

博士學位論文

胚性幹細胞における細胞外syntaxin-4 の 形態と分化への影響 —分化状態の不均一性との関わり—

関西学院大学大学院
理工学研究科 生命科学専攻

萩原 奈津美

2017年3月

目次

略語表	6
第 1 章 要旨	8
第 2 章 序論	10
第 1 節 胚性幹細胞の不均一性	
第 2 節 syntaxin-4 の機能	
第 3 章 材料と方法	18
第 1 節 細胞培養	
第 2 節 発現コンストラクトの作製および遺伝子導入	
第 3 節 細胞の蛍光免疫染色	
第 4 節 ウェスタンブロッティング	
第 5 節 細胞表面のタンパク質のビオチン化による検出	
第 6 節 細胞表面 syntaxin-4 の免疫沈降	

第 7 節 組換えタンパク質の作製

第 8 節 RT-PCR および qRT-PCR

第 9 節 細胞表面タンパク質の免疫蛍光染色法による検出

第 10 節 細胞外 syntaxin-4 による細胞形態の解析

第 11 節 RNA シーケンス解析

第 12 節 *zscan4* 遺伝子のノックダウン

第 13 節 データ処理

第 4 章 結果

第 1 節 マウス ES 細胞における syntaxin-4 の細胞外局在 29

ES 細胞表面での syntaxin-4 の自発的な発現

MEK1/2 および GSK3 β 阻害剤添加による細胞外 syntaxin-4 の発現変化

細胞外 syntaxin-4 の発現細胞の割合

第 2 節 細胞外 syntaxin-4 による形態・分化への影響 35

細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態への影響

E- to P-cadherin スイッチへの影響

syntaxin-4 フラグメントによる細胞外 syntaxin-4 の機能の検証

細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子および中胚葉分化への影響

第 3 節 細胞外 syntaxin-4 の下流因子の同定 43

次世代シーケンサーによる細胞外 syntaxin-4 の下流因子の探索

細胞外 syntaxin-4 による未分化状態安定化因子 Zscan4 への影響

細胞外 syntaxin-4 による PI3K/Akt シグナルへの影響

MEK1/2 および GSK3 β 阻害剤による細胞外 syntaxin-4 の機能への影響

第 4 節 F9 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能

(cadherin スイッチと形態との関わり) 51

細胞外 syntaxin-4 による F9 細胞の形態への影響

E- to P-cadherin スイッチへの影響

細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子および分化への影響

P-cadherin 強制発現による形態への影響

E-cadherin の機能阻害による形態変化

E- to P-cadherin スイッチの模倣による形態変化

長期的な細胞外 syntaxin-4 発現による分化への影響

第 5 節 P19CL6 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能

(P-cadherin と中胚葉分化との関係) 63

細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態への影響

細胞外 syntaxin-4 による中胚葉分化への影響

P-cadherin 強制発現による形態と中胚葉分化への影響

第 5 章 総括および考察	68
第 6 章 参考文献	75
第 7 章 参考資料	83
第 8 章 付録	87
第 9 章 研究業績	115
第 10 章 謝辞	119

略語表

ES: Embryonic stem

iPS: Induced pluripotent stem

EC: Embryonic carcinoma

MEK1/2: MAPK/ ERK kinase

GSK3: Glycogen synthase kinase 3

LIF: Leukemia inhibitory factor

EMT: Epithelial-mesenchymal-transition

HES1: Hes family bHLH transcription factor 1

t-SNARE: Target soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

ICM: Inner cell mass

JAK: Janus kinase

STAT: Signal transducers and activator of transcription

Akt: Akt serine/threonine kinase 1

PI3K: Phosphatidylinositol 3 kinase

α SMA: α -Smooth muscle actin

Zeb1: Zinc finger e-box binding homeobox

Foxc2: Forkhead box protein C2

AFP: alpha fetoprotein

MHC: Myosin heavy chain

Tuj1: Neuronal class III β -Tubulin

RA: Retinoic acid

Oct3/4: Octamer-binding transcription factor 3/4

Nanog: Nanog homeobox

Rex1 (Zfp42): ring-exported protein 1 (Zinc finger protein 42)

Gata: Gata binding protein

Bmp4: Bone morphogenetic protein 4

Wnt3: Wingless-type MMTV integration site family, member 3

Mek: MAP kinase-ERK kinase

Erk: Extracellular regulated MAP kinase

GMEM: Glasgow minimum essential medium

α MEM: Alpha modified minimum essential medium

GFP: Green fluorescent protein

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

SDS: Sodium dodecyl sulfate

PBS: Phosphate buffered saline

PFA: Paraformaldehyde

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DOX: Doxycycline

qRT-PCR: quantitative reverse transcription PCR

siRNA: small interfering RNA

第1章 要旨

近年、ES、iPS細胞などの多能性幹細胞は次世代再生医療への応用が期待されているが、その実用化には、目的細胞への高効率な分化誘導技術の確立という重要課題が残されている。現在、この分化効率低下の原因として、「多能性幹細胞の不均一性」が挙げられている。未分化な幹細胞の単一コロニー中にはもともと形態や性質の異なる複数の細胞が混在するため、一方向への分化刺激に対しても複数の細胞応答が引き起こされてしまう。しかし、現在までその不均一性の発生メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。本研究では、この多能性幹細胞の不均一性を生み出す候補因子として、細胞内外で異なる機能を発揮するユニークな膜タンパク質群 syntaxin に着目し、その局所的な発現と機能によって、幹細胞集団に不均一な分化状態が生じる可能性を見出した。通常、syntaxin は細胞膜の内側にアンカーされ、小胞の膜融合を媒介するが、細胞外からの種々の刺激を受け取ると、一部が膜の内側から外側へと反転し、隣接細胞に局所的なシグナルを伝えることができる。まず、これまで表皮角化細胞において細胞外提示が実証されている syntaxin-4 について未分化な ES 細胞表面での発現を確認したところ、コロニー中の一部の細胞が syntaxin-4 を局所的に細胞外提示することが判明した。さらに、マウス ES 細胞を均一な未分化状態 (ground-state) で維持するために用いられる MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤 (2i) によって syntaxin-4 の細胞外提示が抑制されることも明らかとなった。しかし、これまで細胞外 syntaxin-4 が多能性幹細胞に与える影響については一切報告されていない。そこで次に、ES 細胞や種々の EC (胚性癌) 細胞に syntaxin-4 を細胞外に強制提示させる系と機能阻害組み換えタンパク質を用いる系を組み合わせることで、幹細胞への機能を解析した。その結果、ES 細胞や EC 細胞では細胞外 syntaxin-4 によって EMT (上皮間葉転換) 様の形態変化や中胚葉系列への分化が誘導されることがわかった。また、トランスクリプトーム解析により、E-cadherin から P-cadherin へのスイッチや、未分化維持因子 Zscan4 の顕著な発現抑制が検出された。さら

に、これらの発現変動には PI3K/Akt シグナルの不活性化が深く関与することが明らかとなった。以上の変化は、多能性維持因子である LIF 存在下でも誘導されることから、未分化維持培地中において、個々の幹細胞表面で不均一に発現する syntaxin-4 のシグナルを受け取った細胞は、完全な未分化状態を維持できず、結果として、細胞集団の不均一性が創出される可能性が示された。

第 2 章 序論

第 1 節 胚性幹細胞の不均一性

私たちの体はたった一つの受精卵からはじまり、その細胞が絶えず増殖・分化することで、成人になる頃には 270 種類以上、総数にして約 37 兆個の細胞で構成されるようになる¹。多能性幹細胞である ES (Embryonic stem)、iPS (Induced pluripotent stem) 細胞は理論上、生体内のあらゆる細胞へ分化することが可能であるため、次世代再生医療の強力なツールとして世界中でその応用が期待されるとともに、初期発生分野の学術的な研究材料としても広く用いられている^{2,3}。

これまで、未分化な多能性幹細胞は均一な細胞集団であると考えられていたが、近年、非分化誘導条件下においても、異なる形態や分化状態を示す細胞が複数出現し、「不均一な細胞集団」となるところが明らかになってきた⁴⁻⁸。例えば、マウス ES 細胞では未分化維持に必要とされている LIF (Leukemia inhibitory factor) を添加した培養条件では、JAK-Stat や PI3K/Akt シグナルを介して多能性マーカーである Oct3/4 の発現が保たれているが^{9,10}、その未分化維持転写ネットワークに属する Nanog や Rex1 等の遺伝子発現は一つのコロニー内で均一ではなく、個々の細胞間で大きくばらついている⁵⁻⁷。Nanog 陰性細胞は始原内胚葉細胞に似た性質を示す一方、Rex1 陰性細胞は ES 細胞を取得する時期の内部細胞塊 (ICM) より分化の進んだ胚盤葉上層 (Epiblast) や始原外胚葉様の細胞に近い性質を有し、体細胞への分化ステージに速やかに移行できる状態であると言われている^{6,9,11}。また、周期的に発現量の変動する転写因子として知られる Hes1 は、個々の ES 細胞でその変動タイミングが異なるため、一定時間で見ると単一コロニー内での発現は不均一になっている¹²。分化状態としては、Hes1 の発現レベルが高いものは中胚葉系列へ、低いものは外胚葉系列の細胞

に分化しやすい性質を有することが報告されている (図 1-A)¹²⁻¹⁵。

一方、幹細胞は機能的な分化に伴って、その細胞形態もダイナミックに変化させることが広く知られている^{16,17}。完全な未分化状態にある ES 細胞は丸く、細胞間接着が密なコロニーを形成するが、分化刺激が伝わることで扁平化し、個々の細胞が散在した形態をとることが報告されている¹⁸⁻²¹。さらに近年、脂肪細胞由来の幹細胞において人工的に誘導した形態変化が分化開始の引き金になるという報告もあり、多能性幹細胞の形態と分化の密接な関与が伺える^{22,23}。

ES 細胞はコロニー形成時の形態や細胞間結合タンパク質の発現から上皮細胞に近い性質を有しており、その分化の初期段階には EMT (Epithelial mesenchymal transision, 上皮間葉転換) が関与するという報告もある^{16,18,24}。EMT はその名の通り、上皮から間葉への形質の移行により定義づけられる。典型的な EMT では、丸みを帯びた上皮細胞様の形状から扁平化した間葉系細胞様への形態変化に伴い、転写因子 Snail 因子群による、E-cadherin の発現抑制が多く見られている^{25,26}。また、ES 細胞においても、E-cadherin の発現減少は、多能性に関わる PI3K/Akt シグナルを抑制し、未分化性を破綻させることが知られている^{27,28}。さらに、EMT では E-cadherin の発現量低下にともなって別の種類の cadherin の発現が上昇する cadherin スイッチという現象が多数報告されている。一般的には E-cadherin から N-cadherin への移行 (E- to N-cadherin スイッチ) が有名だが^{29,30}、近年、乳腺や膵臓などの複数のガン細胞の浸潤転移および形態変化に伴って E-cadherin から P-cadherin へのスイッチ (E- to P-cadherin スイッチ) が誘導されることも観察されている (図 1-B)³¹⁻³⁵。

また近年、着床前期マウス胚の各ステージにおける遺伝子発現プロファイリングの解析により、二細胞期に特異的に発現する遺伝子として *zscan4* が同定された³⁶。*zscan4* は二細胞期胚と ES 細胞に特異的に発現する遺伝子で、テロメラーゼに依存しないテロメアの伸長やゲノムの安定性を維持することで、自己増殖中も常に未分化状態を維持するための重要な役割を果たしている^{37,38}。さらに、iPS 細胞作製時に 24 時間 *zscan4* を活性化すること

で大幅に作製効率が促進されるとともに、早期に着床前期胚特異的な遺伝子群が活性化することも報告された³⁹。また、*zscan4* の発現は未分化維持因子 LIF レセプターの下流である PI3K/Akt シグナルによって正に制御されていることから、幹細胞の多能性維持に重要な遺伝子であると考えられている^{40,41}。

このように、幹細胞の分化制御についてのメカニズムは国内外で広く研究されているにもかかわらず、幹細胞のコロニーから不均一な細胞集団が局所的に出現するメカニズムについては未だほとんど明らかになっていない^{2,8,42}。再生医療において、この局所的な不均一性は、目的細胞への分化誘導時に、複数方向に分化した細胞や未分化状態を保ったままの細胞の創出に起与し、その結果ターゲット細胞の取得効率低下の原因となると考えられている⁶。また、学術面においては、一つの受精卵から派生した一種のクローナルな細胞集団において、複数の異なる性質を有する細胞が出現する初期発生の重要な仕組みを現わしているという報告もある^{14,15}。これらのことから、多能性幹細胞の不均一性を引き起こす原因因子の同定および詳細な機構解明は、医療応用のみならず発生学的観点からも重要であると考えられる。

多能性幹細胞に局所的な不均一性を付与する新たな候補因子の特徴として、以下の二つが考えられる。一つ目は、遺伝的背景が同一な細胞集団の一部で発現し、隣接細胞に局所的な分化や形態変化のシグナルを送ること (特徴①) である。コロニーの一部の細胞のみに局所的な刺激を与えるということは、分泌拡散されるタンパク質よりも、細胞膜近傍で機能発現する非拡散性の膜タンパク質である可能性が高い。また、マウス ES 細胞では、樹立直後から未分化維持に必要とされる LIF を添加した培養条件下でこの不均一性が観察されているが、その条件にさらに 2i と呼ばれる MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤を添加することで、ES 細胞は機能および形態的に均一な基底状態 (Ground-state) での維持が可能となり、この状態の ES 細胞を胚盤胞に移植するとキメラ形成能が大きく亢進することが知られている^{4,43,44}。このことから、候補因子の2つ目の性質として、2i の有無によって機能発現の ON/

OFF が切り替わること（特徴②）が考えられる。

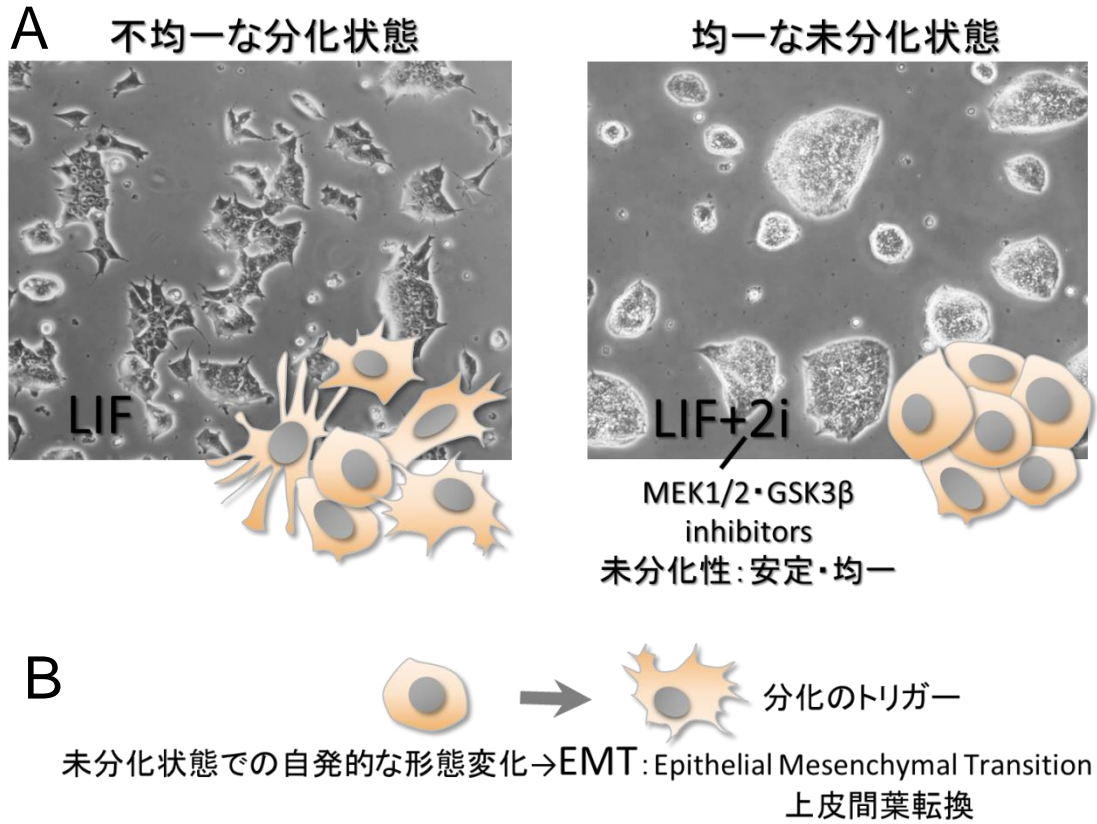


図 1: マウス ES 細胞の不均一性の概念図

A: LIF 添加培地では個々の細胞が不均一な形態や性質を示すのに対し、2i (MEK1/2 および GSK3β の阻害剤) を添加することで未分化状態が均一に保たれる⁴。

