

領域融合レビュー, 1, e008 (2012)  
DOI: 10.7875/leading.author.1.e008  
2012年12月11日公開

## 幹細胞の多能性を規定する分子機構

### Molecular mechanism governing pluripotency of stem cells

丹羽 仁史  
Hitoshi Niwa

理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 多能性幹細胞研究プロジェクト

#### 要 約

マウスの着床前の胚から樹立されたマウス ES 細胞は、サイトカインのひとつ LIF に依存的に多能性を維持している。この LIF シグナルは複数の転写因子の制御を介し多能性に関連する転写因子ネットワークに入力している。これとは並列に、液性タンパク質である Wnt も多能性の維持に寄与するが、この Wnt シグナルは Tcf3 による *Esrrb* 遺伝子の発現抑制を解除するというひとつの点において多能性に関連する転写因子ネットワークに入力している。一方、マウスの着床後の胚から樹立されたマウス EpiSC (エピプラスト幹細胞) はアクチビンと Fgf2 に依存して多能性を維持しているが、その転写因子ネットワークへの入力様式は明らかでない。ただし、EpiSC では LIF シグナルおよび Wnt シグナルへの入力にかかわる転写因子の発現は抑制されており、これがこれら異なる多能性幹細胞の性質を規定している可能性がある。今日では、これら細胞の異なる多能性の状態をナイーブ型およびプライム型として区別するのが一般的であり、ヒト ES 細胞はこの分類ではプライム型に属する。ただし、これまで提唱されていたこの 2 つの状態の差異のうちキメラ胚の形成能は絶対的なものとはいはず、マウス EpiSC は E カドヘリンを一過性に発現させるだけで、その胚盤胞の注入はキメラ胚の形成に寄与した。今後、ナイーブ型およびプライム型の状態において表現型とシグナルの入力、および、転写因子ネットワークの状態を注意深く対応させることにより、ナイーブ型の状態を規定する種をこえた原理の解明が待たれる。

#### はじめに

幹細胞は、自己以外の種類の細胞に分化する能力（分化能）と、細胞分裂をへて自己と同一の分化能をもつ娘細胞

を生み出す能力（自己複製能）とをあわせもつ細胞として定義される。このうち、分化能として多能性をもつ細胞を多能性幹細胞とよぶ。多能性は、もっとも普遍的には三胚葉すべてに分化できる能力として規定される。胚性がん細胞 (embryonal carcinoma cell, EC 細胞) は歴史的にはじめて体外で培養された多能性幹細胞である。この EC 細胞は奇形がん種 (teratocarcinoma) とよばれる三胚葉の成分が混在する腫瘍に由来し、マウスに移植することによりふたたび奇形がん種を形成したことから多能性をもつことが確認された。さらに、実験的に形成した一部の奇形がん種に由来する EC 細胞では、初期胚への移植により正常な発生過程に寄与して三胚葉に分化し、いわゆるキメラマウスの形成も可能であることが確認された<sup>1)</sup>。そして、EC 細胞の知見にもとづき、1981年、マウスの胚盤胞の内部細胞塊から胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞) が樹立された<sup>2,3)</sup>。この ES 細胞は胚盤胞への移植により高率にキメラマウスを形成し、そこで生殖細胞系列にも寄与した。これにより、シャーレにおいて培養した ES 細胞にくわえた遺伝子操作を次世代の個体へと伝達する道が拓かれ、特定の遺伝子機能を喪失した、いわゆるノックアウトマウスの作製が可能になった。この技術の発生研究および医学研究への功績は大きく、開発者は 2007 年のノーベル医学生理学賞を受賞している。一方で、ES 細胞は多能性を規定する分子機構の解明の基盤ともなり、そこから得られた知見にもとづき、2006 年、Oct3/4 遺伝子、Sox2 遺伝子、Klf4 遺伝子、Myc 遺伝子の 4 つの遺伝子を導入することで体細胞を初期化することにより、誘導型多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) が作製された<sup>4)</sup>。この研究を成し遂げた中山伸弥が 2012 年のノーベル医学生理学賞を受賞したことは記憶に新しい。このレビューでは、これら研究の基盤となった多能性幹細胞が自己複製と分化を遂行するための分子機構について最近の知見を概説する。

## 1. マウス ES 細胞の多能性を規定する分子機構

### 1. 1. LIF シグナル伝達経路による多能性維持の機構

マウス ES 細胞は、1981 年の最初の樹立の報告においては、通常の血清含有培地を用い、マウス胎仔から採取した線維芽細胞の上で重層培養されていた。1988 年、LIF (leukemia inhibitory factor, 白血病抑制因子) がマウス ES 細胞の分化を抑制し多能性を維持する液性タンパク質として作用することが報告された<sup>5)</sup>。LIF はそれ以前に M1 白血病細胞の分化を誘導するタンパク質として同定されていたインターロイキン 6 ファミリーに属するサイトカインであったが、マウス ES 細胞に対してはそれとは逆に分化抑制の効果を示し、培地への LIF の添加により、線維芽細胞との重層培養なしにゼラチン基質の上でマウス ES 細胞の多能性を維持することができた。LIF は Gp130 と LIF 受容体  $\beta$  からなる LIF 受容体に結合し、細胞において 3 つのシグナル伝達経路を作動させる(図 1)。これらのうち、Jak-Stat3 経路が機能的に重要であることが、その機能の喪失により LIF の存在下でマウス ES 細胞の分化が誘導されること<sup>6)</sup>、および、その人為的な活性化により LIF の非存在下で自己複製が維持されること<sup>7)</sup>により証明された。一方、LIF は PI3 キナーゼ-Akt 経路も活性化するが、Akt の人為的な活性化によっても LIF の非存在下で自己複製は維持されることが報告されている<sup>8)</sup>。

