

# 博士学位請求論文

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

専攻名 生命情報工学専攻

学籍番号 13d5606

氏名 三浦 太一

指導教員 西原 祥子

創 価 大 学 大 学 院  
工 学 研 究 科

**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**

**2017 年 3 月  
三浦 太一**

# 目次

## 1. 緒論

1. 1. 多能性幹細胞	P3
1. 2. <i>O</i> -GlcNAc の合成と機能	P7~
1. 3. 活性種とプラズマ照射	P9~

## 2. 材料と方法

2. 1. 実験に使用した各種阻害剤	P11
2. 2. 細胞培養	P11
2. 2. 1. マウス ES 細胞の維持	P11
2. 2. 2. <i>Ogt</i> ノックダウン解析	P11, 12
2. 2. 3. プライム状態の ESD-EpiSCs への誘導と ESD-EpiSCs の維持	P12
2. 2. 4. ESD-EpiSCs における <i>Ogt</i> と <i>Oga</i> の機能解析	P12, 13
2. 2. 5. プライム状態の ESD-EpiSCs からのナイーブ状態のマウス ES 細胞への移行	P13
2. 2. 6. マウス ES 細胞からの EB 形成	P13
2. 2. 7. マウス ES 細胞の増殖能の検討	P13
2. 3. プラズマ装置 (低温 APP 装置)	P13
2. 4. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 添加培地とプラズマ照射培地の調整	P14
2. 5. プラズマ照射超純水中の過酸化水素濃度の測定	P15
2. 6. ウェスタンブロット法によるタンパク質の解析	P15
2. 7. リアルタイム PCR 解析	P15
2. 8. 免疫染色	P15, 16
2. 9. 核画分と細胞質画分の調整	P16
2. 10. 統計解析	P16

## 3. 結果

3. 1. プライム状態、および、プライム状態からナイーブ状態への遷移における <i>O</i> -GlcNAc の機能	
3. 1. 1. ナイーブ状態のマウス ES 細胞における <i>Ogt</i> の機能	P17~
3. 1. 2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への誘導	P19~
3. 1. 3. プライム状態の ESD-EpiSCs における <i>Ogt</i> 、 <i>Oga</i> 、 <i>O</i> -GlcNAc の発現	P19~
3. 1. 4. プライム状態の ESD-EpiSCs における <i>Ogt</i> 、 <i>Oga</i> 、 <i>O</i> -GlcNAc の局在	P21~
3. 1. 5. プライム状態の ESD-EpiSCs における <i>Oga</i> の機能	P23

3.1.6. プライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt の機能-----	P24~
3.1.7. プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態への遷移における Ogt と Oga の機能-----	P25

### 3.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果

3.2.1. プラズマ照射培地中の活性種のナイーブ状態のマウス ES 細胞における機能---	P27
3.2.2. 活性種の胚様体 (EB) の増殖能への効果-----	P29~
3.2.3. 活性種のエピブラスト分化における機能-----	P30~
3.2.4. 活性種の中胚葉・内胚葉分化における機能-----	P32~
3.2.5. 活性種の外胚葉分化における機能-----	P33~
3.2.6. 活性種の神経細胞分化における機能-----	P35

## 4. 考察

4.1. プライム状態の ESD-EpiSCs における O-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞へ戻す際の O-GlcNAc の機能-----	P36~
4.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果-----	P38~
4.3. 細胞内・細胞外因子による、多能性幹細胞の未分化・分化に関わるシグナル調節-----	P40~

## 5. 結論

5.1. プライム状態における O-GlcNAc の機能とプライム状態からナイーブ状態への遷移に於ける O-GlcNAc の機能-----	P41
5.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果-----	P42

6. 謝辞-----	P42
------------	-----

7. 参考文献-----	P43~
--------------	------

# 1. 結論

## 1.1. 多能性幹細胞

マウスの胚発生において、受精した日を0日目とした場合、受精後3.5日目には着床前の「胚盤胞」という発生ステージになる。この胚盤胞は大きく分けて3種類の細胞群から構成されており、それぞれ(1)内部細胞塊、(2)栄養外胚葉、(3)原始内胚葉という。このうち、将来、身体を構成する全ての組織の細胞に分化するのは「内部細胞塊」である。内部細胞塊の細胞は内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉に分化できる能力(多能性)を有しており、1981年にマウスの内部細胞塊から樹立された多能性幹細胞が「胚性幹細胞(embryonic stem cell: ES細胞)」である[1, 2]。多能性幹細胞の特徴は多能性を有していることの他に、未分化性を維持していること、自己複製能を有していること、また、増殖速度が速いこと(倍加時間は16~19時間)などが挙げられる[3]。ES細胞は、胚盤胞への移植により高効率にキメラマウスを形成する[1-3]。ES細胞を用いた研究は、発生学的にも、再生医療への応用という観点からも非常に重要である。

マウス ES細胞は、様々な転写因子により、自身の未分化性を維持している。例えば、Oct3/4、Nanog、Sox2などは、マウス ES細胞の未分化性維持に必須な転写因子である[3]。これらの未分化性維持に必須な転写因子を繊維芽細胞などの体細胞(分化細胞)で過剰発現させると、多能性を獲得し、ES細胞のような多能性幹細胞に初期化(リプログラミング)される。この細胞を「誘導型多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)」という[4, 5]。ヒトにおいてもES/iPS細胞が樹立されており、胚発生についての基礎研究や再生医療への応用研究が飛躍的に発展した[5]。

マウス ES/iPS細胞は、前述したが Oct3/4、Nanog、Sox2などの「未分化性維持転写因子」により、その状態が保たれている。これらの未分化性維持転写因子の発現は、様々なシグナルにより、その下流で制御されている[6]。主要シグナルには、leukemia inhibitory factor (LIF)シグナル、bone morphogenetic protein 4 (BMP4)シグナル、Wntシグナルがあり、それぞれのシグナルの下流で未分化性維持に寄与する転写因子の発現を調節している[3, 6-11]。一方、fibroblast growth factor 4 (FGF4)シグナルはその下流で分化促進に寄与する遺伝子の転写を促進するため、「分化促進シグナル」と言われている[12-15]。FGF4シグナルに加え、当研究室により Fasシグナルも分化促進に寄与していることが報告された[16, 17]。Fasシグナルの下流で活性化する Caspase 3は未分化維持に必須な転写因子の一つの Nanog を分解する[16, 17]。これらのシグナルと、転写因子のバランスによりマウス ES細胞の未分化・分化は複雑に制御されている。

マウス ES/iPS細胞は、培地に LIFを加えることで未分化性を維持する。培地中の LIFはマウス ES細胞の細胞膜上にある LIF受容体と結合し、その後、LIF受容体は glycoprotein 130(gp130)と結合する。gp130はその下流で janus kinase (JAK)、signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)をリン酸化し、活性化する[7]。リン酸化 Stat3は核に移行した後、Oct3/4、Nanog、Sox2といった未分化性維持転写因子の転写を促進する[7]。マウス ES/iPS細胞に

において、LIF/Stat3 シグナル経路以外にも、BMP4/ extracellular signal-regulated kinase 5 (Erk5) シグナル経路、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路なども未分化性維持転写因子の転写を促進する [3, 6, 8-11]。

一方、ヒト ES/iPS 細胞は、培地に LIF を加えても未分化性を維持せず、分化してしまう。LIF の代わりに、FGF2、または、Activin A を加えることで、ヒト ES/iPS 細胞の未分化性は維持される [3, 6-11]。ヒト ES/iPS 細胞を用いた様々な解析により、ヒト ES/iPS 細胞において、LIF シグナルは未分化性維持に関与しておらず、FGF/ Erk1/2 シグナル経路と、Activin/ mothers against dpp homolog 2 (Smad2) シグナル経路が未分化性維持に必須なシグナルであることが解明されている [3, 6-11]。このマウス ES/iPS 細胞とヒト ES/iPS 細胞のシグナル要求性の差異は、当初、マウスとヒトの動物種による違いであると考えられていた。その後、ヒト以外の哺乳類であるサル、ウサギ、ブタ、ラットなどからも ES/iPS 細胞が樹立されたが、これらすべての多能性幹細胞の未分化性に LIF/Stat3 シグナルは関与しておらず、ヒトと同じ FGF/Erk1/2 シグナル経路と、Activin /Smad2 シグナル経路が未分化性維持に必須なシグナルであった [3, 6-11]。最終的には、マウスの ES/iPS 細胞のみに LIF 要求性があることとなった。

マウスの着床前の胚から樹立されたマウス ES 細胞に対し、少し発生段階の進んだ受精後 5.5 日目の着床後の卵円筒胚のエピブラストから、多能性幹細胞であるマウスエピブラスト幹細胞 (epiblast stem cells : EpiSCs) が、2007 年に樹立された [18, 19]。また、マウス ES 細胞は、LIF を添加せずに、代わりに FGF2 と、JAK 阻害剤 (LIF シグナル阻害剤) を加え培養すると ESC-derived EpiSCs (ESD-EpiSCs) に分化することも報告された [20]。マウス EpiSCs/ESD-EpiSCs は、ヒトを含めたマウス以外の哺乳類と同じく、未分化性維持に LIF シグナルは寄与しておらず、FGF/Erk1/2 シグナル経路と、Activin /Smad2 シグナル経路が未分化性維持に必須な主要シグナルであることが明らかにされた [3, 6-11]。さらに、網羅的な遺伝子発現やエピジェネティックな制御の状態は、マウス ES/iPS 細胞とヒト ES/iPS 細胞とは全く異なっているが、マウス EpiSCs とヒト ES/iPS 細胞とは酷似していた [3, 6-11]。このことから、当初、考えられていた LIF 要求性の有無は「動物種による違い」ではなく、「多能性幹細胞の対応する発生ステージの違い」であると考えられており、現在にいたってもそのように考えられている。言い換えるならば、マウス ES/iPS 細胞より、ヒト ES/iPS 細胞の方が分化している多能性幹細胞なのである。マウス ES/iPS 細胞のように着床前の内部細胞塊に対応する多能性幹細胞を「ナイーブ状態」と言い、マウス以外のヒトを含めた着床後のエピブラストに対応する多能性幹細胞を「プライム状態」と呼ばれている (図 1)。

ナイーブ状態とプライム状態の特徴の違いは、シグナル要求性以外にも、様々ある。例えば、ナイーブ状態の多能性幹細胞は単一細胞での培養が可能であるのに対し、プライム状態では、単一細胞にすると死滅してしまう (アポトーシスが促進する) [3, 6-11]。プライム状態の多能性幹細胞の継代は、トリプシンなどを用いて単一細胞にすることができないため、コロニーを単一細胞にならない程度に小さく碎き継代するという高度な技術が求められる。また、プライム状態の多能性幹細胞は、ナイーブ状態の多能性幹細胞と比較して、増殖が遅く、遺伝子導入効率も悪い。これ

らの理由から、プライム状態のヒト ES/iPS 細胞は実験を行うにあたり「扱いにくい細胞」である。そこで、近年、ヒト ES/iPS 細胞をプライム状態からナイーブ状態へ移行させようとする研究が盛んに行われているが、報告はまだ少ない[6]。ヒト ES/iPS 細胞のナイーブ化は再生医療への応用はもちろん、発生学的観点からも大変興味深い。プライム状態の ESD-EpiSCs は、FGF2 の代わりに LIF と、Wnt シグナル促進剤 (CHIR99021, CHIR)、FGF シグナル阻害剤 (PD0325901, PD03) を加え、培養することによりナイーブ状態のマウス ES/iPS 細胞に戻ることができる (図 2) [20]。ESD-EpiSCs のナイーブ化モデルを用いて、ナイーブ化効率の促進、または、抑制因子を同定することは、ヒト ES/iPS 細胞のナイーブ化、または、なぜマウス以外の哺乳類の多能性幹細胞はプライム状態なのかという謎の解明につながることを期待できる。

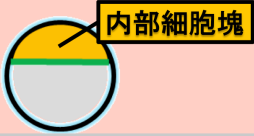

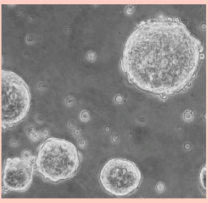
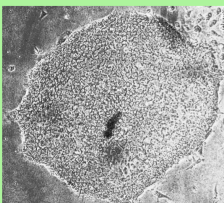
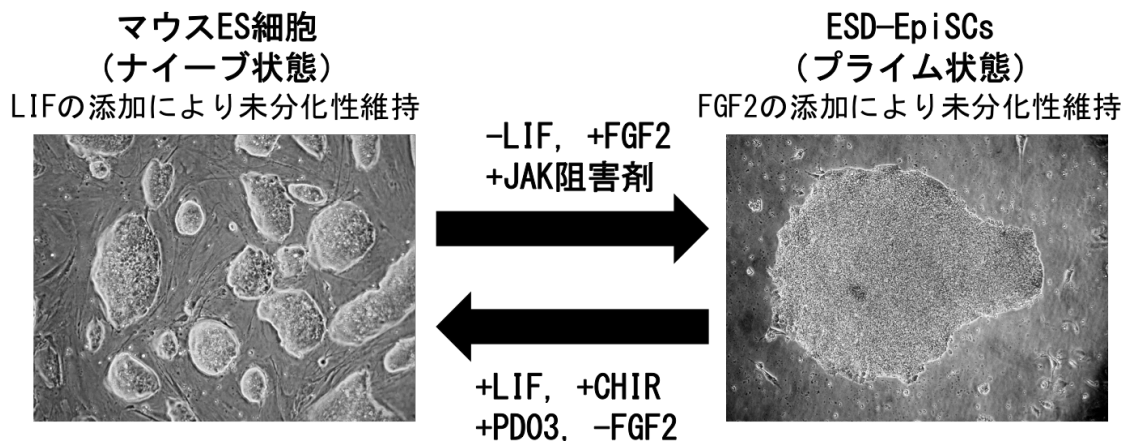
2種類の多能性幹細胞	
ナイーブ状態	プライム状態
<i>in vivo</i> の胚発生における発生段階	
着床前の胚盤胞 マウスの胚性3.5~4.5日目 	着床後のエピブラスト マウスの胚性5.5~6.5日目 
対応する多能性幹細胞	
マウスES/iPS細胞	ヒトES/iPS細胞 マウスEpiSCs ESD-EpiSCs ブタES/iPS細胞 サルES/iPS細胞
それぞれの特徴	
ドーム状のコロニー 	平坦なコロニー 
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 増殖速度：速い</li> <li>・ 単一細胞：可能</li> <li>・ 遺伝子導入効率：高い</li> <li>・ 未分化性維持に関するシグナル： LIF/Stat3、Wnt/<math>\beta</math>-catenin、 BMP4/Erk5シグナル</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 増殖速度：遅い</li> <li>・ 単一細胞：細胞死を引き起こす</li> <li>・ 遺伝子導入効率：低い</li> <li>・ 未分化性維持に関するシグナル： FGF2/Erk1/2、Activin A/Smad2シ グナル</li> </ul>

図 1：ナイーブ状態とプライム状態の多能性幹細胞における特徴

多能性幹細胞には、着床前の胚盤胞の内部細胞塊の特徴を有するもの(ナイーブ状態)と、着床後のエピブラストの特徴を有するもの(プライム状態)の2種類がある。ナイーブ状態の多能性幹細胞には、マウス ES/iPS

細胞があり、プライム状態の多能性幹細胞には、マウス EpiSCs やヒト ES/iPS 細胞、または、マウスとヒト以外の哺乳類の ES/iPS 細胞などがある。ナイーブ状態の多能性幹細胞の未分化性は、LIF/Stat3、Wnt/ $\beta$ -catenin、BMP4/Erk5 シグナルなどにより維持されている。プライム状態の多能性幹細胞の未分化性は、FGF2/Erk1/2、Activin A/Smad2 シグナルにより維持されている。シグナル以外にも、ナイーブ状態とプライム状態の違いには、コロニーの形態、増殖速度、単一細胞培養ができるか、遺伝子導入効率などがある。



**図 2 : ナイーブ状態のマウス ES 細胞とプライム状態の ESD-EpiSCs の誘導・培養法**

左の写真で示したのはナイーブ状態のマウス ES 細胞である。LIF を添加し、接着培養すると未分化性を維持する。一方、右の写真で示した ESD-EpiSCs は、FGF2 を添加し、接着培養すると未分化性を維持する。マウス ES 細胞の培地に LIF を加えずに、代わりに FGF2 と JAK 阻害剤 (LIF/Stat3 シグナル阻害剤) を添加し、培養すると ESD-EpiSCs に誘導することができる。ESD-EpiSCs の培地に FGF2、JAK 阻害剤を加えずに、代わりに LIF、Wnt シグナル促進剤 (CHIR)、FGF シグナル抑制剤 (PD03) を加え培養を行うと、一部の細胞がナイーブ状態 (ナイーブ状態のマウス ES 細胞様の細胞) に戻る。ナイーブ状態に戻ることはできなかった細胞は死ぬ。ナイーブ状態の細胞はアルカリフォスファターゼ陽性であり、プライム状態の細胞はアルカリフォスファターゼ陰性であるため、アルカリフォスファターゼ染色により陽性のコロニー数を数えることでナイーブ化効率を測定することができる。

多能性幹細胞の状態を決定する種々のシグナルは、様々なシグナル構成因子から成る。前述したが、LIF シグナルの細胞質内構成因子には Jak や Stat3、この他にも、Akt などがある [7]。Wnt シグナルの細胞質内構成因子には  $\beta$ -catenin や glycogen synthase kinase 3 (Gsk3)、BMP4 シグナルの細胞質内構成因子には Smad1/5/8 や Erk5 などがある [3, 6, 8-11]。これらの細胞質内構成因子の活性化・不活性化はリン酸化、ユビキチン化、糖鎖修飾などの様々な翻訳後修飾により制御されている [3, 6-11]。例えば、Akt はリン酸化されることで活性化され、 $\beta$ -catenin はリン酸化を受けるとユビキチン/プロテアソーム系により分解される。つまり、翻訳後修飾が各シグナルを調節し、最終的に、多能性幹細胞の未分化・分化を決定している。また、翻訳後修飾以外にも、細胞を取り巻く培地中に存在する活性酸素や活性窒素などの活性種がシグナルを制御しているという報告もある [21, 22]。

本研究では、ナイーブ状態のマウス ES 細胞、または、プライム状態の ESD-EpiSCs を用いて、(1) : 細胞質内翻訳後修飾と (2) : 細胞外の活性種に着目し、(1) では、核・細胞質内糖鎖の *O*-GlcNAc (*O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン) に着目し、「プライム状態の ESD-EpiSCs、ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞への移行における *O*-GlcNAc の機能の解明」、(2) では、「培地中の活性種がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化にあたる影響の解明」を目的とした。



さらに、(2)では、医療用プラズマ照射装置を用いて照射を行い、培地中に活性種を産生させた「プラズマ照射培地」も用いて、「プラズマ照射培地のナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化にあたる影響」も合わせて解析した。

## 1.2. O-GlcNAc の合成と機能

核・細胞質内に存在する種々のタンパク質は、セリン、スレオニン残基に、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) が1分子結合した *O*-GlcNAc 修飾を受けている。*O*-GlcNAc 転移酵素 (Ogt) は、タンパク質のセリン、スレオニン残基に、UDP-GlcNAc から GlcNAc を  $\beta$ -*O*-グリコシド結合で転移する [23, 24]。一方、*O*-GlcNAc 修飾は *O*-GlcNAc 分解酵素 (Oga) により分解される (図 3) [24]。

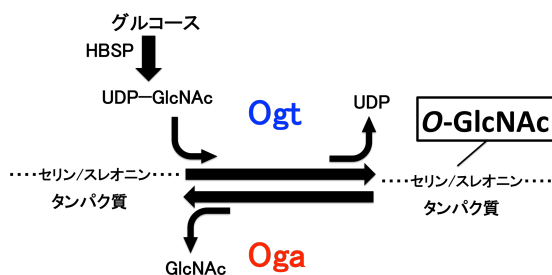


図 3 : *O*-GlcNAc 修飾

Ogt (*O*-GlcNAc 転移酵素)は、ヘキサミン合成経路 (HBSP) から生成された UDP-GlcNAc から、1分子の GlcNAc を  $\beta$ -グリコシド結合で、タンパク質のセリン・スレオニン残基の水酸基に転移する糖転移酵素である。Oga (*O*-GlcNAc 分解酵素)はタンパク質上の *O*-GlcNAc を分解する酵素である。図の絵は、David J. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2012. 16. 488-497. を参考に改変した。

Ogt には、nucleocytoplasmic Ogt (ncOgt)、mitochondrial Ogt (mOgt)、short Ogt (sOgt) の3つのアイソフォームがあり、ncOgt と sOgt は核と細胞質に局在し、mOgt はミトコンドリアに局在することが報告されている (図 4A) [25, 26]。これら3つのアイソフォームは、Ogt のN末端にある tetratricopeptide repeat (TPR) という繰り返し配列の長さによって決まる [26]。TRP 領域は、Ogt の標的タンパク質の認識に寄与すると考えられている [26]。一方、Oga には long-Oga (L-Oga) と short-Oga (S-Oga) の2つのアイソフォームがあり、どちらも核と細胞質に局在することが報告されている (図 4B) [24, 28, 29]。L-Oga はN末端に *O*-GlcNAc 分解活性領域を持っており、また、C末端にヒストンアセチル化 (histone acetyl transferase : HAT) 領域を持つ [28, 29]。S-Oga は、N末端に *O*-GlcNAc 分解活性領域を持つが、C末端に HAT 領域はなく、S-Oga の機能については不明な点が多い。