B: 特定方向への分化刺激なしに起こる、自発的な形態変化には EMT が関与する²⁴。

第 2 節 syntaxin-4 の機能

t-SNARE ファミリータンパク質として知られる syntaxin は、通常 C 末端側の疎水性膜貫通領域 (TM: trans membrane 領域) が膜に固定されており、細胞内の小胞輸送における標的膜への膜融合に関与する (図 2)⁴⁵⁻⁴⁷。

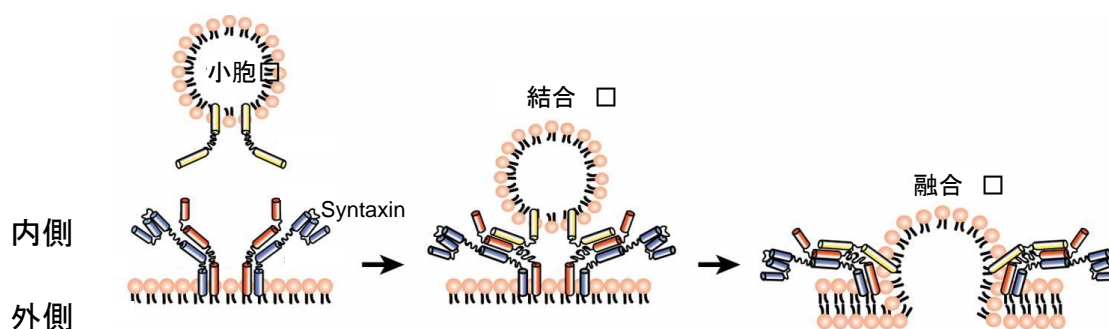


図 2: 小胞輸送過程における syntaxin の細胞内機能

syntaxin は C 末端側の TM 領域で膜に埋め込まれており、細胞内では t-SNARE タンパク質として、小胞輸送における標的膜への膜融合の最初の段階に関与する。

一方で、興味深いことに、細胞膜に局在している syntaxin ファミリーの一部は外部からの刺激に応答した膜反転を契機に細胞の外側に提示され、細胞内とは全く異なる機能を発揮する⁴⁸⁻⁵³。この機能発現には新たな転写や翻訳が必要とされないため、即座に隣接する細胞に局所的な刺激を与えることができると考えられる。一例として、syntaxin ファミリー分子の一つである epimorphin (別名 syntaxin-2) は SNARE タンパク質として小胞輸送に関与するだけでなく外部刺激に応じて一部が特定の細胞から分泌されると、シグナル伝達因子としての機能を発揮することが知られている⁵⁴。皮膚において epimorphin は、細胞膜の細胞質側でホスファチジルセリンと結合している Synaptotagmin や Annexin II と複合体を形成しているが、オレイン酸、カルシウム流入およびアポトーシスによって引き起こされる細胞ストレスにより、ホスファチジルセリンの膜反転に伴って細胞外へ提示された後、即座に切断され細胞外へ分

泌される^{55,56}。分泌された epimorphin は、表皮層の表皮角化細胞の受容体に作用し、表皮角化細胞の分化を制御する。これ以外にも細胞外 epimorphin は肺や乳腺の分枝形成、内皮細胞の管腔形成など、種々の組織の形態・機能分化に関わることが明らかになっている^{48,50,54,56} (図 3)。

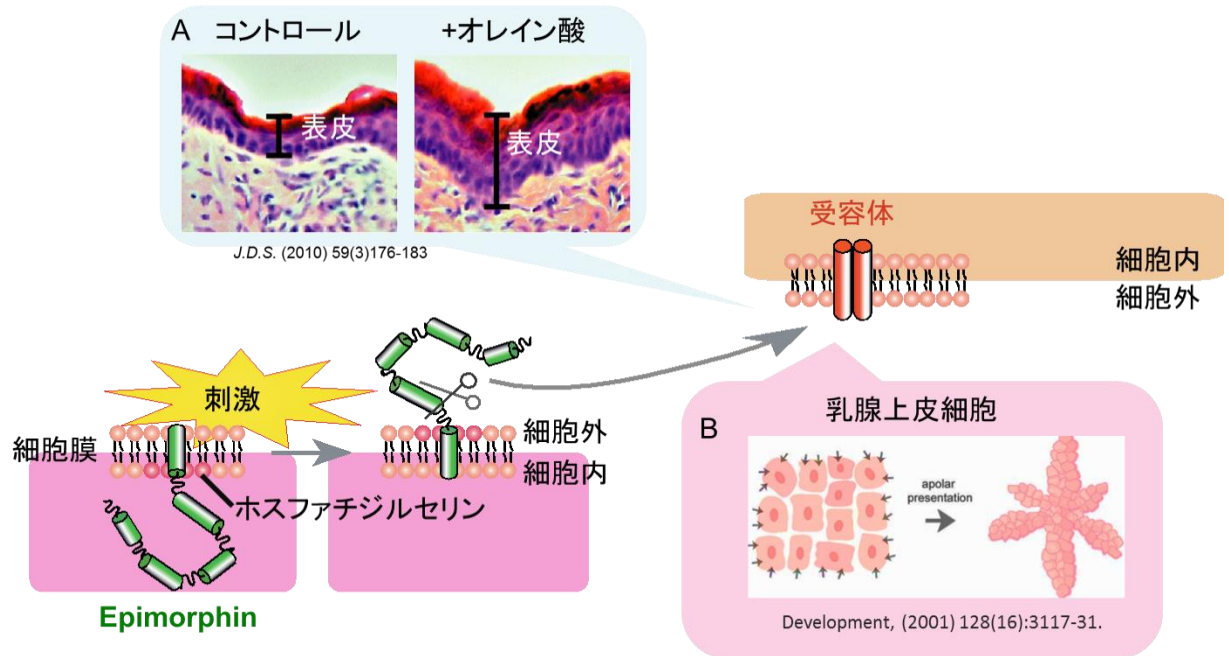


図 3: epimorphin の 細胞外機能の概要

epimorphin は、細胞膜の細胞質側で Synaptotagmin や Annexin II と複合体を形成しているが、種々の細胞外からの刺激により、ホスファチジルセリンの膜転移に伴い細胞外へ提示された後、切断され細胞外へ分泌される。分泌された epimorphin は周辺細胞の受容体に作用し、表皮細胞の分化異常を促すことが知られている (A)⁵⁶。また特定の方向からの epimorphin 刺激によって乳腺上皮細胞の分岐形成が促進されることなども報告されており (B)、細胞外 epimorphin は多様な細胞の分化や形態変化に深く関与している^{50,55}。

これらの先行研究を受け、近年当研究室において epimorphin と同じ syntaxin ファミリーに属する syntaxin-4 も一部が細胞外に発現しており、細胞内とは異なる作用を引き起こすことが報告された^{49,52,57}。syntaxin-4 は epimorphin と同じく、N 末端側から 3 つの α -ヘリックス領域、SNARE および TM 領域からなり、分子内にコイルドコイル複合体を形成する特徴的な

配列を有している (図 4) ^{47,57,58}。syntaxin-4 と epimorphin の構造を比較すると、アミノ酸配列の相同性は約 40%程度であるが、分子量および 2 次構造やドメイン構造は非常によく似ている (図 4)^{57,59}。先行研究において、表皮ケラチノサイトにおいて syntaxin-4 の局在が調べられ、外部からの刺激のない状態でも細胞表面に提示されていることが明らかとなった。さらに、その細胞外の機能として表皮の角質化および酸化ストレス耐性の促進といった、表皮細胞の分化や成熟に関わることが判明した ⁵²。

さらに、epimorphin は細胞外に提示された後、速やかに切断され分泌型となるのに対し、同じく細胞膜に局在する syntaxin-4 は細胞外に提示された後切断されることなく非拡散性のタンパク質として機能することが示された ⁵⁷。その機能発現の違いには MMP による切断部位近傍のアミノ酸配列の違いによると考えられている。分泌前の epimorphin の分子量は 34kDa だが、MMP-14 によって切断されると 30 kDa 付近に検出される。その切断には epimorphin の膜貫通領域から 20 番目の切断領域直後のヒスチジン残基が必須であることが知られており、先行研究においてヒスチジンをアルギニンに置換した変異型 epimorphin は切断が阻害されることが示されている ⁵⁵。それと同様に、syntaxin-4 の予定切断領域直後のアミノ酸はヒスチジンではなくアルギニンであるため、epimorphin と比較して syntaxin-4 は細胞外提示された際分泌されず、より限定的な場所で機能を発揮すると考えられている ⁵²。

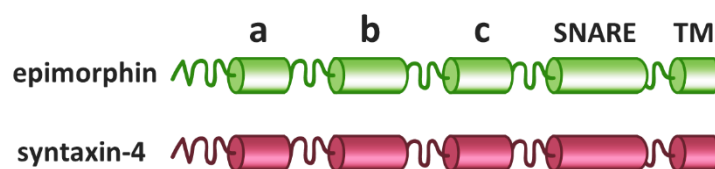


図 4: syntaxin-4 および epimorphin の推定 2 次構造

syntaxin-4 および epimorphin は 3 つのヘリックス a、b および c、SNARE 領域、TM 領域で構成されている。これらのアミノ酸配列の相同性は 40%程度であるが、分子量および 2 次構造は非常によく似ている ⁵⁷。また、epimorphin は細胞外提示された後、即座に切断され分泌型となるが、syntaxin-4 は細胞外に提示されたまま細胞膜に留まることがわかっている ⁵²。

そこで、本研究では多能性幹細胞の不均一性を付与する新規候補因子の同定を目的とし、先述の特徴①に示した、隣接細胞に局所的な分化や形態変化刺激を伝達する可能性のある膜タンパク質 syntaxin-4 に着目した。しかし、これまでの細胞外 syntaxin-4 の機能は、すでに分化が進行した乳腺や表皮の細胞のみで調べられており、発生のもっとも初期段階に位置する多能性幹細胞における機能については全く未解明であった。そのため、まず、syntaxin-4 の ES 細胞表面での不均一な発現および 2i の有無による発現パターンの変化について確認し、その後、細胞外 syntaxin-4 の分化や形態への機能を解析することとした (図 5)。

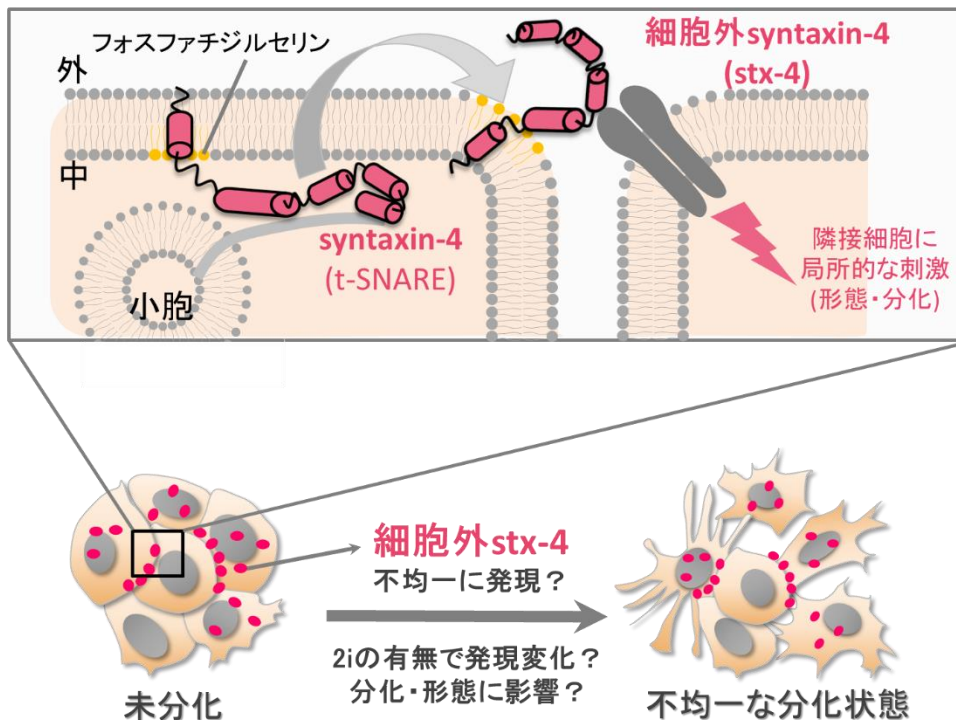


図 5: 本研究の概略図

本研究は未分化な ES 細胞に不均一性を生み出す候補因子として、遺伝的背景が同一の細胞集団の中で隣接細胞に局所的な刺激を与えることが可能な syntaxin-4 に着目した。まず、syntaxin-4 が未分化細胞表面で不均一に発現すること、また、幹細胞の均一化を促す 2i によりその発現パターンが変化することを解析した後、syntaxin-4 を ES 細胞に作用させ、分化や形態に与える影響およびその分子メカニズムについて調べた。

第 3 章 材料と方法

第 1 節 細胞培養

マウス ES 細胞 E14-Tg2A (Parental ES) および細胞外 syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞 (ES-STstx4) は 0.1%のゼラチンを塗布した培養皿に播種し、ES 細胞用培地 [GMEM (Wako 社製)、10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen 社製)、1 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich 社製)、0.1 mM penicillin/streptomycin L-glutamine (Wako 社製)、0.1 mM Non-essential Amino Acids (NEAA) (Wako 社製)、0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma-Aldrich 社製)、leukemia inhibitory factor (LIF) (Wako 社製)] にて培養した。また、未分化状態を均一に維持するために必要な MEK1/2 および GSK3 β の阻害剤の添加実験 (第 4 章 第 1 節および第 3 節) では、ES 細胞用培地に 1 μ M の PD0325901 (Invitrogen 社製) および 3 μ M の CHIR99021 (Invitrogen 社製) (2i) を加えて 3 日間培養した。また、コントロールとして等量の DMSO (Wako 社製) を添加した。細胞の維持は、ES 細胞用培地に 2i (上記と同濃度) を添加した状態で行い、各実験では、実験開始前に 2i を除いた ES 細胞用培地に交換し、1 日以上培養したものをを用いた。

