

# 博 士 論 文

全能性細胞特異的遺伝子を用いた iPS 細胞の作製

2022 年 9 月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科

博士課程 後期課程

519305

原口 大生



## 略称表

Actin :  $\beta$ -actin, Actb

ALP : Alkaline Phosphatase

Axin : Axin 1

Brg1 : Brahma-related gene 1

Btg4 : B-cell translocation gen 4

CAG : CMV enhancer chicken  $\beta$ -actin

Cdh1 : Cadherin 1

Cox7a1 : Cytochrome c oxidase subunit 7A1

Cyp26a1 : Cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDD : Digital differential display

Dlk1 : Delta like non-canonical Notch ligand 1

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

Dox : Doxycycline

Dppa4 : Developmental pluripotency associated 4

EMT : Epithelial-mesenchymal transition

ES : Embryonic Stem

Esrrb : Estrogen related receptor, beta

EST : Expression Sequence Tag

Fbxw14 : F-box/WD repeat-containing protein 14

FCS : Fetal Calf Serum

GFP : Green Fluorescent Protein

GMEM : Glasgow's MEM

Gsk3 : Glycogen synthase kinase 3

Gtl2 : Maternally expressed 3, Meg3

Hoxa1 : Homeobox A1

Idh2 : Isocitrate dehydrogenase 2 (NADP<sup>+</sup>)

iPS : induced Pluripotent Stem

Klf4 : Kruppel-like factor 4

Klf17 : Kruppel-like factor 17

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

Mater : Maternal antigen that embryos require

MDM2 : Transformed mouse 3T3 cell double minute 2

ME : Mercapto-ethanol

MEF : Mouse Embryonic Fibroblast

MET : Mesenchymal Epithelial Transition  
Myc : Myelocytomatosis oncogene  
Nanog : Nanog homeobox  
NEAA : Non-essential amino acids  
Oct3/4 : POU domain, class 5, transcription factor 1, Pou5f1  
OKSM : Oct3/4, Klf4, Sox2 and c-Myc  
OKSMP : Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc and Pramef12  
Pdk1 : Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1  
PFA : Paraformaldehyde  
Pfk1 : Phosphofructokinase 1  
PGC7 : Developmental pluripotency-associated 3, Dppa3  
Pgk1 : Phosphoglycerate kinase 1  
Pramef12 : Preferentially expressed antigen in melanoma family 12  
PVDF : Polyvinylidene Fluoride  
p53 : Transformation related protein 53, Trp53  
RA : Retinoic acid  
Rfp14 : Ret finger protein-like 4  
SCMC : Subcortical maternal complex  
SD : Standard Division  
Slc2a1 : Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter, member 1  
Slug : Snail family zinc finger 2, Snai2  
Snail : Snail family zinc finger 1, Snai1  
Sox2 : SRY (sex determining region Y)-box 2  
Tet3 : tet methylcytosine dioxygenase 3  
Trim61 : Tripartite motif containing 61  
Zbed3 : Zinc finger, BED-type containing 3  
Zc3h6 : Zinc finger CCCH-type containing  
Zeb1 : Zinc finger E-box binding homeobox 1  
Zfp3612 : Zinc finger protein 36-like 2  
Zfp92 : Zinc finger protein 92  
Zic3 : Zinc finger protein of the cerebellum 3

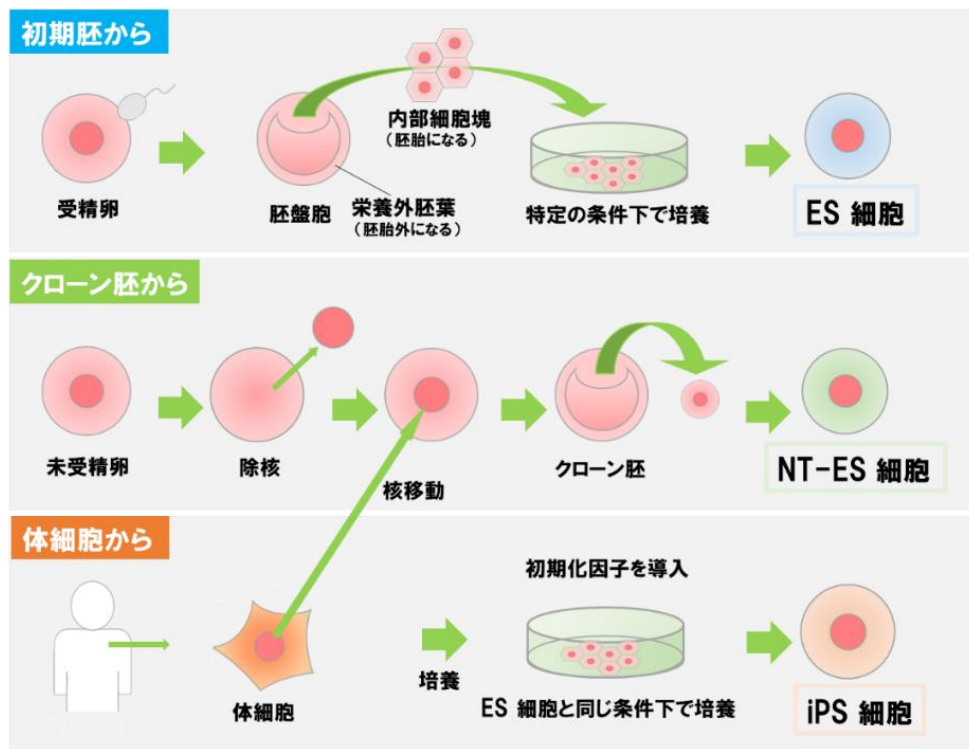
## 序論

近年、iPS 細胞が樹立されたことにより、再生医療実現への期待が急速に高まりつつある。iPS 細胞とは、MEF (mouse embryonic fibroblast : マウス胎仔線維芽細胞) に、4つの転写因子 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) を遺伝子導入することにより樹立された多能性幹細胞である (Takahashi et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006)。しかし、現在 iPS 細胞の樹立効率が低いこと (Hochedlinger and Plath, 2009)、品質が安定しないこと (Pera, 2011)、分化能が低いこと (Kang et al., 2009; Zhao et al., 2009)、などが問題となっている。細胞核のリプログラミングは「受精卵」、「体細胞核移植」(Wakayama et al., 1998)及び「iPS 細胞の誘導時」に生じる (Fig. 1)。「受精卵」及び「体細胞核移植」では、卵子に多量存在する母性因子が使われる。一方、「iPS 細胞誘導時」には遺伝子導入した少数の転写因子が使われる。このことから卵細胞には転写因子の導入では生じない特異的なリプログラミングシステムが存在すると考えられる。最近の研究から、核移植胚から樹立された核移植 ES 細胞の方が iPS 細胞より ES 細胞に近いメチル化状態や遺伝子発現を示すことが明らかにされた (Ma et al., 2014)。このことから、卵子に含まれる因子によりリプログラミングされた細胞の方が、4つの転写因子によりリプログラミングされた細胞より、「高品質」であることが示唆される。実際に、母性因子である Glis1 (Maekawa et al., 2011)、TH2A/TH2B (Shinagawa et al., 2014)、PGC7 (Xu et al., 2015)、Obox1 (Wu et al., 2017)、Zscan4c (Jiang et al., 2013)、および Zscan4f (Cheng et al., 2020) が iPS 細胞の樹立効率や品質を改善することが報告されている (Fig. 2)。

当研究室では、受精後に生じるリプログラミングの分子機構を解析する過程において、*in silico* screening により、全能性を有する初期の着床前胚に特異的あるいは高発現する遺伝子 (全能性細胞特異的遺伝子) を同定している (2015 年後藤悠比 修士論文; 2015 年 鈴木 健士 修士論文; 2016 年 稲岡 京介 修士論文; 2017 年 中田 健太 修士論文; 2017 年 宮木 杏菜 修士論文; 2017 年 劉 琳琳 修士論文; 2019 年 比留田 圭佑 修士論文; 2021 年 西村 和真 修士論文)。現在までに、全能性細胞特異的遺伝子として、Btg4 (B-cell translocation gen 4)、Fbxw14 (F-box/WD repeat-containing protein 14)、Klf17 (Kruppel-like factor 17)、Pramef12 (Preferentially expressed antigen in melanoma family 12)、Rfp14 (Ret finger protein-like 4)、Trim61 (Tripartite motif containing 61)、Zbed3 (Zinc finger, BED-type

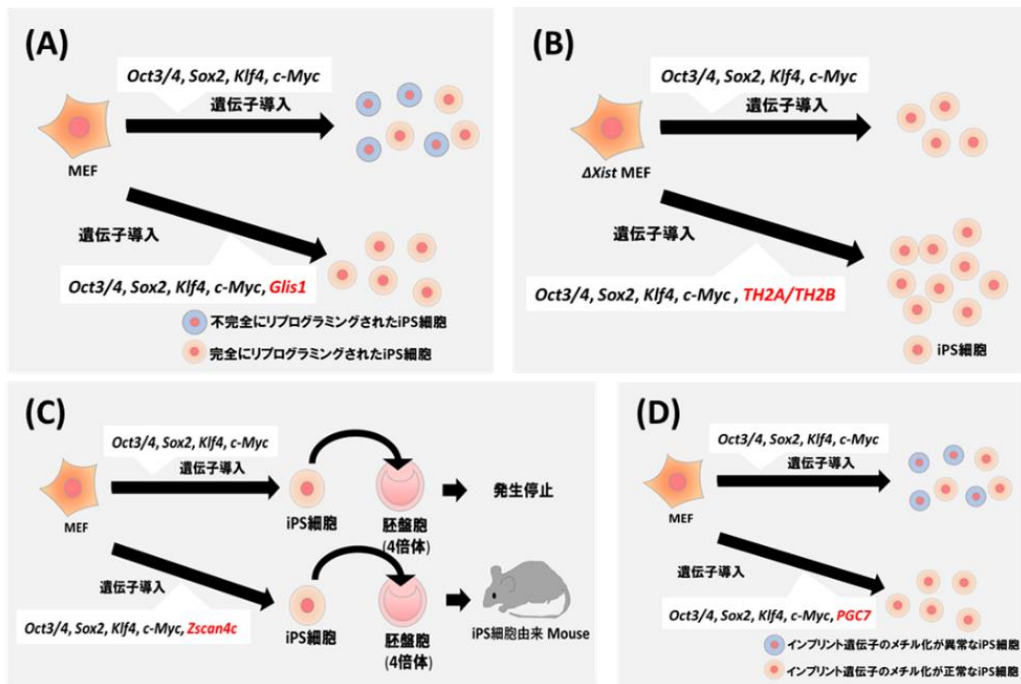
containing 3)、Zc3h6 (Zinc finger CCCH-type containing) および Zfp92 (Zinc finger protein 92) が同定されている。これらの遺伝子の中で、Klf17 と Btg4 については研究室の先行研究から、正常発生に必要な母性効果遺伝子であり、それぞれ胚性遺伝子の活性化と母性 RNA の分解に機能することが明らかにされている。また Zc3h6 に関しては胚性遺伝子の活性化、Zbed3 に関しては発生過程における対称分裂、Rfp14 と Trim61 に関しては母性タンパク質の分解、Pramef12 に関しては雄のノックアウトマウスの精子形成に異常をきたすことから減数分裂または細胞分裂の制御に機能することが明らかにされつつある。

本研究では、全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率と品質に及ぼす影響を明らかにし、全能性細胞特異的遺伝子を用いた高効率・高品質 iPS 細胞を樹立するとともに、その分子機構を明らかにすることを目的とした (Fig. 3)。第 1 章では、全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響を検討した。第 2 章では、第 1 章で得られた結果から Pramef12 に着目し、Pramef12 を用いて作製した iPS 細胞の品質についての検討を行った。第 3 章では、Pramef12 が iPS 細胞の樹立効率と品質を向上させる分子機構について考察した。最後に、これらの結果を統合して、全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率と品質に与える影響、また本研究の今後の展開について議論する。



**Fig. 1 細胞核のリプログラミングと多能性幹細胞の樹立**

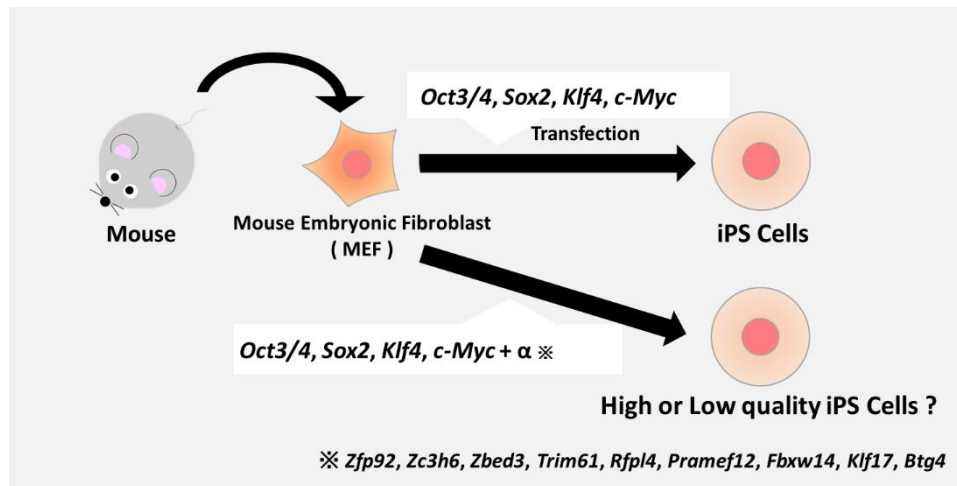
最終分化した精子と卵子は受精後に初期化（リプログラミング）という過程を経て、全ての種類の細胞に分化することができる「全能性」という能力を獲得し、胚盤胞期からはES細胞が樹立できる。リプログラミングは、除核した卵子に体細胞の核を移植したクローン胚においても生じ、クローン胚からはNT-ES細胞が樹立できる。また、リプログラミングは体細胞にES細胞で特異的に発現する4つの転写因子を体細胞に遺伝子導入した際にも生じ、最終的にiPS細胞が誘導される。



**Fig. 2** 母性因子による iPS 細胞の樹立効率と品質の改善

(A) *Glis1* を用いて作製した iPS 細胞では、完全にリプログラミングされた iPS 細胞の割合が増加する。(B) *TH2A/TH2B* を用いて作製した iPS 細胞では、樹立効率が向上する。(C) *Zscan4c* を用いて作製した iPS 細胞では、分化能が高まる。*PGC7* を用いて作製した iPS 細胞では、インプリ遺伝子のメチル化異常が改善され、分化能が高まる。





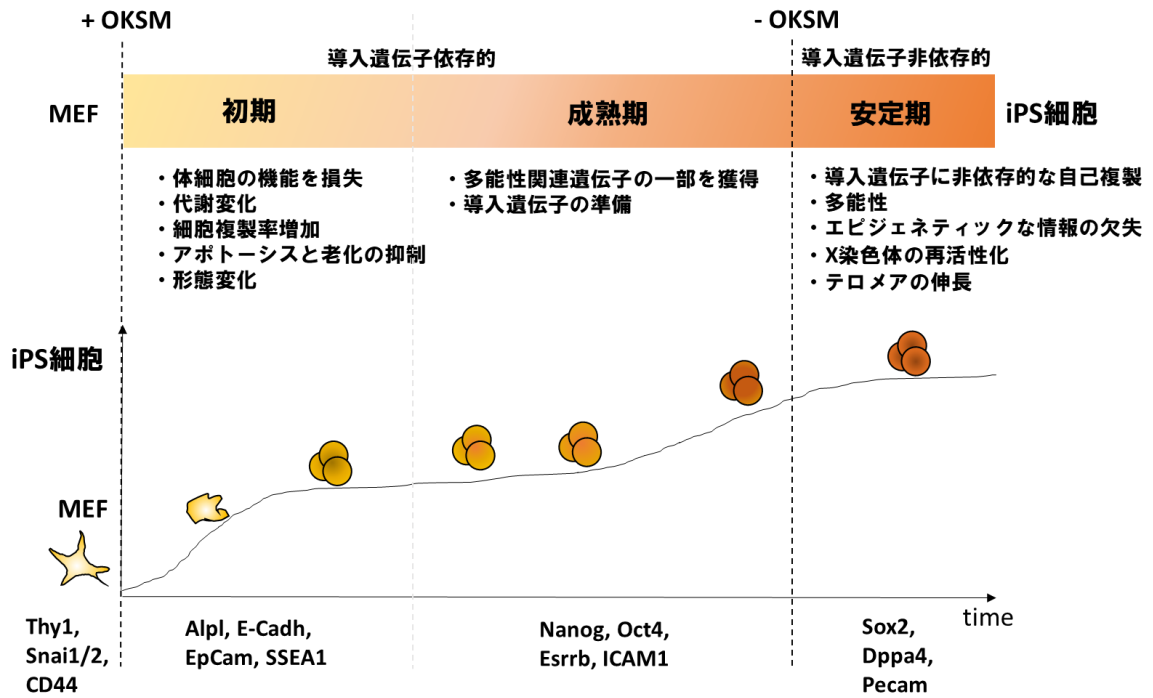
### Fig. 3 全能性細胞特異的遺伝子を用いた iPS 細胞の樹立

本研究では、従来の4つの遺伝子と全能性細胞特異的遺伝子を用いて iPS 細胞を作成し、樹立効率と品質に及ぼす影響を検討する。

## 第1章 全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響

### 緒言

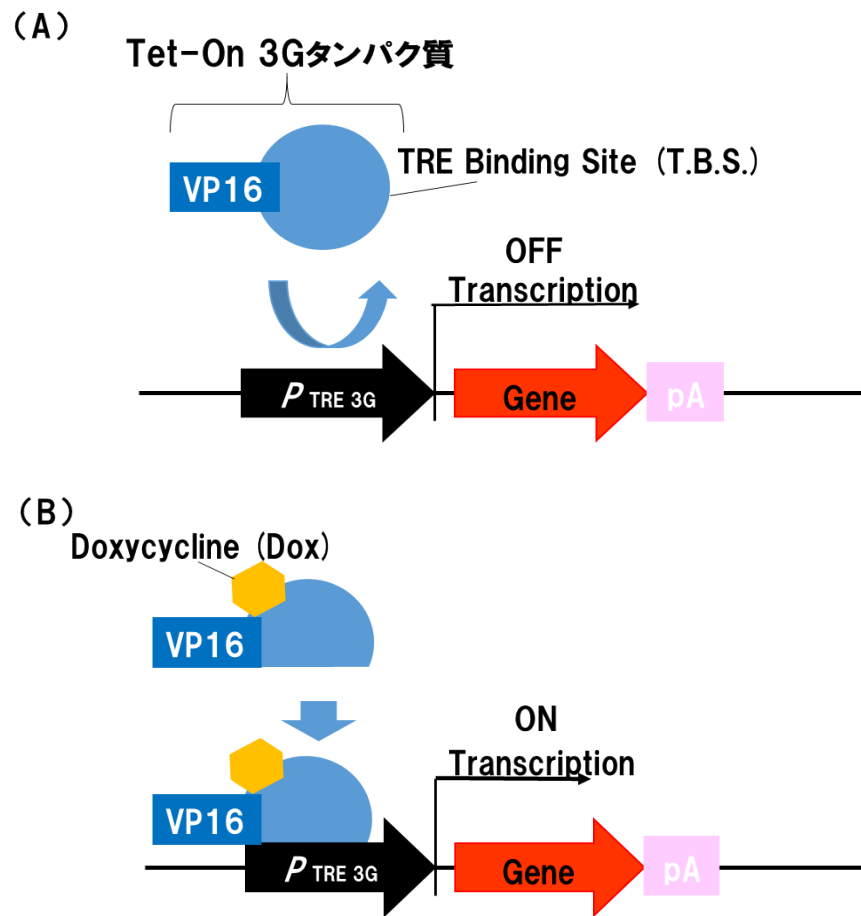
現在までに、体細胞が iPS 細胞にリプログラミングされる際には、「初期」、「成熟期」及び「安定期」の3つの過程を経ることが明らかにされている (Fig. 4) (David L and Polo JM, 2014)。したがって、iPS 細胞誘導の「初期」に働く遺伝子が「成熟期」や「安定期」にはむしろ抑制的に働く可能性が考えられる。また、本研究で用いた全能性細胞特異的遺伝子は、ES 細胞や iPS 細胞ではほとんど発現していないことから、リプログラミングの「初期」に働く可能性が高いと考えられる。そこで、本研究では iPS 細胞誘導時に、全能性細胞特異的遺伝子を Tet-on system を用いて、条件的に発現させることにより全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響を検討した。(Fig. 5)。また、遺伝子導入には外来遺伝子を容易に挿入・除去できる PiggyBac system を用いた (Fig. 6)。



Modified from Laurent David, Jose M. Polo, *Stem Cell Research*

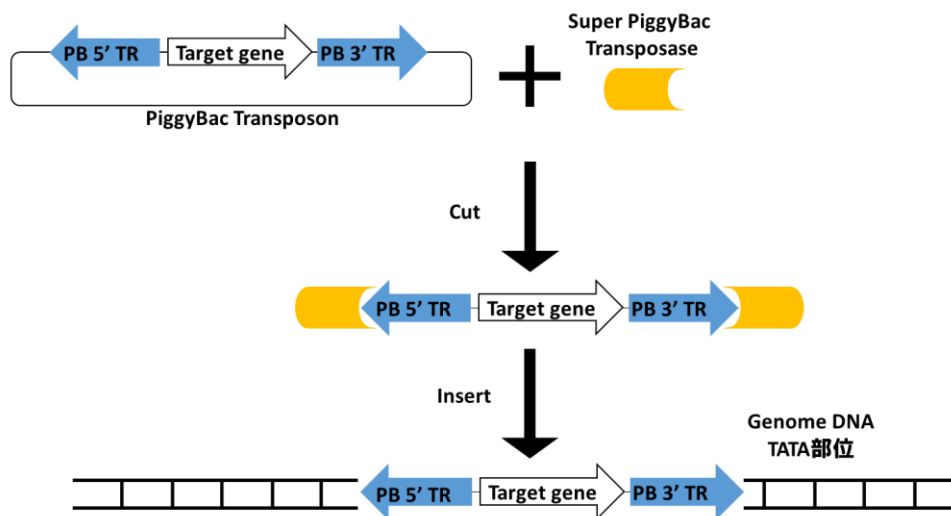
#### Fig. 4 iPS 細胞誘導時に生じるイベント

体細胞は「初期」、「成熟期」、および「安定期」を経てリプログラミングされ iPS 細胞へと変化する。



**Fig. 5 Tet system を用いた遺伝子発現制御**

*E.coli* の *tetO* 配列の繰り返し配列から成る Tetracycline response element ( TRE )配列に TetR のアミノ酸残基を一部改変して作製された reverse TetR ( rTetR ) と VP16AD との融合タンパク質である reverse tetracycline transactivator ( reverse tTA または rtTA )が結合すると下流のプロモーターを活性化させ、目的遺伝子を発現する応答ベクターを宿主ゲノムに組み込んだ安定株は、テトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン ( Dox ) に対して容量依存的に応答するため、目的遺伝子の発現を制御することができる。( A ) Tet-On 3G タンパク質は恒常的に発現しているが、Dox 非存在下では TRE3G プロモーター ( TRE3G ) に結合できず、目的遺伝子が転写されない。( B ) Dox 存在下では、Tet-On 3G タンパク質は構造変化して TRE3G に結合し、TRE3G 下流にクローニングした目的遺伝子の転写を活性化する。