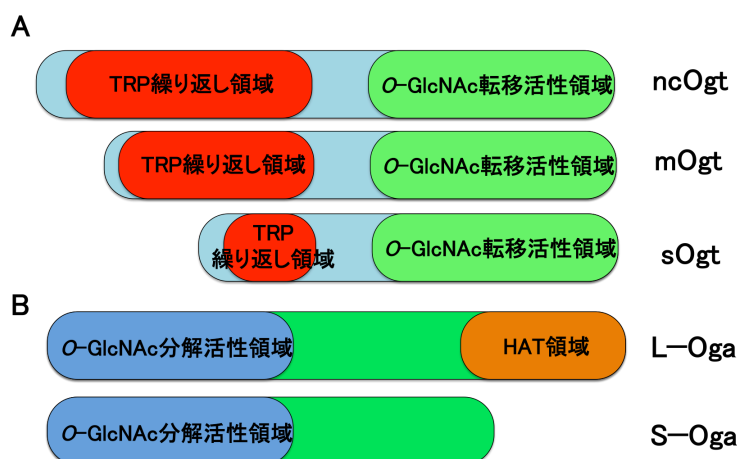


図 4 : Ogt と Oga の各アイソフォームについて

Ogt には ncOgt、mOgt、sOgt の3つのアイソフォームがあり、C末端に共通の *O*-GlcNAc 転移活性領域を持つ。3つのアイソフォームは、N末端の TRP 繰り返し領域の長さによって決まる。TRP 繰り返し領域はタンパク質の認識に関与すると考えられている。Oga には L-Oga と S-Oga の2つのアイソフォームがあり、N末端に共通の *O*-GlcNAc 分解活性領域を持つ。L-Oga のC末端にはヒストンアセチル化 (HAT) 領域を持つが、S-Oga は持っていない。図の絵は、Harwood KR, Hanover JA. *J Cell Sci*. 2014. 127. 1857-1867. を参考に改変した。

Ogt と Oga は、細胞質や核に存在する唯一の糖転移酵素、および、糖分解酵素である[24]。Ogt による O-GlcNAc 修飾は、リン酸化される箇所、または、その近傍で行われるため、「O-GlcNAc 修飾はリン酸化と競合関係にある」と考えられている[24]。また、リン酸化抑制以外にも、O-GlcNAc は、タンパク質の安定化、タンパク質の局在の決定、エピジェネティックな制御、または、転写因子の転写活性を制御していることが報告されている[24]。

O-GlcNAc はナイーブ状態のマウス ES 細胞において、様々な機能を調節していることが報告されている[29-33]。Ogt をノックアウトしたマウスが胚性致死であり、マウス ES 細胞において Ogt をノックダウンさせると細胞死を誘発することから、Ogt はナイーブ状態のマウス ES 細胞において生存に必須であることが明らかにされている[29]。Ten-eleven translocation-1 (Tet1)は、5-メチルシトシンを 5-ヒドロメチルシトシンに変換する酵素であり、この 5-ヒドロメチルシトシンは DNA の脱メチル化経路の中間体であるとされている。ナイーブ状態のマウス ES 細胞において、Tet1 は O-GlcNAc 修飾を受けており、Tet1 上の O-GlcNAc は Tet1 タンパク質の安定化に寄与し、結果としてナイーブ状態の維持に寄与していることが報告されている[30, 31]。Tet1 以外にも、未分化性維持転写因子の 1 つである Oct3/4 も、ナイーブ状態のマウス ES 細胞において、O-GlcNAc 修飾を受けている。Oct3/4 上の O-GlcNAc は、Oct3/4 の転写標的遺伝子のうち、ナイーブ状態の維持に必須な遺伝子群の転写を促進している[32]。つまり、Oct3/4 上の O-GlcNAc は、Oct3/4 の転写活性を制御し、ナイーブ状態のマウス ES 細胞を維持している。また、ナイーブ状態のマウス ES 細胞から neuroectodermal precursors (神経外胚葉前駆体) の細胞に分化する過程でプライム状態のエピプラストに対応するステージを通過する[33]。この分化系を用いた解析から、ナイーブ状態のマウス ES 細胞がプライム状態に移行する際に、Ogt 阻害剤を加えると、細胞が死滅することが明らかになっている[33]。これは、ナイーブ状態からプライム状態への移行の際に Ogt が生存に必須であることを意味する。一方、Oga 阻害剤を加えても、ナイーブ状態からプライム状態への移行には影響はない[33]。ナイーブ状態のマウス ES 細胞は接着培養、かつ、LIF を培地に添加することで未分化性を維持するが、LIF を除き、浮遊培養すると、*in vivo* の胚発生を模した胚様体 (embryoid body : EB) を形成する[35]。この EB 形成法によりマウス ES 細胞の三胚葉分化について検討することができる。ナイーブ状態のマウス ES 細胞からの EB 形成を解析した結果、EB 形成後 4 日目以降から ncOGT と O-GlcNAc の発現が減少することが分かっている[32]。また、プライム状態のヒト ES 細胞からの EB 形成を解析した結果、EB 形成を開始すると急速に ncOGT と L-OGA の発現量は減少することも明らかにされている[34]。加えて、プライム状態のヒト ES 細胞に OGA 阻害剤を加えても、生存性や未分化性に影響がないため、OGA はヒト ES 細胞においてプライム状態の維持には関与しないとされている[34]。しかし、プライム状態のマウス ESD-EpiSCs、および、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態への移行における O-GlcNAc の機能については不明であった。

本研究は、「プライム状態の ESD-EpiSCs における O-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞へ戻す際の O-GlcNAc の機能の解明」を第一の目的とした。

### 1.3. 活性種とプラズマ照射

前述した *O*-GlcNAc は核・細胞質内における翻訳後修飾の 1 つであるが、細胞内環境以外にも細胞外からのある種の刺激・ストレスによりシグナルが制御されているという報告がある [21, 22]。したがって、シグナル制御機構の解明のためには、細胞内における制御機構の解明と合わせて、細胞外因子によるシグナル制御機構を解明することも重要である。近年、細胞外からの刺激・ストレス因子として、培養液中に存在する過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素種が注目されている。分子機構については不明な点が多いが、外部からの酸化ストレスにより、シグナルが制御されているということが報告されている [21, 22]。これらの活性種によるシグナル制御は、総称して「レドックスシグナル」と呼ばれている。造血幹細胞 [36] や、成体心筋幹細胞 [37] において、細胞質内の低濃度の活性酸素の 1 種である  $H_2O_2$  が未分化性維持に寄与し、一方、細胞質内の高濃度の  $H_2O_2$  は分化に寄与することが報告されている。また、近年、 $H_2O_2$  などの活性酸素種 (ROS) は、様々な組織幹細胞の老化において重要な因子の 1 つとして注目されている [38-40]。様々な組織には、恒常性を保つためにその組織に特異的に分化する能力と、自己複製能を有している組織幹細胞がある。造血幹細胞や間葉系幹細胞がそれにあたる。これらの組織幹細胞は老化するにつれ細胞内に ROS が蓄積し、最終的にアポトーシスや細胞周期の停止、分化異常、悪性腫瘍化などにつながることを報告されている [38-40]。例えば、ヒトの造血幹細胞は加齢に伴い、細胞内に ROS が蓄積し、その結果、増殖異常、悪性腫瘍化、自己複製能の抑制、アポトーシスなどが引き起こされる [40]。組織幹細胞の老化における ROS の機能については不明な点が多いが、ROS の機能を解析することで、不可逆的と言われてきた幹細胞老化を若返らせることが期待されている。活性種によるシグナル制御に関しては、ナイーブ状態のマウス ES 細胞において、ROS が分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼシグナルの構成因子である、Erk1/2、Jun-N-terminal kinase (Jnk)、p38 を活性化することが報告されている [21, 22]。しかし、培地中の活性種がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に与える影響、または、分化を制御するシグナルへの影響については不明であった。

本研究は、「ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果」を、シグナルとの関連も含め明らかにすることを第二の目的とした。

溶液中に様々な活性種を作り出す方法の 1 つに、ガスプラズマ照射処理がある [41]。ガスプラズマ照射は怪我や病気の治療の道具として、実際に使用されている [41, 42]。プラズマ医療に用いられている装置の 1 つに低温 atmospheric-pressure plasma (APP) 装置がある (図 5) [42]。



### 図 5：プラズマ照射装置とプラズマ照射時の様子

左の写真で示したのは、低温 APP 装置からプラズマが放出している様子である。今回、大阪大学の浜口先生から貸与していただいた低温 APP 装置を用いた。右の写真は、実際にプレートの各 well に加えた細胞培養用培地にプラズマを照射している様子である。

医療における低温 APP 照射の効果には、組織殺菌[42]、血液凝固（止血効果）[43]、血管新生[44]、創傷治癒[45]、腫瘍の除去[46]などがある。プラズマ照射を培地や水などの液体中に行うと、その液体中に、様々な活性種が生成されることが報告されている[47]。活性酸素種（ROS）や活性窒素種（RNS）がそれにあたる[47]。プラズマ照射により生成される主要な ROS に  $H_2O_2$  がある[47]。本研究では、「 $H_2O_2$  を添加した培地」と、実際に医療の現場で用いられている低温 APP 装置を使い、培地中に活性種を生成させた「プラズマ照射培地」の 2 種類を用い、培地中の活性種がナীব状態のマウス ES 細胞からの分化に与える影響を EB 形成法で解析した。「 $H_2O_2$  を添加した培地」と「プラズマ照射培地」で共通の影響が出た場合は、培地中の  $H_2O_2$  による影響であり、「プラズマ照射培地」による影響が、「 $H_2O_2$  を添加した培地」では認められなかった場合は、培地中の  $H_2O_2$  以外の活性種による影響である。

本研究による成果は、活性種による分化に関わるシグナルへの影響の解明だけでなく、プラズマ照射装置が創傷治癒などのツールだけでなく、再生医療にも応用できることを強く示唆するものである。また、幹細胞老化においても、本研究と同様のシグナル経路が促進・抑制されている可能性が示唆するものである。

## 2. 材料と方法

### 2.1. 実験に使用した各種阻害剤

本研究は、Ogt 阻害剤 (Ogti) : Phenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylate (TimTec) [48]、Oga 阻害剤 (Ogai) : PUGNAc (Sigma) [49]、Mek 阻害剤 (FGF シグナル阻害剤) : PD0325901 (Wako)、GSK3 阻害剤 (Wnt シグナル促進剤) : CHIR99021 (Wako) を用いた。これら全ての阻害剤は、dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma) を溶媒として希釈してから実験に用いた。阻害剤を用いた実験におけるコントロールは、使用する阻害剤の量に合わせ、DMSO を培地に添加したものをを用いた。

### 2.2. 細胞培養

#### 2.2.1. マウス ES 細胞の維持

本研究では、R1 マウス ES 細胞株を用いた [50]。マウス ES 細胞は、10  $\mu$ g/ml mitomycin C (Sigma) で不活化したマウスの繊維芽細胞 (MEFs) 上で培養・維持した。ナイーブ状態を維持するために以下の「マウス ES 細胞用培地」を用いた。基本培地の DMEM (Gibco) に、15% fetal bovine serum (Hyclone Laboratories)、1% penicillin/streptomycin (Gibco)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Gibco)、0.1 mM nonessential amino acids (Gibco)、1,000 U/ml LIF (Chemicon International) を添加した。培地は毎日、新鮮なものに交換し、1 日置きにトリプシンを用いて継代を行った。

#### 2.2.2. Ogt ノックダウン解析

Ogt のノックダウン (KD) を行うために、Ogt を標的とした small hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを作製した。また、enhanced green fluorescent protein (EGFP) を標的とした small hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターをネガティブコントロールとして用いた。KD ベクターは、pSilencer 3.1-H1 (Ambion) を用いた。RNA 干渉に用いた配列は siDirect (<http://sidirect.jp/esd/modules/modsiperfect/>) により設計した。本研究に用いた KD 配列を以下に示す。

EGFP : 5' -GATCCCGCCACAACGTCTATATCATGGGAAAATCCATGATATAGACGTTGTGGCTTTTTTGGAAA-3'、

Ogt KD 1 : 5' -GATCCCCTGTATCGCAAAGCATTAGAGCTTCCTGTCACTCTAATGCTTTGCGATACAGGTTTTTTA-3'、

Ogt KD 2 : 5' -GATCCCGTTGCAGACGGATGATATATAGCTTCCTGTCACTATATATCATCCGTCTGCAACTTTTTTA-3'。

Ogt KD 1 は Ogt の coding region で設計し、Ogt KD 2 は Ogt の 3' untranslated region (3' UTR) で設計した。トランスフェクションの前日に、1  $\times$  10<sup>6</sup> 個のマウス ES 細胞を、MEFs を用いず、ゼラチンコートをした 60-mm tissue culture dishes に、マウス ES 細胞用培地 (LIF 含有) を用いて播種した。翌日、4  $\mu$ g の Ogt を標的とした shRNA 発現ベクター (Ogt KD 1 と Ogt KD 2) と EGFP を標的とした shRNA 発現ベクターを、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、ES 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションを行った翌日、2  $\mu$ g/ml ピューロマイシン (Sigma)

を培地に加え、24 時間、薬剤選択を行った。研究に用いた pSilencer 3.1-H1 はピューロマイシン耐性遺伝子発現カセットが導入されているため、ピューロマイシンを加えると、ベクターが導入された細胞だけが生き残り、ベクターの入っていない細胞は 24 時間で死滅する。トランスフェクション後 4 日目の *Ogt* KD 細胞を回収し、実験に用いた。

### 2.2.3. プライム状態の ESD-EpiSCs への誘導と ESD-EpiSCs の維持

ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs へ分化誘導させるために、「ESD-EpiSC 培地」を用いた。基本培地の DMEM/F12 (Gibco) に、20% knockout serum replacement (Gibco)、2 mM L-glutamine (Invitrogen)、1 % penicillin/streptomycin (Gibco)、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Gibco)、0.1 mM nonessential amino acids (Gibco)、15 ng/ml fibroblast growth factor 2 (FGF2) (Wako) を添加した。ESD-EpiSCs を用いた他の論文では、ESD-EpiSCs の誘導に Activin A を用いる場合があるが、ESD-EpiSCs 誘導時に Activin A を添加しても、添加しなくても ESD-EpiSCs の誘導効率や未分化性に影響はなかった。不活性化した MEFs を播種した翌日に、60-mm tissue culture dishes に  $2 \times 10^5$  個のナイーブ状態のマウス ES 細胞を MEFs 上に播種した。この時、用いる培地は ESD-EpiSC 培地に 0.6  $\mu$ M JAK inhibitor 1 (Santa Cruz Biotechnology) を加えたものを使用する。JAK は LIF シグナル構成因子の 1 つであり、LIF/Stat3 シグナル経路の活性化に必須な因子であるため、JAK inhibitor 1 は LIF/Stat3 シグナル阻害剤である。LIF/Stat3 シグナル経路はナイーブ状態の維持、または、そこからの分化の抑制に寄与しているため、プライム状態の ESD-EpiSCs 誘導時に JAK inhibitor 1 を加えることで、ESD-EpiSCs 誘導効率が増加することができると考えられる。JAK inhibitor 1 を加える期間は、ESD-EpiSCs 誘導を開始してから 4~5 日間のみが良く、それ以上の期間加えると、死細胞が顕著に増加する。ESD-EpiSCs 誘導において、ESD-EpiSC 培地は毎日、新鮮なものに交換した。また、毎 5~7 日置きに、コロニーピックアップをし、単一細胞にならない程度にコロニーを小さく碎き、継代した。

### 2.2.4. ESD-EpiSCs における *Ogt* と *Oga* の機能解析

プライム状態の ESD-EpiSCs における *Ogt* と *Oga* の機能を解析するために、*Ogti* と *Ogai* を用いた。MEFs への影響を除外するために、MEFs の無い状態で培養した ESD-EpiSCs に各阻害剤を加えた。加えた各阻害剤の濃度は、140  $\mu$ M *Ogti* と 200  $\mu$ M *Ogai* である。MEFs の無い状態でプライム状態の ESD-EpiSCs を維持するために、「コンディショニング培地」に、15 ng/ml FGF2 を添加したものをを用いた。MEFs を播種してある 60-mm tissue culture dishes に、ESD-EpiSC 培地を添加し 24 時間培養した後、培地のみを回収し、浮遊した MEFs を除去するために、1,753 g で 10 分間遠心を行った後の上澄みを「コンディショニング培地」とした。阻害剤による影響で死細胞が培地中で浮遊している場合は、培養上清を回収し、0.3 % Trypan blue solution により死細胞を染色し、Burker-Turk blood cell counter を用いて染色陽性の細胞を数えた。

### 2.2.5. プライム状態の ESD-EpiSCs からのナイーブ状態のマウス ES 細胞への移行

プライム状態の ESD-EpiSCs は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞様の細胞 (reverted ESCs : rESCs) に戻すことができる。プライム状態の ESD-EpiSCs を、コロニーピックアップした後に、単一細胞にならないように注意しながら細かく碎き、それらを、不活性化した MEFs をあらかじめ播種しておいた 60-mm tissue culture dishes に播種した。この時、マウス ES 細胞用培地 (LIF 含有) に、 $1 \mu\text{M}$  PD0325901 (FGF シグナル阻害剤)、 $3 \mu\text{M}$  CHIR99021 (Wnt シグナル促進剤)、または、 $140 \mu\text{M}$  Ogti か  $200 \mu\text{M}$  Ogai を加えた。6 日後、MEFs 上の細胞を、アルカリフォスファターゼ活性があるものを選択的に染色する 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate-nitro blue tetrazolium chloride (Nacalai Tesque) で染色した。ナイーブ状態のマウス ES 細胞はアルカリフォスファターゼ活性を有しており、アルカリフォスファターゼ染色を行うと青紫色に染まる。一方、プライム状態の ESD-EpiSCs はアルカリフォスファターゼ活性が無いため、アルカリフォスファターゼ染色では染まらない。このため、rESCs におけるアルカリフォスファターゼ染色陽性のコロニーを数えると、ナイーブ化効率を算出することができる。

### 2.2.6. マウス ES 細胞からの胚様体形成

胚様体 (embryoid body: EB) 形成を行うために、ナイーブ状態の  $3.0 \times 10^5$  個のマウス ES 細胞を 3.5-mm Low Cell Binding dishes (Sumitomo Bakelite Co.) に播種した。EB 形成には、LIF 非含有のマウス ES 細胞用培地、血清を加えたプラズマ照射培地 (LIF 非含有)、血清を加えた  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加培地 (LIF 非含有) を用いた。「プラズマ照射培地」と「 $\text{H}_2\text{O}_2$  添加培地」の詳細については後の項目に記載した。培地は 1 日置きに新鮮なものと交換した。EB 形成は開始した日を 0 日目とし、12 日間行った。12 日間使用する培地は、全て、EB 形成を始めた日 (0 日目) にまとめて作製しておき、固く密閉した後に  $4^\circ\text{C}$  で保存した。

### 2.2.7. マウス ES 細胞の増殖能の検討

$0.2\%$  ゼラチンをあらかじめコートした 96-well plate の 1 well あたりに  $0.8 \times 10^4$  個のマウス ES 細胞を播種した。マウス ES 細胞用培地を用い、培地は 1 日置きに新鮮なものと交換した。播種した時を 0 時間とし、0 時間、24 時間、48 時間後の細胞を回収した。回収する際、培地をアスピレーターで吸い取り (ここで浮遊している死細胞を取り除かれる)、PBS で 1 度洗った後、トリプシンを用いて回収した。回収した細胞は遠心後、 $0.3\%$  Trypan blue solution により染色し、Burker-Turk blood cell counter を用いて細胞数を数えた。染色されない細胞を「生細胞 (Viable cells)」とした。

## 2.3. プラズマ装置 (低温 APP 装置)

本研究には、大阪大学の浜口先生から貸与していただいた低温 APP 装置を用いた。この低温 APP 装置は、石英管中でヘリウムガスに高電圧をかけ、空気中に放電する装置である。ヘリウ

ムガスは2 L/minで流入した。プラズマビーム発射口と24-wellプレートとの距離は、5.5 mmである。

#### 2.4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地とプラズマ照射培地の調整

プラズマ照射培地と、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地は作成後、直ちに密閉し、使用するまで4°Cに保存した。プラズマ照射培地は以下の手順に従って作成した。(1)1 mlのLIF非含有、かつ、血清非含有の Maus ES 細胞用培地を24-well plateの各1 wellに入れる。(2)低温APP装置を用いてプラズマ照射を60秒間行う。(3)プラズマ照射後、直ちにマイクロチューブに培地を移し、密閉し、4°Cにて保存する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地は以下の手順に従って作成した。(1)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(Kanto Chemical Co.)を、LIF非含有、かつ、血清非含有の Maus ES 細胞用培地に加える。(2)直ちにマイクロチューブに培地を移し、密閉し、4°Cにて保存する。プラズマ照射を60秒間行った時に生成されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度が約45 μMであるため、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の最終濃度は45 μMになるように調整する。なお、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度測定法については後の項目に記載する。今回用いたプラズマ照射培地とH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加培地のpHは、プラズマ照射を行っていない、もしくは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加していない培地と変わらなかったため、これらの培地による効果はpHに依存しない効果である(図6)。

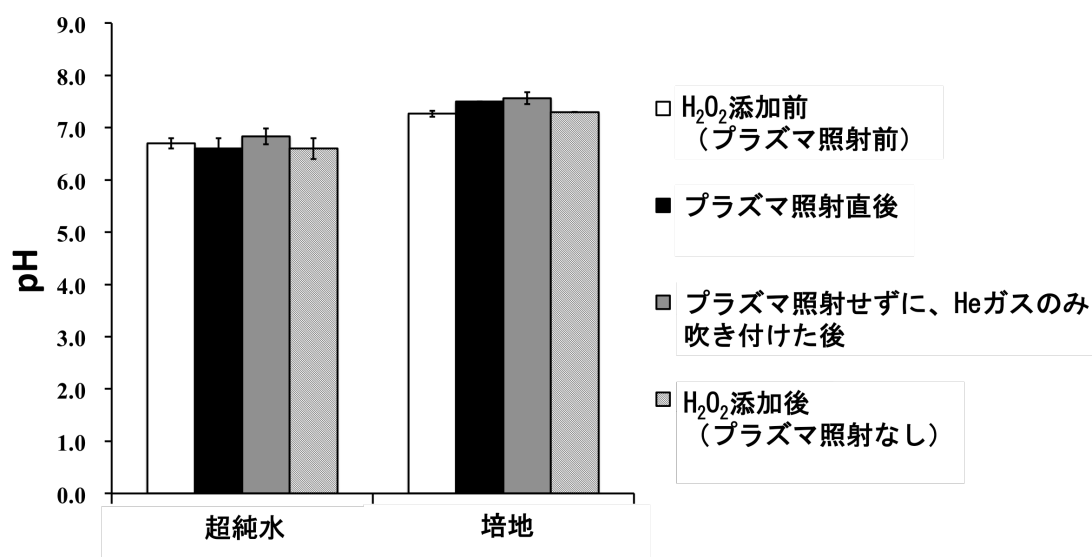


図6：プラズマ照射・H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加による超純水と培地のpHの検討

以下の4つの条件における、超純水と培地のpHを測定した結果を示す。条件1：プラズマ照射、または、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を添加する前、条件2：プラズマ照射を行った直後、条件3：プラズマ照射をせずに、(放電をせずに、) Heガスのみを吹き付けた直後、条件4：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>添加直後(プラズマ照射なし)。プラズマ照射、または、Heガスのみを吹き付けは60秒間行った。添加したH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の濃度は45 μMである。グラフの値は、試行回数3回分の平均値である。エラーバーは標準偏差を示す。いずれの条件においても、pHは変化しなかった。