マウス胚性ガン細胞 (EC 細胞) 由来の F9 細胞 (ATCC CRL-1720)、syntaxin-4 発現誘導細胞 (F9-STstx4)、syntaxin-4 安定発現細胞 (F9-sig-stx4) および P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) には、DMEM/HamsF12 (DH) (Wako 社製) に最終濃度が 10%となるように FBS (Invitrogen 社製) を加えた培地 (DH10) を用意し、そこに 50 U/mL penicillin (Meiji Seika ファルマ社製)、50 μ g/mL streptomycin (Meiji Seika ファルマ社製) を添加した培養液を用いた。また、同じく EC 細胞由来の P19CL6 細胞 (RIKEN BRL RCB2318)、syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) では、Alpha modified MEM (α -MEM) (Wako 社製) に最終濃度が 5%となるように FBS を加えた培地に、さらに 50 U/mL penicillin、

50 µg/mL streptomycin を添加し、培養液を調製した。ES-STstx4、F9-STstx4、F9-P-cad および P19-STstx4 は 5 µg/ml Doxycycline (DOX) (Sigma-Aldrich 社製) を 2 日もしくは 3 日間添加し、外来遺伝子を発現誘導した。また ES-STstx4 に 1.25 µM および 2.5 µM の PI3K 阻害剤 (LY294002) (Wako 社製) を添加した実験 (第 4 章 第 3 節) では、コントロールとして、等量の DMSO を添加した。なお、今回用いた全ての細胞は 37°C、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で無菌的に培養した。

第 2 節 発現コンストラクトの作製および遺伝子導入

細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin 発現誘導 ES・F9・P19CL6 細胞

DOX により細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin の発現誘導が可能なコンストラクトを作製するために、N 末端に IL-2 のシグナルペプチドと T7 タグを付加した syntaxin-4⁵⁷ と P-cadherin の cDNA (竹市雅俊先生から頂いたもの)⁶⁰ を PiggyBac-TET transposon プラスミド⁶¹⁻⁶⁴ の *Not* I と *Eco*R I 制限酵素サイトにクローニングした。また、このプラスミドには IRES (Internal ribosome entry site) の下流にネオマイシン耐性遺伝子が連結されているため、理論上、薬剤選択で生き延びた細胞株は外来遺伝子を発現する。この PB-TET-T7-syntaxin-4 -IRES-Neo および PB-TET-T7-P-cad-IRES-Neo それぞれのコンストラクトとともに、PB-CA-rtTA Adv と pCAG-Pbase⁶¹ の計 3 種のプラスミドを Lipofectamin 2000 (Life technologies 社製) にて ES、F9 および P19CL6 細胞に遺伝子導入した。2 日後 G418 (Gibco 社製) (終濃度: 500 µg/ml) および DOX (5 µg/ml) を添加し 1 週間セレクトオンした。その後 DOX を除き 5 日間培養したものをを用いて、DOX の有無による外来遺伝子の発現確認を免疫染色および qRT-PCR にて行った (ES-STstx4、F9-STstx4、F9-P-cad および P19-STstx4)。また、今回は単一コロニーの選択によるクローナルアーティファクトを避けるため、薬剤耐性を示した複数コロニーが混合した状態で培養した。

細胞外 syntaxin-4 および P-cadherin の一過性発現細胞

一過的に syntaxin-4 を発現した ES 細胞 (ES-T7stx4) を作製するために、pQCXIN Retroviral Vector (Invitrogen 社製) に T7 タグ付き syntaxin-4 が挿入されたコンストラクト (T7-stx4) (当研究室で作成済み)⁵⁷ を Lipofectamin 2000 にて ES 細胞に遺伝子導入し、3 日後免疫染色を行った。一過的に P-cadherin を発現した細胞 (P19-P-cad) は、上記の PB-TET-T7-P-cad-IRES-Neo および PB-CA-rtTA Adv を Lipofectamin 2000 にて P19CL6 細胞に遺伝子導入し、24 時間後 DOX を添加し、さらに 2 日後免疫染色および qRT-PCR を行った。

細胞外 syntaxin-4 の安定発現 F9 細胞

細胞外 syntaxin-4 を恒常的に発現する F9 細胞 (sig-stx4) を作製するために、N 末端に IL-2 のシグナルペプチドおよび T7 タグが付加された syntaxin-4 を pIRES2-DsRed2 vector (Clontech 社製) の DsRed を EGFP に置換したベクターに挿入したコンストラクト (sig-T7-syntaxin-4) (当研究室にて作成済み) をエレクトロポレーション法により F9 細胞に導入した。エレクトロポレーションは CUY21 Pro-Vitro 遺伝子導入装置 (Nepagene 社製) を用いて 125 mA、15 msec にて行い、3 日後に 500 µg/ml G418 (Gibco 社製) 含有 DH10 培地に交換し、1 週間薬剤選択を行った。また、コントロールとして外来遺伝子を挿入していない pQCXIN Retroviral Vector (empty vector) を導入した F9 細胞 (empty) を取得した。

第 3 節 細胞の蛍光免疫染色

コラーゲン A1 (新田ゼラチン社製) でコートしたガラス 4 穴チャンバースライド (Falcon 社製) に培養細胞を播き、染色前に上清を除いた。冷メタノールで 10 分間固定後、TBS (Tris を 50 mM、NaCl を 150.6 mM、CaCl₂ を 1.3 mM 含む水溶液を HCl で pH を 7.4 に合わせた溶液) で希釈した 2.5% スキムミルク (BD 社製) にて 1 時間ブロッキングした。TBS

にて洗浄 (5 分×3 回) 後、2. 5%スキムミルクを含む TBS で希釈した一次抗体を室温で 1 時間反応させた。TBS で洗浄 (5 分×3 回) 後、2. 5%スキムミルクを含む TBS で希釈した一次抗体を 1 時間反応させた。TBS にて洗浄 (5 分×3 回) 後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1:1000) (Sigma-Aldrich 社製) で染色し、封入した。なお F-actin と二重染色を行ったサンプルに関しては、0.1% tritonX-100 にて固定を行い、抗体の代わりに F-actin に直接結合する Alexa-flour488 標識 Phalloidin (Invitrogen 社製) を用いて染色した。サンプルは共焦点レーザー顕微鏡 A1 (Nikon 社製) もしくは CCD camera VB-7010 (Keyence, Japan 社製) 付きの蛍光顕微鏡 AXIOSHOP (Zeiss 社製) を用いて観察した。

一次抗体は、抗 P-cadherin 抗体 (1:200)、抗 T7 抗体 (1:500) (Novagen 社製)、 α -SMA (Sigma-Aldrich 社製) (1:500)、ECCD2 (竹市雅俊先生からの頂いた) (1:200) を使用した。二次抗体は、Alexa-flour488 標識抗ラビット IgG 抗体 (1:200) (Molecular Probe 社製)、Cy3 標識抗ラット IgG 抗体 (Sigma-Aldrich 社製) および Cy3 標識抗マウス IgG 抗体 (1:500) (GE Healthcare 社製) を使用した。

第 4 節 ウェスタンブロッティング

培養細胞を 1×SDS サンプルバッファーに懸濁し細胞溶解液を作製した。試料は 12%アクリルアミドゲルを用いて、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により展開後、イモビロン-P PVDFメンブレン (Millipore社製) に転写し、TBSにて希釈した 5%スキムミルクを用いて室温で 60 分間ブロッキングした。メンブレンはそれぞれHRP標識抗T7 抗体 (1:1000) (Novagen社製)、抗syntaxin-4 抗体 (1:200)、抗 α -SMA (Sigma-Aldrich社製) (1:500)、抗Akt抗体および抗リン酸化Akt抗体 (Ser473) (CST Japan) (1:500)、抗 β -actin抗体 (1:1000) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。抗P-cadherin抗体 (1:200) および抗E-cadherin抗体(1:200) は竹市雅俊先生から頂いた。二次抗体は、HRP標識抗マウスIgG

抗体 (1:1000) (GE Healthcare 社製)、HRP 標識抗ラビットIgG 抗体 (1:1000) (GE Healthcare社製) およびHRP標識抗ラットIgG抗体 (1:1000) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。最後に、ECL plus (GE Healthcare社製) を用いて検出した。なお、ポリクローナル抗 syntaxin-4 抗体はsyntaxin-4 の組換えタンパク質をラビットに免疫することにより当研究室で作製されたものを使用した⁵⁷。なお、定量化は解析ソフトImageJで行い、 β -actinで標準化した⁶⁵。

第 5 節 細胞表面のタンパク質のビオチン化による検出

6 穴細胞培養皿 (nunc 社製) に ES 細胞を播き、T7-stx4 を遺伝子導入した。2 日後、培養上清を捨て、PBS で 2 回洗浄後、PBS で希釈した 100 μ g/mL の sulfo-NHS-biotin (thermo 社製) を添加し、15 分間氷上で反応させた。反応液を捨て、DH10 培地で洗浄し反応を停止させた。細胞溶解緩衝液 (PBS 中に 1 % Triton X-100、0.1 % アジ化ナトリウム、プロテアーゼ阻害剤カクテルを混合した溶液) を添加した試料を、13,000 rpm、30 分間、遠心し上清を回収した。NeutrAvidin agarose beads (Invitrogen 社製) を添加し 1 時間転倒混和した後、遠心し、細胞溶解緩衝液で 3 回洗浄した後、1 \times SDS サンプルバッファーを添加した。目的のタンパク質をウエスタンブロッティング法により抗 syntaxin-4 抗体 (1:200) を用い検出した。

第 6 節 細胞表面 syntaxin-4 の免疫沈降

6 穴細胞培養皿 (falcon 社製) に ES 細胞を播き、T7-stx4 を遺伝子導入した。2 日後、培養上清を捨て、PBS で 2 回洗浄後、細胞溶解緩衝液に懸濁した。細胞溶解液を 13,000 rpm にて 30 分間遠心後、それぞれの上清のみを回収した。これらに、抗 syntaxin-4 抗体 (1:200) を添加し、1 時間反応させた。そこへプロテイン G ビーズ (GE Healthcare 社製) を

添加した。1 時間反応させた後、ビーズを細胞溶解緩衝液で洗浄し、1×SDS サンプルバッファーを添加後、ウエスタンブロッティング法にて HRP 標識streptavidin (Sigma-Aldrich 社製) (1:1000) および抗 T7 抗体 (1:1000) (Novagen 社製) にて検出した。

第 7 節 組換えタンパク質の作製

組換えタンパク質 Green Fluorescent Protein (GFP)、syntaxin-4 の Fragment1 (F1)、Fragment2 (F2) および Fragment3 (F3) は、TaKaRa Competent Cell BL21 (Takara 社製) に発現させた。これらの組み換えタンパク質を作製するために使用したコンストラクトは当研究室で既に作製されていた⁶⁶。GFP、F1 (Met1~Glu110)、F2 (Ala111~Arg197) および F3 (Gln198~Lys272) の各々の N 末端に His タグ (ヒスチジン 6 個) を付加したインサートをタンパク質高発現ベクター pET3a ベクター (Novagen 社製) の Eco RI サイトに組み込んだベクター (GFP-pET3、F1-pET3a、F2-pET3a および F3-pET3a) を用いた。各種プラスミドを用いて TaKaRa Competent Cell BL21 を形質転換後、アンピシリン含有 LB 培地に播き、30°C で 16 時間振盪培養後、終濃度 2 mM の IPTG (Takara 社製) によりタンパク質の発現誘導を行った。30°C で 2 時間振盪培養した後、菌液を 5,000 rpm、10 分間、4°C で遠心し大腸菌を回収した。lysozyme (Sigma-Aldrich 社製) を 2 mg/mL の濃度に添加した洗浄用緩衝液 (0.1 M NaH₂PO₄、0.01 M Tris-HCl [pH 8.0]) に回収した大腸菌を懸濁し、30 分間反応させた。-80°C で 1 時間凍結した後、室温で溶解する行程を 3 回繰り返した。菌液に 1 mg/mL の DNase (Sigma-Aldrich 社製) を 100 μL 添加し 1 時間 37°C に置いた。菌液の粘性がなくなったところで 8 M urea 溶液 (洗浄用緩衝液に urea を 8 M の濃度に添加した溶液) を加え氷上で超音波破碎した。得られた破碎液は 7,000 rpm で 30 分間、常温で遠心上清を回収した。Ni-NTA-agarose カラム (Qiagen 社製) を PBS (-) 溶液で平衡化した後、細胞溶解液の上清を通し、His タグ融合タンパク質をカラムに吸着させた。8M urea 溶液で洗浄後、イミダゾール溶液 (8 M urea に 250 mM の濃度にイミダゾールを添加し、pH8.0 に含

わせた溶液) で溶出した。溶出したタンパク質溶液を透析チューブ (Spectrum Labs 社製) に入れ、1 L の PBS (-) で 12 時間ずつ、合計 3 回 PBS (-) を交換し透析した。透析したタンパク質溶液を回収し、13,000 rpm、30 分間、4°C で遠心し、上清 (可溶性画分) と沈殿 (不溶性画分) に分離し、可溶性画分を実験に使用した (組換えタンパク質 GFP、F1、F2 および F3)。

第 8 節 RT-PCR および qRT-PCR

培養細胞を 12 穴プレート (falcon社製) に播種し、翌日 RNeasy Mini Kit (QIAGEN社製) を用いて RNA 抽出を行った。得られた RNA 溶液に、RNA PCR Kit (AMV) (タカラバイオ社製) に添付のプロトコルに従い、逆転写酵素および Random primer を含む逆転写用試薬を加えて、65°C、5 分間熱処理を行った後に、逆転写反応により mRNA を鋳型とする cDNA を合成した。次いで、逆転写反応後溶液に、以下のプライマーセット、T7-syntaxin-4 (5'-GGG GCG GCC GCA TGG CTA GCA TGA CTG GTG GAC-3'、5'-TTT TAG CTG CGC CCG GAC C-3') および gapdh (5'-GGA TTT GGC CGT ATT GG-3'、5'-TCA TGG ATG ACC TTG GC-3') と Quick Taq HS Dye Mix (TOYOBO社製) を用いて最終液量を 25 μ L となるよう調整し、94°C 10 秒間、55°C 30 秒間、68°C 1 分間を 1 サイクルとして 30 サイクルの PCR をサーマルサイクラーを用いて行った。PCR 反応後溶液をエチジウムブロマイド入り 2.0% アガロースゲルにより電気泳動を行い、トランスイルミネーターを用いて UV 照射下で写真撮影を行った。

qRT-PCR では、同上の条件で精製した cDNA と FastStart Essential DNA Green Master (Roche 社製) を最終液量 10 μ L となるように調整し、LightCycler Nano system (Roche 社製) を用いて PCR を行った (45 サイクル)。なお、定量化した全ての遺伝子発現はインターナルコントロールである β -actin の値で標準化した。用いたプライマーセットを以下に