では、これらのシグナル伝達経路はどのような遺伝子の発現を活性化することで多能性の維持に寄与しているのだろうか？ その同定のため、マウス ES 細胞において未

分化状態にて特異的に発現する転写因子を強制発現させて、LIF の非存在下で自己複製が維持されるかどうか検討された。その結果、2003 年にホメオボックス転写因子 Nanog が<sup>9,10)</sup>、2009 年には Kruppel ファミリーに属するジンクフィンガー転写因子 Klf4 および T ボックス転写因子 Tbx3 が<sup>11)</sup>、そのような能力をもつと報告された。そして、これらのうち Klf4 は Jak-Stat3 経路において、Tbx3 と Nanog は PI3 キナーゼ-Akt 経路において、その発現の活性化されることが示された(図 1)。

一方で、1990 年、EC 細胞を用いた解析から、2 つのホメオボックス関連 DNA 結合領域をもつ転写因子 Oct3/4 が未分化状態において特異的に発現していると報告された<sup>12-14)</sup>。2000 年には、Oct3/4 の発現が一定量に維持されることがマウス ES 細胞における多能性の維持に必須であり、その発現量の増加は LIF の除去と同様に分化を誘導し、その減少は栄養外胚葉への分化を誘導することが報告された<sup>15)</sup>。Oct3/4 は Sry ファミリーに属する HMG ボックス転写因子 Sox2 と複合体を形成し標的遺伝子の転写を活性化する<sup>16)</sup>。Sox2 もまたマウス ES 細胞における多能性の維持に必須であり、その機能の欠失は栄養外胚葉への分化を誘導する<sup>17)</sup>。Oct3/4 の機能抑制が栄養外胚葉への分化を特異的に誘導する機構として、Oct3/4 は栄養外胚葉への分化を指令するホメオボックス転写因子 Cdx2 と相互抑制回路を形成し、Oct3/4 の発現減少は Cdx2 の発現増加を誘導して栄養外胚葉への分化を誘導するものと考えられている<sup>18)</sup>。また、Sox2 は Oct3/4 と相互活性化回路を形成し、Sox2 の発現減少は Oct3/4 の発現減少をへて、

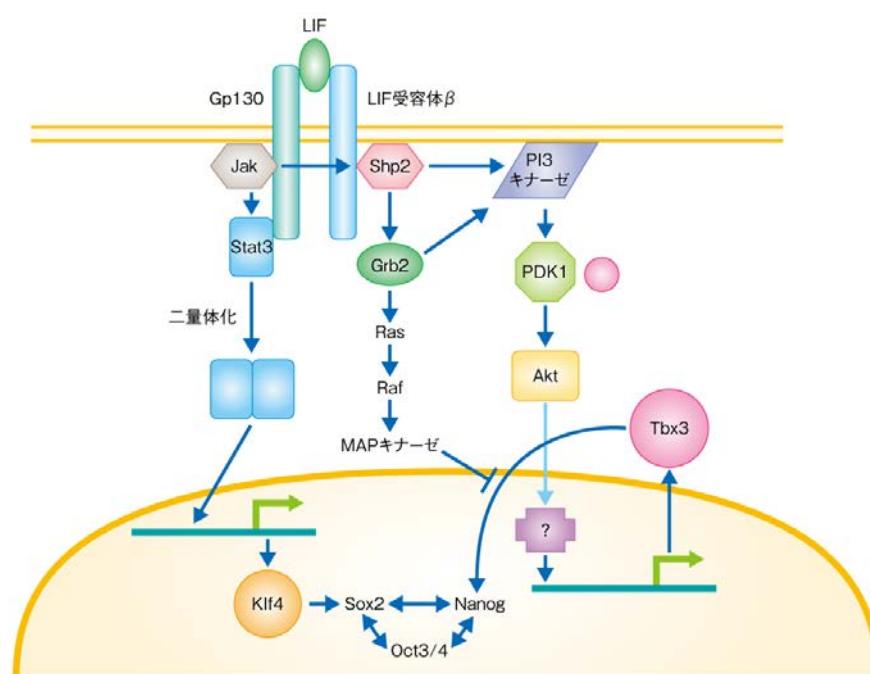


図 1 マウス ES 細胞における LIF シグナルの入力

LIF シグナルは Jak-Stat 経路、PI3 キナーゼ-Akt 経路、Grb2-MAP キナーゼ経路の 3 つのシグナル伝達機構を活性化し、異なる入力を転写因子ネットワークにあたえる<sup>11)</sup>。

結果的に栄養外胚葉への分化を誘導すると考えられている。

では, LIF からのシグナル伝達経路はどのように Oct3/4 あるいは Sox2 に連結しているのだろうか? Oct3/4 の発現を制御する転写因子として, Oct3/4, Sox2, Nr5a2, Nanog, Esrrb などが報告されている。したがって, Nanog はその連結タンパク質として重要と考えられるが, 一方で, Nanog を欠損した細胞は不安定ながらも多能性を維持できるので, これだけでは説明できない<sup>19)</sup>。Klf4 は Oct3/4 および Sox2 と協調して標的遺伝子の転写活性化にはたらくことが報告されており, 機能的な連結に重要と考えられる<sup>20)</sup>。また, Oct3/4 により直接に制御される標的遺伝子の候補として *Klf4* 遺伝子, *Tbx3* 遺伝子, *Nanog* 遺伝子, *Nr5a2* 遺伝子, *Esrrb* 遺伝子がすべてあげられていることから, これらにコードされる転写因子はネットワークを形成し自己安定化を行っていると考えられるが, その構造の詳細は解明されていない。