#### 2.5. プラズマ照射超純水中の過酸化水素濃度の測定

超純水(Wako)にプラズマ照射を15秒、または、60秒間行い、4°Cで12日間、密閉保存した。プラズマ照射を行った日を0日目とし、0日目と12日目におけるプラズマ照射超純水中のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>濃度を



測定した。測定には、hydrogen peroxide fluorometric detection kit (Enzo Life Sciences) と、spectrofluorophotometer RF-5300PC (Shimadzu) を用いた。

## 2.6. ウェスタンブロット法によるタンパク質の解析

各細胞は可溶化液を用いて可溶化した。可溶化液の組成は、50 mM Tris-HCl pH 7.4、150 mM NaCl、1 % Triton X-100、5 mM EDTA、1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、10 mM NaF、各種プロテアーゼ阻害剤である。ブラッドフォード法によりタンパク量を測定した後に、10 μg の各サンプルを 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、フッ化ポリビニリデン (PVDF) メンブレン (Millipore) に転写させた。bovine serum albumin (Iwai Chemicals Company) を用いてブロッキングした後に、メンブレンに一次抗体を加え 4°C で 16 時間反応させた。用いた一次抗体は、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2; Abcam)、抗 Ogt 抗体 (H-300; Santa Cruz Biotechnology)、抗 Oga 抗体 (SAB4200267; Sigma)、抗 Lamin B1 抗体 (Zymed Laboratories Inc.)、抗 Erk1/2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗リン酸化-Erk1/2 (p-Erk1/2、Cell Signaling Technology)、抗 α-tubulin 抗体 (Invitrogen)、抗 cleaved-caspase 3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 β-actin 抗体 (Sigma) である。本研究に用いた抗 Ogt 抗体 (H-300) は、ncOgt を特異的に認識する抗体であり、抗 Oga 抗体 (SAB4200267) は、L-Oga と S-Oga を認識する抗体である。一次抗体反応後、洗浄を行い、その後、HRP-linked anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)、または、HRP-linked anti-mouse IgG (Cell Signaling Technology) を二次抗体として用いて、室温で 1 時間反応させた。二次抗体反応後、洗浄を行い、ECL Plus reagents (GE Healthcare) を用いて検出した。

## 2.7. リアルタイム PCR 解析

TRIzol® Reagent (Invitrogen) を用いて細胞から全 RNA を抽出し、oligo-dT primer (Invitrogen) と、Superscript II First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて逆転写を行った。リアルタイム PCR 解析は、ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて行った。リアルタイム PCR 解析にはサイバーグリーンの系を用いた。各 mRNA の発現は、ハウスキーピング遺伝子である β-actin、または、Gapdh mRNA の発現量で補正を行った。リアルタイム PCR 解析に用いたプラーマーセットは表 1 に示す。

## 2.8. 免疫染色

ポリエルリジンコートガラス (Iwaki) 上で培養した各種細胞は、4% paraformaldehyde (Wako) で固定した後に、洗浄し、PBS に 5% bovine serum albumin (Iwai Chemicals Company)、0.1% Triton X-100、1% normal goat serum (Wako) を溶かしたブロッキング液でブロッキングを行った。免疫染色には、抗 Ogt 抗体 (H-300) と抗 Oga 抗体 (SAB4200267) を一次抗体として使用した。Goat Alexa

Fluor 488-conjugated anti-rabbit IgG (Molecular Probes)は二次抗体として使用した。核は Hoechst dye (Invitrogen)を用いて染色した。免疫染色の観察は、LSM 700 confocal laser microscope (Carl Zeiss)を用いた。

## 2.9. 核画分と細胞質画分の調整

細胞を 160  $\mu$ l のバッファーA (10 mM HEPES pH 7.4、2 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、10 mM KCl、1 mM dithiothreitol、各種プロテアーゼ阻害剤)を用いてよく懸濁し、15 分間氷上で静置した後に、16  $\mu$ l の 10 % Nonidet P-40 を加えて、ボルテックスにより 10 秒間、懸濁した。5 分間氷上で静置した後、1,205 g で 30 秒間遠心を行った。遠心後の上清を「細胞質画分(cytosolic fraction)」として回収した。また、核画分を含んだペレットは PBS で洗浄した後にバッファーB (25 mM HEPES pH 7.4、500 mM NaCl、1 mM dithiothreitol、10 % glycerol、0.2 % Nonidet P-40、5 mM MgCl<sub>2</sub>)を用いて可溶化した。これを「核画分 (Nuclear fraction)」とした。

## 2.10. 統計解析

本研究における統計的有意性は t 検定を用いて評価した。

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Ogt</i>	5'- GAAAGAGGCACGCATTTTTGA -3'	5'- ACCACCGCATGATTTGGG -3'
<i>Nanog</i>	5'- CAGAAAAACCAAGTGGTTGAAGACTAG -3'	5'- GCAATGGATGCTGGGATACTC -3'
<i>Oct3/4</i>	5'- CTCACCCTGGGCGTTCTCT -3'	5'- AGGCCTCGAAGCGACAGA -3'
<i>Sox2</i>	5'- GTGGAAACTTTTGTCCGAGACC -3'	5'- CGCAGCCGTTGGC -3'
<i>Tbx3</i>	5'- AGGAGCGTGCTGTCAAGTT -3'	5'- GCCATTACCTCCCAATTTT -3'
<i>Gata6</i>	5'- CCCCTCATCAAGCCACAGAA -3'	5'- GTGACAGTTGGCACAGGACAGT -3'
<i>Dusp9</i>	5'- AGCTGCGGGAAGAAGGCT -3'	5'- GACACTCGGCCTGGAAGTTG -3'
<i>Fgf5</i>	5'- GCAGCCACGGGTCAA -3'	5'- CGGTTGCTCGGACTGCTT -3'
<i>Otx2</i>	5'- CATGATGTCTTATCTAAAGCAACCG -3'	5'- GTCGAGCTGTGCCCTAGTA -3'
<i>Spry2</i>	5'- GGTCTCGGAGCAGTACAAGG -3'	5'- GTAGGCATGCAGACCAAAT -3'
<i>Dusp6</i>	5'- CGAGTCGTCACACATCGAAT -3'	5'- TCGCTGCTATTCTCGTCGTA -3'
<i>Fgf4</i>	5'- CGGCTCTACTGCAACGTG -3'	5'- CGGAGAGAGCTCCAGAAGAC -3'
<i>Fgfr2</i>	5'- CCCGGCCCTCCTCA -3'	5'- GTTGGGAGATTTGGTATTTGGTT -3'
<i>T</i>	5'- TGCTGCAGTCCCATGATAACTG -3'	5'- ATGACTCACAGGCAGCATGCT -3'
<i>Mixl1</i>	5'- GCACGTCGTTCCAGCTCGGAGCAGC -3'	5'- AGTCATGCTGGGATCCGGAACGTGG -3'
<i>Foxa2</i>	5'- AGCCGTGAAGATGGAAGGG -3'	5'- CTCCGCGTAGTAGCTGTCC -3'
<i>Gata6</i>	5'- CCCCTCATCAAGCCACAGAA -3'	5'- GTGACAGTTGGCACAGGACAGT -3'
<i><math>\beta</math>-actin</i>	5'- GCTCTGGCTCCTAGCACCAT -3'	5'- GCCACCGATCCACACAGAGT -3'
<i>Axin2</i>	5'- GGGAGCAGTTTTGTGGCAGCA -3'	5'- AGGGTCTGGGTAAATGGGTGAG -3'
<i>CcnD1</i>	5'- GCTACCGCACACGCACTT -3'	5'- GCAGGCACGGAGGCAG -3'
<i>Wnt3a</i>	5'- CTGCCATGAACCGTCACAAC -3'	5'- CATTGCACTTGAGGTGCATGT -3'
<i>Lrp5</i>	5'- GTGCTTCACTACACGCTGG -3'	5'- TAGGACAAGGTCCGGGCTG -3'
<i>Lrp6</i>	5'- GCAAGCTCTTCTGGGCTGACT -3'	5'- AACACGGTCAGGCCACA -3'
<i>Fzd1</i>	5'- AACTTTGTGCCGAAGCACTC -3'	5'- GGTCTGGTTGTACGGCATGT -3'
<i>Fzd5</i>	5'- GGCATCTTCAACCTGCTCTA -3'	5'- TTCCTCTCCAAGCCACTCTG -3'
<i>Pax6</i>	5'- AACCTGCTAGCGAAAAGCA -3'	5'- CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA -3'
<i>Nestin</i>	5'- TGACAGACCTGGAAGAAGTTC -3'	5'- CCCAAGGAAATGCAGCTTCA -3'
<i>Tubb3</i>	5'- ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG -3'	5'- ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG -3'
<i>GFAP</i>	5'- AGATGAAACCACTGAGGCTG -3'	5'- CCTTCTCTCCAATCCACACG -3'
<i>Oig1</i>	5'- ATAGGTAGCAAGGCACGTCGTAG -3'	5'- TCGCCCAACTCCGCTTACT -3'

表 1:リアルタイム PCR 解析に用いたプライマーセット一覧

### 3. 結果

#### 3.1. プライム状態、および、プライム状態からナイーブ状態への遷移における O-GlcNAc の機能

##### 3.1.1. ナイーブ状態のマウス ES 細胞における *Ogt* の機能

ナイーブ状態のマウス ES 細胞における O-GlcNAc の機能を検討するために、*Ogt* を標的に、RNAi 法を用いてノックダウン (KD) し、O-GlcNAc を減少させた。オフターゲット効果による影響でないことを確認するために、*Ogt* KD 解析には、異なる 2 つの配列に対する siRNA 発現ベクターを用いた (以降、*Ogt* KD 細胞 1 と *Ogt* KD 細胞 2 と呼ぶ)。各 siRNA 発現ベクターを形質導入してから、4 日後に回収した各種細胞を用いて、リアルタイム PCR 解析と、ウェスタンブロット解析により KD 効率を検討した。*Ogt* KD 細胞 1 と *Ogt* KD 細胞 2 における *Ogt* の mRNA の発現は、それぞれ約 20% と約 5% であった (図 7A)。O-GlcNAc 修飾されたタンパク質の発現は、KD 効率に比例して減少した (図 7B)。ナイーブ状態の多能性幹細胞の特徴の 1 つにコロニーの形態がある。ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、ドーム状に隆起したコロニーである。ナイーブ状態から分化すると、コロニーの形態はドーム状ではなくなり、平坦になる。*Ogt* KD 細胞のコロニーの形態は、コントロールとは違い、ドーム状ではなく、平坦なコロニーであり、培地に LIF を添加しているにも関わらず、*Ogt* KD 細胞がナイーブ状態を脱し、分化したと考えられた (図 7C)。実際に、*Ogt* KD 細胞がナイーブ状態を維持しているかどうか検討するために、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行った。ナイーブ状態の多能性幹細胞は ALP 活性を有しているため、ALP 染色陽性細胞は未分化性を維持している細胞である。そのため、ALP 染色はナイーブ状態かどうかを検討するための簡便な方法である。ALP 染色の結果、*Ogt* KD 細胞における ALP 陽性コロニー数は顕著に減少した (図 7D)。さらに、*Ogt* KD 細胞における、ナイーブ状態の未分化性維持転写因子である *Nanog* と *Sox2* の mRNA、および、タンパク質の発現が、コントロールに比べて有意に減少した (図 7E、F)。以上の事実より、ナイーブ状態のマウス ES 細胞で O-GlcNAc を減少させると、未分化性を維持できずに分化することが明らかになった。

次に、ナイーブ状態のマウス ES 細胞から EB を形成し、分化に伴う *Ogt* の発現の変化を、リアルタイム PCR 解析により検討した。遺伝子発現は、検量線を用いた絶対定量で定量解析した。解析の結果、*Ogt* の発現は EB 分化に伴い減少した (図 7G)。次に、マウス ES 細胞の EB 分化に伴う O-GlcNAc の発現を抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2) を用いたウェスタンブロット解析により検討した。解析の結果、O-GlcNAc の発現は、EB 分化に伴い減少した (図 7H)。この EB 分化に伴う O-GlcNAc の減少は、*Ogt* の減少による影響である。

以上の事実より、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の維持に *Ogt* による O-GlcNAc 修飾が必須であり、分化に伴い、*Ogt* と O-GlcNAc が減少することが明らかになった。

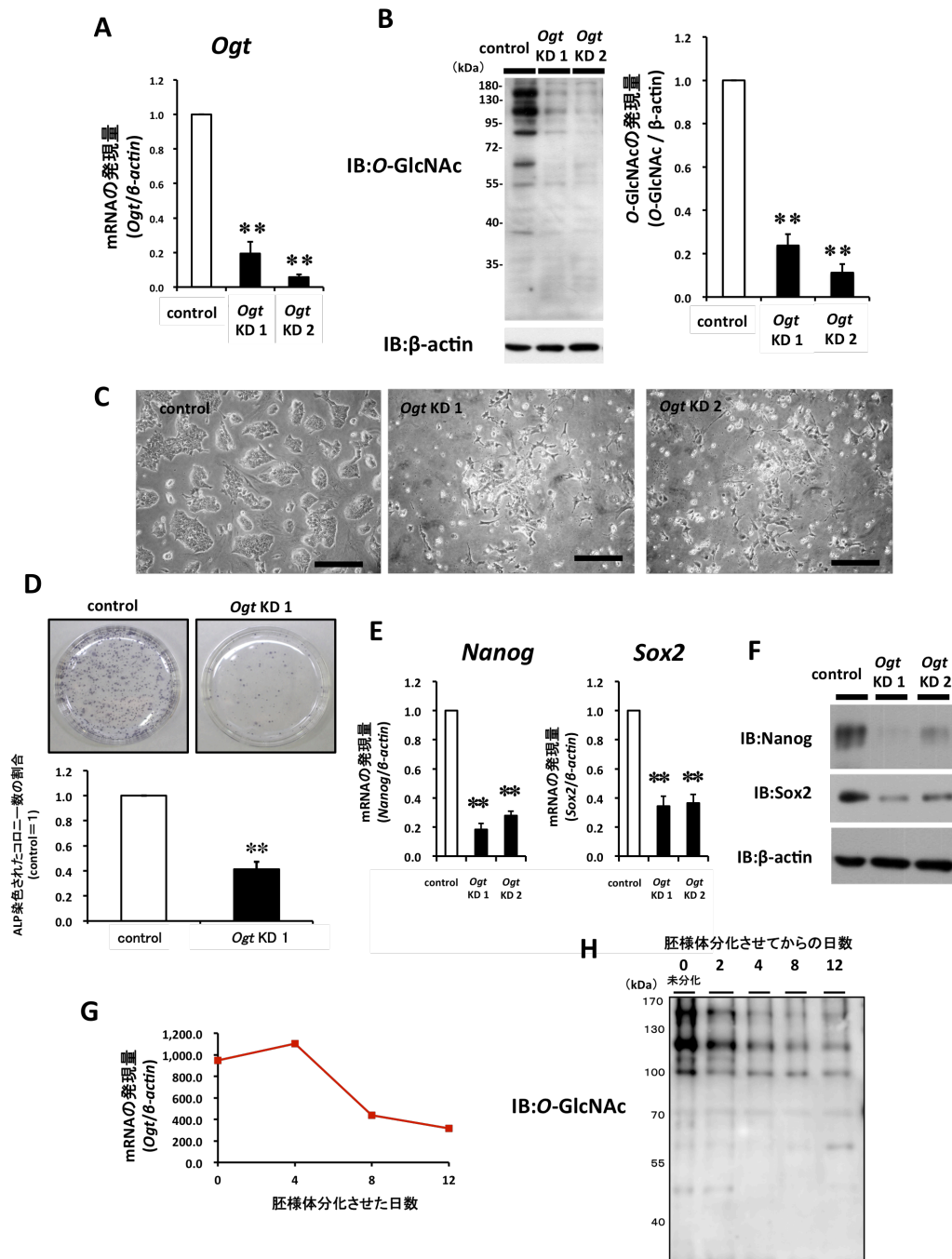


図7: ナイーブ状態のマウス ES 細胞において *Ogt* は未分化性の維持に必要な因子である

A: *Ogt* を標的とした shRNA 発現ベクター (*Ogt* KD 1 と *Ogt* KD 2) をトランスフェクションしてから4日後の *Ogt* knockdown (KD) 細胞のリアルタイム PCR 解析の結果を示す。示した *Ogt*/ $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を1とした場合の相対値である。B: *Ogt* KD 細胞と、抗 *O-GlcNAc* 抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果を示す。右のグラフで示した *O-GlcNAc*/ $\beta$ -actin のバンド強度の値は、Control を1とした場合の相対値である。C: Control (左)、*Ogt* KD 1 (中央)、*Ogt* KD 2 (右) の細胞の様子を示す。スケールバーは200  $\mu$ m を示す。D: Control と *Ogt* KD 1 のアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色の結果を示す。上段の写真はALP染色後の様子を示し、下段のグラフはALP陽性のコロニー数/全コロニー数の値を示す。E: *Ogt* KD 細胞における未分化性維持因子 (*Nanog*, *Sox2*) の mRNA の発現解析の結果を示す。示した *Nanog*/ $\beta$ -actin, *Sox2*/ $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を1とした場合の相対値である。F: *Ogt* KD 細胞における未分化性維持因子 (*Nanog*, *Sox2*) のタンパク質の発現解析の結果を示す。G: ナイーブ状態のマウス ES 細胞から胚様体 (EB) 分化させ、その分化過程における *Ogt* の mRNA の発現を検討した結果を示す。胚様体は、胚様体分化を開始した日を0日目とし、4日目、8日目、12日目に回収した。H: 胚様体分化における *O-GlcNAc* の発現解析の結果を示す。

全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真、または、ウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 、\*\*,  $P < 0.01$ 。

略語説明: IB, イムノブロット (ウェスタンブロット); KD, knockdown; Ogt, *O*-GlcNAc 転移酵素。

### 3.1.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への誘導

次に、ナイーブ状態からプライム状態への遷移における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の発現を検討するために、ナイーブ状態のマウス ES 細胞をプライム状態の ESD-EpiSCs に誘導した。ナイーブ状態のマウス ES 細胞は、LIF を添加せずに、代わりに 15ng/ml FGF2 と、 $0.6 \mu\text{M}$  JAK 阻害剤 (LIF シグナル阻害剤) を加えて培養するとプライム状態の ESD-EpiSCs に分化する。JAK 阻害剤はプライム状態の ESD-EpiSCs への分化を促進する。プライム状態の ESD-EpiSCs は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞に比べて平らなコロニーである (図 8A)。誘導後の ESD-EpiSCs におけるプライム状態のマーカ遺伝子とナイーブ状態のマーカ遺伝子の発現をリアルタイム PCR 解析により検討した (図 8B)。ESD-EpiSCs において、プライム状態のマーカ遺伝子である *Fgf5* の発現はマウス ES 細胞と比べて有意に高く、ナイーブ状態のマーカ遺伝子である *Klf4* の発現は有意に低かった。ナイーブ状態・プライム状態において *Oct3/4* は共通の未分化性維持に必須な転写因子であるため、両状態で発現量の変化はなかった。*Fgf5* の発現量は、ESD-EpiSCs への誘導を開始してから 3 回目の継代後の ESD-EpiSCs においてピークに達し、その後は少し減少するも高発現の状態を少なくとも 10 継代目まで維持していた。*Klf4* の発現量も、*Fgf5* 同様に、少なくとも 10 継代目まで減少したままの状態を維持していた。以降、3 継代目の ESD-EpiSCs を実験に用いた。プライム状態の ESD-EpiSCs において Erk1/2 は培地中の FGF2 により、リン酸化 (活性化) される。リン酸化 Erk1/2 は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞では分化を促進するが、プライム状態の ESD-EpiSCs では未分化性を維持している。誘導した ESD-EpiSCs において、リン酸化 Erk1/2 の発現量はナイーブ状態のマウス ES 細胞と比べて顕著に高かった (図 8C)。以上の事実より、今回誘導した ESD-EpiSCs は、ナイーブ状態を脱したプライム状態の多能性幹細胞であることが分かった。

### 3.1.3. プライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の発現

ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への遷移における Ogt, Oga, *O*-GlcNAc の発現を、ウェスタンブロット解析により検討した。本研究では ncOgt を特異的に認識する抗 Ogt 抗体 (H-300) を用いた。これは、一般的に、多能性幹細胞において ncOgt の機能についてよく解析されているからである。また、実験に用いた抗 Oga 抗体 (SAB4200267) は、2 つのアイソフォーム (L-Oga と S-Oga) を認識する。ウェスタンブロット解析の結果、ncOgt の発現はナイーブ状態のマウス ES 細胞とプライム状態の ESD-EpiSCs と比べて変化しなかった (図 9A)。プライム状態の ESD-EpiSCs における、L-Oga と S-Oga の発現は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞と比較して、顕著に増加した。ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行に伴い、L-Oga と S-Oga が顕著に増加したため、Oga による *O*-GlcNAc の分解が促進し、*O*-GlcNAc のバンド強度は、ESD-EpiSCs で全体的に減少すると推測していたが、プライム状態で減少するのは 130 kDa