示す (表 1)。

表 1: qRT-PCRで使したプライマーセット

Target	Forward	Reverse
E-cadherin	GCTCTCATCATCGCCACAG	GATGGGAGCGTTGTCATTG
P-cadherin	GCACTGCTGACCCTTCTACTG	GGGCTCTTTGACCTTCTCT
Brachyury	CCACAAAGATGTAATGGAGGAAC	GAACAAGCCACCCCAT
α SMA	CTCTCTCCAGCCATCTTTCAT	TATAGGTGGTTTCGTGGATGC
MHC	GAAGGAGGAGGAGCTTCAGG	TCCTTGAAGCCTTTTCAGACTC
BMP4	GAGGAGTTTCCATCACGAAGA	GCTCTGCCGAGGAGATCA
Tuj1	CCCACTCCATGTGAGTCCA	GCAACATAAATACAGAGGTGGCTA
Nanog	TTCTTGCTTACAAGGTCTGC	CAGGGCTGCCTTGAAGAG
Oct3/4	GTTGGAGAAGGTGGAACCAA	CTCCTTCTGCAGGGCTTTC
Slug	CATTGCCTTGTGTCTGCAAG	AGAAAGGCTTTTCCCCAGTG
Snail	CTTGTGTCTGCACGACCTGT	CAGGAGAATGGCTTCTCACC
Foxc2	GCAACCCAACAGCAAACCTTC	GACGGCGTAGCTCGATAGG
Vimentin	TGCGCCAGCAGTATGAAA	GCCTCAGAGAGGTCAGCAAA
Cofilin	TCCTTCTTCTCGTCCCAGTG	TCATTCACTGTAACCTCAGATGC
Zscan4	GACTGAACTATCTAACATCCTCAGCA	TTGCAACATTCTTCTCTCTTTGA
Gata4	GGAAGACACCCCAATCTCG	CATGGCCCCACAATTGAC
AFP	TGGATGTCAGGACAATCTGG	GCAGCTTTGCTTGGACAGT
Zeb1	ACCCCTTCAAGAACCGCTTT	CAATTGGCCACCACTGCTAA
Gapdh	TGACCACAGTCCATGCCATC	GACGGACACATTGGGGGTAG
β -actin	CCTCACCTCCCAAAGC	GTGGA CT CAGGGCATGGA

第 9 節 細胞表面タンパク質の免疫蛍光染色法による検出

コラーゲンA1 (新田ゼラチン社製) でコートした 4 穴チャンバースライドに 50%の細胞密度で細胞を播種し、37°C、5%二酸化炭素濃度を維持する炭酸ガス恒温培養装置中で 2 日間培養した。培地中に一次抗体を添加し、1 時間 37°Cにインキュベートした後に培養上清を除去し、TBSで洗浄 (5 分×3 回) 後、4% PFA (PBS中に 4%となるようPFAを混合しpHを 7 から 8 に調整した溶液) で 10 分間固定した。さらに、TBSで洗浄 (5 分×3 回) 後、冷メタノールで 10 分間固定した。二次抗体をTBSで希釈した 5%スキムミルクで、1 時間反応させた。TBSにて洗浄 (5 分×3 回) 後、DAPI (1:1000) で核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡A1 もしくは CCD camera VB-7010 (Keyence, Japan 社 製) 付きの fluorescence microscope AXIOSHOP (Zeiss社製) を用いて染色状況を観察した。以下、免疫染色に用いた抗体と希釈率を示す。一次抗体は、抗syntaxin-4 抗体 (1:100)、抗T7 抗体 (Novagen社製) および抗 β -actin抗体 (1:100) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。二次抗体はAlexa-flour 488 標識抗ラビットIgG抗体 (1:200) (Molecular Probe社製)、Cy3 標識抗マウスIgG抗体 (1 :200) (Millipore社製) を使用した。

第 10 節 細胞外 syntaxin-4 による細胞形態の解析

細胞形態の観察のために、F9-STstx4、F9-P-cad、ES-STstx4 および P19-STstx4 を DOX 有り無しで 2 日間 (F9-STstx4、F9-P-cad)、3 日間 (ES-STstx4 and P19-STstx4) 培養した。長さ 10 μ m 以上の仮足が 3 本以上伸展している細胞の数を計測した。P19-STstx4 に関しては、1 細胞の占める面積の割合を解析ソフト ImageJ を用いて定量化した⁶⁵。

第 11 節 RNA シーケンス解析

細胞外 syntaxin-4 により発現量が変化する遺伝子 (differentially expressed (DE) genes) を調べるために、RIKEN CLST の分子配列比較解析ユニットにて次世代シーケンサーによる解析を行った。ES-STstx4 および親株の ES 細胞を DOX 有り無しで 3 日間培養した後 RNA を回収し、発現変動遺伝子を網羅的に解析した。ES-STstx4 で変化した遺伝子のうち親株で変化した発現量を差し引いて、細胞外 syntaxin-4 による変動遺伝子を 138 個見出した (発現変動率 2 倍以上かつ有意水準 q-value 0.01 以下のもの)。

第 12 節 Zscan4 遺伝子のノックダウン

Zscan4 遺伝子を ES 細胞において発現抑制するために、先行研究で報告されていたオリゴヌクレオチド siRNA (Nippon Gene 社製) を細胞に導入した³⁷。Zscan4 の Exon II に対する 4 本の siRNA (siRNA Zscan4 #1-4) (dTdT はオーバーハング⁶⁷) とコントロールである Hilyte488-labeled NEGS/NEGAS (Nippon Gene 社製) を 12 穴細胞培養皿に播種した ES 細胞にそれぞれ Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen 社製) を用いて導入した。3 日後 Zscan4 および P-cadherin の mRNA 発現量を qRT-PCR にて解析した。以下に用いた配列および Zscan4 siRNA のターゲット配列を示す (表 2)。

siRNA Zscan4#1

5' guagcgauaugaggagauudTdT 3'
3' dTdTcaucgcuaucuccucuaa 5'

siRNA Zscan4#2

5' gaccaacaauuuagaguuudTdT 3'
3' dTdTcugguuguuaaaucucuaa 5'

siRNA Zscan4#3

5' caccaagugcucagcuaaadTdT
3' dTdTgugguucacgagucgauuu 5'

siRNA Zscan4#4

5' gcugcaaagucucuggaagdTdT 3'
3' dTdTcgacguucagagaccuuc 5'

Control siRNA

Hilyte 488 -labeled NEGS/NEGAS
(universal negative control)

表 2: siRNA Zscan4 #1-4 のターゲット配列

Name of siRNA	Target position on cDNA (bp)	Target Sequences
siRNA Zscan4#1	514-532 (exon II)	gtagcgatatgaggagatt
siRNA Zscan4#2	236-254 (exon II)	gaccaacaatttagagttt
siRNA Zscan4#3	304-322 (exon II)	caccaagtgctcagctaaa
siRNA Zscan4#4	362-380 (exon II)	gctgcaaagtctctggaag

第 13 節 データ処理

定量結果の有意差検定には少なくとも 3 回の再現性確認実験とStudentのt検定、もしくはMann-WhitneyのU検定を用い、 $P < 0.05$ を有意水準とした。

第4章 結果

第1節 マウスES細胞におけるsyntaxin-4の細胞外局在

ES細胞表面でのsyntaxin-4の自発的な発現

未分化維持因子LIFを添加した状態で培養したES細胞を用い、内在性syntaxin-4の細胞外提示について免疫蛍光染色にて検証した。膜透過処理を行った後に一次抗体を作用し、細胞内外すべてのタンパク質を染色したもの (Total) では、細胞内タンパク質である β -actinとともにsyntaxin-4がコロニー内で均一に局在していることがわかった (図 1-1 A)。一方、膜透過処理をする前に一次抗体を作用し、細胞外のタンパク質を染色したもの (Cell surface) では、細胞表面に提示されたsyntaxin-4のみが染色された。さらに、その発現量は一つのコロニー内でも個々の細胞で大きく異なっており、syntaxin-4は未分化維持培地中のES細胞表面で、不均一な発現パターンを示すことが明らかとなった (図 1-1 B)。

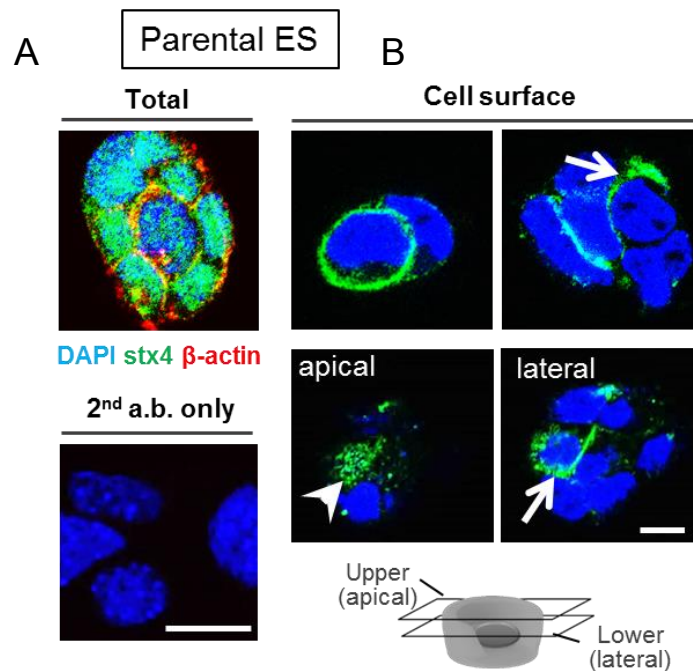


図 1-1: ES 細胞表面での syntaxin-4 の自発的な発現

A: 上: 膜透過処理後に一次抗体として syntaxin-4 (stx4) 抗体および β -actin 抗体を作用し、細胞内外のタンパク質を染色した (Total)。

下: 二次抗体のみの染色

B: 上: 膜透過処理前に一次抗体を作用し、細胞外のみタンパク質を染色した (Cell surface)。

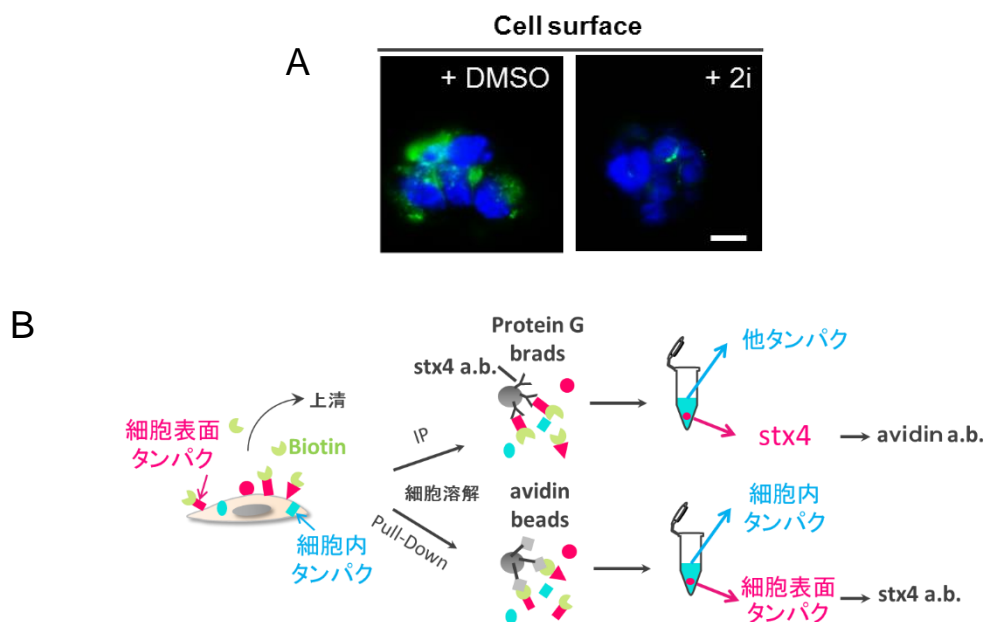
下: ひとつのコロニーの Apical 面と Lateral 面に焦点を当てた染色図

矢印および矢じりは syntaxin-4 の局在を示す。

内在性 syntaxin-4 (緑)、 β -actin (赤)、 DAPI (青)、 スケールバー 10 μ m

MEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤による細胞外syntaxin-4 の発現変化

次に、マウスES細胞を強力的に均一な未分化状態 (Ground state) で維持する作用を持ったMEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤 (2i)⁴ を添加した場合の細胞外syntaxin-4 の局在を確認した。細胞表面の免疫染色にてコントロールのDMSOと比較したところ、その細胞外提示は抑制される傾向であることが分かった (図 1-2 A)。また、免疫染色で見られた、2iの作用によるsyntaxin-4 の細胞外提示の抑制を検証するために、T7 タグ付きのsyntaxin-4 (シグナルペプチド無し) を一過的に発現させたES細胞に 2iを作用させ、細胞表面タンパクのビオチン化を行った。その後、一つはsyntaxin-4 抗体で免疫沈降 (IP) を行い、T7 抗体で細胞内外のsyntaxin-4 (Total) と、ストレプトアビジン抗体で細胞表面のsyntaxin-4 (Cell surface) を検出した。もう一つは、NeutrAvidin agarose beadsを用いてプルダウンアッセイ (Pull-Down) を行い、syntaxin-4 抗体で検出した (図 1-2 B)。結果として、どちらの方法からも細胞外表面におけるsyntaxin-4 の発現量は 2iによって減少することが明らかとなった (図 1-2 C,D)。さらに、プルダウンアッセイにおける発現量の定量化を行ったところ、2iによる有意なsyntaxin-4 の細胞外提示抑制効果が見られた (図 1-2 D)。



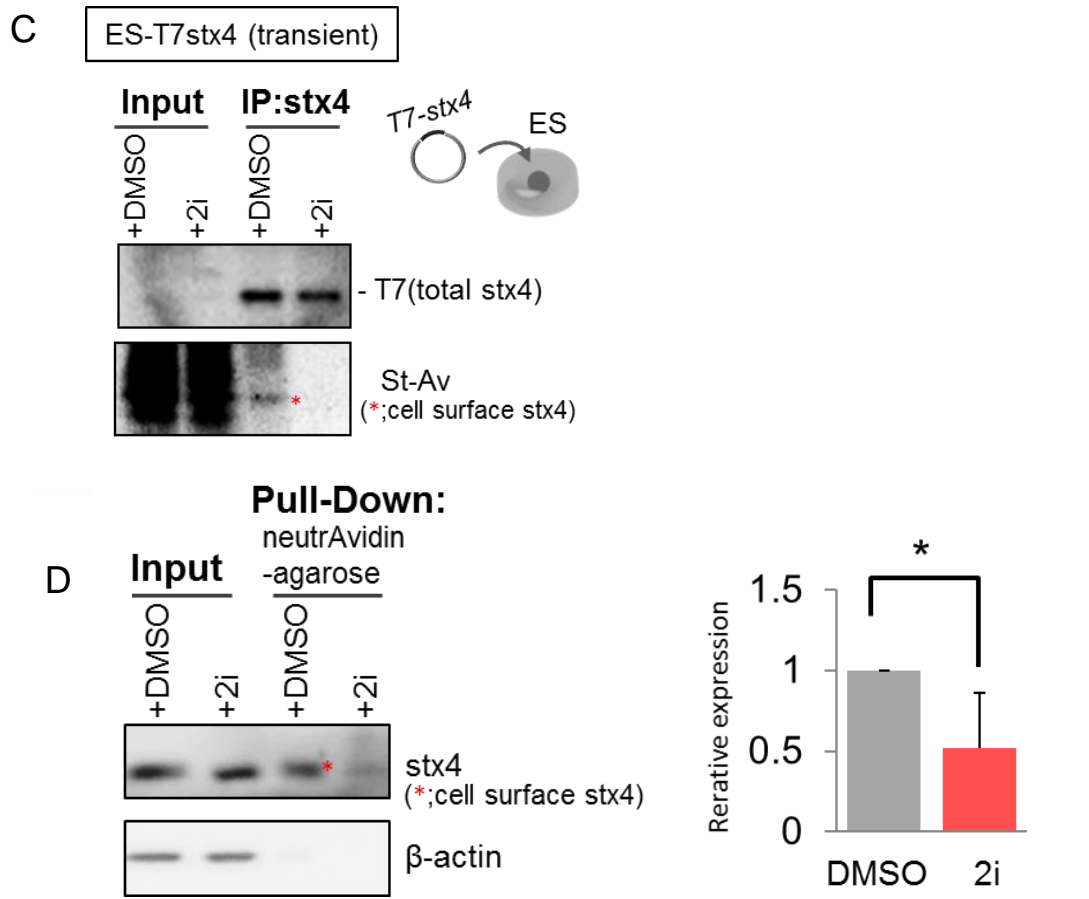


図 1-2: MEK1/2 および GSK3β の阻害剤 (2i) による細胞外 syntaxin-4 の発現量変化

A: 2i (MEK1/2 および GSK3β の阻害剤) を添加したときの syntaxin-4 の局在を膜透過処理前に一次抗体を作用した細胞外染色にて調べた (Cell surface)。

