

細胞リプログラミングにおける
WNT2/ β -catenin 経路の解析

木村 瑞希

目次

要旨 . . . 2

略語 . . . 4

序論 . . . 5

材料と方法 . . . 9

結果 . . . 16

考察 . . . 50

引用文献 . . . 56

謝辞 . . . 64

要旨

体細胞にリプログラミング因子と呼ばれる転写因子を導入することで、胚性幹細胞（ES 細胞）と同等の分化能を持つ人工多能性幹細胞（iPS 細胞）にリプログラミングされる。リプログラミング過程における分子機構については、網羅的な遺伝子発現解析などからその機構が徐々に明らかになってきたが、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ついては未解明な部分が多い。

本研究において申請者は、OCT3/4、KLF4、SOX2（以下 OKS）を用いたリプログラミング過程において、内在性 Wnt/ β -catenin 経路の一過的な活性化がリプログラミングを促進することを明らかにした。マウス線維芽細胞（以下 MEF）に OKS を導入し、リプログラミングを誘導した。免疫染色により β -catenin の細胞内局在を調べると、リプログラミング過程で一過的に β -catenin が核内に移行することが見出された。さらに、Wnt/ β -catenin 経路のレポーターを用いた実験から、リプログラミング過程で Wnt/ β -catenin 経路が活性化すること、またリプログラミング初期に Wnt/ β -catenin 経路が活性化した細胞集団からより多くの iPS 細胞コロニーが形成されることが分かった。リプログラミング過程において Wnt/ β -catenin 経路を活性化する Wnt リガンドを同定するため、リプログラミング過程におけるマイクロアレイデータの解析と定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、哺乳類で 19 種存在する Wnt リガンドの中で、*Wnt2* のみがリプログラミング過程において発現が上昇することが明らかになった。MEF を用いたリプログラミングでは、リプログラミング初期に体細胞マーカーである THY1 の発現が抑制されることが知られている。THY1 陽性および陰性細胞集団における *Wnt2* の発現を調べると、*Wnt2* は THY1 陽性細胞、つまりリプログラミング初期の細胞で主に発現していることが見出された。そこで、*Wnt2* の発現が導入したリプログラミング因子によって直接制御されているのではないかと考え、ChIP ア

ッセイを行った結果、*Wnt2*の発現は OCT3/4 によって直接制御される可能性が示唆された。*Wnt2*をノックダウンすると、 β -catenin が核内移行している細胞数、および形成される iPS 細胞コロニー数が減少し、WNT2 の過剰発現では逆の効果が見られた。Wnt/ β -catenin 経路の阻害剤を添加した場合も、 β -catenin が核内移行している細胞数、形成される iPS 細胞コロニー数が減少し、活性化剤の添加では逆の効果が見られた。また、*Wnt2* をノックダウンした細胞に Wnt/ β -catenin 経路の活性化剤を添加すると、 β -catenin が核内移行している細胞数、形成される iPS 細胞コロニー数はレスキューされた。さらに、リプログラミング過程における *Wnt2* による Wnt/ β -catenin 経路活性化の役割を明らかにするため、BrdU 取り込み実験を行い、細胞増殖能を調べた。その結果、細胞増殖能は *Wnt2* ノックダウンによって低下し、WNT2 過剰発現によって向上した。また、*Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能の低下は、Wnt/ β -catenin 経路活性化剤の添加によってレスキューされた。

本研究により、リプログラミング過程で WNT2 による内在性 Wnt/ β -catenin 経路の活性化が細胞増殖を促進し、リプログラミングを促進することが明らかになった。Wnt/ β -catenin 経路は多能性維持や分化に重要であることが報告されているが、本研究成果により多能性の獲得にも内在性 Wnt/ β -catenin 経路が重要な役割を担うことが示唆された。

略語

OKSM: OCT3/4, KLF4, SOX2 and c-MYC

OKS: OCT3/4, KLF4 and SOX2

OK: OCT3/4 and KLF4

KS: KLF4 and SOX2

OS: OCT3/4 and SOX2

iPSC: induced pluripotent stem cell

ESC: embryonic stem cell

MEF: mouse embryonic fibroblast

AP: alkaline phosphatase

LIF: leukemia inhibitory factor

FBS: fetal bovine serum

7TGP: 7xTcf-eGFP

遺伝子名は斜字、タンパク名は大文字で示す。

序論

マウス線維芽細胞 (Mouse Embryonic Stem Cell; MEF) に 4 つの転写因子 (OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC; OKSM) を導入することで、胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell; ES 細胞) と同等の分化能を持つ人工多能性細胞 (induced Pluripotent Stem Cell; iPS 細胞) が誘導されることが報告された (Takahashi and Yamanaka, 2006)。ES 細胞はその分化能の高さから医療分野への応用が期待されたが、ES 細胞を誘導するには発生初期の胚を壊す必要があるため、その使用には倫理的な問題が存在した。しかし、ES 細胞と同等の分化能を持ちながら、体細胞から誘導することの出来る iPS 細胞が報告されたことでこの倫理的な問題が解消され、iPS 細胞を用いた医療の実現に向けた研究が世界中で行われるようになった。実際に、2014 年には治療法の確立されていない滲出型加齢黄斑変性の患者に対して自己の iPS 細胞由来の細胞シートを移植する臨床試験が実施され、この移植手術の術後経過と安全性も報告されている (Mandai et al., 2017)。さらに、患者自身の細胞ではなく、拒絶反応が起こりにくい iPS 細胞由来の心筋シートを用いた臨床試験も計画されるなど、医療応用に向けて今後ますます発展していくことが期待される。このような iPS 細胞の臨床応用に向けた研究と共に、iPS 細胞を誘導する過程、すなわちリプログラミングの分子機構に関する研究も行われてきた (Buganim et al., 2013)。リプログラミング経過に伴う網羅的な遺伝子発現解析やエピジェネティクス解析が行われる一方で (Hussein et al., 2014; Koche et al., 2011; Koga et al., 2014; Mikkelsen et al., 2008; O'Malley et al., 2013; Polo et al., 2012)、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とその分子機構については未だ解明されていない部分が多い。

マウスおよびヒト ES 細胞の未分化状態の維持に、Wnt/ β -catenin 経路が重要であることが報告されている (Sato et al., 2004)。Wnt/ β -catenin 経路は、Wnt 受容体であ

る 7 回膜貫通型受容体 Frizzled に Wnt リガンドが結合することで GSK3 の活性が阻害され、細胞質に存在する β -catenin が安定化する (図 1)。この安定化した β -catenin は核内に移行し、転写因子である TCF/LEF と共に標的遺伝子の発現に働く。マウス ES 細胞は、GSK3 阻害剤 (Wnt/ β -catenin 経路活性化剤) および、MEK 阻害剤を含む 2i 培地を用いることで未分化状態の維持されること (Ying et al., 2008)、また ES 細胞自体が Wnt リガンドを分泌することが報告されている (ten Berge et al., 2011)。このように、Wnt/ β -catenin 経路が ES 細胞の未分化状態維持に必要であることが明らかになる一方で、ES 細胞の分化初期にも Wnt/ β -catenin 経路が重要な役割を担うことが報告されるなど (Murry and Keller, 2008)、ES 細胞における Wnt/ β -catenin 経路の機能の多様性が示唆されている。

iPS 細胞へのリプログラミングにおける Wnt/ β -catenin 経路の役割についても研究が行われている。これまでに、OKSM から c-MYC を除いた OKS 3 因子によるリプログラミング過程で、WNT3A を培地に添加するとリプログラミング効率が向上することが報告された (Marson et al., 2008)。さらに、転写因子 TCF のノックダウンやノックアウト、Wnt シグナル経路の活性化剤あるいは阻害剤の添加がリプログラミング効率に影響を与えることが報告されている (Aulicino et al., 2014; Ho et al., 2013; Lluís et al., 2011; Ross et al., 2014; Zhang et al., 2014)。このように、iPS 細胞へのリプログラミングにおいても Wnt/ β -catenin 経路が重要な機能を持つことが示唆されている。しかしその一方で、リプログラミング過程で内在性の Wnt/ β -catenin 経路が活性化するのか、活性化する場合、どのような役割を担うのかは分かっていない。

本研究では、iPS 細胞へのリプログラミング過程における内在性の Wnt/ β -catenin 経路に着目した。まず、リプログラミング過程で Wnt/ β -catenin 経路が活性化しているかを明らかにするため、Wnt/ β -catenin 経路活性化の指標である β -catenin の核内移行がリプログラミング過程で起きているかを調べた。その結果、リプログラミング過程

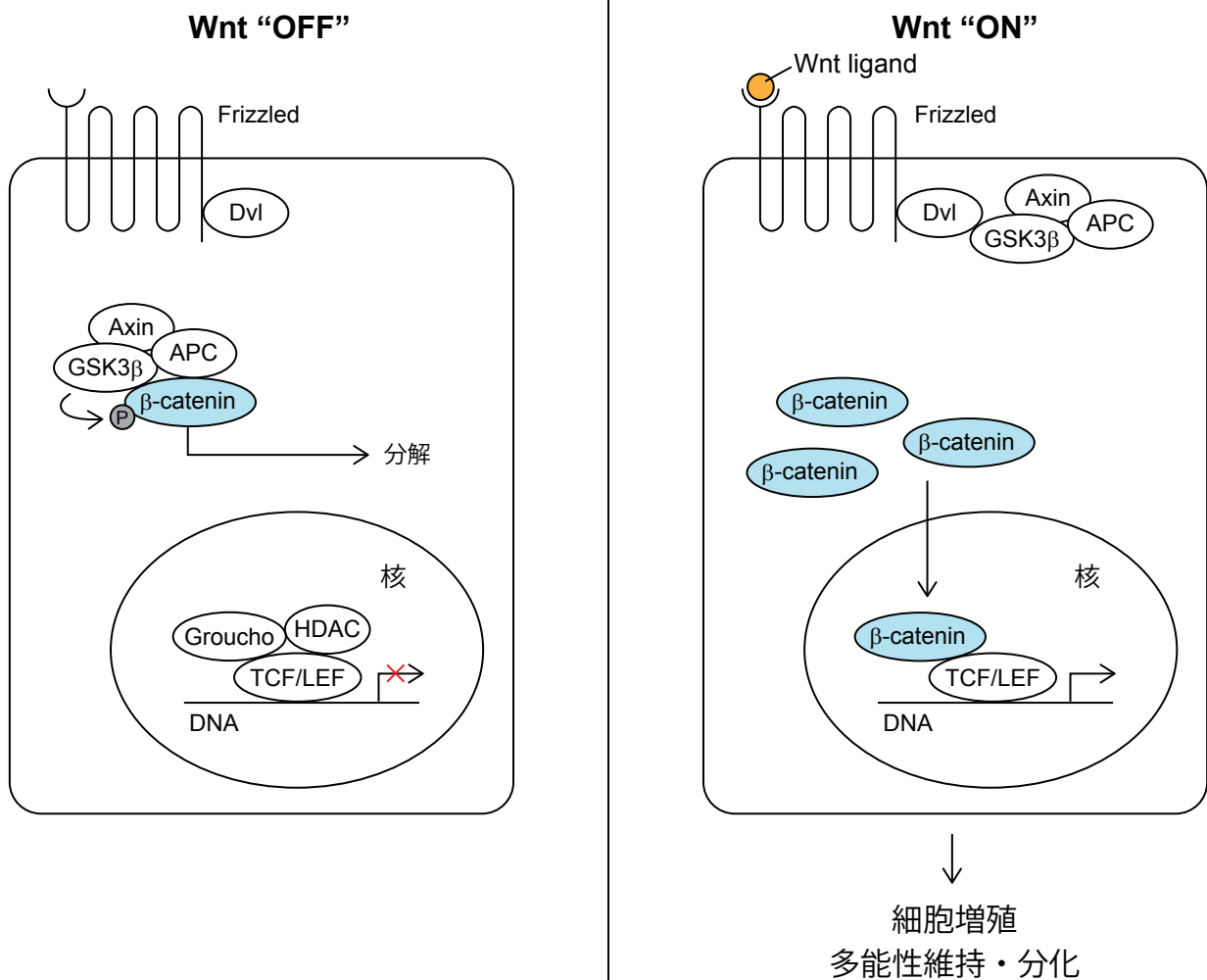


図 1. Wnt/β-catenin 経路

Wnt/β-catenin 経路を簡略化し模式的に示す。Wnt リガンド非存在下では、β-catenin は APC-Axin-GSK3β 複合体によるリン酸化を介して分解される。Wnt リガンドが 7 回膜貫通型受容体 (Frizzled) に結合することで細胞内にシグナルが伝わり、Dishevelled (Dvl) が活性化され APC-Axin-GSK3β による β-catenin の分解を阻害する。安定化した β-catenin は核内に移行し、転写因子である TCF/LEF と結合して Wnt/β-catenin 経路の標的遺伝子の発現を促進する。Wnt/β-catenin 経路の活性化は細胞増殖や、幹細胞における多能性維持、分化などに重要な役割を担うことが知られている。

で一過的に β -catenin が核内に移行することが分かった。さらに、Wnt/ β -catenin 経路のレポーターを用いてリプログラミング過程における Wnt/ β -catenin 経路の活性化状態を調べると、OKS の導入によって Wnt/ β -catenin 経路が活性化されること、Wnt/ β -catenin 経路が活性化した細胞が将来 iPS 細胞になることが示唆された。また、リプログラミング過程で発現が上昇する Wnt リガンドは *Wnt2* のみであり、*Wnt2* の発現はリプログラミング初期に上昇し、リプログラミング後期には減少することが示された。*Wnt2* をノックダウンすると β -catenin の核内移行が抑制されリプログラミング効率は低下するが、Wnt/ β -catenin 経路の活性化剤の添加により β -catenin の核内移行を促進すると、*Wnt2* ノックダウンの効果はレスキューされた。またその一方で、WNT2 過剰発現、Wnt/ β -catenin 経路活性化剤の添加によって、 β -catenin の核内移行が促進され、リプログラミング効率も向上したことから、WNT2 による Wnt/ β -catenin 経路の活性化はリプログラミングを促進することが明らかになった。さらに、BrdU 取り込み実験によって、リプログラミング過程における WNT2 による Wnt/ β -catenin の活性化は細胞増殖能の向上に寄与することが示された。これらの研究成果から、OKS によるリプログラミング過程において内在性 Wnt/ β -catenin 経路が活性化し、細胞増殖能が向上することがリプログラミング進行に必要であることが示唆された。

材料と方法

細胞培養

MEF は胎生 14.5 日目の ICR マウスから採取したものを使用した。MEF、HEK293T 細胞は、FBS 培地 (DMEM (Nissui) 、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich) 、penicillin/streptomycin (Gibco) 、L-Glutamine (Gibco) を含む) を使用し、Plat-E 細胞は FBS 培地に 1 $\mu\text{g/ml}$ puromycin(Sigma-Aldrich)、10 $\mu\text{g/ml}$ blastcidin S(科研製薬) を添加して培養した。リプログラミング過程の細胞は、ES 細胞培養培地 (high glucose DMEM(Nacalai Tesque)、15% HyClone Defined Fetal Bovine Serum (Thermo Scientific) 、1x NEAA (Gibco)、1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich) 、penicillin/streptomycin (Gibco) 、L-Glutamine (Gibco) 、0.1 mM 2-mercaptoethanol (Gibco) 、1000 units/ml ESGRO Leukemia inhibitory factor (以下、LIF) (Millipore) を用いて培養した。Wnt/ β -catenin 経路を制御する低分子化合物をリプログラミング過程で添加する実験では、2.5 μM IWR-1 (Sigma-Aldrich)、2.5 μM XAV939 (Sigma-Aldrich)、2.5 μM IWP-2 (Sigma-Aldrich)、3 μM CHIR99021 (Axon Medchem) を使用した。FACS セルソーターを用いて 7TGP 陽性細胞をソートした後の播種では、マイトマイシン C で処理した MEF をフィーダー細胞として使用した。培養細胞は全て 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。

リプログラミング誘導

iPS 細胞へのリプログラミング方法は、過去の報告に基づいて行った (Takahashi and Yamanaka, 2006)。レトロウイルス作製のため、リプログラミング因子をコードする pMXs ベクターを FuGENE HD Transfection Reagents (Promega)を用いて Plat-E 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の 48 時間後、レトロウイルス

を含む培養培地を回収し、6 µg/ml polybrene (Promega)を添加して MEF に感染させた。ウイルス感染の 16 時間後に ES 細胞培養培地に交換し、ウイルス感染の 3 日後に、ゼラチンコートした dish に細胞をまきなおした。その後のリプログラミング過程では、2 日に 1 度ずつ新しい ES 細胞培養培地に培地を交換した。

プラスミド

pMXs ベクター (pMXs-*hOct4*, -*hSox2*, -*hKlf4*) は、Addgene (Addgene plasmids # 17217, # 17218, and # 17219)から購入した (Takahashi et al., 2007)。また、pMXs-GFP ベクターは、Cell Biolabs 社から購入した (Kitamura et al., 2003)。pMXs-mCherry と pMXs-*Wnt2*は、それぞれ mCherry およびマウス *Wnt2*のコード配列を pMXs ベクターにサブクローニングした。7TGP ベクターは Addgene (Addgene plasmid # 24305) から購入した (Fuerer and Nusse, 2010)。

免疫染色

細胞は 4% paraformaldehyde in PBS で固定し、0.2% Triton X-100 in PBS で膜透過処理を行った。Blocking One (Nacalai tesque)を用いてブロッキングをした後、一次抗体を 4℃で一晩反応させた。使用した一次抗体を以下に記す。anti-NANOG (SC1000, Calbiochem, 1/1000), (RCAB001P, ReproCELL, 1/200), anti-β-Catenin (610153, BD Transduction Laboratories, 1/200), anti-BrdU (347580, BD Transduction Laboratories, 1/100)。一次抗体反応ののち PBS で 2 度洗浄し、二次抗体を室温で 2 時間反応させた。使用した二次抗体を以下に記す。Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Life Technologies, 1/250) 、Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, 1/250)。核の染色は Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 1/500)を用いた。染色した細胞は、Axiovert 200M (Carl Zeiss)、IX83 (Olympus) 、

SZX16 (Olympus)を用いて観察した。

アルカリフォスファターゼ染色 (AP 染色)

Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit を用い、プロトコルに従って染色した (Sigma-Aldrich)。染色した細胞は SZX16 (Olympus)を用いて観察した。

BrdU 取り込み実験

20 μ M BrdU (Sigma-Aldrich)を培養培地に添加し、3 時間後に固定した。膜透過処理、ブロッキング後、DNase 1 (TaKaRa)を用いて室温で 1 時間 DNase 処理を行い、BrdU 抗体、二次抗体を反応させた。染色した細胞は Axiovert 200M (Carl Zeiss)で観察した。BrdU 陽性細胞数の計測は ImageJ を用いた。

レンチウイルスによる RNAi

レンチウイルス作製のため、*Wnt2* に対する shRNA ベクターと 7TGP ベクターを pCAG-HIVgp ベクター、pCMV-VSV-G-RSV-Rev ベクターと共に HEK293T 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の 16 時間後に培地交換を行い、トランスフェクションの 48 時間後にレンチウイルスを含む培養培地を回収した。回収したウイルス懸濁液は PEG-it (System Bioscience)で濃縮し、タイターを測定したものを実験に使用した。*LacZ* (control)および *Wnt2* に対する shRNA の配列は、CSII-U6-MCS-EGFP ベクター (Okamoto et al., 2006) にサブクローニングした。使用した shRNA 配列を以下に記す。

sh-*LacZ* (control), 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATT-3';

sh-*Wnt2*#1, 5'-GCAGTGACAATATTGACTACG-3'; and

sh-*Wnt2*#2, 5'-GCTTCACTGTAGCCAATAAGA-3'.

