

|   |                                  |    |       |
|---|----------------------------------|----|-------|
| 京都大学  | 博士 (工学)                          | 氏名 | 安藤 悠太 |
| 論文題目  | 層状組織形成過程におけるマウス胚性幹細胞の多能性状態の領域特異性 |    |       |
| (論文内容の要旨)   |                                  |    |       |
| <p>本論文は、マウス胚性幹細胞の組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が組織内力学状態により生じることを明らかにすることを目的とし、微細構造培養基板を用いて細胞接着場を調節することにより、マウス胚性幹細胞に対して層状組織形成を誘導し、形成された層状組織における多能性状態の領域特異性を調べたものであり、全5章からなる。</p> <p>第1章は緒論であり、多能性幹細胞を用いた多細胞組織形成に関する研究の現状を概説し、組織形成過程における多能性状態変化の領域特異性の重要性を述べている。また、領域特異的な多能性状態の変化には組織内力学状態が重要であることから、微細構造培養基板を用いて組織形成を誘導することで、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態に及ぼす影響を解析する必要性を論じている。さらに、細胞接着が可能な領域を細線上のみに制限する微細加工メッシュ構造基板を用いることにより、細胞接着場の調節のみにより層状組織形成を誘導でき、形成された層状組織における多能性状態の領域特異性の観察が容易になることを述べている。</p> <p>第2章では、マウス胚性幹細胞の維持培養条件により定まる多能性状態に応じて、組織形成能力が異なることを検証するため、メッシュ構造基板を用いて平面的な組織成長を促すことで層状組織の形成を誘導し、多能性状態が組織形成に及ぼす影響を調べている。マウス胚性幹細胞のナイーブ状態と基底状態の2つの多能性状態に応じた層状組織形成の差異を調べるため、形成された層状組織の形状を観察した。3日間培養した結果、基底状態の細胞は不連続な層状組織を形成した一方で、ナイーブ状態の細胞は網目をすべて覆い連続した層状組織を形成した。また、ナイーブ状態の細胞の層状組織形成過程においては、網目を覆う際に生じる孔を囲むように、KRT8発現細胞がケラチン線維を発達させている様子が観察され、これらの細胞が網目を埋める過程に寄与している可能性が示唆された。以上のことから、基底状態のマウス胚性幹細胞と比較し、KRT8発現細胞群を含むナイーブ状態のマウス胚性幹細胞の方が、メッシュ構造基板上における層状組織形成能力が高いことを示した。このことは、組織形成の誘導において多能性状態の選択が重要であることを示しており、多細胞組織を構築する上で有用な知見が得られた。</p> <p>第3章では、細胞接着場の調節により誘導される層状組織形成過程において、マウス胚性幹細胞に生じる多能性状態の変化を明らかにするため、メッシュ構造基板上における層状組織形成に伴う遺伝子発現変化を調べている。まず、ナイーブ状態のマウス胚性幹細胞をメッシュ構造基板上で3日間培養して層状組織を形成させ、その後さらに3日間培養を継続した。その結果、層状組織の一部が突出してドーム状の立体組織が形成されることが観察された。また、この一連の組織形成過程において、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変化の網羅的解析を行った結果、始原生殖細胞様の</p> |                                  |    |       |

