

細胞リプログラミングにおける分泌型EPHA7の  
機能の同定と解析

李 俊成

## 目次

要旨 .....	2
第一章 序論 .....	4
第二章 材料と方法 .....	8
第三章 結果 .....	15
第四章 考察 .....	47
引用文献 .....	50
謝辞 .....	57

## 要旨

体細胞に特定の転写因子を強制発現することで細胞のリプログラミングが誘導され、ES (胚性幹)細胞と同様の無限の分裂能と多能性を持つiPS (人工多能性幹)細胞が作製できる。細胞リプログラミングのメカニズムについては、遺伝子発現の網羅的な解析などによって徐々に明らかになっているが、リプログラミング過程に影響を及ぼす細胞間情報伝達経路については十分に解明されていない。本研究では、細胞間相互作用に関わる重要な因子であるEPH受容体とそのリガンドであるEPHRINファミリーに注目した。まず、マウス胚性線維芽細胞 (MEF)のリプログラミング過程におけるEPH受容体とEPHRINファミリーの遺伝子発現変化を定量的RT-PCRを用いて調べた。その結果、EPH受容体A7 (EPHA7)の発現が一過的に上昇している事を見出した。*Epha7*のノックダウンを行ったところ、NANOG陽性のiPS細胞コロニーの数が減少した。このことは、EPHA7の一過的発現上昇がマウス体細胞のリプログラミングに重要であることを示している。EPHA7には、全長型と分泌型 (切断型)のスプライスバリエントがあり、両方ともリプログラミング過程において一過的な発現上昇が見られた。そこで、どちらのスプライスバリエントが重要であるかを調べるために、*Epha7*をノックダウンしたMEFに全長型EPHA7を発現させるか、あるいは分泌型EPHA7を加える操作を行ったところ、分泌型EPHA7を加えた時にのみリプログラミング効率が上昇した。この結果は、分泌型EPHA7が細胞リプログラミングを制御する因子であることを示した。次に、分泌型EPHA7のリプログラミング制御メカニズムを検討した。マウスES細胞が分化する際にERK1/2が活性化すること、またリンパ腫細胞において、分泌型EPHA7がERK1/2の活性化を抑制することが報告されていたことから、分泌型EPHA7がERK1/2の活性化を制御することでリプログラミングを制御しているのではないかと考えた。そこで、リプログラミング過程におけるERK1/2 活性 (リン酸化型・活性型ERK1/2)の変化を調べたところ、リプログラミング過程の中期において活性型ERK1/2のレベルが低下することを見出した。*Epha7*のノックダウンを行うと、この活性型ERK1/2レベルの減少が抑制された。そこに分泌型EPHA7を添加すると、活性型ERK1/2レベルの減少が再び見られた。また、ERK1/2活

性因子MEKの阻害剤を添加したところ、分泌型EPHA7の添加と同様に、リプログラミング効率の上昇が見られた。以上の結果は、分泌型EPHA7がERK1/2活性の低下を誘導することにより、リプログラミングを促進していることを明らかにし、リプログラミングにおける分泌因子の重要性を示すものである。

## 第一章 序論

胚性幹細胞 (Embryonic stem cells, 以下ES細胞) は、動物の発生初期段階である胚盤胞期の胚の一部に属する内部細胞塊より作られる細胞株のことである。受精卵に非常に近い能力を持っており、あらゆる身体の組織に分化できる分化多能性とほぼ無限の増殖能を保つことで再生医療への応用に注目されているが、生命の萌芽である受精卵を素材として、胚を破壊しなければ得ることができないので、倫理的に大きな問題を抱えている。

ES細胞の多能性を維持させる上で重要な機能を果たす四つの転写因子(OCT3/4, KLF4, SOX2, C-MYC; 以下OSKM)をマウス胎仔繊維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast; 以下MEF)に過剰発現させることにより、ES細胞の形質を持つ誘導性多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells、以下iPS細胞)が樹立できるということが報告された (Takahashi and Yamanaka, 2006)。現在では、MEFだけではなく、ヒトのBリンパ球・すい臓β細胞・髪の毛一本由来のケラチノサイト等の多様な体細胞からiPS細胞が樹立できることが報告されている (Aasen et al., 2008; Hanna et al., 2008)。iPS細胞が樹立されて以降、iPS細胞を再生医療に用いる為の研究や技術開発がこの数年で急速に発展してきた。また、iPS細胞は再生医療のみならず、難治性疾患の病態解析、創薬などを目的とした研究のツールとしても注目されている。例えば、iPS細胞を使って網膜の働きを助ける網膜色素上皮細胞を作り、シート状に加工した網膜細胞を患者に移植する手術が実施されたり (Kamao H et al., 2014)、筋委縮性側索硬化症 (ALS) の患者の皮膚から iPS細胞を樹立し、さらにそのiPS細胞から運動ニューロンを分化誘導することによって細胞レベルでの疾患メカニズムの研究が行われた (Dimos et al., 2008; Park et al., 2008; Egawa et al., 2012)。さらに、アルツハイマー病患者の iPS細胞由来の神経細胞を用いた薬剤スクリーニングと、ALS患者のiPS細胞由来の運動ニューロンを用いた化合物スクリーニングを行い、効能が期待できる化合物を発見できた (Yahata et al., 2011; Yang et al., 2013)など、iPS細胞の応用の範囲は広い。iPS細胞の腫瘍化の問題についても、ホストゲノムへの挿入のないセンダイウイルスを用いた手法 (Fusaki et al., 2009; Seki et al.,

2010; Nishimura et al., 2011)、腫瘍化を起こしにくいiPS細胞の選抜方法 (Koyanagi-Aoi et al., 2013)、リプログラミングに必要な導入因子を変えることにより安全性が高いiPS細胞を作製する方法 (Buganim et al., 2014)等の数多くの報告がされてきた。

こうした応用研究だけでなく、体細胞がiPS細胞になるまでの過程、すなわち細胞リプログラミングの分子メカニズムに関する研究も活発に行われている(Stadtfield, M. et al., 2008; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Buganim et al., 2012)。リプログラミング効率向上に寄与するクロマチンの修飾因子、薬剤 (Huangfu et al., 2008; Onder et al., 2012; Costa et al., 2013)、リプログラミング因子 (OSKM)の役割 (Sridharan et al., 2009)、線維芽細胞のリプログラミング過程でおこる間葉上皮移行の重要性 (Li et al., 2010)、リプログラミング過程におけるDNAメチル化変化 (Doi et al., 2009)等がこれまでに報告されているが、リプログラミング過程の分子メカニズムについては未だ未解明な部分が多い。細胞リプログラミング機構の解明は、iPS細胞作製の効率と安全性の向上につながると考えられるため、非常に重要な研究課題である。私はリプログラミング過程におけるシグナル伝達経路の役割に注目し、多能性獲得のために必要なシグナル伝達経路や、遺伝子を同定することを目的とした。

そこで、私はEPH-EPHRINシグナル伝達経路に注目した(図 1)。EPH (erythropoietin-producing hepatocellular receptor) は受容体型チロシンキナーゼファミリーに属し、リガンドであるEPHRINと結合することによってEPH受容体のアミノ酸配列内に存在するチロシンがリン酸化され、細胞内に様々なシグナルを伝達することが知られている (Pasquale, 2010)。9種類存在するEPH Aは、5種類存在するGPIアンカー型のEPHRIN Aリガンドと結合する。また、5種類存在するEPH Bは、3種類存在する膜貫通型EPHRIN Bリガンドと結合する。リガンド-受容体の結合形式は保持されているが、いくつかの受容体は相互にリガンドを共有している (Pasquale, 2010)。EPHはEPHRINに対して逆にリガンド分子としても働くことが知られており、EPHRINを発現する細胞とEPHを発現する細胞が接触すると、両細胞にシグナル伝達が生じることも報告されている (bidirectional signaling; Pasquale, 2008)。さらに、いくつかのEPHとEPHRINは、細胞外に分泌される切断型のスプライシングバリエントをもっており、シグナルを制御することが知られている (Aasheim et al., 2000; Holmberg et al., 2005, 2006; Chumley et al., 2007;

Jiao et al., 2008; Wykosky et al., 2008)。現在までに、EPH-EPHRINシグナル伝達経路が細胞様々な生理機能と疾患に関連があることが明らかになってきたが (Pasquale, 2008と2010)、EPH-EPHRINシグナル伝達経路が細胞リプログラミングの制御にも関わっているのかに関しては報告されていない。

そこで、本研究では、細胞リプログラミング制御に重要なEPH、又はEPHRINを同定し、機能を解明することを目指した。その結果、EPH 受容体A7 (EPHA7)がリプログラミングの過程で一過的に上昇することを見出した。また、*EphA7*のノックダウンによってリプログラミング効率が低下し、全長型EPHA7ではなく、分泌型EPHA7がリプログラミング効率改善に寄与することが分かった。さらに、リプログラミングの進行によってERK1/2の活性が低下し、*EphA7*のノックダウンを行うとERK1/2の活性低下が抑制された。*EphA7*のノックダウンした細胞に、分泌型EPHA7あるいはERK1/2をリン酸化するMEKの阻害剤の添加することによってリプログラミング効率が向上することを見出した。以上の結果は、分泌型EPHA7によって制御されるERK活性の低下がリプログラミングに必要な現象であることを示唆するものである。

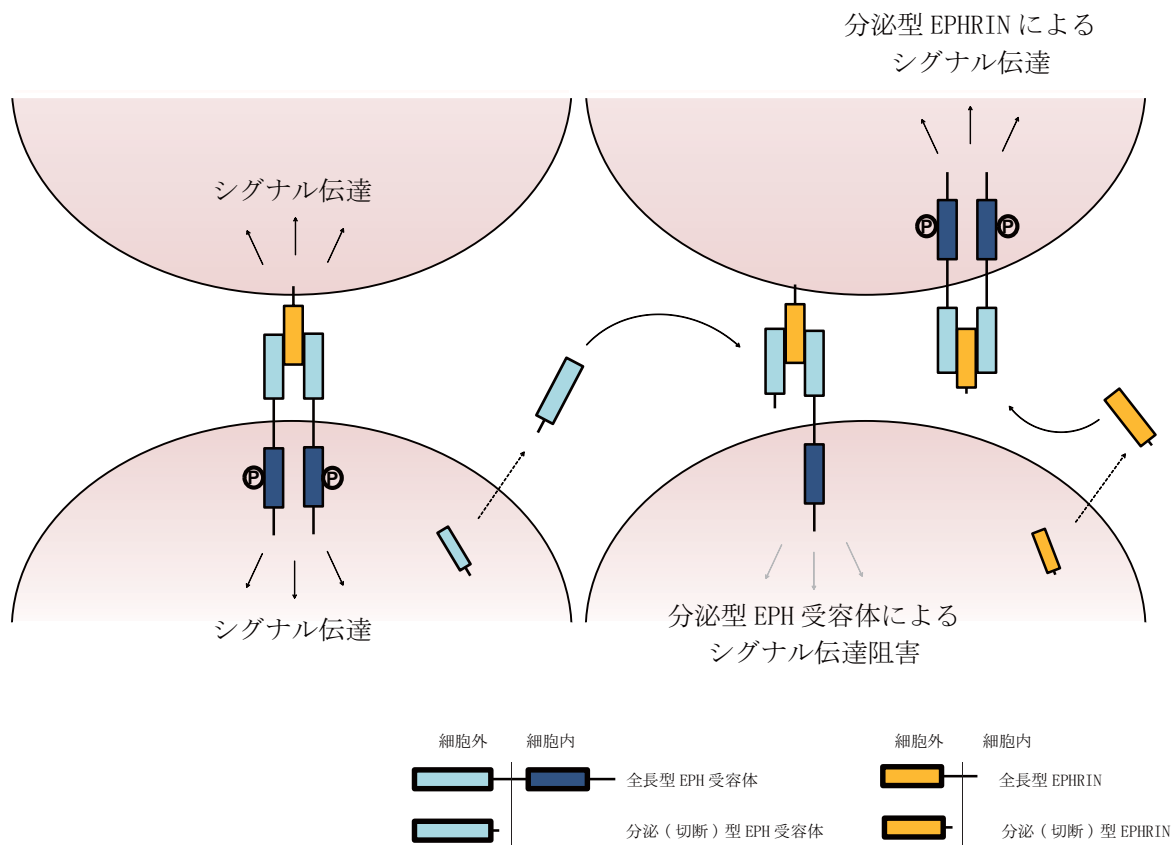


図1 EPH-EPHRIN シグナル伝達経路

EPHRIN リガンドの結合により、膜貫通領域の近傍に位置するチロシンとセリンがリン酸化され、チロシンキナーゼドメインが活性化されることで、下流分子にシグナルを伝達する。さらに、EPH 受容体は EPHRIN に対して逆にリガンド分子としても働くことが知られており、EPHRIN を発現する細胞と EPH 受容体を発現する細胞が接触すると、両細胞にシグナル伝達が生じる。また、EPH と EPHRIN は、細胞外に分泌される切断型のスプライシングバリエーションをもっており、シグナルを制御することが知られている。



## 第二章 材料と方法

### (1) 細胞培養

MEFは、FCS 培地 (DMEM (Nissui) 、10% fetal bovine serum (Sigma) 、penicillin/streptomycin (Gibco) 、L-Glutamine (Gibco)含む) を用いて、Plat-E 細胞はFCS培地に puromycin (1 µg/ml) 、blastidins (10 µg/ml) を加えたものを用いて培養した。293T細胞はFCS培地にカナマイシン (250 µg/ml)を加えたものを用いて培養した。図4の(A, B)、図19の (A, B)、iPS細胞の樹立 (図10のE)に使われた野生型 (WT) MEFは胎生13.5日目 (E13.5) のICRマウスから採取したものを使用し、他の実験にはE13.5の *Nanog*-GFP-IRES-PuroRマウス (RIKEN BRC (ナショナルバイオリソースプロジェクト) より提供されたもの; Okita et al., 2007)から採取したMEFを用いた。

### (2) 遺伝子クローニングとプラスミド構築

pMXsベクター (pMXs-h*OCT4*, -h*SOX2*, -h*KLF4*, and -h*C-MYC*)はAddgene (Addgene plasmids 17217, 17218, 17219, そして17220; Kitamura et al., 2003; Takahashi and Yamanaka, 2006)から購入した。全長型EPhA7の過剰発現のため、マウスの全長型*EphA7*のコード配列をpMXsベクターにサブクローニングした。ルシフェラーゼ、*EphA7*、*EfnA3*に対するsh RNAの配列はCSII-U6-puroベクター(Okamoto et al., 2006)にサブクローニングした。pCAG-HIVgpベクターとpCMV-VSV-G-RSV-Revベクターをレンチウイルス用パッケージングプラスミドとして用いた。sh RNAの配列は次の通り。

sh RNA	Sequence (5'-3')
Luciferase shRNA	CUUACGCUGAGUACUUCGATT
EphA7 sh RNA #1	GCTGCGAAGGAAGTACTATTA
EphA7 sh RNA #2	GCTGCGGACTAACTGGATTTC
EphA7 sh RNA #3	GCTTGCATAGCATTGGTTTCT;
EphA7 sh RNA #4	GGAGCTATGGGATTGTCATGT
EphA7 sh RNA #5	GCAGATAGTCGGAATTCTAGA.

EfnA3 sh RNA	GGTAATGTTTGGTACCAAACC
--------------	-----------------------

### (3) レンチウイルスを用いたRNAi

100mm collagen coated culture ディッシュに293T細胞を $3 \times 10^6$ 個でまいて翌日CS II-U6ベクター、pCAG-HIVベクター、pCMV-VSVGベクターをOpti-MEM (Invitrogen)、FuGENE®HD Transfection Reagent (Promega) を用いてtransfectionした。transfection 16時間後、新たな培地に交換した。transfection 2日後、産生されたウイルス含む培地を回収し、MEFに添加した。その際に、培地に6 ug/mlのpolybrene (Nacalai Tesque) を加え、MEFにレンチウイルスを感染させた。iPS細胞誘導を行う際は、shRNAウイルス感染後2日のMEFにレトロウイルスを感染させた。

### (4) レトロウイルスを用いた iPS 細胞誘導

100mm collagen coated culture ディッシュにPlat-E細胞を $3.6 \times 10^6$ 個でまいて翌日pMXsウイルスベクターをFuGENE®HD Transfection Reagent (Promega)を用いてPlat-E細胞にtransfectionした。Transfection 16時間後、新たな培地に交換した。transfection 2日後、産生されたウイルス含む培地を回収し、MEFに添加した。その際に、培地に6 ug/mlのpolybrene (Nacalai Tesque)を加え、MEFにレトロウイルスを感染させた。ウイルス感染24時間後でウイルスを含む培地をES細胞用培地に交換し、ウイルス感染48時間でMEFを継代、以降培地交換を48時間毎に行った。

### (5) iPS細胞の樹立とES細胞、iPS細胞、そしてpiPS細胞の培養

iPS細胞は、ES細胞用培地 (high-glucose DMEM、7.5% HyClone Defined Fetal Bovine Serum (Thermo)、5% knock-out serum replacement (Invitrogen)、MEM NEAA (Gibco)、2-mercaptoethanol (Gibco)、sodium pyruvate (Sigma) penicillin/streptomycin (Gibco)、L-Glutamine (Gibco)、leukemia inhibitory factor (LIF) (Millipore) 含む) を用いて、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 存在下で培養した。レスキュー実験のためはマウスリコンビナントEPHA7-Fcタンパク質 (EPHA7<sup>FC</sup>, R&D systems, 608-A7-200)、又はPD0325901(WAKO, 163-24001)を用いた。EPHA7-Fcタンパク質はマウスEPHA7の細胞外ドメインを持ち(Ala30-Pro549)、

分泌、分泌型 EPHA7 の役割をする。ES 細胞株 (HT7) と樹立された iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17; RIKEN BRC (ナショナルバイオリソースプロジェクト)より提供されたもの)、そして partially iPS 細胞株 (piPS 細胞、20A4 ; Okita et al., 2007)) はマイトマイシン C 処理を行った MEF、又は SNL76/7 のフィーダー細胞の上にまいて、ES 細胞用培地 (1500 U/ml LIF を添加したもの) を用いて培養した。

#### (6) 定量的 RT-PCR

RNA は RNeasy Kit (QIAGEN) を用いてプロトコール通りに調整した。500 ng~1 µg の total RNA を鋳型として、QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として、SYBER Green PCR kit (QIAGEN) と Light Cycler (Roche Diagnostics) を用いてリアルタイム定量的 PCR を行った。コントロールとして GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の計測値を使用してデータを標準化した。使ったプライマーは次の通り。