**Fig. 6 PiggyBac Vector を用いた遺伝子導入**

目的遺伝子を挿入した PiggyBac Transposon Vector と Super PiggyBac Transposase Expression Vector を宿主細胞に Cotransfection すると Super PiggyBac Transposase Expression Vector から Transposase が発現し、目的を挿入した PiggyBac Transposon Vector の 5'側、3'側の両端に存在するトランスポゾン特異性末端逆位配列 (PiggyBac Terminal Repeat:PB5'TR, PB3'TR) の部分で配列が切り出される。切り出された配列が、宿主細胞ゲノム中の TTAA 部位に挿入されて安定発現する。また、Excision only PiggyBac Transposase Expression Vector のみを再度 Transfection すると発現した Transposase によって挿入した Target gene の痕跡を残さずに除去することもできる。

## 材料と方法

### 1. PCR

目的の遺伝子が含む Plasmid 10 ng 分に 2 x PCR Buffer for KOD Fx Neo, 2 mM dNTPs, 10  $\mu$ M Forward Primer (Table.1) , 10  $\mu$ M Revers Primer (Table.1) , KOD Fx Neo をそれぞれ 25  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L, 1.0  $\mu$ L 加えた。そして全量が 50  $\mu$ L になるように D.W.を加えた。そして 98 $^{\circ}$ C で 2 分反応後、98 $^{\circ}$ C 10 秒、68 $^{\circ}$ C、30 秒を 35 cycle 行った。その後反応液 1  $\mu$ L 分を電気泳動により目的の PCR 産物の確認をした。

### 2. PCR 反応液・制限酵素処理液の精製

PCR 産物と QG Buffer が 1:3 になるように調製し、5 分間 55 $^{\circ}$ C でインキュベートした。その後、Spin column に移し 8,000 rpm  $\cdot$  1 min  $\cdot$  室温で遠心した。遠心後、素通り画分を捨て、PE Buffer を 500  $\mu$ L 加えて 8,000 rpm  $\cdot$  1 min  $\cdot$  室温で遠心した。遠心後、column を新しい 1.5 mL tube に移し、D.W.を 30  $\mu$ L 加えて 1 分間静置した。その後、13,500 rpm  $\cdot$  1 min  $\cdot$  室温で遠心した。そのサンプルを Nano Drop で濃度測定後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

### 3. 制限酵素処理

PCR 産物または 1.5  $\mu$ g の Vector に対して、目的の 2 種類の制限酵素および制限酵素 Buffer をそれぞれ 0.5  $\mu$ L および 3  $\mu$ L 加えた。全量が 30  $\mu$ L になるように D.W.を加えて、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートした。その後、反応液 1.0  $\mu$ L 分をアガロース電気泳動で確認した。

### 4. ゲル抽出

まず、目的のバンドをアガロースゲルから切り出して 1.5 mL tube へ移し、QX I Buffer を 1 mL 加えた。さらに D.W.を 500  $\mu$ L、Qiaex II を 8  $\mu$ L 加えて、アガロースゲルが溶けるように 55 $^{\circ}$ C  $\cdot$  10 分間温めた。完全に溶けたことを確認した後、8,000 rpm  $\cdot$  室温  $\cdot$  1 min で遠心した。遠心後、上清を捨て、QX I Buffer を 1 mL 加え、転倒混和した。その tube を 55 $^{\circ}$ C  $\cdot$  5 分間温めた後、8,000 rpm  $\cdot$  室温  $\cdot$  1 min で遠心した。遠心後、上清を捨て、PE Buffer を 500  $\mu$ L 加えて、8,000 rpm  $\cdot$  室温  $\cdot$  1 min で遠心した。この操作を 2 回行い、上清を捨てて、55 $^{\circ}$ C で 1 分間温

めた。その後、D.W.を 8  $\mu$ L 加えて、55 $^{\circ}$ C で 5 分間温めた。そして、13,500 rpm  $\cdot$  室温  $\cdot$  1 min で遠心した後、上清を新しい 1.5 mL tube へ移した。そのサンプルを Nano Drop で濃度測定後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。

## 5. ライゲーション

制限酵素処理したベクターとインサートをモル比が 1 : 2~3 になるように混合し、その混合液と等量の Ligation kit ver.2 (TOYOBO) を加えて 16 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートした。

## 6. 形質転換

100  $\mu$ L 分の Competent cells (DH5 $\alpha$ ) にプラスミドまたは ligation 後のサンプルを加え、30 分間氷上で静置した。そして 42 $^{\circ}$ C  $\cdot$  40 秒のヒートショックを与え、1 分間氷上に静置した。その後、予め 37 $^{\circ}$ C に温めておいた SOC 溶液を 250  $\mu$ L 加えて 37 $^{\circ}$ C  $\cdot$  7 分間、回復培養をおこなった。最後に LB/Amp プレートに塗布または、LB 培地にて 37 $^{\circ}$ C で一晩培養した。

## 7. プラスミド抽出 (ミニプレップ)

目的のプラスミドを持った大腸菌を 1.5 mL の LB 培地 (セレクションマーカーに合わせた抗生物質) に植菌し、一晩培養した。培養後、1.5 mL tube に分注し、5,000 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  5 min 遠心した。そして上清を除去して P1 Buffer を 250  $\mu$ L 加え、vortex で完全に融解させた。そこに P2 Buffer を 250  $\mu$ L 加え、転倒混和して N3 Buffer を 350  $\mu$ L 加え、転倒混和した。転倒混和後、13,500 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  10 min 遠心した。上清を spin column に移した後、8,000 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 min で遠心した。そして素通り画分を捨てた後、PE Buffer を 750  $\mu$ L 加えて 8,000 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 min で遠心した。また素通りを捨てた後、13,500 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 min で遠心した。そして新しい 1.5 mL tube に column を移し、D.W.を 30  $\mu$ L 加えて 1 分間静置した後、13,500 rpm  $\cdot$  4 $^{\circ}$ C  $\cdot$  1 min で遠心した。そのサンプルを Nano Drop で濃度測定後、-20 $^{\circ}$ C で保存した。Spin column は GeneDesigh 社、P1、P2、N3、および PE buffer は Qiagen 社から購入して実験に用いた。

## 8. 大量プラスミド抽出 (ミディプレップ)

目的のプラスミドを持った大腸菌を 50 mL の LB 培地（セレクションマーカーに合わせた抗生物質）に植菌し、一晚培養した。培養後、50 mL tube に移し、6,000 x g・4°C・15 min で遠心した。そして上清を除去し、VP 1 Buffer を 4.0 mL 加え、vortex で完全に分散させた。そこに VP 2 Buffer を 4.0 mL 加え、転倒混和して室温で 5 min 静置した。そして VP 3 Buffer を 4.0 mL 加え、転倒混和して 20,000 x g・4°C・15 min で遠心した。その遠心中に column に 100% EtOH を 3 mL と VPN Buffer を 5 mL 加えた。遠心後、上清を column に移し、VPN Buffer を 15 mL 加えた。その後、column を新しい tube に移し、VPE Buffer を 5 mL 加えた。そして isopropanol を 3.5 mL 加えて、転倒混和し、15,000 x g・4°C・30 min で遠心した。遠心後、上清を除去して 70 % EtOH を 1 mL 加えて沈殿物ごと 1.5 mL tube へ移し、15,000 x g・室温・10 min で遠心した。その遠心後、上清を除去して沈殿物を 10 min 乾燥させた。その沈殿物を溶かすために TE Buffer を 50  $\mu$ L 加えて Nano Drop で濃度測定後、-20°C で保存した。Midiprep には、Viogene 社のキットを用いた。

## 9. シークエンス

150-300 ng 分の Template に BigDye, 5 $\times$  sequence buffer, 10  $\mu$ M Primer (Table. 2) をそれぞれ 1.0  $\mu$ L, 1.5  $\mu$ L, 0.32  $\mu$ L そして全量が 10  $\mu$ L になるように D.W を加えた。その後 96°C 10 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分で 25 cycle 反応させた。反応後、エタノール沈殿を行い、20  $\mu$ L の Hi-Di formamide で沈殿を溶かした。サンプルを 95°C で 5 分間インキュベートし、速やかに氷上に移した後、5 分間静置した。その後、96-well に移し、シーケンサーによって配列を確認した (Thermo Fisher, 3500 Genetic Analyzer)。

## 10. MEF の作製

まず、妊娠マウスを解剖し、E 13.5 の胎仔を取り出して PBS が入った Dish へ移した。次に胎仔を解剖し、臓器、尾、手足と頭を取り除き、表皮だけにした。この時、頭部はジェノタイピング用として 1.5 mL tube に置き置きをしておいた。そして、表皮をハサミで細かく刻み、15 mL tube へ移して遠心し、上清を取り除いた。上清を取り除いた後、沈殿物に対してトリプシン処理することで細胞をさらに細かくした。その後、全量を DMEM の入った 10 cm Dish で培養した。コン



フルエント時にトリプシンにより細胞を剥がし、10%DMSO 入り DMEM で分注して細胞を凍結した。

### 11. Pramef12 ノックアウト MEF のジェノタイピング

MEF を作製する際に胎仔の頭部を切断してエッペンチューブに回収し、0.5 mL の HMW buffer (Table 3) に浸し、55°C で一晩振盪した。翌日、0.5 mL の phenol / chloroform (phenol : chloroform = 1 : 1) を加えて転倒混和し、遠心 (8,000 rpm, 5 min, RT) 後、上清 300  $\mu$ L を新しいエッペンチューブに回収した。回収した上清に 600  $\mu$ L の 2-propanol を加えて転倒混和し、遠心 (8,000 rpm, 5 min, RT) 後、上清を除去した。500  $\mu$ L の 70% EtOH を加え、遠心 (8,000 rpm, 5 min, RT) 後、上清を除去した。室温で 10 分間、エッペンチューブの蓋を開けて静置し、50  $\mu$ L の滅菌 MilliQ 水を加えてピペッティングし、ゲノムの濃度を 50 ng /  $\mu$ L になるように調整し、PCR の反応液の組成、および条件はそれぞれ Table 4 と Table 5 に示した。また、5 塩基欠失の検出には、欠失部位を含む Table 6 に示したプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物の一部を 2% アガロースゲルで電気泳動することにより解析した。

### 12. 細胞の培養

MEF の培養には、10% FCS、25  $\mu$ g/ml Streptomycin (Sigma; S1277)、37.5  $\mu$ g/ml Penicillin (Sigma; P7794) を含む DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Nacalai tesque; 08458-16) を用いた。iPS 細胞誘導時には、10% FCS を含む GMEM (Sigma; G6148) に 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco; 11360-070)、1 x NEAA (Non-essential amino acids, Gibco; 11140-050)、0.1 mM 2-ME (2-Mercaptoethanol, Nacalai tesque; 21438-82)、および未分化を維持 (Niwa et al., 2009) するために LIF を加えた培地を用いた (Fig. 7)。

### 13. Mitomycin C

滅菌済みの PBS を用いて粉状の Mitomycin C を 1 mg/ml Mitomycin C とし、0.2  $\mu$ m のシリンジでフィルター滅菌した。その後、その溶液を分注し、遮光冷凍保存した。

#### 14. Feeder 細胞の作製

10 cm Dish に ICR のメスの MEF (E13.5、P3) をコンフルエントになるまで育て、培養液を除いた。そして PBS で洗浄後、細胞周期を止めるために 1 : 100 の比率で 1 mg/ml Mitomycin C と Cell culture Medium を混合した Feeder Medium を Dish に加え、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 2.5 時間培養した。その後、Feeder Medium を除き、PBS で洗浄し、0.1%トリプシンで細胞をはがした。そして、10%DMSO 入り DMEM で、1 本あたり  $1.6 \times 10^6$  cells となるように分注し、-80°C で保存した。

#### 14. LIF の作製

$5.0 \times 10^5$  cells / 10 cm Dish の Cos7 細胞に対して恒常的に LIF を産生する pCAG-GS-LIF の Plasmid を Opti-MEM、PEI を用いて Transfection を行った。Transfection してから 48 時間後、上清を回収し、Filter を通して滅菌を行った。その後、ES 細胞に対して Titer Check をし、5 mL ずつ分注し、-80 度で遮光冷凍保存した。

#### 15. MEF へ遺伝子導入

遺伝子導入の前日に MEF を 6 well plate に  $1.0 \times 10^5$  個播種した。100  $\mu$ L の Xfect reaction buffer に Xfect を Plasmid 1  $\mu$ g あたり 0.3  $\mu$ L 加えた後、Table 7 に示した Plasmid を各 2.5  $\mu$ g 添加した (Fig. 10)。室温で 15 分間静置した後、MEF に添加した。翌日から、14 日間毎日培地を交換した。また Dox (Doxycycline) を 1.5  $\mu$ g/mL になるように添加し続けた。

#### 16. iPS 細胞のコロニー染色 (ALP 染色)

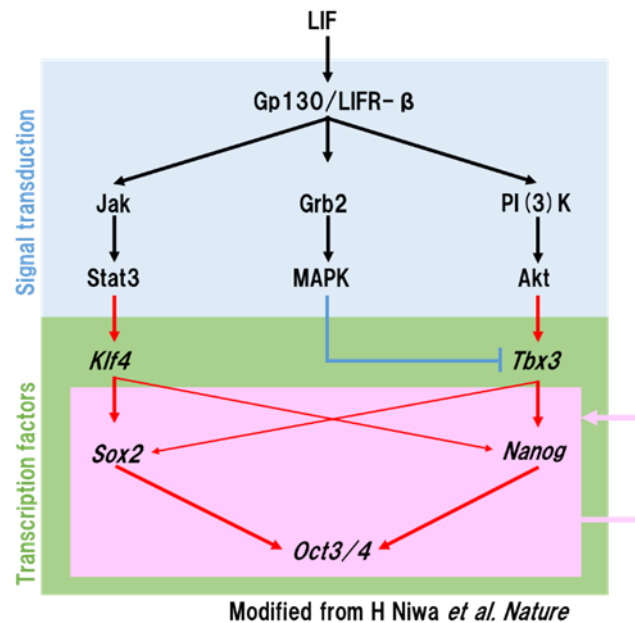
ES 細胞や iPS 細胞はアルカリフォスファターゼを産出することからコロニー染色には ALP 染色 (Alkaline Phosphatase Staining) が用いられている。そこで、本実験では Alkaline Phosphatase Detection Kit (Millipore; SCR004) を使用した。まず、6 well Plate の各 well から培養液を除き 1 x TBS-T (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.05 % Tween-20) を 2 mL 加えて洗浄した。洗浄後、TBS-T を除き、細胞を固定するために 4 % Paraformaldehyde (PFA) / PBS を 1 mL 加えて 2 分間静置した。その後、PFA を除き、TBS-T を 2 mL 加えた。そして、TBS-T を除き、

染色液（Fast Red Violet : Nasphtol AS-BI phosphate solution : water = 2:1:1）を 1 mL 加えて暗所に 15 分静置した。最後に染色液を除き PBS で洗った。

#### 17. iPS 細胞樹立効率の解析

ALP 染色後、PBS で洗浄し、6 well Plate をスキャナーで画像を取り込んだ。そして、Image-J を用いて染色された細胞数をカウントし、Excel でデータ処理を行った。

動物実験は、すべて長浜バイオ大学実験附属施設運営委員会の承認を受けた実験計画書（031）に従って行った。



**Fig. 7** マウス幹細胞における LIF シグナル経路

LIF 存在下で Jak-Stat 経路・PI3 キナーゼ-Akt 経路・Grb2-MAP キナーゼ経路の 3 つのシグナル伝達機構を活性化し、異なる入力を転写因子ネットワークにあたえる。そして、その転写因子である Sox2、Nanog、Oct3/4 を活性化し多能性を維持する。

**Table 1** Adaptor-PCR Primers

Primer	Sequence
Fbxw14_Sal I_FWD	GTCGACATGGAGATCCATTACCTAG
Fbxw14_Not I_REV	GCGGCCGCTCAAGAGCAGACATTCAAGG
Pramef12_Xho I_FWD	CGCTCGAGATGAGCTTGCGT
Pramef12_Not I_REV	CGGCGGCCGCTCAAGGAAGA
Rfp14_Xho I_FWD	CGCTCGAGATGGCTCATCTC
Rfp14_Not I_REV	CGGCGGCCGCTTATTGGGGG
Trim61_Xho I_FWD	CGCTCGAGATGGAGCTTGCT
Trim61_Not I_REV	CGGCGGCCGCTCACTCAAGA
Zc3h6_Xho I_FWD	CGCTCGAGATGACAGACTCT
Zc3h6_Not I_REV	CGGCGGCCGCTAACAAAAC
Zfp92_EcoR I_FWD	GAATTCATGGCAGCCACTCTTCTAAG
Zfp92_Not I_REV	GCGGCCGCTCAAGGTGAGGATGGACCGT

**Table 2 Primers for sequencing**

Primer	Sequence
TRE3G-EP F	CCTACAGCTCCTGGGCAACG
TRE3G-EP R	GGCTGGCAACTAGAAGGCAC

**Table 3 HMW buffer の組成**

HMW stock solution (10 mM Tris-HCl at pH8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA at pH8.0)	0.5 mL
20mg / ml Proteinase K	2.5 $\mu$ L
100mg / ml RNase A	0.1 $\mu$ L
10 % SDS	5 $\mu$ L

**Table 4 PCR 反応液の組成**

Genome	1 $\mu$ L
*2 x KAPA Taq Extra Hotstart Ready Mix	6.25 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer	0.625 $\mu$ L
10 $\mu$ M primer	0.625 $\mu$ L
D. W.	4 $\mu$ L
Total	12.5 $\mu$ L

\*2 x KAPA Taq Extra Hotstart Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS, KK3607)

**Table 5 PCR 条件**

95°C	3 min	35 cycles
95°C	10 sec	
60°C	10 sec	
72°C	15 sec	
72°C	5 min	
12°C	$\infty$	

**Table 6** ジェノタイピング用プライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
pramef12_ORF_FWD	ATGAGCTTGCGTGCCACACC
d5_Pramef12_WT_AS	AGATATCCAGGTATGGTGTC
d5_Pramef12_KO_AS	GCAAGATATCCAGGTGTCTT

**Table 7** Plasmids used for iPS induction

Plasmid
1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PB-pCAG-OKS
1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PB-pCAG-c-Myc
1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PB-pCAG-Tet3G ( rtTA )
1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pCAG-humaized-hypPBbase
1.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ PB-TRE3G-Target gene

## 結果

### 1. MEF を用いたトランスフェクションの条件検討

MEF (mouse embryonic fibroblast) は、遺伝子導入効率が低いため、トランスフェクションの条件検討を行った。その結果、「細胞数： $1.0 \times 10^5$  cells」、「トランスフェクション時の培地の量：1 mL」、「トランスフェクション時の培地交換の時間：4 時間後」、「DNA 量は  $2.5 \mu\text{g}$ 」が最も効率よく遺伝子を導入できることが明らかとなった (Fig. 8, 9)。また、Dox の濃度は  $0.5 \mu\text{g/mL}$  で十分に発現が誘導できることも示された (Fig. 10)。

### 2. 全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞樹立効率に与える影響

iPS 細胞誘導時に、全能性細胞特異的遺伝子を 4 日間または 14 日間発現させ、14 日目に iPS 細胞のコロニー数をカウントした (Fig. 11, 12)。その結果、Prmef12 を 4 日間発現させた場合には iPS 細胞のマーカーである ALP (Alkaline phosphatase) 陽性のコロニーの数が有意に増加し、14 日間発現させた場合には減少することが明らかとなった (Fig. 13)。Btg4 を 4 日間と 14 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 14)。Trim61 を 4 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が増加する傾向にあり、14 日間発現させた場合には ALP で染色されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 14)。Klf17 を 4 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少し、14 日間発現させた場合には ALP で染色されるコロニーの数が減少する傾向にあったことが明らかとなった (Fig. 15)。Rfp14 を 4 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が増加する傾向があり、14 日間発現させた場合には ALP で染色されるコロニーの数が減少する傾向にあったことが明らかとなった (Fig. 15)。Fbxw14 を 4 日間と 14 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が減少する傾向にあったことが明らかとなった (Fig. 16)。Zfp92 を 4 日間と 14 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少することが明らかとなった (Fig. 16)。Zbed3 を 4 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が有意に減少し、14 日間発現させた場合には ALP で染色されるコロニーの数が減少する傾向にあったことが明らかとなった

(Fig. 17)。Zc3h6 を 4 日間と 14 日間発現させた場合には ALP 陽性の iPS 細胞と推定されるコロニーの数が減少する傾向にあったことが明らかとなった (Fig. 17)。