のバンド強度 (band b) のみであった (図 9B)。70 (band d)、95 (band c)、170 kDa (band a) のバンドは、プライム状態への移行に伴い、有意に増加した。以上の事実より、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行に伴い、Oga が増加し、O-GlcNAc 修飾のパターンが両状態で異なることが明らかになった。

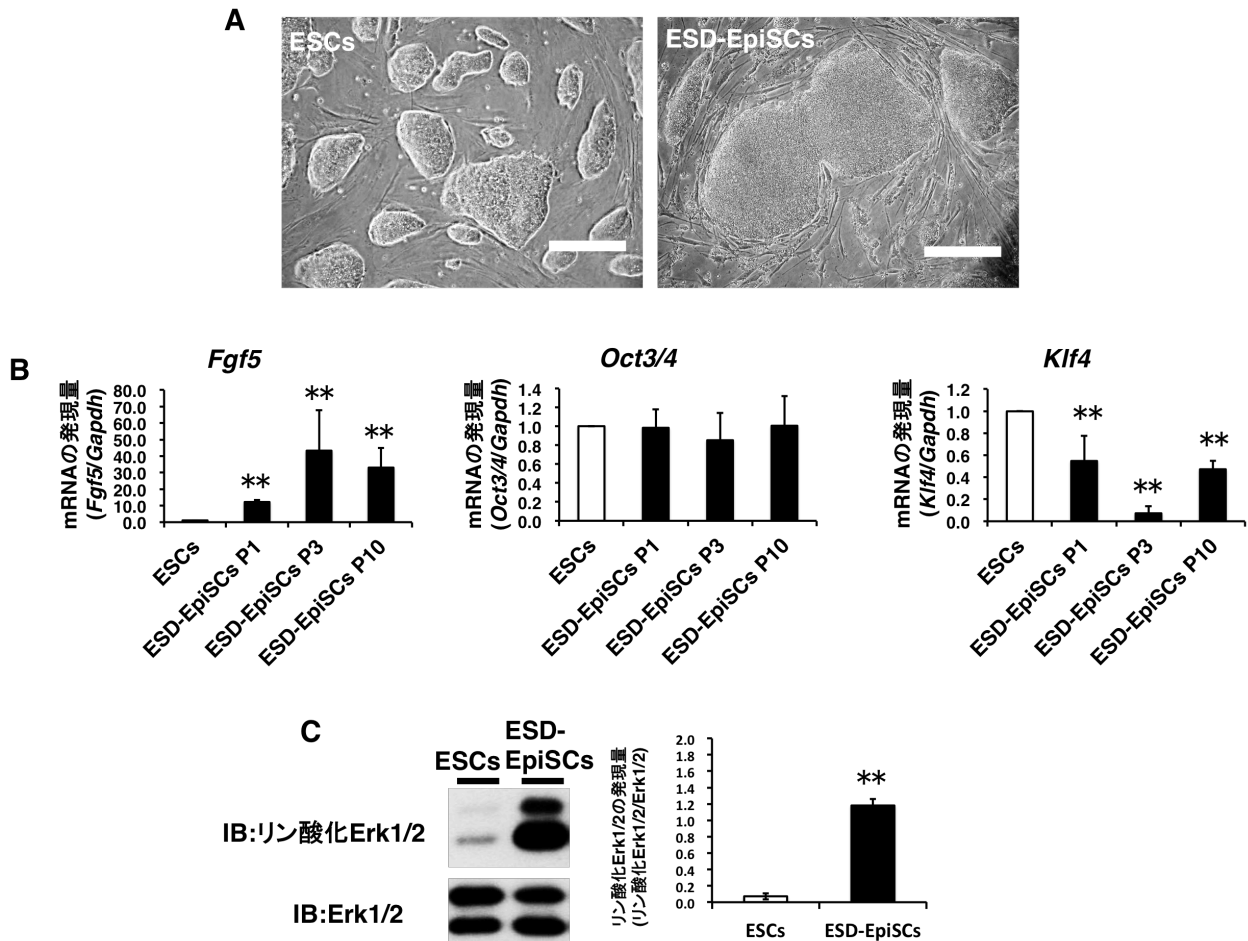


図 8 : ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs を誘導・維持した

A: 左にナイーブ状態のマウス ES 細胞 (ESCs) と、右にマウス ES 細胞から誘導したプライム状態の ESD-EpiSCs (3 継代後) の様子を示す。スケールバーは 250  $\mu$ m を示す。B: マウス ES 細胞と ESD-EpiSC における、*Fgf5*、*Oct3/4*、*Klf4* の mRNA の発現を示す。示した値は、各遺伝子の mRNA の発現を、*Gapdh* (ハウスキーピング遺伝子) の mRNA の発現で補正した後、マウス ES 細胞 (ESCs) を 1 とした場合の相対値である。*Fgf5* はプライム状態のマーカ遺伝子、*Oct3/4* はナイーブ・プライム状態に共通する未分化性維持因子、*Klf4* はナイーブ状態のマーカ遺伝子である。解析には、1 継代後 (ESD-EpiSCs P1)、3 継代後 (ESD-EpiSCs P3)、10 継代後 (ESD-EpiSCs P10) の ESD-EpiSCs を用いた。C: マウス ES 細胞と ESD-EpiSC における、リン酸化 Erk1/2 と Erk1/2 のタンパク質の発現の解析結果を示す。右のグラフは、リン酸化 Erk1/2/Erk1/2 のバンド強度を示す。リン酸化 Erk1/2 は Erk1/2 の活性化を意味しており、活性化 Erk1/2 はナイーブ状態では分化の促進に、プライム状態では未分化性の維持に関与している。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真、または、ウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*\*,  $P < 0.01$ 。

略語説明: ESCs, マウス ES 細胞; ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット); P, passage (継代数)。

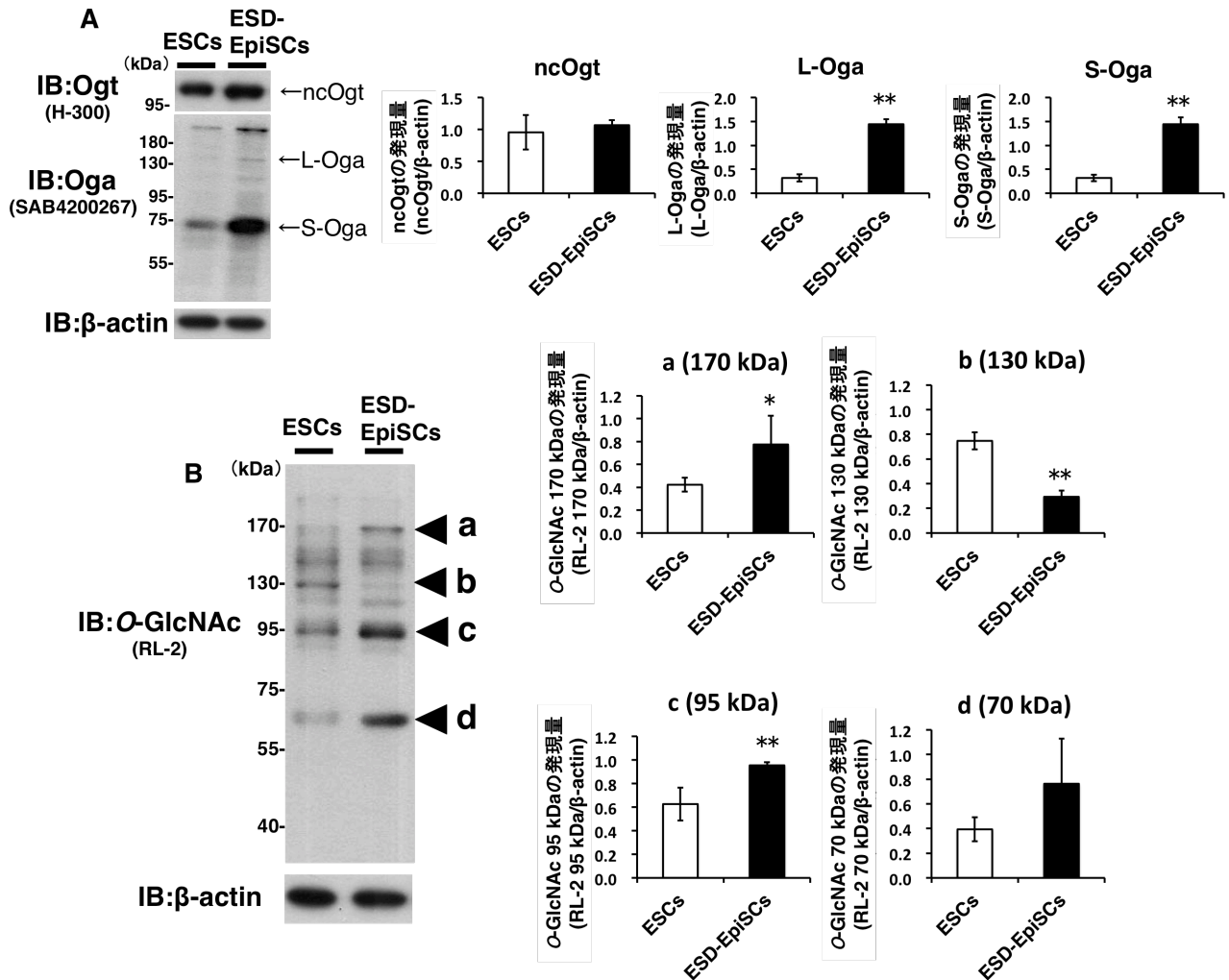


図9： ナイーブ状態からプライム状態への移行に伴い、L-Oga と S-Oga の発現が増加する

A: マウス ES 細胞と ESD-EpiSC における、nucleocytoplasmic Ogt (ncOgt)、long-form Oga (L-Oga)、short-form Oga (S-Oga) の発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 Ogt 抗体 (H-300) と抗 Oga 抗体 (SAB4200267) を用いた。右のグラフは、ncOgt、L-Oga、S-Oga のそれぞれのバンド強度を、 $\beta$ -actin のバンド強度で補正した後の値を示す。B: マウス ES 細胞と ESD-EpiSC における、O-GlcNAc 発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2) を用いた。右のグラフは、矢頭で示した 170 kDa (a)、130 kDa (b)、95 kDa (c)、70 kDa (d) のバンド強度を、 $\beta$ -actin のバンド強度で補正した後の値を示す。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示したウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 、\*\*,  $P < 0.01$ 。

略語説明: ESCs, マウス ES 細胞; ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット)。

### 3.1.4. プライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt、Oga、O-GlcNAc の局在

プライム状態の ESD-EpiSCs における Ogt、Oga、O-GlcNAc の局在を検討するために、界面活性剤を用いた遠心分画法により、核画分と細胞質画分に分画し解析を行った。核・細胞質画分のサンプルを用いたウェスタンブロット解析により、LaminB1 と  $\alpha$ -tubulin の発現量を解析した。LaminB1 は核に特異的に発現しているため「核マーカー」として、また、 $\alpha$ -tubulin は細胞質に特異的に発現しているため「細胞質マーカー」として用いた。ウェスタンブロット解析の結果、核画分でのみに LaminB1 の発現を、または、細胞質画分でのみに  $\alpha$ -tubulin の発現を確認できた (図

10A)。これらの画分と、抗 Ogt 抗体 (H-300) と抗 Oga 抗体 (SAB4200267) を用いたウェスタンブロット解析の結果、ナイーブ状態からプライム状態への移行において発現が変化しなかった ncOgt は核と細胞質に局在していた (図 10B)。一方、プライム状態の ESD-EpiSCs への移行において発現量が顕著に増加した L-Oga と S-Oga の両者は、細胞質のみに局在していた。抗 Ogt 抗体 (H-300) と抗 Oga 抗体 (SAB4200267) を用いた免疫染色の結果からも、プライム状態の ESD-EpiSCs において、ncOgt は核と細胞質に局在しており、L-Oga と S-Oga は細胞質のみに局在していることがさらに確認された (図 10C)。次に、核画分と細胞質画分における O-GlcNAc 修飾のパターンを検討した。ウェスタンブロット解析の結果、プライム状態の ESD-EpiSCs における O-GlcNAc 修飾のパターンは、核画分と細胞質画分で異なることが明らかになった。例えば、ナイーブ状態からプライム状態への移行に伴い唯一減少した 130kDa のバンド (図 9B の band b) は、細胞質に局在するタンパクであることが分かった (図 11)。以上の事実より、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs へ移行する際、細胞質の L-Oga と S-Oga が増加し、O-GlcNAc 修飾のパターンが変化することが明らかになった。

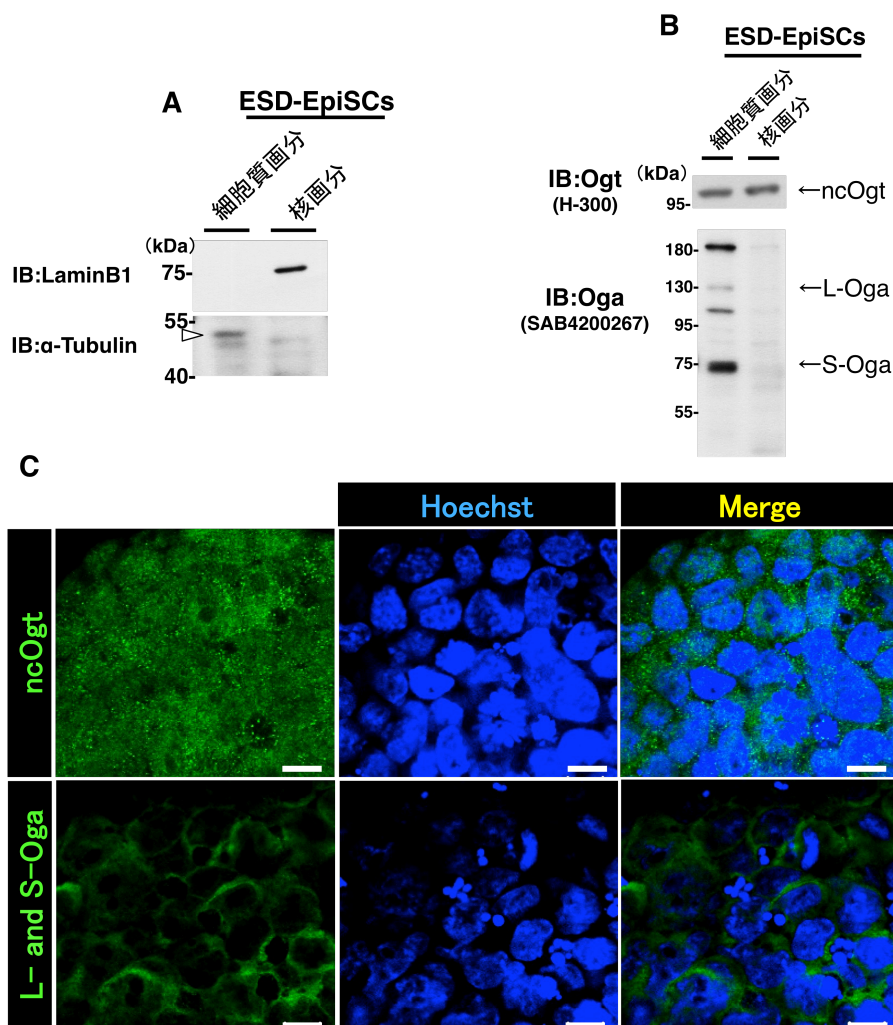


図 10 : ESD-EpiSCs において ncOgt は細胞質と核に、L-Oga と S-Oga は細胞質のみに局在する  
A : ESD-EpiSCs の細胞質画分と核画分における、LaminB1 (核マーカー) と  $\alpha$ -tubulin (細胞質マーカー) の発現解析の結果を示す。矢頭は、 $\alpha$ -tubulin を示す。B : ESD-EpiSCs の細胞質画分と核画分における、



nucleocytoplasmic Ogt (ncOgt)、long-form Oga (L-Oga)、short-form Oga (S-Oga)の発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 Ogt 抗体 (H-300) と抗 Oga 抗体 (SAB4200267) を用いた。C : ESD-EpiSCs と、抗 Ogt 抗体 (H-300 : 上段の緑色)、または、抗 Oga 抗体 (SAB4200267 : 下段の緑色) を用いた免疫染色の結果を示す。核は Hoechst (青色) によって染めた。スケールバーは 10  $\mu$ m を示す。示した写真、または、ウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。

略語説明: ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット) .

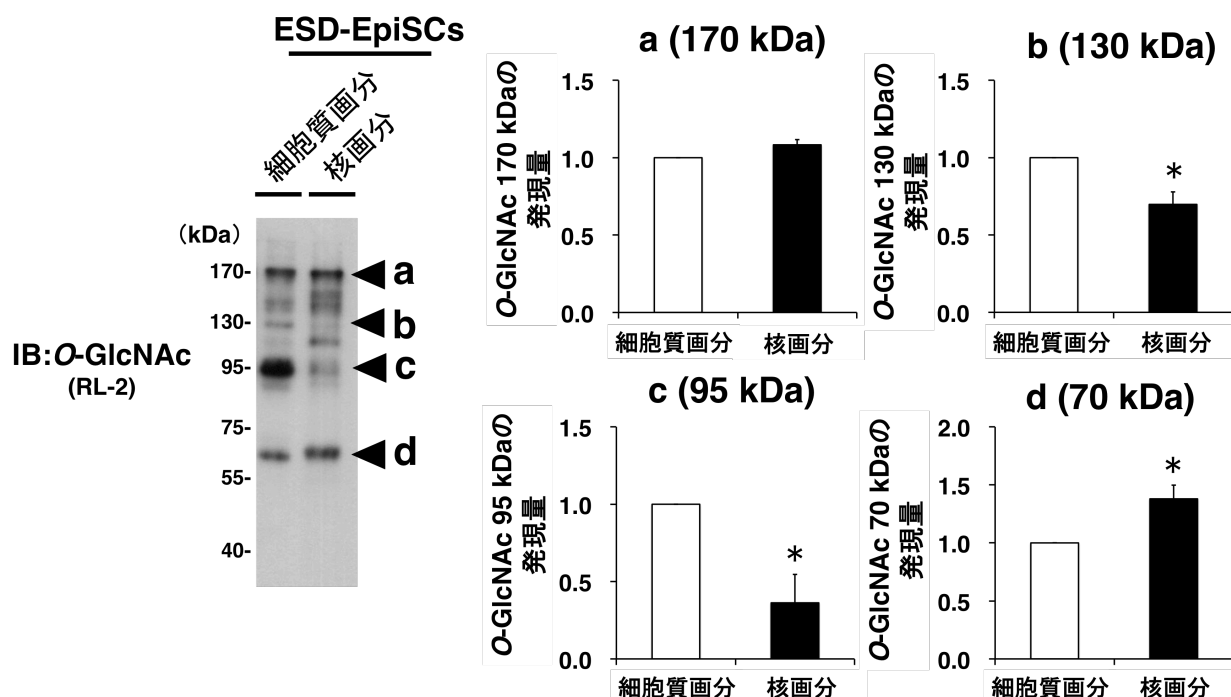


図 11 : ESD-EpiSC の細胞質画分と核画分における O-GlcNAc 修飾のパターンは異なる

ESD-EpiSC の細胞質画分と核画分における、O-GlcNAc 発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2) を用いた。右のグラフは、矢頭で示した 170 kDa (a)、130 kDa (b)、95 kDa (c)、70 kDa (d) のバンド強度を示す。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示したウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 。

略語説明: ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット) .

