

内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1】

平成 29 年 2 月 8 日

氏名	三浦 太一		
学位の種類	博士 (工学)		
学位記番号	甲 第 148 号		
学位記の授与日	平成 29 年 3 月 18 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 創価大学大学院学則第 31 条第 2 項該当 創価大学学位規則第 3 条の 3 第 1 項該当		
論文題目	多能性幹細胞の未分化・分化を制御するシグナル調節因子の解析		
論文審査機関	工学研究科委員会		
論文審査委員	主査委員 理学 博士	西原 祥子	印
	委 員 理学 博士	青山 由利	印
	委 員 獣医学博士	高瀬 明	印

<論文の内容の要旨>

本論文は、多能性幹細胞における未分化・分化を制御するシグナル調節因子に着目し、活性酸素種による制御、および、*O*-GlcNAc 糖鎖修飾による制御について解析を行った。その結果、(1) H_2O_2 が fibroblast growth factor 4 (FGF4) シグナルを活性化して、ナイーブ状態の ES 細胞からプライム状態のエピブラスト、外胚葉、神経への分化を促進すること、(2) プライム状態の多能性幹細胞の生存に *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) が必須であり、また、プライム状態からナイーブ状態の ES 細胞への逆移行には OGT と *O*-GlcNAc 分解酵素 (OGA) の両者が必須であることを、新規に明らかにした。本論文は、緒論、方法、結果、考察、および、結論から構成されており、以下にその要旨を述べる。

緒論

ES 細胞や iPS 細胞は、未分化状態を維持して自己複製でき、かつ、身体を構成する全ての組織の細胞に分化できる能力を有している多能性幹細胞である。マウス ES 細胞は、着床前の胚の内部細胞塊から樹立された「ナイーブ状態」の多能性幹細胞であり、マウスエピブラスト幹細胞は着床後の胚のエピブラストから樹立された「プライム状態」の多能性幹細胞である。ヒト ES 細胞は遺伝子発現解析などから、プライム状態にあるとされている。この 2 つの状態間の遷移については、「なぜ哺乳類においてマウスの ES 細胞のみがナイーブ状態なのか」など、そのメカニズムには、多くの未解決な問題が残されている。

一方、転写因子以外にも様々な因子により、ES 細胞の未分化性の維持や分化を制御するシグナルが調節されている。酸化ストレスによるシグナルの制御、また、*O*-GlcNAc 糖鎖修飾によるリン酸化を介したシグナルの制御が考えられた。本研究では、この 2 つの方向からのシグナル制御に焦点を絞り、「ナイーブ状態」と「プライム状態」の多能性幹細胞の維持と両状態間の遷移、分化に対して研究を行った。

方法

ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、未分化性維持因子の LIF を加えずに、浮遊培養すると、*in vivo* の胚発生を模倣した胚様体 (EB) を形成し、エピブラストから三胚葉へ分化する。また、ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、LIF を添加せずに、FGF2 と LIF シグナル阻害剤を加えて培養すると、プライム状態のエピブラスト幹細胞に分化する。逆に、プライム状態のエピブラスト幹細胞を、LIF と FGF シグナル阻害剤、Wnt シグナル促進剤を加え、1 週間フィーダー細胞上で培養すると、ナイーブ状態のマウス ES 細胞に戻すことができる。これらの培養系に、 H_2O_2 や OGT、OGA 阻害剤などを添加して、解析を行った。

結果と考察

はじめに、活性酸素種がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に与える影響を検討するため、培地に H_2O_2 を添加し、EB を形成させて解析を行った。エピブラストマーカー、外胚葉マーカー、神経細胞マーカーが上昇し、エピブラスト、外胚葉、神経への分化が促進した。この時、FGF4 シグナルの下流のリン酸化 Erk1/2 は増加し、FGF4 シグナルの標的遺伝子の発現も増加していた。これらの事実から、活性酸素の一種である H_2O_2 は FGF4 シグナルを活性化させ、エピブラストから、外胚葉、神経への分化を促進させることが明らかとなった。

次に、「ナイーブ状態」マウス ES 細胞から「プライム状態」のエピブラスト幹細胞への遷移における *O*-GlcNAc の解析を行った。OGT の発現は、両者で変化しなかったが、プライム状態のエピブラスト幹細胞で OGA の発現は顕著に増加し、*O*-GlcNAc 修飾のパターンも両状態で異なることが分かった。さらに、OGT 阻害剤と OGA 阻害剤を用いた実験から、プライム状態のエピブラスト幹細胞において OGT は生存に必須であること、プライム状態のエピブラスト幹細胞から、ナイーブ状態のマウス ES 細胞への移行には OGT と OGA の両者が必須であることが明らかとなった。

結論

本研究により、(1) 活性酸素の一種である H_2O_2 が FGF4 シグナルを活性化し、エピブラスト、外胚葉、神経への分化を促進すること、(2) *O*-GlcNAc 修飾が、プライム状態の多能性幹細胞の生存に必須であり、また、プライム状態からナイーブ状態への移行にも必須であることが、新規に明らかにされた。

<論文審査結果の要旨>

本論文は、活性酸素の一種である H_2O_2 が FGF4 シグナルを活性化して ES 細胞の分化を促進すること、*O*-GlcNAc 修飾がプライム状態における生存とナイーブ状態への遷移に必要なことを新規に見出した。これらは、本研究で初めて明らかにされたものであり、それを証明する十分なデータも有することから、学位論文に値する内容であると認定する。

以上の結果は、以下の学術雑誌に掲載された。

1. Miura T, Ando A, Hirano K, Ogura C, Kanazawa T, Ikeguchi M, Seki A, Nishihara S, Hamaguchi S: Proliferation assay of mouse embryonic stem (ES) cells exposed to atmospheric pressure plasmas at room temperature. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **47**, 445402 (2014).
2. Miura T, Hamaguchi S, Nishihara S: Atmospheric-pressure plasma-irradiation inhibits mouse embryonic stem cell differentiation to mesoderm and endoderm but promotes ectoderm differentiation. *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **49**, 165401 (2016).
3. Miura T, Nishihara S: *O*-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state. *BBRC*, **480**, 655-661 (2016).