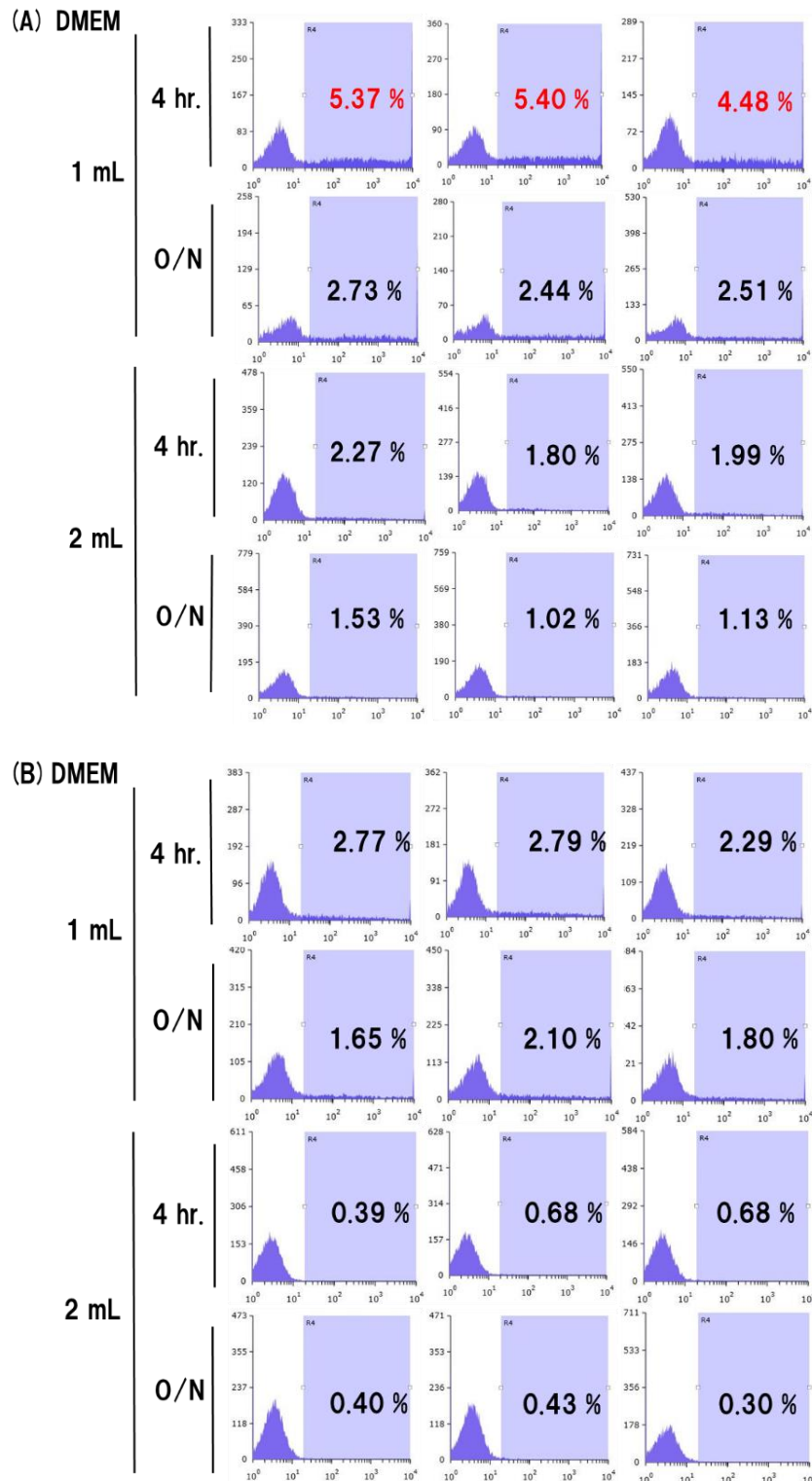
また、Pramef12 のヘテロやノックアウト MEF を用いても同様に 4 日間または 14 日間発現させ、14 日目に iPS 細胞のコロニー数をカウントした (Fig. 18, 19)。その結果、Pramef12 を 4 日間発現させた場合には iPS 細胞のマーカである ALP 陽性のコロニーの数が有意に増加し、14 日間発現させた場合には減少することが明らかとなった (Fig. 18, 19)。

以上の結果から、全能性細胞特異的遺伝子の大部分は、iPS 細胞誘導時に発現させることにより、iPS 細胞の樹立効率を低下させることが明らかとなった。一方で、Pramef12 については、iPS 細胞誘導の初期段階に一過的に発現させた場合にのみ、iPS 細胞の樹立効率が上昇することが示された。そして、リプログラミング過程において Pramef12 は必須でないことが明らかになった。



## 考察

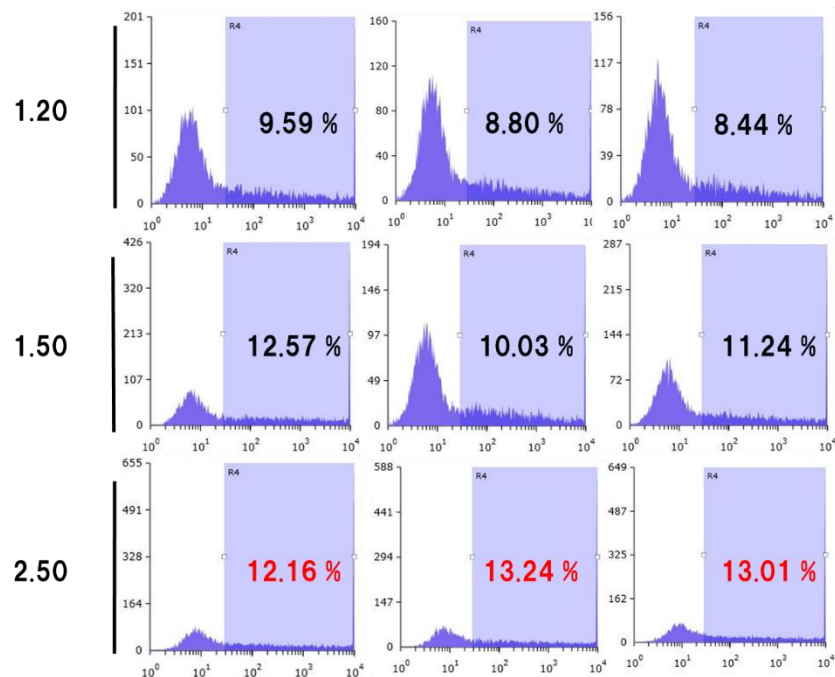
本研究では全能性を有する初期の着床前胚で特異的あるいは高発現を示す 9 つの全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響を検討した。その結果、Prmef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間のみ発現させた場合に、iPS 細胞の樹立効率が上昇することが示された。一方、その他の遺伝子は MEF から iPS 細胞へのリプログラミングに対して抑制的に働く可能性が示唆された。本研究では、同一サンプル間でのコロニー数にばらつきが多いサンプルもあり、統計学的に有意な差が認められないサンプルもあった。したがって、有意差が確認できなかった条件や遺伝子については、技術的な面を改善することで、これらの遺伝子が iPS 細胞の樹立に及ぼす影響を明確にできると考えられる。また、本研究では、血清中のテトラサイクリン様物質の影響を受けにくい第三世代の Tet-on システムを用いて、遺伝子の正確な on/off をすることができた一方で、低濃度のドキシサイクリンに応答して遺伝子を発現することから、外来遺伝子の発現量を調節することが困難であった。外来遺伝子の発現量と iPS 細胞の樹立効率や品質に影響を与えることが知られているため、今後は Tet-on advanced system を用いることにより、外来遺伝子の発現量を制御する実験系を検討する必要があると思われる。



**Fig. 8** 細胞数、培地量、および培地交換のタイミングと遺伝子導入効率の関係

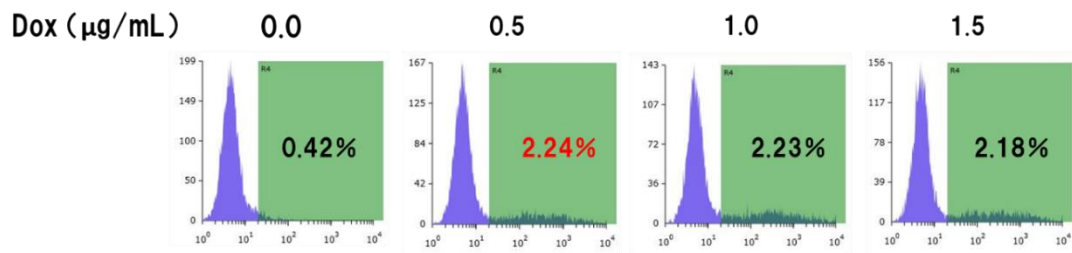
6 well plate に MEF を  $1.0 \times 10^5$  cells / well (A)、または  $3.0 \times 10^5$  cells / well (B) 播種し、翌日培地を 1 mL または 2 mL になるように交換して、1.2  $\mu$ g 分の GFP 発現プラスミドをトランスフェクションした。4 時間または一晩培養した後、培地交換 (2 mL) を行い、トランスフェクション 48 時間後に FACS 解析を行った。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。

GFP Plasmid (  $\mu\text{g}$  )



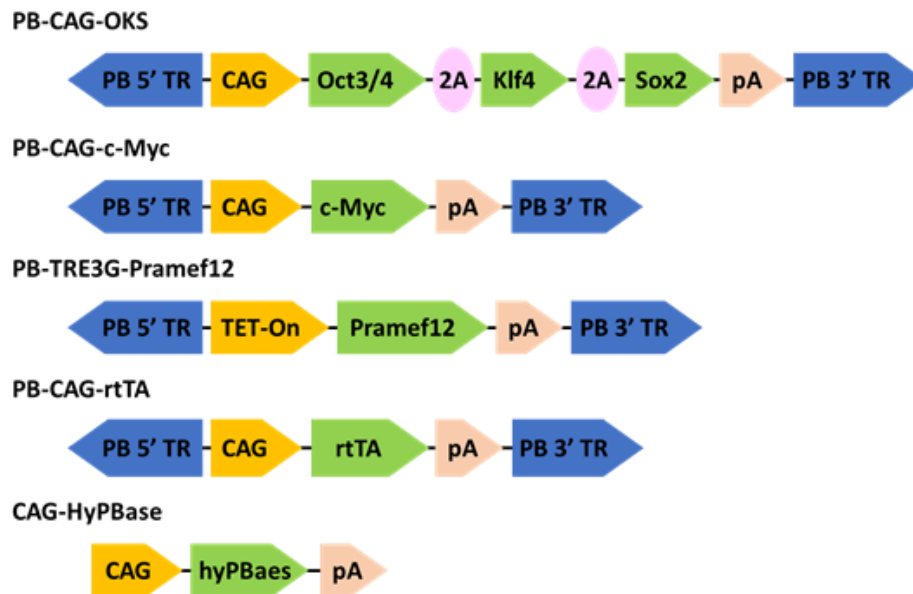
**Fig. 9** プラスミド量と遺伝子導入効率の関係

6 well plate に MEF を  $1.0 \times 10^5$  cells / well 播種し、翌日培地を 1 mL になるように交換して、GFP 発現プラスミドを 1.2  $\mu\text{g}$ 、1.5  $\mu\text{g}$ 、または 2.5  $\mu\text{g}$  トランスフェクションした。4 時間後に培地交換 (2 mL) を行い、トランスフェクション 48 時間後に FACS 解析を行った。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。



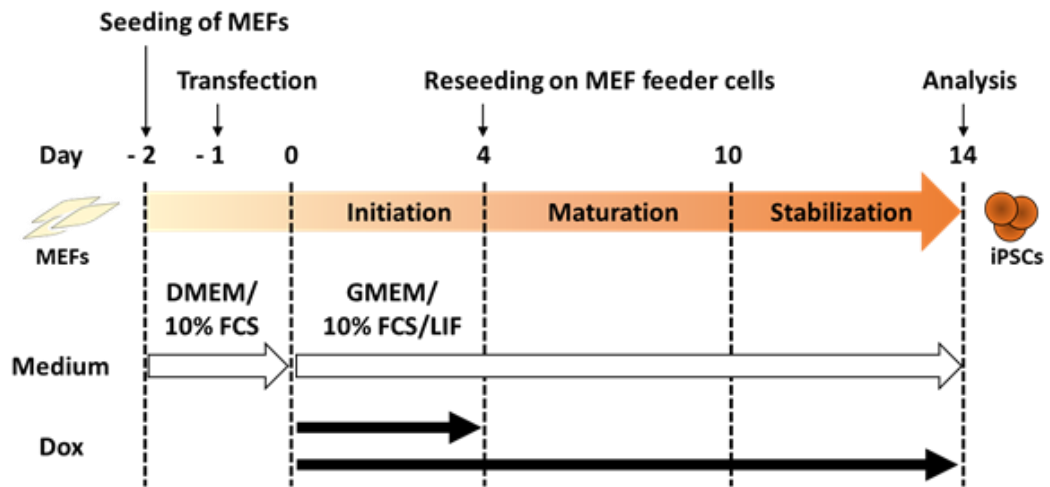
**Fig. 10 Dox の濃度と遺伝子発現の関係**

6 well plate に MEF を  $1.0 \times 10^5$  cells / well 播種し、翌日培地を 1 mL になるように交換して、Dox に応答して GFP を発現するプラスミドを  $2.5 \mu\text{g}$  トランスフェクションした。4 時間後に培地交換 (2 mL) を行い、Dox を 0、0.5、1.0、または  $1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$  添加し、トランスフェクション 48 時間後に FACS 解析を行った。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を示す。



**Fig. 11 iPS 細胞の樹立に用いたプラスミド**

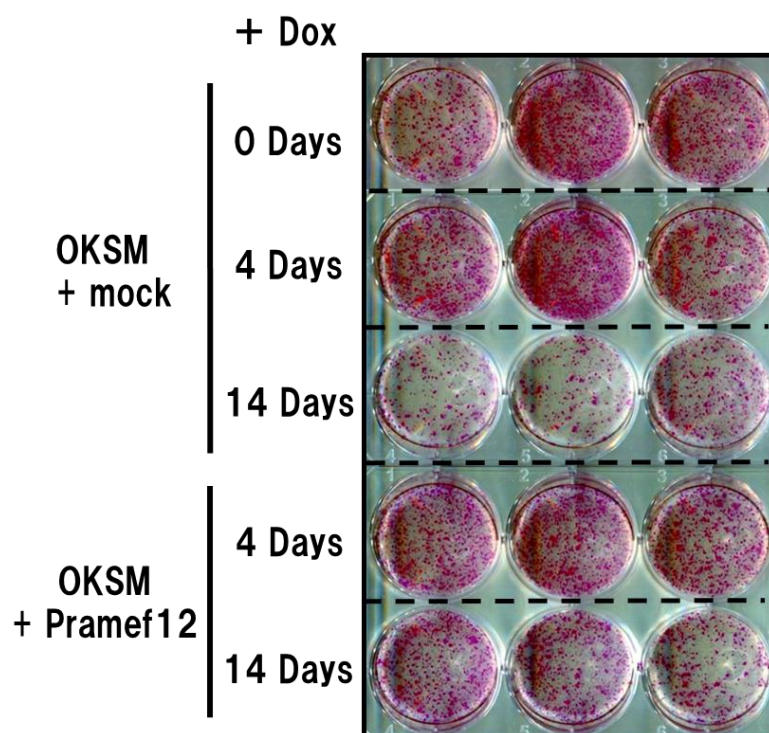
CAG プロモーターの制御下で恒常的に Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc、rtTA、および hyPBase を発現させ、Tet-3G プロモーターにより Pramef12 などの全能性細胞特異的遺伝子を条件的に発現させるベクターを構築した。2A ペプチドはウイルス由来の 20 a.a. のペプチド配列であり、細胞内在性 2A ペプチターゼにより切断される。



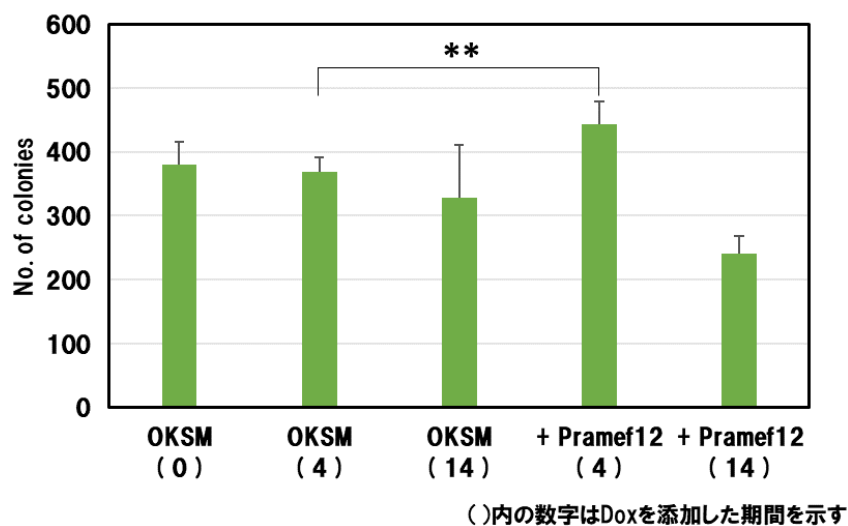
**Fig. 12** 全能性細胞特異的遺伝子を用いた iPS 細胞樹立のストラテジー

トランスフェクションの前日に MEF を播種し、Fig.11 のプラスミドをトランスフェクションし、翌日に培地を ES 細胞用の培地に交換する。培地交換 4 日後にマイトマイシン C 処理を行った MEF 上に再度播種し、さらに 10 日間培養する。Dox を初期（0 ～ 4 日間）または継続的（0 ～ 14 日間）に添加する。

(A)



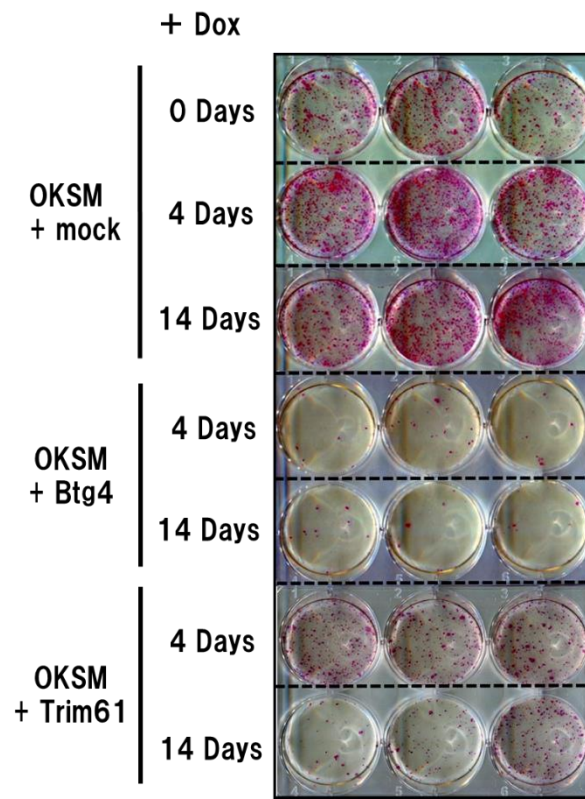
(B)



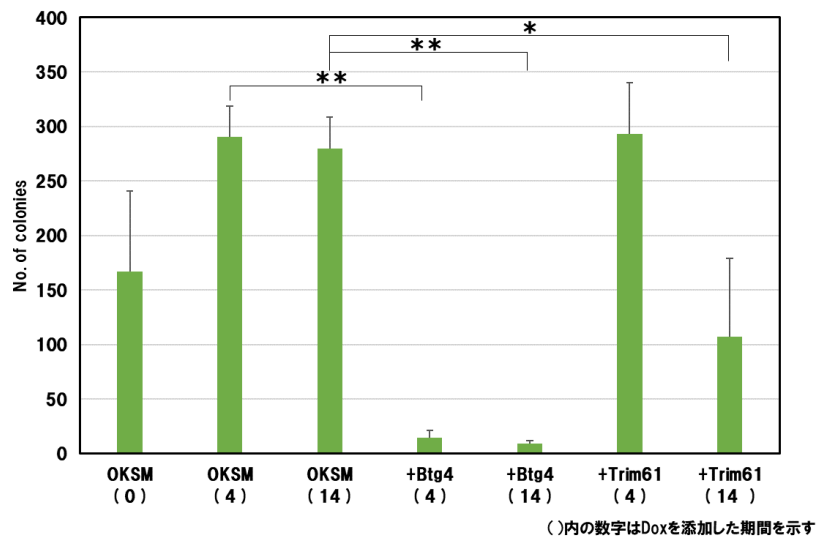
### Fig. 13 Pramef12 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響

(A) MEFにOKSMおよびPramef12をそれぞれ14日間、または4日間発現させ、14日間培養した後にALP染色を行った。(B) ALPで染色されるコロニーの数。平均値±SD、n=3、\*\* $p < 0.01$ 。

(A)



(B)

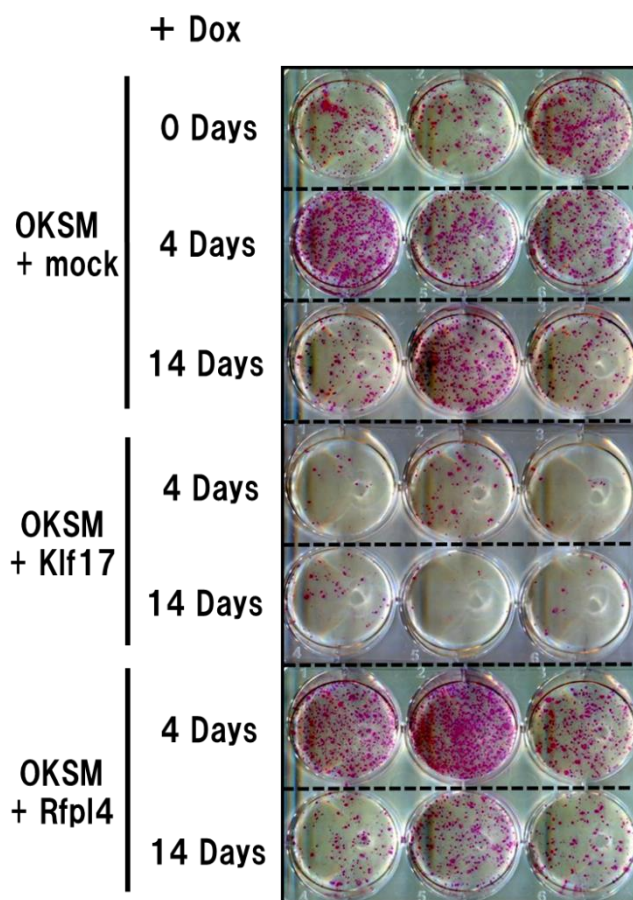


**Fig. 14 Btg4 と Trim61 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響**

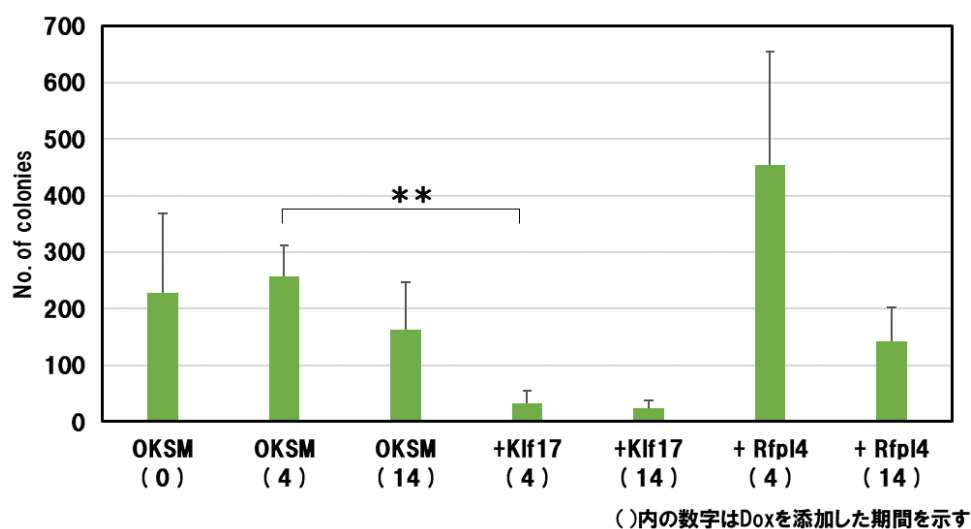
(A) MEFに OKSM および Btg4 または Trim61 をそれぞれ 14 日間、または 4 日間発現させ、14 日間培養した後に ALP 染色を行った。(B) ALP で染色されるコロニーの数。平均値±SD、n=3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