Primer	Sequence (5'-3')
<i>Nanog</i> (F)	CCTCCATTCTGAACCTGAGC
<i>Nanog</i> (R)	GGGATACTCCACTGGTGCTG
<i>EphA7</i> (F)	CCGAGGAAGAGGCAGAAAA
<i>EphA7</i> (R)	TGGACAACGAGAACACTGGA
Truncated <i>EphA7</i> (F)	TGCCCATGCAAATTACACTTTCG
Truncated <i>EphA7</i> (R)	GTAAGATCCCCCTGCACTTACC
<i>EphA1</i> (F)	GCCTGGCCCTTTCTCCCCTG
<i>EphA1</i> (R)	TCTCTGTCTCTGGCCTCTCC
<i>EphA2</i> (F)	GTGCCAGGAAGGCTACGAGA
<i>EphA2</i> (R)	TCCTCAGGTGCCCTGAAATAG
<i>EphA3</i> (F)	ACAGAAGGGGAATGGCTGGT
<i>EphA3</i> (R)	GCCATGGATGGAGGGTCTTT
<i>EfnA1</i> (F)	AGTTCAAGGAAGGACACAGC

<i>EfnA1</i> (R)	CTCTTCTCCTGTGGGTTGAC
<i>EfnA3</i> (F)	CCACGCCCACTCACAACCTG
<i>EfnA3</i> (R)	CCTCAAAGTCTTCCAACACG
<i>EfnA5</i> (F)	CCCAGACAACGGAAGAAG
<i>EfnA5</i> (R)	ACAGGCGGACGGGAGGAG
<i>EphB2</i> (F)	CTGTGCCAGACCAGACCAAGA
<i>EphB2</i> (R)	CAGCAGAACTTGCATCTTGTC
<i>EphB6</i> (F)	AGGCTGTCAATGGGGTGTCT
<i>EphB6</i> (R)	CGCAGCTGGTAGTCGAGGAT
<i>EphB3</i> (F)	AATGAGGCCGTCCGAGAGTT
<i>EphB3</i> (R)	ATCCCACCTTCAGCGTCTTG
<i>EpCAM</i> (F)	GCTGGCAACAAGTTGCTCTCTGAA
<i>EpCAM</i> (R)	CGTTGCACTGCTTGGCTTTGAAGA
<i>Zeb-1</i> (F)	TGCTCACCTGCCCGTATTGTGATA
<i>Zeb-1</i> (R)	AGTGCACTTGAAGTTGCGGTTTCC
<i>Slug</i> (F)	CACATTCGAACCCACACATTGCCT
<i>Slug</i> (R)	TGTGCCCTCAGGTTTGATCTGTCT
Endogenous- <i>Oct3/4</i> (F)	GGAAAGCAACTCAGAGGGAA
Endogenous- <i>Oct3/4</i> (R)	TTCTAGCTCCTTCTGCAGGG
<i>Mcm5</i> (F)	ACAGGGTAGGTGTGGGCATC
<i>Mcm5</i> (R)	GCCAGGCGACGAAATTCCTC
<i>Poli</i> (F)	CCAGCAGCTTCCAAGTGAGG
<i>Poli</i> (R)	CCAACCACAAGTCTCCGATGC
<i>Rfc4</i> (F)	ACAACTGACCAAGGACCGGG
<i>Rfc4</i> (R)	GCACTGCAACCACTTCGTCC
<i>Ccnd1</i> (F)	CGGAAAATCGTGGCCACCTG
<i>Ccnd1</i> (R)	TTCAAGGGCTCCAGGGACAG

<i>Ccnd2</i> (F)	ACATCCAACCGTACATGCGC
<i>Ccnd2</i> (R)	AGCCAAGAAACGGTCCAGGT
<i>GAPDH</i> (F)	AACATCAAATGGGGTGAGGCC
<i>GAPDH</i> (R)	GTTGTCATGGATGACCTTGGC

### (7) ChiPアッセイ

100mmディッシュで培養したMEF又はES細胞を1%のホルムアルデヒドで10分間処理しクロスリンクさせた。反応を125 mMのグリシン溶液をいれて止めて、細胞をPBSで2回洗浄し、細胞lysis buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF, そして1x protease inhibitor cocktail (Roche))を加えて、細胞回収した。核抽出液をChIP SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF, 1x protease inhibitor cocktail)を用いて調整し、バイオラプター (Tosho Electric Co., Ltd.)で超音波処理を行った。さらに、ChIP dilution buffer (16.7 mM Tris- HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA, 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 1x protease inhibitor cocktail)、坑-OCT3/4抗体(sc-9081, Santa Cruz)、又はnormal rabbit IgG (sc-2027, Santa Cruz)、Dynabeads protein G (Invitrogen)を用いて免疫沈降を行った。ビーズをlow-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100)、high-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100)、lithium wash buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1% NP-40)、Tris-EDTA (TE) bufferを用いて洗浄し、ChIP elution buffer (1% SDSと50 mM NaHCO<sub>3</sub>; 200 mM NaCl)を加えて、65°Cで一晩反応させ、クロスリンクをはずした。ChIPed DNAをRNase Aとproteinase K処理を行い、QIAquick PCR purification kit (Qiagen)で洗浄し、定量的RT PCRを用いて解析を行った。使用したプライマーは次の通り。

Primer	Sequence (5'-3')
site A	TGTCTTTGCCAAACATTTTCGGTAGA
site A	TGGTCCCCACATCACTGCTT

site B	CAGGGCCCTTAAGATTAGCC
site B	GGGCCTGGGTCTCTCAATAG
site C	TTAAGGCTTTTGGCAGATGGA
site C	CCAATCAATTTACCCCTTGGA
site D	CAGTGACACATTAGCAACACTCCA
site D	GCATCTTTACGACACGGTATTCA
site E	CCGTGTCGTAAAGATGCAAAG
site E	TCCACCGCCTAAGAAAATCA

#### (8) ウェスタンブロッティング

35mmディッシュに培養していた細胞から、タンパク質をlysis buffer (20 mM Tris-Cl (pH 7.5)、2 mM EGTA、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、150 mM NaCl、10 mM NaF、12.5 mM β-glycerophosphate、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、1% Triton-X)で溶出し、氷上に10分間静置したのち、15000rpmで30分遠心し上清を回収した。

培地由来のタンパク質は回収2日前から無血清培地で細胞を培養し、回収した上清を3000rpmで5分遠心後、Amicon®Ultra-4 Centrifugal Filters 30K (Millipore UFC803024) を用いて濃縮した。タンパク質は5×sample Buffer (62.5mM Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% glycerol、5% β-mercaptoethanol、0.01% BPB)を用いてサンプル処理を行った。10% SDS-PAGE によりサンプルを展開し、ゲルをtransfer buffer (25 mM Tris (pH 8.3)、192 mM グリシン、20% メタノール)で平衡化した後、PVDF メンブレン(Millipore)を用いてセミドライ法でタンパク質のトランスファーを15V、25分行った。室温で30分Blocking One (ナカライテスク)でblockingした後、4 °Cで一晩1 次抗体と反応させた。1 次抗体として抗EPHA7 抗体 (SC-917, Santa Cruz, 1/200)、抗pERK1/2 抗体 (4377s, Cell Signaling 1/1000)、抗ERK1/2 抗体 (K-23, Santa Cruz, 1/1000)、抗E-CADHERIN 抗体 (3195s, Cell Signaling, 1/1000)、抗NANOG 抗体 (SC1000, Calbiochem, 1/5000)、そして抗α-TUBULIN 抗体 (T6199, Sigma, 1/10000)を使用した。TBS-0.05% Tween20で5分、3回洗浄後、室温で1 時間2 次抗体と反応させた。2次抗体としてHRP 結合型の抗マウス抗体 (1:10000) と抗ラビット抗体 (1:10000; GE healthcare)を使用した。TBS-0.05% Tween20 で5分、3回

洗浄後、ECL Western Blotting System (Amersham)をバンドの検出に用いて、LAS-4000 (Fujifilm) で撮影した。

#### (9) 蛍光活性化セルソーティング (FACS)

細胞をFixation Buffer (BD Cytotfix)で固定し、細胞を室温で30分、PE-conjugated 抗SSEA-1抗体 (Santa Cruz, SC21702)と反応させた。SSEA-1抗体と反応させた細胞、又はGFP陽性/陰性(すなわち、NANOG陽性/陰性)細胞をJSAN (Bay Bioscience)、又はFACS Aria II (BD Biosciences)を用いて定量、ソートし、FlowJo softwareで分析した。

#### (10) エライザアッセイ

培地の中に含まれている分泌型EphA7を検出するため、Ephrin type-A receptor 7 (EPHA7) ELISA キット (CUSABIO, CSB-EL007727MO)を使用した。

#### (11) アルカリホスファターゼ染色 (AP染色)

AP染色は、Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma)を用い、「ヒト多能性幹細胞の維持培養プロトコール」(理研 CDB 幹細胞研究支援・開発室) に従って行った。染色後、観察は実体顕微鏡下 (SZX16, Olympus) で行い、ImageJを用いて解析した。

#### 12) 免疫染色

カバーガラス上で培養しているiPS細胞をPBSで1度洗浄し、4%パラホルムアルデヒドを含むPBSに10分間浸したのち、0.2%Triton X-100を含むPBSに10分浸し、抗原を賦活化した。その後、ブロッキングワシ (Nacalai Tesque) で30分ブロッキングし5% ブロッキングワシを含むPBSで希釈した一次抗体をカバーガラスに乗せ、室温で1時間静置した。その後、蛍光標識した適当な2次抗体を同様に希釈し、カバーガラスに乗せ、4℃で一晩反応させた。1次抗体として抗NANOG抗体 (1/1000; Calbiochem)、抗OCT3/4抗体 (H-134, Santa Cruz, 1/200)、抗E-CADHERIN抗体 (1/100; Cell Signaling)を使用した。2次抗体としてAlexa Fluor® 594 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen)を使用した。細胞はMowiolにマウントし、観察は蛍光顕微鏡下 (Zeiss Axiophoto)で行った。

## 第三章 結果

### (1) 繊維芽細胞からのiPS細胞の樹立

まず私は、MEFからのiPS細胞の誘導を試みた。ここでは、胎生13.5日目の*Nanog*-GFP-IRES-PuroR マウス由来のMEFを用いた。*Nanog*-GFP-IRES-PuroR配列を持つ細胞は、多能性マーカー遺伝子である*Nanog*のプロモーターの下流で*GFP*とピューロマイシン耐性遺伝子を発現する。MEFに山中因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC、以下OSKM)を発現するレトロウィルスを感染させてリプログラミングを誘導した (図2A)。感染6日後、マウス ES細胞と似たタイトな形態、明確な境界を持つ三次元状のコロニーを形成している細胞の集団が観察され、8日後からはNANOG陽性 (GFP陽性)コロニーが現れた。12日後には継代できるほどの大きなコロニーが多数できた (図2B)。次に、定量的RT-PCRを用いてES細胞マーカーのmRNAの発現変化を調べた。その結果、*Nanog*と内在性の*Oct3/4*は5日目から、*E-cadherin*は3日目から発現量が上がることが分かった (図2C)。更に、NANOGとE-CADHERINの抗体を用いて免疫プロットを行ったところ、タンパク質レベルでもNANOGとE-CADHERINの発現が上昇したことが分かった (図2D)。以上の結果から、MEFから細胞リプログラミングが誘導されたことが分かった。

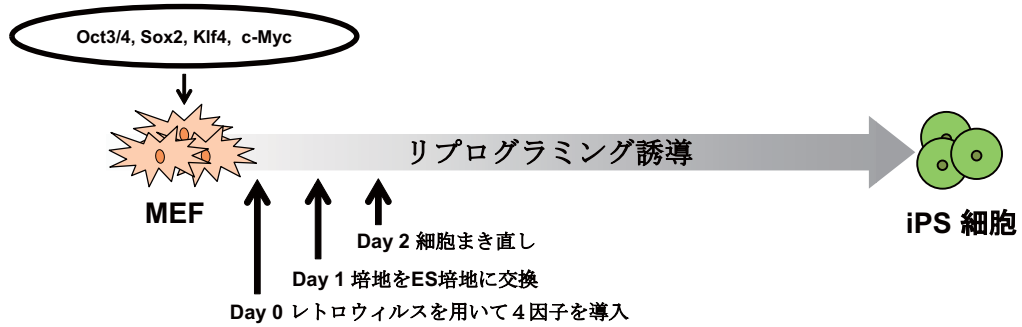
### (2) Ephrin receptor A7はMEFのリプログラミングにおいて顕著に発現が上昇する

次に、リプログラミング過程における EPH-EPHRINシグナル伝達経路関連遺伝子の発現変化を網羅的に解析するため、当研究室で過去に行われたマイクロアレイのデータを用いて解析を行った (図 3A, B; Koga et al., 2014)。さらに、リプログラミングを誘導したMEFと、蛍光色素の*mCherry*の遺伝子を導入したMEF (コントロール) を、2日に一回サンプルを回収して定量的RT-PCRを行った。ここで用いたアレイと定量的RT-PCRのデータは、MEFに4因子 (OSKM) を導入してリプログラミングを誘導し、OSKM導入時点を Day 0としてDay 2, 4, 6, 8, 10, 12に回収したサンプルについて解析したものである。その結果、*Eph*や*Ephrin*ファミリーの中で、Eph receptor A7 (以下*EphA7*)の発現がもっとも著しく上昇した (図 3C, D)。*EphA7*の発現はDay 4から発現が上昇し、ES細胞



(A)

MEF からの iPS 細胞誘導プロトコル



(B)

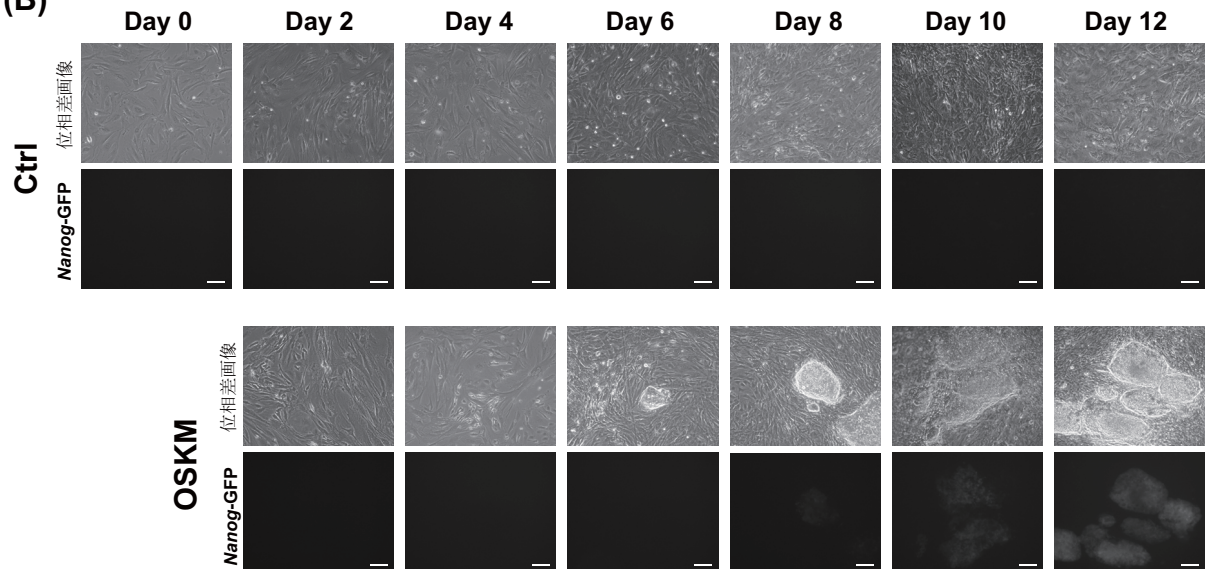


図 2 マウスの胎仔線維芽細胞 (MEF) からのリプログラミング誘導

(A) リプログラミング誘導の模式図。MEF (*Nanog-GFP-IRES-PuroR* マウス由来) に 4 因子 (OSKM) をレトロウィルスを用いて導入した。レトロウィルスの感染日を Day 0 とし、Day 1 から培地を ES 細胞用培地に交換した。Day 2 に一度細胞をまきなおし、その後は二日に一回培地交換を行った。(B) コントロール MEF と 4 因子を導入した MEF の位相差画像と GFP の画像を示している。スケールバー = 100  $\mu\text{m}$ 。

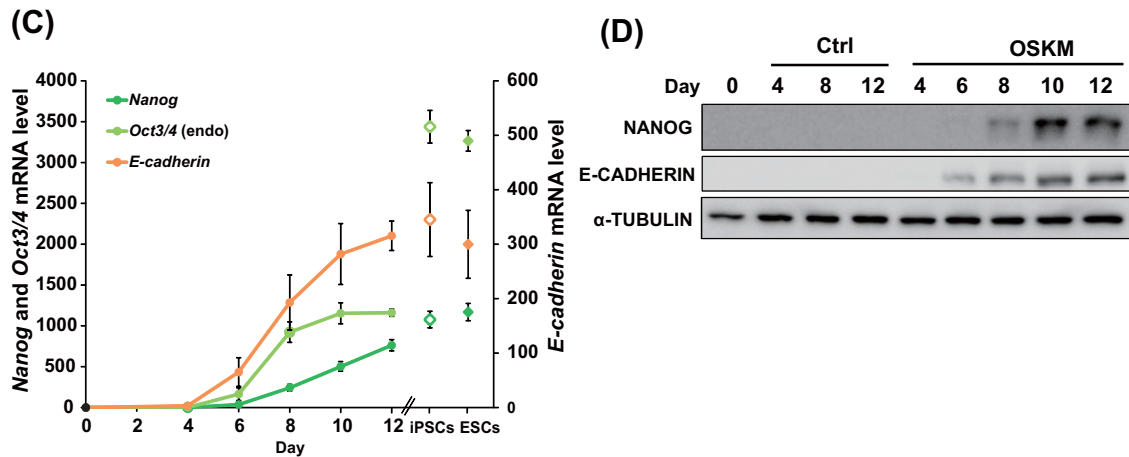
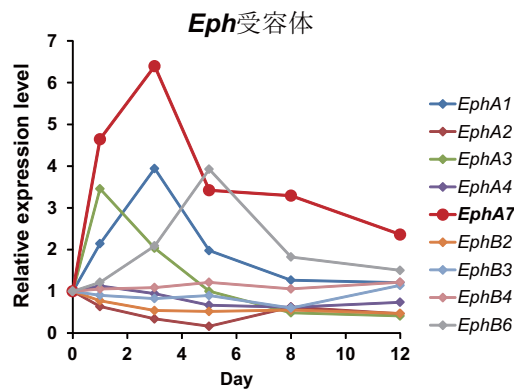