定量的 RT-PCR

RNeasy kit (Qiagen)あるいは NucleoSpin® RNA kit (MACHEREY-NAGEL)を用いてトータル RNA を調製し、QuantiTect Rverse Transcription Kit (Qiagen) あるいは ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型に SYBR Green PCR kit (QIAGEN)と LightCycler (Roche)を使用してリアルタイム定量的 PCR を行った。遺伝子発現レベルは、GAPDH により補正した。使用したプライマーを以下に記す。

Gapdh

(Forward) 5'-AACATCAAATGGGGTGAGGCC-3'

(Reverse) 5'-GTTGTCATGGATGACCTTGGC-3'

Wnt2

(Forward) 5'-ACAACAGAGCTGGAAGGAAGGCTGT-3'

(Reverse) 5'-AGTGAAGCCAGTGCCATCCTGG-3'

E-cadherin

(Forward) 5'-CGAGAGAGTTACCCTACATA-3'

(Reverse) 5'-GTGTTGGGGGCATCATCATC-3'

Nanog

(Forward) 5'-CCTCCATTCTGAACCTGAGC-3'

(Reverse) 5'-GGGATACTCCACTGGTGCTG-3'

Slug

(Forward) 5'-CACATTCGAACCCACACATTGCCT-3'

(Reverse) 5'-TGTGCCCTCAGGTTTGATCTGTCT-3'

Thy1

(Forward) 5'-CCAAGGATGAGGGCGACTAC-3'

(Reverse) 5'-TATGCCGCCACACTTGACC-3'

Axin2

(Forward) 5'-GAGAGTGAGCGGCAGAGC-3'

(Reverse) 5'-CGGCTGACTCGTTCTCCT-3';

CyclinD1

(Forward) 5'-AGGCGGATGAGAACAAGCA-3'

(Reverse) 5'-GAGGGTGGGTTGGAATGAA-3';

Exogenous human-*Oct3/4*

(Forward) 5'-GCTCCTGAAGCAGAAGAGGA-3'

(Reverse) 5'-AGATGGTCGTTTGGCTGAAT-3';

Exogenous human-*Klf4*

(Forward) 5'-GGAGAAGACACTGCGTCAAG-3'

(Reverse) 5'-AGTCGCTTCATGTGGGAGA-3';

Exogenous human-*Sox2*

(Forward) 5'-AACCCCAAGATGCACAACTC-3'

(Reverse) 5'-TCTCCGTCTCCGACAAAAGT-3'

FACS 解析

0.25% trypsin を用いて細胞を剥がし、単一細胞の状態にした。その後、抗体を室温で 30 分反応させた。使用した抗体を以下に記す。FITC-conjugated mouse anti-THY1 antibody (11-0903-81, Affymetrix, 1/250), (105305, BioLegend, 1/200), rabbit anti-NANOG antibody (RCAB001P, ReproCELL, 1/200), mouse anti-NANOG antibody (560259, BD, 1/200)。NANOG 抗体については、Alexa Fluor 488-conjugated

goat anti-rabbit IgG (Life Technologies, 1/250)、Alexa Fluor 647-conjugated goat anti-mouse IgG (Life Technologies, 1/250)を二次抗体として使用した。染色後、FACS Aria II (BD Biosciences)を用いてセルソーティングを行った。染色をしていない細胞、あるいは 7TGP を導入していない細胞をゲート設定のネガティブコントロールとした。解析には BD FACSDiva ソフトウェア(BD Biosciences)、FlowJo を用いた。

ChIP アッセイ

100 mm dish で培養した細胞にクロスリンクのため 1% formaldehyde を添加し、室温で 10 分間静置した後、反応を止めるため最終濃度が 125 mM になるようグリシン溶液を加えた。PBS で 2 回洗浄後に細胞を回収し、lysis buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8.0], 85 mM KCl, 0.5% NP-40, 1 mM PMSF and 1x protease inhibitor cocktail (Roche))で処理した。核抽出液を ChIP SDS lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA, 1% SDS, 1 mM PMSF and 1x protease inhibitor cocktail)で処理することで調製し、Bioruptor (Tosho Electric Co., Ltd)を用いて超音波処理を行った。免疫沈降には、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, and 1x protease inhibitor cocktail)、anti-OCT3/4 (sc-9081, Santa Cruz)、normal rabbit IgG (sc-2027, Santa Cruz)、Dynabeads protein G (Invitrogen)を使用した。ビーズの洗浄には、low-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, and 1% Triton X-100)、high-salt wash buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, and 1% Triton X-100)、lithium wash buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, and 1% NP-40)、Tris-EDTA (TE) buffer を使用し、ChIP elution buffer (1% SDS and 50 mM NaHCO₃) with 200 mM NaCl を加え、65°Cで一晩反応させクロスリンクをはずした。ChIPed DNA は RNase A

と proteinase K で処理し、QIAquick PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製し、定量的 RT-PCR で解析した。PCR 解析に使用したプライマーを以下に記す。

site A

(Forward) 5'-ATAGTTCACAGTCCGTTCCCTTG-3'

(Reverse) 5'-CCTCCCTGCCCTCTTTTCTT-3'

site B

(Forward) 5'-ATTCTGACTGGTGTGAGGTGGA-3'

(Reverse) 5'-ATACCGAATGGCAGAGAAGCA-3'

site C

(Forward) 5'-CAATGGTGTGTCAGCGTTTGG-3'

(Reverse) 5'-CTATGCCCCTCCTTAGATTTGG-3'

結果

リプログラミング初期に β -catenin が核内に移行する

マウス線維芽細胞 (MEF) に OCT3/4、KLF4、SOX2、c-MYC (OKSM) 4 因子、あるいは OKSM から c-MYC を除いた OKS 3 因子を導入することでリプログラミングが誘導される。OKSM によるリプログラミング誘導では、OKS 3 因子によるリプログラミング誘導に比べリプログラミングが不完全な細胞 (partially reprogrammed cell) がより多く出現することが報告されている (Nakagawa et al., 2008, Wernig et al., 2008)。また、Wnt/ β -catenin 経路と c-MYC は、リプログラミングにおいて似た役割を担う可能性が示唆されている (Marson et al., 2008)。そこで、本研究では OKS 3 因子を MEF に導入する方法でリプログラミングを誘導し、OKS を用いたリプログラミング過程における Wnt/ β -catenin 経路について調べた。OKS はレトロウイルスを用いて MEF に導入し、ウイルスを感染させた時点をリプログラミング 0 日目として時間経過に伴う解析を行った (図 2A)。初めに、リプログラミング過程で Wnt/ β -catenin 経路が活性化するかを明らかにするため、リプログラミング過程における β -catenin の細胞内局在を β -catenin の免疫染色で調べた。その結果、リプログラミング 2 日目から β -catenin が核内に移行している細胞が出現し、 β -catenin 免疫染色による核内の蛍光強度はリプログラミング 6 日目に最大となった (図 2B)。その後、リプログラミング 8 日目、10 日目になると iPS 細胞様コロニーが出現し始め、 β -catenin は細胞膜に局在化していた。一方で、OKS を導入していないコントロールでは β -catenin の核内移行が見られなかった (図 2C)。リプログラミング過程でタイムポイントを設定し、 β -catenin が核内移行している細胞数を計測した結果、リプログラミング 2 日目から 6 日目にかけて β -catenin が核内移行している細胞数は増加し、その後急激に減少していた (図 2D)。また、iPS 細胞様コロニーを形成している細胞では、 β -catenin が核内移行している細胞

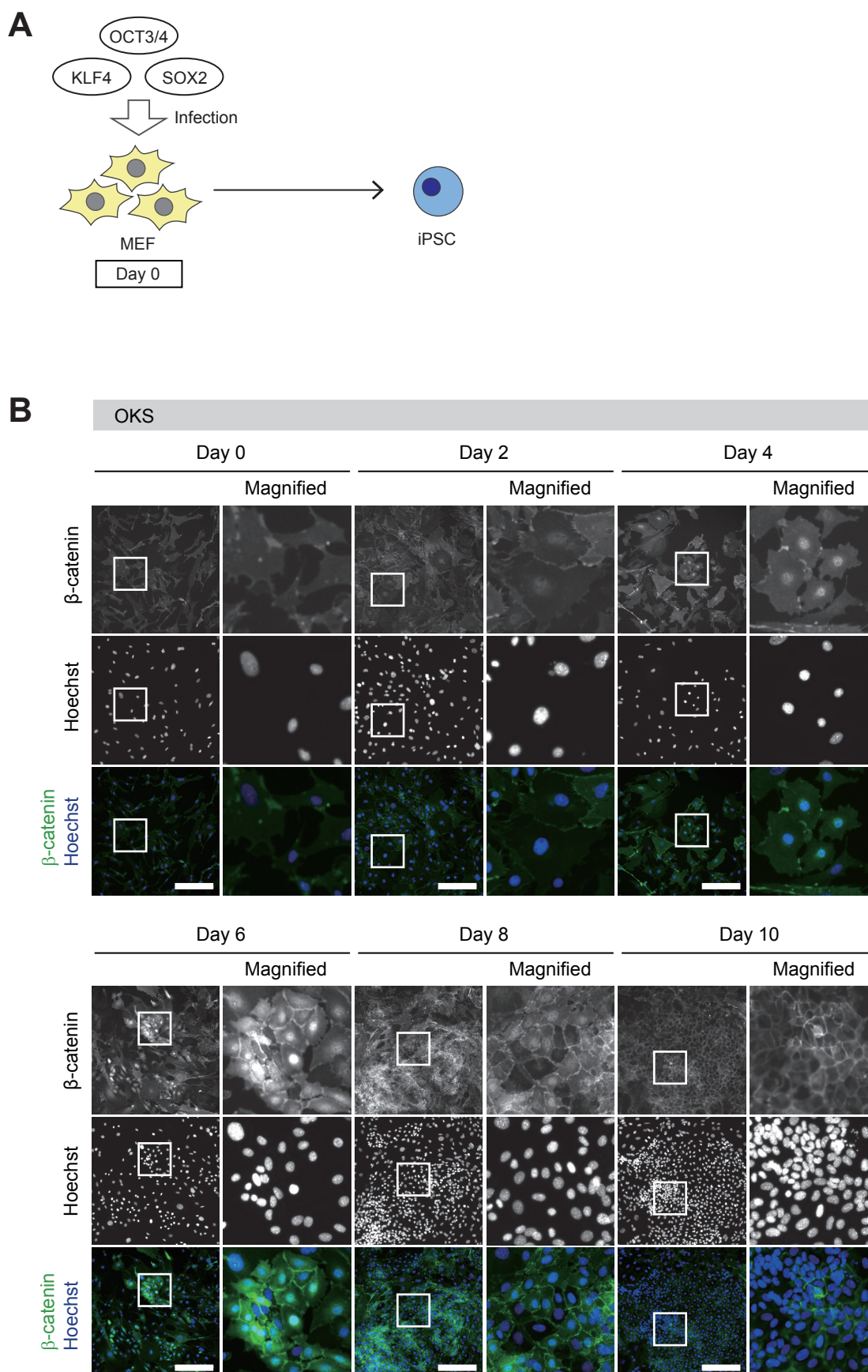


図2. リプログラミング過程における β -catenin の細胞内局在

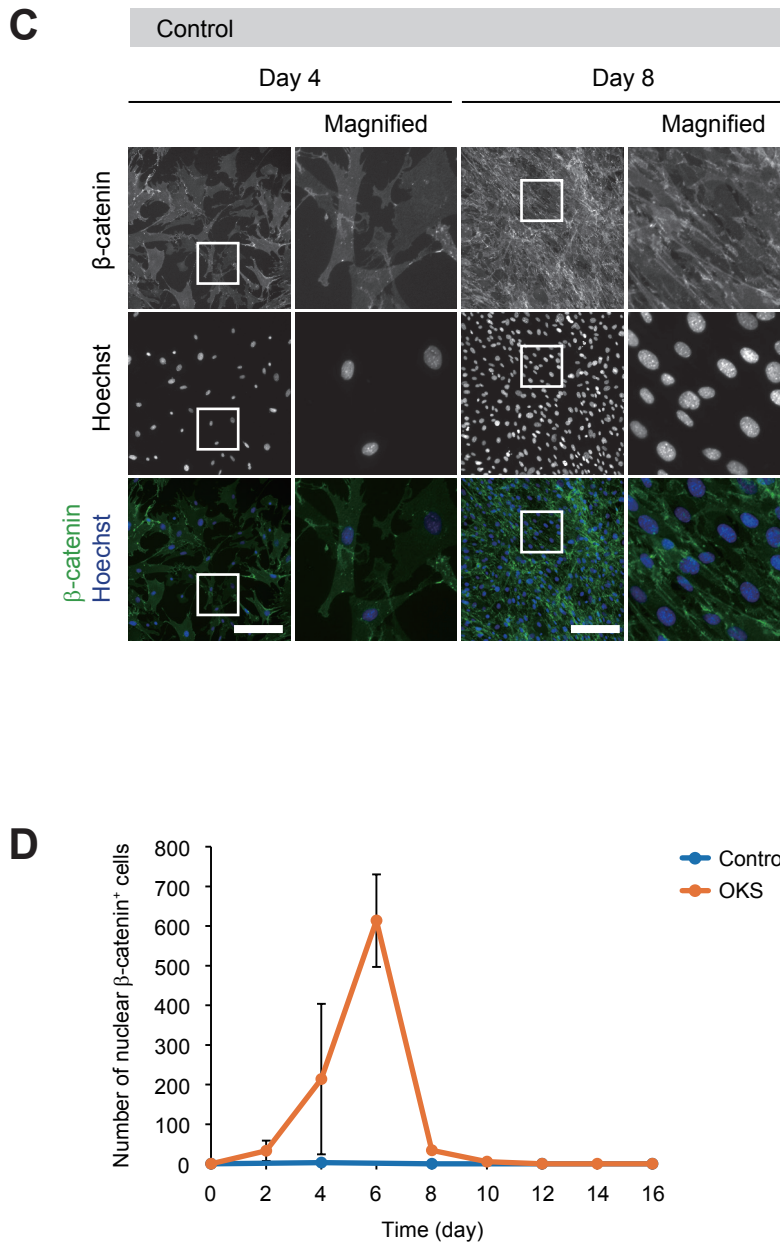


図2. リプログラミング過程における β -catenin の細胞内局在

(A) リプログラミング誘導の模式図。レトロウイルスを用いて MEF へ OKS を導入した時点を開始点 (Day 0) とし、iPS 細胞コロニー形成までのリプログラミング過程を解析した。

(B) OKS を導入した細胞における β -catenin 免疫染色の結果。リプログラミング開始から Day 10 まですべて 2 日おきに β -catenin の免疫染色を行った。

(C) OKS の代わりに、mCherry を導入したコントロールにおける β -catenin 免疫染色の結果。Day 4 および Day 8 に β -catenin の免疫染色を行った。

(B) (C) β -catenin を緑、Hoechst を青で示す。各時点について、左の写真の白枠内を拡大したものを右に示す。スケールバーは 200 μ m を示す。

(D) リプログラミングの各時点における β -catenin が核内移行している細胞数の定量結果。 β -catenin が核内移行している細胞数は、チャンバー内の細胞全てを対象として計測した。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

胞は全く見られなかった。この結果から、リプログラミング過程で一過的に Wnt/ β -catenin 経路が活性化していることが示唆された。

Wnt/ β -catenin 経路がリプログラミング過程で活性化する

Wnt/ β -catenin 経路のレポーターである 7xTcf-eGFP (7TGP) (Fuerer and Nusse, 2010) を用いて、リプログラミング過程における Wnt/ β -catenin 経路の活性化状態を調べた (図 3A)。OKS と同時にレンチウイルスを用いて 7TGP を MEF に導入し、リプログラミング 3 日目から 6 日目までピューロマイシンを添加して 7TGP を持つ細胞のみを選抜した。リプログラミング 6 日目にセルソーターを用いて 7TGP 陽性細胞の割合を調べると、OKS と共に 7TGP を導入した細胞集団では、全体のおよそ 4.5% が 7TGP 陽性であった (図 3B)。さらに、Wnt/ β -catenin 経路の代表的な標的遺伝子である *Axin2*、*CyclinD1* の発現レベルを定量的 RT-PCR で調べた (図 3C)。その結果、*Axin2*、*CyclinD1* 共に 7TGP 陰性細胞集団に比べ 7TGP 陽性細胞集団でより高く発現していることが分かった。以上の結果から、リプログラミング過程で Wnt/ β -catenin 経路が活性化することが示された。

Wnt/ β -catenin 経路が活性化している細胞はリプログラミングがより進行したステージにある

MEF の iPS 細胞へのリプログラミングの進行に伴って、間葉系マーカーである *Thy1* 及び *Slug* の発現レベルが低下する一方で、上皮系マーカーである *E-cadherin* の発現が上昇することが報告されている (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010; Stadtfeld et al., 2008)。これらの遺伝子について、リプログラミング 6 日目における 7TGP 陽性細胞集団と陰性細胞集団における発現レベルを定量的 RT-PCR で調べた (図 4A)。*Thy1* 及び *Slug* は Day 0 に比べ、7TGP 陽性/陰性細胞集団共に発現が低下したが、7TGP 陽性細胞集団と 7TGP 陰性細胞集団での発現レベルを比べると、7TGP 陰性細胞集団での発現が高かった。

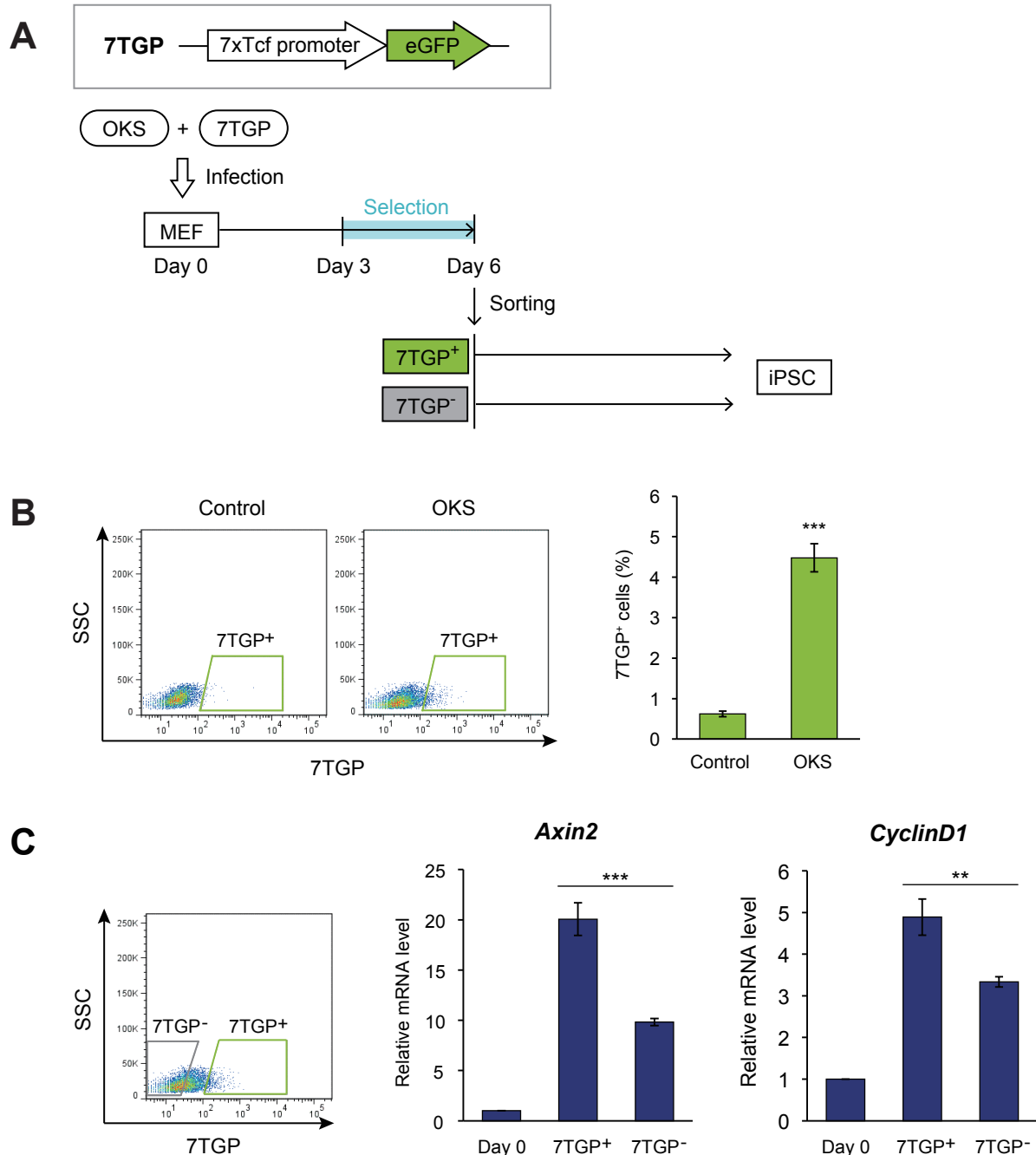


図3. 7TGP を用いた Wnt/ β -catenin 経路活性化状態の解析

(A) 7TGP を用いた実験系の模式図。7xTcf プロモーター下に eGFP を持つ 7TGP ベクターをコードするレンチウイルスを、OKS をそれぞれコードするレトロウイルスと共に MEF に感染させた。7TGP が導入された細胞をセクションするため、Day 3 から Day 6 までピューロマイシンを添加した。Day 6 に FACS セルソーターで 7TGP 陽性細胞をソートして、7TGP 陽性 / 陰性細胞 10000 個をフィーダー細胞上にそれぞれ播種し、iPS 細胞コロニー形成まで 2 週間培養した。