(A)



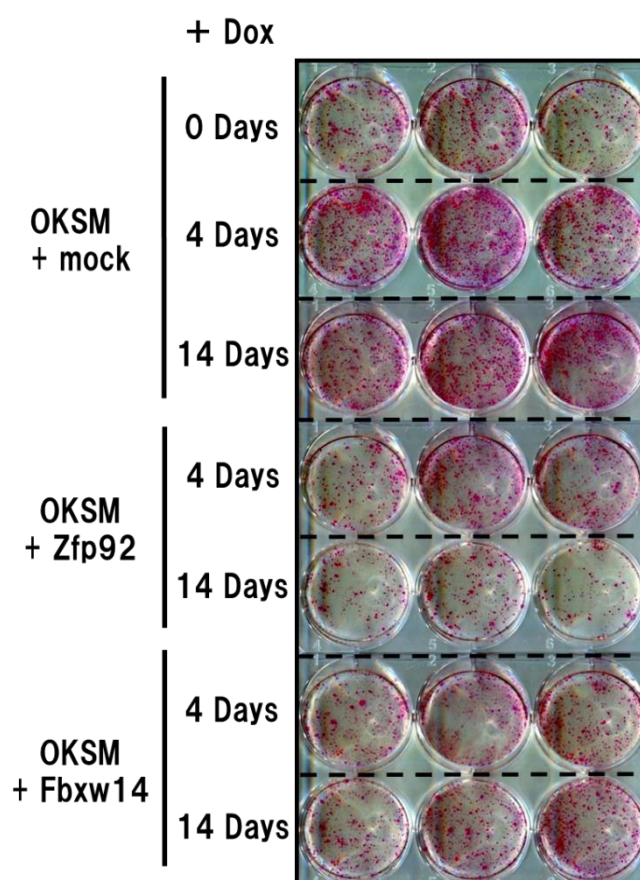
(B)



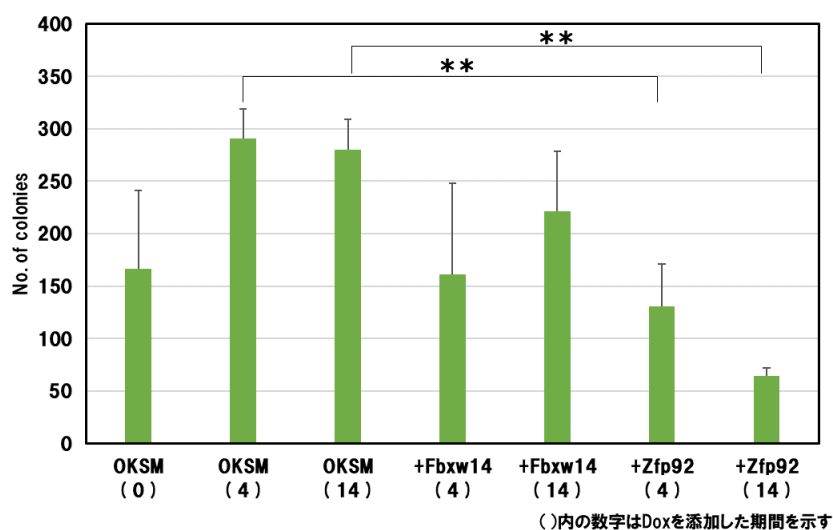
### Fig. 15 Klf17 と Rfp14 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響

(A)MEF に OKSM および Klf17 または Rfp14 をそれぞれ 14 日間、または 4 日間発現させ、14 日間培養した後に ALP 染色を行った。(B) ALP で染色されるコロニーの数。平均値±SD、n=3、\*\* $p < 0.01$ 。

(A)



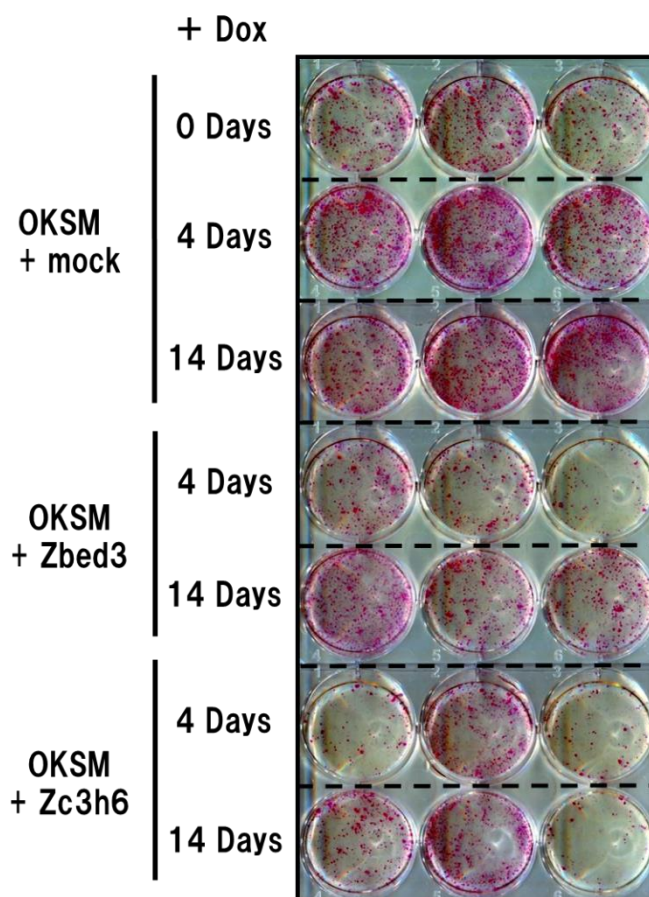
(B)



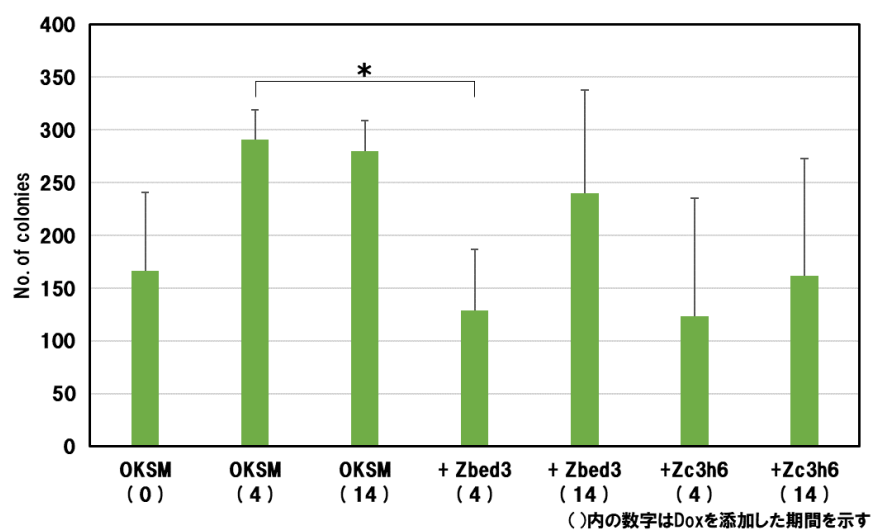
**Fig. 16 Zfp92 と Fbxw14 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響**

(A) MEFにOKSMおよびZfp92またはFbxw14をそれぞれ14日間、または4日間発現させ、14日間培養した後にALP染色を行った。(B) ALPで染色されるコロニーの数。平均値±SD、n=3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。

(A)



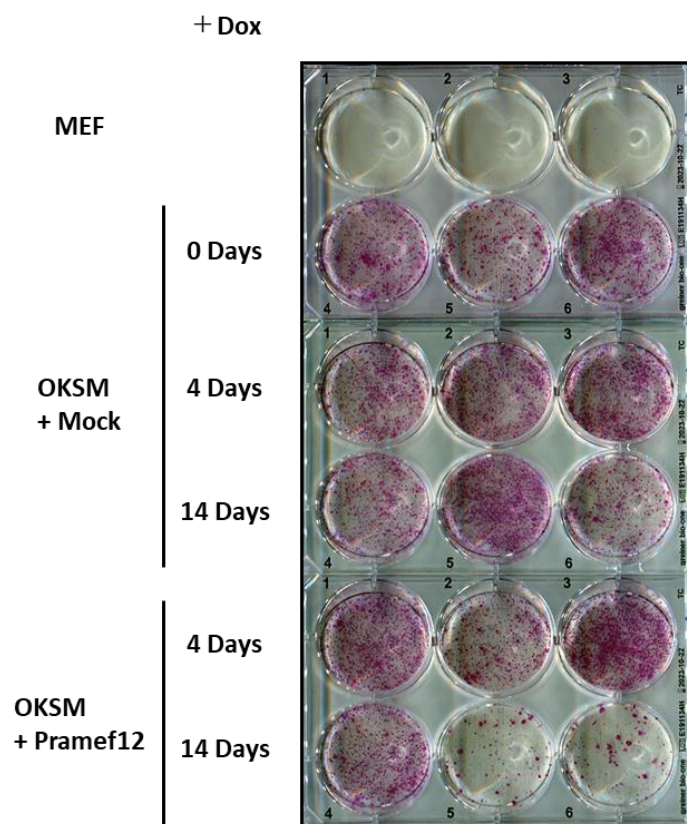
(B)



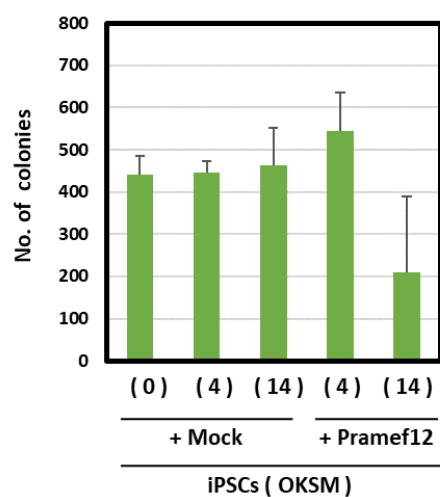
**Fig. 17 Zbed3 と Zc3h6 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響**

(A) MEF に OKSM および Zbed3 または Zc3h6 をそれぞれ 14 日間、または 4 日間発現させ、14 日間培養した後に ALP 染色を行った。(B) ALP で染色されるコロニーの数。平均値±SD、n=3、\* $p < 0.05$ 。

(A)



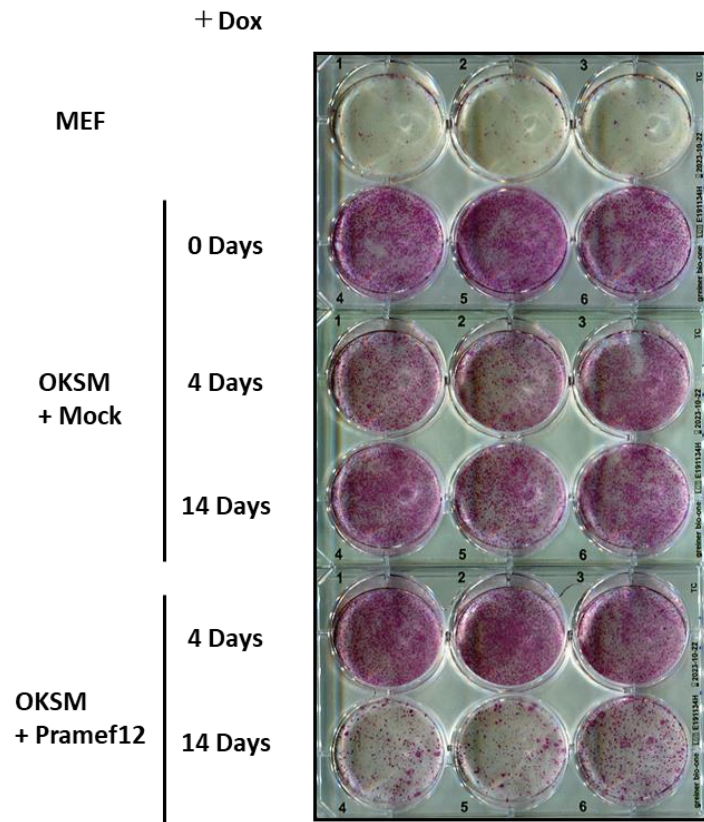
(B)



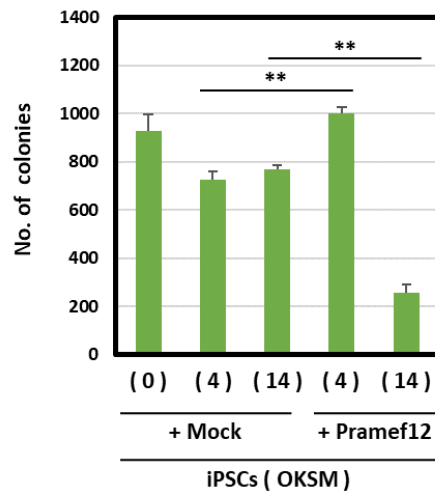
**Fig. 18 Pramef12<sup>+/-</sup>-MEF における Pramef12 が iPS 細胞の樹立効率に及ぼす影響**

(A) Pramef12<sup>+/-</sup>-MEF に OKSM および Pramef12 をそれぞれ 14 日間、または 4 日間発現させ、14 日間培養した後に ALP 染色を行った。(B) ALP で染色されるコロニーの数。( ) 内の数字は Dox を添加した期間、平均値±SD、n = 3。

(A)



(B)



**Fig. 19 Pramef12KOMEF における Pramef12 が iPSC 細胞の樹立効率に及ぼす影響**

(A) Pramef12KOMEF に OKSM および Pramef12 をそれぞれ 14 日間、または 4 日間発現させ、14 日間培養した後に ALP 染色を行った。(B) ALP で染色されるコロニーの数。( )内の数字は Dox を添加した期間、平均値±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。

## 第2章 Pramef12 を用いて作製した iPS 細胞の特性の解析

### 緒言

現在までに、従来の方法で作製された iPS 細胞には、リプログラミングされる前の細胞のエピゲノム情報が完全に消去できおらず、不完全にリプログラミングされた質の低い細胞が含まれていることが示されている。また、ES 細胞や iPS 細胞は遺伝子発現がヘテロな細胞集団であり、着床前の胚盤胞期の内部細胞塊に近い naïve 型の細胞と着床後のエピブラストに近い primed 型の細胞が含まれていることが示されている。naïve 型の ES/iPS 細胞は、primed 型の細胞より分化能が高いことも明らかにされている。さらに、分化能が低い iPS 細胞ではインプリント遺伝子である Dlk1 や Gtl2 の発現が低下することも明らかにされている (Stadtfield, M. et al., 2010)。本章では、前章で iPS 細胞の誘導時に発現させることにより、樹立効率を向上させた Pramef12 に着目して、Pramef12 を用いて作製した iPS 細胞 (iPS-OKSMP) の特性を解析した。

## 材料と方法

### 1. iPS 細胞のコロニーピックアップ

まず、MEF に iPS 細胞の誘導を開始して 14 日後のコロニーを Pick up する前日に 24 well Plate の 1 well に対してフィーダー細胞を  $5.6 \times 10^4$  cells となるように撒いた。そして当日、96 well Plate に 100  $\mu$ L の 0.05% のトリプシンを入れておき、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで温めておいた。次に iPS 細胞誘導後の 6 well Plate から培養液を除き、PBS で洗浄した。その後、10  $\mu$ L にピペットマンを合わせて顕微鏡で観察しながらコロニーを拾った。そして、温めておいたトリプシン入りの 96 well Plate にそのコロニーを入れ、37°C で反応させて細胞を分散させた。トリプシンの反応後、培養液で反応を止め、前日に準備しておいたフィーダー細胞入りの 24 well Plate に全量を移した。

### 2. 免疫染色 (iPS 細胞)

MEF に iPS 細胞の誘導を開始して 14 日後のコロニーをピックアップし、サイトスピン (Thermo Shandon; Cytospin3) によりスライドガラスに固定した。PAP PEN で回りを囲んだ後、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分間静置することにより、細胞の固定処理を行った。固定した細胞に PBS を用いて 3 回洗浄した後、0.2% TritonX-100/PBS を加えて室温で 15 分静置した。PBS を用いて 3 回洗浄した後、5% NGS / PBS を加えて室温で 1 時間静置することによりブロッキング処理を行った。次に、1 次抗体として mouse  $\alpha$ -Oct3/4 (1:200, BD Biosciences; 611202) / rat  $\alpha$ -Nanog (1:500, eBioscience; 14-5761-80) / 5% NGS / PBS を加えて 4°C で一晩静置した。PBS を用いて 3 回洗浄 (1 回の洗浄につき室温で 5 分静置) した後、2 次抗体として goat  $\alpha$ -mouse IgG Alexa488 (1:500, Thermo Fisher Science; A11029) / goat  $\alpha$ -rat IgG Alexa568 (1:500, Thermo Fisher Science; A-11077) / 5% NGS / PBS を加えて、遮光下で室温 1 時間静置した。PBS を用いて 3 回洗浄 (1 回の洗浄につき室温で 5 分静置) し、スライドガラスに蛍光褪色防止剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Nacalai tesque; 12593-64) を用いてマウントした後、カバーガラスを被せてマニキュアで封入した。サンプルは倒立蛍光顕微鏡 (Olympus IX71)、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV10i) またはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700 シリーズ) を用いて観察した。

### 3. qRT-PCR

Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN; 74106)、または RNeasy Micro Kit (QIAGEN; 74004)を用いて精製した。Total RNA 500 ng を SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen; 11754250) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。リアルタイム PCR システム (Roche Light Cycler 480 SystemII) を用いて Nanog、Esrrb、Dppa4 と Dlk1 と Gtl2 の発現量を定量化した。テンプレートは 10 倍希釈し、Table 8 に示すプライマーを用いた。サンプル間の発現を比較するために、Actin の値で補正を行った。

### 4. Western Blotting

6well Plate から回収した細胞のペレットに、TNE buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を加えて溶解し、氷上で 30 分間静置した。13,500 rpm、 $4^{\circ}\text{C}$ ・15 分遠心後に、上清を回収し細胞抽出液とした。細胞抽出液 25  $\mu\text{g}$  分を SDS-PAGE (SuperSep Ace, 10-20%, WAKO, 191-15031) で電気泳動した後、PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Millipore, Immobilon-P, IPVH00010) メンブレン転写し、5% skim milk / TBS-T (50 mM Tris-HCl at pH7.5, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20) 中、 $4^{\circ}\text{C}$  で 1 晩振とうすることによりブロッキングを行った。翌日、mouse anti- $\beta$ -Actin (Sigma, A8592, 1:1,000) / 5% skim milk、mouse anti-p53 (Santa Cruz Biotechnology, A-1, 1:500) / 5% skim milk または rat anti-Nanog (Roche, 3F10, 11867423001, 1:500) / 5% skim milk / TBS-中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で洗浄 (5 分間、3 回) 洗浄した後、mouse anti- $\beta$ -Actin、mouse anti-p53 や rat anti-Nanog と反応させたメンブレンは、TBS-T で洗浄 (5 分間、3 回) 洗浄し、anti-mouse IgG HRP (1:1,000) / 5% skim milk や anti-rat IgG HRP (1:1,000) / 5% skim milk 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で 3 回洗浄した後、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, NEL105001EA) と CCD イメージャー (ChemiDoc XRS Plus, BIO-RAD) を用いてシグナルを検出した。なお、サンプル間の発現を比較するために、Actin の値で補正を行った。



**Table 8 Primer sequences**

Name	Sequence (5' to 3')
Nanog (FWD)	CACCCACCCATGCTAGTCTT
Nanog (REV)	ACCCTCAAACCTCCTGGTCCT
Dlk1_qPCR_FWD2	TTCGAGTGTCTGTGCAAG
Dlk1_qPCR_REV2	CATGGACACCTTCAGGAT
Gtl2_qPCR_FWD2	AGAGAGACCCACCTACTG
Gtl2_qPCR_REV2	CTGTGAGGTAGGAACCTG
Esrrb (FWD)	TTTCTGGAACCCATGGAGAG
Esrrb (REV)	AGCCAGCACCTCCTTCTACA
Dppa4_FWD	AACCAAGCACGGCTCCTGCAAA
Dppa4_REV	ACCTTCCTACGAGTCTGTCCTG

## 結果

### 1. iPS-OKSMP における Nanog 陽性細胞の割合

Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間または継続的に発現させることにより作製した iPS 細胞 (iPS-OKSMP) のコロニーをピックアップし、サイトスピンを行った後、抗 Oct3/4 抗体と抗 Nanog 抗体、DAPI を用いて免疫染色を行った。その結果、Pramef12-iPS において、Pramef12 の発現期間に関係なく、Nanog を発現している細胞の割合 (Nanog/DAPI) が有意に増加することが示された (Fig. 20, 21)。

### 2. iPS-OKSMP における多能性関連遺伝子の発現解析

Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間または継続的に発現させることにより作製した iPS 細胞 (iPS-OKSMP) を用いて多能性幹細胞のマーカー (Nanog および Esrrb) と naïve 型多能性細胞のマーカー (Dppa4) の発現を qRT-PCR を用いて検討した。その結果、今回調べた全ての遺伝子の発現が、iPS-OKSMP において発現時期に関わらず、有意に上昇することが示された (Fig. 22 - 24)。さらに、iPS-OKSMP (4) は、iPS-OKSM (14) よりも今回調べた遺伝子の発現が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 22 - 24)。