図2 マウスの胎仔線維芽細胞 (MEF) からのリプログラミング誘導

(C) OSKM を導入した MEF を 2 日に一回サンプルを回収し、cDNA を合成し、表示した各遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR によって解析した。それぞれの mRNA 量は GAPDH で補正し、Day 4 の mRNA 量を 1 とした相対量で表示している。iPS 細胞と ES 細胞における遺伝子発現も同時に解析した。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。(D) コントロール MEF と OSKM を導入した MEF を 2 日に一回サンプルを回収し、タンパク質を抽出し、表示した各タンパク質の抗体を用いて免疫ブロットを行った。Loading コントロールとして  $\alpha$ -TUBULIN を検出した。

(A)



(B)

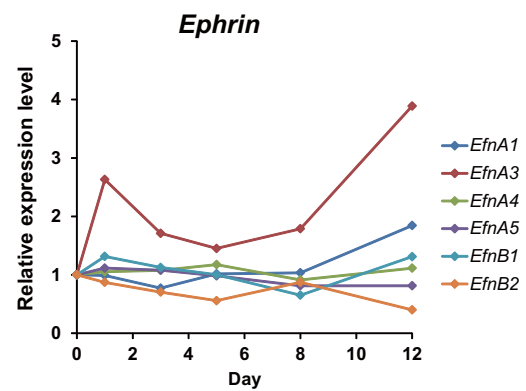
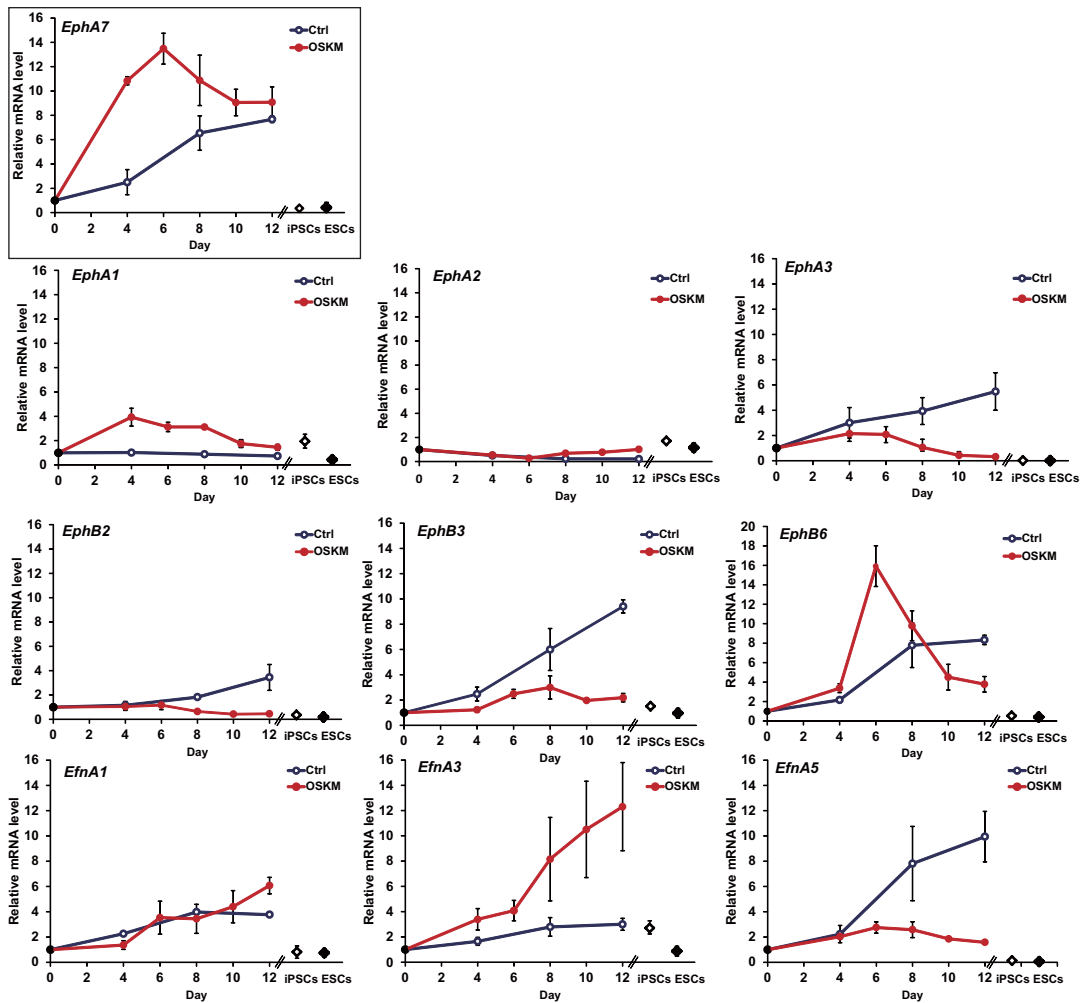


図3 リプログラミング過程における EPHA7 の一過的な発現上昇

(A) リプログラミング過程のマイクロアレイ解析。OSKM 導入時のリプログラミング過程における *Eph* 受容体の発現変化。Day 0 を 1 としたマイクロアレイシグナル値の相対値で示している。(B) リプログラミング過程のマイクロアレイ解析。OSKM 導入時のリプログラミング過程における *Ephrin* リガンドの発現変化。Day 0 を 1 としたマイクロアレイシグナル値の相対値で示している。。

(C)



(D)

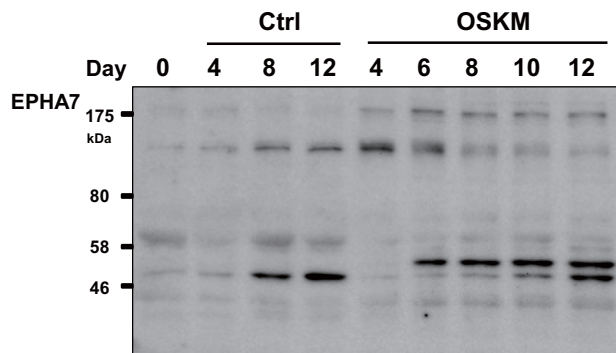


図3 リプログラミング過程における EPHA7 の一過的な発現上昇

(C) 定量的 RT-PCR によるリプログラミングを誘導していないコントロールの MEF (Ctrl)、OSKM 導入時の MEF (OSKM)、iPS 細胞、ES 細胞における *Eph* と *Efrin* リガンドの発現解析。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。MEF のサンプルはウイルス感染後 0, 4, 6, 8, 10, 12 日後に回収した。データは平均値に標準偏差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。(D) 免疫ブロットによるコントロールの MEF と OSKM 導入時の MEF の EPHA7 の発現変化解析。Loading コントロールの  $\alpha$ -TUBULIN は図 3 の (D) と共通である。

マーカーである*Nanog*と内在性の*Oct3/4*、そして*E-cadherin*の発現に先立って上昇していた (図 3C, 2C)。EPHA7にはキナーゼ活性が欠損されている分泌 (切断)型のスプライシングバリエントが存在するため (Dawson et al., 2007; Oricchio et al., 2011; Truncated EPHA7, 以下分泌型EPHA7)、分泌型*EphA7*の発現についても調べた。分泌型*EphA7*に特異的なプライマーを設計し、定量的RT-PCRを行ったところ、Day 4から著しく発現が上昇した (図 4A)。分泌型EPHA7はタンパク質レベルでも、Day 4から上昇した (図 4B)。さらに、ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent)アッセイを用いて、分泌型EPHA7が細胞のリプログラミング過程で培地中に分泌されていること確認した (図 4C)。一方で、樹立されたiPS細胞やES細胞ではEPHA7の発現はほとんど見られなかった。

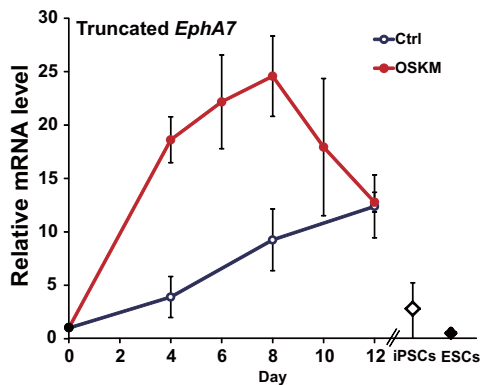
### (3) OCT3/4はEPHA7の発現上昇をひき起こす

次に、EPHA7の発現上昇の原因となっている因子を調べるために、OCT3/4、KLF4、SOX2および C-MYCをそれぞれ単独で MEFに導入し、EPHA7の発現が誘導されるのかを解析した。その結果、Oct3/4を過剰発現させた MEFでの EPHA7発現量はKLF4、SOX2、C-MYCの単一因子や OKSMの組み合わせで発現させた時よりも高く、OCT3/4の発現がEPHA7の発現上昇の原因となっていることが示唆された (図 5A)。さらに、タイムコースの解析から、OCT3/4の導入後24時間以内に全長型と分泌型*EphA7*の発現が上昇することがわかった (図 5B)。さらに、OCT3/4が直接*EphA7*の発現を制御するのかを調べるため、クロマチン免疫沈降 (ChiP)アッセイを行った。その結果、*EphA7*の上流領域のOCT3/4の結合可能サイトに強く結合していることがわかった (図 5C, D; Nishimoto et al., 2003)。以上の結果は、OCT3/4がリプログラミングの過程でEPHA7の発現を制御する重要な因子であることを示唆するものである。一方、ES細胞では、*EphA7*の上流領域にOct3/4の弱い結合が見られた (図 5E)。このことはES細胞においてEPHA7の発現が低い原因の一つであると考えられる。

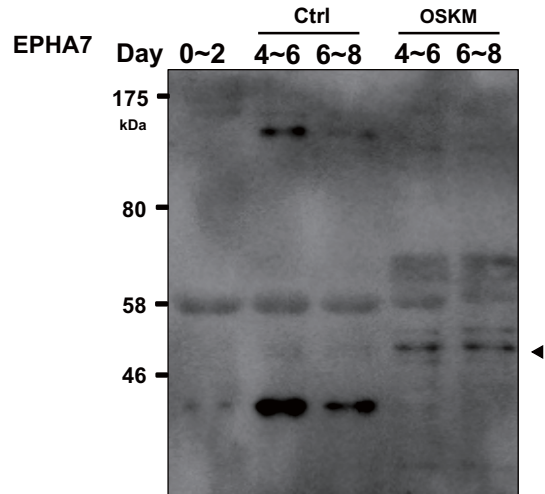
### (4) *EphA7*のノックダウンはリプログラミング効率を低下させる

EPHA7のリプログラミングにおける機能を解析するため、EPHA7の発現を特異的に阻害するsmall hairpin RNA (sh RNA)を用いて、*EphA7*のノックダウンを行った。まず、

(A)



(B)



(C)

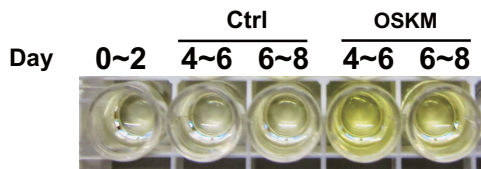


図4 リプログラミング過程における分泌型 EPHA7 の発現上昇

(A) 定量的 RT-PCR によるコントロールの MEF (Ctrl)、OSKM 導入時の MEF (OSKM)、iPS 細胞、ES 細胞における分泌型 *EphA7* (Truncated *EphA7*) の発現解析。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。(B) 免疫ブロットによる分泌型 EPHA7 の発現解析。コントロールの MEF あるいは OSKM を導入した MEF を飼っている培地を回収しタンパク質を濃縮した後、アクリルアミドゲルに流して抗 EPHA7 抗体を用いて検出した。(C) エライザアッセイによるコントロールの MEF あるいは OSKM を導入した MEF を飼っている培地に含まれる分泌型 EPHA7 の検出。

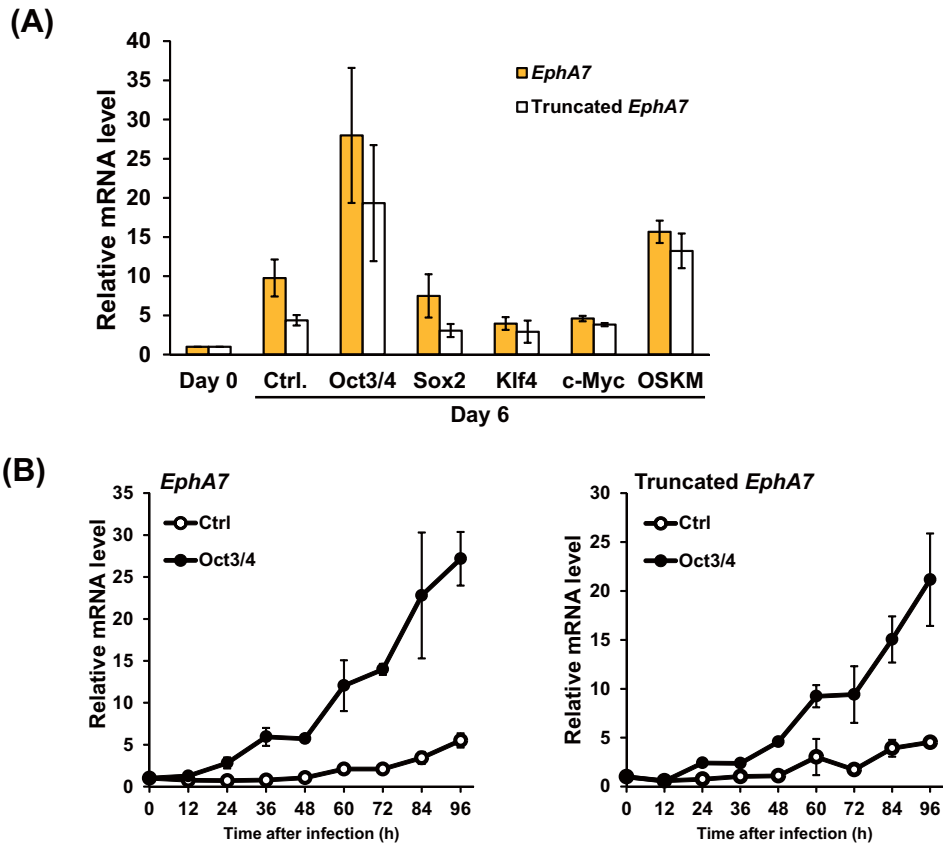
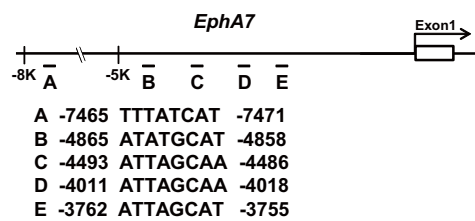


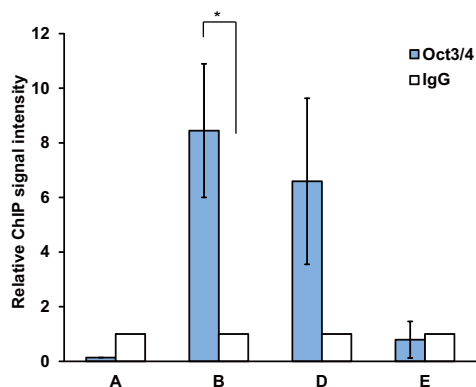
図 5 OCT3/4 は *EphA7* の発現を制御する

(A) リプログラミング因子単独過剰発現による *EphA7* (全長型と分泌型の両方の *EphA7* を含む) と分泌型 *EphA7* の発現変化。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。サンプルは Day 6 に回収した。OCT3/4 を強制発現したサンプルで *EphA7* の発現が最も上昇した。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。(B) 定量的 RT-PCR による *EphA7* と切断型 *EphA7* の発現変化。MEF に OCT3/4 を導入して 12 時間おきにサンプルを回収した。コントロール (Ctrl) としては mCHERRY を導入した MEF を用いた。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。

(C)



(D)



(E)

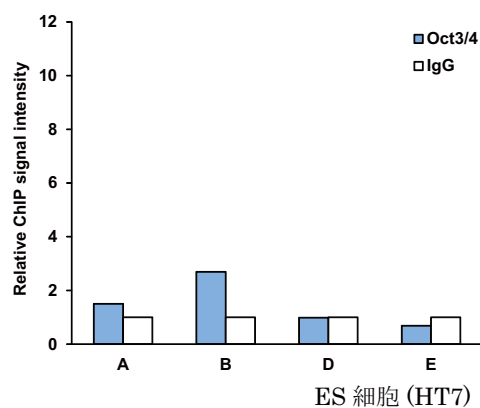


図 5 OCT3/4 は *EphA7* の発現を制御する

(C) *EphA7* の上流領域 OCT3/4 が結合配列を持つ領域を図で示した。(D) OCT3/4 を導入した MEF の DNA の断片を IgG、又は抗 OCT3/4 抗体を用いて免疫沈降を行った。領域は定量的 RT-PCR を用いて定量した。値は IgG を 1 とした相対値で示している。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (サイト B と D、 $n=4$ 、 $*P<0.05$ ; サイト E、 $n=3$ ; サイト A、 $n=2$ ; サイト C は検出されなかった。) P 値は student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(E) ES 細胞の DNA の断片を IgG (イムノグロブリン G)、又は抗 OCT3/4 抗体を用いて免疫沈降を行った。各領域は定量的 RT-PCR を用いて定量した。値は IgG を 1 とした相対値で示している。