(B) リプログラミング 6 日目における 7TGP 陽性細胞の割合。左に FACS プロット図、右に 7TGP 陽性細胞の割合を示す。FACS プロット図は 3 回の実験の内の代表的な 1 回、7TGP 陽性細胞の割合は 3 回の実験の平均値を示す。

(C) リプログラミング 6 日目における 7TGP 陽性 / 陰性細胞集団に対する定量的 RT-PCR による発現解析。左に FACS プロット図、右に定量的 RT-PCR の結果を示す。代表的な Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子 (*Axin2*, *CyclinD1*) の発現を調べた。定量的 RT-PCR は、*Gapdh* で mRNA 量を補正し Day 0 を 1 とした相対値を示す。FACS プロット図は 4 回の実験の内代表的な 1 回、定量的 RT-PCR の値は 3 回の実験の平均値を示す。

(B) (C) エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

また、Day 0 では *E-cadherin* は発現していなかったが、リプログラミング 6 日目には 7TGP 陽性/陰性細胞集団共に発現が上昇しており、7TGP 陽性細胞集団でより発現レベルが高かった。この結果から、7TGP 陰性細胞集団に比べ、7TGP 陽性細胞集団の細胞はリプログラミングがより進んだステージにあることが示唆された。また、導入した OKS (*hOct3/4*, *hKlf4*, *hSox2*) は 7TGP 陰性細胞集団に比べ、7TGP 陽性細胞集団でより高く発現していた (図 4B)。

Wnt/β-catenin 経路が活性化した細胞集団からより多くの iPS 細胞コロニーが形成される

リプログラミング過程で Wnt/β-catenin 経路が一過的に活性化することが示唆されたが、Wnt/β-catenin 経路が活性化した細胞が最終的に iPS 細胞に至るかは分かっていない。そこで、リプログラミング 6 日目における 7TGP 陽性細胞集団と 7TGP 陰性細胞集団をそれぞれ播種し、形成される iPS 細胞コロニー数を計測することで Wnt/β-catenin 経路活性化のリプログラミングへの影響を調べた (図 5AB)。iPS 細胞コロニーは、未分化な多能性細胞で発現するアルカリフォスファターゼ (AP) 染色および NANOG (多能性細胞マーカー) に対する免疫染色でそれぞれ染色し、AP 陽性、NANOG 陽性となったコロニー数を計測した。その結果、7TGP 陰性細胞集団に比べ、7TGP 陽性細胞集団からより多くの AP 陽性 iPS 細胞コロニー、NANOG 陽性 iPS 細胞コロニーが形成された。以上の結果から、Wnt/β-catenin 経路が活性化している細胞が iPS 細胞になる運命にあることが示唆された。

Wnt2 の発現がリプログラミング過程で一過的に上昇する

リプログラミング過程で Wnt/β-catenin 経路が活性化することが分かったので、次に、Wnt/β-catenin 経路を活性化する Wnt リガンドの同定を試みた。リプログラミング過程におけるマイクロアレイデータを調べた結果 (Koga et al., 2014)、哺乳類で 19 種存在する Wnt リガンドの中で *Wnt2* と *Wnt16* の発現がリプログラミング過程で上昇していることが

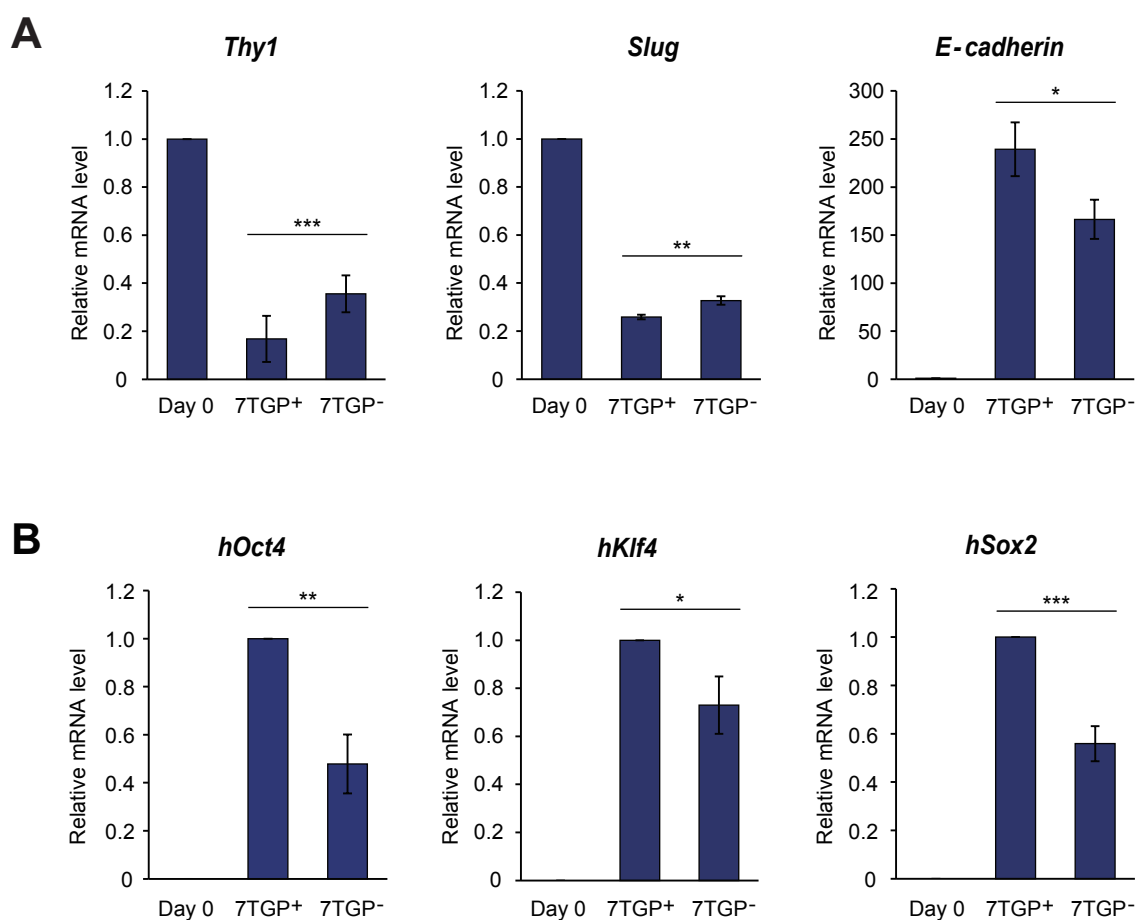


図4. 7TGP 陽性 / 陰性細胞集団における遺伝子の発現解析

(A) 定量的 RT-PCR による、間葉系マーカー遺伝子 (*Thy1*、*Slug*) および上皮系マーカー遺伝子 (*E-cadherin*) の発現解析。

(B) 定量的 RT-PCR による、導入した *Oct3/4*、*Klf4*、*Sox2* の発現解析。

(A) (B) *Gapdh* で mRNA 量を補正し、Day 0 を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

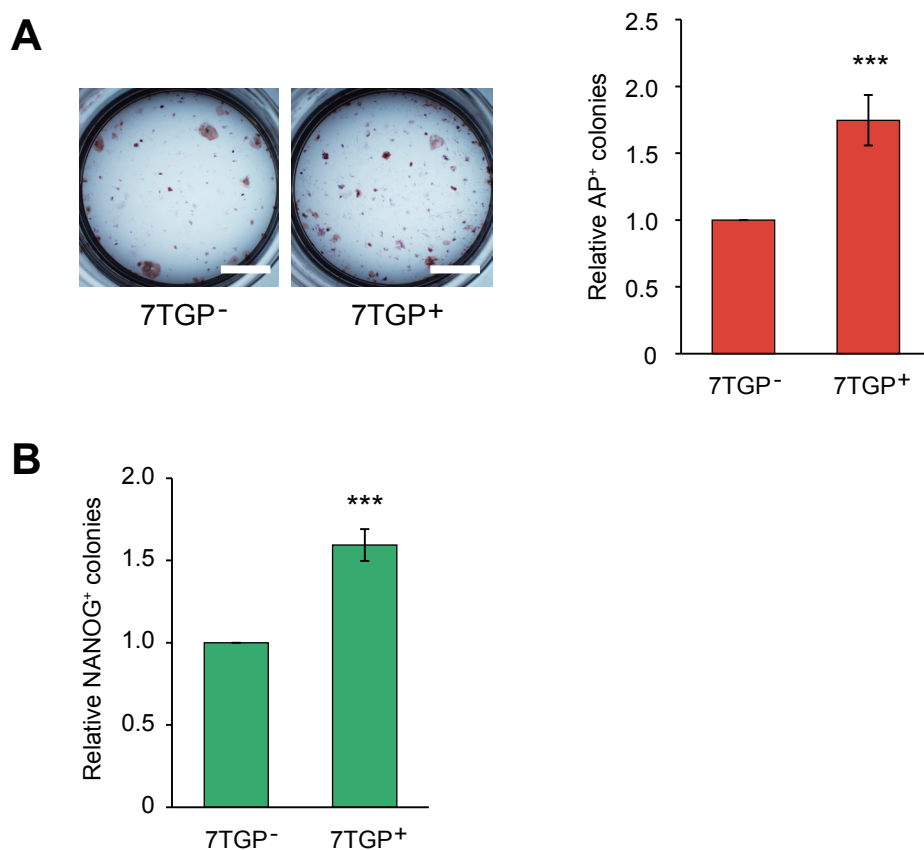


図5. 7TGP 陽性 / 陰性細胞集団から誘導される iPS 細胞コロニー数

(A) AP 染色による iPS 細胞コロニーの定量。Day 6 時点における 7TGP 陽性 / 陰性細胞集団から形成される iPS 細胞コロニー数をそれぞれ定量した。左に代表的な AP 染色した iPS 細胞コロニーの写真、右に AP 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。AP 染色結果の写真は 4 回の実験の内、代表的な 1 回を示す。スケールバーは 5 mm を示す。

(B) NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニーの定量。Day 6 時点における 7TGP 陽性 / 陰性細胞集団から形成される iPS 細胞コロニー数をそれぞれ定量した。

(A) (B) 7TGP 陰性細胞集団から形成された iPS 細胞コロニー数を 1 とした相対値で示す。iPS 細胞コロニー数の定量は 4 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student' s t test を行い、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

示唆された (図 6A)。しかし、*Wnt16* の発現は GFP のみを導入したコントロールでも発現が上昇していたため、リプログラミング過程特異的に発現が上昇する Wnt リガンドは *Wnt2* のみであることが分かった。そこで、リプログラミング過程におけるより詳細なタイムポイントを設定し、定量的 RT-PCR で *Wnt2* および iPS 細胞で発現レベルが高い *E-cadherin*、*Nanog* の発現変化を調べた (図 6B)。*E-cadherin*、*Nanog* は共にリプログラミング過程で発現が上昇するマーカー遺伝子であり、*E-cadherin* はリプログラミングの比較的初期、*Nanog* はリプログラミングの後期から発現することが知られている。*Wnt2* の発現は *E-cadherin*、*Nanog* の発現に先立って上昇し、リプログラミング 8 日目に最大となり、*Nanog* の発現が上昇するリプログラミング後期になると減少した。また、樹立された ES 細胞株では、*Wnt2* は全く発現していなかった。*Wnt2* は発生過程やがん細胞において Wnt/ β -catenin 経路を活性化することが報告されている (Fu et al., 2011; Goss et al., 2009; You et al., 2004)。そこで、Wnt/ β -catenin 経路の代表的な標的遺伝子である *Axin2* および *CyclinD1* の発現変化を調べた結果、*Axin2*、*CyclinD1* 共に *Wnt2* と似た発現パターンを示すことが分かった (図 6C)。

Wnt2 はリプログラミングの初期に発現する

MEF のリプログラミング過程初期から中期にかけて、間葉系マーカー THY1 が発現しなくなることが報告されている (Polo et al., 2012)。THY1 は表面抗原であるため、FACS セルソーターを用いて THY1 陽性細胞集団 (リプログラミングが進行していない細胞集団) と THY1 陰性細胞集団 (リプログラミングが進行している細胞集団) に分けることが出来る。リプログラミング過程における *Wnt2* 発現のタイミングをより詳細に調べるため、リプログラミングの各時点における THY1 陽性および陰性細胞集団における *Wnt2* および Wnt/ β -catenin 経路標的遺伝子の発現レベルを調べた。OKS 導入の前日 (Day -1) に、FACS セルソーターを用いて MEF をソートして THY1 陽性 MEF (約 80%) を回収し、播

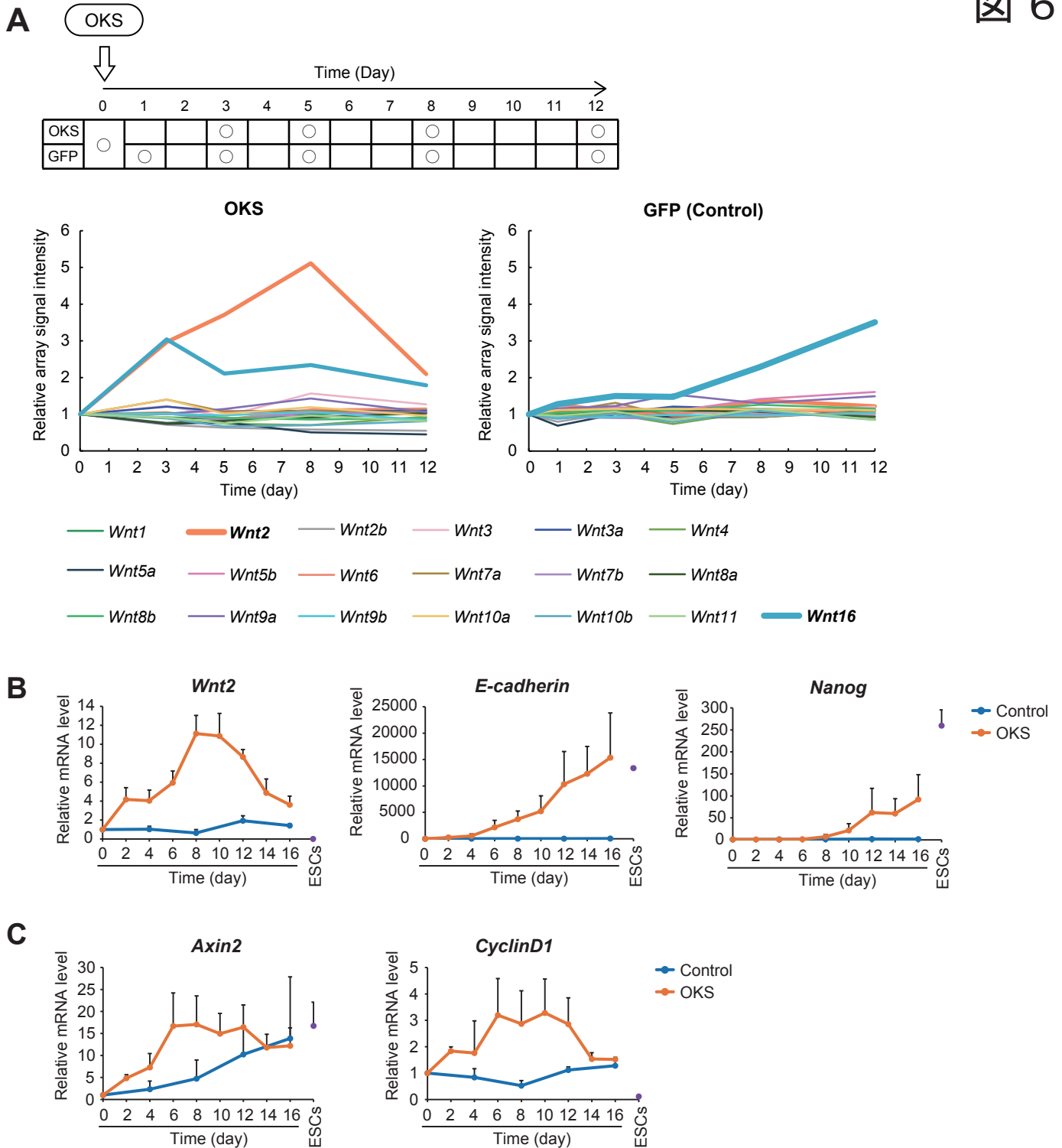


図6. リプログラミング過程における *Wnt2* の発現解析

(A) リプログラミング過程におけるマイクロアレイデータ (Koga et al., 2014) を解析し、19 種存在する Wnt リガンドの発現変化を調べた。上の模式図は、細胞を回収したリプログラミング過程のタイムポイントを示す。コントロールとして、OKS の代わりに GFP を導入した細胞を用いている。Day 0 を 1 としたマイクロアレイシグナル値の相対値を示す。

(B) 定量的 RT-PCR による *Wnt2* および *E-cadherin*、*Nanog* の発現解析。

(C) 定量的 RT-PCR による代表的な Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子 (*Axin2*、*CyclinD1*) の発現解析。

(B) (C) OKS は Day 16 まで 2 日おき、コントロールは 4 日おきに細胞を回収した。ESCs は樹立された ES 細胞株を示す。Gapdh で mRNA 量を補正し、Day 0 を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

種した (図 7A)。播種した THY1 陽性の MEF に OKS を導入し、リプログラミング 4 日目から 2 日おきに THY1 陽性/陰性細胞の割合を調べた結果、リプログラミング 4 日目では THY1 陽性細胞が THY1 陰性細胞の 2 倍であったのに対し、6 日目になると THY1 陰性細胞が THY1 陽性細胞を上回り、その後 THY1 陰性細胞の割合は増加していた (図 7B)。定量的 RT-PCR で THY1 陽性/陰性細胞集団における遺伝子発現を調べると、THY1 陽性細胞集団に対して THY1 陰性細胞集団においては *E-cadherin*、*Nanog* の発現が時間経過に伴って上昇し、*Slug* の発現は低下していた (図 7C)。以上の結果は、THY1 陰性細胞集団は THY1 陽性細胞集団に比べ、リプログラミングがより進行したステージにあるというこれまでの報告と一致するものである。次に、THY1 陽性/陰性細胞集団における *Wnt2* および Wnt/ β -catenin 経路標的遺伝子 (*Axin2*、*CyclinD1*) の発現を調べた (図 7D)。リプログラミング 4 日目における *Wnt2* の発現は THY1 陽性/陰性細胞集団で差が無かったが、6 日目以降は THY1 陽性細胞集団で上昇していた。*Axin2* と *CyclinD1* も同様に、リプログラミング 4 日目では THY1 陽性/陰性細胞集団で差が無かったが、6 日目以降は THY1 陽性細胞集団で発現が高かった。この結果から、*Wnt2* の発現および Wnt/ β -catenin 経路の活性化は、THY1 陽性のリプログラミング初期のステージにおける現象であることが示唆された。

