

内容の要旨及び審査結果の要旨

【書式 1 1】

令和 3 年 1 月 30 日

氏名（本籍）	Pecori Federico		
学位の種類	博士（工学）		
学位記番号	甲 第 177 号		
学位記の授与日	令和 3 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	Characterization and functional analysis of glycosylation in mouse pluripotent stem cells		
論文審査機関	理工学研究科委員会		
論文審査委員	主査委員	西原 祥子	印
	委員	高瀬 明	印
	委員	梅谷内 晶	印

<論文の内容の要旨>

本論文は、多能性幹細胞がとる 2 つの未分化なステージ、「ナイーブ状態」とナイーブ状態より少し分化が進んだ「プライム状態」に注目し、糖鎖とそれを合成する酵素の網羅的発現解析、及び、ムチン型糖鎖の機能解析を行なった。その結果、(1) 多能性幹細胞のナイーブ状態からプライム状態への遷移で細胞表面の様々な糖鎖構造が顕著な変化を示し、それを一括して polycomb repressive complex 2 (PRC2) が制御していること、(2) *O*-結合型でムチン型糖鎖の一種である T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc) とその構造を合成する C1galT1 が、ナイーブ状態の多能性幹細胞の維持に、Wnt シグナルを介して関与していることを、新規に明らかにした。本論文は、緒論、方法、結果、考察、及び、結論から構成されており、以下にその要旨を述べる。

緒論

胚幹細胞細胞 (ES 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、マウスエピプラスト幹細胞は着床後の胚のエピプ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、その状態維持に関する機構には、多くの未解決な問題が残されている。マウス ES 細胞、及び、それから誘導することができるマウスエピプラスト様幹細胞 (エピ様幹細胞) は、*in vitro* で胚の初期発生を再現するものであり、ナイーブ状態からプライム状態への遷移メカニズムの解明を可能するモデルである。

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。細胞表面の糖鎖はその鍵を握るものの一つと考えられた。

本論文では、ナイーブ状態とプライム状態のステージに焦点を絞り、遷移における糖転移酵素などの発現と糖鎖構造の変化に対する網羅的解析、それらを引き起こす因子の同定、さらには、糖鎖の多能性維持への関与について研究を行った。

方法

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様幹細胞に遷移・分化させることができる。マウス ES 細胞とエピ様幹細胞において、real time PCR により糖転移酵素を含む糖鎖合成関連遺伝子の網羅的発現解析、種々の糖鎖構造を認識する抗体と糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンを用いたフローサイトメトリーによる細胞表面の糖鎖構造解析を行なった。さらに、顕著に発現が変化する糖鎖合成関連遺伝子に対し、チップアトラスにより発現制御に関わる因子を推定した。見出された因子に対する阻害剤で細胞を処理し、同様にフローサイトメトリーによる細胞表面の糖鎖構造解析と RNA seq による糖鎖合成関連遺伝子の発現解析を行なった。

さらに、LIF を添加して未分化状態を保ったナীব状態のマウス ES 細胞において、ムチン型糖鎖の一種である T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc) を合成する *C1galt1* をノックダウンし、Real-time PCR やウエスタンブロット解析による未分化性維持因子の発現の解析、各種シグナルに関連する因子の解析を行なった。

結果と考察

マウス ES 細胞とエビ様幹細胞の網羅的糖鎖プロファイリングから、糖鎖構造が発生の初期段階から劇的な変化を遂げるが明らかになった。さらに、チップアトラスと阻害剤を用いた解析から、この変化はクロマチンリモデラーである polycomb repressive complex 2 (PRC2) によって一括して制御されていることがわかった。この糖鎖構造全体を調節するネットワークの存在は、糖鎖構造発現制御の新たな概念を提供するものであった。

加えて、ナীব状態のマウス ES 細胞におけるムチン型糖鎖の機能解析を初めて行なった。*C1galt1* をノックダウンすると ES 細胞は分化し、*C1galt1* が合成する T 抗原は、マウス ES 細胞の多能維持に関与していた。Wnt の受容体の Frizzled-5 が T 抗原の修飾を受けており、それに結合するガレクチンにより Frizzled-5 のエンドサイトーシスが促進されていた。*C1galt1* ノックダウン細胞では、Frizzled-5 のエンドサイトーシスが阻害されて細胞表面の存在量が増加し、Wnt シグナルが過剰に増強され分化に進むことも明らかになった。これは、ムチン型糖鎖と Wnt シグナルの関連を明らかにした初めての例となった。

結論

本論文では、(1) 多能性幹細胞のナীব状態からプライム状態の遷移に伴う糖鎖のダイナミクスとその PRC2 による制御メカニズムを新規に見出した。また、(2) ムチン型糖鎖によるマウス ES 細胞の多能性の制御メカニズムを明らかにした。

<論文審査結果の要旨>

哺乳類の多能性幹細胞は異なる発生段階に対応する状態にあり、「ナীব状態」と「プライム状態」に分けられる。本論文では、糖鎖に着目して解析を行い、以下の点を明らかにした。

- (1) 多能性幹細胞のナীব状態からプライム状態への遷移・分化において、糖鎖構造が劇的に変化することを明らかにし、この変化が、クロマチンリモデラーである polycomb repressive complex 2 によって一括して制御されること、すなわち、糖鎖構造全体を調節するネットワークの存在を新規に見出した。
- (2) さらに、ナীব状態の多能性幹細胞における O-結合型ムチン型糖鎖の機能を初めて明らかにし、O-結合型糖鎖が Wnt シグナルに関わることを示した。

これらの結果は、糖鎖発現の制御とその機能に新たな概念を加えるものであり、それを十分に裏付けるデータもある。多能性幹細胞のみならず、組織幹細胞、癌幹細胞にまで共通すると考えられ、再生医療のみならず癌などの疾病にもその応用は広がる。

上記の理由により、本論文は学位論文に値すると認定する。

なお、研究の結果は、以下の論文に掲載された。

- (1) Pecori F, Yokota I, Hanamatsu H, Miura T, Ogura C, Ota H, Furukawa J, Oki S, Yamamoto K, Yoshie O, Nishihara S: A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition. *Sci Rep.* 2021 Jan 14;11(1):1276. doi: 10.1038/s41598-020-79666-4.
- (2) Pecori F, Akimoto Y, Hanamatsu H, Furukawa JI, Shinohara Y, Ikehara Y, Nishihara S: Mucin-type O-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis. *J Cell Sci.* 2020 Oct 23;133(20): jcs245845. doi: 10.1242/jcs.245845.

最終試験の結果の要旨

【書式12】

令和3年1月30日

フリガナ 申請者氏名	ペーコリ フェデリーコ Pecori Federico	専攻名	生命情報工学専攻
審査委員会委員	主査委員	西原 祥子	印
	委員	高瀬 明	印
	委員	梅谷内 晶	印

要旨

最終試験は、上記3名の審査委員により、令和3年1月26日に実施し、学位申請者に対して、研究内容に関する試問を行った。その結果、申請者は、博士（工学）としての十分な学力と研究能力を有するものと判定された。したがって、審査委員会は、最終試験を合格と認定した。