

研究題目 多能性幹細胞におけるキメラ形成能の分子メカニズムの解明

研究組織

研究代表者：岡村大治（近畿大学農学部バイオサイエンス学科）

共同研究者：竹本龍也（徳島大学先端酵素学研究所）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

現在多能性幹細胞研究において、キメラ形成能を持つヒトや家畜などの大型動物の多能性幹細胞の開発が激しくなっている。その理由の一つが、再生医療における野心的な目標として「ヒトの臓器を他動物の体内で作製する」ことが示されているからである。この目標の中で「異種間キメラ形成能を持つヒト iPS 細胞の開発」は、最も大きな課題の一つであると考えられる。しかし現在に至るまで、キメラ形成の分子機構というのはほとんどが理解されておらず、研究モデルとなるシステムすら未だ示されていない状況である。

ES 細胞や iPS 細胞に代表される多能性幹細胞は、その性質の違いから二つに大別される。一つは、マウス ES/iPS 細胞のように着床前の胚の性質に似た「ナイーブ型」。もう一つは、マウスエピブラス幹細胞 (EpiSCs: epiblast stem cells) やヒト ES/iPS 細胞などの着床後の胚の性質に似た「プライム型」である。両者共に、三胚葉の分化細胞を生み出す能力を保持していることから多能性幹細胞と呼ばれるが、ナイーブ型には胚盤胞注入によるキメラ形成能が有るにも関わらずプライム型には確認出来ないなど、両者には明確な相違があることが示されている。ま

たナイーブ型細胞の安定した培養維持条件は、Wnt シグナルの活性化であることが明らかとなっている。

近年我々は、従来の FGF2 とアクチビンによるプライム型の培養条件を変更し、FGF2 と Wnt 阻害剤を添加することで、極めて安定的なプライム型の多能性幹細胞を生み出すことに成功した (Okamura* et al., *Nature*, 2015)。しかしこの細胞もまたプライム型であることから、胚盤胞注入によるキメラ形成能がないことが明らかとなっている。

そこで当該共同研究では、ナイーブ型とプライム型の安定した培養条件がそれぞれ Wnt シグナルの活性化(ナイーブ型)と阻害(プライム型)であることに着目し、「Wnt シグナルの入力強度を指標とした、多能性幹細胞のキメラ形成能の指標化」にアプローチする。Wnt レポーターマウスを使って Wnt シグナルの入力強度の変化に、その蛍光強度の変化で反応する ES 細胞やエピブラスト幹細胞を樹立する。Wnt シグナルの入力強度は、培養液中に加える Wnt 活性剤や阻害剤の投与量によって厳密に調整可能であることから、その際の蛍光強度を数値化した上で、胚盤胞注入によるそれぞれのキメラ形成能を検証し、Wnt シグナル入力強度とキメラ形成能の相関性を分析する。これにより、現在までそのほとんどが明らかとなってい

ないキメラ形成の分子機構の解明に、Wnt 強度を指標とする「研究モデル」を提供出来ることが期待される。

[1-2]研究の方法・経過

当該共同利用の受け入れ教員であられる竹本教授は 2016 年、Wnt シグナルの活性度を GFP 強度で反映するレポーターマウスの作製に成功した (Takemoto et al., 2016, *Genes Cells*)。

そこで我々はこの胚盤胞を材料に Wnt-GFP レポーターES 細胞を樹立し、「WntVis ES 細胞」と名付けた。この細胞をナイーブ型からプライム型の異なる 4 つの多能性状態に誘導した上で、それぞれの細胞における GFP の蛍光強度を観察した。その結果、4 つの異なる多能性状態にある多能性幹細胞はそれぞれ異なる GFP の蛍光強度を示した。2i/LIF 存在下で培養された ES 細胞の培地には、Wnt シグナルの活性剤である GSK3 β 阻害剤が入っている為、Wnt シグナルの伝達経路が活性化され、非常に強い GFP 蛍光が観察された。一方で、Wnt シグナルの阻害剤である IWR1 が入っているプライム型多能性幹細胞 (rsEpiSC) では GFP の蛍光シグナルは全く検出出来なかった。

驚くべきことに、LIF 存在下で培養された ES 細胞の培地とプライム型多能性幹細胞 (EpiSC) の培地には Wnt シグナルの活性剤や阻害剤が入っていないにもかかわらず、GFP シグナルが観察され、EpiSC よりも LIF 存在下で培養された ES 細胞の方が強い蛍光が検出された。

これらの結果は、Wnt レポーターである

GFP シグナルの発現量が Wnt シグナルの活性剤や阻害剤の有無に左右されるのではなく、「細胞の多能性状態」を反映していることが示唆された。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

多能性幹細胞で認められた Wnt シグナル強度と多能性状態の対応性。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

Wnt シグナルは様々な種間で保存しているシグナル伝達経路であるので、サルやヒトの細胞でも Wnt シグナルの活性状態を可視化することで多能性状態を指標化することも期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表：なし

[3-2]学会発表：なし

【4】今後の課題等

蛍光消失の早い destabilized EGFP をレポーターとした新規の Wnt レポーターマウスの作製に取り組み、ES 細胞やエピプラスト幹細胞を樹立した上で蛍光強度を数値化、さらに胚盤胞注入によるそれぞれのキメラ形成能を検証し、Wnt シグナル入力強度とキメラ形成能の相関性を分析する。