Wnt2 の発現は OCT3/4 によって制御される

Wnt2 がリプログラミング初期に発現することが示されたので、導入した OKS が直接 *Wnt2* の発現を制御しているのではないかと考えた。そこで、リプログラミング因子単独、あるいは 2 因子の組み合わせで導入した時に *Wnt2* の発現が上昇するか調べた (図 8)。OCT3/4、KLF4、SOX2 をそれぞれ単独で MEF に導入し、2 日後に定量的 RT-PCR で *Wnt2* の発現を調べたが、*Wnt2* は発現していなかった。次に、OCT3/4 と KLF4 (OK)、KLF4 と SOX2 (KS)、OCT3/4 と SOX2 (OS) の組み合わせで導入すると、OK および OS の導

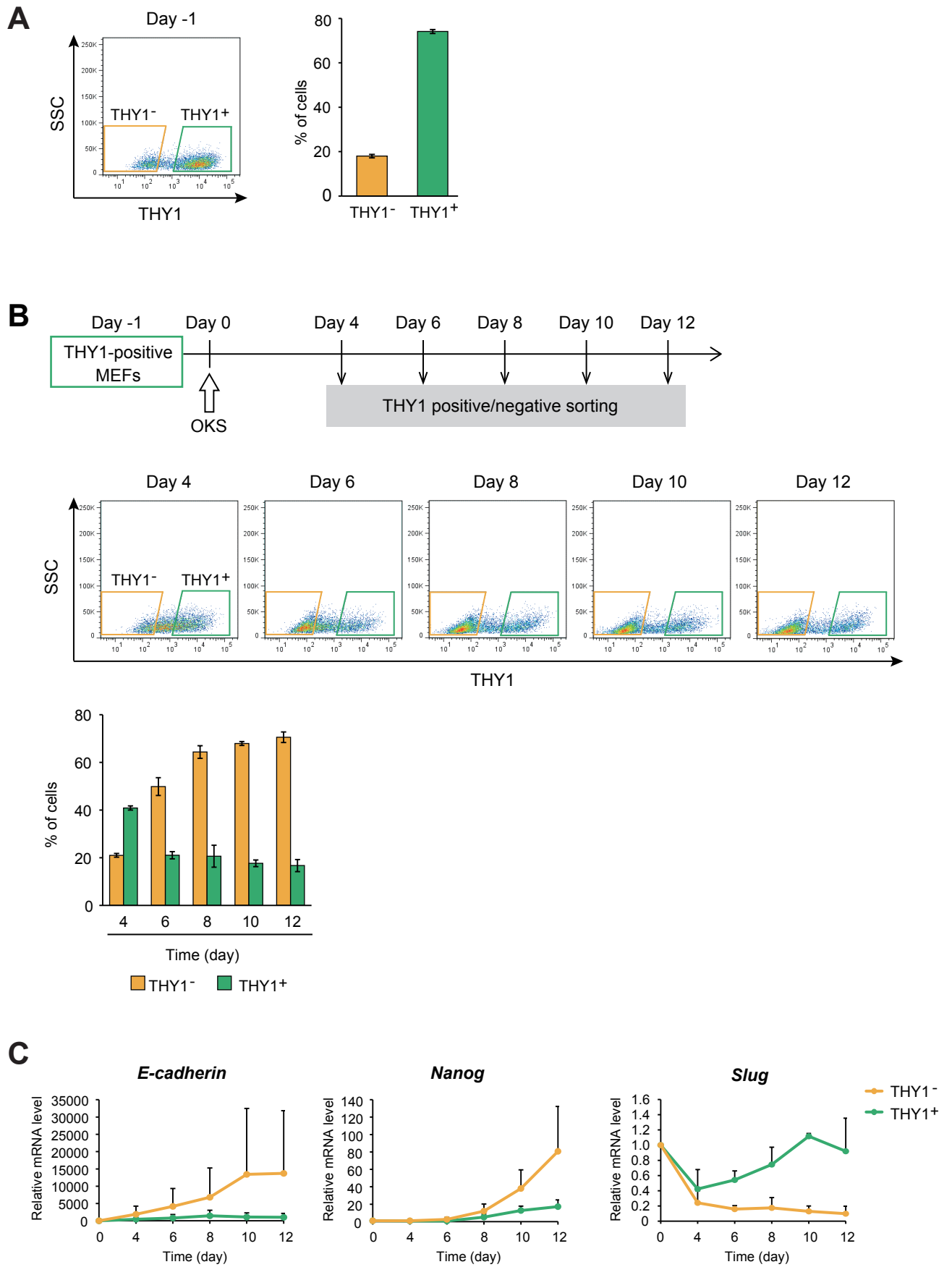


図7. リプログラミング過程における THY1 ソーティング

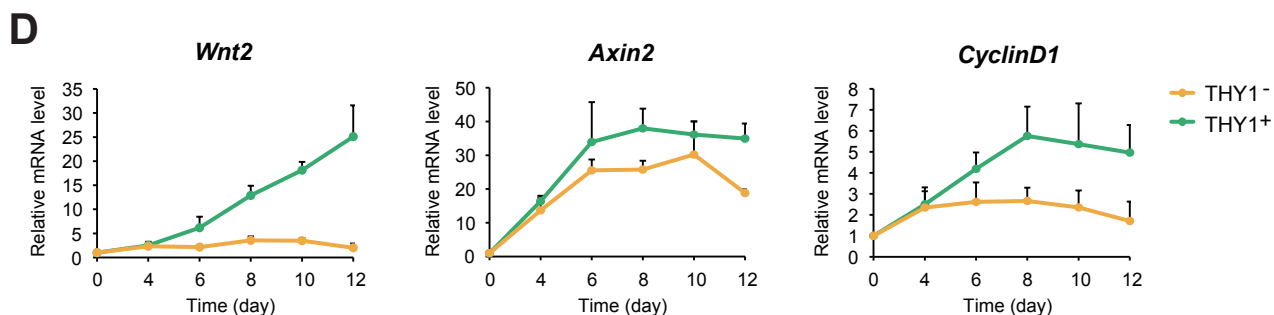


図7. リプログラミング過程における THY1 ソーティング

(A) リプログラミングに用いる THY1 陽性細胞のソート。OKS 導入の前日 (Day -1) に THY1 でソーティングを行い、THY1 陽性細胞だけを OKS 導入用に播種した。左に FACS プロット図、右に THY1 陽性 / 陰性細胞の割合を示す。

(B) リプログラミング経過に伴う THY1 陽性 / 陰性細胞の割合の変化。上に実験のプロトコルの模式図、中央にリプログラミングの各タイムポイントにおける FACS プロット図、下に THY1 陽性 / 陰性細胞の割合を示す。THY1 陽性細胞に OKS を導入し、Day 4 から Day 12 まで 2 日おきに THY1 のソーティングを行った。

(A) (B) FACS プロット図は 3 回の実験の内代表的な 1 回、THY1 陽性 / 陰性細胞の割合は 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

(C) 定量的 RT-PCR による *E-cadherin*、*Nanog*、*Slug* の発現解析。

(D) 定量的 RT-PCR による *Wnt2* および代表的な Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子 (*Axin2*、*CyclinD1*) の発現解析。

(C) (D) *Gapdh* で mRNA 量を補正し、Day 0 を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

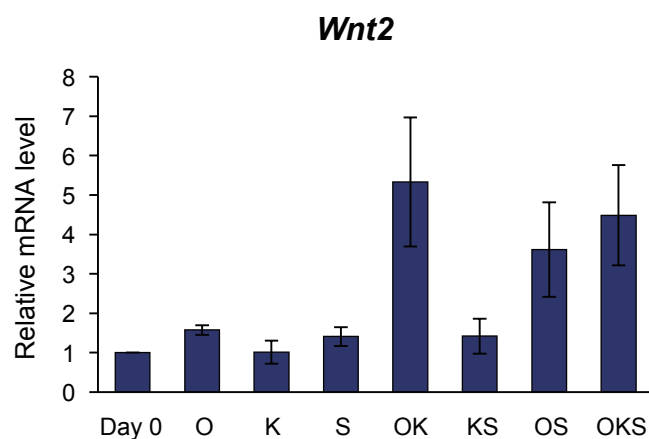


図8. OCT3/4、KLF4、SOX2 単独あるいは組み合わせによる *Wnt2* 発現への影響
リプログラミング因子単独（O、K、S）、あるいは組み合わせ（OK、KS、OS）での導入による *Wnt2* の発現を定量的 RT-PCR で調べた。レトロウイルスを用いてリプログラミング因子を導入し、2 日後に *Wnt2* の発現を調べた。*Gapdh* で mRNA 量を補正し、Day 0 を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

入によって *Wnt2* の発現が上昇した。この結果から、OCT3/4 が主体となり KLF4、SOX2 と協調して *Wnt2* の発現を制御している可能性が示唆された。

次に、OCT3/4 が *Wnt2* のプロモーター領域に結合しているかを調べるため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行った。*Wnt2* の上流領域 (−5,000 bp) を調べると、OCT3/4 が結合する可能性がある配列が 3 か所存在することが分かった (図 9A) (site A-C)。この 3 か所の OCT3/4 結合可能配列に対する ChIP アッセイを行った結果、site A に OCT3/4 が結合することを示唆する結果が得られた (図 9B)。さらに、*Wnt2* 上流領域における KLF4、SOX2 の結合可能配列を調べた結果、site A の近傍に KLF4、SOX2 の結合可能配列が存在することが分かった。また、リプログラミング過程で WNT3A を添加することでリプログラミング効率が向上することが報告されていたが (Marson et al., 2008)、*Wnt3a* の上流領域には OCT3/4 が結合する可能性のある配列が存在しなかった。以上の結果から、OCT3/4 が KLF4、SOX2 と協調して直接 *Wnt2* を制御することが示唆された。

Wnt2 のノックダウンによってリプログラミング効率が低下する

Wnt2 の発現がリプログラミングに必要であるかを調べるため、*Wnt2* に対する shRNA を用いて *Wnt2* のノックダウンを行った。*Wnt2* に対する 2 つの shRNA (sh-*Wnt2* #1、sh-*Wnt2* #2) を作製し、レンチウイルスを用いて OKS と共に MEF に導入した。OKS と共に *Wnt2* に対する shRNA を導入すると、コントロール (sh-*LacZ*) に比べ *Wnt2* の発現は減少した (図 10A)。また、リプログラミング 5 日目において β -catenin が核内移行している細胞数を調べた結果、*Wnt2* の発現レベルに応じて β -catenin が核内移行している細胞数も減少した (図 10B)。この結果から、*Wnt2* が β -catenin の核内移行を制御していることが示唆された。次に、*Wnt2* ノックダウンによる iPS 細胞コロニー形成への影響を調べた。*Wnt2* のノックダウンによって、AP 陽性 iPS 細胞コロニー数および NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数は減少した (図 11AB)。さらに、*Wnt2* をノックダウンした細胞集団ではリ

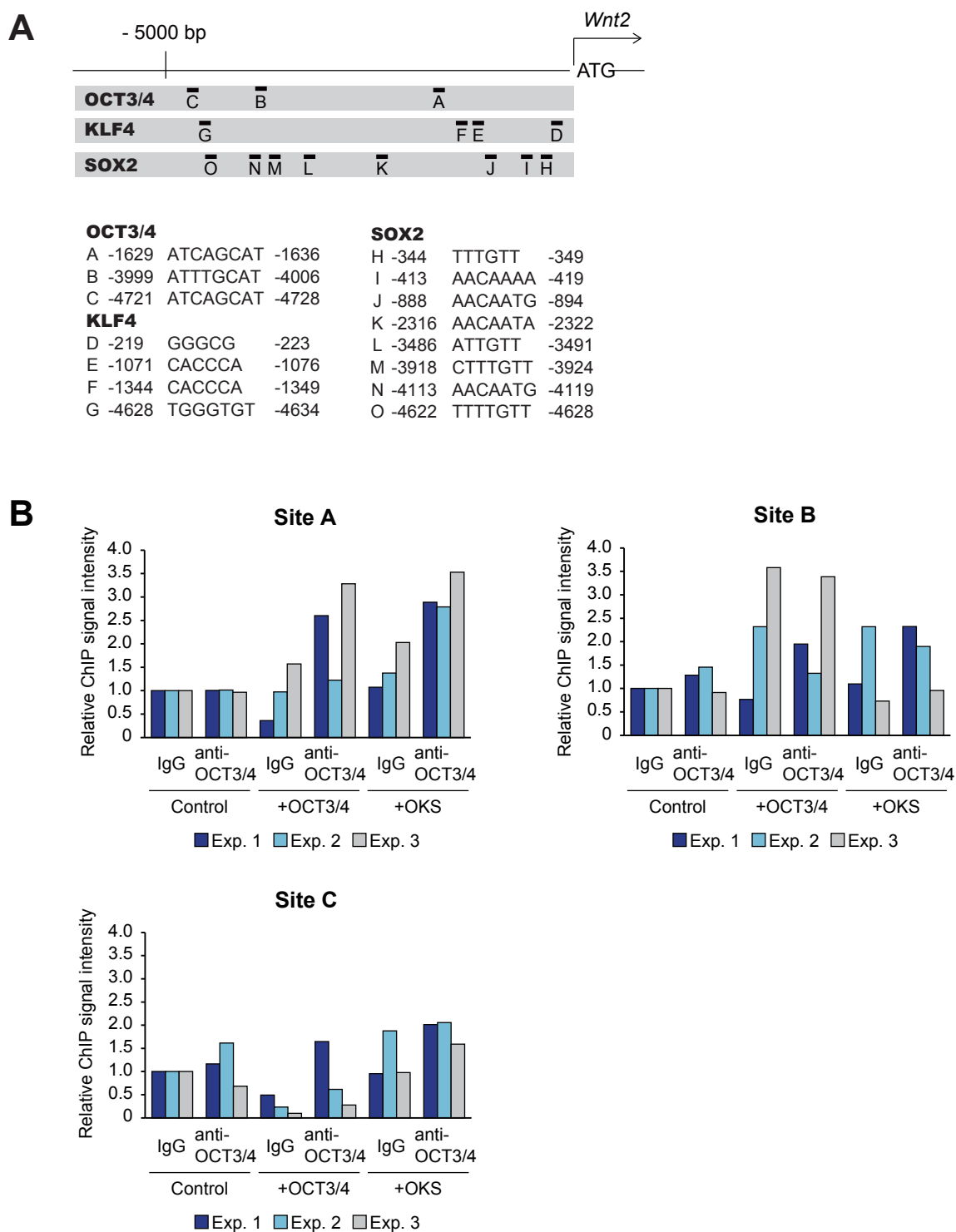


図9. *Wnt2* 上流領域に対する OCT3/4 抗体を用いた ChIP アッセイ

(A) *Wnt2* の上流領域において OCT3/4、KLF4、SOX2 が結合する可能性のある配列の分布を模式的に示す。

(B) OCT3/4 抗体を用いた ChIP アッセイ。OCT3/4 抗体に対するコントロールとして IgG 抗体を用いた。MEF (Control)、Oct3/4 を過剰発現 (+OCT3/4)、OKS を過剰発現 (+OKS) した細胞についてそれぞれ ChIP を行い、定量的 RT-PCR で定量した。MEF (Control) の IgG 抗体の値を 1 とした相対値を示す。3 回の実験データを示す。

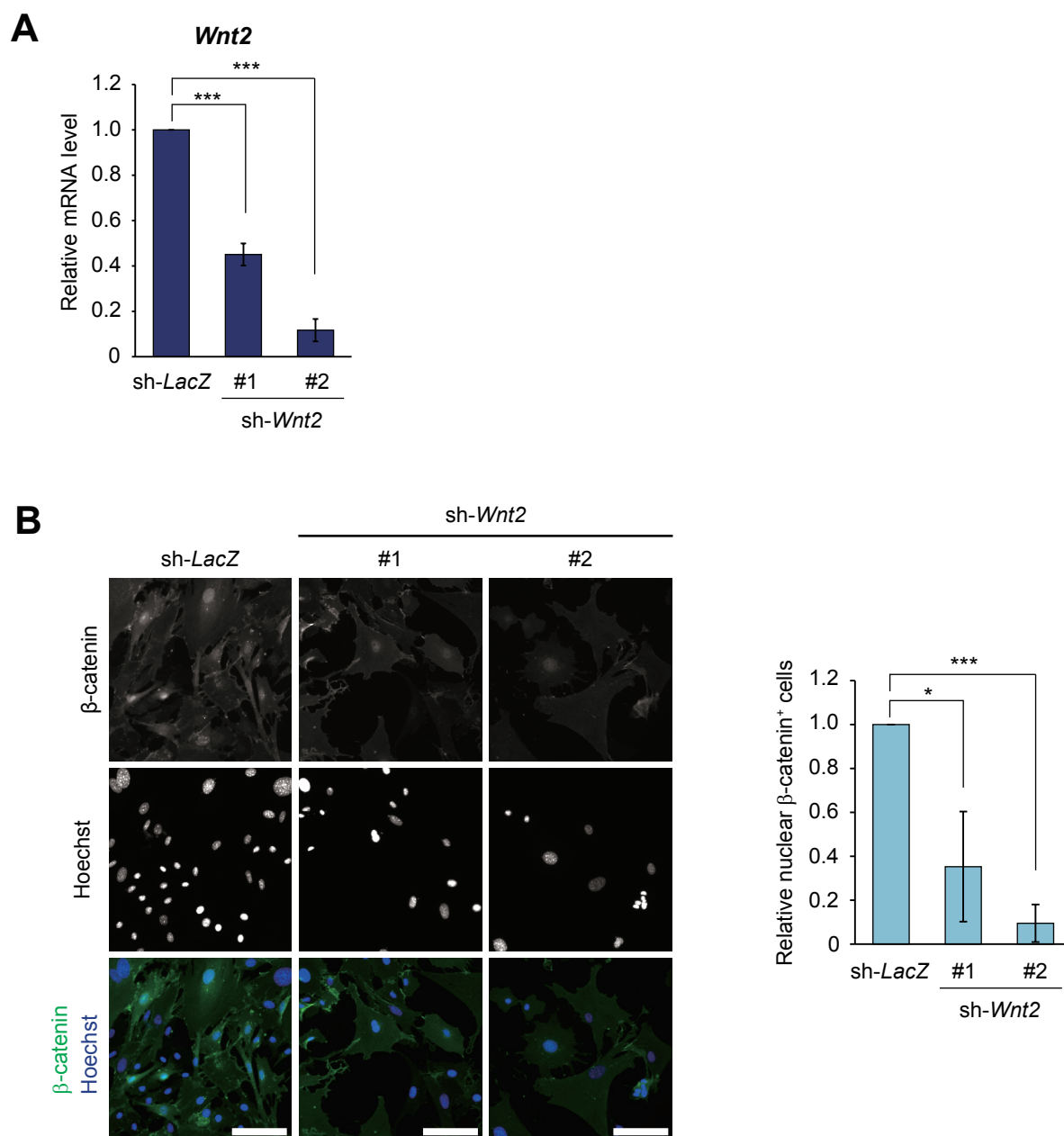


図10. *Wnt2* ノックダウンによる β -catenin 核内移行への影響

(A) shRNA による *Wnt2* のノックダウン効率。 *Wnt2* に対する 2 つの shRNA 配列 (sh-*Wnt2* #1、sh-*Wnt2* #2) を、レンチウイルスを用いて OKS と共に MEF に導入し *Wnt2* のノックダウンを行った。コントロールとして *LacZ* に対する shRNA (sh-*LacZ*) を導入した。Day 4 に細胞を回収し、定量的 RT-PCR で *Wnt2* の発現量を調べた。 *Gapdh* で mRNA 量を補正した。4 回の実験の平均値を示す。