コントロールとして DMSO を使用した。

内在性 syntaxin-4 (緑)、β-actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μm

B: 免疫沈降 (IP) およびプルダウンアッセイ (Pull-Down) の概要

C: syntaxin-4 抗体で免疫沈降を行い、細胞内外 syntaxin-4 (Total) を T7 抗体で、細胞外 syntaxin-4 (Cell surface) を Strept avidin (St-Av) 抗体で検出した。

D: 左:NeutrAvidin agarose beads でプルダウンアッセイを行い、syntaxin-4 抗体と β-actin 抗体 (インターナルコントロール) で検出した。

右:プルダウンアッセイによる細胞外 syntaxin-4 の発現量を β-actin の発現量で割り (Relative expression)、定量化した。N=3 *P<0.05

細胞外syntaxin-4 の発現細胞の割合

次に、LIF添加時に不均一な発現パターンを示したsyntaxin-4 の細胞外提示について定量化するために、T7 タグ付きのsyntaxin-4 を強制発現したES細胞を用いて免疫染色を行った。まず細胞膜透過処理を行った後にT7 抗体にて遺伝子導入効率を算出した、約 30%であることをたしかめた (図 1-3 A,C)。一方、同じ時に同条件で培養したサンプルを膜透過処理前にT7 抗体で検出したところ、細胞表面にsyntaxin-4 を発現していた細胞は約 6%であった (図 1-3 B,C)。このことから、遺伝子導入によって細胞内に多量にsyntaxin-4 が発現している細胞を 100%としたとき、そのうちの約 20%の細胞が膜表面にsyntaxin-4 を提示することが明らかとなった。

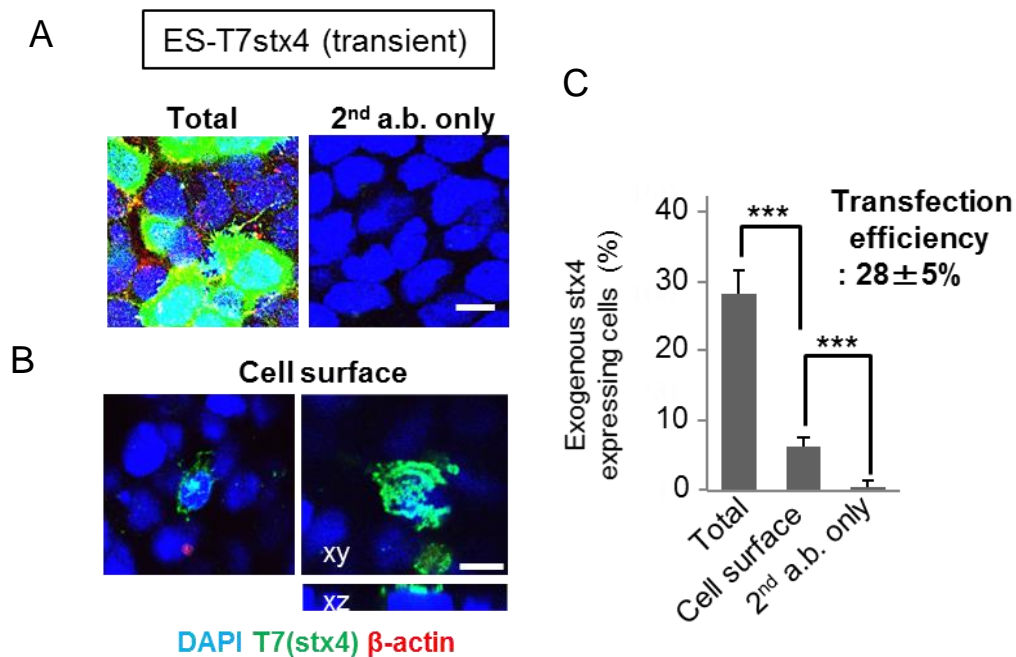


図 1-3: 細胞外 syntaxin-4 の発現量変化

T7-タグ付きの syntaxin-4 を一過的に発現させた ES 細胞 (ES-T7stx4) を LIF 存在下で培養し、免疫染色を行った。

A: 左:膜透過処理後に一次抗体として T7 抗体および β-actin 抗体を作用し、細胞内外のタンパク質を染色した(Total)。

右:二次抗体のみの染色

B: 左:膜透過処理前に一次抗体を作用し、細胞外のみタンパク質を染色した(Cell surface)。

右:同様に細胞外 syntaxin-4 を染色したものを XY 軸と XZ 軸で同時に撮影した図

内在性 syntaxin-4 (緑)、β-actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μm

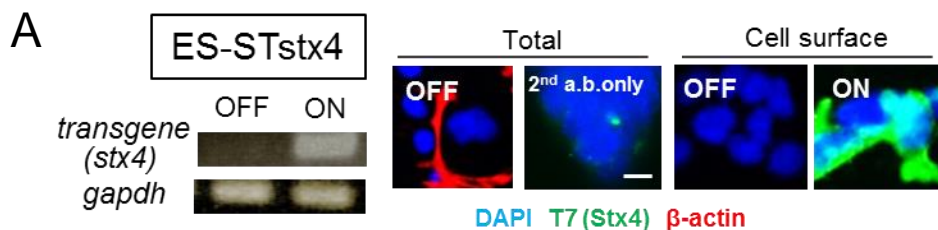
C: Total、Cell surface および二次抗体のみで、T7 抗体によって染色された細胞数を一視野あたりの細胞数で割った割合。Total からトランスフェクション効率(28±5%)を算出した。

N=18 ***P<0.001

第 2 節 細胞外syntaxin-4 による形態・分化への影響

細胞外syntaxin-4 によるES細胞の形態への影響

これまでの結果として、未分化なES細胞表面でsyntaxin-4 は不均一に発現しており、さらにその発現は未分化状態を均一化する 2il によって抑制されることが明らかとなった。これらは、序論で述べたように、ES細胞の分化状態の不均一性にsyntaxin-4 が関わる可能性を示していると考えた。そこで次に、細胞外に提示されたsyntaxin-4 が多能性幹細胞であるES細胞にどのような影響を与えるのか、形態と分化に焦点を当て検討することとした。はじめに、細胞外に強制的に提示させるためのシグナルペプチドとT7 タグを付加したsyntaxin-4 をDOX (Doxycycline) によって発現誘導可能な細胞 (ES-STstx4) を樹立した。RT-PCRと免疫染色を用いて導入したsyntaxin-4 の発現確認を行った後に (図 2-1 A)、LIF添加培地にてsyntaxin-4 の発現誘導なしの細胞 (OFF) とDOX添加により発現を誘導した細胞 (ON) の形態について比較した。その結果、発現誘導なしの細胞では、親株のES細胞と同様に細胞同士が密に接着したコロニーを形成するのに対し、細胞外syntaxin-4 を発現誘導した細胞は、細胞形態が扁平化するとともに仮足が形成され、さらに細胞間の接着は弱まった形態を示した (図 2-1 B)。



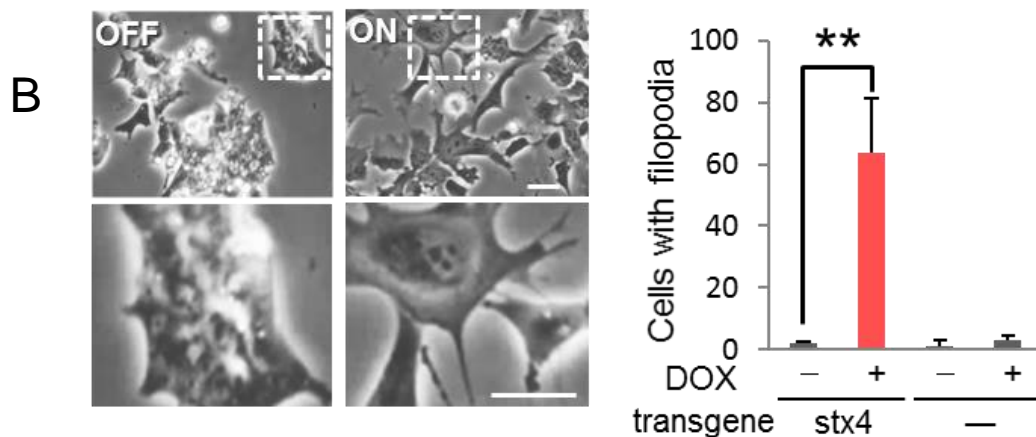


図 2-1: 細胞外 syntaxin-4 の発現確認とその形態への影響

A: 外来性 syntaxin-4 の発現確認

細胞外に提示させるためのシグナルペプチドおよび T7 タグを付加した syntaxin-4 のコンストラクトを ES 細胞に導入した syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞 (ES-STsx4) に DOX を添加して 2 日後、発現確認を行った。DOX 非添加 (遺伝子発現 OFF)、DOX 添加 (遺伝子発現 ON)、

左: RT-PCR インターナルコントロールとして *gapdh* を用いた。

右: 免疫染色 細胞内外の染色 (Total)、細胞外染色 (Cell surface)

T7 (stx4) (緑)、 β -actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μ m

B: 細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態変化

左: DOX を添加して 2 日後に細胞形態を観察した。下の写真は上の写真の拡大図

右: 細胞仮足形成細胞数の定量化 N=4、** P<0.01 スケールバー 20 μ m

E- to P-cadherin スイッチへの影響

未分化維持因子 LIF の存在下で細胞外 syntaxin-4 により誘導される形態変化は、上皮間葉転換 (EMT) で見られる変化に近いことから、次に EMT でよく観察される cadherin スイッチについて検証した。一般的な EMT でよく見られる cadherin スイッチは E- to N-cadherin スイッチであるが⁶⁸、後述の網羅的遺伝子解析結果から syntaxin-4 による N-cadherin の発現量変化は認められなかった (参考資料 1-3)。そこで、近年癌細胞などの EMT で見られている E- to

P-cadherinスイッチについて検証するために³³、ES-STstx4 細胞を用いてE-cadherinとP-cadherinの発現量を調べたところ、E-cadherinはタンパク質レベルでの発現減少が確認された一方で、P-cadherinはタンパク質およびmRNAの両方が発現上昇することが分かった(図 2-2)。

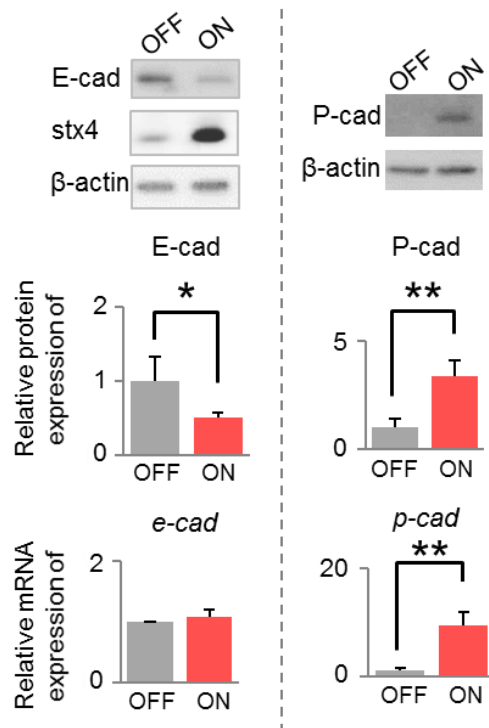


図 2-2: 細胞外 syntaxin-4 による E- to P-cadherin スイッチへの影響

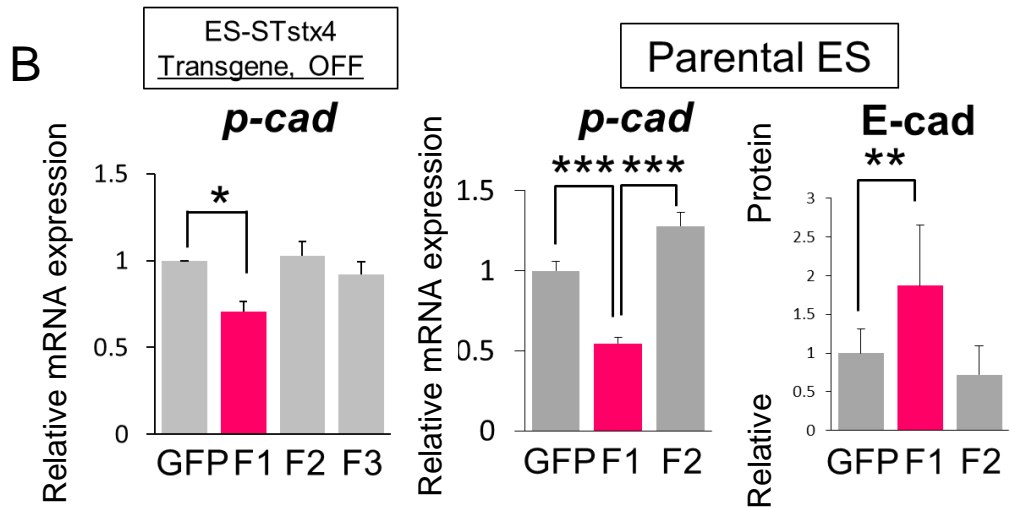
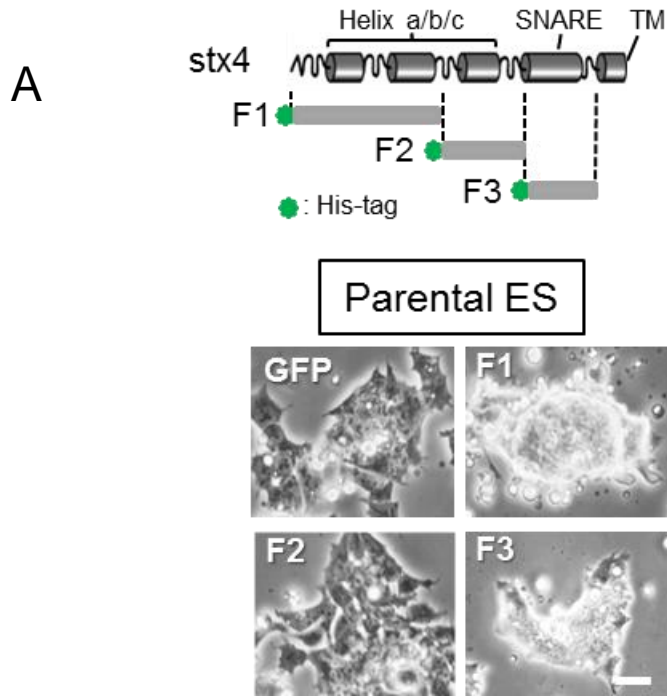
syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞に DOX を添加して 3 日後タンパク質と RNA を回収し E-cadherin と P-cadherin の発現量をそれぞれ解析した。