Myc もまた, LIF シグナル伝達経路に関与する転写因子と考えられている。安定変異型 Myc の強制発現により LIF の非存在下で自己複製が維持されることが報告されている<sup>21)</sup>。一方, Myc を単独で欠損したマウス ES 細胞は正常に自己複製するが, Myc と Mycn との二重欠損マウス ES 細胞は胚体外内胚葉へと分化することから, Myc ファミリーの機能的な重複が示された<sup>22)</sup>。しかし, Myc の二量体形成のパートナーである Max を欠損したマウス ES 細胞は通常の血清含有培地では維持できないが, GSK3 阻害剤と MAPK 阻害剤を含む無血清培地（後述）では維持

できたことから, Myc ファミリーの機能はマウス ES 細胞における多能性の維持に無条件に必要ではないといえる<sup>23)</sup>。

## 1. 2. FGF シグナル伝達経路による分化誘導の機構

LIF により活性化される第 3 の細胞内シグナル伝達経路として MAP キナーゼ経路がある（図 1）。この経路は, マウス ES 細胞自体が発現する FGF4 により刺激される FGF 受容体の細胞内シグナル伝達経路でもある。この MAP キナーゼ経路は多能性の維持に拮抗して分化を誘導する方向にはたらき, Fgf4 あるいは Erk2 の欠損によりこの経路の活性化を阻害すると, マウス ES 細胞の自己複製は安定化し自発的な分化が抑制される<sup>24)</sup>。また, MAP キナーゼは Nanog および Tbx3 の核への移行に抑制的にはたらくことが報告されている<sup>11,25)</sup>。しかし, これまでに MAP キナーゼ経路における機能的な標的タンパク質は報告されていない。

## 1. 3. Wnt シグナル伝達経路による多能性維持の機構

Wnt は発生過程のさまざまな場面ではたらく液性タンパク質である。Wnt シグナルは古典的経路においては Frizzled と Lrp5/6 あるいは Lrp6 とからなる受容体を介して GSK3 の抑制にはたらく（図 2）。GSK3 は  $\beta$  カテニンをリン酸化しその分解を亢進させるので, Wnt シグナルの刺激による GSK3 の抑制は  $\beta$  カテニンを安定化させる。安定化し蓄積した  $\beta$  カテニンは核へと移行し, Tcf ファミリーに属する転写因子と協調して標的遺伝子の発現を制

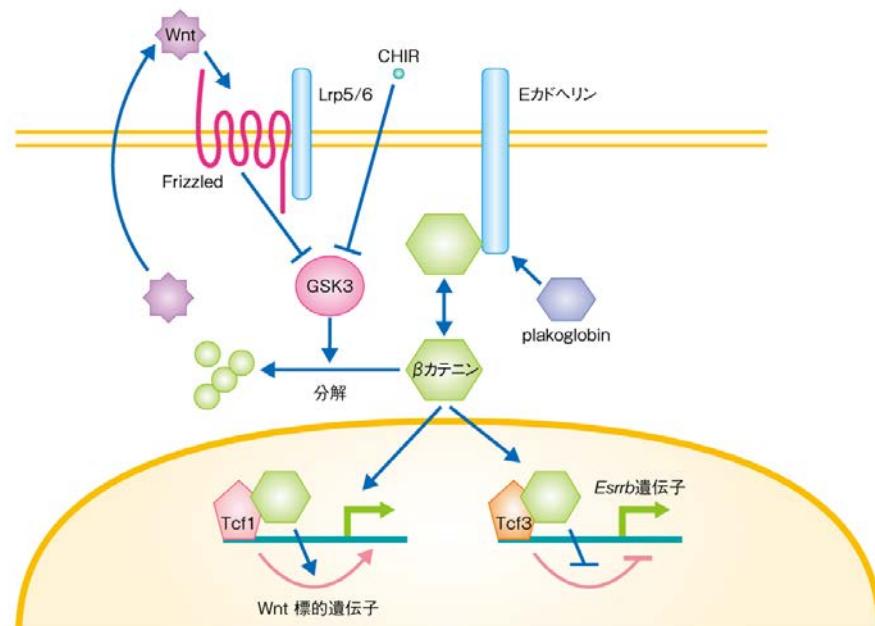


図 2 マウス ES 細胞における Wnt シグナルの入力

Wnt シグナルは GSK3 の活性抑制,  $\beta$  カテニンの安定化と核への移行を介して転写抑制因子 Tcf3 の機能を抑制し, その標的である *Esrrb* 遺伝子の転写活性化をひき起こすことにより多能性の維持に寄与している<sup>29)</sup>。このとき, Tcf1 による転写活性化も誘導されるが, こちらの多能性の維持への寄与は確認されていない。