(B) *Wnt2* ノックダウン時の β -catenin が核内移行している細胞数の定量。Day 5 に β -catenin の免疫染色を行い、 β -catenin が核内移行している細胞数を定量した。左に β -catenin 免疫染色の代表的な写真、右に定量結果を示す。 β -catenin 免疫染色の写真について、 β -catenin を緑、Hoechst を青で示し、スケールバーは 100 μ m を示す。 β -catenin が核内移行している細胞数は sh-*LacZ* を 1 とした相対値で示す。3 回の実験の平均値を示す。

(A) (B) sh-*LacZ* を 1 とした相対値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's *t* test を行い、* は *p* 値が 0.05 より小さいこと、*** は *p* 値が 0.001 より小さいことを示す。

プログラミング 12 日目における全体の細胞数が減少していたが、FACS セルソーターを用いて NANOG 陽性細胞の割合を調べた結果、NANOG 陽性細胞の割合も減少していた (図 11CD)。以上の結果から、*Wnt2* がリプログラミング過程において β -catenin の核内移行を制御すること、*Wnt2* の発現がリプログラミングに必要であることが示唆された。

WNT2 の過剰発現によってリプログラミング効率が向上する

次に、WNT2 の過剰発現によってリプログラミング効率が向上するがを調べた。レトロウイルスを用いて WNT2 過剰発現ベクターを OKS と共に MEF に導入した。その結果、OKS のみを導入したコントロールに対して、WNT2 を過剰発現した細胞では β -catenin が核内移行した細胞数がおよそ 2 倍に増加した (図 12)。また、形成される AP 陽性 iPS 細胞コロニー、NANOG 陽性 iPS 細胞コロニーも β -catenin が核内移行した細胞数と同様におよそ 2 倍に増加し、リプログラミング 12 日目における全細胞数、及び NANOG 陽性細胞数の割合も WNT2 過剰発現によって増加した (図 13A-D)。以上の結果から、WNT2 の過剰発現によってリプログラミング効率が向上することが示された。

β -catenin の核内移行がリプログラミングに重要である

Wnt/ β -catenin 経路の阻害剤 (IWR-1、XAV939、IWP-2) と活性化剤 (CHIR99021) を用いて、 β -catenin 核内移行のリプログラミングへの影響を調べた。IWR-1、XAV939 は AXIN の安定性を向上させることで β -catenin の分解を促進し、IWP-2 は Wnt リガンドの分泌に必要な PORCUPINE を阻害することで Wnt リガンドの分泌を阻害する Wnt シグナル経路の阻害剤である。また、CHIR99021 は GSK3 を阻害することで β -catenin を安定化し、 β -catenin の核内移行を促進する Wnt/ β -catenin 経路の活性化剤である。これら 4 つの低分子化合物あるいは DMSO (コントロール) を OKS 導入の翌日 (Day 1) から添加した結果、IWR-1、XAV939、IWP-2 の添加によって β -catenin が核内移行している細胞数は

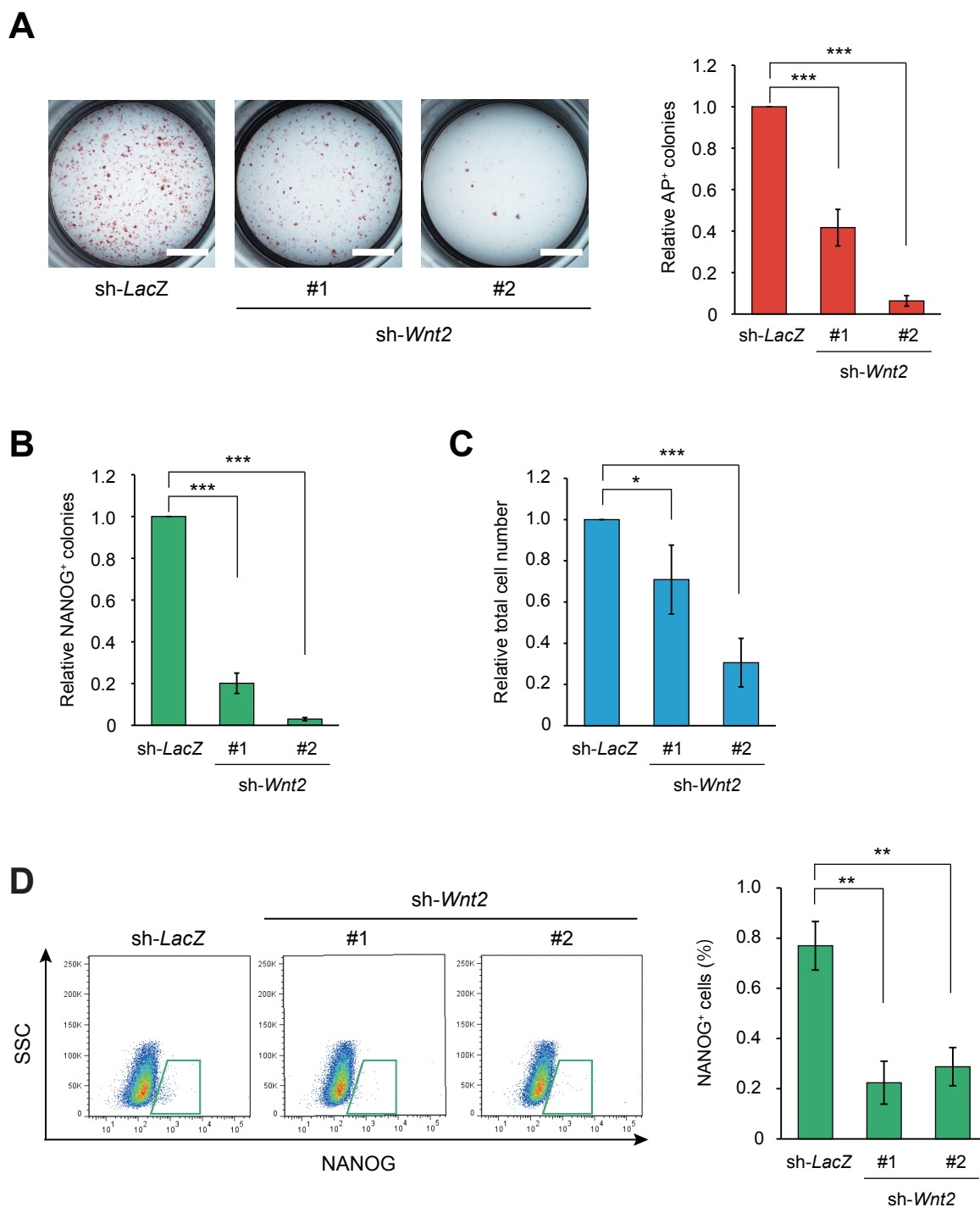


図11. *Wnt2* ノックダウンによるリプログラミングへの影響

(A) AP 染色による iPS 細胞コロニー数の定量。左に代表的な AP 染色した iPS 細胞コロニーの写真、右に AP 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。Day 11 から Day 14 に細胞を固定、染色した。スケールバーは 5 mm を示す。AP 陽性 iPS 細胞コロニー数は sh-LacZ を 1 とした相対値を示す。

(B) NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニー数の定量。Day 11 から Day 14 に細胞を固定、染色した。sh-LacZ を 1 とした相対値を示す。

(C) Day 12 における全体の細胞数。sh-LacZ を 1 とした相対値を示す。

(D) Day 12 における NANOG 陽性細胞の割合。FACS セルソーターで NANOG 陽性細胞の割合を調べた。左に代表的な FACS プロット図、右に NANOG 陽性細胞の割合を示す。

(A-D) 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student' s t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

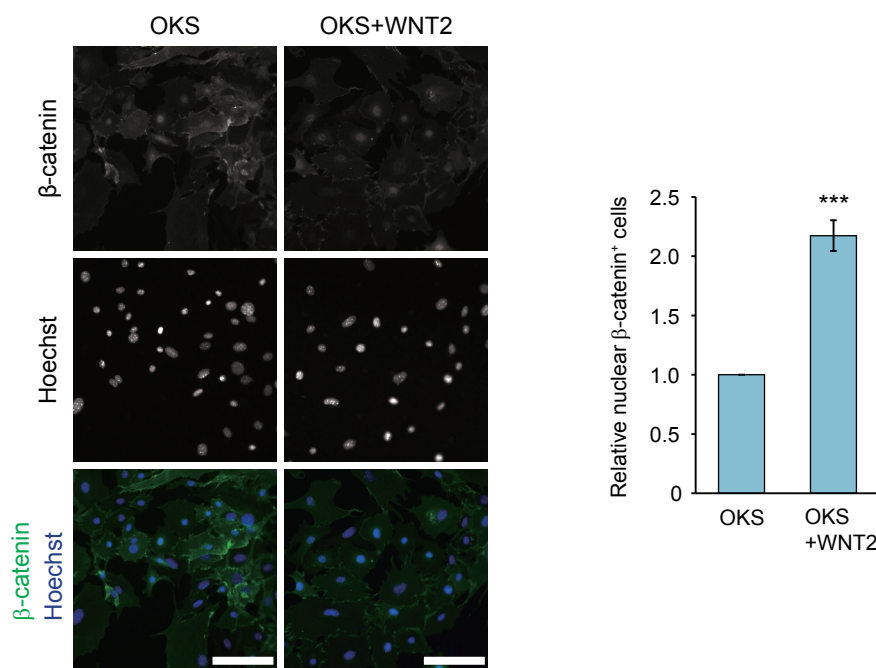


図12. WNT2 過剰発現による β-catenin 核内移行への影響

OKS と共に WNT2 過剰発現ベクターを、レトロウイルスを用いて MEF に導入し β-catenin が核内移行している細胞数を定量した。Day 4 に β-catenin の免疫染色を行った。左に β-catenin 免疫染色の代表的な写真、右に定量結果を示す。β-catenin 免疫染色の写真について、β-catenin を緑、Hoechst を青で示し、スケールバーは 100 μm を示す。β-catenin が核内移行している細胞数は OKS を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。Student' s t test を行い、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

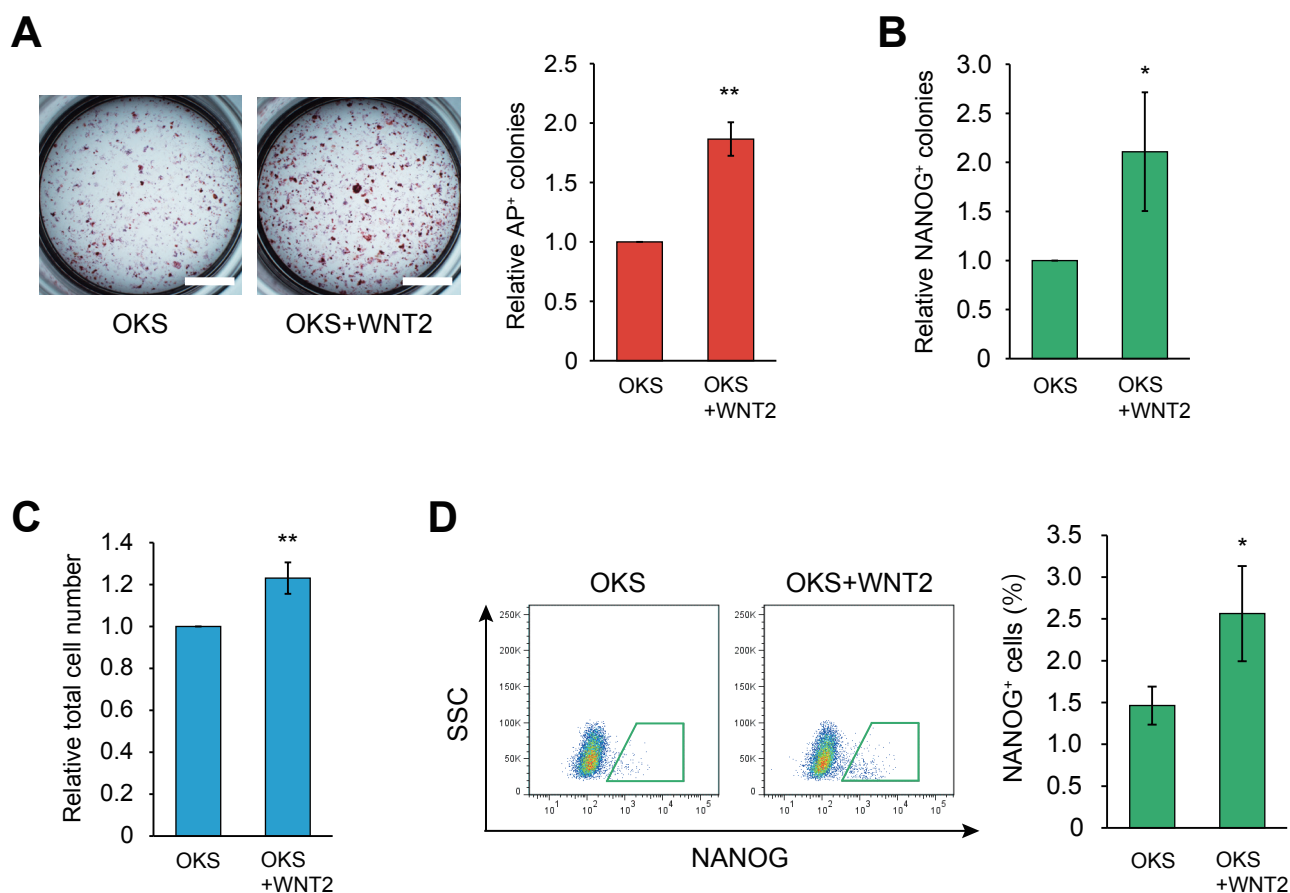


図13. WNT2 過剰発現によるリプログラミングへの影響

(A) AP 染色による iPS 細胞コロニー数の定量。左に代表的な AP 染色した iPS 細胞コロニーの写真、右に AP 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。Day 11 から Day 14 に細胞を固定、染色した。スケールバーは 5 mm を示す。AP 陽性 iPS 細胞コロニー数は OKS を 1 とした相対値を示す。

(B) NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニー数の定量。Day 11 から Day 14 に細胞を固定、染色した。OKS を 1 とした相対値を示す。

(C) Day 12 における全体の細胞数。OKS を 1 とした相対値を示す。

(D) Day 12 における NANOG 陽性細胞の割合。FACS セルソーターで NANOG 陽性細胞の割合を調べた。左に代表的な FACS プロット図、右に NANOG 陽性細胞の割合を示す。

(A-D) 3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、

* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいことを示す。

低下し、CHIR99021 の添加によって増加した (図 14)。次に、阻害剤あるいは活性化剤添加によるリプログラミング効率への影響を調べた結果、形成される AP 陽性 iPS 細胞コロニー数、NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数は IWR-1、XAV939、IWP-2 の添加によって減少し、CHIR99021 の添加によって増加した (図 15)。以上の結果から、 β -catenin の核内移行がリプログラミングに重要であることが明らかになった。

Wnt/ β -catenin 経路阻害剤、活性化剤はリプログラミング初期に作用する

これまでの結果から、*Wnt2* の発現がリプログラミングの初期に起きる現象であることが示されたため、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤、活性化剤もリプログラミング初期に添加することで最も大きな効果があるのではないかと考えた。そこで、IWR-1、CHIR99021 をリプログラミング時期特異的に添加することによるリプログラミングへの影響を調べた。リプログラミング 1 日目から 12 日目まで、1 日目から 4 日目 (初期)、4 日目から 8 日目 (中期)、8 日目から 12 日目 (後期) の 4 条件で IWR-1、CHIR99021 を添加し、形成される NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数を計測した (図 16)。その結果、1 日目から 12 日目、及び初期に添加した条件に対して、中期及び後期では IWR-1、CHIR99021 添加による効果が弱かった。この結果から、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤、活性化剤はリプログラミング初期で効果的に作用することが示唆された。

Wnt2 ノックダウンの効果は Wnt シグナル活性化剤によってレスキューされる

Wnt2 をノックダウンした細胞に CHIR99021 を添加することで、ノックダウンの効果がレスキューされるかを調べた。*Wnt2* ノックダウンのための shRNA (sh-*Wnt2*#1、sh-*Wnt2*#2) は OKS と同じタイミングで MEF に導入し、CHIR99021 はその翌日のリプログラミング 1 日目 (Day 1) から添加した (図 17A)。リプログラミング 4 日目において、*Wnt2* ノックダウンによって減少した β -catenin が核内移行している細胞数は、CHIR99021 の添

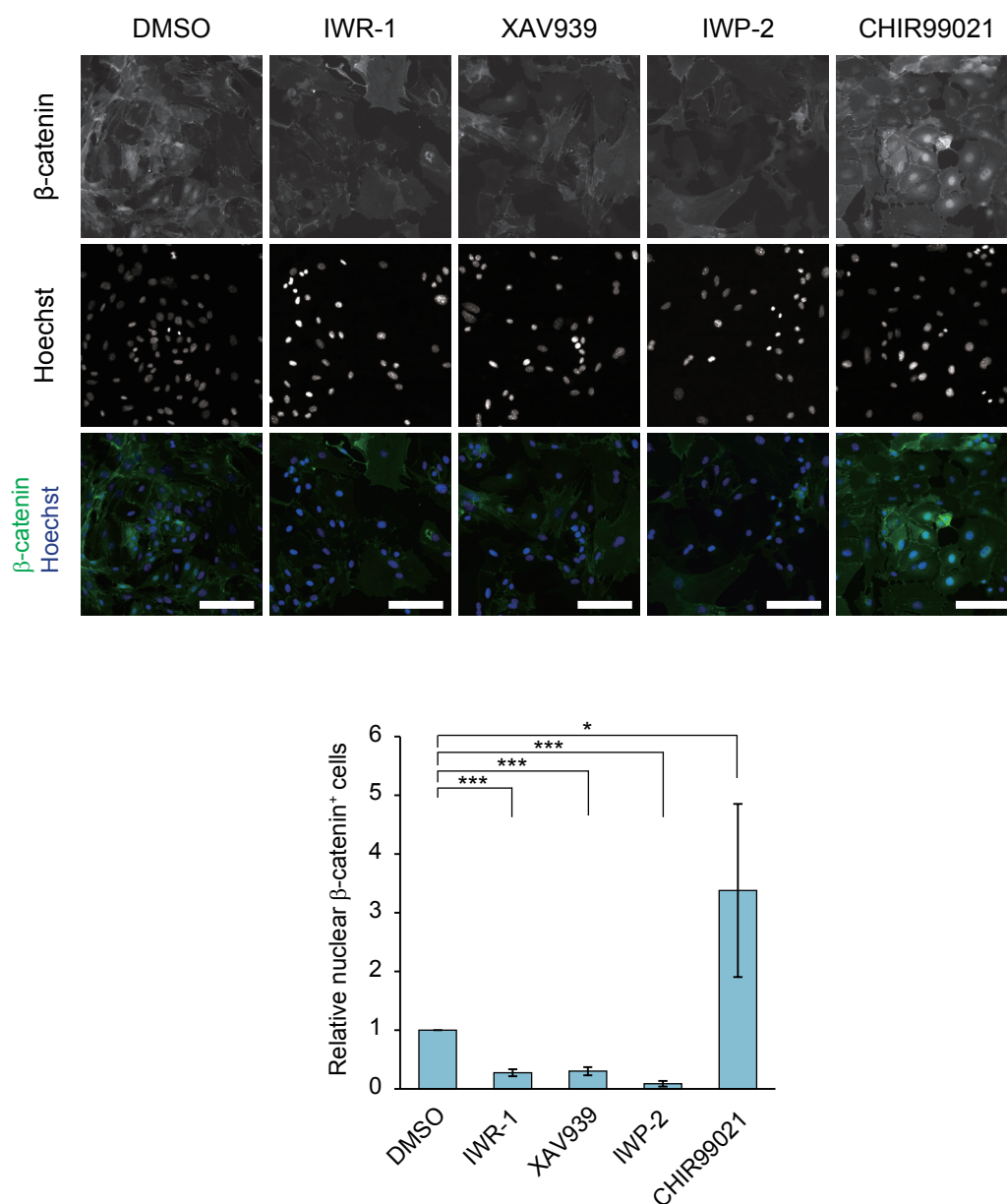


図14. Wnt/β-catenin 経路阻害剤、活性化剤による β-catenin 核内移行への影響

Day 1 から Wnt/β-catenin 経路の阻害剤あるいは活性化剤を添加し、Day 4 において β-catenin が核内移行している細胞数を定量した。Wnt/β-catenin 経路の阻害剤として IWR-1、XAV939、IWP-2 を、また活性化剤として CHIR99021 を添加した。コントロールとして DMSO を用いた。上に β-catenin 免疫染色の代表的な写真、下に定量結果を示す。β-catenin 免疫染色の写真におけるスケールバーは 100 μm を示す。β-catenin が核内移行している細胞数は DMSO を添加した細胞を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。Student' s t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

