポンジとしてはたらく PTEN mRNA と p21 mRNA は互いに競合的に作用しあいながら iPS 細胞形成を負に制御していることが見いだされた。

#### 4.2. 人工 Wnt3a キメラ受容体の細胞分化制御における意義

古典的 Wnt シグナル経路は幹細胞における自己複製能及び多分化能の制御に関与する。さらに、古典的 Wnt シグナル伝達の活性化は、多能性幹細胞から心筋細胞への分化効率を高める (Cohen et al., 2008; Kwon et al., 2007; Mummery et al., 2012; Naito et al., 2006; Ueno et al., 2007)。しかしながら、リガンドである Wnt タンパク質は疎水性の性質を示すことから、組換えタンパク質の産生にはコストがかかる (Nusse and Clevers, 2017)。そこで、第 3 章では Wnt3a による古典的 Wnt シグナル経路の活性化を再現する、人工 Wnt3a キメラ受容体の開発を試みた。

BSA-FL を代替リガンドとして採用し、抗 FL 抗体の抗原結合部位と内在性の LRP6、FZD8 を融合させることで 3 種類の人工 LRP6 と 2 種類の人工 FZD8 を作製した。これらの人工 LRP6 と人工 FZD8 を種々の組合せでマウス ES 細胞に発現させた実験結果から、scLRP6S/scFZD8L を安定発現する細胞株では、BSA-FL リガンド刺激に応答して TCF/  $\beta$ -catenin 依存性の転写活性が亢進し、Wnt3a シグナル伝達の標的遺伝子の発現レベルが上昇することが見いだされた。さらに、分化誘導の早期にリガンド刺激を行うことで、心筋細胞への分化誘導効率の上昇が確認された。また、BSA-FL 刺激によって、心筋マーカー遺伝子の発現が亢進した一方で、非心筋性の中胚葉や内胚葉、外胚葉に対するマーカー遺伝子の発現は変動しなかった。これらのことから、本研究で設計・構築

した人工 Wnt3a キメラ受容体は代替リガンドである BSA-FL に応答して古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、指向性をもって心筋分化を誘導することが示された。また、人工 Wnt3a キメラ受容体は、内在性の LRP6 及び FZD8 とは独立して古典的 Wnt シグナル経路を活性化し、心筋分化を促進することも見いだされた。このことから、人工 Wnt3a キメラ受容体による標的特異的な古典的 Wnt シグナル伝達の活性化が可能であることが示された。

### 4.3. 多能性幹細胞の安全かつ効率的な医療応用へ向けて

多能性幹細胞を再生医療へ応用する際の安全性やコストについて、まず、多能性幹細胞の作製における安全性について考慮する必要がある。iPS 細胞はその形成効率の低さやがん化のリスクといった課題を抱えており、高い分化能を維持し、かつ、がん化のリスクの低い iPS 細胞の作製が強く望まれている。第 2 章の研究では、iPS 細胞への初期化誘導過程における miR-17-92 の発現上昇に着目し、これが c-Myc による iPS 細胞形成効率の亢進と関わることを明らかにした。miR-17-92 はがん発症の原因となる miRNA としても機能し、この研究から明らかにされた標的遺伝子 *Pten* や *p21* はがん抑制的に作用するものとしても知られている。ここでは、miR-17-92 の iPS 細胞形成促進作用について検証を行った一方で、がん化の促進といった安全性の評価は実施していない。今後は、初期化誘導過程における miR-17-92 の発現上昇が iPS 細胞のがん化リスクに及ぼす影響について検証することで、効率面に加え安全面においても優れた iPS 細胞の作製に寄与するものと期待される。

次に、多能性幹細胞の分化誘導について、種々の成長因子を介したシグナル伝達の制御が多能性幹細胞からの心筋分化誘導効率を高めることが報告されている (Protze et al., 2019)。しかしながら、組換えタンパク質の精製や低分子化合物の合成にかかるコストを考慮する場合、より安価でかつ生体組織に対する安全性の高い分化誘導技術の確立が強く期待される。第 3 章の研究では、安価な代替リガンド BSA-FL とこれに応答する人