上:ウエスタンブロットティングのメンブレン 中・下:タンパク質および mRNA 発現量の定量化

左: E-cadherin の発現量 N=4、*P<0.05、 右:P-cadherin の発現量 N=3、** P<0.01

syntaxin-4 フラグメントによる細胞外syntaxin-4 の機能の検証

これまでに、syntaxin-4 は未分化なES細胞表面に不均一に発現すること、また、細胞外 syntaxin-4 発現誘導ES細胞であるES-STstx4 を用いた実験からsyntaxin-4 はES細胞の形態の扁平化とE- to P-cadherinスイッチを引き起こすことが判明した。しかし、今回示された syntaxin-4 の効果が外来遺伝子を導入したことによるアーティファクトである可能性を払拭できていない。先行研究において、syntaxin-4 のフラグメントが乳腺上皮細胞の細胞外 syntaxin-4 の活性を抑制することが示されていたことから⁶⁶、同フラグメントの組み換えタンパク質を作成し、それらのアンタゴニスト活性について検討した。syntaxin-4 のHelix aおよびbを含むフラグメント1 (F1)、Helix cを含むフラグメント 2 (F2)、SNAREドメインを含むフラグメント 3 (F3) の組み換えタンパク質をそれぞれ作成し、親株のES細胞に添加して細胞形態について観察した。その結果、F1 およびF3 添加した細胞はコントロールであるGFPと比較して細胞が丸くなり密なコロニーを形成する、細胞外syntaxin-4 を発現誘導した際と逆の作用が示された (図 2-3 A)。次に、ES-STstx4 のDOX非添加時の*p-cadherin*の発現量を解析したところ、F1 のみで発現抑制効果が見られた (図 2-3 B)。また、親株のES細胞を用いて E-cadherinおよび*p-cadherin*の発現量を解析したところ、これについてもsyntaxin-4 の発現誘導時とは逆に、F1 によってE-cadherinの発現量は上昇し、*p-cadherin*の発現量は減少した (図 2-3 B)。さらに、ES-STstx4 にDOXを添加して強制的にsyntaxin-4 を細胞表面に発現させた際の各フラグメントの効果を調べた。その結果、syntaxin-4 によって扁平化した細胞形態がF1 により抑制され、*p-cadherin*の発現量も減少することが示された (図 2-3 C)。以上の結果より、今回作製したF1 は細胞外syntaxin-4 の効果を阻害するアンタゴニストとして作用すること、ならびに細胞外syntaxin-4 の強制発現による効果は遺伝子導入によるアーティファクトではないことが判明した。



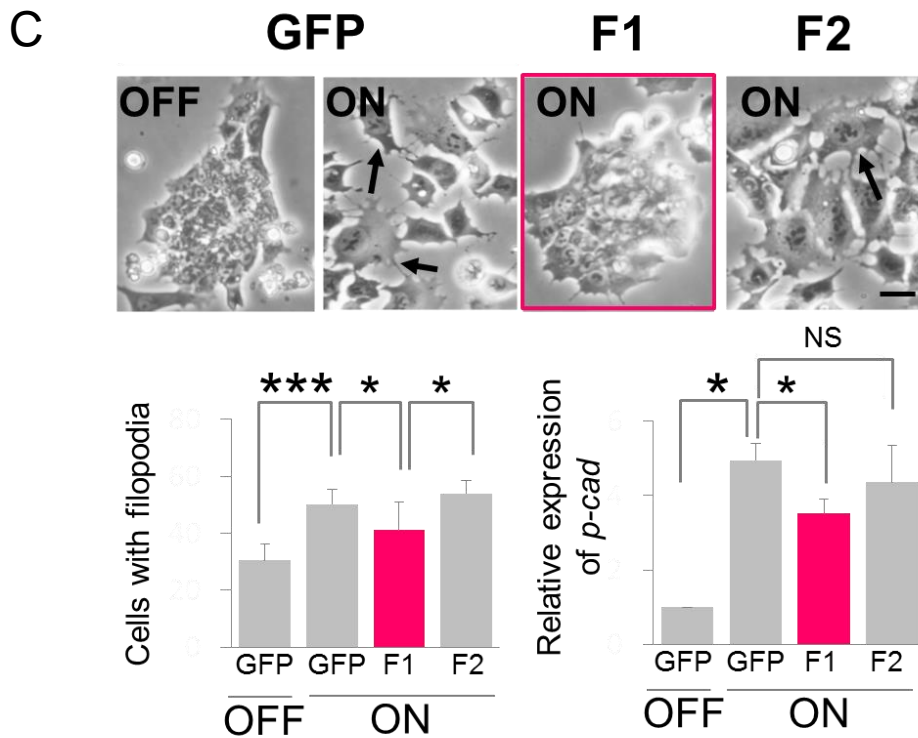


図 2-3: syntaxin-4 フラグメントによる形態と cadherin への効果

syntaxin-4 のフラグメントを各細胞に 50 ng/ml 添加し 2 日間培養した後の細胞形態を観察し、タンパク質および RNA を回収した。

A: 上: 各フラグメントの模式図

下: 親株の ES 細胞 (Parental ES) に各フラグメントを添加した際の形態 (矢印: 仮足形成細胞)

B: 左: ES-STstx4 (DOX 非添加) の P-cadherin の mRNA 発現量

右: 親株の ES 細胞における P-cadherin (mRNA) と E-cadherin (Protein) の発現量

C: 上: ES-STstx4 の各フラグメントによる形態への効果

下: 仮足形成細胞数の割合および P-cadherin (mRNA) の発現量

スケールバー 20 μ m N=3, * P>0.05 ** P<0.01 *** P<0.001

細胞外syntaxin-4 によるEMT関連因子及び中胚葉分化への影響

細胞外syntaxin-4 によりEMT様の形態変化とE- to P-cadherinスイッチが誘導されたことから、次に、典型的なEMTの関連マーカーおよび分化マーカーの発現について調べることにした。まず、EMT関連マーカーとしてE-cadherinを転写レベルで抑制する転写因子Snail、Slug、Foxc2 や、EMTで発現上昇する中間系フィラメントのVimentin、およびF-actinの脱重合を促進するCofilinのmRNA の発現量を調べた^{24,69-71}。結果として、細胞外syntaxin-4 を発現誘導しても、EMT関連転写因子やVimentinの発現はほとんど変化しない、もしくは減少することがわかった (図 2-4 A)。このことから、細胞外syntaxin-4 によって誘導された形態変化およびcadherinスイッチは、典型的なEMTとは異なる可能性が考えられる。つづいて、多能性幹細胞の形態変化と密接に関与することが知られている分化への影響を調べた。各方向への分化マーカーのmRNA量を検討した結果、細胞外syntaxin-4 はBrachyury、 α SMA、MHCなど中胚葉系列の分化を促進するとともに、未分化維持因子のNanogを抑制することが分かった。その他、外胚葉マーカーのTuj1 やbmp4などは変化しなかった。このことから、細胞表面に提示されたsyntaxin-4 により中胚葉系列の細胞に分化が誘導されることが明らかとなった (図 2-4 B)。

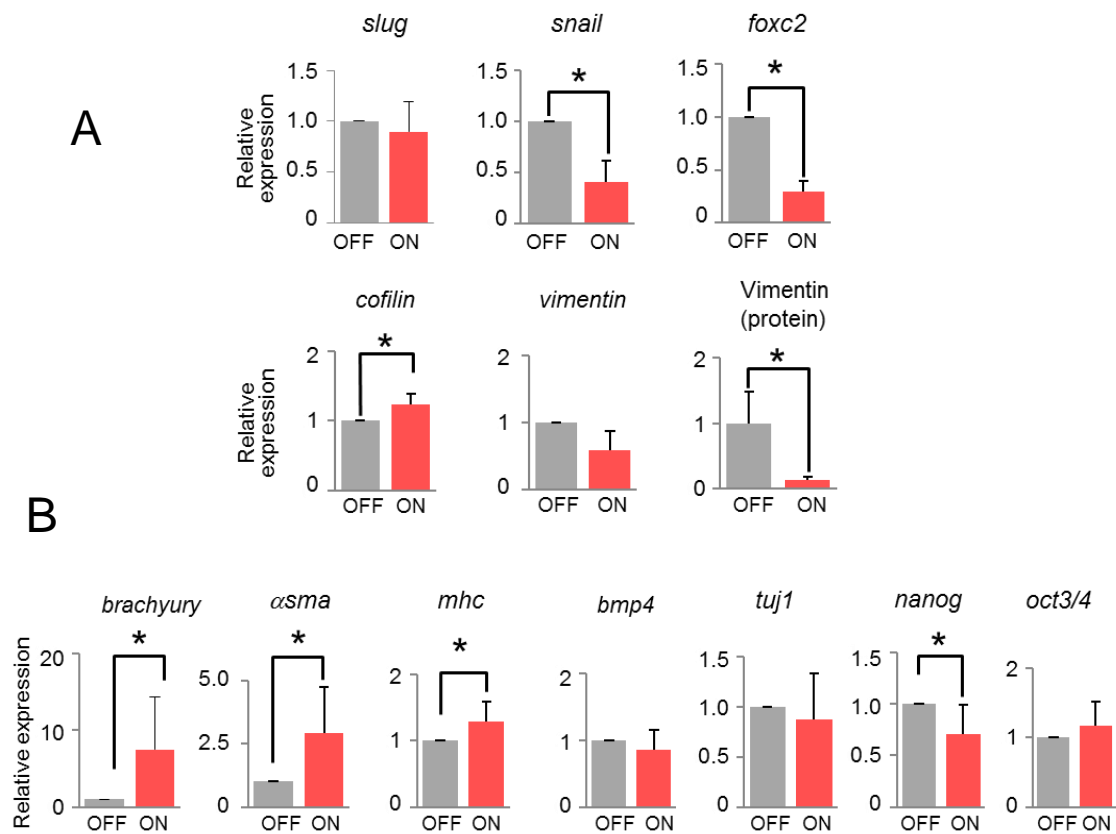


図 2-4: 細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子と分化マーカーへの影響

A: EMT 関連転写因子 Slug、Snail、Foxc2 および細胞骨格マーカーCofilin や Vimentin の mRNA レベルを qRT-PCR にて調べた。また、Vimentin についてはタンパク質発現量も定量化した。

B: 各分化マーカーおよび多能性関連マーカーについての mRNA 発現量を調べた。

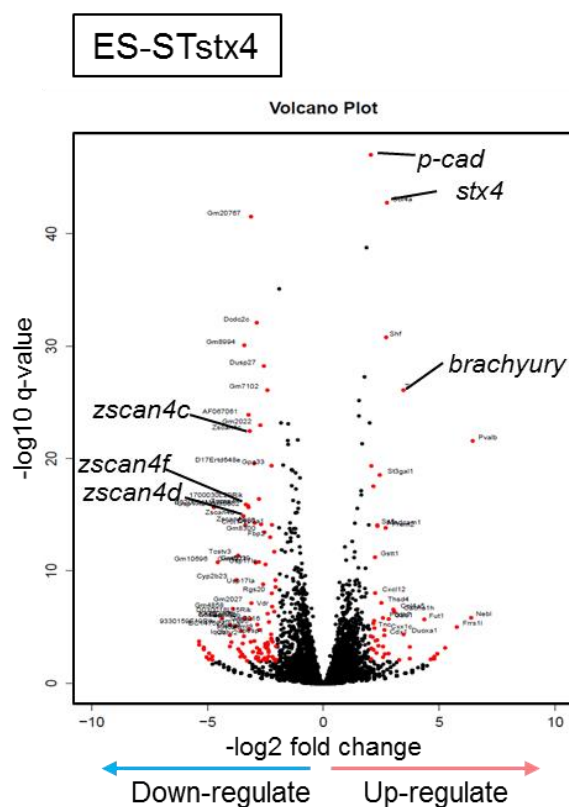
N = 4 *: P < 0.05

第3節 細胞外syntaxin-4 の下流因子の同定

次世代シーケンサーによる細胞外syntaxin-4 の下流因子の探索

細胞外syntaxin-4 のさらなる下流因子の手がかりを探るため、ES-STstx4 を用いて次世代シーケンサーにてトランスクリプトーム解析を行った。その結果細胞外syntaxin-4 を発現誘導することで*p-cadherin*や*brachyury*などこれまで明らかとなった因子の他に未分化関連因子*zscan4* の発現が抑制されることがわかった (図 3-1 A)。遺伝子発現変動が4倍以上かつ有意水準のQ-valueが0.01以下の遺伝子について、解析ソフトPANTHERを用いて機能分類を行ったところ、細胞間結合因子や触媒活性をもつ因子、さらに転写因子などが変動することが分かった (図 3-1 B)。

A



B

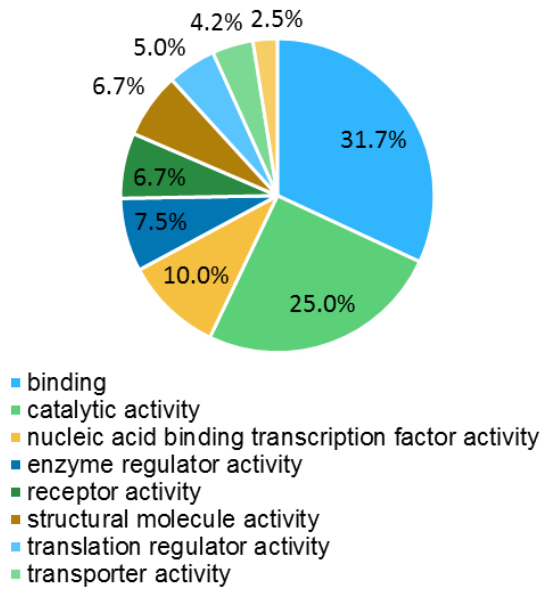


図 3-1: 細胞外 syntaxin-4 によって変動する遺伝子の網羅的解析

A: ES-STstx4 を用いて DOX 添加により発現を誘導した細胞で変化する遺伝子を Volcano Plot 形式で示した。横軸中央の 0 から右側が発現上昇した遺伝子、左側が減少した遺伝子を示す。縦軸は有意水準を示し、上部ほど高い有意水準で変動した遺伝子であることがわかる。また赤色で示したドットは発現変動が 4 倍以上かつ有意水準 q-value が 0.01 以下の遺伝子を示す。

B: 変動遺伝子の機能的分類

解析ソフト PANTHER-GO-Slim を用いて、A の赤色で示した発現変動遺伝子を機能分類した。(binding は主に Protein binding および Nucleotide binding を示す)

細胞外syntaxin-4 と未分化状態安定化因子Zscan4 との関係

次に、機能的分類のうち転写因子のグループに含まれた未分化状態の安定化に寄与するとされるZscan4 ファミリーに着目した。この遺伝子は、6 つのパラログ (a-f) をもつ遺伝子で、ES細胞では未分化状態を保ったまま自己増殖するために必要とされている^{1,37}。今回の次世代シーケンサーの結果、このZscan4 ファミリー全てがsyntaxin-4 発現誘導時に抑制されていることが分かった。さらに、qRT-PCRにてmRNA量を解析したところ、同様に*zscan4* の発現量の減少が見られた (図 3-2 A)。そこで、Zscan4 が細胞外syntaxin-4 の下流因子であることを確かめるため、親株ES細胞を用いて*zscan4* をノックダウンした際に、syntaxin-4 で発現上昇することが示された*p-cadherin* (図 2-2) の発現について調べることにした。その結果、siRNAで*zscan4* を抑制すると、*p-cadherin*が発現上昇することがわかった (図 3-2 B)。しかし、*zscan4* ノックダウンによる*p-cadherin*の発現上昇度合いは、細胞外syntaxin-4 を発現誘導したときと比較し小さかったことから、Zscan4 は細胞外syntaxin-4 の下流因子ではあるが、その効果は一部であることが示された。