設計したshRNAについて発現抑制の効果を検討するため、MEFに*EphA7*に対するshRNAとコントロールshRNA (sh Luciferase; sh *Luc*)発現するレンチウイルスを感染させて、定量的RT-PCRと免疫ブロットを行った。その結果、5つのshRNA配列全て、*EphA7*のmRNAやタンパク質を顕著に減少させることがわかった (図 6A, B, そしてC)。次に、EPHA7の発現減少によるリプログラミングの効率の変化を調べた。多能性幹細胞で発現するアルカリホスファターゼ (Alkaline phosphatase (AP))に対して染色し、AP陽性となったコロニー数を計測したところ、shRNAを導入した5つのサンプル全てでコントロールよりAP陽性コロニー数が減少した (図 7A)。さらに、*EphA7*のノックダウンによって、*Nanog*のmRNAやタンパク質の発現上昇が抑制され、NANOG陽性のコロニーの数も顕著に減少した(図 7B、C、そしてD)。*EphA7*のノックダウンはC-MYCを除いた3因子(OSK)によるリプログラミングの効率も低下させた (図 8A、B)。これらの結果から、EPHA7の発現はプログラミングに必要であることが分かった。

##### (5) 分泌型EPHA7がリプログラミングを制御する

先にも述べたように、EPHA7は全長型と、チロシンキナーゼ活性が欠損した分泌型のスプライシングバリエーションが存在する。よって、どちらのタイプのEPHA7がリプログラミングに関与しているのかを調べた。そこで、*EphA7*をノックダウンして、リプログラミングを抑制した際に、全長型EPHA7と分泌型EPHA7のどちらがレスキューできるのかを検討した。全長型EPHA7はレトロウイルスを用いて過剰発現させ、分泌型のEPHA7はEPHA7<sup>FC</sup> (EPHA7細胞外領域だけで作られたタンパク質で、分泌型EPHA7の機能をす)を培地中に添加した。その結果、全長型EPHA7を発現させたサンプルではリプログラミング効率の改善が見られなかったのに対しEPHA7<sup>FC</sup>を培地に添加したサンプルでは、ノックダウンによって減少した*Nanog*のmRNAレベルが回復し、NANOG陽性コロニーの数も増加した (図 9A-E)。これらの結果は、MEFのリプログラミングでは分泌型のEPHA7が重要であることを示唆している。

##### (6) 分泌型のEPHA7はリプログラミングの中期から後期にかけて機能する

次に、分泌型EphA7がリプログラミングのどの時期に働くのかを調べた。*EphA7*をノ

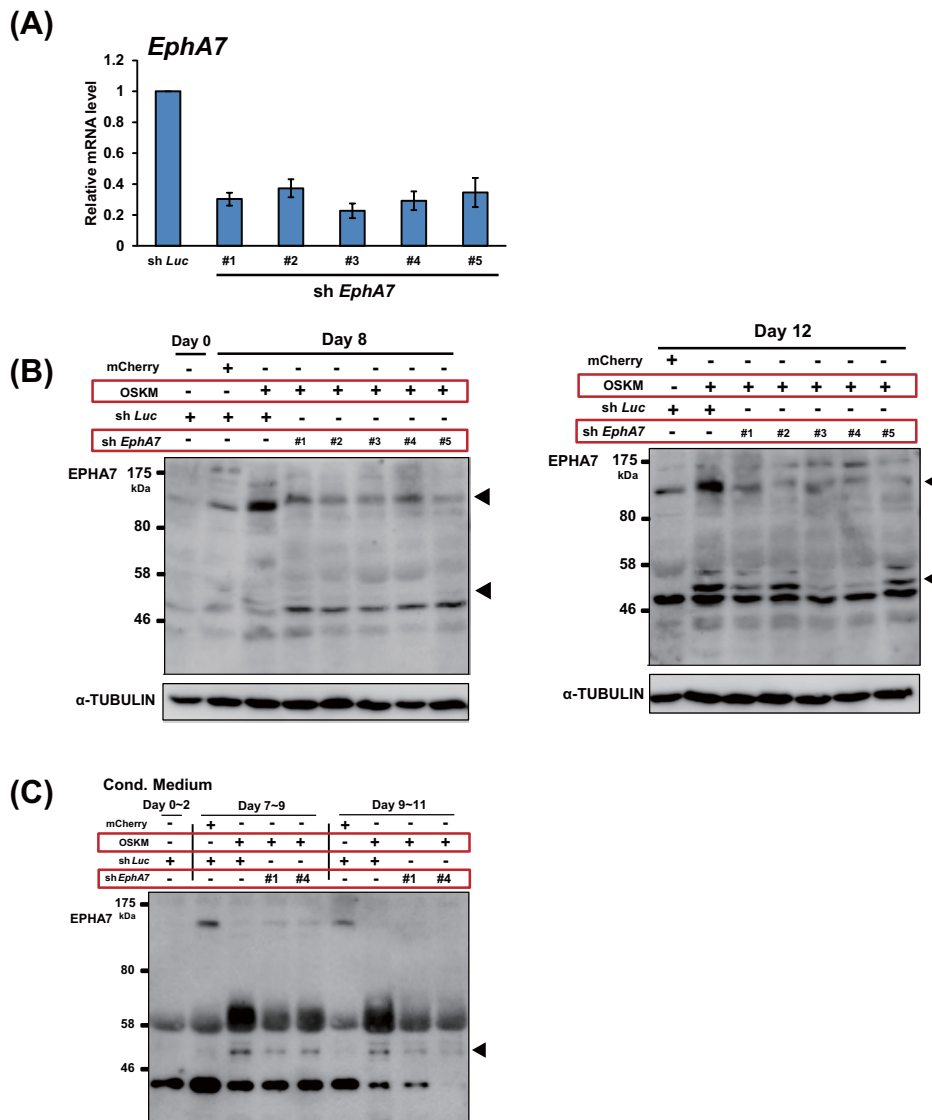


図6 リプログラミング過程における *EphA7* のノックダウン

(A) 定量的 RT-PCR による *EphA7* 発現量の解析。ルシフェラーゼに対する shRNA (sh *Luc*) をコントロールとして用いた。使用した *EphA7* に対する shRNA のコンストラクト全てでノックダウンの効果が確認できた。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。 (B) 免疫ブロットによる EPHA7 発現量の解析。リプログラミングを誘導していないコントロールのサンプルでは mCHERRY を導入した。Day 8 における発現量を左側に、Day 12 における発現量を右側に示している。Loading コントロールとして  $\alpha$ -TUBULIN を検出した。上にある三角印は全長型 EPHA7 を、下にある三角印は分泌型 EPHA7 を示している。 (C) 免疫ブロットによる培地中の分泌型 EPHA7 の発現解析。リプログラミングを誘導した MEF を Day 7 から Day 9 まで、または Day 9 から Day 11 までの 2 日間無血清培地で培養し、その培地に含まれているタンパク質を回収し免疫ブロットを行った。コントロールとしてリプログラミングを誘導しなかった MEF を 2 日間無血清培地で培養しタンパク質を回収した。

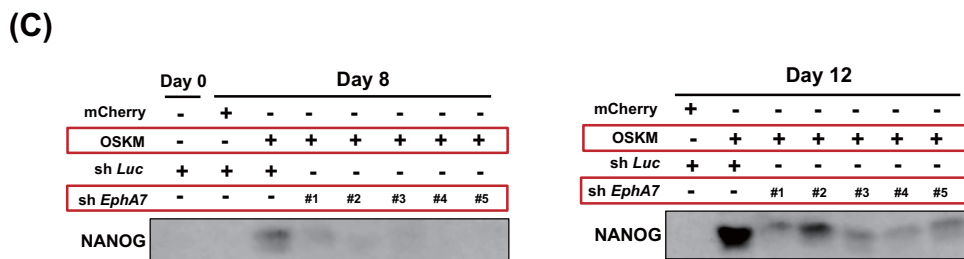
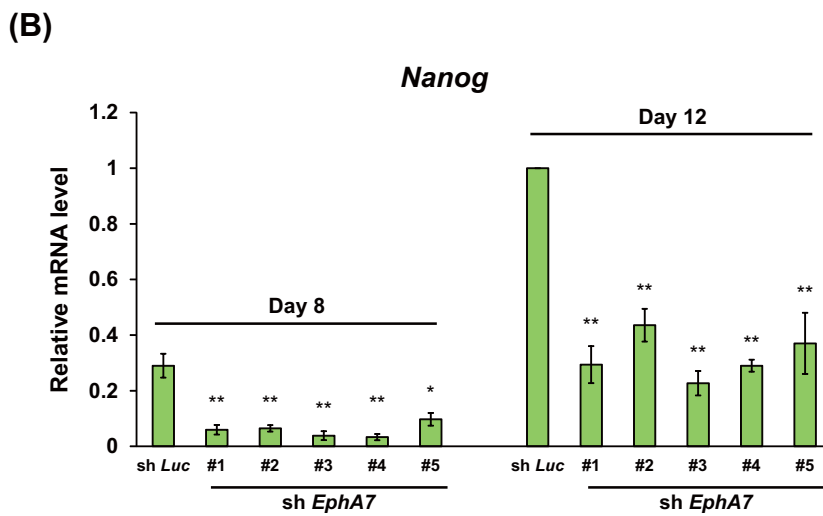
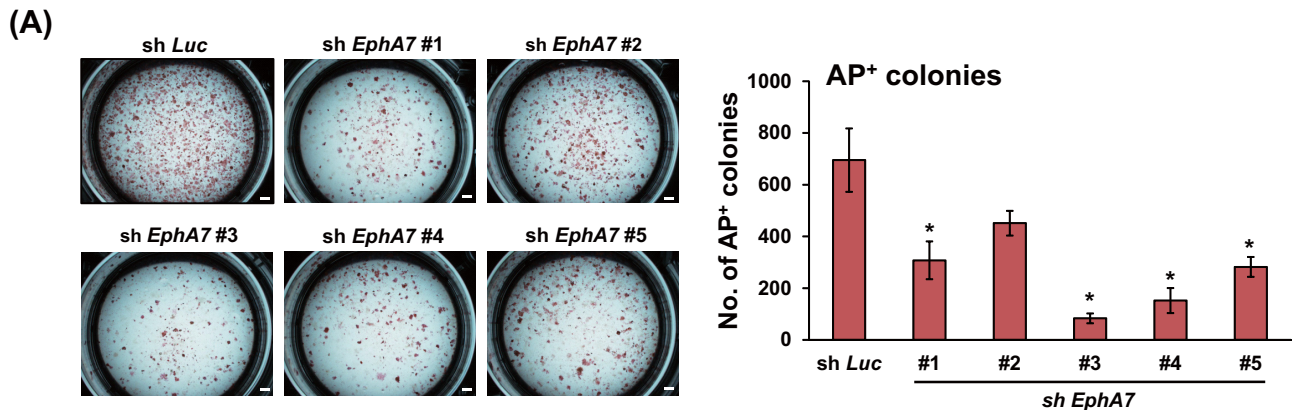


図7 *EphA7* のノックダウンによるリプログラミング効率の低下

(A) *EphA7* のノックダウンによるリプログラミング効率への影響。AP 陽性コロニーの写真(左)との計測結果(右)。*EphA7* のノックダウンによって AP 陽性コロニー数は減少した。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。スケールバー=2 mm。(B) 定量的 RT-PCR による *Nanog* 発現量の解析。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05; \*\*P<0.01)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(C) 免疫ブロットによる NANOG の発現量の解析。Loading コントロールの  $\alpha$ -TU BULIN は図 7 の (B) と共通である。

(D)

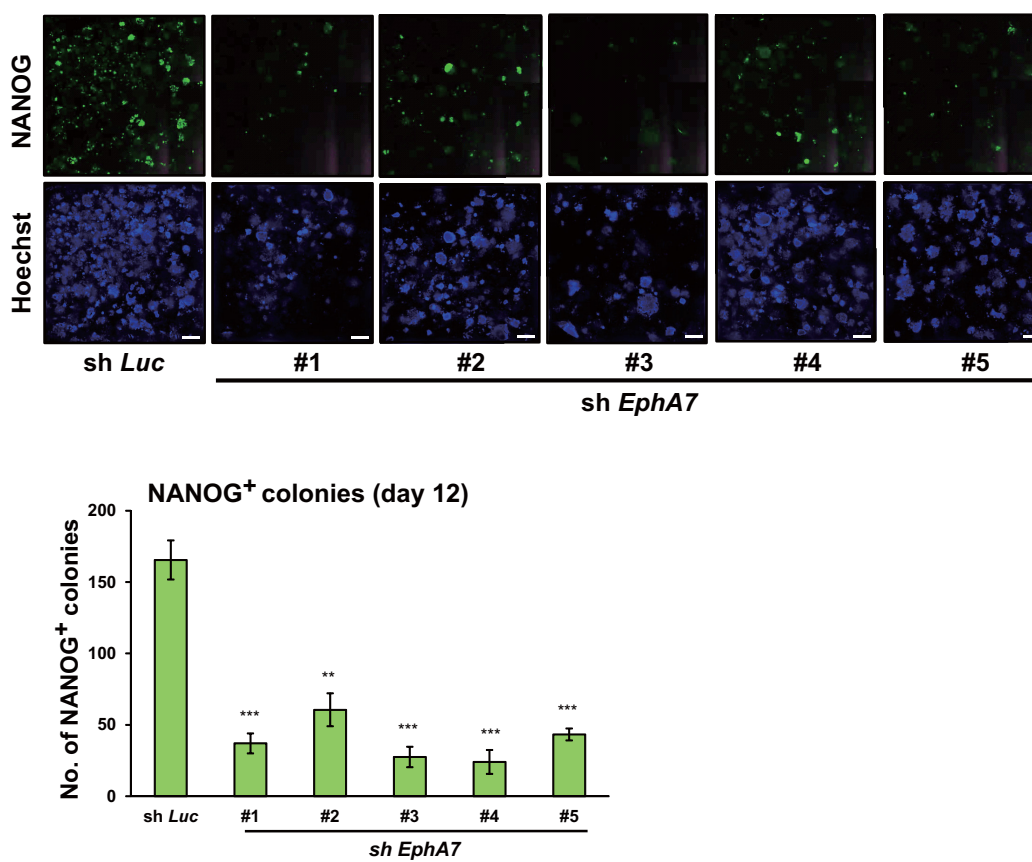


図7 *EphA7* のノックダウンによるリプログラミング効率の低下

(D) リプログラミング誘導後12日目の *Nanog*-GFP 陽性コロニーの写真(上)との計測結果(下)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001)。P 値は student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。スケールバー=2 mm。

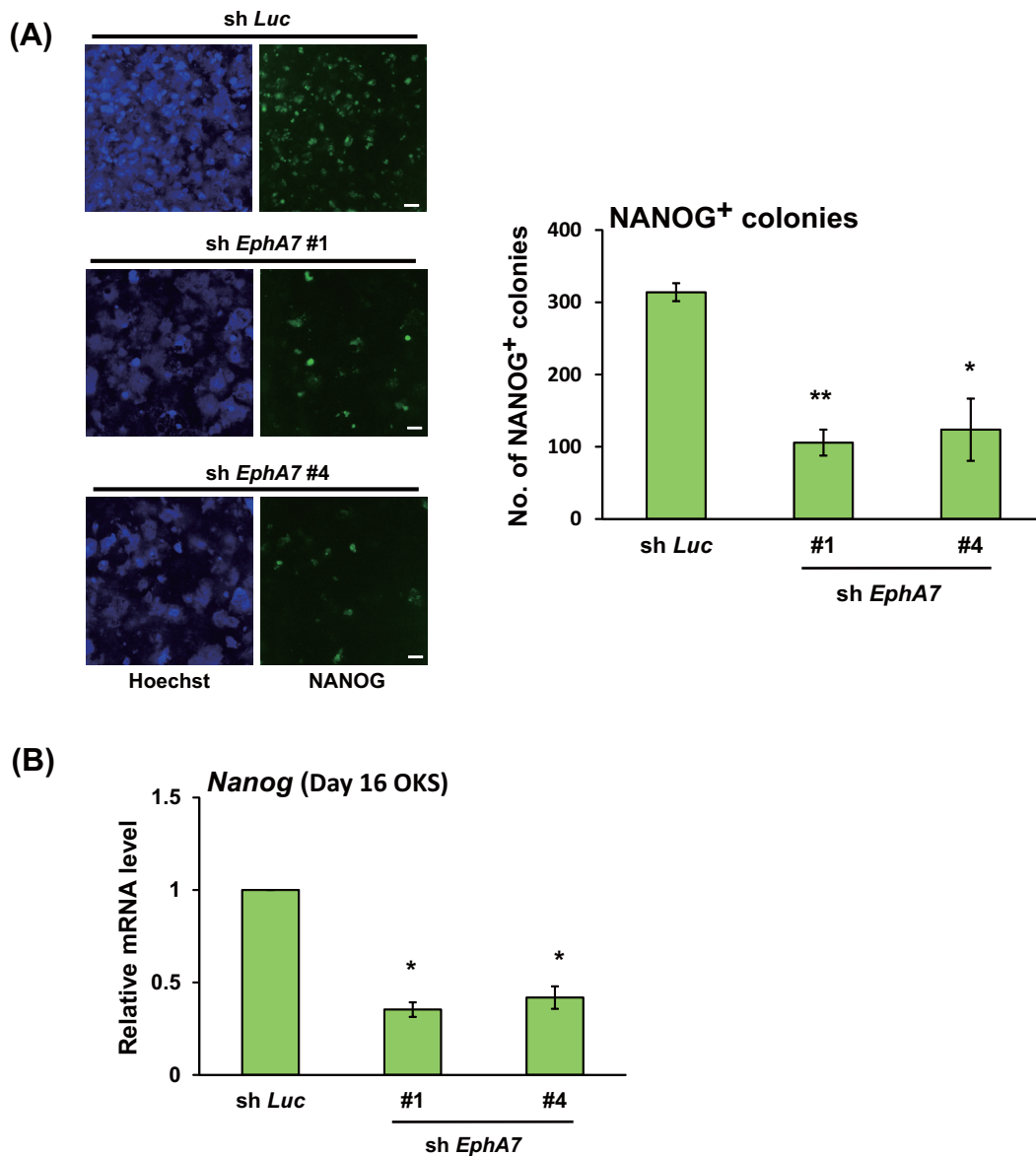
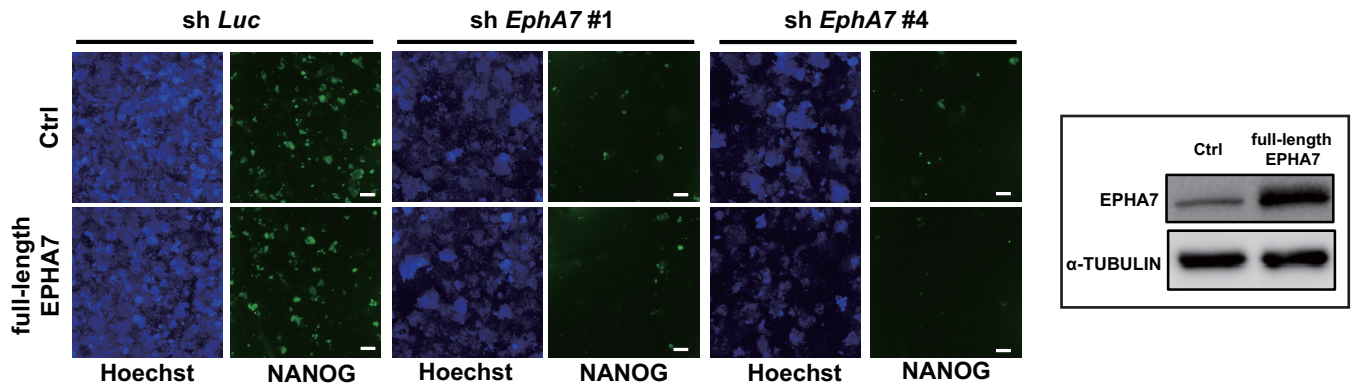
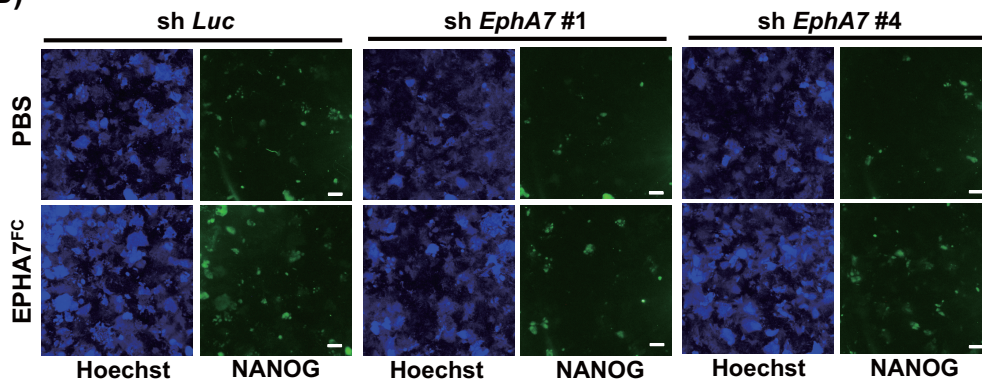