御する。2004年、マウスES細胞に対するWnt3a阻害剤あるいはGSK3阻害剤の添加は多能性の維持に寄与することが示唆された<sup>26)</sup>。さらに2008年には、GSK3阻害剤とMAPキナーゼ阻害剤を同時に添加することにより、無血清培地においてマウスES細胞の多能性を維持できることが報告された<sup>27)</sup>。このGSK3阻害剤とMAPキナーゼ阻害剤を組み合わせた無血清培地(2i無血清培地)はLIFなしに多能性を維持できるが、そこにLIFをくわえると多能性維持の効果が増強することから、これらの細胞内シグナル制御は協調的にはたらきうるようである。

では、Wntシグナル伝達経路はどのような遺伝子の発現を制御することで多能性の維持に寄与しているのだろうか? Tcfファミリーに属する転写因子のひとつTcf3はマウスES細胞においてその機能を欠失させると多能性の維持を安定化させることから、マウスES細胞におけるWntシグナル伝達経路の機能的な構成タンパク質であることが示唆された。ついで、Tcf3はおもに転写抑制因子としてはたらくこと、そして、その機能はWntシグナルの刺激により核に蓄積したβカテニンとの結合により抑制されることが報告された<sup>28)</sup>。すなわち、Wnt3a阻害剤あるいはGSK3阻害剤の投与はβカテニンの活性化をへてTcf3による標的遺伝子の転写抑制を解除することにより、多能性の維持に寄与していたのである。一方、WntシグナルはマウスES細胞においてもβカテニンとTcf1との複合体の形成を介しAxin2遺伝子などの標的遺伝子の転写活性化を起こすが、これらの多能性の維持への寄与はこれまでのところ検証されていない。最近、Tcf3により転写抑制される標的遺伝子としてEsrrb遺伝子が同定された。Esrrbの人為的な発現の維持はGSK3阻害剤の効果を代替でき、Esrrbを欠損したマウスES細胞はGSK3阻害剤への応答性を喪失した。一方で、Esrrbの人為的な発現の維持はNanogやKlf4、Tbx3と同様にLIFの効果をも代替できたが、Esrrbを欠損したマウスES細胞はLIFの存在下では多能性を維持することができた。これより、Esrrbの機能はGSK3-Tcf3経路の標的としては必要だがLIFシグナル伝達経路の活性化により代償が可能であり、LIFシグナルとWntシグナルの転写因子ネットワークへの入力は分離が可能で、かつ、協調性を示すことを説明することが可能になった<sup>29)</sup>(図2)。

#### 1. 4. 多能性とエピジェネティクス

ここまで、シグナルの入力との関連において、おもに転写因子による遺伝子の発現制御にもとづく(ジェネティックな)制御機構について述べた。一方で最近、エピジェネティックな制御機構も多能性の維持に寄与していることが報告されている。

ATP依存的クロマチン再構成複合体のひとつであるNuRD(nucleosome remodelling and histone deacetylase)複合体は、その多能性の維持への寄与が機

能的に証明された最初のエピジェネティック因子である。NuRD複合体の構成タンパク質のひとつであるMbd3を欠損させたマウスES細胞は分化に対する抵抗性を示し、LIFの非存在下でも自己複製を続ける<sup>30)</sup>。NuRD複合体はおもに転写を抑制する機能をもつことが知られていたが、最近、マウスES細胞においてNuRD複合体はKlf4、Klf5、Tbx3、Rex1などの発現を抑制しており、その欠損はこれらの転写因子の発現を増加させることにより分化に対する抵抗性を誘導することが示された<sup>31)</sup>。一方、ヒストン脱メチル化酵素LSD1はNuRD複合体の構成タンパク質であるが、その機能は多能性の維持には関与せず、分化誘導ののちの遺伝子の発現制御に寄与しているようである<sup>32)</sup>。

BAF複合体もATP依存的クロマチン再構成複合体のひとつであるが、おもに転写活性化に寄与する点でNuRD複合体とは異なる。マウスES細胞にはES細胞に特異的な構成タンパク質を含むesBAF複合体が存在し、Oct3/4やNanogと結合してこれら転写因子による標的遺伝子の転写活性化に寄与することが知られている<sup>33)</sup>。また、ゲノムワイドな解析ではesBAF複合体はStat3とともに強く共局在し、その標的遺伝子の発現制御への寄与が示唆されている<sup>34,35)</sup>。

マウスES細胞では遺伝子コード領域のクロマチンが全般にユークロマチン状態にあり、ヒストンの交換が高頻度に起こっていることが知られている<sup>36)</sup>。このような状態の維持には転写活性化にかかわるヒストン修飾パターンの積極的な形成が関与していると考えられる。ヒストンアセチル化は転写活性化にかかわるヒストン修飾の代表であるが、この修飾を導入するヒストンアセチルtransferase(HAT)のひとつTip60は、ノックダウンによる機能的なスクリーニングから多能性の維持への寄与が示唆されている<sup>37)</sup>。また最近、別のヒストンアセチルtransferaseであるMOF/Myst1/Kat8がマウスES細胞における自己複製の維持に必須であることが報告された<sup>38)</sup>。ヒストンH3の4番目のリジン残基のメチル化(H3K4me)も転写活性化にかかわるヒストン修飾のひとつであり、Trithoraxグループ(trxG)複合体がその導入に関与している。マウスES細胞におけるTrithoraxグループ複合体の構成タンパク質のひとつWdr5は、ゲノムにおいてOct3/4と共に局在し多能性の維持に寄与していると考えられている<sup>39)</sup>。