工 Wnt3a キメラ受容体を用いることで効率的に心筋細胞を分化誘導することに成功した (Sogo et al., 2023)。人工キメラ受容体を用いた細胞内シグナル伝達の制御については、複数の先行研究においてその有用性が報告されている (Nakabayashi et al., 2016; Tsukamoto et al., 2020)。つまり、分化に関与するシグナル伝達機構を応用し、人工キメラ受容体を構築することで、心筋細胞のみならず様々な細胞種への分化誘導による組織再生が低コストで実現する可能性が期待される。

## 第5章 結語

本博士論文の前半の研究（第2章）では、初期化誘導過程において、c-Myc が miR-17-92 の発現増加と iPS 細胞産生効率に寄与することを示した。また、miR-17-92 を構成する miRNA のうち、特に miR-17 と miR-20a、が p21 と PTEN の発現を時期特異的に抑制することで、初期化効率を上昇させていることが見いだされた。初期化を亢進する miRNA は他にも複数報告されているが、miRNA の標的遺伝子が ceRNA として競合的に作用しながら iPS 細胞の形成を負に制御している本研究成果は、初期化の分子機構の一端を解明する重要な知見と言える。

さらに、後半の研究（第3章）では多能性幹細胞の分化誘導に関して、誘導早期の古典的 Wnt 経路の活性化が心筋分化を促進することに着目し、これを再現する人工キメラ受容体の開発を試みた。ここでは、安価な代替リガンドとして BSA-FL を採用し、これに応答する scFv を細胞外領域にもつ人工 FZD8 及び人工 LRP6 を構築し、マウス ES 細胞に導入することで種々の解析を行なった。その結果、代替リガンド刺激により BSA-FL/人工 FZD/人工 LRP6 が複合体を形成することで古典的 Wnt シグナル伝達が惹起され、心筋マーカー遺伝子の発現亢進とカルシウムオシレーションを伴う自己拍動性の心筋細胞への分化効率上昇を認めた。

以上の結果は、初期化機構の解明と効率的な多能性幹細胞の作製法の開発に寄与し、さらに、多能性幹細胞から経済的な心筋分化誘導法の開発にも寄与するものと期待される。

## 謝辞

立命館大学生命科学部生命医科学科 川村晃久教授には学士課程から博士課程後期課程における指導教官として、また、本博士論文における主査として、多岐に渡りご指導いただき深く感謝申し上げます。また、立命館大学生命科学部生命情報学科 天野晃教授、立命館大学生命科学部生命医科学科 田中秀和教授には本論文の副査としてご指導いただき感謝申し上げます。

また、本論文の研究を実施するにあたり、医薬基盤・健康・栄養研究所細胞ワクチンプロジェクトプロジェクトリーダー 河原正浩先生、一般社団法人総合研究奨励会 長棟輝行先生には、人工キメラ受容体に関わる実験材料から実験手法まで様々なご助言を賜りましたこと、感謝申し上げます。本研究の遂行に際して多大なご協力・ご助言をいただいた立命館大学生命科学部生命医科学科任期制講師（現、東海大学医学部医学科基礎医学系生体機能学領域）中尾周先生、立命館大学総合科学技術研究機構研究教員（助教）植山萌恵先生、ならびに立命館大学生命科学部生命医科学科 幹細胞・再生医学研究室の皆様へ感謝申し上げます。

## 参考文献

Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal*, 16(13), 3797–3804.

Azzolin, L., Panciera, T., Soligo, S., Enzo, E., Bicciato, S., Dupont, S., Bresolin, S., Frasson, C., Basso, G., Guzzardo, V., Fassina, A., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2014). YAP/TAZ incorporation in the  $\beta$ -catenin destruction complex orchestrates the Wnt response. *Cell*, 158(1), 157–170.

Bers D. M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 415(6868), 198–205.