### 3.1.5. プライム状態の ESD-EpiSCs における Oga の機能

プライム状態の ESD-EpiSCs における Oga の機能を検討するために、Oga 阻害剤である PUGNAc (Oga inhibitor : Ogai) を ESD-EpiSCs の培養上清に加え培養した。ナイーブ状態からプライム状態への移行に伴い Oga の発現が顕著に増加するため、ESD-EpiSCs において、Oga は未分化性の維持や生存に必須な因子であると予想した。ESD-EpiSCs に 200  $\mu$ M Ogai を加えると、Oga による O-GlcNAc の分解が阻害されるため、最終的に O-GlcNAc が蓄積し、増加した (図 12A)。予想に反して、Ogai を加えた ESD-EpiSCs (Ogai+) のコロニーの形態は、Ogai を加えていない ESD-EpiSCs (Ogai-) と比べて変化はなかった (図 12B)。また、リアルタイム PCR 解析の結果、プライム状態マーカー遺伝子の *Fgf5*、*Oct3/4* の発現、ナイーブマーカー遺伝子の *Oct3/4*、*Klf4*、*Nanog*、*Klf2*、*Sox2*、*Esrrb* の発現は全て、Ogai を加えても変化しなかった (図 12C)。以上の事実から、プライム状態の ESD-EpiSCs において、Oga は未分化性の維持や生存には関与しないことが明らかになった。

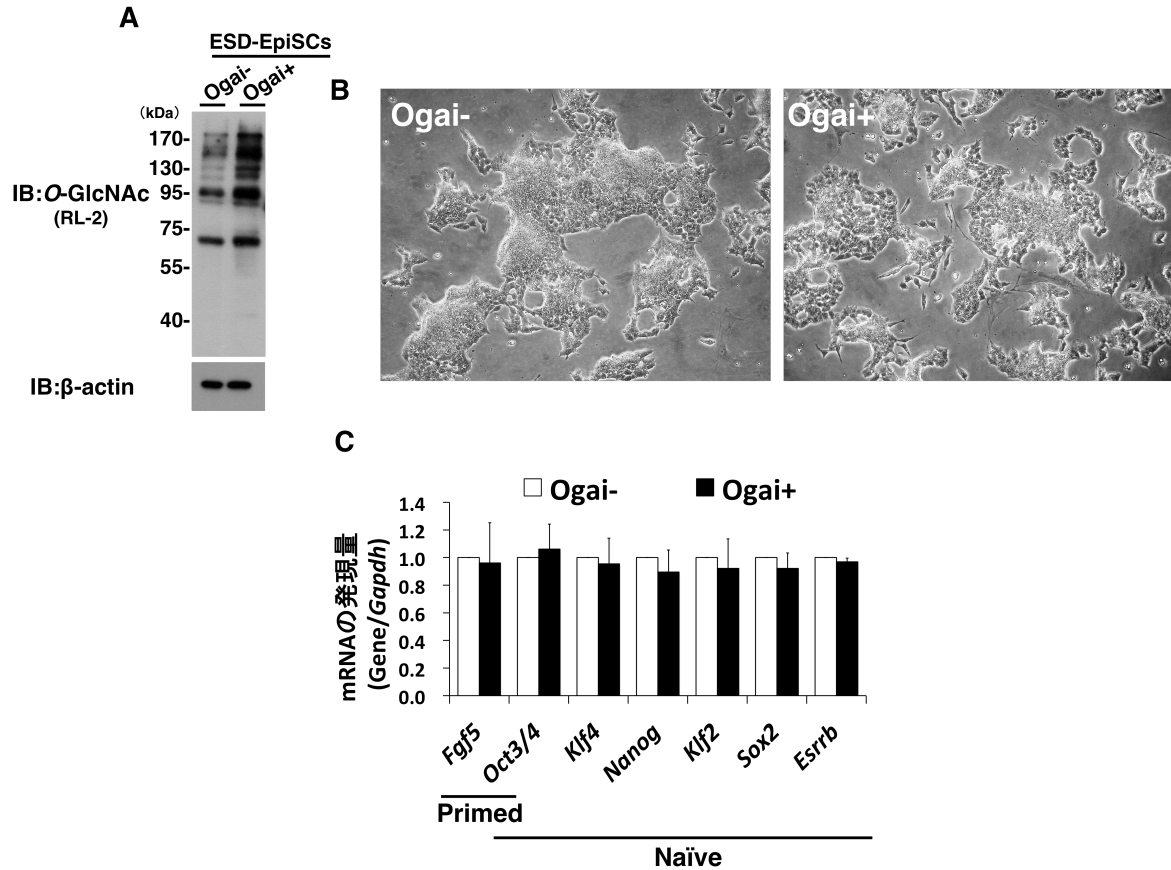


図 12 : ESD-EpiSCs において *Oga* はプライム状態の維持・生存には関与しない

A : 200  $\mu$ M *Ogai* を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC における *O*-GlcNAc 発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 *O*-GlcNAc 抗体 (RL-2) を用いた。*Ogai* を加えて培養を行った ESD-EpiSCs は「*Ogai*+」、加えていない ESD-EpiSCs は「*Ogai*-」と表記した。B : 200  $\mu$ M *Ogai* を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC (*Ogai*+ ) と、加えていない ESD-EpiSCs (*Ogai*- ) のコロニーの形態の様子を示す。C : 200  $\mu$ M *Ogai* を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC (*Ogai*+ ) と、加えていない ESD-EpiSCs (*Ogai*- ) における、プライム状態マーカー遺伝子 (*Fgf5*, *Oct3/4*) と、ナイーブマーカー遺伝子 (*Oct3/4*, *Klf4*, *Nanog*, *Klf2*, *Sox2*, *Esrrb*) の mRNA の発現を示す。示した値は、各遺伝子の mRNA の発現を、*Gapdh* の mRNA の発現で補正した後、「*Ogai*-」を 1 とした場合の相対値である。グラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真、または、ウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。

略語説明: ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット); *Ogai*, *Oga* 阻害剤。

### 3.1.6. プライム状態の ESD-EpiSCs における *Ogt* の機能

*Oga* と同様に、プライム状態の ESD-EpiSCs における *Ogt* の機能を検討するために、*Ogt* 阻害剤である Phenyl 5-chloro-2-oxo-3-hydrobenzoxazole-3-carboxylate (*Ogt* inhibitor : *Ogti*) を ESD-EpiSCs の培養上清に加え培養した。ナイーブ状態のマウス ES 細胞において、*ncOgt* は未分化性維持と生存に必須であり、*ncOgt* の発現量はナイーブ状態からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行において変化しなかったため、プライム状態の ESD-EpiSCs においても *ncOgt* が未分化性維持や生存に必須な因子である可能性があった。ESD-EpiSCs に 140  $\mu$ M *Ogti* を加えると、*Ogt* による GlcNAc の転移が阻害されるため、*O*-GlcNAc は減少した (図 13A)。 *Ogti* を加えると ESD-EpiSCs は速やかに死滅した (図 13B)。また、*Ogti* を加えた後の、培養上清中に浮遊している死細胞数を、

トリパンブルーを用いて計測したところ、Ogti を加えていない時と比較して顕著に増加し、生き残る細胞は少数であった (図 13C)。Ogti を加えた後、プライム状態の未分化性維持に必須な因子である *Oct3/4* の発現量を検討したところ、変化はなかった (図 13D)。以上の事実から、プライム状態の ESD-EpiSCs において Ogt は生存には必須であるが、未分化性維持には関与しないことが明らかになった。

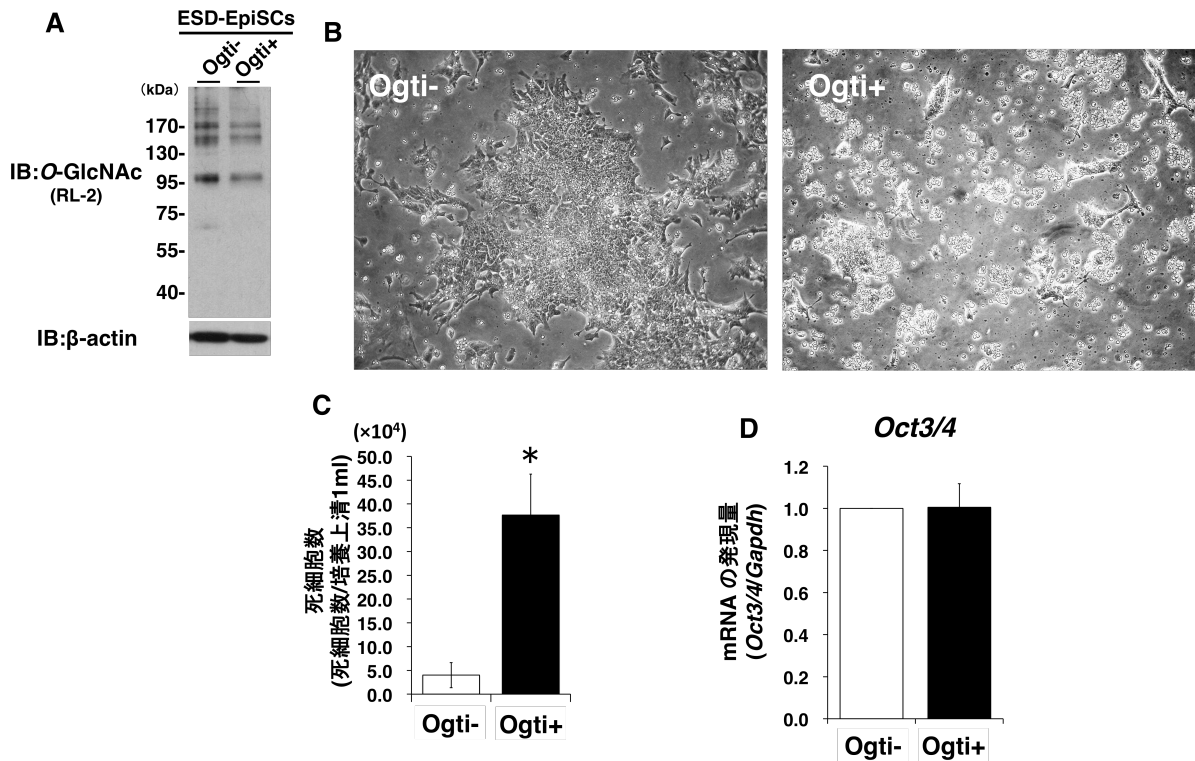


図 13 : ESD-EpiSCs において Ogt は生存に必須である

A : 140  $\mu$ M Ogti を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC における O-GlcNAc 発現解析の結果を示す。ウェスタンブロットには、抗 O-GlcNAc 抗体 (RL-2) を用いた。Ogti を加えて培養を行った ESD-EpiSCs は「Ogti+」、加えていない ESD-EpiSCs は「Ogti-」と表記した。B : 140  $\mu$ M Ogti を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC (Ogti+) と、加えていない ESD-EpiSCs (Ogti-) のコロニーの形態の様子を示す。Ogti+ の写真で確認できる細かい細胞の凝集は死滅し培養上清に浮いた細胞である。C : 140  $\mu$ M Ogti を 24 時間加えて培養を行った後の ESD-EpiSC (Ogti+) と、加えていない ESD-EpiSCs (Ogti-) における、プライム状態・ナイーブ状態マーカー遺伝子である *Oct3/4* の mRNA の発現を示す。示した値は、*Oct3/4* の mRNA の発現を、*Gapdh* の mRNA の発現で補正した後、「Ogti-」を 1 とした場合の相対値である。グラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真、または、ウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.01$ 。

略語説明: ESD-EpiSCs, ESC-derived EpiSCs; IB, イムノブロット (ウェスタンブロット); Ogti, Ogt 阻害剤。

### 3.1.7. プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態への遷移における Ogt と Oga の機能

プライム状態の ESD-EpiSCs は FGF2 と JAK 阻害剤を加えずに、LIF、1  $\mu$ M PD0325901 (FGF シグナル阻害剤)、3  $\mu$ M CHIR99021 (Wnt シグナル促進剤) を加え、1 週間ほど、不活性化した MEFs 上で培養することで、ナイーブ状態のマウス ES 細胞様の細胞 (reverted ESCs: rESCs) に戻すことができる。ナイーブ状態のマウス ES 細胞はアルカリフォスファターゼ活性を有しているのに対

し、プライム状態の ESD-EpiSCs はアルカリフォスファターゼ活性が無いため、アルカリフォスファターゼ染色では染まらない。このため、rESCs におけるアルカリフォスファターゼ染色陽性のコロニーを数えることでナイーブ化効率を算出することができる。ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs に移行する際に Oga の発現が顕著に増加したため(図 9A)、ESD-EpiSCs から rESCs 誘導時に Ogai を加えることでナイーブ化効率が増加すると予想した。しかし、予想に反して、Ogai を加えると有意にナイーブ化効率が減少した(図 14)。さらに、ESD-EpiSCs から rESCs 誘導時に Ogti を加えると、Ogai 添加時よりも、有意にナイーブ化効率が減少した。以上の事実から、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の rESCs 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。

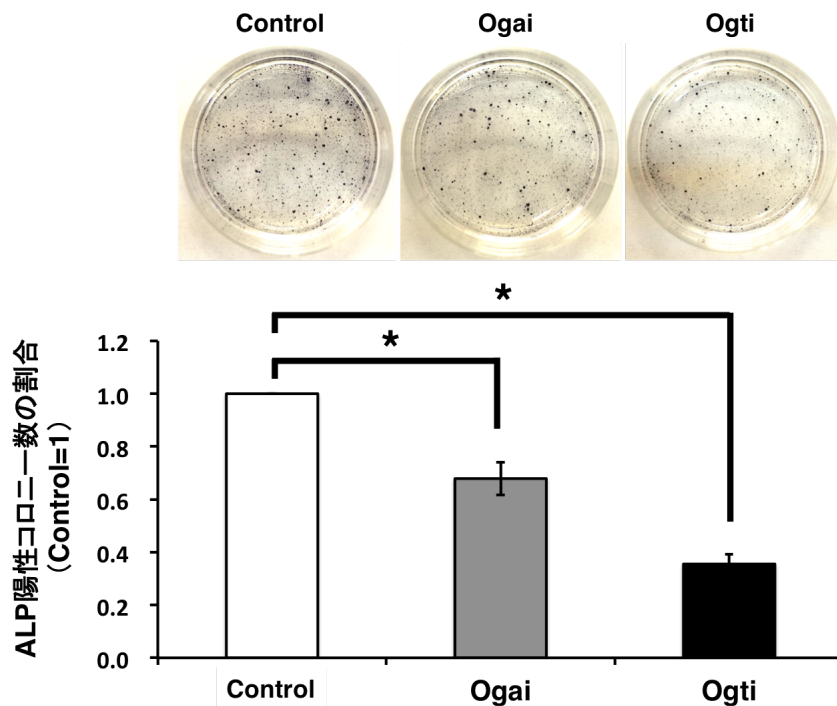


図 14 : ESD-EpiSCs において Ogt は生存に必須である

プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の reverted ESCs (rESCs) に誘導する際に、200  $\mu$ M Ogai、または、140  $\mu$ M Ogti を加えた。誘導後、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色を行った結果を示す。ナイーブ状態の rESC への誘導を 6 日間行い、各種阻害剤含有の培地は毎日交換した。上段の写真は、ALP 染色直後の様子であり、青紫色に染まった ALP 陽性のコロニーは、ナイーブ状態の rESC を示す。下段のグラフは、ALP 陽性コロニー数の割合を示す。グラフの値は、Control の ALP 陽性コロニー数を 1 とした時の相対値である。グラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.01$ 。

略語説明: ALP, alkaline phosphatase (アルカリフォスファターゼ); Ogai, Oga 阻害剤; Ogti, Ogt 阻害剤。

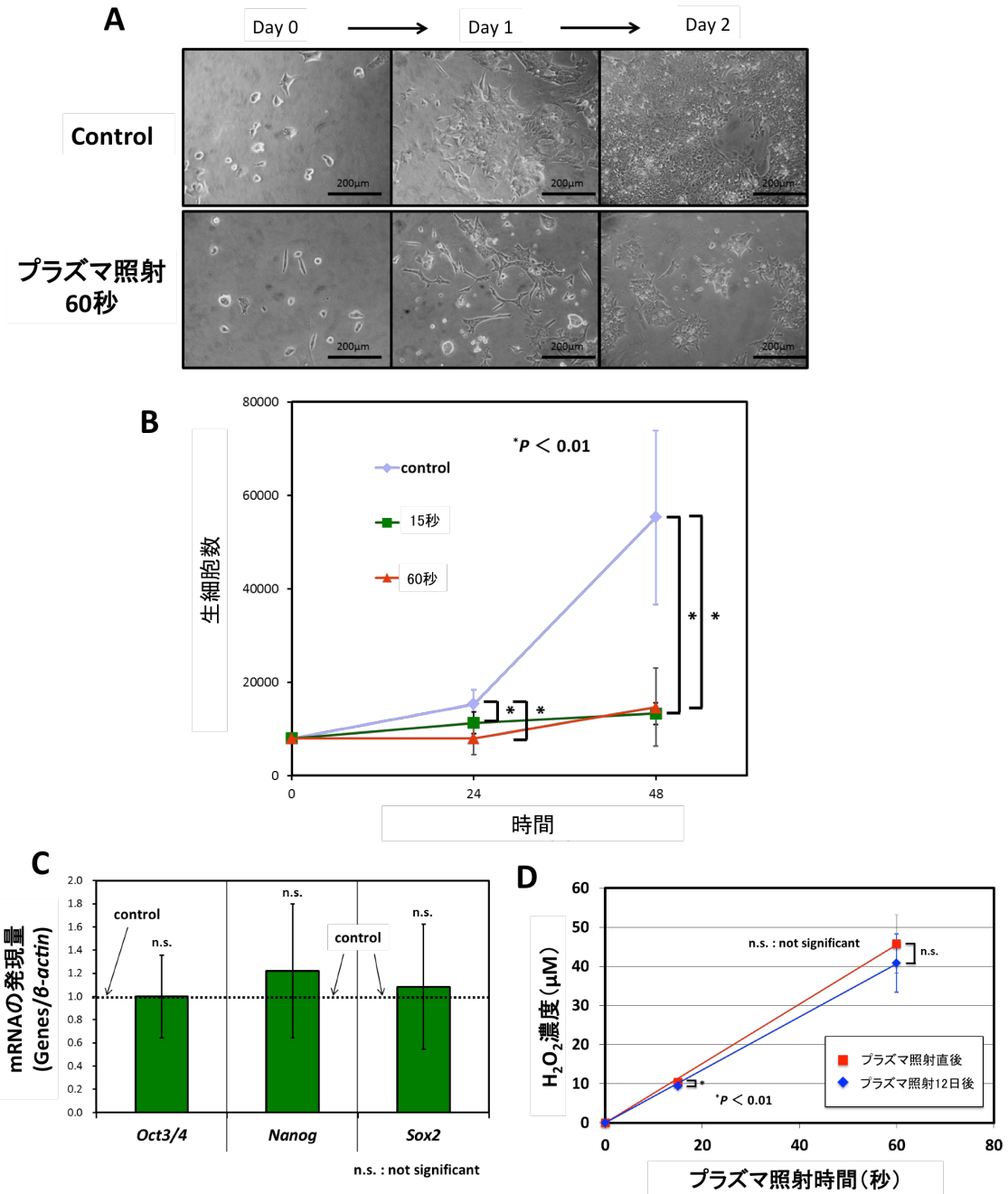
### 3.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果

#### 3.2.1. プラズマ照射培地中の活性種のナイーブ状態のマウス ES 細胞における機能

培地中の活性種によるナイーブ状態のマウス ES 細胞への影響を検討するために、プラズマを照射した「プラズマ照射培地」を用いた。プラズマ照射装置は、大阪大学の浜口先生からプラズマ装置を貸与していただいた。最初に、プラズマ照射により培地中に生成された活性種がマウス ES 細胞の増殖能と未分化性にどのような影響を与えるか検討した。血清を含まないマウス ES 細胞用培地に 60 秒間プラズマ照射を行い、そのプラズマ照射培地に血清と LIF を加え、マウス ES 細胞を培養した。プラズマ照射培地で培養したマウス ES 細胞の形態に変化はなかったが、細胞数が顕著に減少した(図 15A)。実際に、プラズマ照射培地で培養を始めてから 2 日後の細胞数を計測したところ、プラズマ照射培地で培養した場合で有意に減少した(図 15B)。また、プラズマ照射培地による死細胞数に有意な差はなく、プラズマ照射培地がナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖能を抑制していることが明らかとなった。次に、プラズマ照射培地で培養し、増殖能が抑制されたマウス ES 細胞における未分化性を検討した。検討の方法は、ナイーブ状態における未分化性維持転写因子である *Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2* の mRNA の発現量をリアルタイム PCR により解析した(図 15C)。その結果、各未分化維持因子の発現量に変化はなかった。以上の結果から、プラズマ照射培地中の活性種は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖能を抑制するが、未分化性維持には影響を与えないことが明らかとなった。

プラズマ照射により培地中で生成される主要な活性酸素種の一つに過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) がある[51, 52]。そこで、プラズマ照射により生成される  $H_2O_2$  の濃度を検討した(図 15D)。ES 細胞用培地では培地由来の色素(フェノールレッド)により  $H_2O_2$  の濃度を検討できなかつたので、超純水にプラズマ照射を行い、 $H_2O_2$  の濃度を検討した。その結果、プラズマ照射時間が長くなるにつれ超純水中に生成される  $H_2O_2$  の濃度も高くなった。60 秒間のプラズマ照射により超純粋中に約  $45 \mu M$  の  $H_2O_2$  が生成された。また、プラズマ照射後の超純水を 12 日間、 $4^\circ C$  で密閉保存した後の  $H_2O_2$  の濃度を検討した結果、照射直後と濃度は変化しなかつた。このことから、プラズマ照射により培地中に  $H_2O_2$  が生成され、生成された  $H_2O_2$  は長時間(少なくとも 12 日間は)存在し続けることが明らかとなった。以上の事実から、プラズマ照射により培地中に生成された  $H_2O_2$  などの活性種は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖能を抑制し、未分化性維持には影響を与えないことが明らかとなった。

「2.4.  $H_2O_2$  添加培地とプラズマ照射培地の調整」でも述べたが、 $45 \mu M$   $H_2O_2$  を添加した培地・60 秒間のプラズマ照射を行った培地の pH を測定したところ、添加前・照射前と比較して変化はなかつた(超純水の pH 約 6.8、細胞用培地の pH 約 7.2)。以上の事実より、培地中の  $H_2O_2$  などの活性種による、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖能抑制効果は、pH による影響ではないことが明らかとなった。また、以降の実験においても pH の影響はない。



**図 15 : 培地中の活性種はナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖を抑制する**

A : 60 秒間のプラズマ照射を行った培地（プラズマ照射培地）を用いてナイーブ状態のマウス ES 細胞を培養した際の細胞の様子を示す。図は、プラズマ照射培地を用いた培養を開始した日を「Day0」とし、Day1、Day2 の時の細胞の様子である。スケールバーは  $200\mu m$  を示す。Day2 の Control では細胞が一面に広がって増殖しているのに対し、プラズマ照射培地では、細胞は増殖せずに数個のコロニーしか観察されなかった。B : プラズマ照射培地を用いて培養した際の生細胞数の経時変化を示す。プラズマ照射は 15 秒間と 60 秒間で行った。細胞数の計測には、Trypan blue solution を用い、染色されない細胞（生細胞）を数えた。C : 60 秒間のプラズマ照射を行った培地を用いて 48 時間培養した後の、未分化維持に必要な転写因子（*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*）の mRNA の発現を示す。示した値は、*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2* の各 mRNA の発現を、 $\beta$ -actin の mRNA の発現で補正した後、「Control」を 1 とした場合（点線で示す）の相対値である。グラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。示した写真は試行回数 3 回のうちの代表するものである。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*、 $P < 0.01$ 。

### 3.2.2. 活性種の胚様体 (EB) の増殖能への効果

一般的に、EB 形成法は多能性幹細胞の三胚葉分化を検討する際に用いられる方法である。LIF を除き、浮遊培養することにより EB を形成することができる。「H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地」用いて EB 形成を 12 日間行い、培地中の活性酸素種による分化への影響を検討した。加えて、「プラズマ照射培地」も用いて、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地と同時に EB 形成を行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地とプラズマ照射培地に共通する効果は培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による影響であり、共通ではない効果は培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以外の活性種による影響である。