これらとは対照的に、多くのエピジェネティックな制御機構はヘテロクロマチンを形成し遺伝子発現を抑制する方向にはたらくが、マウスES細胞の多能性の維持には必要ない<sup>40)</sup>。Polycomb抑制複合体2(PRC2)はヒストンH3の27番目のリジン残基のメチル化(H3K27me3)を導入して転写を抑制するが、マウスES細胞においてその構成タンパク質であるEed、Suz12、Ezh2を欠損させH3K27me3をほぼ消滅させても多能性は維持される。ま

表1 マウスES細胞とマウスEpiSCとの差異

	マウスES細胞	マウスEpiSC
コロニー形態	重層	単層
タイトジャンクションの形成	なし	あり
テラトーマ形成能	あり	あり
胚盤胞キメラ形成能	あり	そのままではなし
生殖細胞分化能	あり	なし
雌X染色体の不活性化	なし	あり
相同組換え活性	高い	低い
必要な増殖因子	LIF	アクチビン, Fgf2
2i培地への応答	自己複製	分化
特異的マーカー遺伝子	Rex1, Klf4, NrOb1など	Fgf5
相同なマウス発生時期	4.5~5.0日	6.5~7.0日
多能性の状態	ナイーブ型	プライム型

文献<sup>52)</sup>などより作成

た, H3K4me3 と H3K27me3 の混在する二価のドメイン (bivalent domain) はマウス ES 細胞において自己複製と分化の制御にかかわるエピジェネティックな状態として注目をあつめたが, 最近の報告では, GSK3 阻害剤と MAP キナーゼ阻害剤をくわえた 2i 無血清培地で培養されたマウス ES 細胞においては, ゲノムにおいて H3K4me3 と H3K27me3 の混在するドメインが激減しているにもかかわらず, その多能性の状態はむしろ亢進していること, そして, その分化誘導の過程でも H3K4me3 と H3K27me3 の混在するドメインの出現は明確ではないことが示された<sup>41)</sup>. したがって, H3K27me3 の導入による H3K4me3 と混在するドメインの形成には強い機能的な意義は存在しないと考えたほうがよいと思われる.

## 2. マウス EpiSC の多能性を規定する分子機構

### 2. 1. マウス EpiSC とは?

マウス ES 細胞は子宮に着床する前の胚盤胞から樹立された多能性幹細胞であるが, 2007 年, 少し発生の進んだ着床後の胚からも多能性幹細胞が樹立された<sup>42,43)</sup>. この細胞はエピblast 幹細胞 (epiblast stem cell, EpiSC) と命名され, マウス ES 細胞とはさまざまな点で違いを示した (表 1). マウス EpiSC の増殖は LIF には依存せず, マウス ES 細胞において LIF シグナルの入力にかかわる転写因子である Klf4 や Tbx3 も発現していない. 一方, Nanog は発現しているが, その発現は EpiSC の自己複製に必要な液性タンパク質であるアクチビンのシグナルにより制御されていることが示されている. しかし最近, Nanog を欠損した EpiSC が樹立されたので, マウス ES 細胞と同様に, Nanog の機能は EpiSC における多能性の維持にも必須ではないといえる<sup>44)</sup>.

マウス ES 細胞を EpiSC の培養条件において培養を続けると, その一部が EpiSC 様の多能性幹細胞へと移行することが報告されている. 逆に, EpiSC は SK3 阻害剤と

MAP キナーゼ阻害剤をくわえた 2i 無血清培地では分化してしまい, LIF と血清を含む培地でわずかに ES 細胞様の多能性幹細胞への移行が認められるにすぎない. しかし, このとき, マウス ES 細胞において特異的に発現している転写因子 Klf2, Klf4, Nanog, Tbx3, Esrrb, Nr5a1, Nr5a2 のうちどれかひとつを過剰発現させるか, あるいは, LIF シグナルを強制的に活性化させると, 数%の細胞が ES 細胞様の多能性幹細胞へと “リプログラミング” される<sup>45,46)</sup>. したがって, ES 細胞から EpiSC への移行は発生過程の順方向の変化であって基本的には不可逆的であり, その逆行には分化した細胞の場合と同様に遺伝子操作を必要とする.

では, EpiSC は発生過程においてどの時期の多能性幹細胞の状態に近いのだろうか? マウス ES 細胞からの始原生殖細胞の分化誘導の条件の検討により, マウス ES 細胞から分化し形成された着床後胚の多能性幹細胞に相当する状態からは始原生殖細胞が分化誘導できるのに対し, EpiSC からは同様の培養条件では誘導できないことが報告された<sup>47)</sup>. さらに, これらの細胞および始原生殖細胞が形成されるまえの着床後胚 (5.5 日胚) における多能性幹細胞の遺伝子発現プロファイルの比較から, EpiSC はこの時期の多能性幹細胞とは異なっていることが示された. これらの結果から, EpiSC は生殖細胞が分化したのち, 発生 6 日以降の時期の多能性幹細胞に近いと推測される.