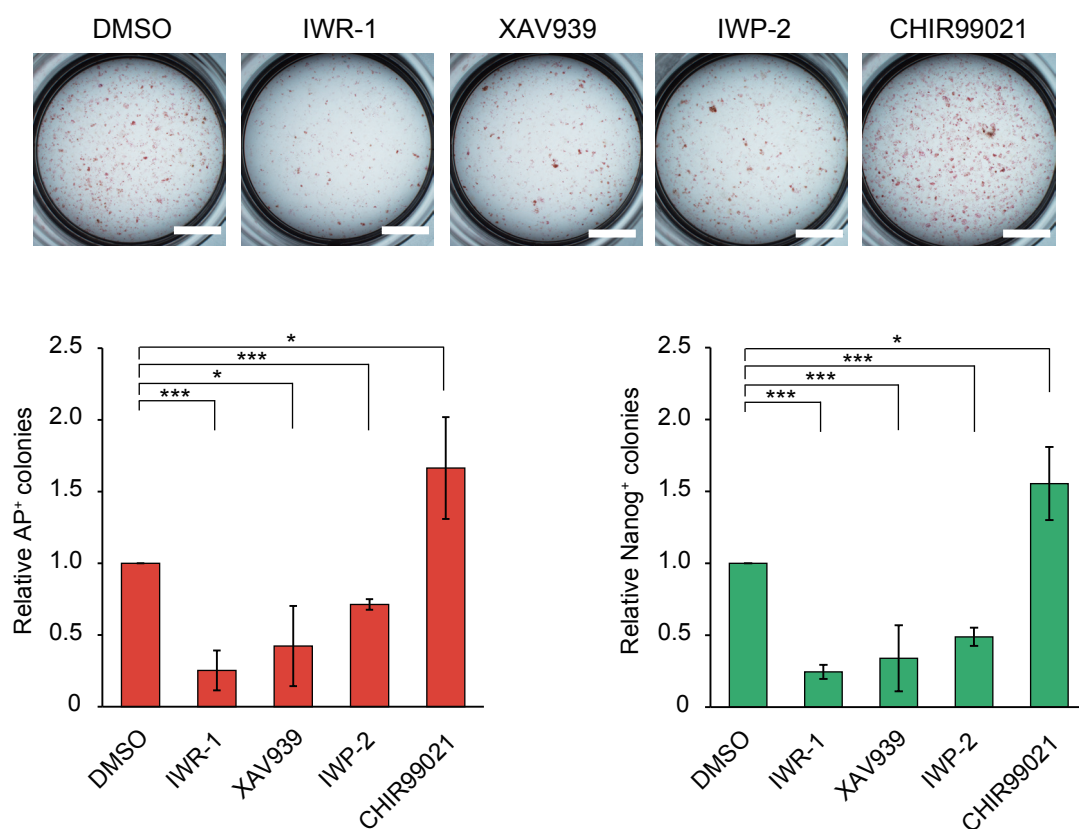


図15. Wnt/β-catenin 経路阻害剤、活性化剤によるリプログラミングへの影響

AP 染色および NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニー数の定量。上に代表的な AP 染色 iPS 細胞コロニーの写真、左下に AP 陽性 iPS 細胞コロニーの定量結果、右下に NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。Day 11 から Day 14 に細胞を固定、染色した。スケールバーは 5 mm を示す。DMSO を添加した細胞を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student' s t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいことを示す。

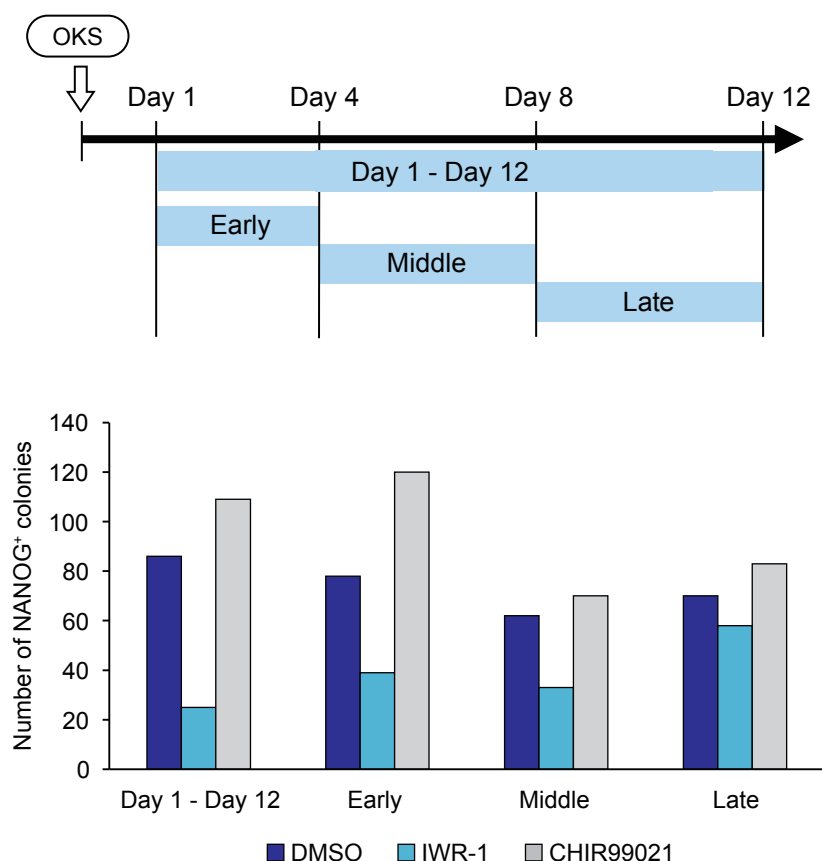


図16. Wnt/ β -catenin 経路阻害剤、活性化剤の時期特異的な添加によるリプログラミングへの影響

リプログラミングの時期特異的に Wnt/ β -catenin 経路に作用する低分子化合物を添加し、形成される iPS 細胞コロニー数を定量した。Wnt/ β -catenin 経路の阻害剤として IWR-1 を、活性化剤として CHIR99021 を使用した。また、コントロールには DMSO を添加した。上に実験プロトコルの模式図を示す。Day 1 から Day 12 まで全日、また Day 1 から Day 4 (Early)、Day 4 から Day 8 (Middle)、Day 8 から Day 12 (Late) の 4 条件で実験を行った。下に Day 12 に形成された NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。

加によってレスキューされた (図 17B)。また、形成される AP 陽性 iPS 細胞コロニー数および NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数も、CHIR99021 の添加によってレスキューされた (図 17C)。

WNT2 過剰発現の効果は β -catenin の核内移行を阻害することで抑制される

WNT2 を過剰発現した細胞に β -catenin の核内移行を阻害する IWR-1、XAV939 を添加し、リプログラミングへの影響を調べた。先のレスキュー実験と同様に、OKS と同時に WNT2 過剰発現ベクターを MEF に導入し、その翌日から IWR-1、XAV939 を添加した (図 18A)。その結果、WNT2 過剰発現によっておよそ 2 倍に増加した AP 陽性 iPS 細胞コロニー数、NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数は、IWR-1、XAV939 の添加によって著しく減少した (図 18B)。以上の結果から、*Wnt2* が β -catenin の核内移行を介してリプログラミングを促進することが明らかになった。

リプログラミング過程における Wnt/ β -catenin 経路の活性化は細胞増殖を制御する

OKS 導入によるリプログラミング初期に *Wnt2* の発現が誘導され、Wnt/ β -catenin 経路が活性化することでリプログラミングが促進されることが明らかになった。そこで次に、リプログラミング過程における *Wnt2* による Wnt/ β -catenin 経路の役割について検討した。これまでに、*Wnt2* による Wnt/ β -catenin 経路の活性化は、いくつかのがん種や発生過程において細胞増殖能の向上に寄与することが報告されている (Jung et al., 2015; Pu et al., 2009; Sousa et al., 2010; Wang et al., 2010)。また、OKSM を用いたリプログラミングでは、リプログラミング初期における細胞増殖能の向上が c-MYC によって制御されることが示唆されている (Sridharan et al., 2009)。そこで、リプログラミング過程における *Wnt2* による Wnt/ β -catenin 経路の活性化も細胞増殖能の向上に寄与しているのではないかと考え、BrdU 取り込み実験を行った。まず、THY1 陽性/陰性細胞集団における細胞増殖能を

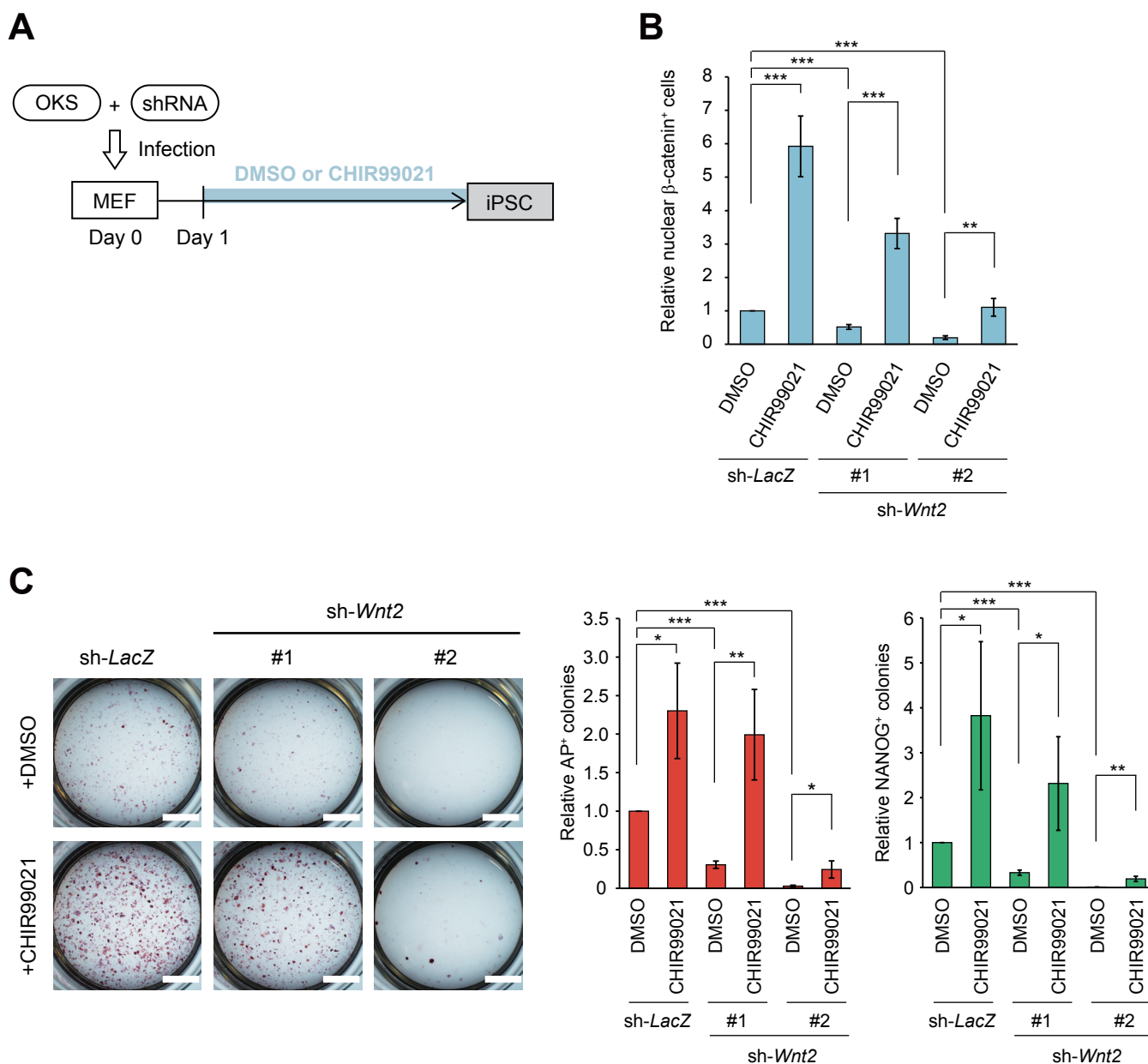


図17. *Wnt2* ノックダウンに対する Wnt/ β -catenin 経路活性化剤によるレスキュー実験

(A)レスキュー実験の模式図。OKSと共にレンチウイルスを用いて *Wnt2* に対する shRNA 配列を導入し、その翌日 (Day 1) から Wnt/ β -catenin 経路活性化剤 CHIR99021 を添加した。また、コントロールには DMSO を添加した。

(B) β -catenin が核内移行している細胞数の定量。Day 4 において β -catenin の免疫染色を行い、 β -catenin が核内移行している細胞数を定量した。 β -catenin 免疫染色の写真におけるスケールバーは 100 μ m を示す。

(C) AP 染色および NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニー数の定量。左に代表的な AP 染色 iPS 細胞コロニーの写真、中央に AP 陽性 iPS 細胞コロニー数、右に NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。Day 14 に細胞を固定、染色した。スケールバーは 5 mm を示す。

(A-C) sh-LacZ を導入し DMSO を添加した細胞を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

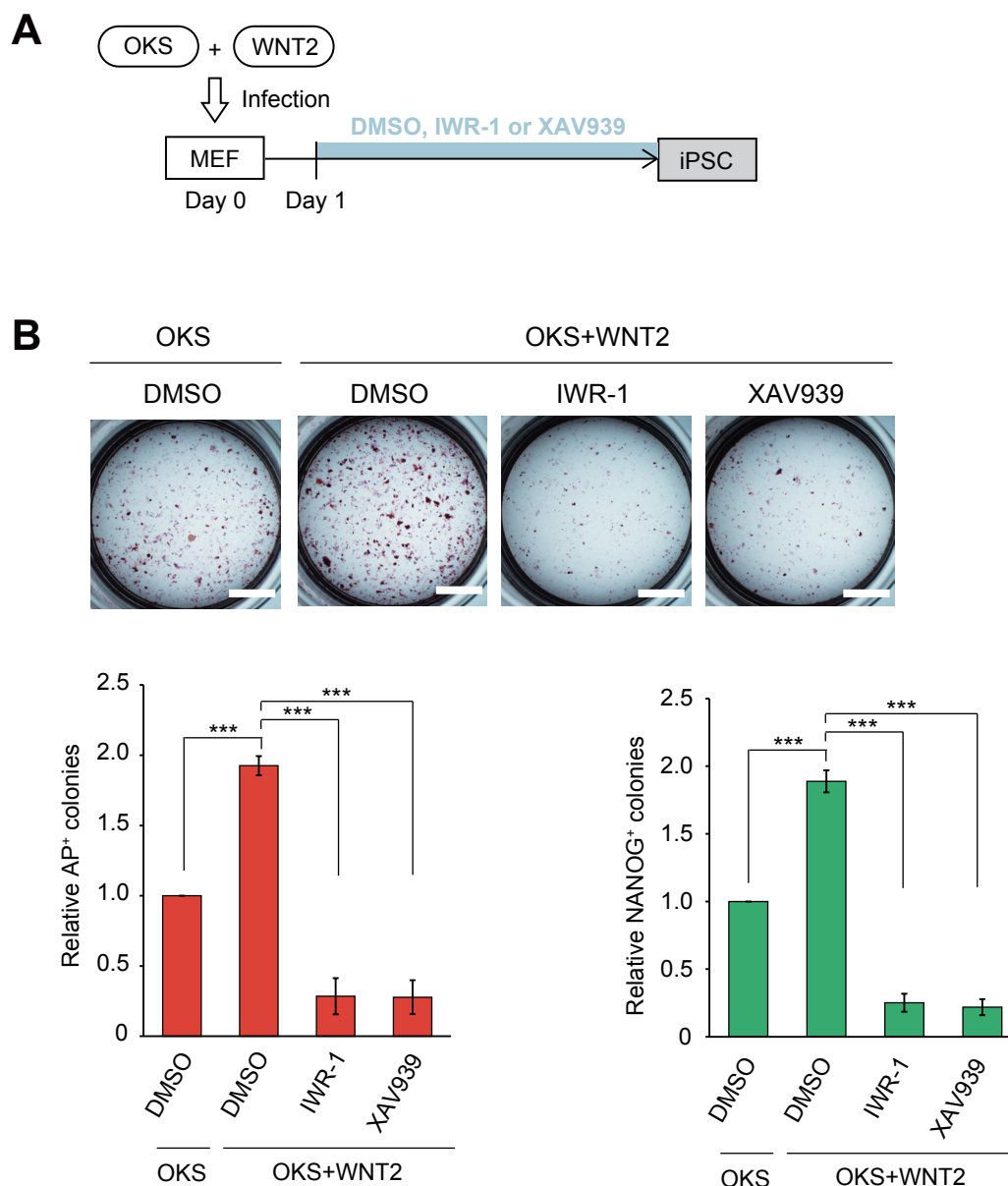


図18. WNT2 過剰発現に対する Wnt/ β -catenin 経路阻害剤の影響

(A) 実験プロトコルの模式図。OKS と共にレトロウイルスを用いて WNT2 過剰発現ベクターを導入し、その翌日 (Day 1) から Wnt/ β -catenin 経路阻害剤 IWR-1、XAV939 を添加した。また、コントロールには DMSO を添加した。

(B) AP 染色および NANOG 免疫染色による iPS 細胞コロニー数の定量。上に代表的な AP 染色 iPS 細胞コロニーの写真、左下に AP 陽性 iPS 細胞コロニー数、右下に NANOG 陽性 iPS 細胞コロニー数の定量結果を示す。Day 14 に細胞を固定、染色した。スケールバーは 5 mm を示す。OKS のみを導入し DMSO を添加した細胞を 1 とした相対値を示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

調べた。THY1 陽性の MEF に OKS を導入し、リプログラミング 4 日目に THY1 陽性細胞と陰性細胞に分け、リプログラミング 5 日目、6 日目における細胞増殖能を調べた (図 19A)。その結果、リプログラミング 5 日目では THY1 陽性細胞集団に比べ THY1 陰性細胞集団で僅かに細胞増殖能が高くなっており、6 日目ではその差がより大きくなった (図 19B)。これは、リプログラミングの進行によって細胞増殖能が向上することを示している。

さらに、WNT2 過剰発現、*Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能への影響を調べた。リプログラミング 4 日目では、OKS を導入していないコントロールに比べ、WNT2 を過剰発現させた細胞 (OKS+WNT2) では細胞増殖能が向上していたが、OKS と OKS+WNT2 では差が無かった (図 20)。対して、リプログラミング 5 日目になると、コントロール、OKS、OKS+WNT2 と細胞増殖能が向上していた。次に、shRNA を用いた *Wnt2* のノックダウンでも同様の実験を行った。その結果、リプログラミング 4 日目では *Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能への影響はなかったが、5 日目ではコントロール (sh-*LacZ*) に比べ、*Wnt2* をノックダウンした細胞では細胞増殖能が低下していた (図 21)。さらに、*Wnt2* をノックダウンした細胞に対して CHIR99021 を添加することで、細胞増殖能の低下がレスキューされるかを調べた。その結果、リプログラミング 5 日目において、*Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能の低下は CHIR99021 の添加によってレスキューされた (図 22)。また、リプログラミング 4 日目では、コントロール (sh-*LacZ*) に CHIR99021 を添加しても細胞増殖能は向上せず、5 日目になると細胞増殖能が向上した。以上の結果から、*Wnt2* による Wnt/ β -catenin 経路の活性化によって、細胞増殖能が向上することが明らかになった。