また、Nanog については、ウェスタンブロッティングによりタンパク質量の定量も行った。その結果、iPS-OKSMP において発現時期に関わらず、iPS-OKSM よりも Nanog タンパク質量が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 25)。さらに、iPS-OKSMP (4) は、iPS-OKSM (14) よりも Nanog タンパク質量が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 25)。

### 3. iPS-OKSMP におけるインプリント遺伝子の発現解析

Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間または継続的に発現させることにより作製した iPS 細胞 (iPS-OKSMP) を用いてインプリント遺伝子 (Dlk1 および Gtl2) の発現を qRT-PCR を用いて検討した。その結果、Dlk1 および Gtl2 の発現が、iPS-OKSMP において発現時期に関わらず、iPS-OKSM よりも有意に上昇することが示された。 (Fig. 26 - 27)。さらに、iPS-OKSMP (4) は、iPS-OKSM (14) よりも Dlk1 の発現量が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 26)。一方で、iPS-OKSMP (14) は、iPS-OKSM (4) よりも Gtl2 の発現量が有

意に増加していることが明らかとなった (Fig. 27)。

#### 4. Pramef12 が p53 に及ぼす影響

これまでの研究から、iPS 細胞を誘導する際に p53 を抑制することにより iPS 細胞の樹立効率が上昇することが報告されている (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009)。また、p53 は Nanog の発現を抑制することも明らかにされている。そこで、Pramef12 が p53 を抑制することにより、iPS 細胞の樹立効率や Nanog の発現を亢進することが考えられた。そこで、iPS-OKSMP における p53 タンパク質量をウェスタンブロッティングにより検討した。その結果、p53 タンパク質量は、iPS-OKSMP において発現時期に関わらず、iPS-OKSM よりも有意に減少することが示された (Fig. 28)。

## 考察

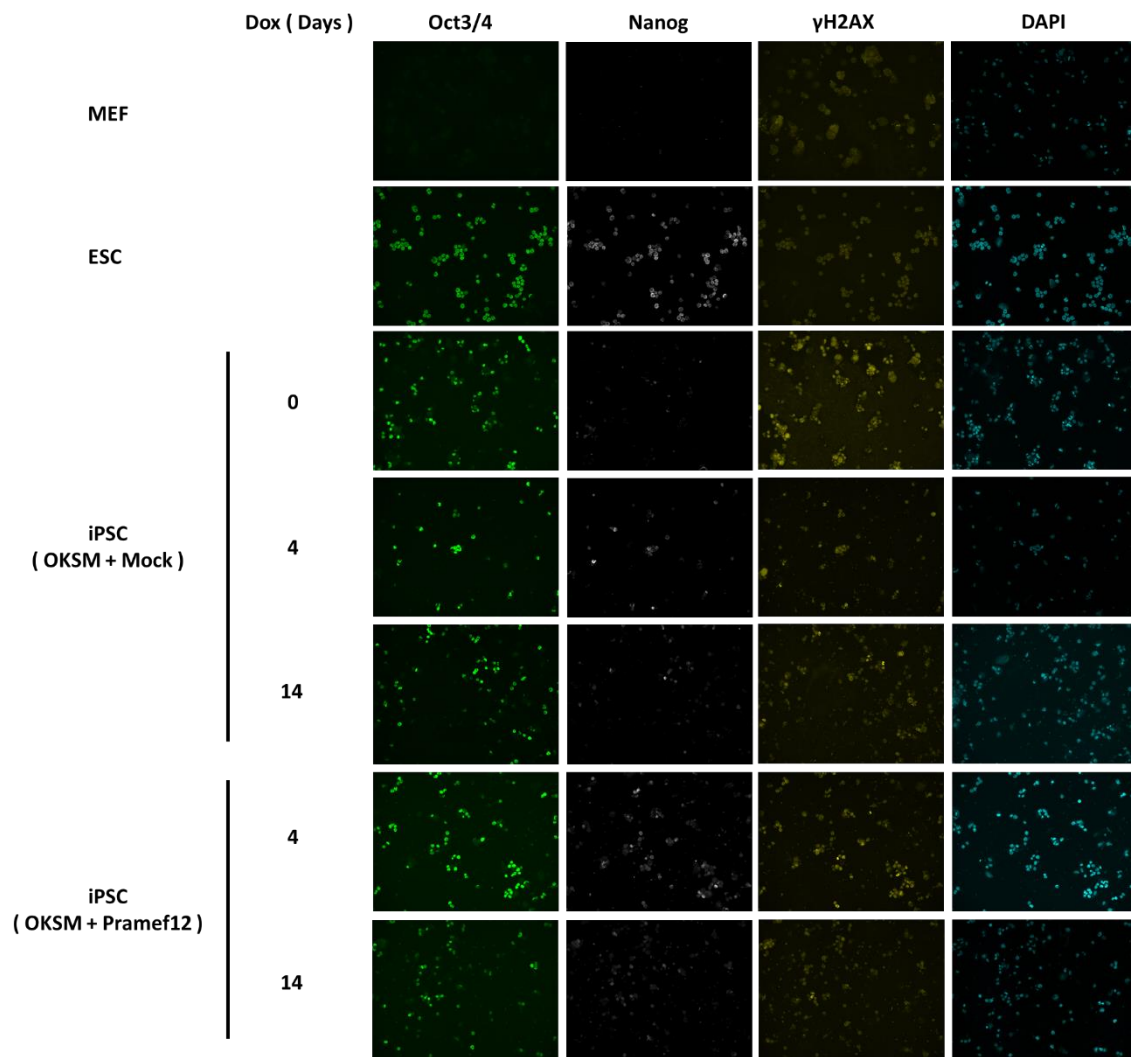
本章では、iPS 細胞誘導時に Pramef12 を発現させることにより樹立した iPS-OKSMP の遺伝子発現と鍵となるタンパク質の発現の解析を行った。多能性幹細胞には、Nanog の発現が高い細胞集団 (Nanog-high) と低い細胞集団 (Nanog-low) が存在し、Nanog-high 細胞では、自己複製能が高く、Nanog-low 細胞では、胚体外外胚葉に分化しやすい傾向があることが報告されている (Pan and Thomson, 2007; Singh et al., 2007; Zhang et al., 2014a)。本研究で作製した iPS-OKSMP は、Nanog 陽性細胞の割合と発現量がともに従来の iPS-OKSM よりも高いことから、自己複製能が高く分化指向性が低い品質の高い細胞が樹立できたと考えられる。実際に、iPS-OKSMP では、分化指向性が低く、あらゆる細胞への分化能を備えた naïve 型の多能性幹細胞のマーカである Dppa4 の発現も従来の iPS-OKSM よりも高いという結果が得られた。また、エネルギー代謝経路を解糖系から酸化的リン酸化へと変換させることにより primed 型から naïve 型への転換を促進する Esrrb の発現も、iPS-OKSMP において上昇していた。

これまでの研究から、iPS 細胞を誘導する際に p53 を抑制することにより iPS 細胞の樹立効率が上昇することが報告されている (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009)。また、p53 は Nanog の発現を抑制することも明らかにされている (Lin et al., 2005)。そこで、Pramef12 が p53 を抑制することにより、iPS 細胞の樹立効率や Nanog の発現を亢進することが考えられた。iPS-OKSMP において、p53 タンパク質の量が有意に減少していたが、p53 をノックアウトした場合よりはかなり多くのタンパク質が存在しているため、Pramef12 が p53 を抑制していたとしても、Nanog の発現の上昇には関与しない可能性が高いと考えられる。

分化能が低く、胚盤胞に移植した際にキメラ寄与率が低くなる質の低い iPS 細胞では、Dlk1-Dio3 インプリンティングクラスターに存在する遺伝子の発現が低下することが報告されている (Stadtfield et al., 2010)。そこで、iPS-OKSMP における Dlk1 と Gtl2 の遺伝子発現を解析したところ、iPS-OKSMP において有意に発現が上昇することが示された。このことから、iPS-OKSMP は従来の iPS-OKSM よりキメラ寄与率が高い細胞である可能性が示唆された。

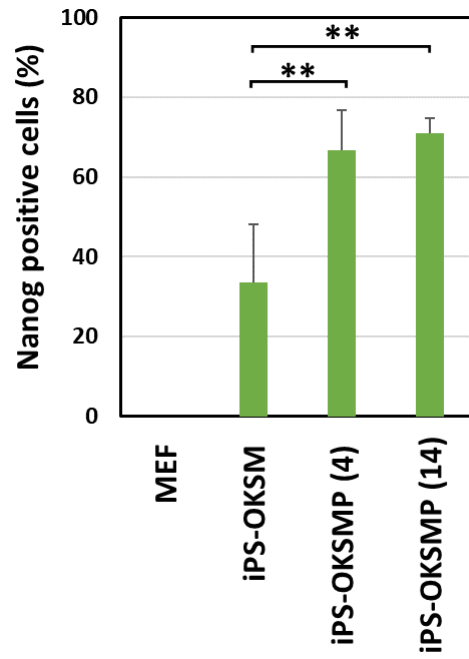
以上の結果より、iPS 細胞誘導時に Pramef12 を発現させることにより分化能が高い naïve 型の iPS 細胞を効率よく誘導できることが示された。今後、インプリント遺伝子領域のバイサルファイトシーケンスやヌードマウスへの移植実

験、胚様体形成実験、およびキメラマウス作製実験、等により作製した iPS 細胞の分化能を詳細に解析する必要があると考えられる。



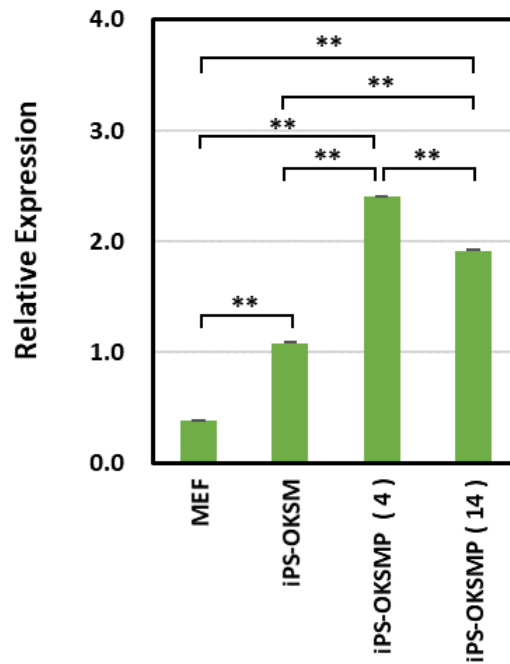
**Fig. 20 Pramef12-iPS 細胞における多能性関連タンパク質の発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞のコロニーをピックアップし、サイトスピンした後、免疫染色を行った。Oct3/4 : 緑、Nanog : 白、 $\gamma$ -H2AX : 黄、DAPI (核) : 青。



**Fig. 21 Pramef12-iPS 細胞における Nanog 発現細胞の割合**

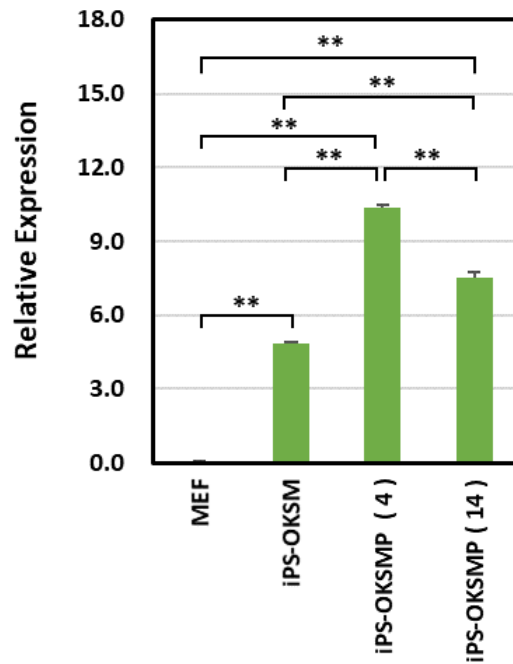
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Nanog の割合を算出した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間、Nanog / DAPI、平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



**Fig. 22 Pramef12-iPS 細胞における Nanog mRNA 発現**

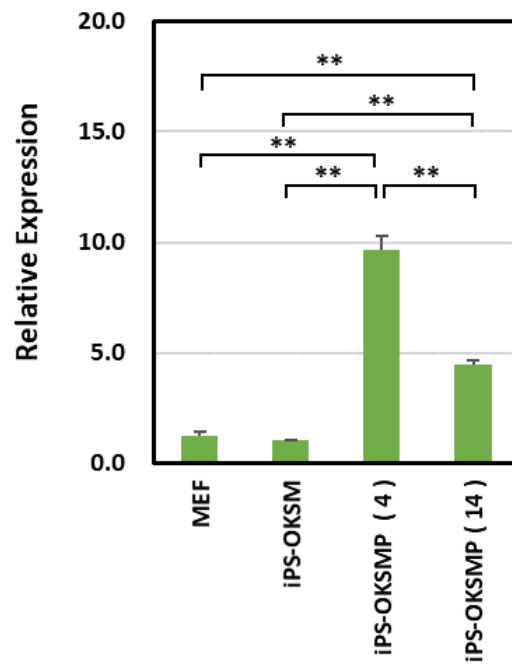
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Nanog mRNA の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。





**Fig. 23 Pramef12-iPS 細胞における Esrrb mRNA 発現**

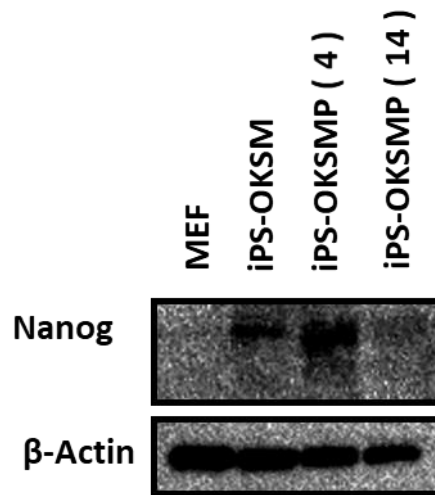
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Esrrb の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



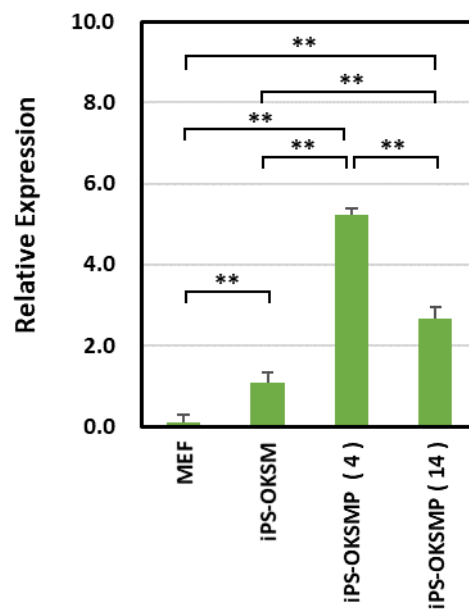
**Fig. 24 Pramef12-iPS 細胞における Dppa4 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Dppa4 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。

(A)

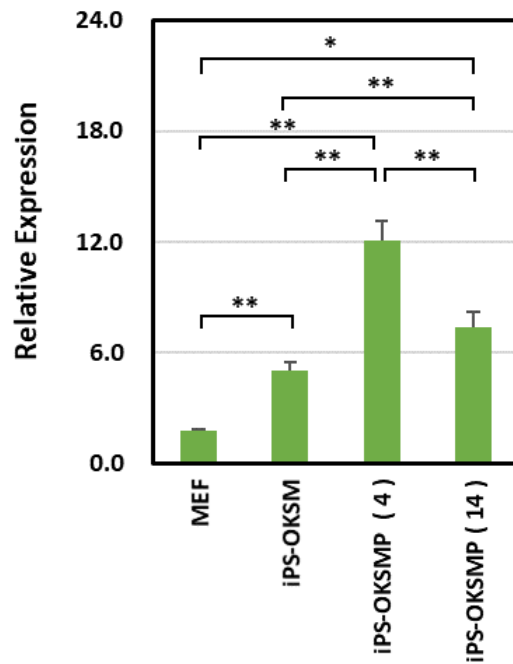


(B)



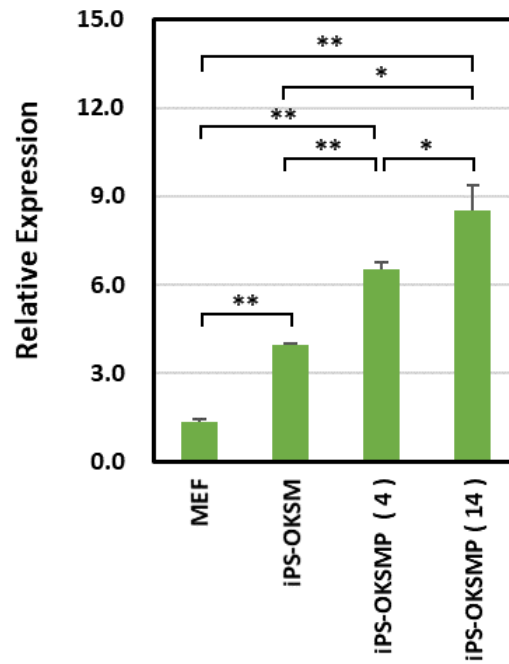
**Fig. 25 Pramef12-iPS 細胞における Nanog タンパク質発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Nanog の発現をウェスタンブロッティングにて解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 $\pm$ SD、n=3、\*\* $p$ <0.01。



**Fig. 26 Pramef12-iPS 細胞における Dlk1 mRNA 発現**

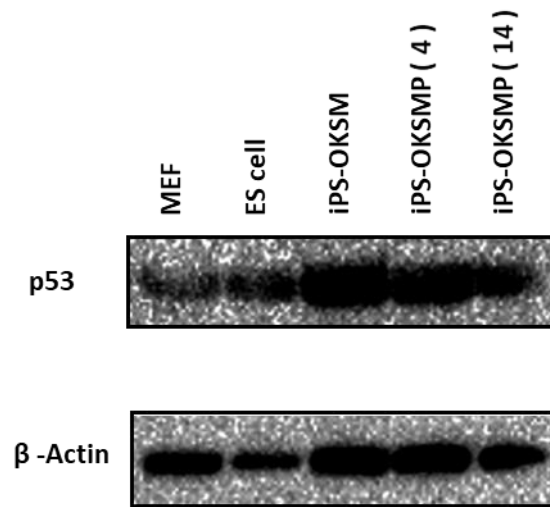
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Dlk1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



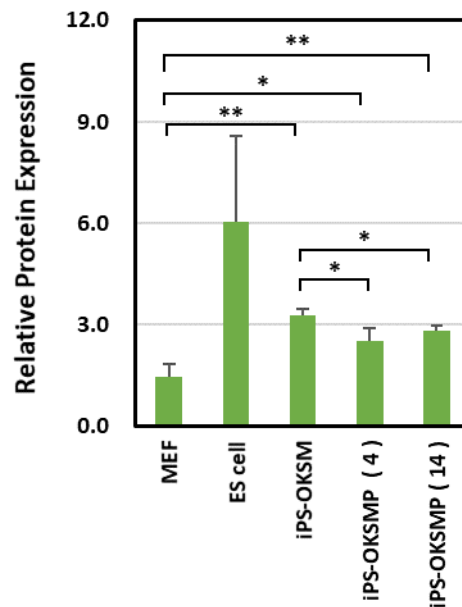
**Fig. 27 Pramef12-iPS 細胞における Gtl2 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Gtl2 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。

(A)



(B)



**Fig. 28 Pramef12-iPS 細胞における p53 タンパク質発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における p53 の発現をウェスタンブロッティングにて解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 $\pm$ SD、n = 3、\* $p$  < 0.05 \*\* $p$  < 0.01。

### 第3章 Pramef12による高品質iPS細胞誘導の分子機構の解析

#### 緒言

iPS細胞が樹立されるまでには、分化マーカーの発現抑制、間葉系-上皮転移、多能性マーカーの発現、エネルギー代謝経路の変換が生じることが知られている (Wu, L. et al. 2017.; Sone M. et al. 2017.)。そこで、本章では Pramef12 が iPS 細胞誘導過程における多能性マーカー、間葉系上皮転移関連遺伝子、エネルギー代謝経路関連遺伝子の発現に及ぼす影響について検討を行った。また、Pramef12 の iPS 細胞の誘導に関与する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路への関与についても検討を行った。

## 材料と方法

### 1. qRT-PCR

Total RNA は RNeasy Mini Kit (QIAGEN; 74106)、または RNeasy Micro Kit (QIAGEN; 74004)を用いて精製した。Total RNA 500 ng を SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Invitrogen; 11754250) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。リアルタイム PCR システム (Roche Light Cycler 480 SystemII) を用いて様々な遺伝子の発現量を定量化した。テンプレートは 10 倍希釈し、Table 9 に示すプライマーを用いた。サンプル間の発現を比較するために、Actin の値で補正を行った。

### 2. 遺伝子導入 (HEK293T 細胞 : 免疫染色)

遺伝子導入の前日に HEK293T 細胞を  $8.0 \times 10^5$  個播種した。100  $\mu$ L の Opti-MEMI Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, 31985070) に 1 mg/mL PEI (Polyethylenimine, Sigma-Aldrich: 408727) を 9.0  $\mu$ L 加え、pcDNA4-FLAG-Primef12 の Plasmid を 3.0  $\mu$ g 加えた後、15 分静置し、細胞に添加した。翌日、この細胞を 18 x 18 mm カバーガラスが入った 6 well plate に  $1.0 \times 10^5$  個播種した。次の日に 2 mL の培地を加えた。そして、遺伝子導入から 3 日後のサンプルを解析に用いた。

### 3. 遺伝子導入 (HEK293T 細胞 : 免疫沈降)

遺伝子導入の前日に HEK293T 細胞を  $8.0 \times 10^5$  個播種した。100  $\mu$ L の Opti-MEMI Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, 31985070) に 1 mg/mL PEI (Polyethylenimine, Sigma-Aldrich: 408727) を 9  $\mu$ L 加え、それぞれの組み合わせで Table 10 に示した Plasmid を 3  $\mu$ g 加えた後、15 分静置し、細胞に添加した。翌日に 2 mL の培地を加えた。そして、遺伝子導入から 2 日後のサンプルを解析に用いた。