### 2. 2. EpiSC の特性を規定する分子機構

では, ES 細胞と EpiSC との違いはどのような分子機構により規定されているのだろうか? さきに述べた EpiSC をリプログラミングする活性をもつ転写因子は, マウス ES 細胞においてはおもに LIF シグナル伝達経路に関与しており, それぞれの機能は ES 細胞の多能性の維持において必須ではないという点で共通している. したがって, マウス ES 細胞に特徴的な多能性は LIF シグナルへの

応答性に依存していると考えられる。一方、マウス ES 細胞と比較して EpiSC において強く発現する遺伝子から、EpiSC に特徴的な多能性を規定する機能的なタンパク質はこれまで同定されていない。

EpiSC はエピジェネティックな制御の点でもマウス ES 細胞とは大きく異なっている。雌では着床の直後の胚においてエピジェネティックな制御により 2 本ある X 染色体の一方の不活性化が起こるが、雌のマウス ES 細胞は着床前の 2 本の X 染色体がともに活性な状態を維持しているのに対し、雌の EpiSC では 1 本の X 染色体に不活性化が起こっている。また、発生の過程で制御される遺伝子のヒストン修飾状態にも明らかな違いが報告されている。さらに、*Dnmt3a* 遺伝子や *Dnmt3l* 遺伝子といった DNA メチル化に関与する遺伝子の発現が EpiSC において高いことも観察されている。ただし、このような違いがどのようにして EpiSC の表現型に機能的に関与しているのかは明らかでない。

### 2. 3. EpiSC のキメラ胚への寄与能

ES 細胞と EpiSC とを区別する表現型として、胚盤胞に注入されたときのキメラ胚への寄与能がある。2007 年の報告では、EpiSC を胚盤胞に注入してもほとんどは内部細胞塊と融合せず、わずかなキメラ胚が回収されたにすぎなかつたとされている<sup>42,43)</sup>。しかし、EpiSC は着床後胚に由来する多能性幹細胞であり、着床前の胚盤胞への移植は異所性の移植であるから、これがキメラ胚に寄与できな

い理由とも考えられる。また、そもそも EpiSC のもととなる着床後胚の多能性幹細胞もまた、胚発生の過程において三胚葉への分化能を示すことから、EpiSC が絶対的な意味でキメラ胚への寄与能を喪失しているとは考えにくい。EpiSC のキメラ胚への寄与能を正当に評価するためには着床後胚への同所性の移植を行うことが理想的だが、これには技術的に高い困難がある。

そこで最近、筆者らは、E カドヘリンを一過性に強制発現させた EpiSC を胚盤胞に注入し、そのキメラ胚への寄与能を検討した<sup>48)</sup>（図 3）。E カドヘリンを強制発現させた理由は、E カドヘリンはマウス ES 細胞において細胞間接着をつかさどる主たる接着因子であること、そして、過去の報告では EpiSC ではその発現が低下しているとされていたことによる。E カドヘリンを 2 日間にわたり発現させた EpiSC においては、マウス ES 細胞に特異的な遺伝子の発現は誘導されず、また、X 染色体の再活性化も認められなかつたことから、マウス ES 細胞に特異的な転写因子を強制発現させたときのようなリプログラミングは誘導されていないと考えられた。しかし、これらの細胞を胚盤胞に 1 個だけ注入すると、その 5% が良好なキメラ胚を形成した。したがって、EpiSC がキメラ胚への寄与能を喪失しているようにみえるのはその絶対的な能力の欠損を示すものではなく、かつ、マウス ES 細胞に特異的な転写因子の機能はキメラ胚への寄与能を規定するものではないといえた。また、この方法で作製されたキメラマウスでは EpiSC に由来する細胞の生殖細胞系列への寄与は観

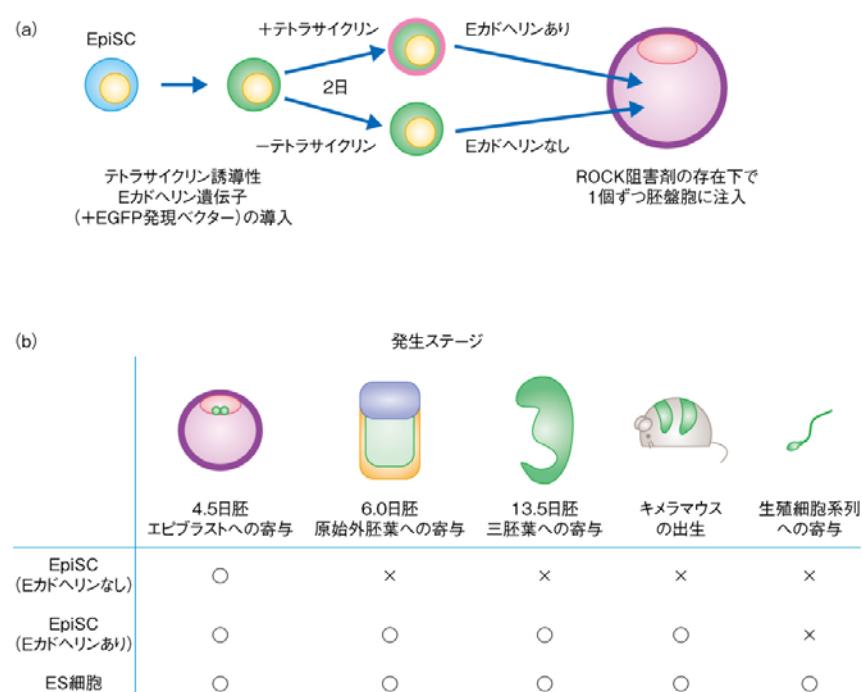


図 3 E カドヘリンの発現によるマウス EpiSC のキメラ胚への寄与

- (a) E カドヘリンを発現誘導してから 2 日目のマウス EpiSC を、ROCK 阻害剤の存在下で単一細胞に解離し胚盤胞に注入した。
- (b) EpiSC の E カドヘリンの発現に依存的なキメラ胚への寄与<sup>48)</sup>。