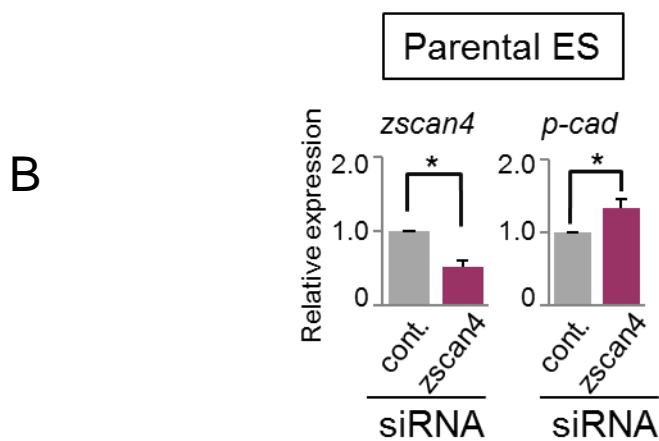
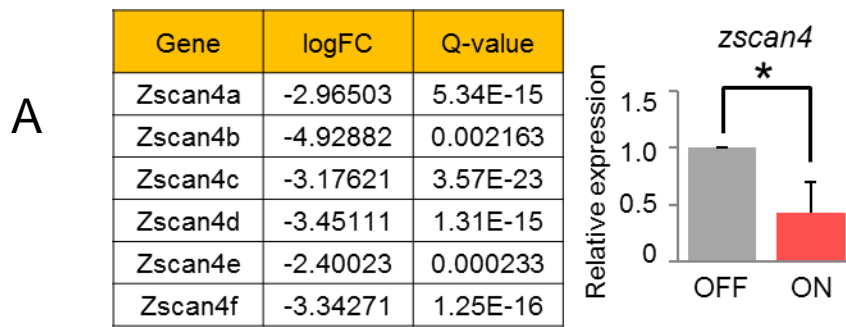


図 3-2: syntaxin-4 による Zscan4 への影響

ES-STstx4 を用いて DOX 添加により Zscan4 の発現変化を解析した。

A: 左: 次世代シーケンサーによる zscan4 ファミリーの発現変動

右: qRT-PCR による zscan4 の発現変動解析 N=3 * P<0.05

B: siRNA を用いて zscan4 をノックダウンした際の zscan4 および p-cadherin の発現変化を qRT-PCR を用いて解析した。 N=3 * P<0.05

細胞外syntaxin-4 によるPI3K/Aktシグナルへの影響

Zscan4 ファミリーはES細胞において、PI3K/Aktシグナルによって正に制御されていることがわかっている⁴¹。そこで、細胞外syntaxin-4 の下流シグナルとの関わりを調べるため、活性化型のAktの発現量を調べた (図 3-3 A)。その結果、細胞外syntaxin-4 により、リン酸化Aktの量は有意に減少することがわかった。さらに、親株のES細胞にPI3Kの阻害剤 (LY294002)を添加し、これまで判明したsyntaxin-4 の下流因子、*p-cadherin*および*brachyury*への影響を調べた。結果として、PI3K阻害剤の濃度依存的に*zscan4* の発現量は減少し、反対に*p-cadherin*は上昇することがわかった (図 3-3 B)。また、*brachyury*に関して効果は見られなかった。

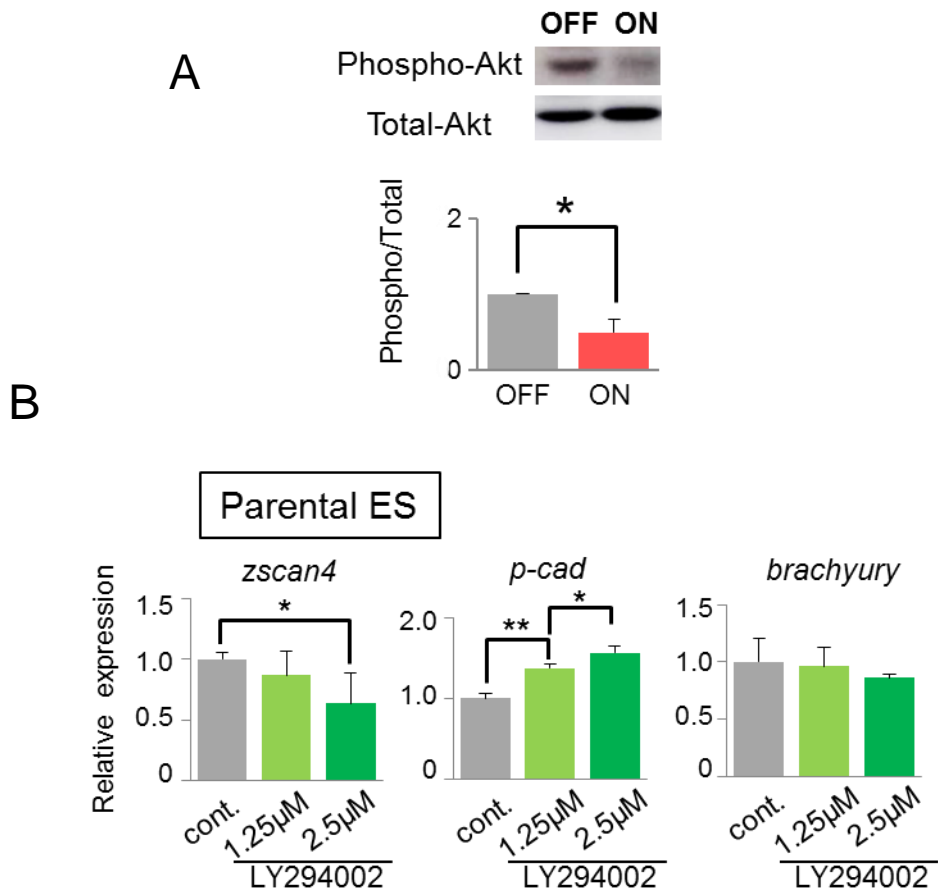


図 3-3: PI3K/Akt シグナルと細胞外 syntaxin-4 の関わり

A: 細胞外 syntaxin-4 を発現誘導したときのリン酸化型 Akt の発現量を調べた。

リン酸化型 Akt を Total の Akt で割り、定量化した。 N=4 * P<0.05

B: PI3K の阻害剤 (LY294002) を親株の ES 細胞に添加し、その際の Zscan4、P-cadherin および Brachyury の mRNA 量を定量化した。 N = 4 * P<0.05 ** P < 0.01

MEK1/2 およびGSK3 β 阻害剤による細胞外syntaxin-4 の

機能への影響

前述の結果 (図 1-2) より、syntaxin-4 の細胞外提示はES細胞の未分化性を均一に保つ MEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤 (2i) によって抑制されることがわかっている。そこで次に、細胞外syntaxin-4 の機能とこの2つの経路の関係について調べるため、2iを添加すると同時にsyntaxin-4 の発現を誘導し、形態や分化への影響を解析した。その結果、2i未添加のES細胞は細胞外syntaxin-4 によって形態の扁平化が促進されたが、2iを添加した細胞では、syntaxin-4 による細胞形態の変化は見られなくなった (図 3-4 A)。一方、これまでsyntaxin-4 によって誘導された主な分化マーカーである*p-cadherin*、*brachyury*および*zscan4* について2iを添加した状態で調べたところ、各遺伝子はこれまで同様、細胞外syntaxin-4 によって発現量が上昇することが判明した (図 3-4 B)。このことから、細胞外syntaxin-4 による形態変化にはこの2つの経路の少なくともどちらかが関与する可能性が考えられる。また、2iは強力な未分化性維持因子であるにもかかわらず、強制的にsyntaxin-4 を細胞外提示しただけで、中胚葉系列への分化が誘導されることが分かった。このことは 2iの未分化性維持因子としての主要な役割は、syntaxin-4 の細胞外提示の抑制であるという可能性を示している。

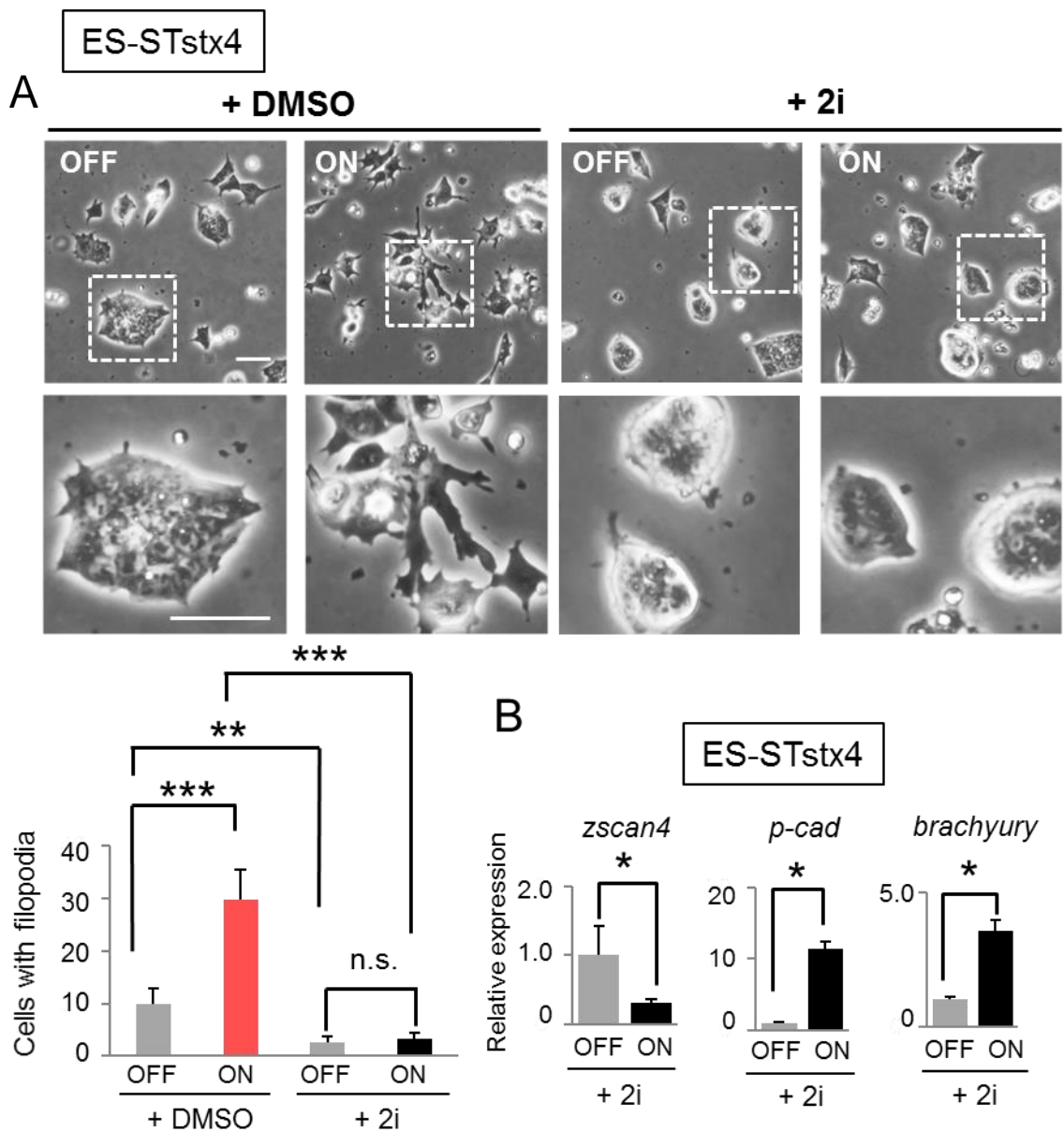


図 3-4: 細胞外 syntaxin-4 の形態・分化への影響と MEK1/2 および GSK3 β の関係

A: 上: コントロールとして DMSO を添加したものと、2i を添加したもので、細胞外 syntaxin-4 による形態への影響を比較した。下段の写真は上段の拡大図を示す

下: 仮足形成細胞数の定量化 N=4 ** P<0.01 *** P<0.001

B: 2i を添加した状態で細胞外 syntaxin-4 を発現誘導したときの分化マーカーの mRNA 量を定量化した。N=4 * P<0.05

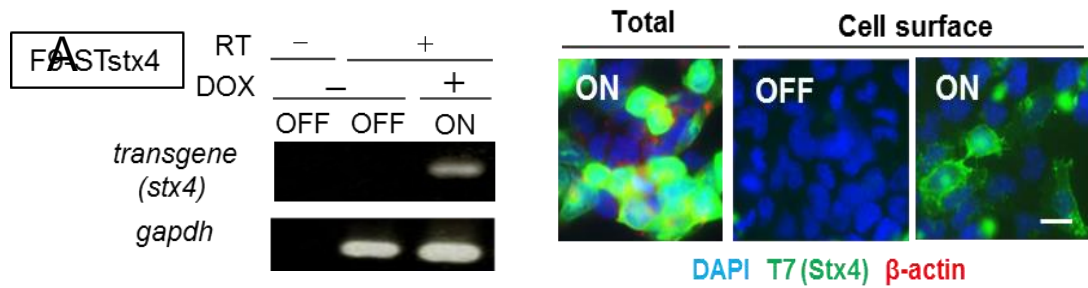
第 4 節 F9 細胞における細胞外syntaxin-4 の機能 (cadherinスイッチと形態との関わり)

細胞外syntaxin-4 によるF9 細胞の形態への影響

これまでの結果として、①LIFによる未分化状態のES細胞の一部で内在性syntaxin-4 が細胞外提示していること、②細胞外syntaxin-4 を発現誘導したES細胞で、形態の扁平化、E-to P-cadherinスイッチおよび中胚葉系列への分化が促進されることが明らかとなった。次に、これらの表現型の関連性を調査するにあたり、適切な評価細胞の選定を行った。ES細胞はzscan4を含む様々な未分化および分化関連因子が複雑に絡み合っているため⁷²、一つの要素が変化することで複数の細胞応答が導かれてしまう可能性が高い。そこで今回は、一つ一つの要素の繋がりを探る手段として、ES細胞より単純な系であるEC (胚性癌) 細胞を用いることとした。EC細胞はマウスES細胞の樹立が成功していなかった 1980 年代から多能性幹細胞のモデルとして世界中で広く使用されていた細胞で、ES細胞と同様にテラトーマ形成能を有することから潜在的な多能性を有しているにもかかわらず、非常に簡便な培養条件 (LIF や 2iを必要としない) で安定的に未分化性を維持できることが知られている⁷³⁻⁷⁵。その中でも今回用いたF9 細胞は、培養下では内胚葉系列への分化誘導が可能な未分化細胞であり、E-cadherinが発現した密なコロニーを形成する一方で、zscan4 の発現は認められない⁷³。よって、この細胞を用いることで、中胚葉分化およびzscan4 の関与を除外し、細胞外syntaxin-4 のcadherinスイッチと細胞形態の関連性に着目した解析を行えると考えた。

まず、ES細胞と同様にDOX添加の有無で細胞外syntaxin-4 の発現誘導が可能なF9-STstx4 細胞を樹立した (図 3-4 A)。この細胞の形態について観察すると、ES細胞と同様に、syntaxin-4 を発現した細胞では細胞間結合が抑制され、仮足形成が促進された (図 3-4