図8 *EphA7* のノックダウンは3因子 (OSK) によるリプログラミングの効率を低下させる (A)*Nanog*-GFP 陽性コロニーの写真 (左) との計測結果 (右)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05; \*\*P<0.01)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。スケールバー=2 mm。(B) 定量的 RT-PCR による OKS 導入後 16 日目の *Nanog* 発現量の解析。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。

(A)



(B)



(C)

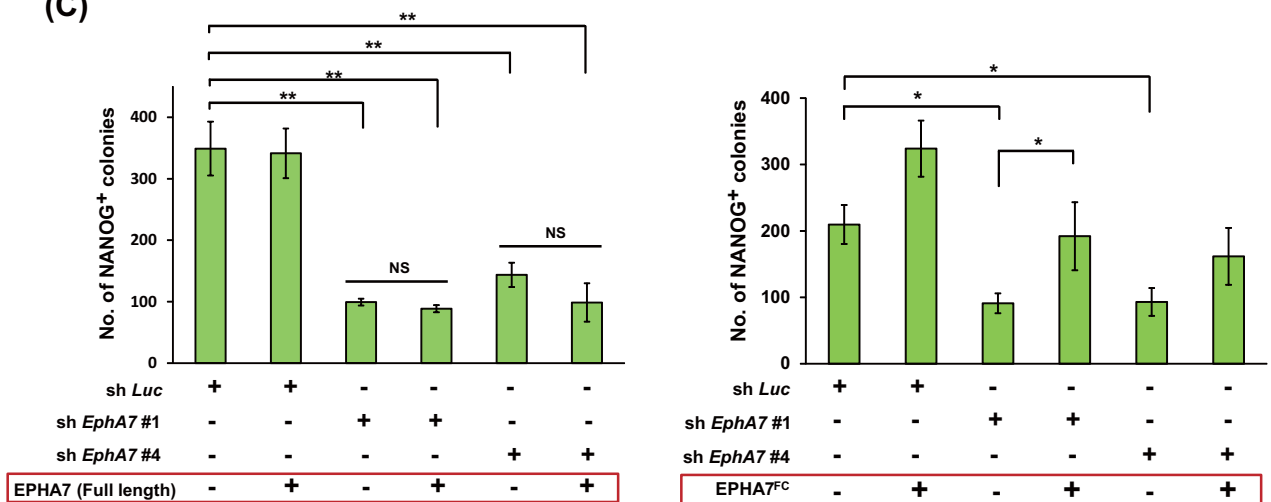
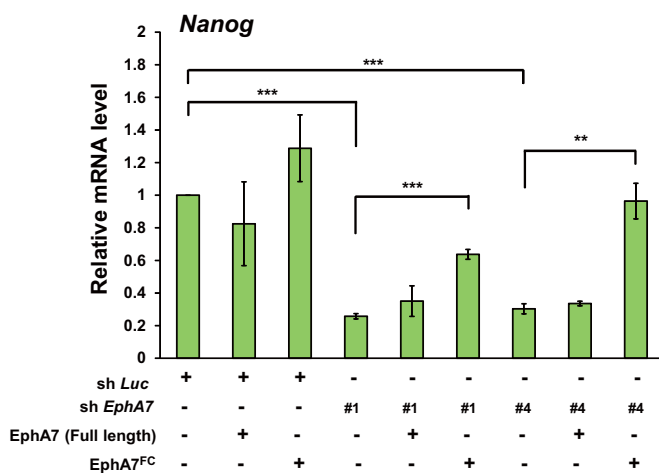


図9 分泌型 EPHA7 は *EphA7* のノックダウンによるリプログラミング効率の低下を回復させる

(D)



(E)

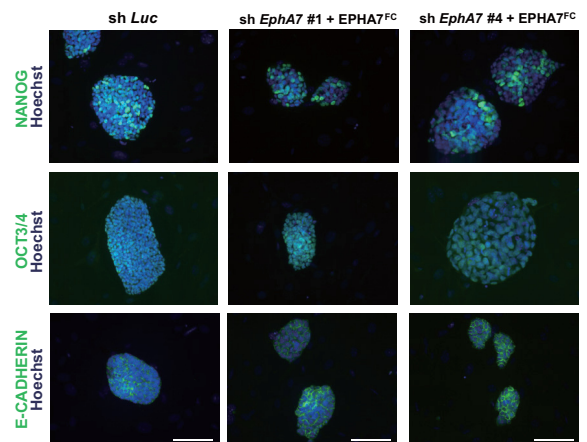


図9 分泌型 EPHA7 は *EphA7* のノックダウンによるリプログラミング効率の低下を回復させる

(A) 全長型 EPHA7 がリプログラミング効率に与える影響。リプログラミングを誘導した MEF (sh *Luc*) と *EphA7* をノックダウンした MEF (sh *EphA7* #1 と #4) に全長型 EPHA7 を過剰発現させ、12 日後にサンプルを回収した。Nanog-GFP 陽性コロニーの写真を左に示している。右は全長型 EPHA7 が過剰発現していることを示した免疫ブロットの結果。スケールバー = 2 mm。(B) 分泌型 EPHA7 がリプログラミング効率に与える影響。EPHA7<sup>FC</sup> (切断型 EPHA7; 5  $\mu$ g/ml) を Day 6 から Day 10 まで添加した。Nanog-GFP 陽性コロニーの写真。スケールバー = 2 mm。(C) (A) と (B) の Nanog-GFP 陽性コロニーの計測結果 ((A), 左; (B), 右)。(D) 全長型 EPHA7 の過剰発現、又は分泌型 EPHA7 が Nanog の発現に与える影響を定量的 RT-PCR を用いて解析した。サンプルは Day 12 に回収した。(C), (D) について、データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している ((C) は n=3, (D) は n=4, \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; NS, not significant)。P 値は student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(E) iPS 細胞における NANOG, OCT3/4, E-CADHERIN の発現。iPS 細胞株は、以下の三条件でリプログラミングを誘導して樹立したものである。(左) OSKM とコントロール shRNA を導入した MEF (sh *Luc*)。(中央と右) OSKM と *EphA7* に対する shRNA を導入した MEF (sh *EphA7* #1 と #4) に EPHA7<sup>FC</sup> (5  $\mu$ g/ml) を添加したもの。抗 NANOG 抗体、抗 OCT3/4 抗体、抗 E-CADHERIN 抗体、Hoechst を用いて iPS 細胞の免疫染色を行った。スケールバー = 100  $\mu$ m。

ックダウンしてリプログラミングを誘導した細胞にDay 2 からDay 6、Day 6からDay 10、そしてDay 2からDay 10の三つの期間に、EPHA7<sup>FC</sup>を添加し、各サンプルのNANOG陽性コロニーの数を計測した。その結果、Day 6から10までEPHA7<sup>FC</sup>を添加したサンプルで、最もリプログラミング効率の改善が見られた (図 10)。この結果から、分泌型EPHA7はリプログラミングの中期から後期にかけて主に働くことが分かった。

#### (7) *Ephrin A3*のノックダウンはリプログラミング効率に影響を与えない

次に、EPHRINファミリーの中でリプログラミングの過程で発現が上がったEPHRIN A3 (EFNA3)についても、リプログラミングへの影響を調べた。*EfnA3*に対するsh RNAを用いて*EfnA3*のノックダウンを行い、OSKMを導入してリプログラミング誘導をした。EFNA3の発現低下によってAP陽性コロニーの数や*Naong*の発現に影響は見られなかった (図 11A、B)。以上のことは、EFNA3を介するEPH-EPHRINシグナル経路はリプログラミングの制御に関与していないことを示唆している。

#### (8) 分泌型のEPHA7はERK1/2の活性を下げることによってリプログラミングを促進する

次に、分泌型EPHA7がどのようにMEFのリプログラミング制御に関与しているかについて調べた。分泌型EPHA7がリンパ腫においてEPH-EPHRINシグナル伝達経路を阻害してERK1/2の活性化を抑制することが報告されている (Oricchio et al., 2011)。そして、マウスのES細胞が分化する時、すなわち、ES細胞が多能性を失う時には、ERK1/2の活性化のレベルが上がることが報告されている (Kim et al., 2012)。以上のことから、分泌型EPHA7はERK1/2の活性化を制御することでリプログラミングを調節することが考えられる。この仮説を検証するために、まずリプログラミングの過程におけるERK1/2の活性化レベルを調べた。リプログラミング因子を導入したMEFを2日に一回サンプルを回収して免疫ブロットを行った。ERK1/2の活性型であるリン酸化型ERK1/2 (以降pERK1/2) のレベルはリプログラミング誘導6日目から顕著に下がり始めた (図 12A, OSKM)。このタイミングはEPHA7の発現上昇のピークと一致する。pERK1/2のレベルの低下はリプログラミングを誘導していないコントロールの細胞ではみられなかった



(図 12A, Ctrl)。次に、分泌型EPHA7がリプログラミングにおけるpERK1/2のレベルの低下に寄与するのかを調べた。免疫プロットの結果により、リプログラミングを誘導した細胞で見られたpERK1/2のレベルの低下が、*EphA7*をノックダウンによって抑えられたことがわかった (図 12B)。さらに、EPHA7<sup>FC</sup>を培地に添加することにより、*EphA7*のノックダウンによるpERK1/2レベルの減少の抑制が見られなくなり、コントロールの細胞 (sh *Luc*)と同様にpERK1/2レベルが減少した (図 12C)。分泌型のEPHA7がリプログラミングを制御し、ERK1/2の活性を抑制することから、ERK1/2の活性の低下は細胞リプログラミングの重要であることが示唆された。それを検証するため、ERK1/2をリン酸化するMEKに対する特異的な阻害剤の添加が、分泌型EPHA7の添加と同じくリプログラミング効率の改善を引き起こすのかを調べた。その結果、*EphA7*のノックダウンによるリプログラミング効率の低下はMEKの阻害剤のPD0325901を添加することにより回復し、それはEPHA7<sup>FC</sup>を添加による効率改善効果に似ていた (図 13A-C)。さらに、EPHA7<sup>FC</sup>とPD032591を同時に添加しても、単独で加えた場合と同程度のリプログラミング効率の改善しか得られなかったことから (図 14)、EPHA7<sup>FC</sup>とPD032591は同じ作用機序を持つと考えられる。以上の結果は、分泌型EPHA7はERK1/2の活性を低下することにより細胞リプログラミングを促進することを示している。

#### (9) EPHA7はリプログラミング過程において間葉上皮移行を制御する

ES細胞が分化するときには、上皮間葉移行 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition; EMT)が起こることや (Jennifer et al., 2012)、pERK1/2のレベルが上昇することが報告されている (Kim et al., 2012)。さらに、大腸癌細胞ではERK1/2の活性が上皮系マーカー遺伝子であるE-CADHERINの発現を抑制し、間葉系マーカー遺伝子である*Slug*の発現を促進することも報告されているため (Conacci-Sorrell et al., 2003)、ERK1/2の活性化がEMTを制御すると考えられる。一方で、MEFからのリプログラミングの際には、EMTとは逆の現象、すなわち間葉上皮移行 (Mesenchymal-to-Epithelial-Transition; MET)が起こることが報告されている。分泌型EPHA7はERK1/2の活性を抑制することによってリプログラミングを促進することから、EPHA7がMETを制御してリプログラミングを制御するのではないかと推測した。それを検証するため、*EphA7*をノックダウンした細胞にリ

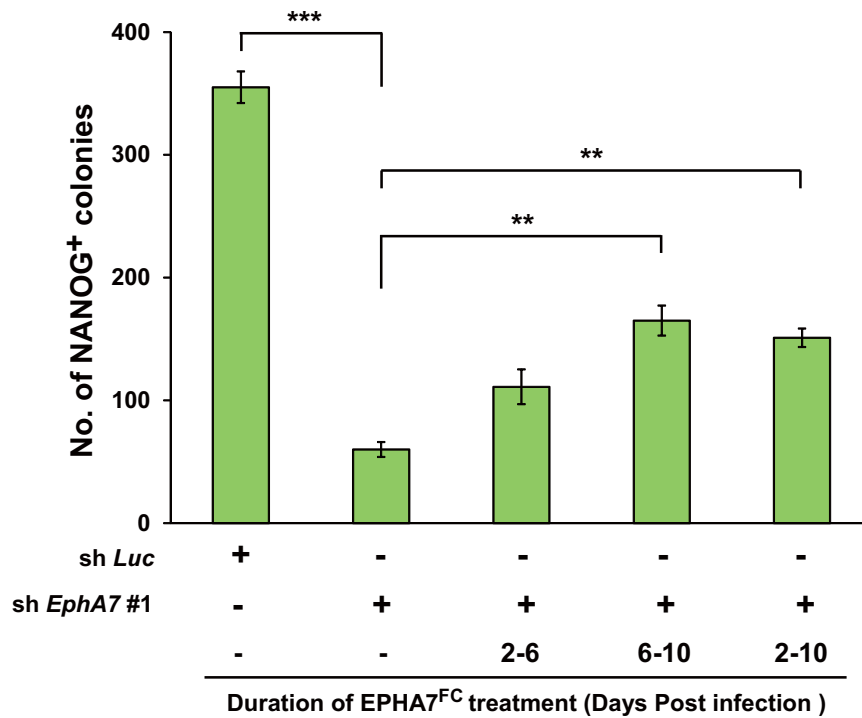


図 10 異なる時期に分泌型 EPHA7 (EPHA7<sup>FC</sup>) を添加することの効果

EphA7 をノックダウンして、プログラミングを誘導した MEF (sh *EphA7* #1) に異なる時期に EPHA7<sup>FC</sup> の添加を行った。Nanog-GFP 陽性コロニーの計測結果。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001; NS, not significant)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。

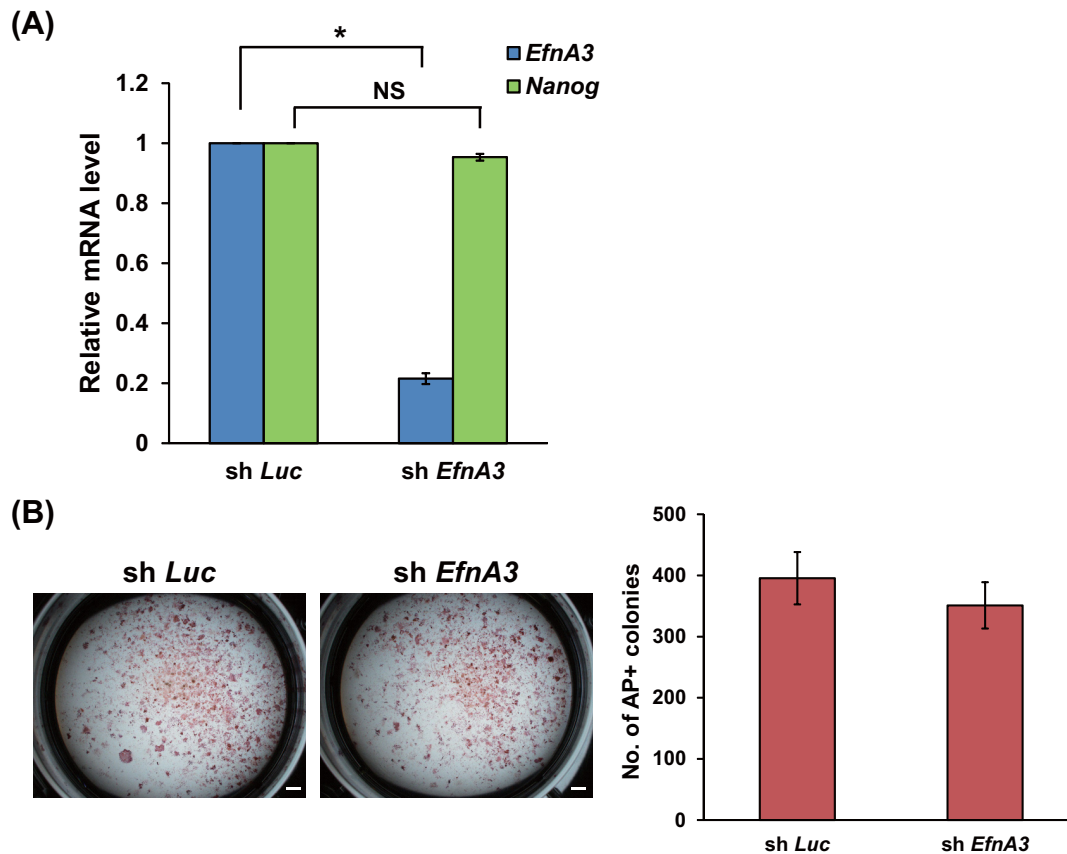
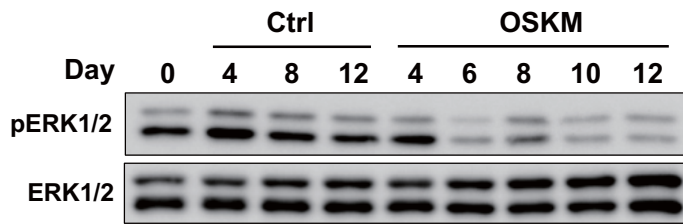