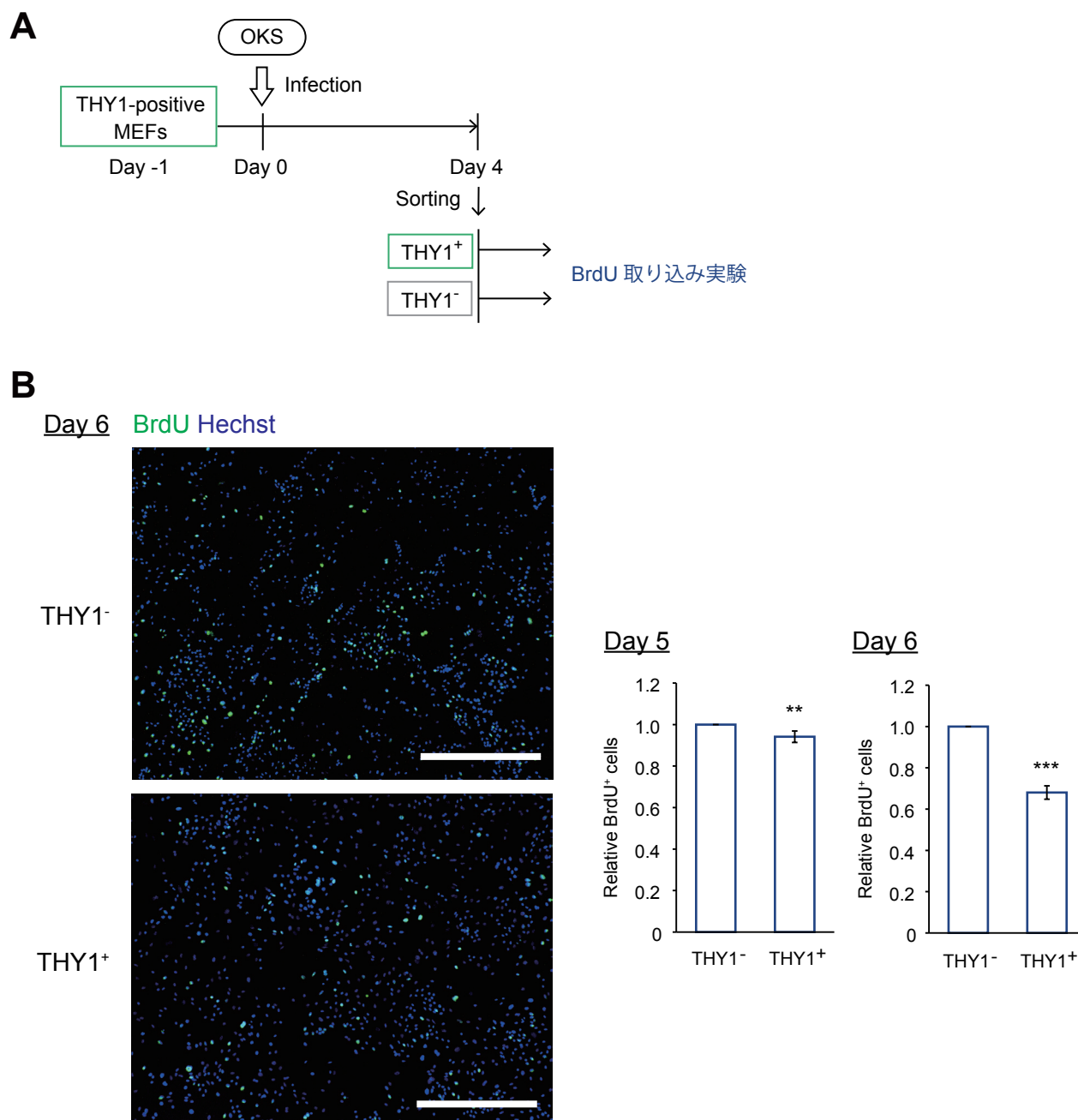


図19. THY1 陽性 / 陰性細胞集団における細胞増殖能

(A) 実験プロトコルの模式図。OKS 導入の前日 (Day -1) にソーティングを行い、THY1 陽性細胞だけを OKS 導入のために播種した。翌日 OKS を導入し、Day 4 に再度ソーティングを行い THY1 陽性細胞集団と THY1 陰性細胞集団に分け、それぞれを播種し、Day 5 あるいは Day 6 に BrdU 取り込み実験を行った。20 μ M BrdU を添加して 3 時間後に細胞を固定し、BrdU 陽性細胞の割合を調べた。

(B) BrdU 取り込み実験の結果。左に Day 6 における代表的な BrdU 免疫染色の写真、右に Day 5 および Day 6 における BrdU 陽性細胞の割合を示す。BrdU 免疫染色の写真におけるスケールバーは 500 μ m を示し、BrdU を緑、Hoechst を青で示す。BrdU 陽性細胞の割合は、THY1 陰性細胞集団における BrdU 陽性細胞の割合を 1 とした相対値で示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's *t* test を行い、** は *p* 値が 0.01 より小さいこと、*** は *p* 値が 0.001 より小さいことを示す。

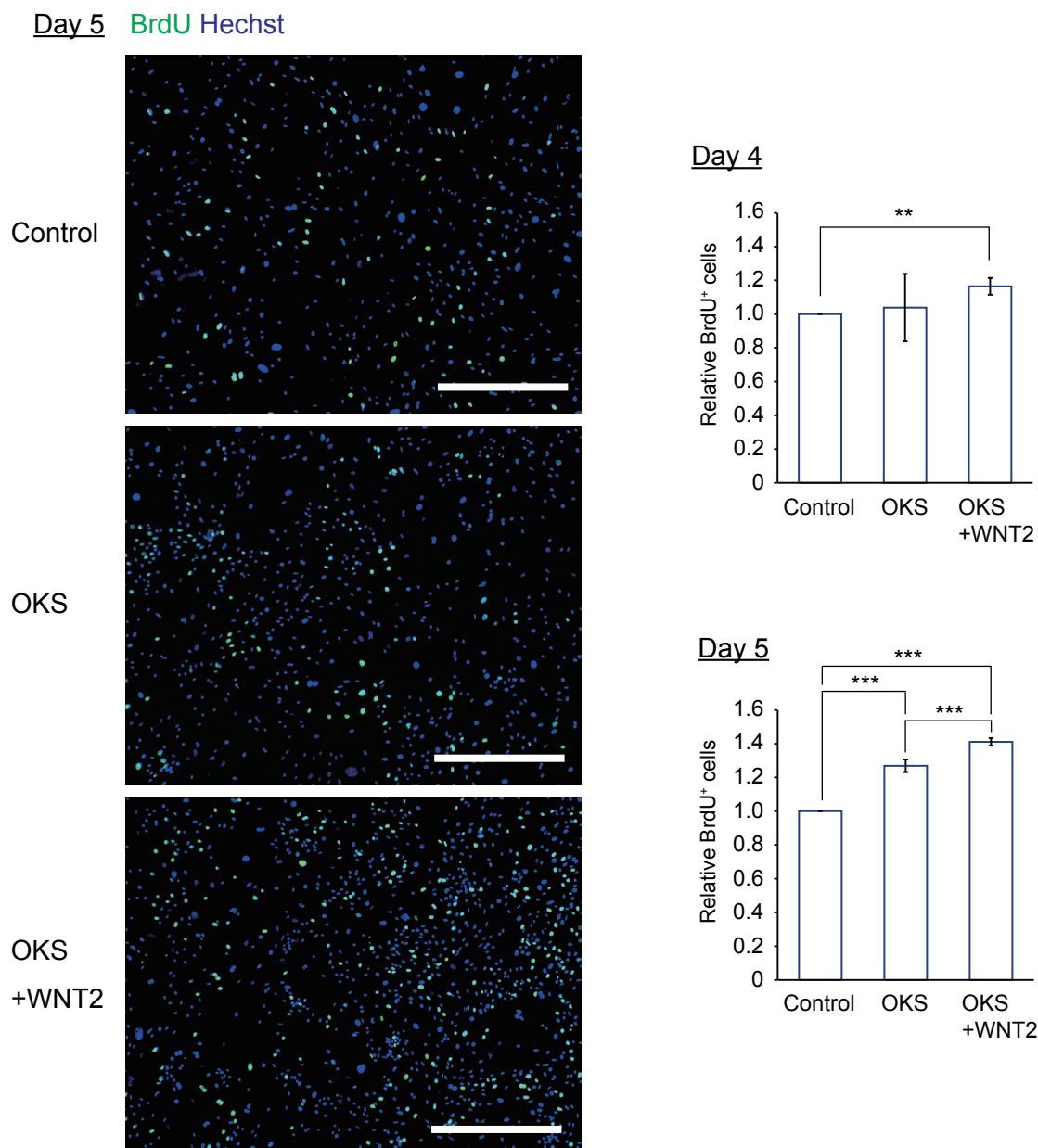


図20. WNT2 過剰発現による細胞増殖能への影響

左に Day 5 における代表的な BrdU 免疫染色の写真、右に Day 4 および Day 5 における BrdU 陽性細胞の割合を示す。20 μ M BrdU を添加して 3 時間後に細胞を固定し、BrdU 陽性細胞の割合を調べた。BrdU 免疫染色の写真におけるスケールバーは 500 μ m を示し、BrdU を緑、Hoechst を青で示す。BrdU 陽性細胞の割合は、OKS を導入していないコントロールにおける BrdU 陽性細胞を 1 とした相対値で示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student' s t test を行い、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

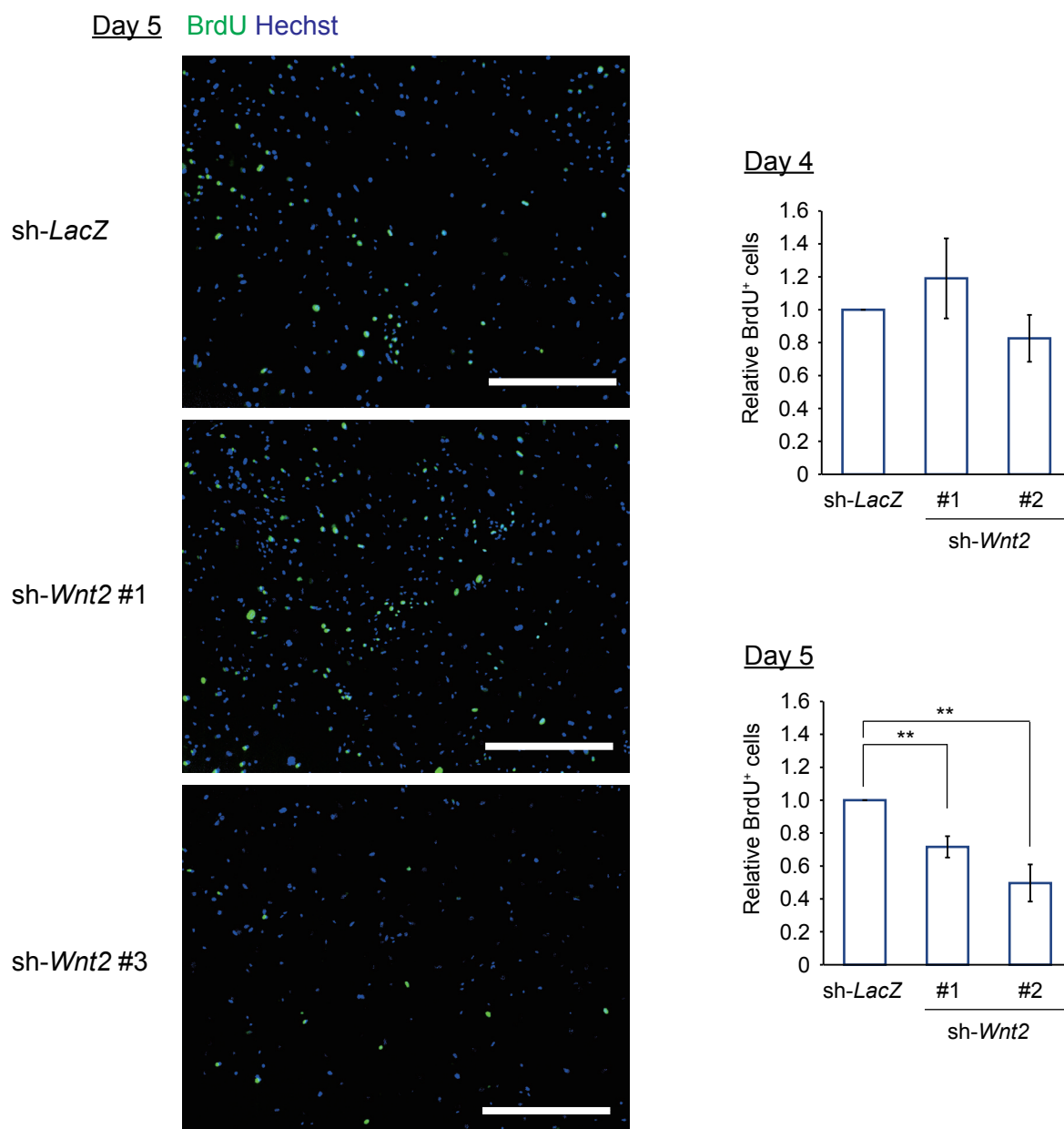


図21. *Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能への影響

左に Day 5 における代表的な BrdU 免疫染色の写真、右に Day 4 および Day 5 における BrdU 陽性細胞の割合を示す。20 μ M BrdU を添加して 3 時間後に細胞を固定し、BrdU 陽性細胞の割合を調べた。BrdU 免疫染色の写真におけるスケールバーは 500 μ m を示し、BrdU を緑、Hoechst を青で示す。BrdU 陽性細胞の割合は、sh-LacZ (コントロール) における BrdU 陽性細胞を 1 とした相対値で示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、** は p 値が 0.01 より小さいことを示す。

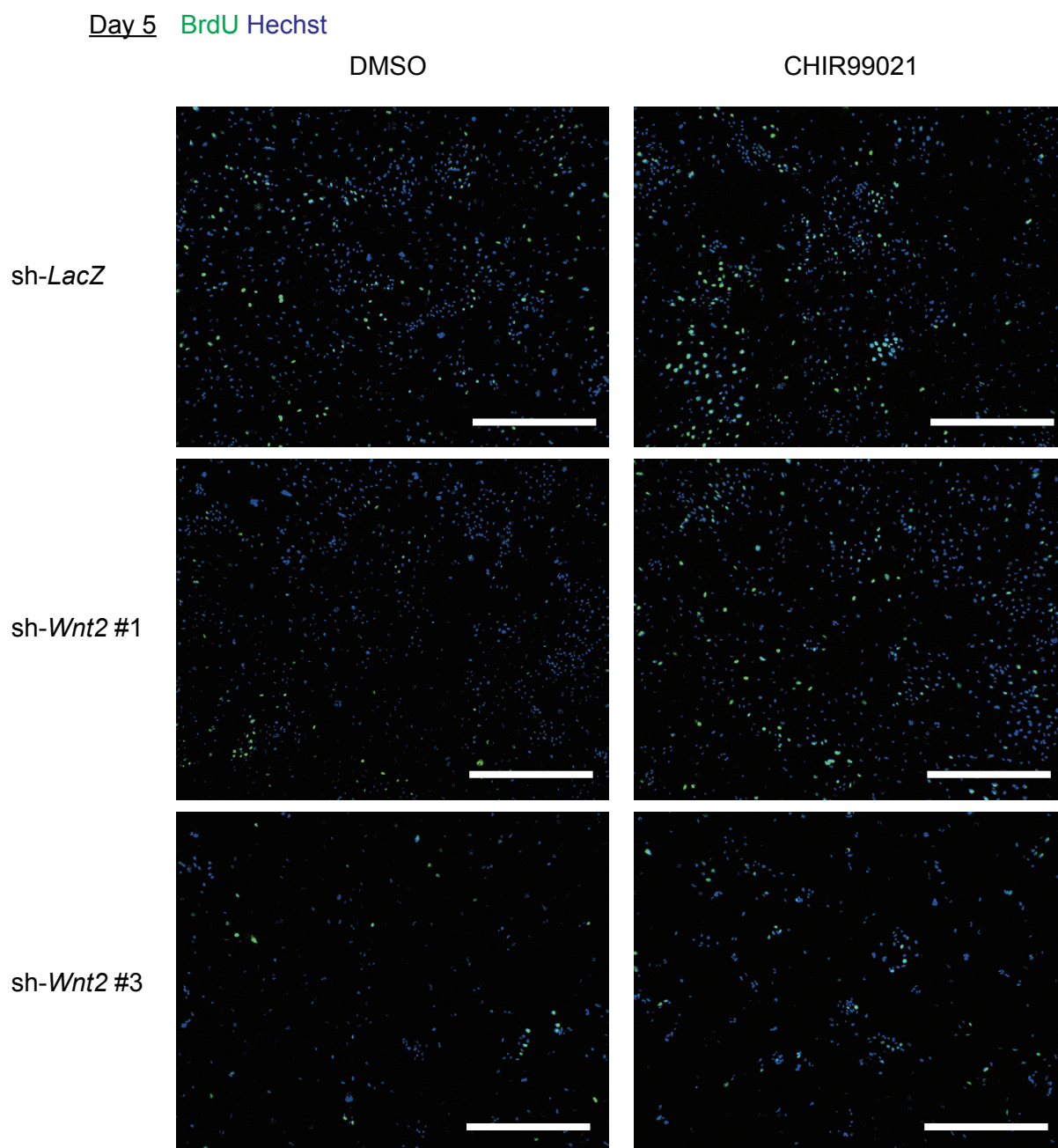


図22. *Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能の低下に対する Wnt/ β -catenin 経路活性化剤を用いたレスキュー実験

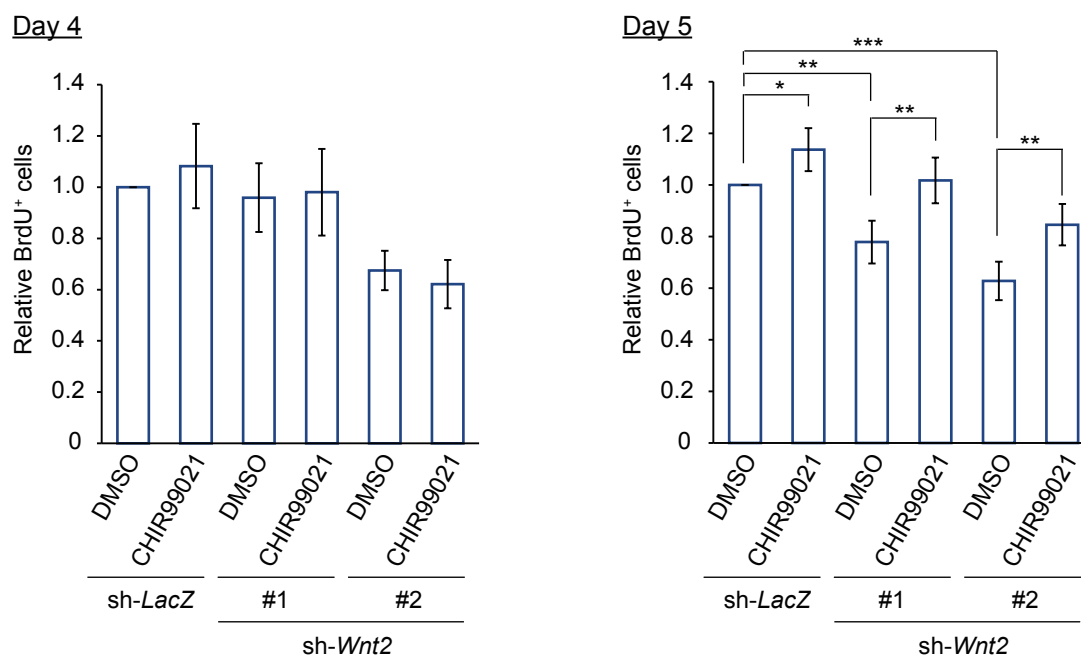


図22. *Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能の低下に対する Wnt/ β -catenin 経路活性化剤を用いたレスキュー実験