Bourhis, E., Tam, C., Franke, Y., Bazan, J. F., Ernst, J., Hwang, J., Costa, M., Cochran, A. G., & Hannoush, R. N. (2010). Reconstitution of a frizzled8.Wnt3a.LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. *The Journal of biological chemistry*, 285(12), 9172–9179.

Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205.

Cohen, E. D., Tian, Y., & Morrissey, E. E. (2008). Wnt signaling: an essential regulator of cardiovascular differentiation, morphogenesis and progenitor self-renewal. *Development*, 135(5), 789–798.

Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H., & Young, R. A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes & development*, 22(6), 746–755.

Cong, F., Schweizer, L., & Varmus, H. (2004). Wnt signals across the plasma membrane to activate the beta-catenin pathway by forming oligomers containing its receptors, Frizzled and LRP. *Development*, 131(20), 5103–5115.

Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., Wang, S., Morton, C. C., McMahon, A. P., Powers, D., & Melton, D. A. (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *The New England journal of medicine*, 350(13), 1353–1356.

de Jaime-Soguero, A., Abreu de Oliveira, W. A., & Lluís, F. (2018). The Pleiotropic Effects of the Canonical Wnt Pathway in Early Development and Pluripotency. *Genes*, 9(2), 93.

Evans, M.J., & Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.

Foley, A., & Mercola, M. (2004). Heart induction: embryology to cardiomyocyte regeneration. *Trends in cardiovascular medicine*, 14(3), 121–125.

Fossat, N., Jones, V., Khoo, P. L., Bogani, D., Hardy, A., Steiner, K., Mukhopadhyay, M., Westphal, H., Nolan, P. M., Arkell, R., & Tam, P. P. (2011). Stringent requirement of a proper level of canonical WNT signalling activity for head formation in mouse embryo. *Development*, 138(4), 667–676.

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., & Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*, 65(21), 9628–9632.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., & Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460(7259), 1132–1135.

Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., & Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *The Journal of cell biology*, 148(3), 567–578.

Jouneau, A., Ciaudo, C., Sismeiro, O., Brochard, V., Jouneau, L., Vandormael-Pournin, S., Coppée, J. Y., Zhou, Q., Heard, E., Antoniewski, C., & Cohen-Tannoudji, M. (2012). Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA*, 18(2), 253–264.

Kaneko, E., Kawahara, M., Ueda, H., & Nagamune, T. (2012). Growth control of genetically modified cells using an antibody/c-Kit chimera. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(5), 641–646.

Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., DeNicola, G., Webster, K. A., Weiss, D., Perez-Mancera, P. A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D. J.,

Tuveson, D. A., & Pandolfi, P. P. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 147(2), 382–395.

Kawahara, M., Chen, J., Sogo, T., Teng, J., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., Ueda, H., & Nagamune, T. (2011). Growth promotion of genetically modified hematopoietic progenitors using an antibody/c-Mpl chimera. *Cytokine*, 55(3), 402–408.

Kawahara, M., Hitomi, A., & Nagamune, T. (2014a). Antigen-responsive regulation of Cell motility and migration via the signalobodies based on c-Fms and c-Mpl. *Biotechnology progress*, 30(2), 411–417.

Kawahara, M., Hitomi, A., & Nagamune, T. (2014b). S-Fms signalobody enhances myeloid cell growth and migration. *Biotechnology journal*, 9(7), 954–961.

Kawahara, M., Shimo, Y., Sogo, T., Hitomi, A., Ueda, H., & Nagamune, T. (2008). Antigen-mediated migration of murine pro-B Ba/F3 cells via an antibody/receptor chimera. *Journal of biotechnology*, 133(1), 154–161.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., & Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259), 1140–1144.

Kida, Y. S., Kawamura, T., Wei, Z., Sogo, T., Jacinto, S., Shigeno, A., Kushige, H., Yoshihara, E., Liddle, C., Ecker, J. R., Yu, R. T., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2015). ERRs Mediate a Metabolic Switch Required for Somatic Cell Reprogramming to Pluripotency. *Cell stem cell*, 16(5), 547–555.