### 4. 免疫染色 (HEK293T 細胞)

Transfecion した HEK293T 細胞が付着したカバーガラスを PAP PEN で回りを囲み、4% PFA/PBS を加えて室温で 15 分間静置することにより、細胞の固定処理を行った。固定した細胞に PBS を用いて 3 回洗浄した後、0.2% TritonX-100 / PBS を加えて室温で 15 分静置した。PBS を用いて 3 回洗浄した後、5% NGS / PBS を加えて室温で 1 時間静置することによりブロッキング処理を行った。次



に、1次抗体として rabbit anti-Pramef12 lot#1 (1:15,000; Sigma Lab-made antibody) / 5% NGS / PBS を加えて 4°Cで一晩静置した。PBS を用いて 3回洗浄 (1回の洗浄につき室温で 5分静置) した後、2次抗体として goat  $\alpha$ -rabbit IgG Alexa 647 (1:500, Thermo Fisher ; A-21245) / DAPI/ 5% NGS / PBS を加えて、遮光下で室温 1時間静置した。PBS を用いて 3回洗浄 (1回の洗浄につき室温で 5分静置) し、スライドガラスに蛍光褪色防止剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Nacalai tesque; 12593-64) を用いてマウントした後、カバーガラスを被せてマニキュアで封入した。サンプルは倒立蛍光顕微鏡 (Olympuds IX71)、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympuds FV10i) またはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700 シリーズ) を用いて観察した。

## 5. 免疫染色 (ES 細胞・iPS 細胞)

1 x 10<sup>4</sup> cells 分の ES 細胞をゼラチンコートしたカバーガラス上で 2日間培養または、ゼラチンコートしたカバーガラス上で iPS 細胞の誘導を行った。PAP PEN で回りを囲んだ後、4% PFA/PBS を加えて室温で 15分間静置することにより、細胞の固定処理を行った。固定した細胞に PBS を用いて 3回洗浄した後、0.2% TritonX-100/PBS を加えて室温で 15分静置した。PBS を用いて 3回洗浄した後、5% NGS / PBS を加えて室温で 1時間静置することによりブロッキング処理を行った。次に、1次抗体として mouse  $\alpha$ -Active  $\beta$ -catenin (1:1,000; EMD Millipore; 3102364) / 5% NGS / PBS や mouse  $\alpha$ -Gsk3  $\alpha/\beta$  (1:200, Santa Cruz; I2019) / 5% NGS / PBS、mouse  $\alpha$ -Axin (1:200, Santa Cruz; J1019) / 5% NGS / PBS、mouse  $\alpha$ -FLAG (1:1000, Sigma; F3165) / 5% NGS / PBS を加えて 4°Cで一晩静置した。PBS を用いて 3回洗浄 (1回の洗浄につき室温で 5分静置) した後、2次抗体として goat  $\alpha$ -mouse IgG Alexa 568 (1:500, Thermo Fisher Science; A-11077) / DAPI/ 5% NGS / PBS や goat  $\alpha$ -mouse IgG Alexa 647 (1:500, Thermo Fisher Science; A-21236) / DAPI/ 5% NGS / PBS を加えて、遮光下で室温 1時間静置した。PBS を用いて 3回洗浄 (1回の洗浄につき室温で 5分静置) し、スライドガラスに蛍光褪色防止剤 (Fluoro-KEEPER Antifade Reagent, Nacalai tesque; 12593-64) を用いてマウントした後、カバーガラスを被せてマニキュアで封入した。サンプルは倒立蛍光顕微鏡 (Olympuds IX71)、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympuds FV10i) またはオールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X700 シリーズ) を用いて観察した。

## 6. Western Blotting

6 well Plate から回収した細胞のペレットに、TNE buffer (10 mM Tris-HCl at pH 7.5, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) を加えて溶解し、氷上で 30 分間静置した。13,500 rpm・4°C・15 分遠心後に、上清を回収し細胞抽出液とした。細胞抽出液を SDS-PAGE (SuperSep Ace, 10-20%, WAKO, 191-15031) で 25  $\mu$ g 分を電気泳動した後、PVDF (Polyvinylidene Fluoride, Millipore, Immobilon-P, IPVH00010) メンブレン転写し、5% skim milk / TBS-T (50 mM Tris-HCl at pH7.5, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.1% Tween 20) 中、4°Cで 1 晩振とうすることによりブロッキングを行った。翌日、mouse anti- $\beta$ Actin (Sigma, A8592, 1:1,000) / 5% skim milk または mouse  $\alpha$ -Active  $\beta$ -catenin (1:1,000; EMD Millipore; 3102364) / 5% skim milk / TBS-T、mouse  $\alpha$ -Total  $\beta$ -catenin (1:1,000, BD Transduction; 2146909) / 5% skim milk、mouse  $\alpha$ -Gsk 3  $\alpha/\beta$  (1:200, Santa Cruz Biotechnology; sc-7291) / 5% skim milk、mouse  $\alpha$ -FLAG HRP (1:1,000, Sigma; A8592-1MG) / 5% skim milk、mouse  $\alpha$ -c-Myc HRP (1:500, Santa Cruz Biotechnology; sc-40) / 5% skim milk 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で洗淨 (5 分間、3 回) 洗淨した後、mouse anti- $\beta$ Actin や mouse  $\alpha$ -Active  $\beta$ -catenin などと反応させたメンブレンは、TBS-T で洗淨 (5 分間、3 回) 洗淨し、anti-mouse IgG HRP (1:1,000) / 5% skim milk 中に、室温で 1 時間静置した。TBS-T で 3 回洗淨した後、Western Lightning Plus-ECL (Perkin Elmer, NEL105001EA) と CCD イメージャー (ChemiDoc XRS Plus, BIO-RAD) を用いてシグナルを検出した。

## 7. 免疫沈降

遺伝子導入して 48 時間後に回収した細胞のペレットに対して、500  $\mu$ L の TNE buffer を加えてボルテックスし、氷上で 30 分静置した。4°C・13,500 rpm で 15 分遠心後に、上清を回収し細胞抽出液とした。このとき、Input サンプルとして 30  $\mu$ L 分を別のチューブに回収した。細胞抽出液に抗 FLAG 抗体 (anti-FLAG M2 monoclonal antibody, Sigma, F3165) や抗 Myc 抗体 (anti-c-Myc monoclonal(9E10) antibody, Santa Cruz Biotechnology, sc-40) を加え、4°Cで一晩ローテートした。翌日、Pierce Protein A/G Magnetic beads (ThermoFisher Scientific, 88803) を 10  $\mu$ L 加えて、4°Cで 1 時間ローテートした。TNE buffer で 3 回洗淨後、ウェスタンブロットティングを行った。

**Table 9 Primer sequences**

Name	Sequence (5' to 3')
pramef12_ORF_FWD	ATGAGCTTGCGTGCCACACC
pramef12_ORF_REV	GGAGCTCCATGGGCAGGTCC
Nanog (FWD)	CACCCACCCATGCTAGTCTT
Nanog (REV)	ACCCTCAAACCTCCTGGTCCT
Dlk1_qPCR_FWD2	TTCGAGTGTCTGTGCAAG
Dlk1_qPCR_REV2	CATGGACACCTTCAGGAT
Gtl2_qPCR_FWD2	AGAGAGACCCACCTACTG
Gtl2_qPCR_REV2	CTGTGAGGTAGGAACCTG
Slc2a1_qPCR_FWD	TCCCAGCAGCAAGAAGGTG
Slc2a1_qPCR_REV	GCGGTGGTTCCATGTTTGAT
Pgk1-S	CAGCCTTGATCCTTTGGTTG
Pgk1-AS	CTGACTTTGGACAAGCTGGA
Pdk1_qPCR_FWD	GTTGAAACGTCCCGTGCT
Pdk1_qPCR_REV	GCGTGATATGGGCAATCC
Cox7a1_qPCR_FWD	CGAAGAGGGGAGGTGACTC
Cox7a1_qPCR_REV	AGCCTGGGAGACCCGTAG
Idh2_qPCR_FWD	GGATGTACAACACCGACGAGT
Idh2_qPCR_REV	CGGCCATTTCTTCTGGATAG
Esrrb (FWD)	TTTCTGGAACCCATGGAGAG
Esrrb (REV)	AGCCAGCACCTCCTTCTACA
Zic3_qPCR_FWD2	TCCTTCAAGGCGAAGTACAAACTG
Zic3_qPCR_REV2	GGTTTCTCACCTGTATGGGTCCT
Snail_FWD	TGTCTGCACGACCTGTGGAAAG
Snail_REV	CTTCACATCCGAGTGGGTTTGG
E-cadherin_FWD	GGTCATCAGTGTGCTCACCTCT
E-cadherin_REV	GCTGTTGTGCTCAAGCCTTCAC
Dppa4_FWD	AACCAAGCACGGCTCCTGCAAA
Dppa4_REV	ACCTTCCTACGAGTCTGTCCTG

Hoxa1_FWD	TAACTCCTTATCCCCTCTCCAC
Hoxa1_REV	ACCCACGTAGCCGTA CTCTCCA
Cyp26a1_FWD	GAAACATTGCAGATGGTGCTTCAG
Cyp26a1_REV	CGGCTGAAGGCCTGCATAATCAC

**Table 10 Plasmids used for Immunoprecipitation**

(A)
1.0 µg/µL pcDNA4-Myc-Pramef12
1.0 µg/µL pcDNA4-FLAG
(B)
1.0 µg/µL pcDNA4-Myc
1.0 µg/µL pcDNA4-FLAG-Axin
(C)
1.0 µg/µL pcDNA4-Myc-Pramef12
1.0 µg/µL pcDNA4-FLAG-Axin

## 結果

### 1. Pramef12 が iPS 細胞誘導時の多能性マーカー遺伝子の発現に及ぼす影響

Pramef12 の iPS 誘導過程における役割を明らかにするために、多能性マーカー遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 29、30)。その結果、iPS-OKSMP において、Nanog および Esrrb の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。

### 2. Pramef12 が iPS 細胞誘導時のインプリント遺伝子の発現に及ぼす影響

Pramef12 の iPS 誘導過程における役割を明らかにするために、インプリント遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 31、32)。その結果、iPS-OKSMP において、Gtl2 および Dlk1 の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。

### 3. Pramef12 が iPS 細胞誘導時の解糖系関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Pramef12 の iPS 誘導過程における役割を明らかにするために、解糖系関連遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 33-35)。その結果、iPS-OKSMP において、グルコーストランスポーターである Slc2a、解糖系の主要な酵素である Pfkfb3、およびミトコンドリアにおける TCA サイクルを阻害する Pdk1 の発現は、Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間だけ発現させた場合に、iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。一方、Pramef12 を iPS 細胞誘導期間に継続的に発現させた場合には、従来の iPS-OKSM と類似した遺伝子発現動態を示すことが分かった。

### 4. Pramef12 が iPS 細胞誘導時の酸化的リン酸化関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Pramef12 の iPS 誘導過程における役割を明らかにするために、酸化的リン酸化関連遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 36、37)。その結果、iPS-OKSMP において、シトクロム c オキシダーゼの構成成分である Cox7a1 の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。一方、TCA サイクルにおいてイソクエン酸を  $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換する Idh2 の発現は、Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間だけ発現させた場合に、iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くな

り、Pramef12 を iPS 細胞誘導期間に継続的に発現させた場合には、従来の iPS-OKSM と類似した遺伝子発現動態を示すことが分かった。

#### **5. Pramef12 が iPS 細胞誘導時のエネルギー代謝経路の変換に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響**

Pramef12 の iPS 誘導過程における役割を明らかにするために、エネルギー代謝経路の変換に関与する遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 30、38)。その結果、iPS-OKSM において、Esrrb の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。一方、Zic3 の発現は、Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間だけ発現させた場合に、iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなり、Pramef12 を iPS 細胞誘導期間に継続的に発現させた場合には、従来の iPS-OKSM と類似した遺伝子発現動態を示すことが分かった。

#### **6. Pramef12 が iPS 細胞誘導時の間葉系-上皮転移に関与する遺伝子の発現に及ぼす影響**

Pramef12 による iPS 細胞の樹立効率向上に関する役割を明らかにするために、間葉系-上皮転換に関与する遺伝子の発現を経時的に調べた (Fig. 39、40)。その結果、iPS-OKSM において、上皮-間葉系転移を促進する Snail の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に低くなることが示された。一方、間葉系-上皮転移を促進する Cdh1 の発現は、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。

#### **7. HEK293T 細胞における Pramef12 の細胞内局在の解析**

Pramef12 の HEK293T 細胞における細胞内局在を明らかにするために、FLAG-Prmaef12 を用いて過剰発現させた (Fig. 40)。その結果、Pramef12 は細胞質に局在することが明らかとなった。

#### **8. ES 細胞における Pramef12 の細胞内局在の解析**

Pramef12 の ES 細胞における細胞内局在を明らかにするために、Dox 添加存在下で FLAG-Prmaef12-2A-Venus 発現する ES 細胞を用いて FLAG-Pramef12 を発現さ

せた (Fig. 41)。その結果、Pramef12 は細胞質に局在することが明らかとなった。

### 9. iPS 細胞誘導時における Pramef12 の細胞内局在の解析

Pramef12 の iPS 誘導過程における細胞内局在を明らかにするために、Pramef12 の代わりに EGFP-Prmaef12 を用いて iPS 細胞を誘導した (Fig. 41)。その結果、iPS 誘導 4 日後においても 14 日後においても Pramef12 は細胞質に局在することが明らかとなった。

### 10. Pramef12 が iPS 細胞誘導時の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに及ぼす影響

これまでの結果と Pramef12 の既知ドメイン (Fig. 44) から、Pramef12 は細胞質において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに関与することが考えられる。また、iPS 細胞の誘導には、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が重要であることが示されている (Lluis et al., 2008; Marson et al., 2008; Zhang et al., 2014b)。そこで、Pramef12 が iPS 細胞誘導時の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに及ぼす影響を検討した (Fig. 45)。その結果、活性型  $\beta$ -catenin (Active- $\beta$ -catenin) タンパク質の量が、Pramef12 の発現期間とは関係なく iPS 誘導後 10 日目に従来の iPS-OKSM よりも有意に高くなることが示された。

### 11. ES 細胞における Pramef12 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与

多能性幹細胞である ES 細胞における Pramef12 の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与を調べるために、Pramef12 を条件的に発現する ES 細胞を作製した (Fig. 46 A, B)。この ES 細胞を用いて、活性型  $\beta$ -catenin (Active- $\beta$ -catenin) のタンパク量を検討したところ、Pramef12 を発現させることにより、活性型  $\beta$ -catenin の (Active- $\beta$ -catenin) タンパク量が増加する、すなわち Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化することが明らかとなった。

### 12. ES 細胞における Pramef12 の $\beta$ -catenin destruction complex への関与

$\beta$ -catenin の活性は、GSK3 $\alpha/\beta$  と Axin を含む  $\beta$ -catenin destruction complex により制御されることが知られている (Rao and Kuhl, 2010)。通常、 $\beta$ -catenin destruction complex は、Axin を足場として、細胞膜直下に局在し  $\beta$ -catenin とは別々に存在している。フリーの  $\beta$ -catenin はリン酸化を受けずに核へと移行し、転写因子として機能する。一方、Axin と  $\beta$ -catenin が結合すると、 $\beta$ -catenin destruction complex

に含まれる GSK3 $\alpha/\beta$  と CK1 により  $\beta$ -catenin がリン酸化され、ユビキチン-プロテアソーム系により分解されることにより不活性化される。そこで、多能性幹細胞である ES 細胞において、Pramef12 の発現が  $\beta$ -catenin の活性と  $\beta$ -catenin destruction complex の構成成分である GSK3 $\alpha/\beta$  と Axin の細胞内局在に及ぼす影響を検討した (Fig. 47 - 49)。その結果、Pramef12 を発現させることにより、活性型の  $\beta$ -catenin (Active- $\beta$ -catenin) が顕著に増加することが明らかとなった。一方で、GSK3 $\alpha/\beta$  と Axin の細胞内局在は Pramef12 の発現の有無により影響を受けなかった。

### 13. Pramef12 と Axin、Axin-Gsk3 $\alpha/\beta$ の相互作用

Pramef12 は細胞質において既知ドメイン (Fig. 44) を介して、 $\beta$ -catenin destruction complex に含まれる GSK3 $\alpha/\beta$  や Axin と相互作用することにより、 $\beta$ -catenin のリン酸化が阻害されていることが考えられる。そこで、HEK293T 細胞において、Pramef12 が Axin と相互作用するか検討した (Fig. 50)。また、Pramef12 の発現による Axin- GSK3 $\alpha/\beta$  間の相互作用についても検討した (Fig. 51)。その結果、Pramef12 は Axin と相互作用することが明らかとなった。一方で、Pramef12 が発現していても Axin と GSK3 $\alpha/\beta$  は相互作用していた。



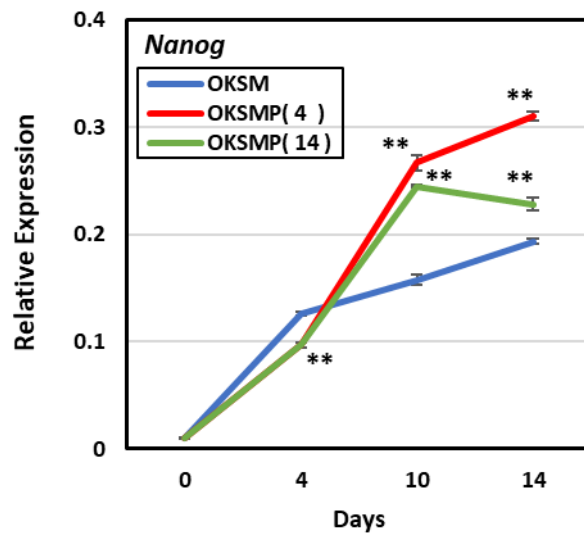
## 考察

本章では、Pramef12 による高品質 iPS 細胞誘導の分子機構を明らかにするために、iPS 誘導過程における遺伝子動態の解析を行うとともに、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルへの関与について検討を行った。その結果、本研究では、iPS 細胞誘導過程において Pramef12 を発現させることにより、①多能性マーカーである Nanog と Esrrb、分化能の指標となる Gtl2 と Dlk1 の発現が iPS 細胞誘導後 10 日目において有意に上昇すること、②Pramef12 を iPS 細胞誘導初期の 4 日間発現させることにより、解糖系と酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現が、iPS 細胞誘導後 10 日目において有意に上昇すること、③エネルギー代謝経路を制御することにより、協調して働く Zic3 と Esrrb の発現が上昇すること、④上皮-間葉系転移を促進する Snail の発現を抑制し、間葉系-上皮転移を促進する Cdh1 の発現が促進されること、を見出した。また、iPS 細胞誘導過程において⑤Pramef12 を発現させることにより、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路が活性化されることも見出した。

Wnt3a および GSK-3 阻害剤は、細胞融合が誘導するリプログラミングと iPS 誘導過程で生じるリプログラミングの両方を促進することが示されている(Lluis et al., 2008; Marson et al., 2008; Zhang et al., 2014b)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる iPS 誘導過程で生じるリプログラミングの促進は、Nanog や Esrrb などの多能性関連遺伝子の発現が上昇するためであり、細胞増殖や c-Myc の活性化には依存しないことが明らかにされている(Zhang et al., 2014b)。本研究では、iPS 誘導過程で生じるリプログラミングの初期に Pramef12 を過剰発現させると、活性型  $\beta$ -catenin (Active- $\beta$ -catenin) が顕著に増加することを明らかにした。Pramef12 を ES 細胞において異所的に発現させると、活性型  $\beta$ -catenin (Active- $\beta$ -catenin) が増加するという結果も、この結果を支持している。

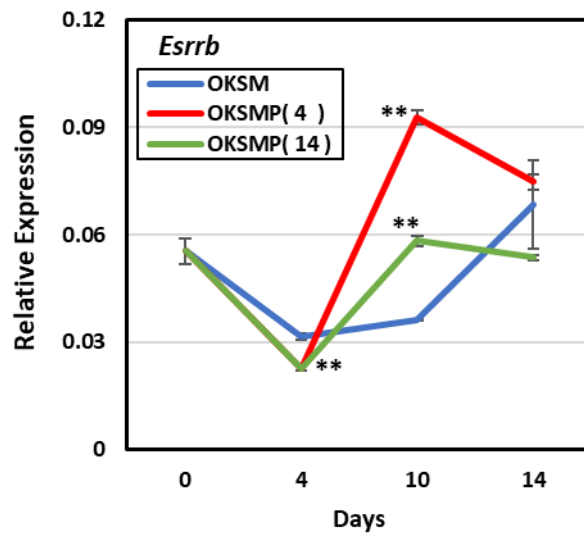
Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは、細胞の増殖、分化、運命決定、および器官形成など、様々な細胞プロセスを制御している(Rao and Kuhl, 2010)。最近の研究では、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの下流で Pdk1 が結腸癌におけるミトコンドリアへのピルビン酸の流入を阻害することによって解糖系が活性化されることが示された(Pate et al., 2014)。また、マウス肝腫瘍細胞において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが、Dlk1-Dio3 インプリンティングクラスターに位置するコーディングおよび非コーディング遺伝子の発現を正に制御することが示されている(Liu et al., 2010)。さらに、Esrrb は、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの主要な下流分子として、多能性幹細胞の維持に重要

な役割を果たすことが報告されている(Fan et al., 2020)。細胞種は異なっているものの、本研究で明らかにした Pramef12 による高品質 iPS 細胞の誘導には、少なくとも部分的には Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが関与することが考えられる。Pramef12 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化する分子機構についてはさらなる研究が必要であるが、Pramef12 が細胞質に局在することから、Pramef12 が GSK3 $\alpha/\beta$  や CK1 による  $\beta$ -catenin のリン酸化を阻害している可能性が考えられる。今後、Pramef12 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを制御する分子機構について明らかにすることにより、近年報告されている小分子化合物のみによる iPS 細胞作製 (Hou, P. et al., 2013.; Guan, J. et al., 2022) において、高品質な iPS 細胞を作製する方法の開発へと発展できると考えられる。