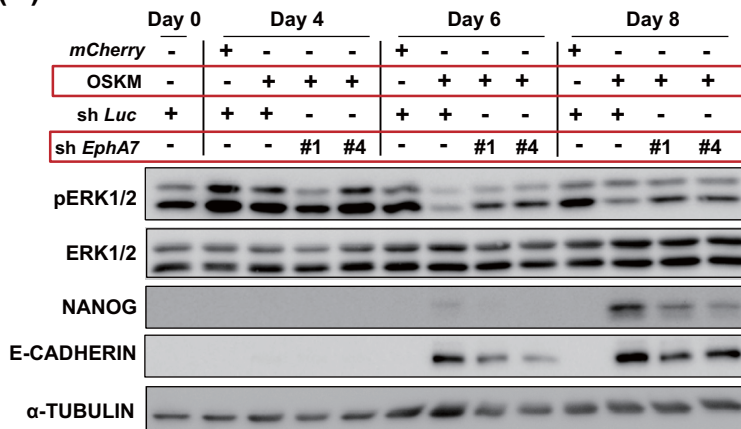
図 11 *EfnA3* のノックダウンがリプログラミングに与える影響

(A) 定量的 RT-PCR による *EfnA3* (青) と *Nanog* の発現量 (緑) の解析。shRNA による *EfnA3* のノックダウン効果は見られたが、*Nanog* の発現には変化が見られなかった。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05; NS, not significant)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(B) AP 陽性コロニーの写真 (左) との計測結果 (右)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。スケールバー=2 mm。

(A)



(B)



(C)

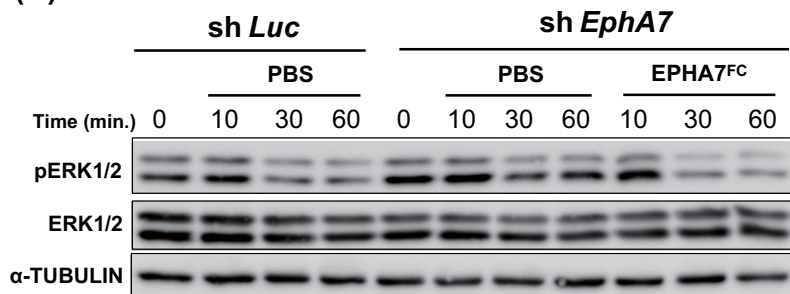


図 12 分泌型 EPHA7 はリプログラミング過程において ERK1/2 の活性を下げる

(A) 免疫プロットによるリプログラミングを誘導していないコントロールの MEF と OSKM を導入した MEF の pERK1/2 のレベルの解析。サンプルは図 3 の (D) と同じものを使用した。(B) *EphA7* のノックダウンによる pERK1/2 レベルへの影響。*EphA7* のノックダウンはリプログラミングにおける pERK1/2 レベルの低下を抑える。(C) 分泌型 EPHA7 の添加が pERK1/2 のレベルに及ぼす影響。まず、コントロール shRNA を導入した MEF(*sh Luc*) と *EphA7* に対する shRNA を導入した MEF(*sh EphA7*) からリプログラミングを誘導した。リプログラミング誘導後 8 日目に、培地に EPHA7<sup>FC</sup> (5  $\mu$ g/ml) を添加し、10、30、60 分後に細胞を回収して pERK1/2 のレベルを調べた。EPHA7<sup>FC</sup> は pERK1/2 のレベルを低下させた。

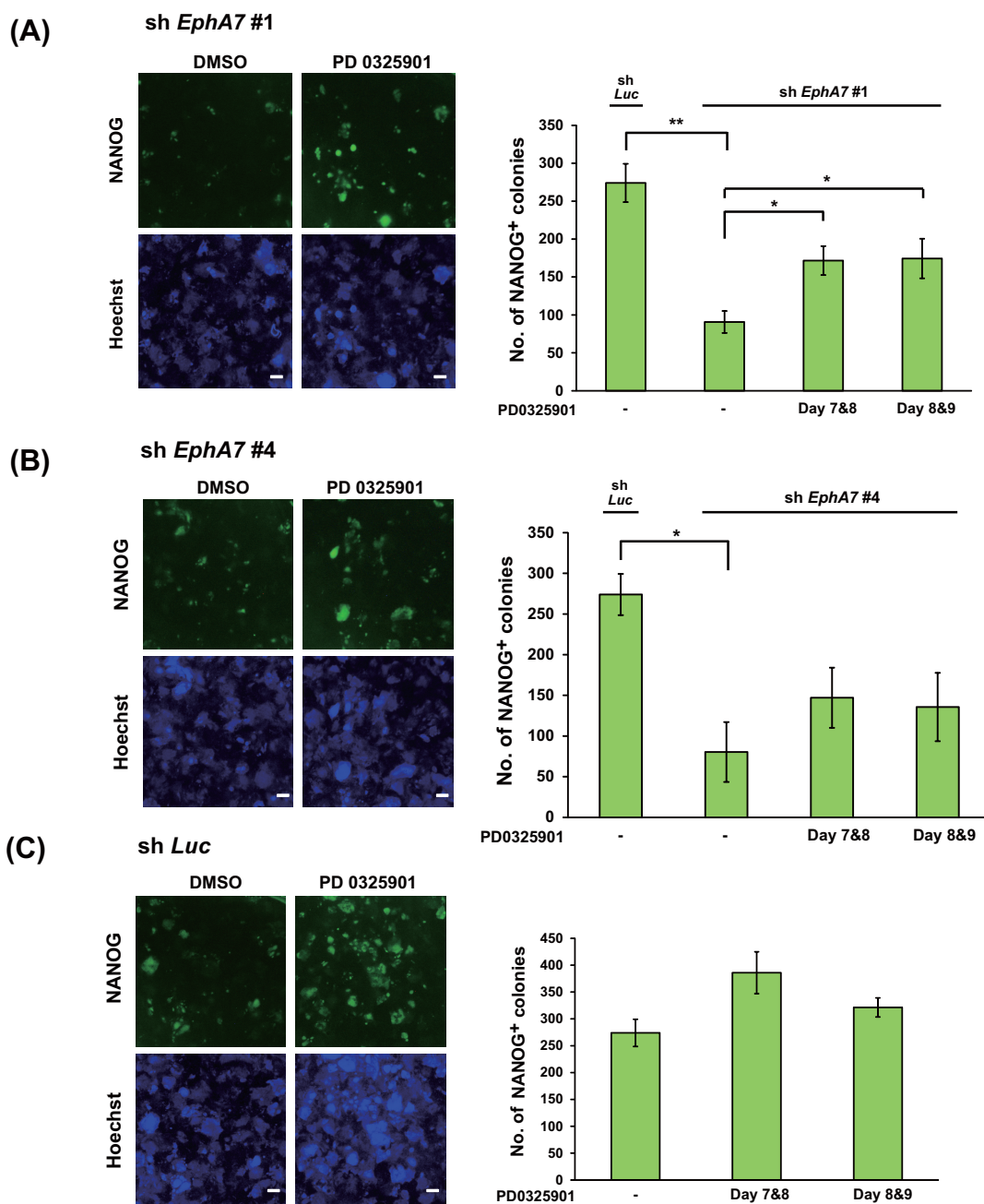


図 13 MEK 阻害剤の添加はリプログラミングの効率を改善する

(A) *EphA7* をノックダウンしてリプログラミングを誘導した MEF(*sh EphA7* #1) に Day 7 から Day 8 まで、または Day 8 から Day 9 まで、MEK 阻害剤である PD0325901 (0.5  $\mu$ M) を処理し、12 日目に *Nanog*-GFP 陽性コロニーの数を計測した。写真(左)と計測結果(右)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05; \*\*P<0.01)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。スケールバー =2 mm。(B) (A) と同様の実験を *sh EphA7* #4 のコンストラクトを用いて行った。写真(左)と計測結果(右)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(C) (A) と同様の実験をコントロール shRNA (*sh luc*) を用いて行った。写真(左)と計測結果(右)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。

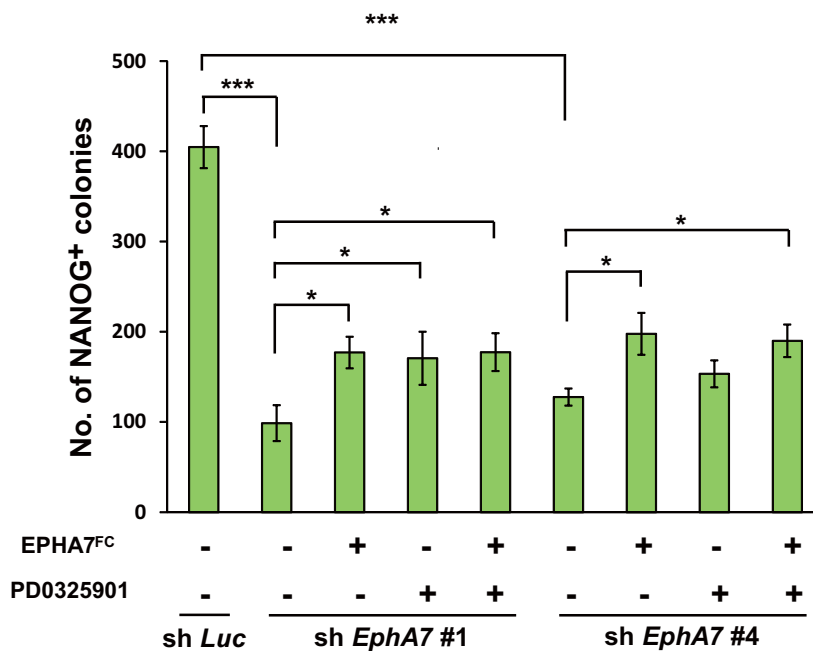


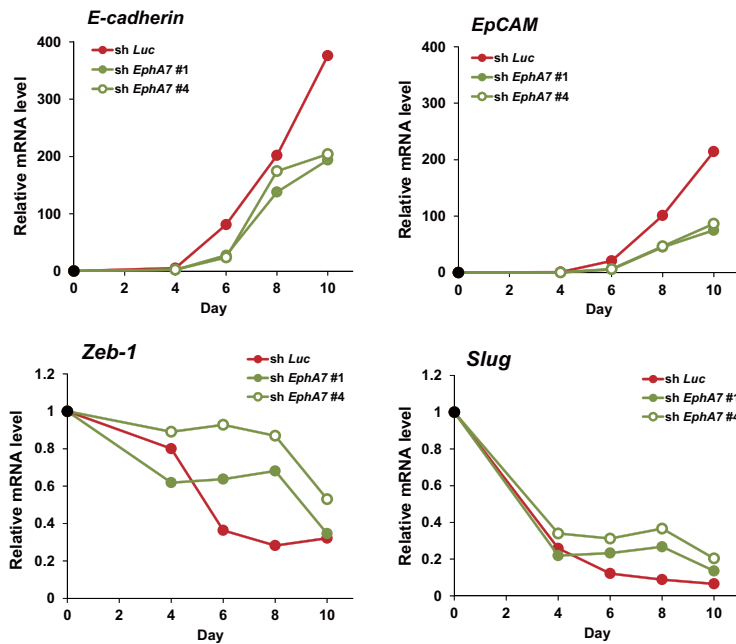
図 14 分泌型 EPHA7 と MEK 阻害剤によるリプログラミング効率の改善は相加的ではない  
*EphA7* をノックダウンしてリプログラミングを誘導した MEF(sh *EphA7* #1 & または #4) に EPHA7<sup>FC</sup> (5  $\mu$ g/ml) を Day 6 から Day 10 まで、そして PD0325901 (0.5  $\mu$ M) を Day 7 から Day 8 まで添加し、12 日目に NANOG 陽性コロニーの数を計測した。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05; \*\*\*P<0.001)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。

プログラミングを誘導し、上皮系マーカー遺伝子と間葉系マーカー遺伝子のmRNA量の変化を調べた。その結果、リプログラミング過程で見られる、上皮系マーカー遺伝子 (*E-cadherin*と*EpCAM*)の発現上昇と間葉系のマーカー遺伝子 (*Zeb-1*と*Slug*)の発現減少が、*EphA7*のノックダウンにより抑制された (図 15A)。一方、リプログラミングの初期に発現が上昇することが報告されている細胞周期に関わる遺伝子は (Mikkelsen et al., 2008)、*EphA7*のノックダウンによって大きな変化が見られなかった (図 15B)。以上の結果はEPHA7がMETを制御してリプログラミングを調節する可能性を示唆している。

#### (10) 分泌型のEPHA7はES細胞の多能性維持には寄与しない

ERK1/2の活性を抑制することは、ES細胞の樹立や多能性の維持に寄与することが報告されている (Ying et al., 2008; Shi et al., 2008; Silva et al., 2009)。MEK阻害剤PD0325901とGSK3β阻害剤CHIR99021 (2 inhibitors; 2i) をES細胞に添加することで、多能性が最も安定的に保持されることも知られている (Ying et al., 2008)。そこで、分泌型のEPHA7がES細胞の多能性維持に寄与するかを調べるため、ES細胞にEPHA7<sup>FC</sup>を添加し、多能性マーカーである*Nanog*と*Klf2*のmRNAレベルの変化を調べた。PD0325901、又は 2i添加が多能性マーカーの発現上昇を引き起こしたのに対し、EPHA7<sup>FC</sup>の添加は多能性マーカーの発現上昇を引き起こさなかった (図 16A)。さらに、EPHA7<sup>FC</sup>を添加してもES細胞のpERK1/2レベルは下がらなかった (図 16B)。以上の結果は、分泌型EPHA7がES細胞の多能性維持機構には関与していないことを示している。また、PD0325901の添加によるERK1/2の活性の抑制は、部分的にリプログラミングされたpartially iPS (piPS)細胞を完全なiPS細胞に変化させることが報告されている (Silva et al., 2008)。そこで、分泌型EPHA7をpiPS細胞に添加することによって、多能性マーカー遺伝子の発現量がES細胞における発現量と同程度にまで上昇するのかどうかを調べた。その結果、分泌型EPHA7はpiPS細胞における多能性マーカー遺伝子の発現上昇に寄与しなかった (図 16C)。以上の結果は、分泌型のEPHA7によるERK1/2の活性低下は細胞リプログラミング特異的な現象で、ES細胞の多能性維持やpiPS細胞を完全なiPS細胞に変化させることには関与しないことを示唆している。

(A)



(B)

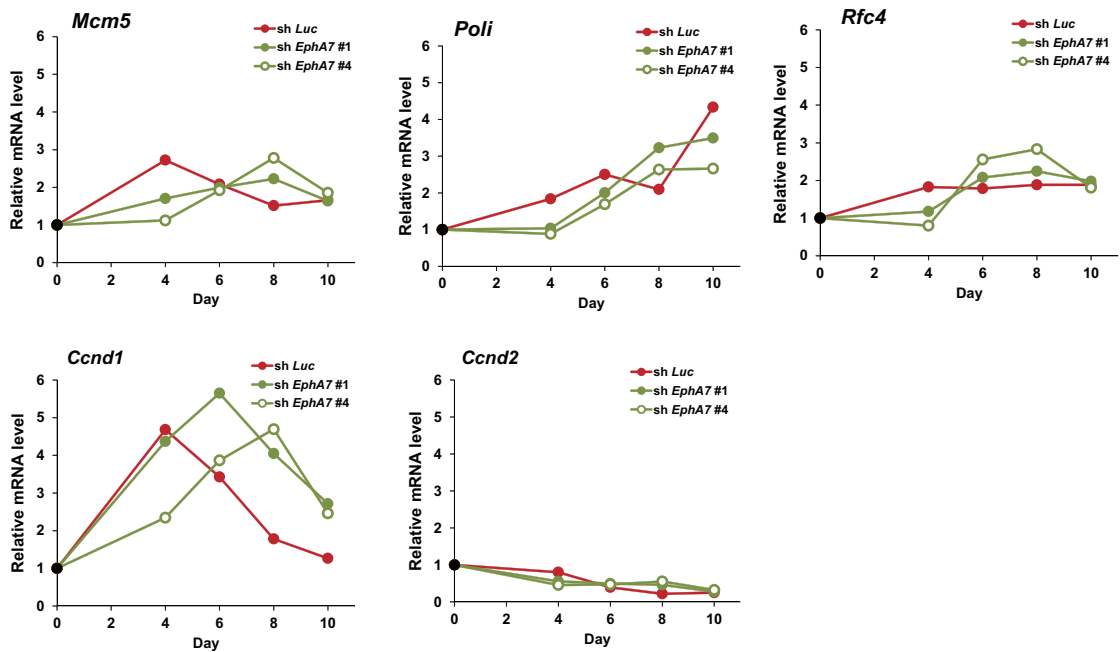


図 15 EPHA7はリプログラミングにおけるMETを制御する

(A) 定量的 RT-PCR による上皮系マーカー (*E-cadherin* と *EpCAM*) と間葉系マーカー遺伝子 (*Zeb-1* と *Slug*) の発現解析。コントロール shRNA を導入した MEF(*sh Luc*) と *EphA7* をノックダウンした MEF(*sh EphA7* #1 と #4) にリプログラミングを誘導し、遺伝子の発現を調べた。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。(B) 定量的 RT-PCR による細胞周期関連遺伝子の発現解析。コントロール shRNA を導入した MEF(*sh Luc*) と *EphA7* をノックダウンした MEF (*sh EphA7* #1 と #4) にリプログラミングを誘導し、*Mcm5*, *Poli*, *Rfc4*, *Ccnd1*, and *Ccnd2* の発現を調べた。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。