察できなかった。これは、さきに述べたように、EpiSC が生殖細胞系列の分離ののち、発生後期の多能性幹細胞の状態に近いことを反映しているのかもしれない。

### 3. 多能性幹細胞の一般的な分類

1981 年のマウス ES 細胞株の樹立の報告ののち、さまざまな動物種からの ES 細胞株の樹立が試みられたが、キメラ胚への寄与能の証明を含む成功例の報告は皆無であった。1995 年、胚盤胞からのサル ES 細胞の樹立が報告されたが、その培養条件はマウスのものとは異なり、LIF の代わりにアクチビンと Fgf2 を含むものであった<sup>49)</sup>。1998 年には、同じ培養条件でヒト ES 細胞の樹立が報告され<sup>50)</sup>、そののち、ほかの動物種からも同じ条件での胚盤胞からの ES 細胞株の樹立があいついでなされた。

当初、このようなマウスとそれ以外の動物種の ES 細胞の培養条件における依存性の違いは、マウスにおいて特異的に LIF シグナルが多能性の維持にはたらくためであると解釈された。しかし、さきに述べたマウスにおける EpiSC の樹立は、このような状況を一変させた。マウス EpiSC は、マウス以外の動物種の ES 細胞と同じく、アクチビンおよび Fgf2 に依存的に多能性を維持しているのみならず、それ以外の性質においても、マウス ES 細胞よりこれらの ES 細胞に似ている。これは、マウス ES 細胞とそれ以外の動物種の ES 細胞の違いは、種に依存的な違いというより、これら多能性幹細胞がシャーレにおいてとどまつた発生段階の違いであることを示唆している。

しかし、マウス EpiSC とほかの動物種の ES 細胞（たとえば、ヒト ES 細胞）とには決定的な違いがある。前者が着床後胚に由来するのに対し、後者は着床前の胚盤胞に由来する、という点である。それで、ヒト ES 細胞がマウス EpiSC に似ているならば、ヒト ES 細胞は樹立の過程において着床後胚に相当するまで発生した多能性幹細胞の集団に由来する、ということなのだろうか？ 最近、この点を示唆する興味深い研究成果が報告された。マウス胚盤胞の内部細胞塊を LIF を含有する培地で培養すると ES 細胞を樹立できるが、これをアクチビンおよび Fgf2 を含有する培地で培養すると EpiSC を樹立できたのだ<sup>51)</sup>。これは、さきに述べたヒト ES 細胞の樹立に関する仮説を強く支持するものである。

ヒト ES 細胞がマウス ES 細胞と相同ではなく、むしろ、マウス EpiSC と相同であるなら、“ES 細胞”という単語は単にその細胞が着床前の初期胚に由来するという出自の相同性を示すだけで、細胞の状態の相同性を表わせていないことになる。2009 年、マウス ES 細胞型の多能性の状態をナイーブ型多能性 (naïve pluripotency)、マウス EpiSC 型の多能性の状態をプライム型多能性 (primed pluripotency) とする分類が提唱された<sup>52)</sup>。これによれば、ヒト ES 紹細胞はプライム型多能性幹細胞に分類されることになる。現在、この分類は多能性幹細胞の性質による分類

として普及しつつある。

### おわりに

では、胚の多能性幹細胞から樹立された細胞がナイーブ型になるかプライム型になるかはどのように決定されるのだろうか？ さきに述べた結果からも明らかなように、ここには 2 つのパラメーターが存在する。ひとつは由来する細胞の発生段階で、ナイーブ型多能性幹細胞からプライム型多能性幹細胞が得られるることはあっても、その逆はありえない。もうひとつは培養条件で、ナイーブ型の状態を維持できる培養条件が存在しないかぎり、ナイーブ型多能性幹細胞に由来していたとしても培養された細胞はナイーブ型ではありえない。現時点で、ナイーブ型の状態を維持できる培養条件はマウスおよびラットというげっ歯類においてしか確立されていない。GSK3 阻害剤と MAP キナーゼ阻害剤をくわえた 2i 無血清培地における培養も、げっ歯類以外ではナイーブ型多能性の維持には十分ではないようである。ここには、動物種による明らかな違いが存在する。しかしながら、ナイーブ型多能性幹細胞にはプライム型多能性幹細胞に実用的にまさる特性が多い。たとえば、相同遺伝子組換えの効率はナイーブ型多能性幹細胞のほうがはるかに高く、プライム型多能性幹細胞における遺伝子ターゲティングは通常の方法では困難である。また、2i 無血清培地における培養にみられるよう、ナイーブ型多能性幹細胞のほうがより均一な性質で維持することが可能であり品質管理の点で有利である。今後、マウス ES 細胞におけるナイーブ型多能性の維持機構をシグナルの入力との関連において明らかにし、さらにそのプライム型多能性への移行の過程における変化を解析することにより、動物種の壁をこえた、普遍的なナイーブ型多能性幹細胞の培養条件の確立が待たれる。

### 文 献

- 1) Papaioannou, V. E., Gardner, R. L., McBurney, M. W. et al.: Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 44, 93-104 (1978)
- 2) Evans, M. J. & Kaufman, M. H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156 (1981)
- 3) Martin, G. R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 7634-7638 (1981)
- 4) Takahashi, K. & Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676

(2006)

5) Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D. et al.: Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336, 688-690 (1988)

6) Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I. et al.: Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.*, 12, 2048-2060 (1998)

7) Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K. et al.: STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.*, 18, 4261-4269 (1999)

8) Watanabe, S., Umehara, H., Murayama, K. et al.: Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene*, 25, 2697-2707 (2006)