EB 形成に用いる培地に 45 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地)、速やかに 4°C で密閉保存した。また、EB 形成に用いる培地に 60 秒間プラズマ照射をクリーンベンチ内で行い (プラズマ照射培地) (図 16A)、速やかに 4°C で密閉保存した (図 16B)。EB 形成に使用する際には、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地に血清を加えてから使用した (LIF は非含有)。なお、EB 形成に用いた H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地は全て EB 形成 0 日目に 12 日間分の量を作製し、保存した。EB は始めエピブラスト (2.5 日目) に分化し、その後、3 日目には内胚葉・中胚葉に分化する。最後に 12 日目には外胚葉に分化する。EB 形成後 2.5 日目、3 日目、12 日目にそれぞれの EB を回収し、分化マーカー遺伝子の発現を解析することにより、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地の分化への影響を検討した (図 16C)。

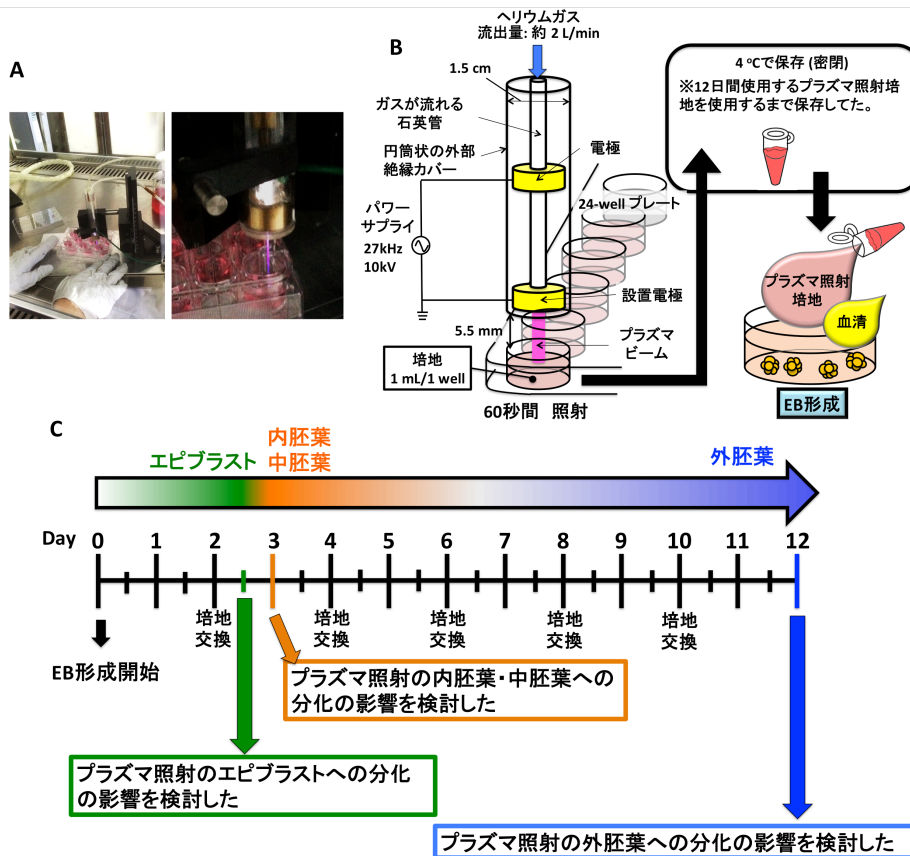


図 16: プラズマ照射装置の詳細とプラズマ照射培地の作り方

A: プラズマ照射をクリーンベンチ内で行っているときの様子の写真を示す。B: プラズマ照射装置の詳細を示す。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地は使用するまで 4°C で密閉保存した。C: 実験計画と、胚様体形成による三胚葉分化過程を示す。各培地は 2 日おきに交換した。

プラズマ照射培地はナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖を抑制したため (図 15A、B)、EB 形成時においても EB の増殖に影響を及ぼすか検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地、または、プラズマ照射培地で培養した EB の形態を観察したところ、形態や、EB の数には変化なかった (図 17)。以上の事実から、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖能は抑制できるが、EB の増殖能は抑制できないことが明らかとなった。

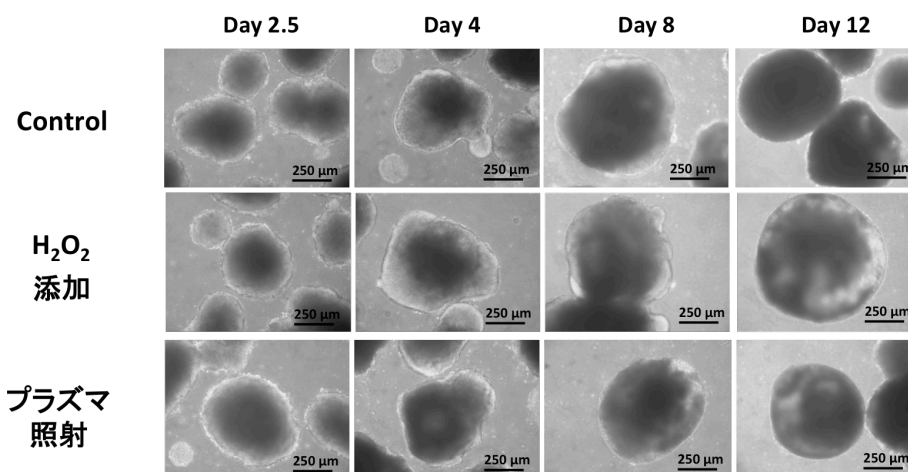


図 17: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地は胚様体 (EB) の増殖能に影響を与えない  
LIF を含まないマウス ES 細胞用培地 (Control)、LIF を含まない H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加)、LIF を含まないプラズマ照射培地 (プラズマ照射) を用いた EB の様子を示す。EB 形成を開始した日を Day0 として、Day2.5、Day4、Day8、Day12 の各 EB の写真を示す。どの条件においても EB の形態・数に変化はなかった。スケールバーは 250 μm を示す。

### 3.2.3. 活性種のエピブラスト分化における機能

2.5 日目の EB のサンプルを用いて、エピブラストへの分化を検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB におけるエピブラストマーカー遺伝子である *Fgf5* と *Otx2* の mRNA の発現量を検討した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地で培養した EB における *Otx2* の発現量は増加傾向にあった (図 18A)。 *Fgf5* と *Otx2* の発現量は、プラズマ照射培地で培養した EB において増加傾向にあった。以上の事実から、培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> はエピブラストへの分化を促進することが明らかとなった。

マウス ES 細胞の分化において、FGF4 シグナルは、エピブラストへの分化を促進することが報告されている [12, 13]。近年、当研究室により Fas シグナルが、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からエピブラストへの分化の促進に寄与していることを報告した [16, 17]。さらに、Fas シグナルは FGF4 シグナルと非依存的に働くことも報告した [16]。Fas 刺激により細胞質内構成因子の Caspase3 が活性化し、活性化 Caspase3 は未分化性維持転写因子のうちの 1 つである Nanog タンパク質を分解する [16, 17]。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地がエピブラストへの分化を促進したことから、FGF4 シグナル、もしくは、Fas シグナルが活性化していると仮定した。そこで、リン酸化 Erk1/2 と、活性化 Caspase3 の発現量をウェスタンブロットにより解析したところ、リン酸化 Erk1/2 が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地と、プラズマ照射培地で培養することで増加した (図 18B)。しかし、活性化 Caspase3 の発現量



は変化しなかった。以上の事実から、培地中の  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを活性化することが明らかとなった。次に、FGF4 シグナルの標的遺伝子である *Spry2* と *Dusp6* の mRNA の発現量を検討した(図 18C)。*Spry2* の発現は、 $H_2O_2$  添加培地で培養した EB においては増加傾向にあり、プラズマ照射培地で培養した EB において有意に増加した。*Dusp6* の発現は、 $H_2O_2$  添加培地で培養した EB とプラズマ照射培地で培養した EB において増加傾向にあった。以上の事実から、培地中の  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを促進し、エピブラストへの分化を促進することが明らかとなった。

培地中の  $H_2O_2$  がどのようにして FGF4 シグナルを促進しているのか、その原因を検討した(図 18D)。FGF4 シグナルは、培地中の *Fgf4* (リガンド) が、マウス ES 細胞の膜上にある FGF 受容体 2c (*Fgfr2c*) に結合することで、Erk1/2 などの下流因子が活性化する[12, 13]。*Fgf4* と *Fgfr2c* の発現量を検討したところ、 $H_2O_2$  添加培地で培養した EB において増加傾向にあり、*Fgf4* の発現量はプラズマ照射培地で培養した EB において有意に増加した。*Fgfr2c* の発現量は、 $H_2O_2$  添加培地で培養した EB、プラズマ照射培地で培養した EB において増加傾向にあった。以上の事実から、2.5 日目の EB において、培地中の  $H_2O_2$  が *Fgf4* と *Fgfr2c* の発現を促進し、FGF4 シグナルが促進し、最終的にエピブラストへの分化が促進することが明らかとなった。

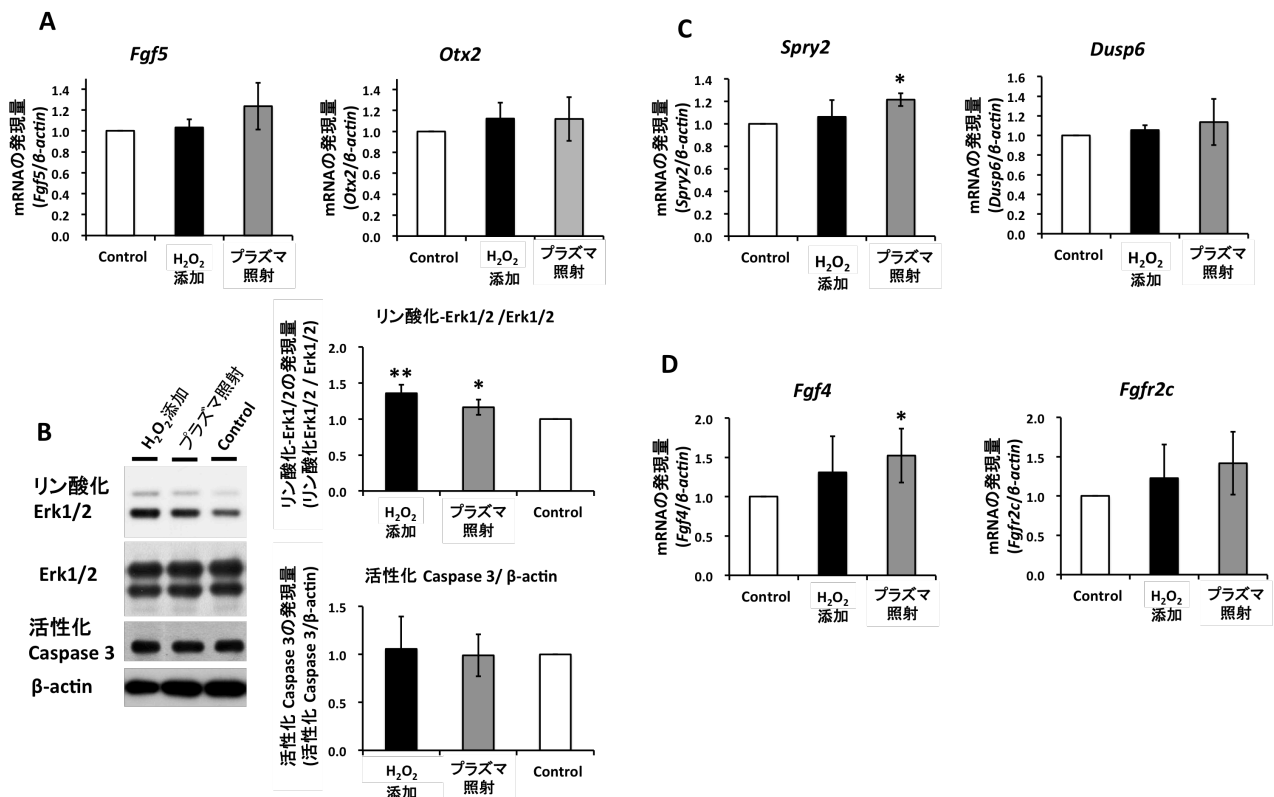


図 18: 培地中の  $H_2O_2$  は FGF4 シグナルを活性化し、エピブラストへの分化を促進する

A:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 2.5 日目の EB におけるエピブラストマーカー遺伝子 (*Fgf5* と *Otx2*) の mRNA の発現を示す。示した *Fgf5*/β-actin、*Otx2*/β-actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。B:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 2.5 日目の EB におけるリン酸化 Erk1/2、Erk1/2、活性化 Caspase3、β-actin のタンパク質の発現解析の結果を示す。右のグラフで示したリン酸化 Erk1/2/Erk1/2、活性化 Caspase3/β-actin のバンド強度の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。示したウェスタンブロットの結果は試行回数 3 回のうちの代表するものである。C:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 2.5 日目の EB における

FGF4 シグナルの標的遺伝子 (*Spry2* と *Dusp6*) の mRNA の発現を示す。示した *Spry2/β-actin*、*Dusp6/β-actin* mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。D : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 2.5 日目の EB における FGF4 シグナル構成因子 (*Fgf4* と *Fgfr2c*) の mRNA の発現を示す。示した *Fgf4/β-actin*、*Fgfr2c/β-actin* mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 、\*\*,  $P < 0.01$ 。

### 3.2.4. 活性種の中胚葉・内胚葉分化における機能

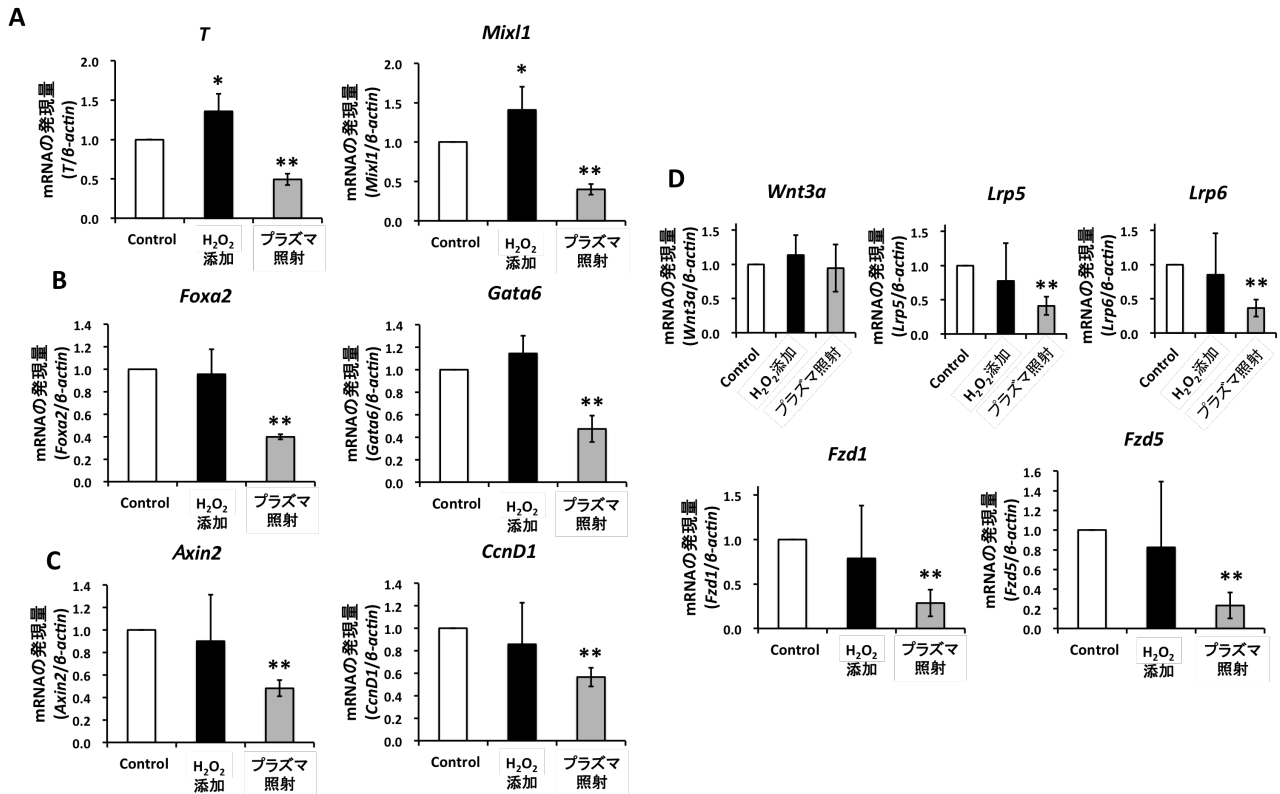
EB 形成後 3 日目の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB における中胚葉・内胚葉マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。中胚葉マーカー遺伝子である *T* と *Mixl1* の発現量を検討したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地で培養した EB において *T* と *Mixl1* の発現量は有意に増加した (図 19A)。一方、プラズマ照射培地で培養した EB において両者の発現は有意に減少した。以上の事実から、培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は中胚葉への分化を促進するが、プラズマ照射により培地中に生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以外の活性種により中胚葉への分化が抑制されることが明らかとなった。

内胚葉マーカー遺伝子である *Foxa2* と *Gata6* の発現量を検討したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地で培養した EB において、*Foxa2* と *Gata6* の発現量は変化しなかった (図 19B)。一方、プラズマ照射培地で培養した EB において両者の発現は有意に減少した。以上の事実から、培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は中胚葉への分化を促進するが内胚葉への分化には影響を与えないことが明らかとなった。さらに、プラズマ照射により培地中に生成された H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以外の活性種により内胚葉への分化が抑制されることが明らかとなった。

マウス ES 細胞の分化において、Wnt シグナルは中胚葉・内胚葉への分化を促進する [53]。ゆえに、EB 形成において H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地 Wnt シグナルに影響を与えるのか検討した。Wnt シグナル標的遺伝子である *Axin2* と *CcnD1* の発現量を検討したところ、両者の発現は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地で培養した EB においては変化せず、プラズマ照射培地で培養した EB において有意に減少した (図 19C)。以上の事実から、2.5 日目の EB において培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は Wnt シグナルには関与しないことが明らかとなった。また、プラズマ照射により生成される培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以外の活性種により Wnt シグナルが抑制され、マウス ES 細胞の中胚葉・内胚葉への分化が抑制されることが明らかとなった。

次に、プラズマ照射培地により生成された活性種がどのようにして Wnt シグナルを抑制しているのか、その原因を検討した。Wnt3a は Wnt リガンドファミリーの一つであり、中胚葉・内胚葉の分化を調節していることが報告されている [54]。Wnt リガンドは、細胞膜上の Wnt 受容体である、Lrp5、Lrp6、Frizzled 1 (Fzd1)、Frizzled 5 (Fzd5) に結合し、β-catenin などの下流因子が活性化する [54]。Wnt3a、または、Lrp5、Lrp6、Fzd1、Fzd5 の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した (図 19D)。その結果、Lrp5、Lrp6、Fzd1、Fzd5 の発現量は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地で培養した EB においては変化せず、プラズマ照射培地で培養した EB において有意に減少した。Wnt3a の発現量はどちらの培地で培養した EB において変化しなかった。これらの結果から、3 日目の EB において、培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は Wnt シグナル構成因子の発現制御には関与しないことが明らかと

なった。また、プラズマ照射により生成される培地中の  $H_2O_2$  以外の活性種により *Lrp5*、*Lrp6*、*Fzd1*、*Fzd5* の発現が抑制され、Wnt シグナルが抑制され、中胚葉・内胚葉への分化が抑制されることが明らかとなった。



**図 19:** 培地中の  $H_2O_2$  以外の活性種は Wnt シグナルを抑制し、中胚葉・内胚葉への分化を抑制する  
A:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 3 日目の EB における中胚葉マーカー遺伝子 (*T* と *Mixl1*) の mRNA の発現を示す。示した *T* /  $\beta$ -actin、*Mixl1* /  $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。B:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 3 日目の EB における内胚葉マーカー遺伝子 (*Foxa2* と *Gata6*) の mRNA の発現を示す。示した *Foxa2* /  $\beta$ -actin、*Gata6* /  $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。C:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 3 日目の EB における Wnt シグナルの標的遺伝子 (*Axin2* と *CcnD1*) の mRNA の発現を示す。示した *Axin2* /  $\beta$ -actin、*CcnD1* /  $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。D:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 3 日目の EB における Wnt シグナル構成因子 (*Wnt3a*、*Lrp5*、*Lrp6*、*Fzd1*、*Fzd5*) の mRNA の発現を示す。示した各構成因子の mRNA の発現 /  $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 、\*\*,  $P < 0.01$ 。

### 3.2.5. 活性種の外胚葉分化における機能

EB 形成後 12 日目の  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB における外胚葉マーカー遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した(図 20A)。外胚葉マーカー遺伝子である *Pax6* と *Nestin* の発現量を検討した結果、*Pax6* の発現量は  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB において共に有意に増加し、*Nestin* の発現量は  $H_2O_2$  添加培地で培養した EB において有意に増加し、プラズマ照射培地で培養した EB において増加傾向にあった。以上の事実から、培地中の  $H_2O_2$  が外胚葉への分化を促進することが明らかとなった。

FGF4 シグナルは、エピブラスト以外にも、外胚葉への分化を促進することが報告されている [55]。FGF4 シグナルの標的遺伝子である *Spry2* と *Dusp6* の mRNA の発現量を検討した結果、*Spry2* の発現は、 $H_2O_2$  添加培地、または、プラズマ照射培地で培養した EB の両者において有意に増加し、*Dusp6* の発現は、両者の EB において増加傾向にあった (図 20B)。以上の事実から、培地中の  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを促進し、外胚葉への分化を促進することが明らかとなった。