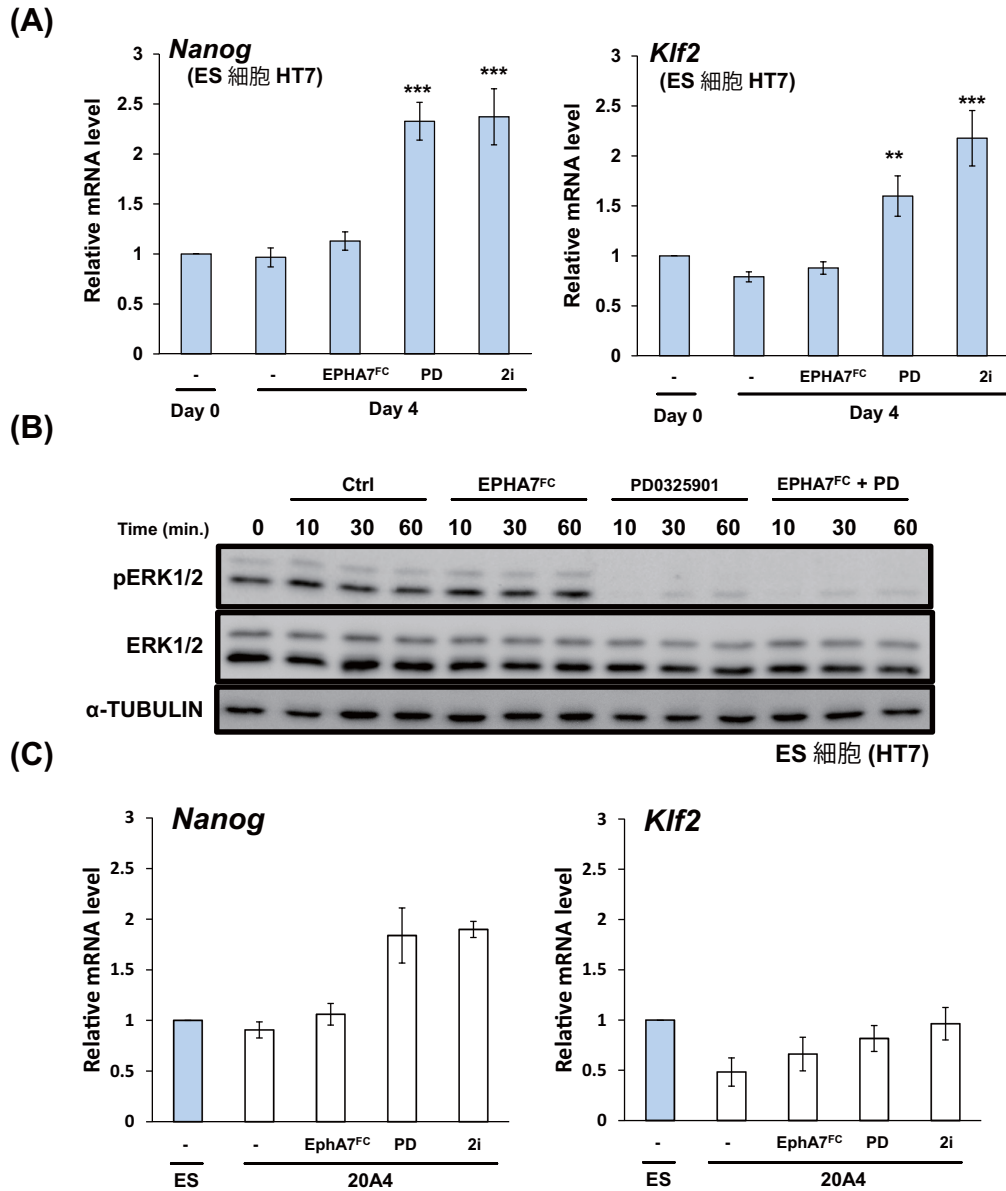


図 16 分泌型 EPHA7 は ES 細胞の多能性維持には寄与しない

(A) 定量的 RT-PCR による ES 細胞における多能性マーカー遺伝子 (*Nanog* と *Klf2*) の発現解析。EPHA7<sup>FC</sup> (5 μg/ml)、PD0325901 (1 μM)、又は 2i (PD 0325901 (1 μM) + CHIR99021 (3 μM)) を培地に添加して ES 細胞を 6 日間培養し、サンプルを回収した。mRNA 量は GAPDH により補正し、Day 0 を 1 とした相対値で示している。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=6, \*\*P<0.01; \*\*\*P <0.001)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。(B) 分泌型 EPHA7 が ES 細胞における pERK1/2 レベルに及ぼす影響。EPHA7<sup>FC</sup> (5 μg/ml)、PD0325901 (1 μM)、又は EPHA7<sup>FC</sup>+PD0325901 を培地に添加し、10、30、60 分後にサンプルを回収し、pERK1/2 のレベルを調べた。分泌型 EPHA7 は ES 細胞における pERK1/2 のレベルを変化させない。(C) 定量的 RT-PCR による ES 細胞と piPS 細胞 (20A4) における多能性マーカーの発現解析。EPHA7<sup>FC</sup> (5 μg/ml)、PD0325901 (1 μM)、又は 2i (PD 0325901 (1 μM) + CHIR99021 (3 μM)) を培地に添加して piPS 細胞を 6 日間培養し、サンプルを回収した。mRNA 量は GAPDH により補正し、ES 細胞における発現を 1 とした相対値で示している。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=4)。

### (11) リプログラミング途中の細胞が主にEPHA7を分泌する

リプログラミングの進行具合とERK1/2の活性との相関関係をさらに詳しく調べるために、FACSを用いてリプログラミングの中期のマーカであるSSEA-1、又はリプログラミングの後期のマーカであるNANOGの発現強度によって分取し、pERK1/2のレベルを調べた。その結果、SSEA-1陽性あるいはNANOG陽性の細胞は、それぞれの陰性の細胞に比べてpERK1/2のレベルが低かった (図 17 A、B)。この結果は、リプログラミングの進行はpERK1/2レベルの減少に伴うことを示している。次に、NANOG陽性細胞と陰性細胞における*EphA7*の発現について調べた。リプログラミング誘導後12日目の細胞において、全長型*EphA7*分泌型の*EphA7*共に、NANOG陽性の細胞より陰性の細胞で発現が高かった (図 17C)。さらに、*Nanog*-GFP-IRES-PuroRマウス由来のMEFを用いてリプログラミングを誘導し、リプログラミングを誘導した後7日目から9日目の間に細胞にピューロマイシンを処理することで、NANOG陽性細胞だけを選択し*EphA7*の発現様相を調べた (図 17D)。その結果、全長型*EphA7*と分泌型の*EphA7*共に、NANOG陽性 (ピューロマイシン処理有り)の細胞よりNANOG陰性 (ピューロマイシン処理無し)の細胞でより高い発現をみせた (図 17E)。培地に分泌された分泌型EPHA7もピューロマイシンを処理しなかった細胞集団での量が多かった(図 17F)。以上の結果は、完全にリプログラミングされた細胞ではEPHA7の発現が顕著に落ちることを示しており、EPHA7はリプログラミング途中の細胞が発現、分泌していることが示された。

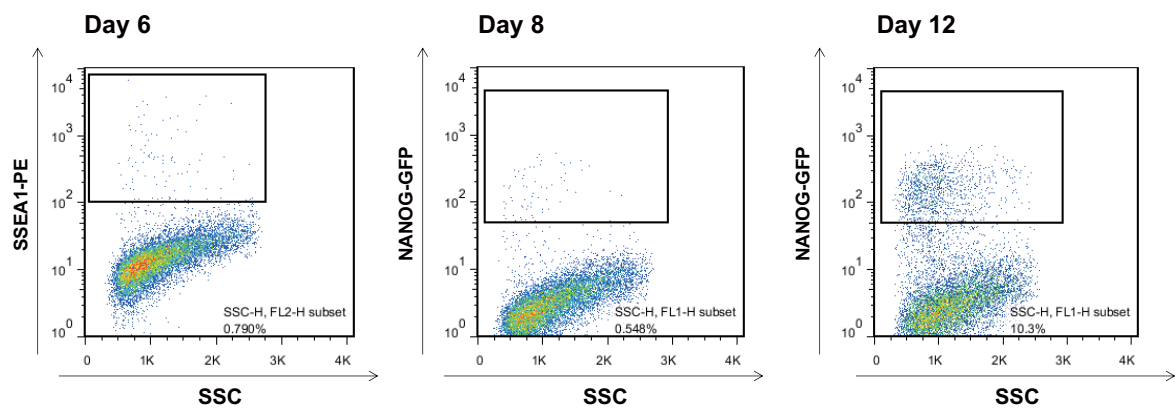
### (12) 分泌型EPHA7は、主にSSEA-1陰性細胞へと働きかけてリプログラミングを促進する

次に、EPHA7を発現するリプログラミング途中の細胞が、分泌型EPHA7の分泌を介して、他の細胞が多能性状態に至るのを補助するのかどうかについて検討した。また、EPHA7を分泌する細胞が他の細胞に働きかける場合は、どの状態にある細胞が主にEPHA7の影響を受けるのかを調べた。まず、*Nanog*-GFP-IRES-PuroRマウス由来のMEFからリプログラミングを誘導し、8日目と12日目にSSEA-1陽性と陰性細胞にソートした。次に、分取した細胞を、2種類のフィーダー細胞上にまきなおし、*Nanog*-GFP陽性コロニーの数を計測した。フィーダー細胞として用いたのは、コントロールshRNAを導入し

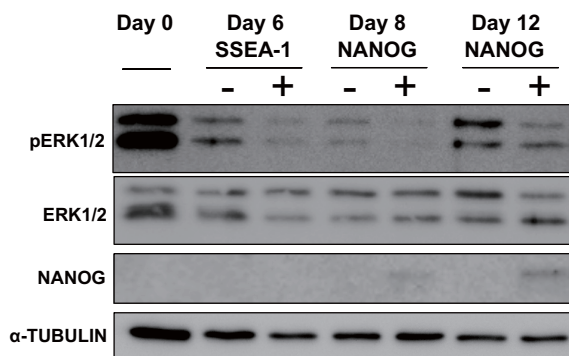
てリプログラミング誘導した野生型マウス由来のMEFと、*EphA7*のshRNAを導入してリプログラミング誘導した野生型マウス由来のMEFである。その結果、*EphA7*がノックダウンされているフィーダー細胞上にまくことで、NANOG陽性のコロニーの数が減少した (図 18A)。これは、細胞をソートした日が8日目でも12日目でも同じであった。さらに興味深いことに、フィーダー細胞が発現するEPHA7が、まきなおした細胞のリプログラミング効率に与える影響は、8日目のSSEA-1陰性の細胞で最も顕著であった。

次に、分泌型のEPHA7がSSEA-1陽性と陰性の細胞に与える影響を調べた。*Nanog*-GFP-IRES-PuroRマウス由来のMEFからリプログラミングを誘導し、8日目にSSEA-1陽性と陰性の細胞に分け、野生型マウス由来のMEFフィーダーの上にまいた。そこに、PBSまたはEPHA7<sup>FC</sup>を培地に添加した。更にOCT3/4がEPHA7の発現を誘導することから、OCT3/4のみを過剰発現させたMEFもフィーダー細胞として用いた。その結果、EPHA7<sup>FC</sup>の添加した条件とOCT3/4を過剰発現させたフィーダー細胞を用いた条件で、*Nanog*-GFP陽性コロニーの出現が増加した。さらに、その効果はSSEA-1陰性に細胞に対して顕著であった (図 18B)。以上のことから、リプログラミング途中の細胞は分泌型EPHA7の分泌を介して主にSSEA-1陰性の細胞に働きかけて、多能性状態へと変化させることが示唆された。

(A)



(B)



(C)

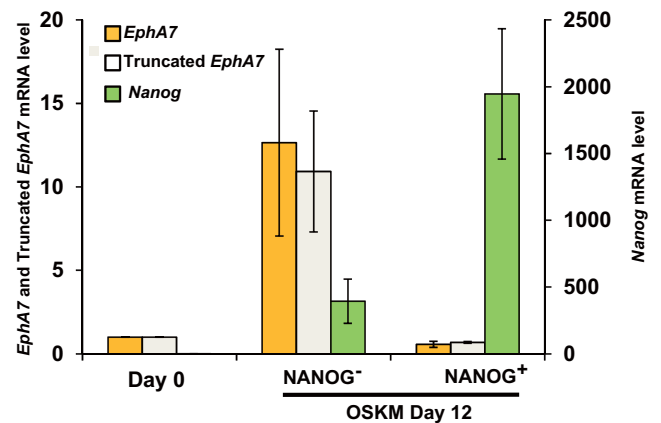
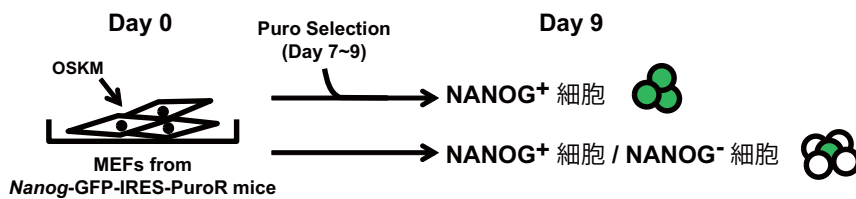


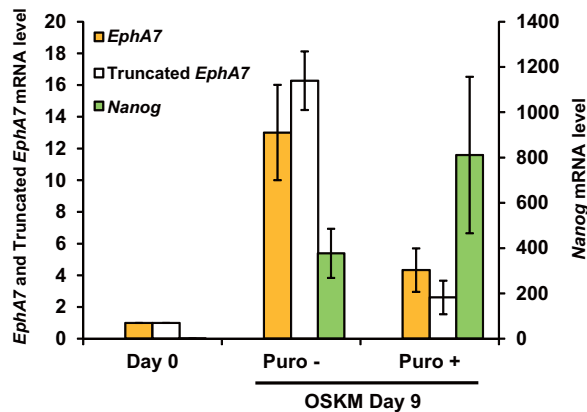
図 17 リプログラミング途中段階の細胞が主に分泌型 EPHA7 を分泌する

(A) リプログラミングを誘導した MEF を SSEA-1 の発現強度 (Day 6)、NANOG の発現強度 (Day 8 と Day 12) によってソートした際の FACS のプロット図。(B) (A) でソートしたサンプルの pERK1/2 レベルを免疫ブロットで調べた。pERK1/2 のレベルは SSEA-1 陰性細胞より SSEA-1 陽性細胞で減少し、NANOG 陰性細胞より NANOG 陽性細胞で大幅に減少した。(C) リプログラミングを誘導して 12 日後の細胞を NANOG の発現強度でソートし、そのサンプルを用いて定量的 RT-PCR を行った。全長型と分泌型 *EphA7* は共に NANOG 陰性細胞で発現が高かった。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3)。

(D)



(E)



(F)



図 17 リプログラミング途中段階の細胞が主に分泌型 EPHA7 を分泌する

(D) ピューロマイシン選択実験の模式図。 *Nanog-GFP-IRES-PuroR* マウス由来の MEF にリプログラミングを誘導し、Day 7 から Day 9 までピューロマイシン (1  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加することで、NANOG 陽性細胞を選択した。(E) ピューロマイシン処理をした MEF (NANOG 陽性細胞) とピューロマイシン処理をしなかった MEF (NANOG 陰性細胞と陽性細胞の両方含む) を用いて定量的 RT-PCR を行い、*Nanog*、*EphA7*、分泌型 *EphA7* の発現を調べた。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している ( $n=3$ )。(F) ピューロマイシン処理をした MEF (NANOG 陽性細胞) とピューロマイシン処理をしなかった MEF (NANOG 陰性細胞と陽性細胞の両方を含む) を飼っていた培地について抗 EPHA7 抗体を用いて免疫ブロットを行った。

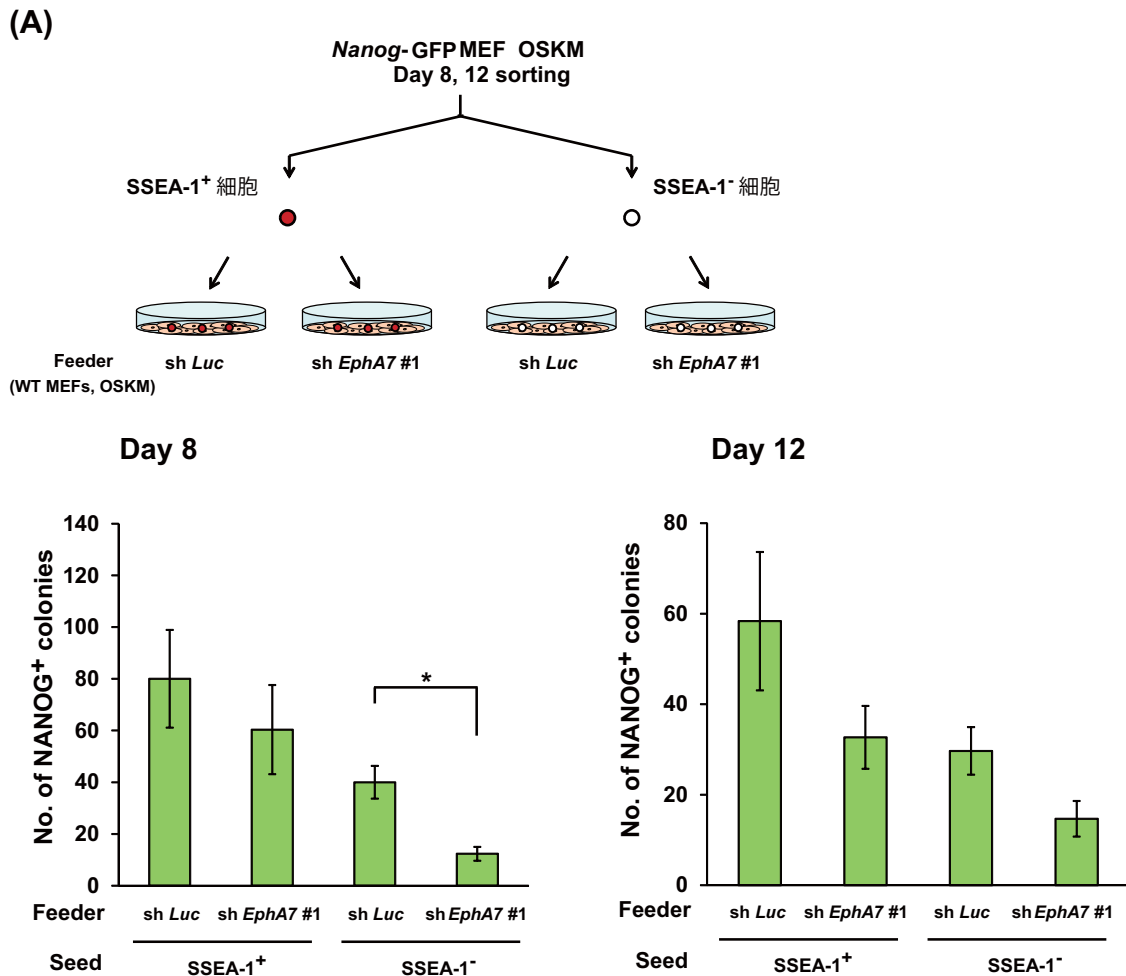


図 18 分泌型 EPHA7 は SSEA-1 陰性細胞のリプログラミングを促進する

(A) 分泌型 EPHA7 を発現するリプログラミング途中段階の細胞が SSEA-1 陰性と陽性細胞のリプログラミングに及ぼす影響。実験の模式図 (上)。リプログラミングを誘導した *Nanog*-GFP マウス由来の MEF を 8 日目と 12 日目に SSEA-1 陰性と陽性細胞に分けた。次にソートした細胞を、コントロール shRNA を導入してからリプログラミングを誘導した WT マウス由来の MEF と、*sh EphA7* #1 を導入してからリプログラミングを誘導した WT マウス由来の MEF の上にまいた。その後 4 日間培養して形成された *Nanog*-GFP 陽性コロニー数を計測した (下)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05)。P 値は Student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。