図22-1に Day 5 における代表的な BrdU 免疫染色の写真、図22-2に Day 4 および Day 5 における BrdU 陽性細胞の割合を示す。20 μ M BrdU を添加して 3 時間後に細胞を固定し、BrdU 陽性細胞の割合を調べた。BrdU 免疫染色の写真におけるスケールバーは 500 μ m を示し、BrdU を緑、Hoechst を青で示す。BrdU 陽性細胞の割合は、sh-LacZ+DMSO（コントロール）における BrdU 陽性細胞を 1 とした相対値で示す。3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。Student's t test を行い、* は p 値が 0.05 より小さいこと、** は p 値が 0.01 より小さいこと、*** は p 値が 0.001 より小さいことを示す。

考察

本研究では、OKS によるリプログラミング過程における WNT2 による Wnt/ β -catenin 経路の活性化がリプログラミングを促進すること、また、この Wnt/ β -catenin 経路の活性化は細胞増殖能の向上に寄与することを明らかにした。これまでに、リプログラミング過程において薬剤の添加など外部からの操作によって Wnt/ β -catenin 経路を活性化させるとリプログラミング効率が向上することが報告されていたが、リプログラミング過程で内在性の Wnt/ β -catenin 経路が自律的に活性化することを示したのは本研究が初めてである。

リプログラミング経過に伴う β -catenin の細胞内局在の変化を詳細に調べたことで、リプログラミング過程で一過的に β -catenin が核内に移行することが明らかになった。Wnt/ β -catenin 経路阻害剤を添加して β -catenin の核内移行を阻害すると、リプログラミング効率が著しく減少したことから、リプログラミング過程における β -catenin 核内移行の重要性が示唆された。さらに、 β -catenin が核内移行した細胞が iPS 細胞に至るかを調べるため、Wnt/ β -catenin 経路のレポーター (7TGP) を用いて Wnt/ β -catenin 経路活性化のリプログラミングへの影響を調べた。その結果、リプログラミング初期に Wnt/ β -catenin 経路が活性化した細胞 (7TGP 陽性細胞) 集団からより多くの iPS 細胞コロニーが形成されることが示された。その一方で、リプログラミング 6 日目時点で Wnt/ β -catenin 経路が活性化していない細胞 (7TGP 陰性細胞) 集団からも iPS 細胞コロニーが形成された。リプログラミング 6 日目以前あるいは以降に Wnt/ β -catenin 経路が活性化していたのか、Wnt/ β -catenin 経路の活性化を介さずに iPS 細胞コロニー形成に至ったのかを、Wnt/ β -catenin 経路のレポーターの制御化で Cre/loxP が作動するシステムを用いて明らかにすることで、Wnt/ β -catenin 経路がリプログラミングに必須な経路であるのかを明らかにすることは今後の課題である。

過去に当研究室で行われたリプログラミング過程におけるマイクロアレイデータを解析することで、リプログラミング過程で発現が上昇する Wnt リガンドが *Wnt2* のみであることを明らかにした。これまでに、ES 細胞の多能性維持に Wnt シグナル経路の活性化が重要であり、ES 細胞自身が WNT リガンドを分泌することが報告されていた (ten Berge et al., 2011)。樹立された ES 細胞株では *Wnt2* が発現していなかったことから、*Wnt2* は多能性維持でなく、多能性獲得に重要な役割を担う可能性を示唆している。さらに、*Wnt2* のノックダウン実験、過剰発現実験から、*Wnt2* がリプログラミング過程における β -catenin の核内移行を制御することを見出した。*Wnt2* が発現し始めるタイミングは β -catenin の核内移行が起き始めるタイミングと似た傾向を示したが、 β -catenin の核内移行がリプログラミング 6 日目以降急激に減少したのに対し、*Wnt2* の発現はリプログラミング 10 日目まで発現が維持された。この時間的なギャップが生じた理由として、2 つの可能性が考えられる。1 つ目の可能性として、 β -catenin の核内移行が E-cadherin によって阻害された可能性が挙げられる。iPS 細胞コロニーが形成されるリプログラミング後期では、 β -catenin は細胞膜に局在化していた。 β -catenin は E-cadherin の足場タンパクとして機能することが報告されているため、リプログラミング後期では E-cadherin に β -catenin がリクルートされたことで β -catenin の核内移行が阻害された可能性が考えられる (Li et al., 2010; Perez-Moreno and Fuchs, 2006; Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。2 つ目の可能性として、AXIN2 による Wnt/ β -catenin 経路の負のフィードバックが起きたことが考えられる。AXIN2 は β -catenin の分解を促進することで、Wnt/ β -catenin 経路を負に調節することが知られている (Behrens et al., 1998; Ikeda et al., 1998; Jho et al., 2002)。リプログラミング過程でも AXIN2 の発現は上昇していることから、AXIN2 による負のフィードバックによって β -catenin の核内移行が抑制されたために、*Wnt2* が発現し続ける一方で、 β -catenin の核内移行が先に抑制されたと考えられる。

本研究では、*Wnt2*がリプログラミング初期から発現が上昇すること、THY1 陽性細胞で主に発現することが示された。THY1 陽性細胞から陰性への変化は、リプログラミング 4 日目から 6 日目に劇的に起きており、これは *Wnt2*の発現上昇や β -catenin の核内移行のタイミングと一致している。また、リプログラミング 6 日目に Wnt/ β -catenin 経路が活性化している細胞（7TGP 陽性細胞）では、Wnt/ β -catenin 経路が活性化していない細胞（7TGP 陰性細胞）に比べ THY1 の発現が低いことから、Wnt/ β -catenin 経路の活性化が THY1 の発現抑制に働く可能性が考えられる。これらの結果から、WNT2 が THY1 陽性細胞に作用して THY1 陰性状態への移行を制御する可能性が示唆された。一方で、THY1 陽性細胞から分泌された WNT2 が、THY1 陰性細胞のリプログラミングの進行をサポートする可能性もある。WNT2 が THY1 陽性/陰性細胞どちらに作用するのか、分泌された *Wnt2*はオートクラインで作用するのか、パラクラインで作用するのかは、今後明らかにすべき課題である。

WNT2 は食道がん、膵臓がん、神経膠腫の転移を促進することが報告されている (Fu et al., 2011; Jiang et al., 2014; Pu et al., 2009)。上皮間葉転移 (Epithelial-to-mesenchymal transition; EMT) が、がんの転移に重要である一方で、MEF のリプログラミング過程では、リプログラミング初期に間葉上皮転移 (Mesenchymal-to-epithelial transition; MET) が起きることが報告されている (Li et al., 2010; Samavarchi-Tehrani et al., 2010)。したがって、Wnt/ β -catenin 経路の活性化時間が長過ぎると、リプログラミング過程の MET を阻害する可能性がある。私の実験結果においても、リプログラミング中期から後期にかけて THY1 陽性細胞において、Wnt/ β -catenin 経路標的遺伝子 (*Axin2*, *CyclinD1*) の発現が高い。リプログラミングの初期に Wnt/ β -catenin 経路が ON になり、それ以降のステージでは OFF になることがリプログラミングに重要である可能性がある。

リプログラミング初期における細胞増殖能の向上がリプログラミングに重要である

ことが知られている。本研究では、BrdU 取り込み実験によって、リプログラミング初期に細胞増殖能が向上することが示された。興味深いことに、リプログラミング 4 日目では OKS 導入、*Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能への影響がみられなかったが、 β -catenin が核内移行している細胞数が急激に増加した 5 日目では、OKS の導入による細胞増殖能の向上、また *Wnt2* ノックダウンによる細胞増殖能の低下がみられた。これまでに、OKSM によるリプログラミング初期に c-MYC が細胞周期関連遺伝子の発現を介して細胞増殖能の向上に寄与することが示唆されている (Sridharan et al., 2009; Xu et al., 2013)。本研究では c-MYC を含まない OKS でリプログラミングを誘導したために、c-MYC に代わって WNT2 がリプログラミング初期の細胞増殖能の制御に寄与したことが考えられる。

これまでに、リプログラミングの異なるステージにおける Wnt/ β -catenin 経路の関与が複数報告されているが、Wnt/ β -catenin 経路の活性化がリプログラミングを正に制御するか負に制御するかは報告によって異なる (Aulicino et al., 2014; Ho et al., 2013; Ross et al., 2014; Zhang et al., 2014)。これは、リプログラミングを誘導するリプログラミング因子の数 (OKSM あるいは OKS)、システム (レトロウイルスによるリプログラミング因子の導入、ドキシサイクリンによるリプログラミング因子の発現誘導)、リプログラミング因子を導入する元の細胞種 (線維芽細胞、神経幹細胞) などリプログラミングの条件が異なることに起因すると考えられる。Wnt/ β -catenin 経路は ES 細胞の多能性維持に必要である一方で、分化過程でも重要であることから (Miki et al., 2011)、Wnt/ β -catenin 経路は細胞の状況に応じて異なる役割を担うことが考えられる。また、細胞融合を介したリプログラミングでは、Wnt/ β -catenin 経路が過不足なく適当なレベルで活性化することがリプログラミングに重要であることが報告されている (Lluis et al., 2008)。したがって、リプログラミングに Wnt/ β -catenin 経路が及ぼす効果が異なる理由として、リプログラミングの誘導システムによって内在性

Wnt/ β -catenin 経路の活性化レベルが異なることに起因する可能性が考えられる。リプログラミングの誘導システムによって内在性 Wnt/ β -catenin 経路の活性化レベルが異なるかについては、今後解明すべき課題である。

本研究成果により、OKS による MEF のリプログラミングでは、リプログラミング初期に *Wnt2* の発現が上昇し内在性の Wnt/ β -catenin 経路が活性化されることでリプログラミングが促進されることが明らかになった (図 23)。また、この Wnt/ β -catenin 経路の活性化は細胞増殖能の向上に寄与することが見出された。iPS 細胞の臨床への実用化に向けて、iPS 細胞の大量生産や安全性の向上が大きな課題となることが考えられる。今後、リプログラミング過程における分子機構が解明されることで、iPS 細胞を用いた医療の実現への貢献が期待される。

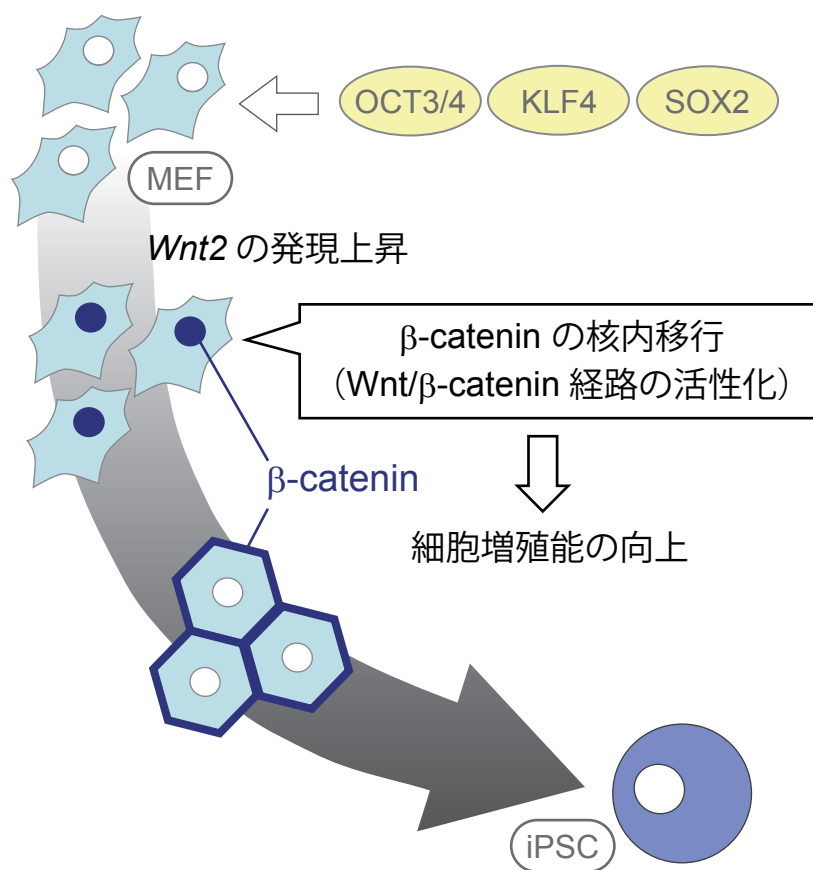


図 23. リプログラミング過程における内在性 Wnt/β-catenin 経路の活性化の模式図

引用文献

Aulicino, F., Theka, I., Ombrato, L., Lluís, F., and Cosma, M.P. (2014). Temporal perturbation of the Wnt signaling pathway in the control of cell reprogramming is modulated by TCF1. *Stem Cell Reports* 2, 707-720.

Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D., and Birchmeier, W. (1998). Functional interaction of an axin homolog, conductin, with β -catenin, APC, and GSK3 β . *Science* 280, 596-599.

Buganim, Y., Faddah, D.A., and Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat. Rev. Genet.* 14, 427-439.

Fu, L., Zhang, C., Zhang, L.Y., Dong, S.S., Lu, L.H., Chen, J., Dai, Y., Li, Y., Kong, K.L., Kwong, D.L., et al. (2011). Wnt2 secreted by tumour fibroblasts promotes tumour progression in oesophageal cancer by activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut* 60, 1635-1643.

Fuerer, C., and Nusse, R. (2010). Lentiviral vectors to probe and manipulate the Wnt signaling pathway. *PLoS One* 5, e9370.

Goss, A.M., Tian, Y., Tsukiyama, T., Cohen, E.D., Zhou, D., Lu, M.M., Yamaguchi, T.P., and Morrissey, E.E. (2009). Wnt2/2b and β -catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Dev. Cell* 17, 290-298.

Ho, R., Papp, B., Hoffman, J.A., Merrill, B.J., and Plath, K. (2013). Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Rep.* *3*, 2113-2126.

Hussein, S.M., Puri, M.C., Tonge, P.D., Benevento, M., Corso, A.J., Clancy, J.L., Mosbergen, R., Li, M., Lee, D.S., Cloonan, N., et al. (2014). Genome-wide characterization of the routes to pluripotency. *Nature* *516*, 198-206.

Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., and Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3 β and β -catenin and promotes GSK-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin. *EMBO J.* *17*, 1371-1384.

Jho, E.H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.K., Freund, J.N., and Costantini, F. (2002). Wnt/ β -catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1172-1183.

Jiang, H., Li, Q., He, C., Li, F., Sheng, H., Shen, X., Zhang, X., Zhu, S., Chen, H., Chen, X., et al. (2014). Activation of the Wnt pathway through Wnt2 promotes metastasis in pancreatic cancer. *Am. J. Cancer Res.* *4*, 537-544.

Jung, Y.S., Jun, S., Lee, S.H., Sharma, A., and Park, J.I. (2015). Wnt2 complements Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *Oncotarget* *6*, 37257-37268.

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.

Koche, R.P., Smith, Z.D., Adli, M., Gu, H., Ku, M., Gnirke, A., Bernstein, B.E., and Meissner, A. (2011). Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell Stem Cell* *8*, 96-105.

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.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., 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.

Lluis, F., Ombrato, L., Pedone, E., Pepe, S., Merrill, B.J., and Cosma, M.P. (2011). T-cell factor 3 (Tcf3) deletion increases somatic cell reprogramming by inducing epigenome modifications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 11912-11917.

Lluis, F., Pedone, E., Pepe, S., and Cosma, M.P. (2008). Periodic activation of Wnt/ β -catenin signaling enhances somatic cell reprogramming mediated by cell fusion. *Cell Stem Cell* *3*, 493-507.

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiram, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fijihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* *16*, 1038-1046.

Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R.A., and Jaenisch, R. (2008). Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* *3*, 132-135

Miki, T., Yasuda, S.Y., and Kahn, M. (2011). Wnt/ β -catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev.* *7*, 836-846.

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.

Murry, C.E., and Keller, G. (2008). Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* *132*, 661-680.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat.*

Biotechnol. *26*, 101-106.

O'Malley, J., Skylaki, S., Iwabuchi, K.A., Chantzoura, E., Ruetz, T., Johnsson, A., Tomlinson, S.R., Linnarsson, S., and Kaji, K. (2013). High-resolution analysis with novel cell-surface markers identifies routes to iPS cells. *Nature* *499*, 88-91.

Perez-Moreno, M., and Fuchs, E. (2006). Catenins: keeping cells from getting their signals crossed. *Dev. Cell* *11*, 601-612.

Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., et al. (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* *151*, 1617-1632.

Pu, P., Zhang, Z., Kang, C., Jiang, R., Jia, Z., Wang, G., and Jiang, H. (2009). Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth. *Cancer Gene Ther.* *16*, 351-361.

Ross, J., Busch, J., Mintz, E., Ng, D., Stanley, A., Brafman, D., Sutton, V.R., Van den Veyver, I., and Willert, K. (2014). A rare human syndrome provides genetic evidence that WNT signaling is required for reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Cell Rep.* *9*, 1770-1780.

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.

Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10, 55-63.

Sousa, K.M., Villaescusa, J.C., Cajanek, L., Ondr, J.K., Castelo-Branco, G., Hofstra, W., Bryja, V., Palmberg, C., Bergman, T., Wainwright, B., Lang, R.A., and Arenas, E. (2010). Wnt2 regulates progenitor proliferation in the developing ventral midbrain. *J. Biol. Chem.* 285, 7246-7253

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.

Stadtfield, 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.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.

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.

ten Berge, D., Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., Siu, R.K., and Nusse, R. (2011). Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1070-1075.

Wang HX., Li T. Y., and Kidder G. M. (2010). WNT2 regulates DNA synthesis in mouse granulosa cells through beta-catenin. *Biol. Reprod.*, *82*, 865-75.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* *2*, 10-12.

Xu Y., Wei X., Wang M., Zhang R., Fu Y., Xing M., Hua Q., and Xie X. (2013). Proliferation rate of somatic cells affects reprogramming efficiency. *J. Biol. Chem.* *288*, 9767-9778

Ying, Q.L., Wray, J., Nichols, J., Battle-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.

You, L., He, B., Xu, Z., Uematsu, K., Mazieres, J., Fujii, N., Mikami, I., Reguart, N., McIntosh, J.K., Kashani-Sabet, M., et al. (2004). An anti-Wnt-2 monoclonal

antibody induces apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.* *64*, 5385-5389.

Zhang, P., Chang, W.H., Fong, B., Gao, F., Liu, C., Al Alam, D., Bellusci, S., and Lu, W. (2014). Regulation of induced pluripotent stem (iPS) cell induction by Wnt/ β -catenin signaling. *J. Biol. Chem.* *289*, 9221-9232.

謝辞

本研究に取り組むにあたり、修士課程、博士課程を通じて多くの御指導ご鞭撻を賜りました西田栄介教授に厚く御礼申し上げます。西田先生には、実験や論文作成に対して多くの御助言を頂いただけでなく、研究者としての姿勢や心構えなど様々な面で親身にご指導を頂きました。

小山（中島）明博士には、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、一から丁寧に御指導頂きました。先輩の御指導のお陰で本研究を遂行することが出来ました。心より感謝致します。

李俊成博士には、多くの御助言を頂き、特に生化学的実験に関して多大な御指導頂きました。心より感謝します。

修士課程、博士課程を通して副指導教員として、米原伸教授、中世古幸信准教授には貴重な御助言を頂きました。心より感謝致します。

また、西田研究室の皆様には常日頃から研究に関する議論をして頂いただけでなく、生活面でもサポートをして頂いたお陰で充実した生活を送ることが出来ました。共に切磋琢磨した研究室の皆様に深く感謝致します。

最後に、学位取得まで様々な面で支えて下さった家族と、恵まれた環境で研究生活を送れたことを深く感謝致します。

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。

Mizuki Kimura, May Nakajima-Koyama, Joonseong Lee, and Eisuke Nishida

Transient Expression of WNT2 Promotes Somatic Cell Reprogramming by Induced β -Catenin Nuclear Accumulation

Stem Cell Reports, 6(6), 834–843, 2016.