|   |         |    |       |
|---|---------|----|-------|
| 京都大学  | 博士 (工学) | 氏名 | 安藤 悠太 |
| <p>遺伝子発現変化が生じることが確認された。さらに、免疫蛍光染色法により、この結果に対応した多能性状態変化を示すタンパク質の発現が確認された。したがって、多能性維持培養液を用いた条件にも関わらず、細胞接着が可能な領域を制限したメッシュ構造基板上でマウス胚性幹細胞を培養すると、組織形成に伴い、多能性状態の変化が自発的に進行することが明らかとなった。この結果は、多能性幹細胞に対して細胞接着場を調節することにより、自発的な組織形成と分化を誘導できることを示唆したものである。</p> <p>第4章では、マウス胚性幹細胞の層状組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が、組織内力学状態により生じることが示すため、層状組織の組織形状を制御することで、領域特異的な組織内力学状態と多能性状態変化の関係を調べている。まず、メッシュ構造基板上でナイーブ状態のマウス胚性幹細胞が形成する層状組織は、厚さの異なる領域が連なる組織形状をなしており、領域によって異なる多能性状態を示すことに着目した。これらの領域は不規則に分布していたため、新しく設計した島状メッシュ構造基板を用いて、エッジ領域を有する島状の層状組織が互いに孤立して形成されるように組織形状を制御した。次に、このエッジ領域に対してレーザーアブレーションを行った結果、張力解放による組織の収縮が観察できた。また、エッジ領域においては、張力の発生に関わるアクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の顕著な発現が観察された。さらに、免疫蛍光染色法による観察および RT-qPCR 解析の結果、エッジ領域の細胞において、多能性マーカーである OCT3/4 の発現が低く、始原生殖細胞マーカーである AP-2<math>\gamma</math> が発現していることを明らかにした。この結果を受け、組織内力学状態と多能性状態変化を繋ぐ経路の一つとして知られている ERK シグナル伝達経路に着目したところ、エッジ領域特異的に ERK 活性化が観察されたことから、エッジ領域特異的な組織内力学状態が、ERK 活性化を介してマウス胚性幹細胞の多能性状態変化を引き起こしている可能性が示唆された。結果として、微細構造培養基板により組織形状を制御する本研究の独創的なアプローチにより、多能性幹細胞の組織形成過程において、組織内力学状態が領域特異的な多能性状態の変化に関与することを明らかにした。</p> <p>第5章は結論であり、本論文のまとめと展望を記述している。特に、結論として、マウス胚性幹細胞がメッシュ構造基板上で形成する層状組織において、その組織形状を制御することにより、組織内力学状態に応じて生じる多能性状態の領域特異性を明らかにしたことを述べている。</p> |         |    |       |

## (論文審査の結果の要旨)

本論文は、マウス胚性幹細胞の組織形成過程における領域特異的な多能性状態の変化が組織内力学状態により生じることを明らかにするために、微細加工メッシュ構造基板を用いて細胞接着場を調節することにより、層状組織形成を誘導し、その過程における多能性状態の領域特異性を調べた研究成果をまとめたものである。主な成果は次の通りである。

- (1) マウス胚性幹細胞の維持培養における基底状態とナイーブ状態に着目し、これらの多能性状態に応じて組織形成能力が異なることを明らかにした。特に、基底状態の細胞とは異なり、ナイーブ状態の細胞はメッシュ構造基板の網目をすべて覆い連続した層状組織を形成することを示した。これにより、組織形成誘導における多能性状態選択の重要性を示した。
- (2) メッシュ構造基板により誘導した層状組織形成過程において、マウス胚性幹細胞が有する初期胚発生を模倣する性質に着目し、遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果、始原生殖細胞様の遺伝子発現変化が自発的に生じることを示した。これにより、細胞接着場の調節により、組織形成と多能性状態の変化を誘導できることを示唆した。
- (3) 層状組織形成過程において生じる領域特異的な多能性状態の変化に着目し、島状メッシュ構造基板を用いた組織形状制御により、エッジ領域特異的な組織内力学状態と多能性状態変化の関係を調べた。島状の層状組織のエッジ領域においては、アクチンフィラメントとリン酸化ミオシン軽鎖の発達が観察されたことから、張力の存在が示唆された。また、エッジ領域の細胞は、多能性マーカーである OCT3/4 の発現低下と始原生殖細胞マーカーである AP-2 $\gamma$  の発現上昇を示すと同時に、ERK 活性化を示した。これにより、島状の層状組織におけるエッジ領域特異的な組織内力学状態が、ERK 活性化を介して多能性状態変化を引き起こすことが示唆された。

以上の成果は、微細構造培養基板を用いて組織形状を制御することにより、多能性幹細胞の組織形成過程における、組織内力学状態が多能性状態の領域特異性に及ぼす影響を明らかにしたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年4月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。