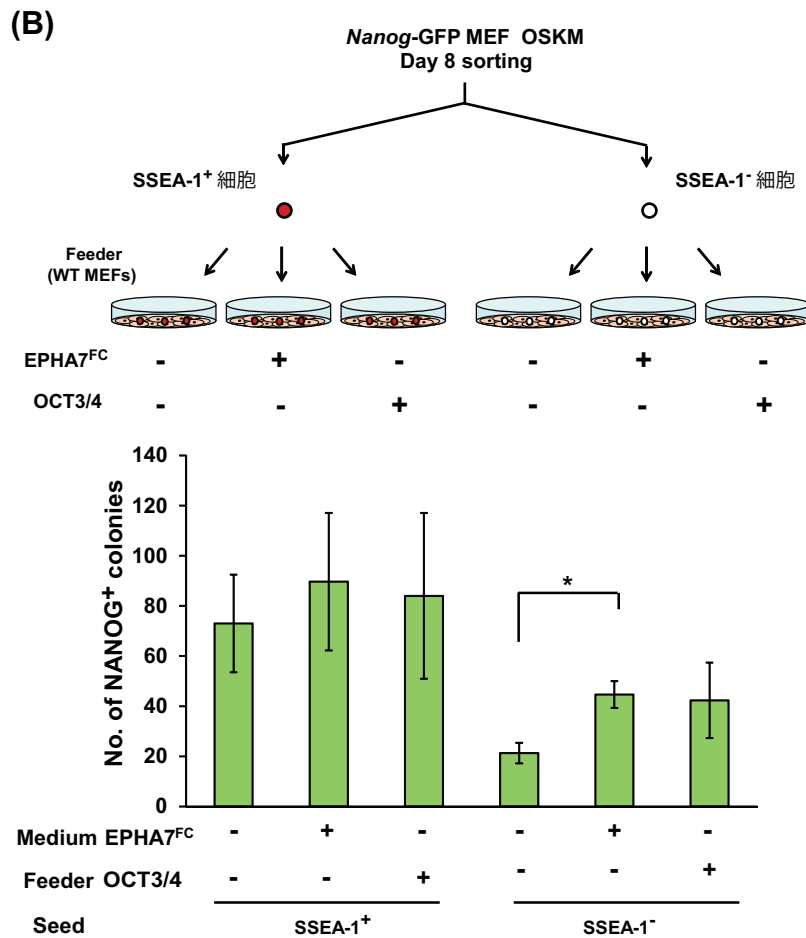


図 18 分泌型 EPHA7 は SSEA-1 陰性細胞のリプログラミングを促進する

(B) 分泌型 EPHA7 が SSEA-1 陰性と陽性細胞のリプログラミングに及ぼす影響。実験の模式図 (上)。リプログラミングを誘導した *Nanog*-GFP マウス由来の MEF を 8 日目に SSEA-1 陰性と陽性細胞に分けた。次に、ソートした細胞を WT マウス由来のリプログラミングを誘導していない MEF と OCT3/4 を過剰発現させた MEF の上にまいた。EPHA7<sup>FC</sup> (5  $\mu$ g/ml) 又は PBS を培地に添加し、4 日間培養した後、形成された *Nanog*-GFP 陽性コロニー数を計測した (下)。データは平均値に標準誤差をプラスマイナスしたものを示している (n=3, \*P<0.05)。P 値は student's unpaired two-tailed t-test によって計算した。

## 第四章 考察

本研究は細胞リプログラミングを制御する新たなシグナル伝達経路を探索することを目的とした。その結果、EPHA7がリプログラミング初期から中期にかけて発現が上昇し、分泌型EPHA7がERK1/2の活性を下げることによってリプログラミングを制御することが明らかとなった。

EPH受容体とEPHRINは細胞間相互作用の重要な因子であり、受容体とリガンドそれぞれを発現する細胞に同時にシグナルが伝達する(双方向的なシグナル伝達経路)ことが既に知られている。更に、いくつかのEPHとEPHRINは、細胞外に分泌される分泌型が存在し、EPH-EPHRINシグナル伝達経路を制御することが報告されている。本研究では、全長型ではなく、分泌される分泌型EPHA7がリプログラミングに重大な役割を持つことと、分泌型のEPHA7が培地中に拡散し、周囲の細胞に働きかけて、リプログラミングを促進することを明らかにした。

先行研究によりERK1/2の活性化の抑制はES細胞やiPS細胞の多能性維持に重要であることが知られている。しかしながら、リプログラミングにおけるERK1/2の活性状態の変化やそれがリプログラミングに及ぼす影響については明らかになっていなかった。本研究は、リプログラミングの中期(およそ6日目)から見られるERK1/2の活性の低下は分泌型EPHA7により制御されており、ERK1/2の活性低下がリプログラミング誘導に必要であることを示した(図19)。

さらに、リプログラミング途中段階にある細胞が分泌型EPHA7を発現、分泌し、分泌型EPHA7がSSEA-1陽性細胞ではなく、SSEA-1陰性細胞に強い効果があることが示された。リプログラミング誘導後6日目からpERK1/2レベルが減少し始め、SSEA-1陽性細胞が出現し始めるのも6日目からであった。さらに、6日目でのpERK1/2のレベルはSSEA-1陽性の細胞より陰性の細胞で高かった。以上の結果を総合すると、分泌型EPHA7によるERK1/2の活性の減少は、リプログラミング中期に強い影響を与え、主にSSEA-1陰性の細胞が多能性状態に至ることを補助することが明らかとなった。

これまでに報告されている細胞リプログラミング関連因子の多くは、ES細胞やiPS細



胞で発現が高い遺伝子である。それに対し、今回明らかにしたEPHA7の発現は一過的である。以前に別の研究グループが発表したリプログラミングのマイクロアレイのデータを解析したところ、*Epha7*がES細胞やiPS細胞では発現しておらず、リプログラミング途中の細胞で発現が高いことがわかった (Mikkelsen et al., 2008; Sridharan et al., 2009; Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。更に、本研究の結果は、分泌型EPHA7によるERK1/2の活性の制御は、体細胞のリプログラミング特異的な現象で、ES細胞の多能性維持には関与していないことを示唆している。ES細胞やiPS細胞では、分泌型EPHA7だけではなく、他のEPHとEPHRINリガンドの発現もかなり低いことから、EPH-EPHRINシグナル伝達経路は、ES細胞におけるERK1/2の活性化の制御には関与しないのではないかと考えられる。本研究によって、分泌型EPHA7によるEPHシグナル伝達経路の制御が細胞リプログラミングで重要であることが分かった。そして、ERK1/2の活性の低下が単にリプログラミングが起こった結果ではなく、リプログラミングを進行させるのに必要な現象であることも分かった。本研究によって、ERK1/2の活性低下を制御する分泌因子が同定され、リプログラミングにおける細胞間コミュニケーションの重要性が明らかとなった。分泌型EPHA7以外にも細胞リプログラミングを制御する分泌因子や細胞間コミュニケーションが明らかとなればリプログラミングの分子機構の理解がより一層進み、効率よく高品質のiPS細胞を作製できることが期待される。

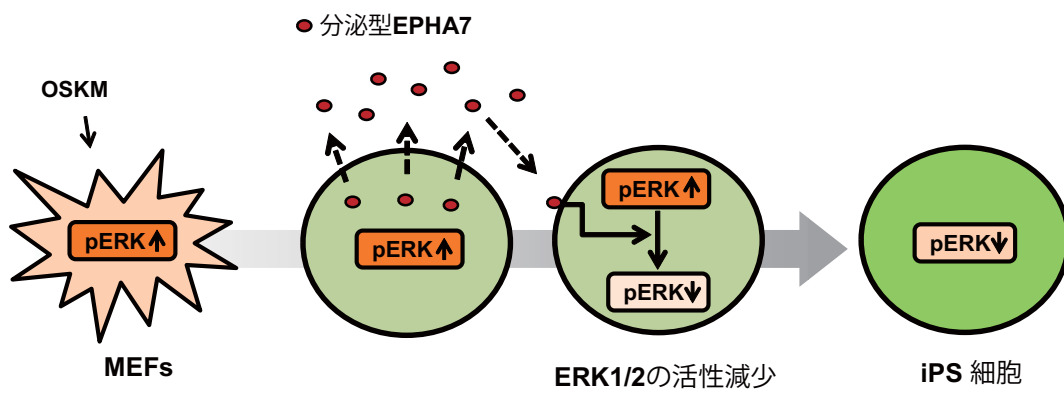


図 19 本研究で明らかとなった分泌型 EPHA7 のリプログラミングにおける役割のモデル図

## 引用文献

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26, 1276–1284.

Aasheim, H.C., Munthe, E., Funderud, S., Smeland, E.B., Beiske, K., and Logtenberg, T. (2000). A splice variant of human Ephrin-A4 encodes a soluble molecule that is secreted by activated human B lymphocytes. *Blood* 95, 221–230.

Buganim, Y., Faddah, D.A., Cheng, A.W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S.L., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell* 150, 1209–1222.

Buganim, Y., Markoulaki, S., van Wietmarschen, N., Hoke, H., Wu, T., Ganz, K., Akhtar-Zaidi, B., He, Y.P., Abraham, B.J., Porubsky, D. et al (2014). The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell* 15, 295–309.

Chumley, M.J., Catchpole, T., Silvany, R.E., Kernie, S.G., and Henkemeyer, M. (2007). EphB receptors regulate stem/progenitor cell proliferation, migration, and polarity during hippocampal neurogenesis. *J. Neurosci.* 27, 13481–13490.

Conacci-Sorrell, M., Simcha, I., Ben-Yedidia, T., Blechman, J., Savagner, P., and Ben-Ze'ev, A. (2003). Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of beta-catenin signaling, Slug, and MAPK. *J. Cell Biol.* 163, 847–857.

Costa, Y., Ding, J., Theunissen, T.W., Faiola, F., Hore, T.A., Shliaha, P.V., Fidalgo, M.,

Saunders, A., Lawrence, M., Dietmann, S., et al. (2013). NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency. *Nature* 495, 370–374.

Dawson, D.W., Hong, J.S., Shen, R.R., French, S.W., Troke, J.J., Wu, Y.Z., Chen, S.S., Gui, D., Regelson, M., Marahrens, Y., et al. (2007). Global DNA methylation profiling reveals silencing of a secreted form of Epha7 in mouse and human germinal center B-cell lymphomas. *Oncogene* 26, 4243–4252.

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221.

Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., et al. (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41, 1350–1353.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., et al. (2012). Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Sci. Transl. Med.* 4, 145ra104–ra145ra104.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 85, 348–362.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P.,

Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250–264.

Holmberg, J., Armulik, A., Senti, K.-A., Edoff, K., Spalding, K., Momma, S., Cassidy, R., Flanagan, J.G., and Frisen, J. (2005). Ephrin-A2 reverse signaling negatively regulates neural progenitor proliferation and neurogenesis. *Genes Dev.* 19, 462–471.

Holmberg, J., Genander, M., Halford, M.M., Anneren, C., Sondell, M., Chumley, M.J., Silvano, R.E., Henkemeyer, M., and Frisen, J. (2006). EphB receptors coordinate migration and proliferation in the intestinal stem cell niche. *Cell* 125, 1151–1163.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26, 795–797.

Jiao, J.W., Feldheim, D.A., and Chen, D.F. (2008). Ephrins as negative regulators of adult neurogenesis in diverse regions of the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 8778–8783.

Jennifer G. Gill, Ellen M. Langer, R. Coleman Lindsley, Mi Cai, Theresa L. Murphy, Michael Kyba, and Kenneth M. Murphy. Snail and the miR-200 family act in opposition to regulate EMT and germ layer fate restriction in differentiating ES cells. *Stem Cells* 2011, 29, 764–776.

Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., Kiryu, J., and Takahashi, M. (2014). Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* 2, 205–218.

Kitamura, T., Koshino, Y., Shibata, F., Oki, T., Nakajima, H., Nosaka, T., and Kumagai, H. (2003). Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional

genomics. *Exp. Hematol.* *31*, 1007–1014.

Kim, M.O., Kim, S.H., Cho, Y.Y., Nadas, J., Jeong, C.H., and Yao, K. (2012). ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 283–290.

Koga, M., Matsuda, M., Kawamura, T., Sogo, T., Shigeno, A., Nishida, E., and Ebisuya, M. (2014). Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process. *Nat. Commun.* *5*, 3197.

Koyanagi-Aoi, M., Ohnuki, M., Takahashi, K., Okita, K., Noma, H., Sawamura, Y., Teramoto, I., Narita, M., Sato, Y., Ichisaka, T., et al. (2013). Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 20569–20574.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., and Zhuang, Q., et al. (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *7*, 51–63.

Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* *454*, 49–55.

Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Tomioka, M., Muramatsu, M., and Okuda, A. (2003). The embryonic Octamer factor 3/4 displays distinct DNA binding specificity from those of other Octamer factors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *302*, 581–586.

Okamoto, K., Fujisawa, J., Reth, M., and Yonehara, S. (2006). Human T-cell leukemia virus

type-I oncoprotein Tax inhibits Fas-mediated apoptosis by inducing cellular FLIP through activation of NF-kappaB. *Genes Cells* 11, 177–191.

Okita, K., Ichisaka, T. and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.

Oricchio, E., Nanjangud, G., Wolfe, A.L., Schatz, J.H., Mavrakis, K.J., Jiang, M., Liu, X., Bruno, J., Heguy, A., and Olshen, A.B., et al. (2011). The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. *Cell* 147, 554–564.

Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., and Gupta, P.B., et al. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483, 598–602.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., et al. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: A unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* 286, 4760–4771.

Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.

Pasquale, E.B. (2008). Eph-Ephrin bidirectional signaling in physiology and disease. *Cell* 133, 38–52.

Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and Ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* 10, 165–180.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., et al. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating t cells. *Cell Stem Cell* 7, 11–13.

Shi, Y., Do, J.T., Despons, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2, 525–528.

Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 6, e253.

Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T.W., Guo, G., van Oosten, A.L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., and Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138, 722–737.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T. and Hochedlinger, K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2, 230–240.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364–377.

Samavarchi-Tehrani, P., Golipour, A., David, L., Sung, H.K., Beyer, T.A., Datti, A., Woltjen, K., Nagy, A., and Wrana, J.L. (2010). Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7, 64–77.



Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Wykosky, J., Palma, E., Gibo, D.M., Ringler, S., Turner, C.P., and Debinski, W. (2008). Soluble monomeric EphrinA1 is released from tumor cells and is a functional ligand for the EphA2 receptor. *Oncogene* 27, 7260–7273.

Yahata, N., Asai, M., Kitaoka, S., Takahashi, K., Asaka, I., Hioki, H., Kaneko, T., Maruyama, K., Saido, T.C., Nakahata, T., et al. (2011). Anti-Aβ drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer’s disease. *PLoS One* 6.

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519–523.

Yang, N., Zuchero, J.B., Ahlenius, H., Marro, S., Ng, Y.H., Vierbuchen, T., Hawkins, J.S., Geissler, R., Barres, B.A., and Wernig, M. (2013). Generation of oligodendroglial cells by direct lineage conversion. *Nat. Biotechnol.* 31, 434–43.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、修士課程、博士課程を通じて、多くのご助言を頂き、辛抱強くご指導いただきました西田栄介教授と小山(中島)明さんに厚く御礼申し上げます。

西田栄介教授には、修士課程から今まで至る留学生活に何も不便なことがないようにお気遣い頂きました。実験のことはもちろん、研究者になるための心構えのことまで様々な面に懇切なる御指導をいただきました。

小山(中島)明さんには、私が研究室に配属された当初から実験技術や研究姿勢など基本的な事柄から専門的な事柄まで一から丁寧に指導いただきました。日本語の表現や書き方についても多くのアドバイスを頂き、大変お世話になりました。深く感謝いたします。

戎家美紀博士、山本拓也博士、曾根正光博士には論文が出来上がるまで多くのご助言をいただき、大変お世話になりました。

副指導教員として折々にご助言頂いた松田道行教授、根岸学教授、上村匡教授、松崎文雄教授、建設的なご意見ご助言をたくさんいただきました。御礼申し上げます。

また、互いに切磋琢磨し、励まし合った同期の古賀牧土氏、太田翔氏、池田貴子氏に心より感謝いたします。多くの助言や叱咤激励を下さった研究室の皆さんにも感謝いたします。お陰様で楽しい研究生活を過ごせることができました。

最後に、学位取得まで様々な面で支えて下さった家族に深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Joonseong Lee, May Nakajima-Koyama, Masamitsu Sone, Makito Koga, Miki Ebisuya, Takuya Yamamoto and Eisuke Nishida

Secreted Ephrin Receptor A7 Promotes Somatic Cell Reprogramming

by Inducing ERK Activity Reduction

Stem Cell Reports, in press, 2015