*Fgf4* と *Fgfr2c* の発現量を検討したところ、*Fgf4* の発現量は  $H_2O_2$  添加培地で培養した EB において増加傾向にあり、プラズマ照射培地で培養した EB において有意に増加した (図 20C)。*Fgfr2c* の発現量は  $H_2O_2$  添加培地、または、プラズマ照射培地で培養した EB において増加傾向にあった。以上の事実から、EB 形成後 12 日目の EB において、培地中の  $H_2O_2$  が *Fgf4* と *Fgfr2c* の発現を促進し、FGF4 シグナルが促進し、外胚葉への分化が促進することが明らかとなった。

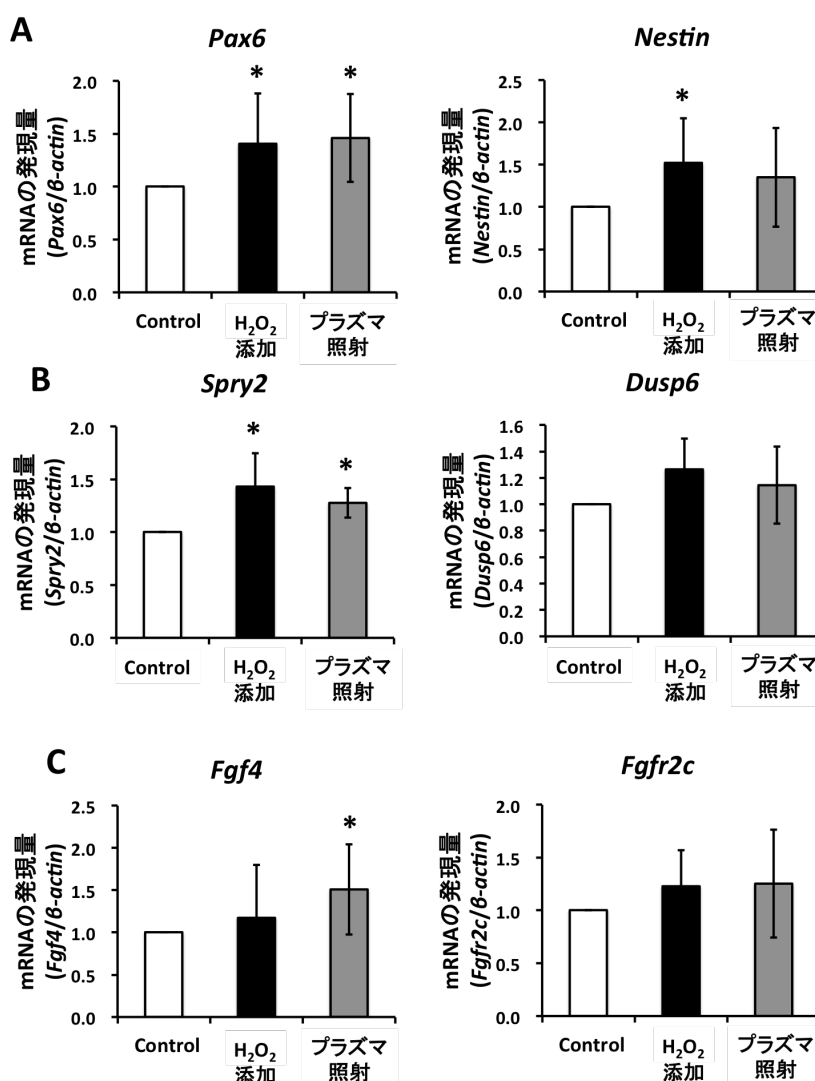


図 20: 培地中の  $H_2O_2$  は FGF4 シグナルを促進し、外胚葉への分化を促進する

A:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 12 日目の EB における外胚葉マーカー遺伝子 (*Pax6* と *Nestin*) の mRNA の発現を示す。示した *Pax6*/ $\beta$ -actin、*Nestin*/ $\beta$ -actin mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。B:  $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 12 日目の EB における FGF4 シグナルの標的遺伝子 (*Spry2* と *Dusp6*) の mRNA の発現を示す。示した *Spry2*/ $\beta$ -actin、

*Dusp6/β-actin* mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。C : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 12 日目の EB における FGF4 シグナル構成因子 (*FGF4* と *Fgfr2c*) の mRNA の発現を示す。示した *Fgf4/β-actin*、*Fgfr2c/β-actin* mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。全てのグラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 。

### 3.2.6. 活性種の神経細胞分化における機能

近年、プラズマ照射培地が神経幹細胞の神経細胞への分化が促進することが報告されている [56]。この報告では、この分化への影響の原因については不明であった [56]。本研究でも H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地により外胚葉への分化が促進したことから、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化において神経細胞への分化が促進していると考えた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地、または、プラズマ照射培地で 12 日間培養した EB における、神経細胞マーカー遺伝子の *Tubulin Beta 3* (*Tubb3*)、アストロサイトマーカー遺伝子の *Glial fibrillary acidic protein* (*GFAP*)、オリゴデンドロサイトマーカー遺伝子の *Oligodendrocyte transcription factor 1* (*Olig1*) の発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した (図 21)。その結果、*Tubb3* の発現量のみが両培地で有意に増加した。しかし、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB における、*GFAP* と *Olig1* の発現量は共に変化しなかった。以上の事実から、培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が外胚葉から神経細胞への分化を特異的に促進し、グリア細胞への分化には影響しないことが明らかとなった。

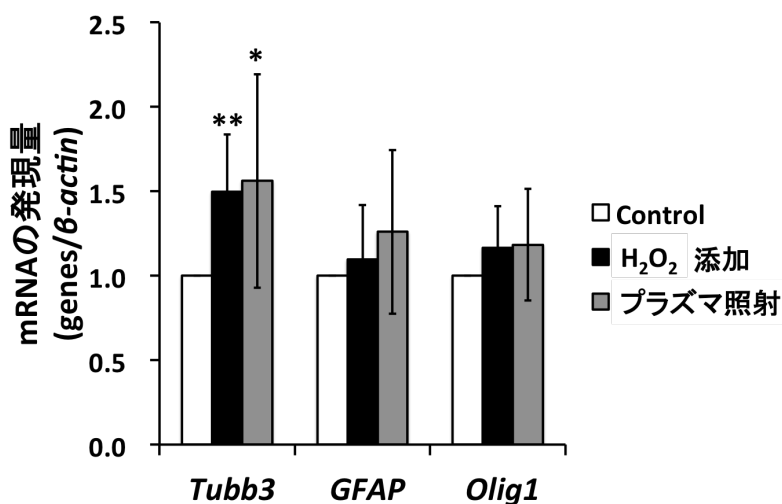


図 21: 培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は神経細胞への分化を促進する

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地で培養した EB 形成開始してから 12 日目の EB における神経細胞マーカー遺伝子の *Tubb3*、アストロサイトマーカー遺伝子の *GFAP*、オリゴデンドロサイトマーカー遺伝子の *Olig1* の mRNA の発現を示す。示した *Tubb3/β-actin*、*GFAP/β-actin*、*Olig1/β-actin* mRNA の値は、Control を 1 とした場合の相対値である。グラフの値は、試行回数 3 回分の平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。有意差は以下のように定義し、図に示した。\*,  $P < 0.05$ 、\*\*,  $P < 0.01$ 。

## 4. 考察

本研究で解明した、「プライム状態の ESD-EpiSCs における *O*-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞へ戻す際の *O*-GlcNAc の機能」と、「ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果」について考察した。以下、2 つのテーマに分けて考察を述べ、最後に、「細胞内・細胞外因子による、多能性幹細胞の未分化・分化に関わるシグナル調節」について考察を述べる。

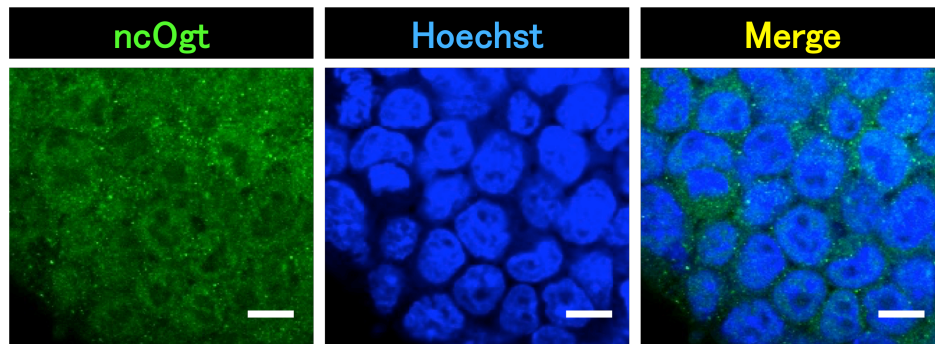
### 4.1. プライム状態の ESD-EpiSCs における *O*-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞へ戻す際の *O*-GlcNAc の機能

本研究で、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs へ移行する過程で、*L-0ga* と *S-0ga* の発現が顕著に増加するが、*nc0gt* の発現は変化しないことを明らかにした。ナイーブ状態の ES 細胞を用いた EB 形成による解析から、EB 形成開始後 2 日目では *nc0gt* の発現は変化せず、4 日目以降から有意に減少することが報告されている [32]。一般的に、EB 形成開始後 2 日目~2.5 日目の細胞は、エピブラストの発生ステージ（プライム状態）に対応すると考えられているため、本研究で示した「*nc0gt* の発現は、ナイーブ状態からプライム状態へ移行しても変わらない」という結果と一致している。プライム状態のヒト ES 細胞を用いた EB 形成による解析から、*nc0GT* と *L-0GA* の発現は分化すると急速に減少することが報告されている [34]。プライム状態の ESD-EpiSCs からの分化においても、プライム状態のヒト ES 細胞と同様に、*nc0gt* と *L-0ga* の発現が減少することが予想された。

前述したが、本研究で、ナイーブ状態のマウス ES 細胞とプライム状態の ESD-EpiSCs における *nc0gt* の発現が変化しないことを明らかにした。また、免疫染色の結果、ナイーブ状態でもプライム状態でも *nc0gt* は、核と細胞質に同程度、局在していることを明らかにした (図 22)。*0gt* の 3 つのアイソフォームを認識する抗 *0gt* 抗体を用いた免疫染色の結果、ナイーブ状態のマウス ES 細胞で *0gt* は核内よりも細胞質に局在する *0gt* が多いことが、他の研究グループにより報告されている [32]。本研究との結果と他の研究グループによる結果の違いは、用いている抗 *0gt* 抗体の認識するアイソフォームの違いであると考えられる。本研究では *nc0gt* を特異的に認識する抗体を用いているため、他の研究グループの結果は、細胞質にある *m0gt* と *s0gt* の発現の分だけ細胞質での染色強度が高くなったと考えられる。

HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来の細胞株）の細胞質において、*S-0ga* が脂肪滴の表面に局在していることが報告されている [57]。また、脂肪滴表面上の *S-0ga* は、プロテアソームを活性化し、活性化したプロテアソームが脂肪滴表面に局在するタンパク質を分解することが報告されている [57]。本研究で、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行の過程で、細胞質の *S-0ga* の発現が顕著に増加することを明らかにした。マウス、または、ヒトのナイーブ状態とプライム状態を比較した場合、細胞質に局在する脂肪滴の量は、プライム状態の方が多い

ことが報告されている [58]。代謝は脂肪滴の産生に密接に関与している。ナイーブ状態の多能性幹細胞は、ミトコンドリア呼吸と解糖系により代謝を行っており、一方、プライム状態の多能性幹細胞は、ミトコンドリア呼吸ではなく解糖系により代謝を行っている [71]。両状態における代謝経路の違いが脂肪滴の量に関与していることが示唆される。ナイーブ状態からプライム状態への移行において、細胞質内で増加する S-0ga は脂肪滴の表面に局在している可能性があり、脂肪滴表面局在タンパク質の分解を促進している可能性がある。



**図 22： ナイーブ状態のマウス ES 細胞において ncOgt は細胞質と核に局在する**

ナイーブ状態のマウス ES 細胞と、抗 Ogt 抗体 (H-300、緑色) を用いた免疫染色の結果を示す。ナイーブ状態のマウス ES 細胞において ncOgt は、核と細胞質に局在していた。核は Hoechst (青色) によって染めた。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$  を示す。示した写真は試行回数 3 回のうちの代表するものである。

略語説明: ncOgt, nucleocytoplasmic Ogt.

さらに、本研究は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行において、細胞質内の 130 kDa のタンパク質上の O-GlcNAc のみが減少することを明らかにした。この O-GlcNAc の減少は、ナイーブ状態からプライム状態への移行に伴う L-0ga、または、S-0ga の増加による影響であると考えられる。130 kDa 以外の、95 kDa の細胞質のタンパク質、70 kDa の核内のタンパク質上の O-GlcNAc がナイーブ状態からプライム状態への移行に伴い増加することを明らかにした。本研究では、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行において ncOgt の発現は変化しないことを明らかにしたが、mOgt と sOgt の発現の変化については不明である。いくつかのタンパク質上の O-GlcNAc がナイーブ状態からプライム状態への移行に伴い増加した原因として、mOgt と sOgt の発現が移行に伴い増加していることが考えられる。

本研究で、プライム状態の ESD-EpiSCs の生存に Ogt が必須であることを明らかにした。ナイーブ状態のマウス ES 細胞においても、Ogt は生存に必須であることが報告されている [29]。これらの事実から、ナイーブ状態とプライム状態において Ogt はアポトーシス促進シグナル経路を抑制することで細胞死を抑制していることが示唆された。プライム状態のヒト ES 細胞において、OGA はプライム状態の未分化性の維持には関与しないことが報告されている [34]。本研究では、プライム状態の ESD-EpiSCs においても、Oga はプライム状態の未分化性維持には関与しないことを明らかにした。本研究と他の研究から、ヒトとマウスのプライム状態では、共通して、Oga がプライム状態の未分化性の維持に関与しないことが明らかとなった。

Ogt と Oga の両者が、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の rESC の移行に必須であることを明らかにした。しかし、Ogt と Oga の両者が、ナイーブ状態への移行に必須な理由は不明である。この問題を解決するためには、以下の 3 種の実験を行う必要があると考えられた。

(1) ナイーブ状態への移行の過程で Ogt と Oga が必要となるタイミングを明らかにする。(2) ナイーブ状態への移行における Ogt と Oga の各アイソフォームの発現と局在を明らかにする。(3) ナイーブ状態とプライム状態、両状態における O-GlcNAc を持つタンパク質を同定する。

近年、プライム状態のヒトの多能性幹細胞をナイーブ状態に移行させる研究が盛んに行なわれている[6]。しかし、ナイーブ状態のヒト ES/iPS 細胞に関する報告は少ない。報告されているヒト ES/iPS 細胞のナイーブ化の方法には「遺伝子導入を用いたナイーブ化」と、「遺伝子導入を用いないナイーブ化」がある。例えば、前者の「遺伝子導入を用いたナイーブ化」には、ヒト ES 細胞に KLF4 と NANOG を過剰発現させ、そこに LIF、PD0325901 (FGF シグナル阻害剤)、CHIR99021 (Wnt シグナル促進剤) を加えるという方法がある[72]。後者の「遺伝子導入を用いないナイーブ化」には、ヒト ES 細胞に、LIF、ActivinA、PD0325901、CHIR99021、b-rapidly accelerated fibrosarcoma (B-RAF) 阻害剤、Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC) 阻害剤、Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤を加えるという方法がある[73]。本研究により、プライム状態からナイーブ状態への移行に Ogt と Oga の両者が必要であることを明らかにした。既存のナイーブ化法に、「遺伝子導入や阻害剤を用いた O-GlcNAc の量の調節」を併用することでヒトのナイーブ化効率が増加することが期待される。

本研究は、プライム状態の ESD-EpiSCs における O-GlcNAc の機能を明らかにした初めての報告である。いくつかの解析を詳細に行う必要はあるが、本研究により「プライム状態の ESD-EpiSCs の生存に O-GlcNAc が必要であること」と、「プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の rESC に移行するのに O-GlcNAc が必要であること」を明らかにした。

#### 4.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果の検討

本研究で、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加培地・プラズマ照射培地はナイーブ状態のマウス ES 細胞から神経細胞への分化を促進し、グリア細胞への分化には影響しないことを明らかにした。ラット間葉系幹細胞[59]、ラット皮質前駆細胞[60]、マウス Neuro2a 細胞[61]から神経細胞への分化時に細胞質内の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度が増加することが報告されている。これらの報告は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> は神経細胞分化において、主要な因子の一つであることを示している。近年、本研究の結果と同様に、プラズマ照射培地が神経幹細胞から神経細胞への分化を促進し、グリア細胞への分化には影響しないことが報告されている[56]。しかし、神経幹細胞の研究において、選択的な神経細胞分化促進の原因は不明であった。本研究では、プラズマ照射により生成される培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が選択的な神経細胞分化促進の原因であることを明らかにしたので、神経幹細胞においても同じ原因で神経細胞への分化を促進することが示唆される。

プラズマ照射培地はナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖を抑制することを明らかにした。



また、プラズマ照射は、*in vitro*、*in vivo*で、慢性の化学療法抵抗性の卵巣癌細胞の増殖も抑制することが報告されている[62]。しかし、本研究では、 $H_2O_2$ 添加培地・プラズマ照射培地はEBの増殖を抑制することはないことを明らかにした。そのため、プラズマ照射による増殖抑制効果は、細胞の種類や、状態によって影響が異なることが明らかとなった。

近年、造血幹細胞[36]や、成体心筋幹細胞[37]において、細胞質内の低濃度の $H_2O_2$ は未分化性維持に寄与し、一方、細胞質内高濃度の $H_2O_2$ は分化に寄与することが報告されている。 $H_2O_2$ などの活性酸素種によるレドックスシグナルは細胞の分化状態を制御している。いくつかの研究グループが、レドックスシグナルが転写因子のDNA結合を抑制し、転写を制御することを報告している[63]。例えば、主要な未分化性維持転写因子であるOct3/4は、レドックスシグナルによりDNA結合が抑制され転写が抑制されることで、未分化性を維持することができなくなることが報告されている[64]。ナীব状態のマウスES細胞において、レドックスシグナルは、未分化・分化を調節する主要シグナルの一つである。本研究では、 $H_2O_2$ 添加培地、または、プラズマ照射培地中の $H_2O_2$ が、*Fgf4*と*Fgfr2c*の転写を促進することを明らかにした。この転写の促進は、 $H_2O_2$ によるレドックスシグナルの活性化が原因である可能性がある。

さらに、本研究で、プラズマ照射が*Lrp5*、*Lrp6*、*Fzd1*、*Fzd5*（全てWntシグナル構成因子）の転写を抑制することを明らかにした。この転写の抑制に $H_2O_2$ は関与しないことも明らかにした。ゆえに、Wntシグナル構成因子の転写抑制は、プラズマ照射により生成された $H_2O_2$ 以外の活性種による影響であることが示唆された。プラズマ照射により生成される $H_2O_2$ 以外の活性種としては、 $O_3$ 、 $NO_3^-$ 、 $ONOO^-$ などがあり[65]、これらによる影響であることが予想された。

本研究では、分化に関わるシグナルとして、FGF4シグナルとWntシグナルに着目した。しかし、活性酸素などにより活性化したレドックスシグナルが他の多くのシグナル経路を制御していることが報告されている[63]。例えば、ヒトの肝臓癌の細胞において、転写因子である signal transducer and activator transcription factor 3 (STAT3)の転写活性がレドックスシグナルにより抑制されることが報告されている[66, 67]。これは、STAT3の418番目、426番目、468番目のシステインが、酸化ストレスによりS-グルタチオニル化されることでSTAT3のDNA結合が抑制されるためである[66, 67]。ナীব状態のマウスES細胞において、STAT3は、未分化性維持に必須なシグナルであるLIFシグナルの下流で活性化される因子である。 $H_2O_2$ 添加培地やプラズマ照射培地によりLIF/STAT3シグナルが抑制されている可能性がある。

近年、細胞内のミトコンドリアから産生された $H_2O_2$ 、または、細胞外から取り込まれ蓄積した $H_2O_2$ などのROSが組織幹細胞の老化を調節していることが報告された[38, 39]。様々な組織の細胞はアポトーシスや損傷により欠如すると、その組織に特異的に分化できる能力をもつ組織幹細胞により再構築が行われる。組織幹細胞は、組織特異的な分化能力以外にも、多能生幹細胞のように自己複製能を有している。組織幹細胞は加齢に伴い老化し、老化した組織幹細胞は分化能の低下、自己複製能の低下、アポトーシスなどが引き起こされ、これらの現象は細胞内のROSによる影響であるとされている[38, 39]。例えば、マウスの造血幹細胞や神経幹細胞は、加齢に伴い細胞内のROS

の濃度が高くなり、に、増殖異常、悪性腫瘍化、自己複製能の抑制などが引き起こされる [40, 68, 69]。しかし、組織幹細胞の老化における ROS が、どのようなシグナル経路に影響を与えているのかについては、不明な点が多い。「細胞内の ROS の蓄積は組織幹細胞の老化を促進する」という報告がある一方で、ショウジョウバエにおいて、細胞内の ROS は造血幹細胞からの正確な分化に寄与するという報告もある [70]。以上の事実は、組織幹細胞の老化における ROS の機能は、細胞内に蓄積した濃度によって異なることを示唆している。本研究では、EB 形成において、培地中の  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを促進することを明らかにした。ヒトの造血幹細胞において FGF4 シグナルは増殖に関与するので、造血幹細胞の老化において  $H_2O_2$  が FGF4 シグナルを促進し、増殖異常を引き起こしている可能性が考えられた。