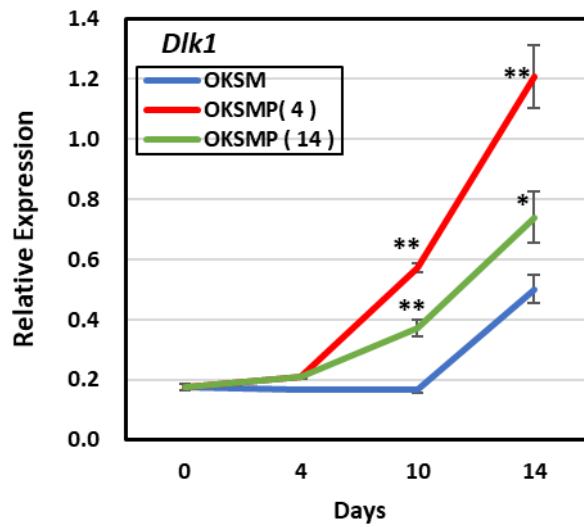
**Fig. 29 iPS 細胞誘導過程における Nanog mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Nanog の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



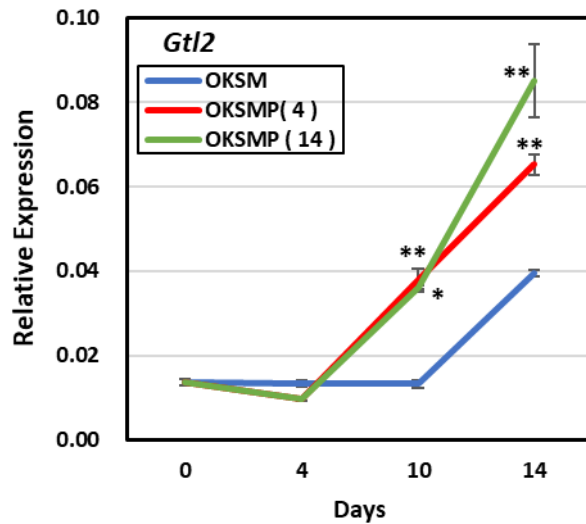
**Fig. 30 iPS 細胞誘導過程における Esrrb mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Esrrb の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



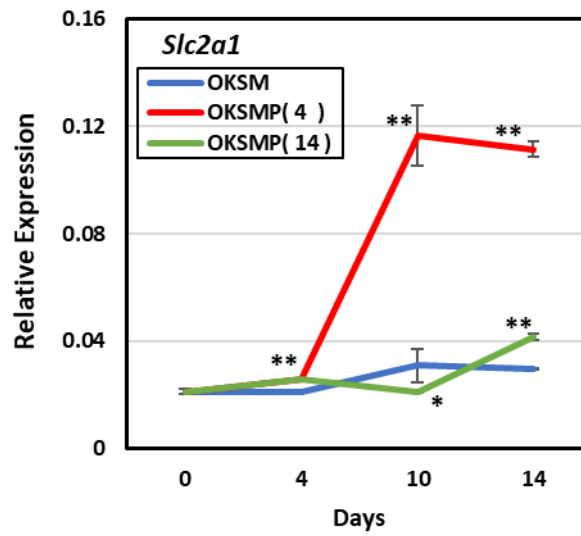
**Fig. 31 iPS 細胞誘導過程における Dlk1 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Dlk1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



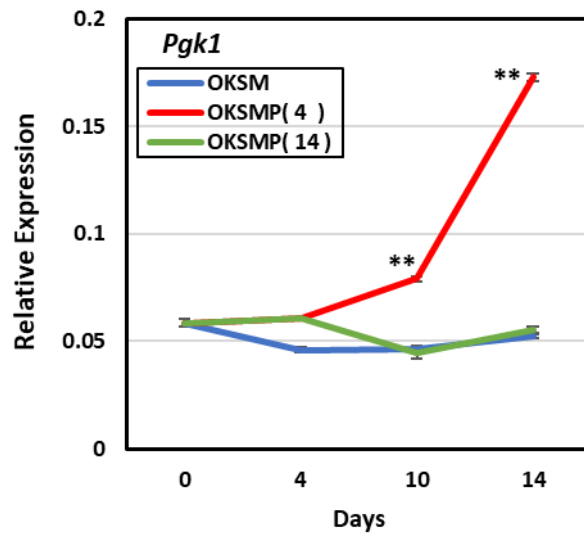
**Fig. 32 iPS 細胞誘導過程における Gtl2 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Gtl2 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



**Fig. 33 iPS 細胞誘導過程における Slc2a1 mRNA 発現**

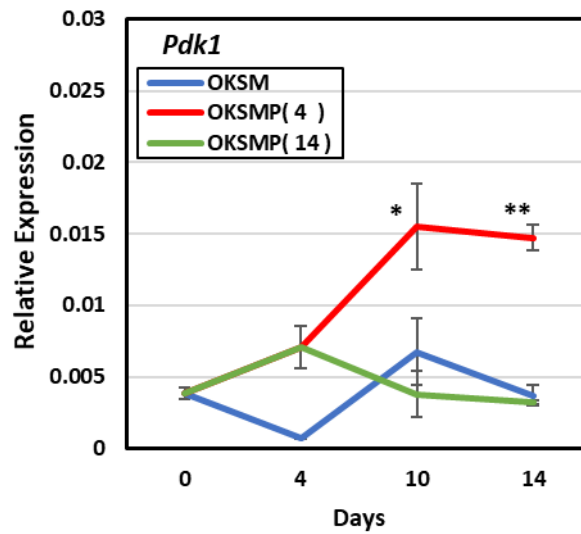
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Slc2a1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



**Fig. 34 iPS 細胞誘導過程における Pgk1 mRNA 発現**

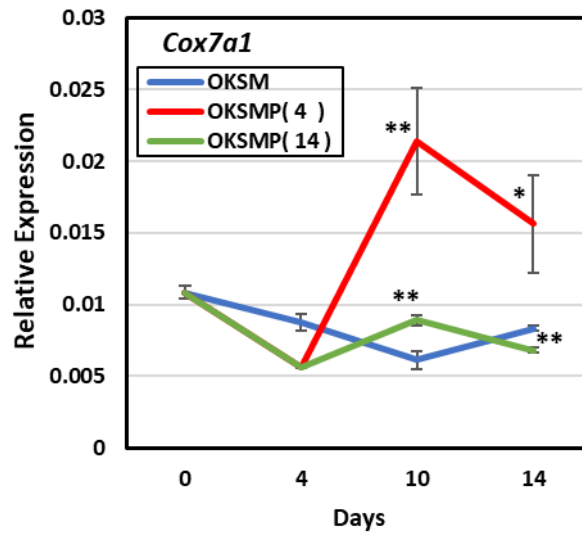
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Pgk1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。





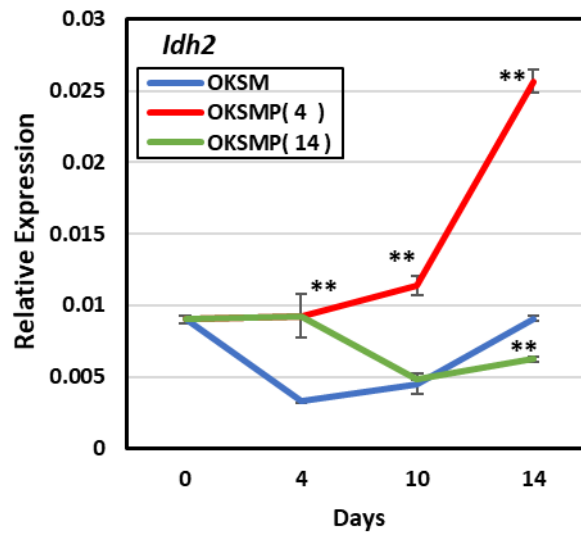
**Fig. 35 iPS 細胞誘導過程における Pdk1 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Pdk1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



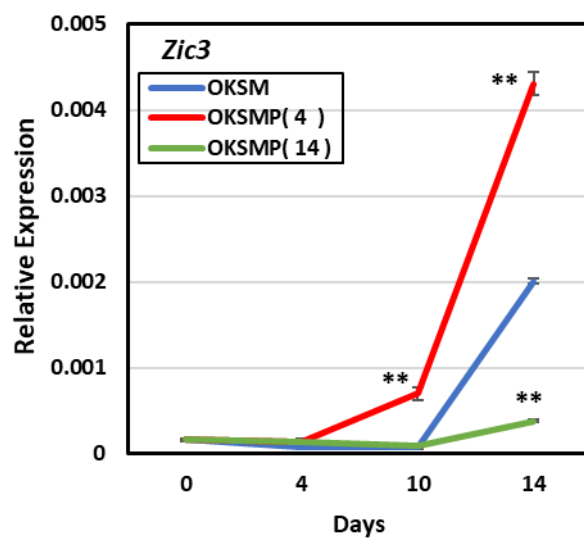
**Fig. 36 iPS 細胞誘導過程における Cox7a1 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Cox7a1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ±SD、n = 3、\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$ 。



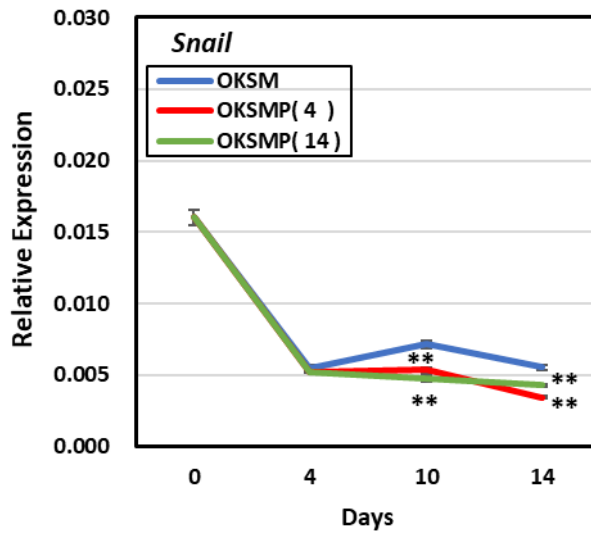
**Fig. 37 iPS 細胞誘導過程における Idh2 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Idh2 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



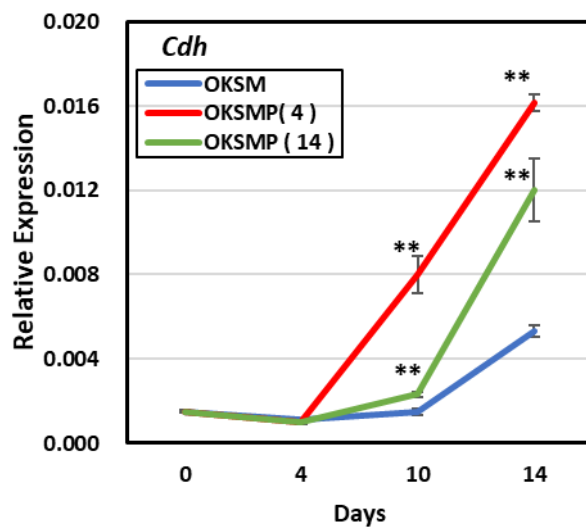
**Fig. 38 iPS 細胞誘導過程における Zic3 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Zic3 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ±SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



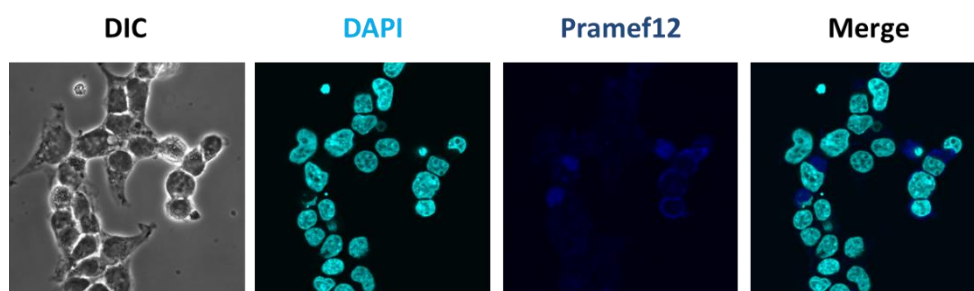
**Fig. 39 iPS 細胞誘導過程における Snail mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Snail の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



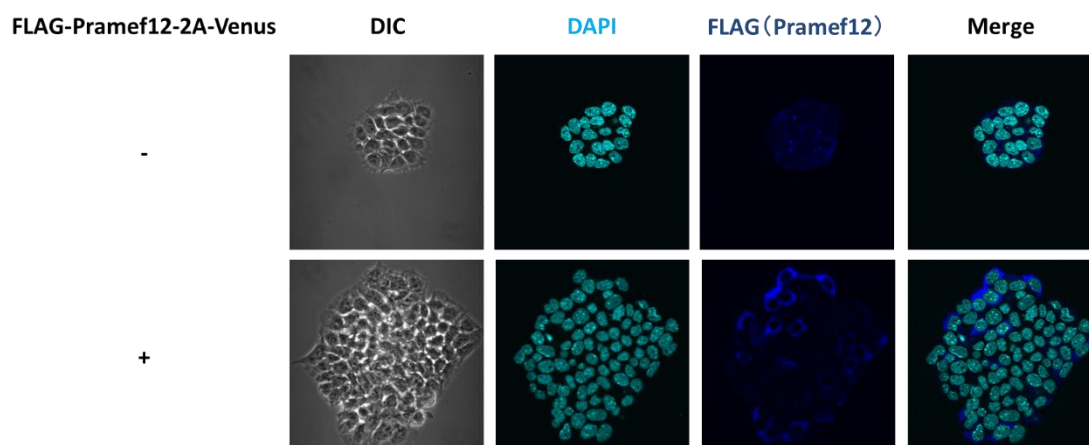
**Fig. 40 iPS 細胞誘導過程における Cdh1 mRNA 発現**

Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Cdh1 の発現を qRT-PCR で解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値 ± SD、n = 3、\*\* $p < 0.01$ 。



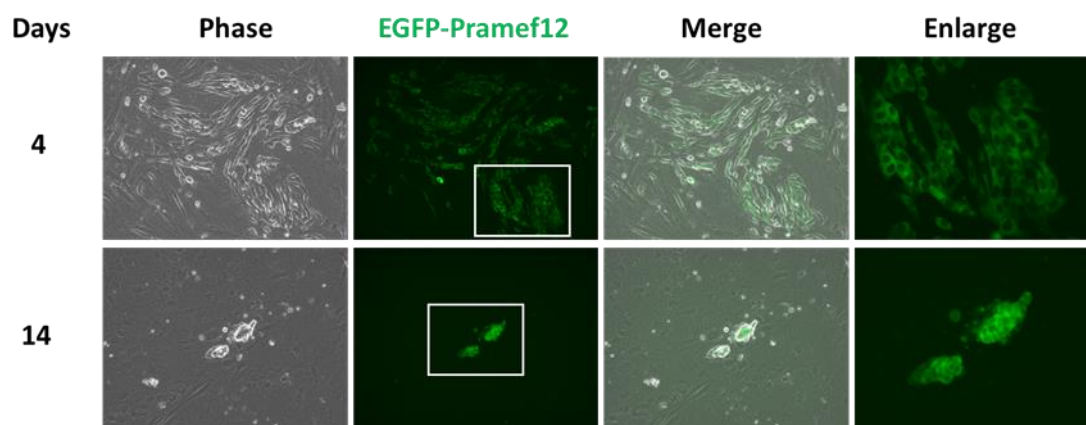
**Fig. 41 HEK293T 細胞における Pramef12 の局在**

HEK293T 細胞に pcDNA4-FLAG-Pramef12 を発現させ、 $\alpha$ -Pramef12 lot#1 を用いて、Pramef12 の局在を免疫染色により確認した。Pramef12：シアン、DAPI (核)：青。



**Fig. 42 ES 細胞における Pramef12 の局在**

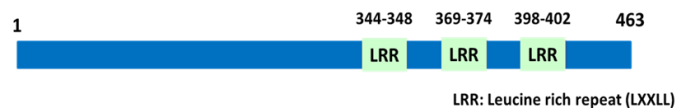
ES 細胞に Dox 添加により FLAG-Pramef12-2A-Venus を発現させ、 $\alpha$ -FLAG M2 を用いて、Pramef12 の局在を免疫染色により確認した。Pramef12：シアン、DAPI (核)：青。



**Fig. 43 iPS 細胞誘導過程における Pramef12 の局在**

iPS 細胞誘導過程において、EGFP-Pramef12 を発現させることにより局在を確認した。EGFP-Pramef12：緑





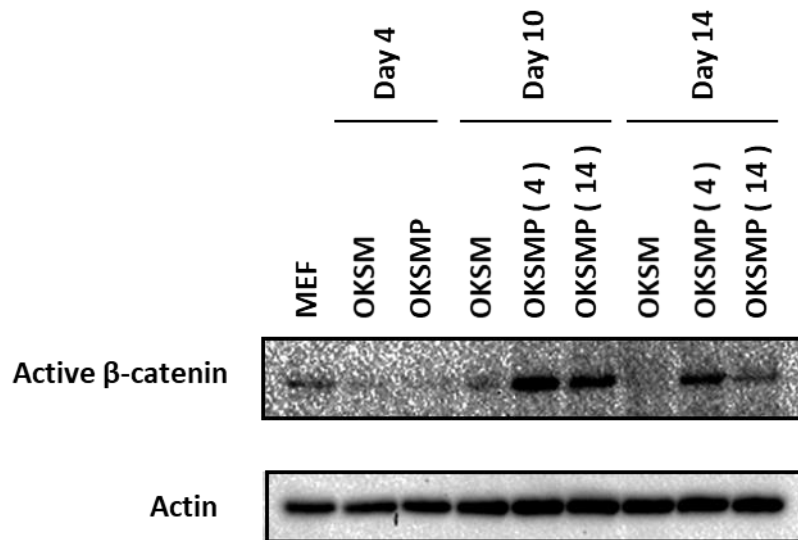
### 推定される機能

- RA (Retinoic acid)シグナルを負に制御
- 細胞増殖を正に制御
- 細胞分化を負に制御
- 転写を負に制御

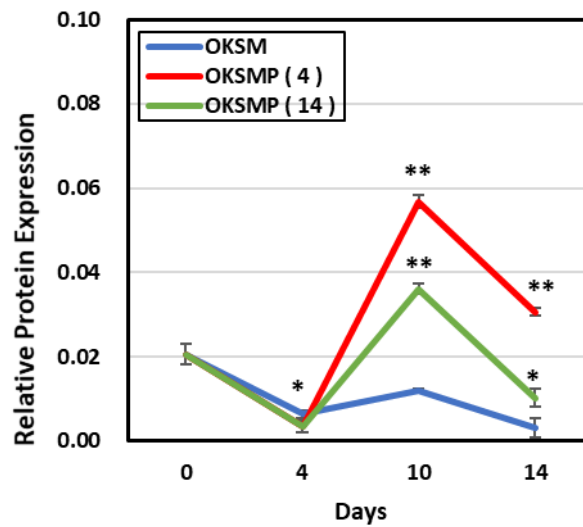
### Fig. 44 Pramef12 の既知ドメインと推定される機能

Pramef12 (Preferentially expressed antigen of melanoma family member 12) は、メラノーマで優先的に発現する抗原として同定されたファミリータンパク質である。マウスでは 25 種類存在しており、その多くがロイシンリッチリピート (LRR) を有している。Pramef12 の場合は、LRR を C 末端側に 3 か所所有している。また、Pramef12 は、他のファミリータンパク質の機能から、レチノイン酸シグナルを負に制御すること、細胞増殖を正に制御すること、細胞分化を負に制御すること、転写を負に制御すること、などが推定される。

(A)

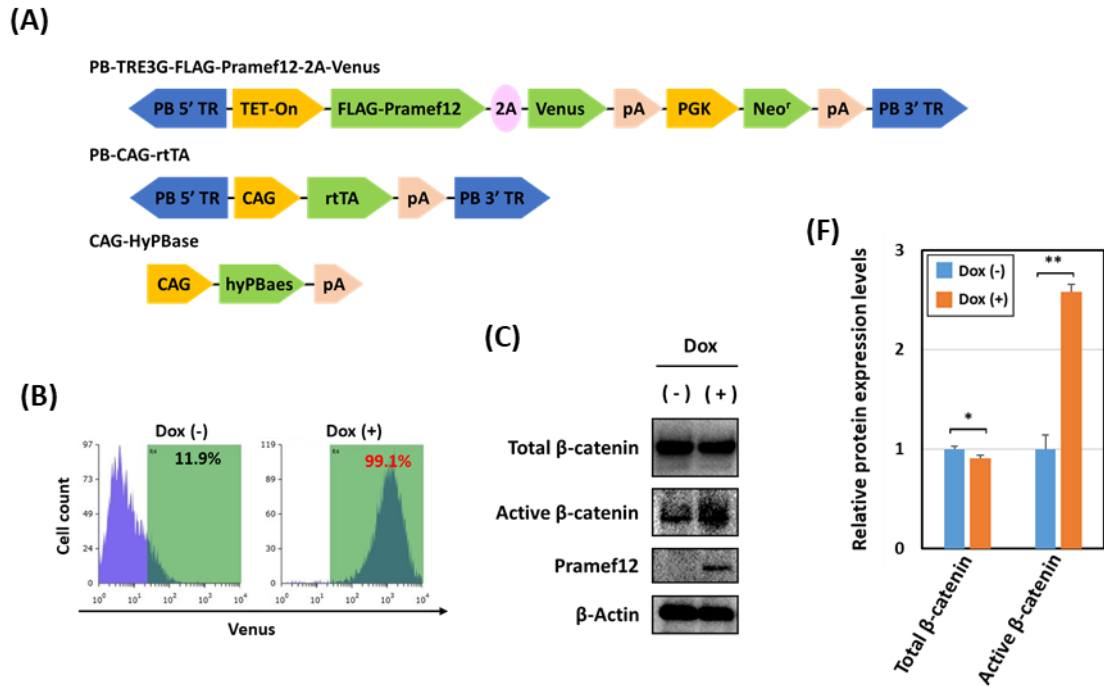


(B)