Kielman, M. F., Rindapää, M., Gaspar, C., van Poppel, N., Breukel, C., van Leeuwen, S., Taketo, M. M., Roberts, S., Smits, R., & Fodde, R. (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nature genetics*, 32(4), 594–605.

Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K., & Nakayama, K. (1999). An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of beta-catenin. *The EMBO journal*, 18(9), 2401–2410.



- Kwon, C., Arnold, J., Hsiao, E. C., Taketo, M. M., Conklin, B. R., & Srivastava, D. (2007). Canonical Wnt signaling is a positive regulator of mammalian cardiac progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26), 10894–10899.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, 460(7259), 1136–1139.
- Li, V. S., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J., Maurice, M. M., Mahmoudi, T., & Clevers, H. (2012). Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*, 149(6), 1245–1256.
- Liao, J., Marumoto, T., Yamaguchi, S., Okano, S., Takeda, N., Sakamoto, C., Kawano, H., Nii, T., Miyamoto, S., Nagai, Y., Okada, M., Inoue, H., Kawahara, K., Suzuki, A., Miura, Y., & Tani, K. (2013). Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(6), 1242–1250.
- Liechty, K. W., MacKenzie, T. C., Shaaban, A. F., Radu, A., Moseley, A. M., Deans, R., Marshak, D. R., & Flake, A. W. (2000). Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature medicine*, 6(11), 1282–1286.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., & He, X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*, 108(6), 837–847.
- Liu, C. C., Pearson, C., & Bu, G. (2009a). Cooperative folding and ligand-binding properties of LRP6 beta-propeller domains. *The Journal of biological chemistry*, 284(22), 15299–15307.
- Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., & Nagamune, T. (2008). Construction of a fluorescein-responsive chimeric receptor with strict ligand dependency. *Biotechnology and bioengineering*, 101(5), 975–984.
- Liu, W., Kawahara, M., Ueda, H., & Nagamune, T. (2009b). The influence of domain structures on the signal transduction of chimeric receptors derived from the erythropoietin receptor. *Journal of biochemistry*, 145(5), 575–584.

Liu, X. S., Chopp, M., Wang, X. L., Zhang, L., Hozeska-Solgot, A., Tang, T., Kassis, H., Zhang, R. L., Chen, C., Xu, J., & Zhang, Z. G. (2013). MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke. *The Journal of biological chemistry*, 288(18), 12478–12488.

Manabe, Y., Miyatake, S., Takagi, M., Nakamura, M., Okeda, A., Nakano, T., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., & Fujii, N. L. (2012). Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PloS one*, 7(12), e52592.

Marión, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*, 460(7259), 1149–1153.

Martin G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(12), 7634–7638.

Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., Elliott, D. A., Elefanty, A. G., & Kamp, T. J. (2012). Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation research*, 111(3), 344–358.

Naito, A. T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., & Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19812–19817.

Nakabayashi, H., Aoyama, S., Kawahara, M., & Nagamune, T. (2016). Differentiation signalobody: Demonstration of antigen-dependent osteoclast differentiation from a progenitor cell line. *Journal of bioscience and bioengineering*, 122(3), 357–363.

Nakabayashi, H., Kawahara, M., & Nagamune, T. (2017). Cell-Surface Expression Levels Are Important for Fine-Tuning the Performance of Receptor Tyrosine Kinase-Based Signalobodies. *Biotechnology journal*, 12(12), 1700441.

Nakabayashi, H., Kawahara, M., Tanaka, K., & Nagamune, T. (2013). Construction of antibody/insulin receptor chimera for growth induction of mammalian cells. *Cytotechnology*, 65(6), 945–953.

Nguyen, T. D., Nagamune, T., & Kawahara, M. (2019). A Suicide Switch Directly Eliminates Intracellular scFv Oligomers in the Cytoplasm of Mammalian Cells. *Biotechnology journal*, 14(1), e1800350.

Nishizawa, M., & Kimura, T. (2015). RNA networks that regulate mRNA expression and their potential as drug targets. *RNA & disease*, 3, e864.

Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., & Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell*, 64(2), 231.

Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, 169(6), 985–999.

Nusse, R., & Varmus, H. E. (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 31(1), 99–109.

Pink, R. C., Wicks, K., Caley, D. P., Punch, E. K., Jacobs, L., & Carter, D. R. (2011). Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease?. *RNA*, 17(5), 792–798.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W. J., & Pandolfi, P. P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465(7301), 1033–1038.

Protze, S. I., Lee, J. H., & Keller, G. M. (2019). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications. *Cell stem cell*, 25(3), 311–327.

Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., & Nusse, R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell*, 50(4), 649–657.

Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language?. *Cell*, 146(3), 353–358.

Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature methods*, 11(8), 783–784.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., & Brivanlou, A. H. (2004). 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(1), 55–63.

Sogo, T., Kawahara, M., Ueda, H., Otsu, M., Onodera, M., Nakauchi, H., & Nagamune, T. (2009). T cell growth control using hapten-specific antibody/interleukin-2 receptor chimera. *Cytokine*, 46(1), 127–136.

Sogo, T., Nakao, S., Tsukamoto, T., Ueyama, T., Harada, Y., Ihara, D., Ishida, T., Nakahara, M., Hasegawa, K., Akagi, Y., Kida, Y. S., Nakagawa, O., Nagamune, T., Kawahara, M., & Kawamura, T. (2023). Canonical Wnt signaling activation by chimeric antigen receptors for efficient cardiac differentiation from mouse embryonic stem cells. *Inflammation & regeneration*, 43(1), 11.

Suemori, H., Tada, T., Torii, R., Hosoi, Y., Kobayashi, K., Imahie, H., Kondo, Y., Iritani, A., & Nakatsuji, N. (2001). 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(2), 273–279.

Suemori, H., Yasuchika, K., Hasegawa, K., Fujioka, T., Tsuneyoshi, N., & Nakatsuji, N. (2006). Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochemical and biophysical research communications*, 345(3), 926–932.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861–872.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.

Tanaka, K., Kawahara, M., Ueda, H., & Nagamune, T. (2009). Selection and growth regulation of genetically modified cells with hapten-specific antibody/receptor tyrosine kinase chimera. *Biotechnology progress*, 25(4), 1138–1145.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.

Tone, Y., Kawahara, M., Hayashi, J., & Nagamune, T. (2013a). Cell fate conversion by conditionally switching the signal-transducing domain of signalobodies. *Biotechnology and bioengineering*, 110(12), 3219–3226.

Tone, Y., Kawahara, M., Kawaguchi, D., Ueda, H., & Nagamune, T. (2013b). Death signalobody: inducing conditional cell death in response to a specific antigen. *Human gene therapy methods*, 24(3), 141–150.

Tsakiridis, A., Huang, Y., Blin, G., Skylaki, S., Wymeersch, F., Osorno, R., Economou, C., Karagianni, E., Zhao, S., Lowell, S., & Wilson, V. (2014). Distinct Wnt-driven primitive streak-like populations reflect in vivo lineage precursors. *Development*, 141(6), 1209–1221.

Tsukamoto, T., Sogo, T., Ueyama, T., Nakao, S., Harada, Y., Ihara, D., Akagi, Y., Kida, Y. S., Hasegawa, K., Nagamune, T., Kawahara, M., & Kawamura, T. (2020). Chimeric G-CSF Receptor-Mediated STAT3 Activation Contributes to Efficient Induction of Cardiomyocytes from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Biotechnology journal*, 15(2), e1900052.

Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A. D., Golob, J. L., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R. T., & Murry, C. E. (2007). Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(23), 9685–9690.

Utikal, J., Polo, J. M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G., & Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, 460(7259), 1145–1148.

Wade, M., Li, Y. C., & Wahl, G. M. (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer*, 13(2), 83–96.

Willert, J., Epping, M., Pollack, J. R., Brown, P. O., & Nusse, R. (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC developmental biology*, 2, 8.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920.