9) Chambers, I., Colby, D., Robertson, M. et al.: Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113, 643-655 (2003)

10) Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H. et al.: The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113, 631-642 (2003)

11) Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. et al.: A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460, 118-122 (2009)

12) Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A. et al.: A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell*, 60, 461-472 (1990)

13) Rosner, M. H., Vigano, M. A., Ozato, K. et al.: A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature*, 345, 686-692 (1990)

14) Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N. et al.: New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344, 435-439 (1990)

15) Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. G.: Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.*, 24, 372-376 (2000)

16) Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. et al.: Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev.*, 9, 2635-2645 (1995)

17) Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y. et al.:

Pluripotency governed by *Sox2* via regulation of *Oct3/4* expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.*, 9, 625-635 (2007)

18) Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D. et al.: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, 123, 917-929 (2005)

19) Chambers, I., Silva, J., Colby, D. et al.: Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450, 1230-1234 (2007)

20) Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y. et al.: Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the *Lefty1* core promoter in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 7772-7782 (2006)

21) Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A. et al.: LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132, 885-896 (2005)

22) Smith, K. N., Singh, A. M. & Dalton, S.: Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 343-354 (2010)

23) Hishida, T., Nozaki, Y., Nakachi, Y. et al.: Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell*, 9, 37-49 (2011)

24) Kunath, T., Saba-El-Leil, M. K., Almousailleakh, M. et al.: FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134, 2895-2902 (2007)

25) Hamazaki, T., Kehoe, S. M., Nakano, T. et al.: The Grb2/Mek pathway represses Nanog in murine embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 26, 7539-7549 (2006)

26) Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L. et al.: 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 (2004)

27) Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J. et al.: The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453, 519-523 (2008)

28) Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S. et al.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.*, 13, 838-845 (2011)

29) Martello, G., Sugimoto, T., Diamanti, E. et al.: Esrrb is a pivotal target of the gsk3/tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 11,

491-504 (2012)

30) Kaji, K., Caballero, I. M., MacLeod, R. et al.: The NuRD component Mbd3 is required for pluripotency of embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.*, 8, 285-292 (2006)31) Reynolds, N., Latos, P., Hynes-Allen, A. et al.: NuRD suppresses pluripotency gene expression to promote transcriptional heterogeneity and lineage commitment. *Cell Stem Cell*, 10, 583-594 (2012)32) Whyte, W. A., Bilodeau, S., Orlando, D. A. et al.: Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation. *Nature*, 482, 221-225 (2012)33) Ho, L., Ronan, J. L., Wu, J. et al.: An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 5181-5186 (2009)34) Ho, L., Miller, E. L., Ronan, J. L. et al.: esBAF facilitates pluripotency by conditioning the genome for LIF/STAT3 signalling and by regulating polycomb function. *Nat. Cell Biol.*, 13, 903-913 (2011)35) Novershtern, N. & Hanna, J. H.: esBAF safeguards Stat3 binding to maintain pluripotency. *Nat. Cell Biol.*, 13, 886-888 (2011)36) Meshorer, E., Yellajoshula, D., George, E. et al.: Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev. Cell*, 10, 105-116 (2006)37) Fazzio, T. G., Huff, J. T. & Panning, B.: An RNAi screen of chromatin proteins identifies Tip60-p400 as a regulator of embryonic stem cell identity. *Cell*, 134, 162-174 (2008)38) Li, X., Li, L., Pandey, R. et al.: The histone acetyltransferase MOF is a key regulator of the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell Stem Cell*, 11, 163-178 (2012)39) Ang, Y. S., Tsai, S. Y., Lee, D. F. et al.: Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 145, 183-197 (2011)40) Niwa, H.: How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134, 635-646 (2007)41) Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R. et al.: The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*, 149, 590-604 (2012)42) Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W. et al.: Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448, 191-195 (2007)43) Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A. et al.: New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 196-199 (2007)44) Festuccia, N., Osorno, R., Halbritter, F. et al.: Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*, 11, 477-490 (2012)45) Guo, G., Yang, J., Nichols, J. et al.: Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, 136, 1063-1069 (2009)46) Guo, G. & Smith, A.: A genome-wide screen in EpiSCs identifies Nr5a nuclear receptors as potent inducers of ground state pluripotency. *Development*, 137, 3185-3192 (2010)47) Hayashi, K., Ohta, H. & Kurimoto, K. et al.: Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146, 519-532 (2011)48) Ohtsuka, S., Nishikawa-Torikai, S. & Niwa, H.: E-cadherin promotes incorporation of mouse epiblast stem cells into normal development. *PLoS One*, 7, e45220 (2012)49) Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G. et al.: Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7844-7848 (1995)50) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S. et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147 (1998)51) Najm, F. J., Chenoweth, J. G., Anderson, P. D. et al.: Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell*, 8, 318-325 (2011)52) Nichols, J. & Smith, A.: Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4, 487-492 (2009)

## 著者プロフィール

丹羽 仁史 (Hitoshi Niwa)

**略歴** : 1993 年 熊本大学大学院医学系研究科 修了, 同年 熊本大学医学部 助手, 1994 年 英国 Edinburgh 大学 ポスドク, 1996 年 大阪大学医学部 助手, 2001 年 理化学研究所発生・再生科学総合研究センター チームリーダーを経て, 2009 年より同 プロジェクトリーダー。

**研究テーマ** : マウス多能性幹細胞において機能する転写因子ネットワーク。

**研究室 URL** : <http://www.cdb.riken.jp/pcs>