#### 4.3. 細胞内・細胞外因子による、多能性幹細胞の未分化・分化に関わるシグナル調節

本研究では、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化において、細胞外の活性種が Wnt シグナルを抑制することを明らかにした。Wnt シグナルが活性化すると、 $\beta$ -catenin が核に移行し、標的遺伝子の転写を促進する。ヒト CaP 細胞（ヒト前立腺癌細胞）の細胞質、および、核内の  $\beta$ -catenin は *O*-GlcNAc 修飾を受けており、 $\beta$ -catenin 上の *O*-GlcNAc は  $\beta$ -catenin の局在を調節し、最終的に Wnt シグナルを調節していることが報告されている [74]。細胞質にある  $\beta$ -catenin が *O*-GlcNAc 修飾を受けると、核に移行することができず、細胞質に蓄積する。細胞質の *O*-GlcNAc 化  $\beta$ -catenin から *O*-GlcNAc が分解されると  $\beta$ -catenin は核に移行することができる。また、核内にある  $\beta$ -catenin が *O*-GlcNAc 修飾を受けると、細胞質に移行せずに核内に蓄積する。以上の事実から、Wnt シグナルは細胞外からの活性種と核・細胞質内の *O*-GlcNAc の両者により調節されている。Wnt シグナル以外にも、細胞外からの活性種が NF- $\kappa$ B シグナルや PI3K/Akt シグナルを調節しており、これらのシグナル構成因子である c-Rel (NF- $\kappa$ B シグナル構成因子) や Akt (PI3K/Akt シグナル構成因子) は *O*-GlcNAc 修飾を受けることも報告されている [75-77]。c-Rel 上の *O*-GlcNAc は c-Rel の転写活性を調節し、Akt 上の *O*-GlcNAc は Akt のリン酸化（活性化）を調節している [76, 77]。ナイーブ状態のマウス ES 細胞において NF- $\kappa$ B シグナルは分化を促進し、PI3K/Akt シグナルは未分化性の維持・生存に必須なシグナルである [6]。以上の事実より、多能性幹細胞の未分化性・分化に関わる多くのシグナルは細胞外因子と細胞内因子により複雑に調節されていることが考えられた。

マウス ES 細胞において、細胞外の  $H_2O_2$  が細胞膜上のグルコーストランスポーター1 (GLUT1) の発現を促進し、細胞内に取り込むグルコースの濃度が増加することが報告されている [78]。また、マウス筋肉由来の細胞において GLUT1 の発現が促進すると核・細胞質内の *O*-GlcNAc が増加することも報告されている [79]。細胞膜上の GLUT1 によりグルコースが細胞内に取り込まれると、ヘキソサミン生合成経路により糖基質の UDP-GlcNAc が生成される。以上の事実から、多能性幹細胞において、細胞外の活性種はシグナルを調節するだけでなく、*O*-GlcNAc の発現を調節していることが示唆された。核・細胞質内の *O*-GlcNAc と細胞外の活性種は依存的に、あるいは、非依存的に複雑にシグナルを制御することで、多能性幹細胞の未分化・分化を調節していることが考えられた。

## 5. 結論

本研究で、「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」として核・細胞質内の *O*-GlcNAc、細胞外の活性種に着目し、「プライム状態の ESD-EpiSCs の生存に *O*-GlcNAc が必要である」ことを見出した。さらに、「プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態の rESCs への移行において *O*-GlcNAc が必要である」ことも明らかにした。また、「培地中の活性種がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化にあたる影響」を明らかにし、プラズマ照射がナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に関与することを初めて示した。以下、2つのテーマに分けて結論を述べる。

### 5.1. プライム状態の ESD-EpiSCs における *O*-GlcNAc の機能と、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態のマウス ES 細胞へ戻す際の *O*-GlcNAc の機能の解明

ナイーブ状態のマウス ES 細胞において、*Ogt* は生存と未分化性の維持に必須な因子である。本研究は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞からプライム状態の ESD-EpiSCs への移行の過程で、細胞質内の *L*-*Oga* と *S*-*Oga* の発現が顕著に増加するが、核・細胞質内の *ncOgt* の発現は変化しないことを明らかにした (図 23)。また、プライム状態の ESD-EpiSCs において *Ogt* は生存に必須であるが、未分化性の維持には関与しないことも初めて明らかにした。しかし、プライム状態の ESD-EpiSCs における *Oga* の機能については不明である。ナイーブ状態からプライム状態への移行に *Ogt* は必須であるが、*Oga* は関与しないことが報告されている [33]。本研究では、プライム状態の ESD-EpiSCs からナイーブ状態への移行に、*Ogt* と *Oga* の両者が必要であることも初めて明らかにした。これらの結果は、効率的なナイーブ状態のヒト ES 細胞の樹立につながることを期待される。また、マウスを含めた様々な哺乳類の ES 細胞における *O*-GlcNAc 修飾を受けるタンパク質を同定することで、哺乳類のうち“なぜマウス ES 細胞のみがナイーブ状態を維持できるのか”の問題解決に貢献することが期待される。

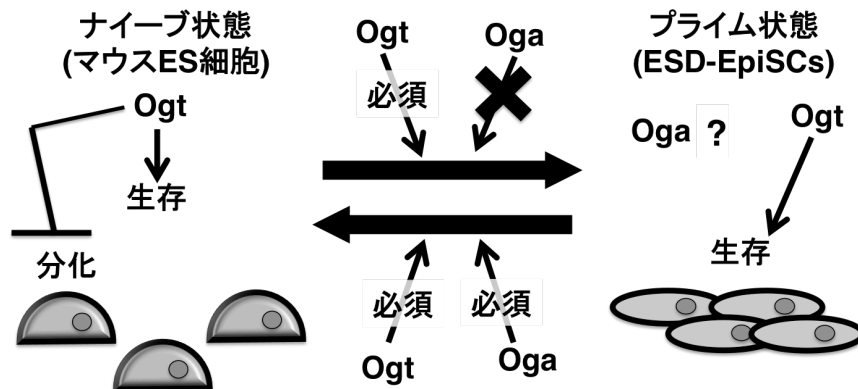


図 23 : ナイーブ状態のマウス ES 細胞とプライム状態の ESD-EpiSCs の遷移における *Ogt* と *Oga* の機能

ナイーブ状態において、*Ogt* は生存性・未分化性維持に必須である。ナイーブ状態からプライム状態への移行において、細胞質内の *Oga* の発現が顕著に増加した。プライム状態において *Ogt* は生存に必須であるが未分化性には関与しなかった。ナイーブ状態からプライム状態への移行には *Ogt* のみが必須であることが報告されている。プライム状態からナイーブ状態への移行には *Ogt* と *Oga* の両者が必須であった。

## 5.2. ナイーブ状態のマウス ES 細胞の分化に対する培地中の活性種の効果の検討

本研究は、初めて、 $H_2O_2$  添加培地・プラズマ照射培地という細胞外環境がマウス ES 細胞の分化にあたる影響を、シグナルへの影響を含め明らかにした（図 24）。プラズマ照射培地は、ナイーブ状態のマウス ES 細胞の増殖を抑制するが、未分化性には関与しないことを明らかにした。また、分化への影響を検討したところ、培地中の  $H_2O_2$  は、FGF4 シグナルを促進することで、エピプラスト、外胚葉、神経細胞への分化を促進することを明らかにした。また、神経細胞への分化を促進させるが、グリア細胞への分化には影響しないため、培地中の  $H_2O_2$  は選択的に神経細胞への分化を促進することが明らかとなった。一方、プラズマ照射培地は、Wnt シグナルを抑制することで、中胚葉、内胚葉への分化を著しく抑制することを解明した。この、プラズマ照射培地による中胚葉・内胚葉分化抑制はプラズマ照射により生成される培地中の  $H_2O_2$  以外の活性種による影響であることも解明した。以上の事実より、各種シグナルは、翻訳後修飾などの細胞内環境はもちろん、活性酸素種などの細胞外環境によっても制御されることが明らかとなった。実際に行われている生体へのプラズマ照射医療においても、本研究のようなシグナル分子機構が機能している可能性がある。また、造血幹細胞などの組織幹細胞の老化においても、FGF4 シグナル経路が、 $H_2O_2$  により促進されている可能性がある。

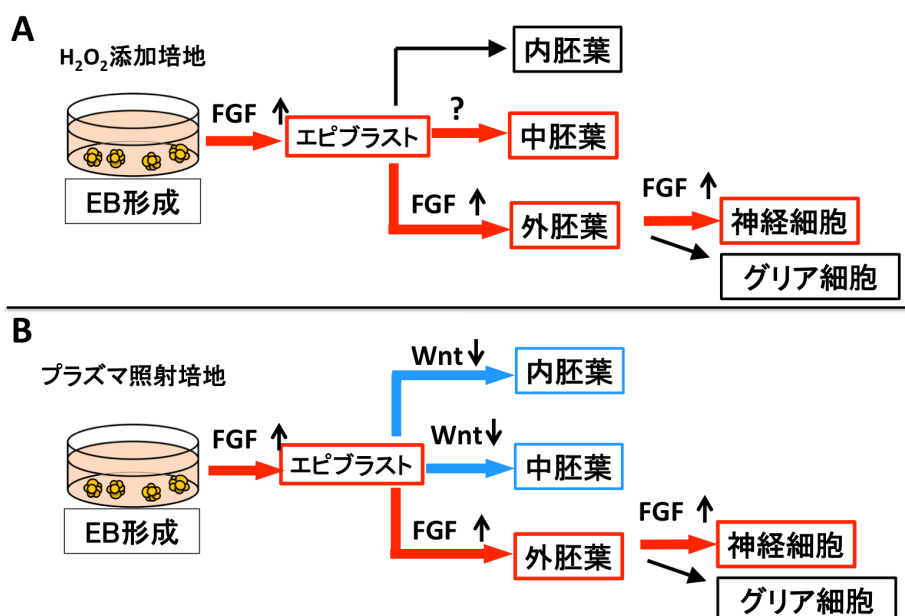


図 24：培地中の活性種がマウス ES 細胞の分化にあたる影響

培地中の  $H_2O_2$  が FGF 4 シグナルを活性化し、エピプラスト、外胚葉、神経への分化を促進することを明らかにした。また、培地中の  $H_2O_2$  が中胚葉への分化も促進したが、その効果がどのシグナルの変化による結果なのかは不明である。プラズマ照射培地も FGF 4 シグナルを活性化し、エピプラスト、外胚葉、神経への分化を促進することを明らかにした。これらの効果は、 $H_2O_2$  添加培地の場合と同じ結果なので、プラズマ照射により培地中に生成された  $H_2O_2$  による影響である。プラズマ照射により生成された  $H_2O_2$  以外の活性種が、Wnt シグナルを抑制し、内胚葉と中胚葉への分化を抑制することも明らかにした。

## 6. 謝辞

本研究は、創価大学大学院 工学研究科 生命情報工学専攻の西原祥子教授の指導、監修のもと行いました。学部4年の1年間、博士前期課程の2年間、博士後期課程の4年間の計7年間に渡り、西原教授から「研究に関する知識」、「研究に対する姿勢」、「基礎研究の重要性」など、多くのことを学ばせて頂きました。西原教授に心から感謝申し上げます。副査として創価大学大学院 工学研究科 生命情報工学専攻の高瀬明教授と青山由利教授には学位論文の査読と、本研究を遂行する上でのご助言をしていただきました。高瀬教授と青山教授に御礼申し上げます。本研究遂行期間には、内外の教授の方々、西原研究室の研究員、技術員、諸先輩方と同期の研究生、後輩、友人に支えて頂きました。特にES/iPSチームの方々には、研究はもちろん、日々の生活においても支えて頂きました。また、創価大学に入れて下さった父母、姉、祖父、祖母には常に激励を頂きながら、毎日問題なく研究を行うことができました。私を支えて下さった方々に心より御礼申し上げます。

## 7. 参考文献

- 1 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154–156.
- 2 Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634–7638.
- 3 Nichols J, Smith A. Naïve and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009;4:487–492.
- 4 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;4:663–676.
- 5 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;5:861–872.
- 6 Weinberger L, Ayyash M, Novershtern N *et al.* Dynamic stem cell states: naïve to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2016;17:155–169.
- 7 Niwa H, Ogawa K, Shimosato D *et al.* A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* 2009;460:118–122.
- 8 Dutta D. Signaling pathways dictating pluripotency in embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 2013;57:667–675.
- 9 Ye S, Liu D, Ying QL. Signaling pathways in induced naïve pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 2014;28:10–15.
- 10 Hackett JA, Surani MA. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell* 2014;15:416–430.
- 11 Zhou X, Contreras-Trujillo H, Ying QL. New insights into the conserved mechanism of pluripotency maintenance. *Curr Opin Genet Dev* 2015;34:1–9.
- 12 Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaillekh M *et al.* FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development* 2007;134:2895–2902.
- 13 Lanner F, Rossant J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development* 2010;137:3351–3360.
- 14 Hamilton WB, Kaji K, Kunath T. ERK2 suppresses self-renewal capacity of embryonic stem cells, but is not required for multi-lineage commitment. *PLoS One* 2013;8:e60907.
- 15 Hamilton WB, Brickman JM. Erk signaling suppresses embryonic stem cell self-renewal to specify endoderm. *Cell Rep* 2014;9:2056–2070.
- 16 Hirano K, Sasaki N, Ichimiya T *et al.* 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contributes to the differentiation of mouse embryonic stem cells via fas signaling. *PLoS One* 2012;7:e43440.
- 17 Hirano K, Sasaki N, Ichimiya T *et al.* 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the

- antibody HS4C3 contributes to the differentiation of mouse embryonic stem cells via fas signaling. *PLoS One* 2012;7:e43440.
- 18 Brons IG, Smithers LE, Trotter MW *et al.* Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 2007;448:191–195.
- 19 Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA *et al.* New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;448:196–199.
- 20 Illich DJ, Zhang M, Ursu A *et al.* Distinct signaling requirements for the establishment of ESC pluripotency in late-stage EpiSCs. *Cell Rep.* 2016;15:787–800.
- 21 Valko M, Leibfritz D, Moncol J *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007;39:44–84.
- 22 Sauer H, Wartenberg M. Reactive oxygen species as signaling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cells and tumor-induced angiogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 2005;7:1423–34.
- 23 Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for *O*-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* 1984;259:3308–3317.
- 24 Nagel AK, Ball LE. *O*-GlcNAc transferase and *O*-GlcNAcase: achieving target substrate specificity. *Amino Acids* 2014;46:2305–2316.
- 25 Hanover JA, Yu S, Lubas WB *et al.* Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of *O*-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003;409:287–297.
- 26 Love DC, Kochan J, Cathey RL *et al.* Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of *O*-linked GlcNAc transferase. *J. Cell. Sci.* 2003;116:647–654.
- 27 Heckel D, Comtesse N, Brass N *et al.* Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* 1998;7:1859–1872.
- 28 Comtesse N, Maldener E, Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;283:634–640.
- 29 Donnell NO, Zachara N, Hart G *et al.* Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Molecular and Cellular Biology* 2004;24:1680–1690.
- 30 Vella P, Scelfo A, Jammula S *et al.* Tet proteins connect the *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol. Cell* 2013;49:645–656.
- 31 Shi FT, Kim H, Lu W *et al.* Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem

- cells. *J. Biol. Chem.* 2013;288:20776–20784.
- 32 Jang H, Kim TW, Yoon S *et al.* *O*-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 2012;11:62–74.
- 33 Speakman CM, Domke TC, Wongpaiboonwattana W *et al.* Elevated *O*-GlcNAc levels activate epigenetically repressed genes and delay mouse ESC differentiation without affecting naïve to primed cell transition. *Stem Cells* 2014;32:2605–2615.
- 34 Maury JJ, Chan KK, Zheng L *et al.* Excess of *O*-linked *N*-acetylglucosamine modifies human pluripotent stem cell differentiation. *Stem Cell Res.* 2013;11:926–937.
- 35 Jackson M, Taylor AH, Jones EA *et al.* The culture of mouse embryonic stem cells and formation of embryoid bodies. *Methods Mol. Biol.* 2010;633:1–18.
- 36 Santos DM, Santos MM, Moreira R *et al.* Synthetic condensed 1,4-naphthoquinone derivative shifts neural stem cell differentiation by regulating redox state. *Mol Neurobiol* 2013;47:313–324.
- 37 Gurusamy N, Mukherjee S, Lekli I *et al.* Inhibition of p53 stimulates the production of reactive oxygen species and induces differentiation in adult cardiac stem cells. *Antioxid Redox Signal* 2009;11:589–600.
- 38 Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med.* 2014;8:870–880.
- 39 Liang R, Ghaffari S. Stem cells, redox signaling, and stem cell aging. *Antioxid Redox Signal* 2014;12:1902–1916.
- 40 Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 2010;464:520–528.
- 41 Kong MG, Kroesen G, Morfil G *et al.* Plasma medicine: an introductory review. *New. J. Phys.* 2009;11:115012.
- 42 Ermolaeva SA, Varfolomeev AF, Chernukha MY *et al.* Bactericidal effects of non-thermal argon plasma in vitro, in biofilms and in the animal model of infected wounds. *J. Med. Microbiol.* 2011;60:75–83.
- 43 Fridman G, Peddinghaus M, Balasubramanian M *et al.* Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 2006;26:425–42.
- 44 Kalghatgi S, Friedman G, Fridman A *et al.* Endothelial cell proliferation is enhanced by low dose non-thermal plasma through fibroblast growth factor-2 release. *Ann Biomed Eng* 2010;38:748–757.
- 45 Lloyd G, Friedman G, Jafri S *et al.* Gas plasma: medical uses and developments in wound care. *Plasma Processes and Polymers* 2010;7:194–211.



- 46 Vandamme M, Robert E, Lerondel S *et al.* ROS implication in a new antitumor strategy based on non-thermal plasma. *Int. J. Cancer.* 2012;130:2185-94.
- 47 Murakami T, Niemi K, Gans T *et al.* Interacting kinetics of neutral and ionic species in an atmospheric-pressure helium-oxygen plasma with humid air impurities. *Plasma Sources Science and Technology* 2013;22:015003.
- 48 Gross BJ, Kraybill BC, Walker S. Discovery of *O*-GlcNAc transferase inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 2005;127:14588-14589.
- 49 Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA. Modulation of *O*-linked *N*-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide *O*-GlcNAc- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase inhibitor *O*-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-*N*-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* 1998;273:3611-3617.
- 50 Nagy A, Rossant J, Nagy R *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993;90:8424-8428.
- 51 Winter J, Wende K, Masur K *et al.* Feed gas humidity: a vital parameter affecting a cold atmospheric-pressure plasma jet and plasma-treated human skin cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2013;46:295401.
- 52 Winter J, Tresp H, Hammer MU *et al.* Tracking plasma generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2014;47:285401.
- 53 Price FD, Yin H, Jones A *et al.* Canonical Wnt signaling induces a primitive endoderm metastable state in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 2013;31:752-764.
- 54 Lien W H, Fuchs E. Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Genes Dev.* 2014;28:1517-1532.
- 55 Kosaka N, Kodama M, Sasaki H *et al.* FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation *FASEB J.* 2006;20:1484-1485.
- 56 Xiong Z, Zhao S, Mao X *et al.* Selective neuronal differentiation of neural stem cells induced by nanosecond microplasma agitation. *Stem Cell Research* 2013;12:387-399.
- 57 Keembiyehetty CN, Krzeslak A, Love DC *et al.* A lipid-droplet-targeted *O*-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J. Cell. Sci.* 2011;124:2851-2860.
- 58 Sperber H, Mathieu J, Wang Y *et al.* The metabolome regulates the epigenetic landscape during naïve-to-primed human embryonic stem cell transition. *Nat. Cell Biol.* 2015;17:1523-1535.

- 59 Wang N, Xie K, Huo S *et al.* Suppressing phosphatidylcholine-specific phospholipase C and elevating ROS level, NADPH oxidase activity and Rb level induced neuronal differentiation in mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 2007;100:1548-1557.
- 60 Konopka R, Kubala L, Lojek A *et al.* Alternation of retinoic acid induced neural differentiation of P19 embryonal carcinoma cells by reduction of reactive oxygen species intracellular production. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2008;29:770-774.
- 61 Shinjyo N, Kita K. Relationship between reactive oxygen species and heme metabolism during the differentiation of Neuro2a cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007;358:130-135.
- 62 Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K *et al.* Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 2013;8:e81576.
- 63 Ren F, Wang K, Zhang T *et al.* New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochim. Biophys. Acta* 2015;1850:1518-1526.
- 64 Guo Y, Einhorn L, Kelley M *et al.* Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells* 2004;22:259-264.
- 65 Tian W, Kushner MJ. Atmospheric pressure dielectric barrier discharges interacting with liquid covered tissue. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2014;47:165201.
- 66 Xie Y, Kole S, Precht P *et al.* S-glutathionylation impairs signal transducer and activator of transcription 3 activation and signaling. *Endocrinology* 2009;150:1122-1131.
- 67 Li L, Cheung S H, Evans E L *et al.* Modulation of gene expression and tumor cell growth by redox modification of STAT3. *Cancer Res.* 2010;70:8222-8232.
- 68 Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* 2008;132:681-696.
- 69 Paik JH. FoxOs cooperatively regulate diverse pathways governing neural stem cell homeostasis. *Cell Stem Cell* 2009;5:540-553.
- 70 Owusu-Ansah E, Banerjee U. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haema-topoietic progenitors for differentiation. *Nature* 2009;461:537-541.
- 71 Zhou W, Choi M, Margineantu D *et al.* HIF1 $\alpha$  induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J* 2012;31:2103-2116.
- 72 Takashima Y, Guo G, Loos R *et al.* Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 2014;158:1254-1269.
- 73 Theunissen T, Friedli, He Y *et al.* Molecular Criteria for defining the naïve human pluripotent state. *Cell Stem Cell* 2016;19:1-14.
- 74 Sayat R, Leber B, Grubac V *et al.* O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 2008;314:2774-2787.

- 75 Zhang J, Wang X, Vikash V *et al.* ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:4350965.
- 76 Ramakrishnan P, Clark PM, Mason DE *et al.* Activation of the transcriptional function of the NF- $\kappa$ B protein c-Rel by O-GlcNAc glycosylation. *Sci Signal* 2013;6:ra75.
- 77 Wang S, Huang X, Sun D *et al.* Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PLoS One* 2012;7:e37427.
- 78 Na SI, Lee MY, Heo JS *et al.* Hydrogen peroxide increases [<sup>3</sup>H]-2-deoxyglucose uptake via MAPKs, cPLA<sub>2</sub>, and NF- $\kappa$ B signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:1007-1018.
- 79 Buse MG, Robinson KA, Marshall BA *et al.* Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:E241-250.