**Fig. 45 iPS 細胞誘導過程における Active  $\beta$ -catenin タンパク質発現**

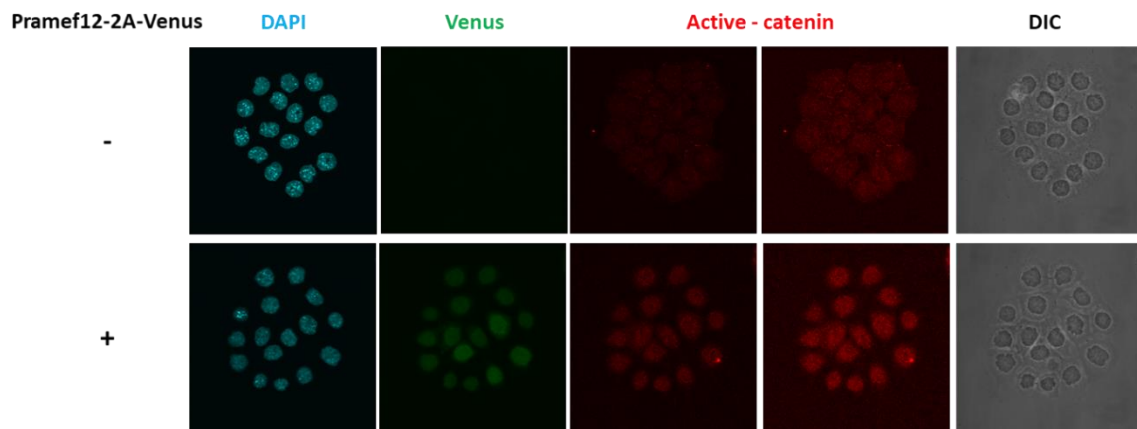
Pramef12 を 0 日、4 日、または 14 日間発現させることにより作製した iPS 細胞における Active  $\beta$ -catenin の発現をウェスタンブロッティングで解析した。( ) 内の数字は Dox を添加した期間を示す。平均値  $\pm$  SD、n = 3、\* $p$  < 0.05 \*\* $p$  < 0.01。



**Fig. 46 ES 細胞における Active  $\beta$ -catenin と Total  $\beta$ -catenin タンパク質発現**

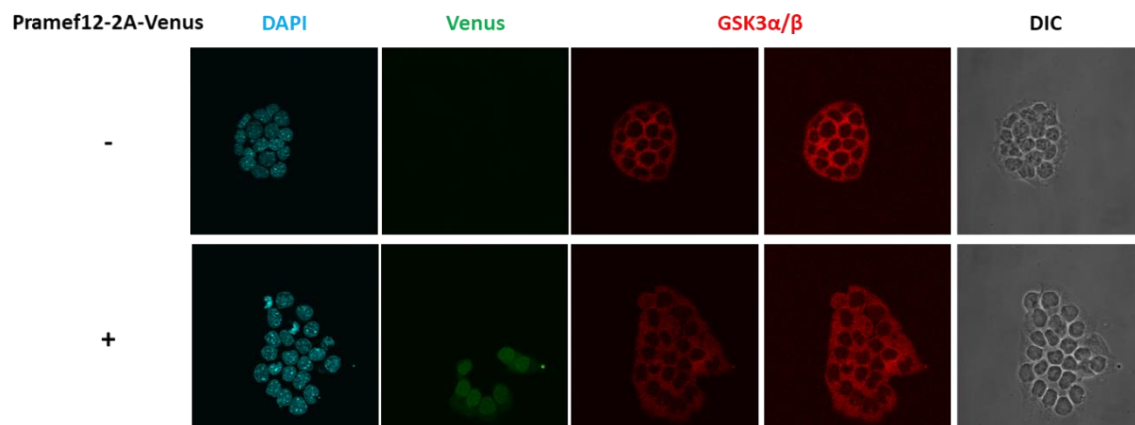
(A) Pramef12 を条件的に発現させる ES 細胞を作製するために用いたプラスミド。(B) 条件的に Pramef12 を発現できる ES 細胞に Dox を添加し、48 時間後に FACS 解析を行った。

(C) Pramef12 が Active  $\beta$ -catenin と Total  $\beta$ -catenin のタンパク質の発現に及ぼす影響をウェスタンブロッティング法を用いて解析した。(D) ウェスタンブロッティングのバンドを Image J を用いて定量した。平均値 $\pm$ SD、n = 3、\* $p$  < 0.05 \*\* $p$  < 0.01。



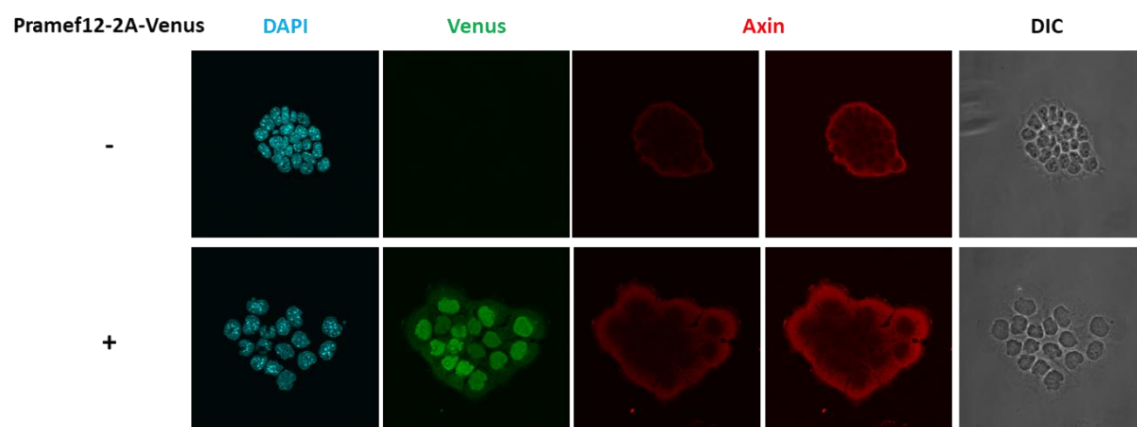
**Fig. 47 ES 細胞における Active  $\beta$ -catenin の局在**

Pramef12-2A-Venus を発現させた ES 細胞における Active  $\beta$ -catenin の局在を免疫染色により確認した。Active  $\beta$ -catenin の右側の写真は左側写真の感度調整、Venus : 緑、Active  $\beta$ -catenin : 赤、DAPI (核) : 青。



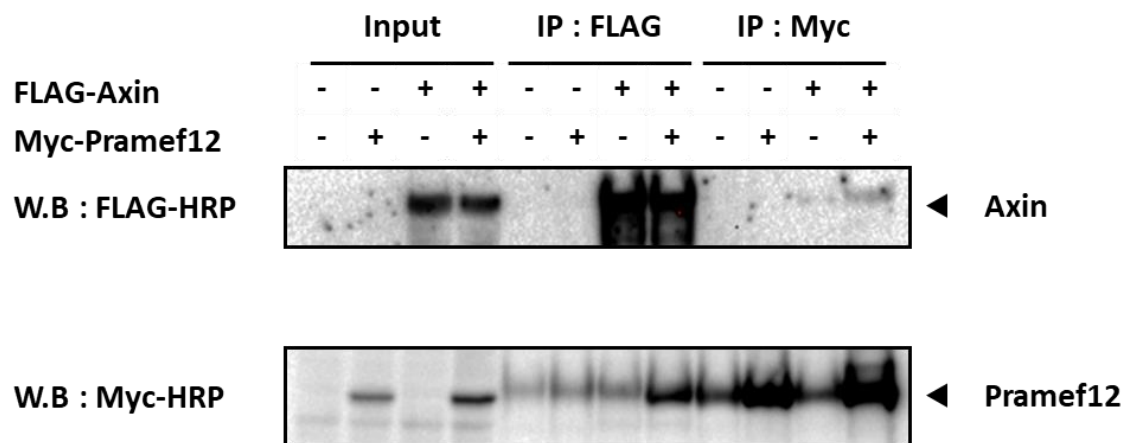
**Fig. 48 ES 細胞における Gsk3 $\alpha/\beta$  の局在**

Pramef12-2A-Venus を発現させた ES 細胞における Gsk3  $\alpha/\beta$  の局在を免疫染色により確認した。Gsk3  $\alpha/\beta$  の右側の写真は左側写真の感度調整、Venus : 緑、Gsk3 $\alpha/\beta$  : 赤、DAPI (核) : 青。



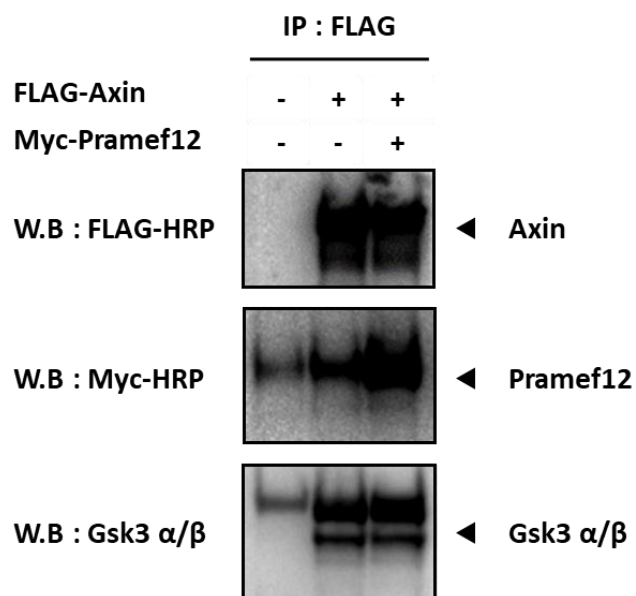
**Fig. 49 ES 細胞における Axin の局在**

Pramef12-2A-Venus を発現させた ES 細胞における Axin の局在を免疫染色により確認した。Axin の右側の写真は左側写真の感度調整、Venus : 緑、Axin : 赤、DAPI (核) : 青。



**Fig. 50 Pramef12 と Axin 相互作用の検討**

HEK293 細胞に Myc タグを付加した Pramef12 と FLAG タグを付加した Axin を発現させ、抗 FLAG 抗体および抗 Myc タグ抗体で免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティングを行った。



**Fig. 51 Pramef12 による Axin-Gsk3 α/β 相互作用の検討**

HEK293 細胞に Myc タグを付加した Pramef12 と FLAG タグを付加した Axin を発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティングを行った。



## 結論

本研究では、全能性細胞で特異的に発現する Pramef12 を iPS 細胞誘導の初期に異所的に発現させることにより、多能性マーカーの発現上昇、分化能に関与するインプリント遺伝子の活性化、解糖系と酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現上昇、および間葉系-上皮転移の促進、を介して iPS 細胞の樹立効率と品質が改善できることを明らかにした (Fig. 52)。また、Pramef12 によるリプログラミングの促進は、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を介することも示唆された。

## 総合考察

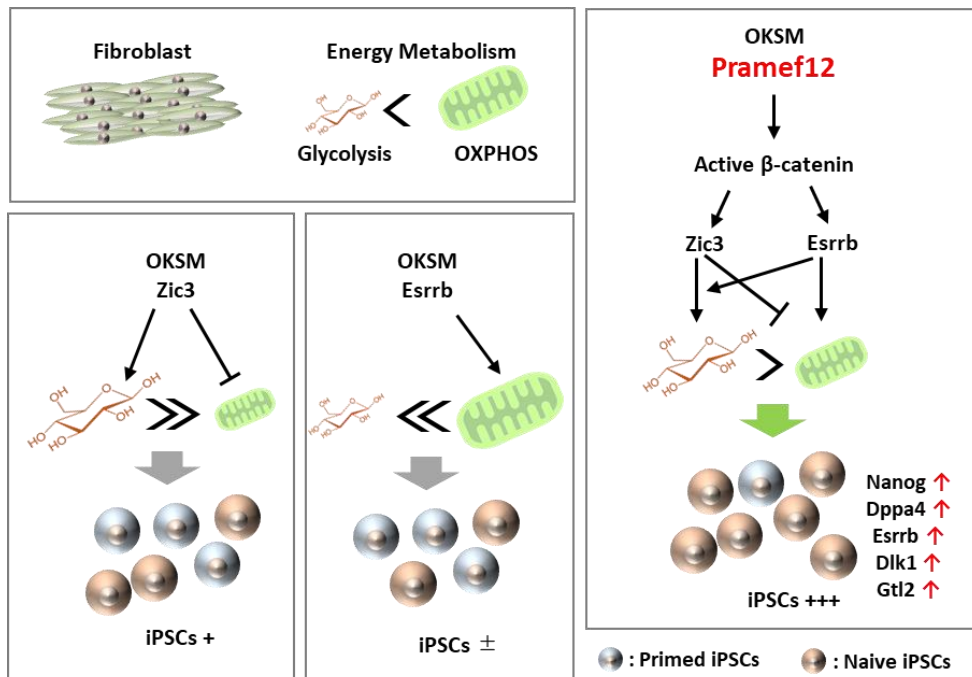
2006年にマウス iPS 細胞(Takahashi and Yamanaka, 2006)、2007年にはヒト iPS 細胞(Takahashi et al., 2007)が樹立され、多能性幹細胞を用いた再生医療の実現が期待され、実際に2014年には臨床研究が開始された(Mandai et al., 2017)。しかし、現在臨床研究や治験で使われる安全性の高い iPS 細胞は、特定の細胞種にしか分化できない細胞や分化できない未分化細胞から、質の高い細胞を選別することにより得ている。したがって、臨床研究や治験で用いることができる高品質 iPS 細胞を誘導する方法を開発することが重要な課題となっている。

2013年にヒト核移植 (NT-) ES 細胞が樹立(Tachibana et al., 2013)されたことにより、ES 細胞、iPS 細胞、NT-ES 細胞、の3種類の多能性幹細胞が揃い、これらの遺伝子発現パターンやエピゲノム解析の結果から、4つの転写因子によりリプログラミングを誘導した iPS 細胞よりも卵子に存在する多数の因子によりリプログラミングを誘導した NT-ES 細胞の方が遺伝子発現パターンやエピゲノムの状態が ES 細胞に近いことが明らかとなった(Ma et al., 2014)。このことは、卵子にはリプログラミングを促進する因子が含まれていることを示唆している。実際に、卵子に存在する Glis1、TH2A/TH2B、PGC7、Oobox1、Zscan4c、および Zscan4f が iPS 細胞の樹立効率や品質を改善することが報告されている(Cheng et al., 2020; Jiang et al., 2013; Maekawa et al., 2011; Shinagawa et al., 2014; Sperber et al., 2015; Wu et al., 2017)。そこで、本研究では全能性を有する初期の着床前胚に特異的に発現する全能性細胞特異的遺伝子を用いて、iPS 細胞の質を改善することを目標に研究を行った。

9種類の全能性細胞特異的遺伝子を iPS 細胞誘導時に異所的に発現させ、iPS 細胞の樹立効率を検討したところ、Pramef12 や Rfpl4、Trim61 を iPS 細胞誘導時の初期段階にのみ発現させた場合、樹立効率が上昇することが明らかとなった。そこで、Pramef12 に着目して研究を進めたところ、Pramef12 を iPS 細胞誘導時に異所的に発現させることにより、分化能が高い naïve 型の iPS 細胞が誘導できることが明らかとなった。また、Pramef12 は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を介してリプログラミングを促進する可能性を示した。

本研究では、全能性細胞特異的遺伝子の中で樹立効率を高める Pramef12 に着目して研究を進めたが、樹立効率を低下させる遺伝子の中には質を向上させる遺伝子が含まれている可能性もある。今後、他の全能性細胞特異的遺伝子を用い

て作製した iPS 細胞についても、品質を検討していくことにより、全能性細胞特異的遺伝子が iPS 細胞の品質を向上できるかどうか明らかにできると考えている。



**Fig. 52 Pramef12 による高品質な iPS 細胞への誘導**

Pramef12 を iPS 細胞誘導時に発現させることにより、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路を制御し、多能性マーカーの発現上昇、分化能に関与するインプリント遺伝子の活性化、解糖系と酸化的リン酸化に関与する遺伝子の発現上昇、および間葉系-上皮転移を促進する。

## 参考文献

- Cheng, Z.L., Zhang, M.L., Lin, H.P., Gao, C., Song, J.B., Zheng, Z., Li, L., Zhang, Y., Shen, X., Zhang, H., *et al.* (2020). The Zscan4-Tet2 Transcription Nexus Regulates Metabolic Rewiring and Enhances Proteostasis to Promote Reprogramming. *Cell Rep* 32, 107877.
- David L, Polo JM. ( 2014 ). Phases of reprogramming. *Stem Cell Res.* Volume 12, Issue 3, May 2014, Pages 754-761
- Fan, R., Kim, Y.S., Wu, J., Chen, R., Zeuschner, D., Mildner, K., Adachi, K., Wu, G., Galatidou, S., Li, J., *et al.* (2020). Wnt/Beta-catenin/Esrrb signalling controls the tissue-scale reorganization and maintenance of the pluripotent lineage during murine embryonic diapause. *Nat Commun* 11, 5499.
- Guan, J., Wang, G., Wang, J. *et al.* (2022). Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605, 325–331
- Hochedlinger, K., and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136, 509-523.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132-1135.
- Hou, P. *et al.* (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 341, 651–654
- Jiang, J., Lv, W., Ye, X., Wang, L., Zhang, M., Yang, H., Okuka, M., Zhou, C., Zhang, X., Liu, L., *et al.* (2013). Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res* 23, 92-106.
- Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z., and Gao, S. (2009). iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 5, 135-138.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140-1144.
- Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nat Cell Biol* 7, 165-171.
- Liu, L., Luo, G.Z., Yang, W., Zhao, X., Zheng, Q., Lv, Z., Li, W., Wu, H.J., Wang, L., Wang, X.J., *et al.* (2010). Activation of the imprinted Dlk1-Dio3 region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem* 285, 19483-19490.

Lluis, F., Pedone, E., Pepe, S., and Cosma, M.P. (2008). Periodic activation of Wnt/beta-catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell* 3, 493-507.

Ma, H., Morey, R., O'Neil, R.C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M.D., Hariharan, M., Nery, J.R., Castanon, R., Sabatini, K., *et al.* (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511, 177-183.

Maekawa, M., Yamaguchi, K., Nakamura, T., Shibukawa, R., Kodanaka, I., Ichisaka, T., Kawamura, Y., Mochizuki, H., Goshima, N., and Yamanaka, S. (2011). Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. *Nature* 474, 225-229.

Mandai, M., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 377, 792-793.

Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3, 132-135.

Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Göttgens B, Niwa H, Smith A. (2012). Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* 11, 491-504.

Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. *et al.* (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 460, 118–122 .

Pan, G., and Thomson, J.A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res* 17, 42-49.

Pate, K.T., Stringari, C., Sprowl-Tanio, S., Wang, K., TeSlaa, T., Hoverter, N.P., McQuade, M.M., Garner, C., Digman, M.A., Teitell, M.A., *et al.* (2014). Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J* 33, 1454-1473.

Pera, M.F. (2011). Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* 471, 46-47.

Rao, T.P., and Kuhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 106, 1798-1806.

Shinagawa, T., Takagi, T., Tsukamoto, D., Tomaru, C., Huynh, L.M., Sivaraman, P., Kumarevel, T., Inoue, K., Nakato, R., Katou, Y., *et al.* (2014). Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 14, 217-227.

Singh, A.M., Hamazaki, T., Hankowski, K.E., and Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* 25, 2534-2542.

Sone M, Morone N, Nakamura T, Tanaka A, Okita K, Woltjen K, Nakagawa M, Heuser

JE, Yamada Y, Yamanaka S, Yamamoto T. (2017). Hybrid Cellular Metabolism Coordinated by Zic3 and Esrrb Synergistically Enhances Induction of Naive Pluripotency. *Cell Metab* 25, 1103-1117.

Sperber, H., Mathieu, J., Wang, Y., Ferreccio, A., Hesson, J., Xu, Z., Fischer, K.A., Devi, A., Detraux, D., Gu, H., *et al.* (2015). The metabolome regulates the epigenetic landscape during naive-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat Cell Biol* 17, 1523-1535.

Stadtfield, M., Apostolou, E., Akutsu, H., Fukuda, A., Follett, P., Natesan, S., Kono, T., Shioda, T., and Hochedlinger, K. (2010). Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465, 175-181.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.S., Sritanandomchai, H., *et al.* (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.

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

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

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.

Wu, L., Wu, Y., Peng, B., Hou, Z., Dong, Y., Chen, K., Guo, M., Li, H., Chen, X., Kou, X., *et al.* (2017). Oocyte-Specific Homeobox 1, Obox1, Facilitates Reprogramming by Promoting Mesenchymal-to-Epithelial Transition and Mitigating Cell Hyperproliferation. *Stem Cell Reports* 9, 1692-1705.

Xu, X., Smorag, L., Nakamura, T., Kimura, T., Dressel, R., Fitzner, A., Tan, X., Linke, M., Zechner, U., Engel, W., *et al.* (2015). Dppa3 expression is critical for generation of fully reprogrammed iPS cells and maintenance of Dlk1-Dio3 imprinting. *Nat Commun* 6, 6008.

Zhang, J., Liu, G., Ruan, Y., Wang, J., Zhao, K., Wan, Y., Liu, B., Zheng, H., Peng, T., Wu, W., *et al.* (2014a). Dax1 and Nanog act in parallel to stabilize mouse embryonic stem cells and induced pluripotency. *Nat Commun* 5, 5042.

Zhang, P., Chang, W.H., Fong, B., Gao, F., Liu, C., Al Alam, D., Bellusci, S., and Lu, W. (2014b). Regulation of induced pluripotent stem (iPS) cell induction by Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 289, 9221-9232.

Zhao, X.Y., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C.L., Ma, Q.W., Wang,

L., *et al.* (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation.  
*Nature* 461, 86-90.



## 謝辞

本研究を行うにあたり、私の意志を尊重し、卒業研究からエピジェネティック制御学研究室で行う機会を与えてくださいました植月太一教授に感謝いたします。また、私の研究室異動に関して相談に乗っていただいた担任の亀村和生教授をはじめ、旧細胞コースの皆様にも感謝いたします。

研究や論文作成、日本学術振興会の書類作成などに関して直接ご指導を賜りました中村肇伸教授に大変感謝いたします。また、学会やシンポジウムにもついてきてくださり、相談にも乗っていただきありがとうございます。また、齊藤修教授、伊藤正恵教授には博士課程の副指導教員としてご多忙の中貴重なご意見とご助言を賜り深く感謝いたします。そして、他学科から来た私を受け入れてくれた小畑俊吾氏、柿原礼佳氏、雑賀祐希氏、佐藤志津江氏、新地葵氏、比留田圭介氏、眞野友裕氏の同期メンバーにも感謝します。また、中田健太氏、劉琳琳氏、古田明日香氏の先輩方には私のような年上の後輩を可愛がっていただきました。ありがとうございます。さらに、実験の遂行に当たり御協力いただきましたエピジェネティック制御学研究室の皆様にも深く感謝いたします。ご迷惑かもしれませんが、これからも何卒よろしく願いいたします。

また、実験を行う上で、貴重な生命を提供してくれた多くの実験動物に深く感謝するとともに、哀悼の意を表します。

そして、大学と大学院の 9 年間で暖かく見守り、辛抱強く応援して下さった両親に感謝いたします。