B)。



B

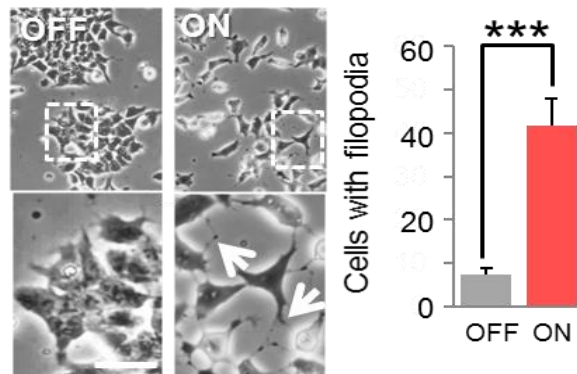


図 4-1: 細胞外 syntaxin-4 の発現確認とその形態への影響

A: 外来性 syntaxin-4 の発現確認

細胞外に提示させるためのシグナルペプチドおよび T7 タグを付加した syntaxin-4 のコンストラクトを F9 細胞に導入した syntaxin-4 発現誘導 F9 細胞 (F9-STstx4) に DOX を添加して 2 日後、RT-PCR (左) と免疫染色 (右) を用いて発現確認を行った。

T7 (stx4) (緑)、β-actin (赤)、DAPI (青)、スケールバー 10 μm

B: 細胞外 syntaxin-4 による ES 細胞の形態変化

左: DOX を添加して 2 日後に細胞形態を観察した。下の写真は上の写真の拡大図
矢印は仮足形成細胞を示す。

右: 仮足形成細胞数の定量化 N=4、*** P<0.001 スケールバー 20 μm

E- to P-cadherinスイッチへの影響

F9 細胞においても細胞外syntaxin-4 の発現によりES細胞と同様の形態変化が見られたことから、次にcadherinスイッチについて検討した。その結果、F9 細胞でもE-cadherinのタンパク質レベルでの発現減少とP-cadherinの転写レベルでの発現上昇が確認された (図 4-2 A)。また、リン酸化Aktの発現量についても確認したところ、細胞外syntaxin-4 によって減少することがわかった (図 4-2 B)。以上のことから、F9 細胞においても細胞外syntaxin-4 は cadherinスイッチとAktシグナルに関してES細胞と同様の効果を示すことが判明した。

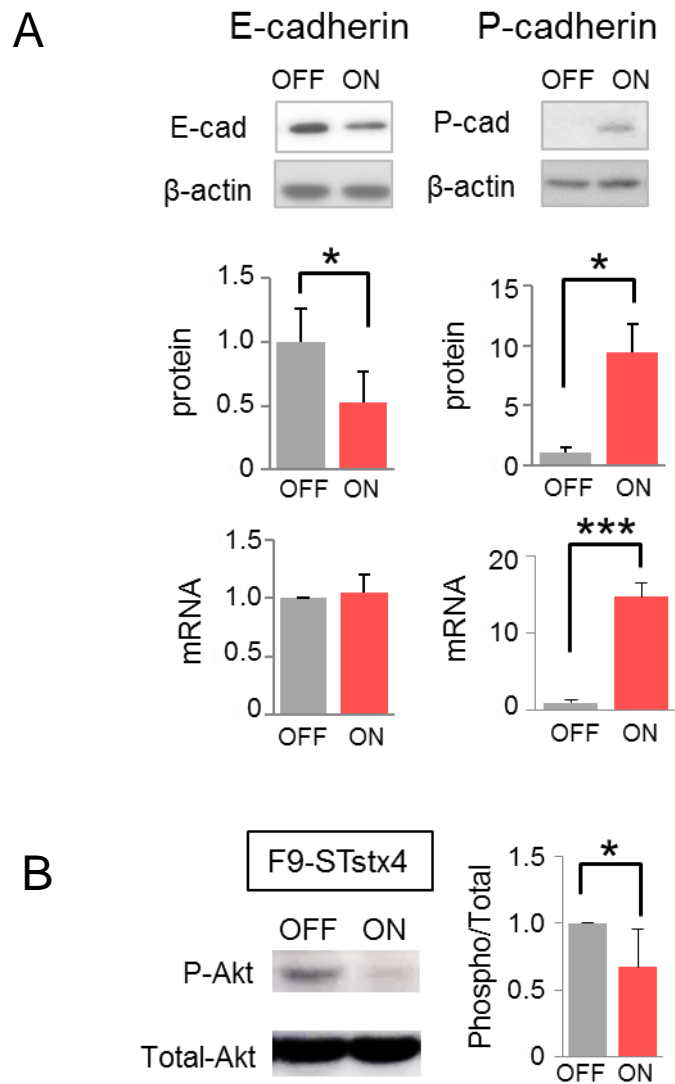


図 4-2: 細胞外 syntaxin-4 による E- to P-cadherin スイッチへの影響

A :syntaxin-4 発現誘導 ES 細胞に DOX を添加して 2 日後タンパク質と RNA を回収し E-cadherin と P-cadherin の発現量をそれぞれ解析した。

上 :ウエスタンブロッティングのメンブレン 中下:タンパク質および mRNA 発現量の定量化

左 :E-cadherin の発現量 右 :P-cadherin の発現量 N=4、** P<0.01

B :細胞外 syntaxin-4 によるリン酸化型 Akt の発現量を調べた。

左:メンブレン 右 :リン酸化型 Akt (p-Akt) を Total の Akt で割り、定量化した。

N=4 * P<0.05

細胞外syntaxin-4 によるEMT関連因子および分化マーカーへの影響

形態およびcadherinスイッチの変化はES細胞とF9細胞で酷似していたことから、続いてEMT関連因子と分化マーカーについての検討を行った。典型的EMTで発現誘導されるSnail、Slug、Zeb1、VimentinおよびCofilinの発現量は変化しなかった。また、中胚葉マーカーである α SMAおよびMHCも変化は見られなかった。培養下でF9細胞はレチノイン酸 (RA) によって内胚葉系列の細胞のみに分化することが知られているが、syntaxin-4 は発現誘導しても内胚葉分化マーカーであるGata4 およびAfp⁷⁶ の発現変化は見られなかった (図 4-3)。

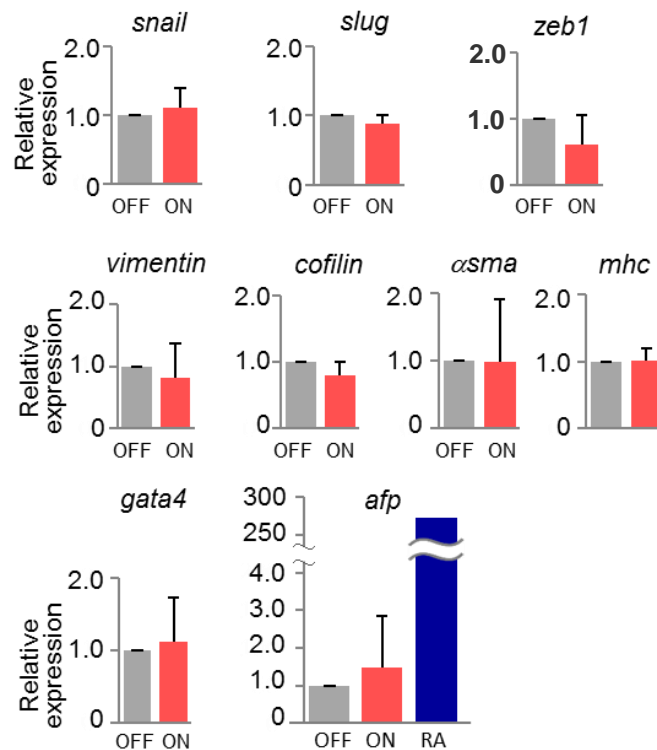


図 4-3: 細胞外 syntaxin-4 による EMT 関連因子と分化マーカーへの影響

細胞外 syntaxin-4 を発現誘導して2日後 RNA を回収し、EMT 関連転写因子 Snail、Slug、Zeb1 および細胞骨格マーカー Cofilin および Vimentin とともに、中胚葉マーカーの α SMA および MHC、内胚葉マーカーの Gata4 および Afp の mRNA レベルを qRT-PCR にて解析した。RA は内胚葉分化のポジティブコントロールとして用いた。N = 4 * P < 0.05

P-cadherin強制発現による形態への影響

F9 細胞においてもES細胞と同様のE- to P-cadherinスイッチおよび形態変化 (①仮足形成 ②細胞間接着の抑制) が見られたことから、これらの関係性を調べるため、まずF9 細胞にP-cadherinを強制発現させた際の形態への影響を観察した。細胞外syntaxin-4 と同様にDOX添加によりP-cadherinの発現誘導可能な細胞 (F9-Pcad) を作製した。DOXを添加して2日後の形態を観察したところ、P-cadherinを発現させた細胞では仮足形成が促進していたが、細胞間接着の抑制は見られなかった (図 4-4 A)。また、免疫染色にてF-actinとP-cadherinを共染色したところ、やはりP-cadherinの発現細胞で仮足形成の促進は見られたが、細胞間接着は保たれたままだった (図 4-4 B上)。さらにこの仮足形成への効果はP-cadherinの機能阻害抗体PCD1 を培地に添加することで阻害されることがわかった (図 4-4B下)。

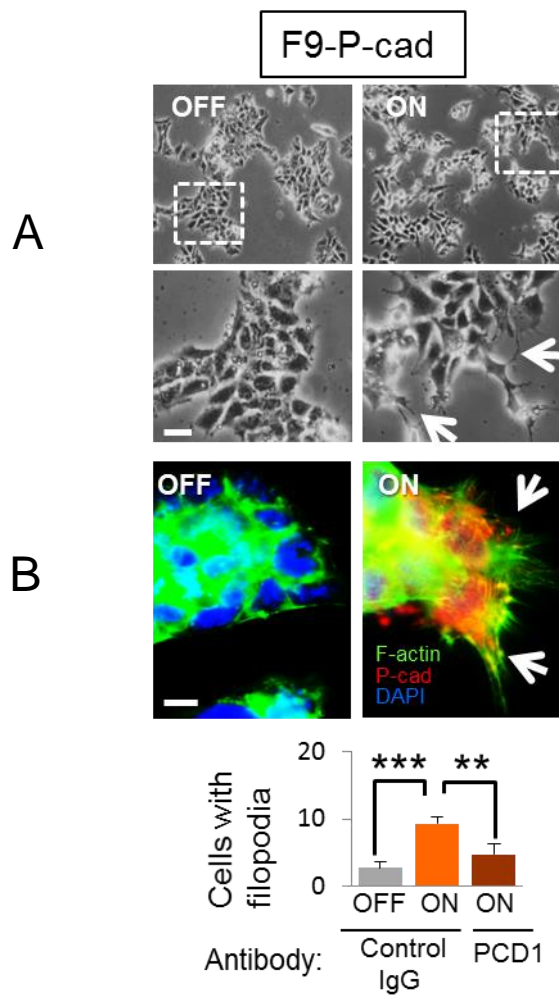


図 4-4: P-cadherin 強制発現による形態への影響

P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) に DOX を添加し二日後の細胞を観察した。矢印は仮足形成細胞を示す。

A: 明視野の写真 上図を拡大した写真を下に示す。

B: 上: 免疫染色写真 F-actin (緑)、P-cad (赤)、DAPI (青)

下: P-cadherin の ON/OFF に加え、DOX を添加すると同時に P-cadherin 阻害抗体である PCD1 を添加したものも併せて仮足形成細胞数を計測した。

N = 4 ** P < 0.01 *** P < 0.001 スケールバー: 20 μm

E-cadherin の機能阻害による形態変化

P-cadherinを発現させたF9 細胞では仮足形成の促進は見られるのに対し、細胞外 syntaxin-4 で観察された細胞間接着の抑制は見られなかった。そのため、次に細胞間接着の主要な構成因子であり、syntaxin-4 により有意な発現減少が見られたE-cadherinの機能阻害を行った。親株のF9 細胞にコントロール抗体とE-cadherinの機能阻害抗体である ECCD1 をそれぞれ添加し、2 日後形態を観察した。すると、ECCD1 を添加した細胞では細胞間結合が弱まった形態を示したが、P-cadherinの強制発現細胞で見られたような仮足形成の促進は観察されなかった (図 4-5 A)。一方、細胞形態とE-cadherinの関係性を調べる別の実験として、人工的に基質への進展を制御した際のE-cadherinの発現量について検討した。具体的には、ペトリディッシュ上で細胞を培養し、基質への進展を阻害した場合と、Poly-L-lysineコートによって物理的に細胞を進展させた場合でのE-cadherinの発現量をタンパクおよびmRNAレベルで解析した。その結果、Poly-L-lysine上で進展した細胞でE-cadherinのタンパク質レベルでの発現減少が観察された (図 4-5 B)。

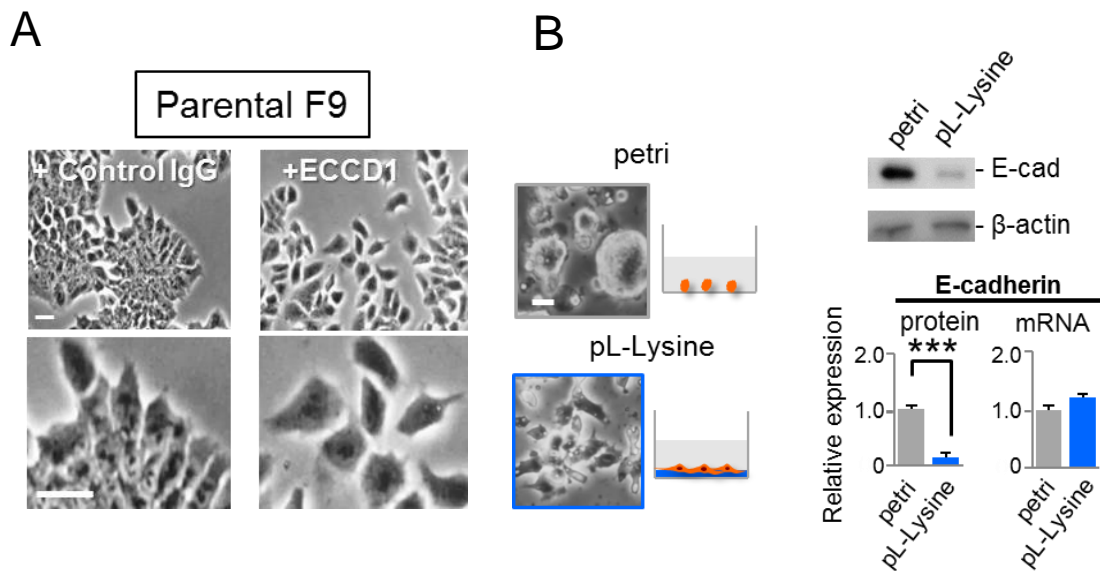


図 4-5: E-cadherin 阻害による形態への影響

A: 親株の F9 細胞 (Parental F9) に E-cadherin の機能阻害抗体である ECCD1 を添加し、細胞形態を観察した。

上図を拡大した写真を下に示す。

B: 左: ペトリディッシュ上で培養した細胞 (petri) と Poly-L-lysine コート上で培養した細胞 (pL-Lysine) の細胞形態

右: E-cadherin の発現量をタンパク質レベルおよび mRNA レベルで解析した。

N = 4 *** P<0.001 スケールバー: 20 μm

E- to P-cadherinスイッチの模倣による形態変化

これまでの結果から、P-cadherinを発現させた細胞では仮足形成のみが促進され、E-cadherinを機能阻害した場合は、細胞間接着の抑制のみが見られた。そこで、この二つの条件を組み合わせることで、E- to P-cadherinスイッチを模倣した場合、細胞外syntaxin-4による形態変化と同様の効果が見られるのかを検討した (図 4-6 A)。その結果、P-cadherinを発現誘導した場合と比較して、P-cadherinの発現と同時にECCD1 を添加した場合では、仮足形成とともに細胞間接着の抑制も見られ、細胞外syntaxin-4による形態変化と似た様子が観察された (図 4-6 B)。

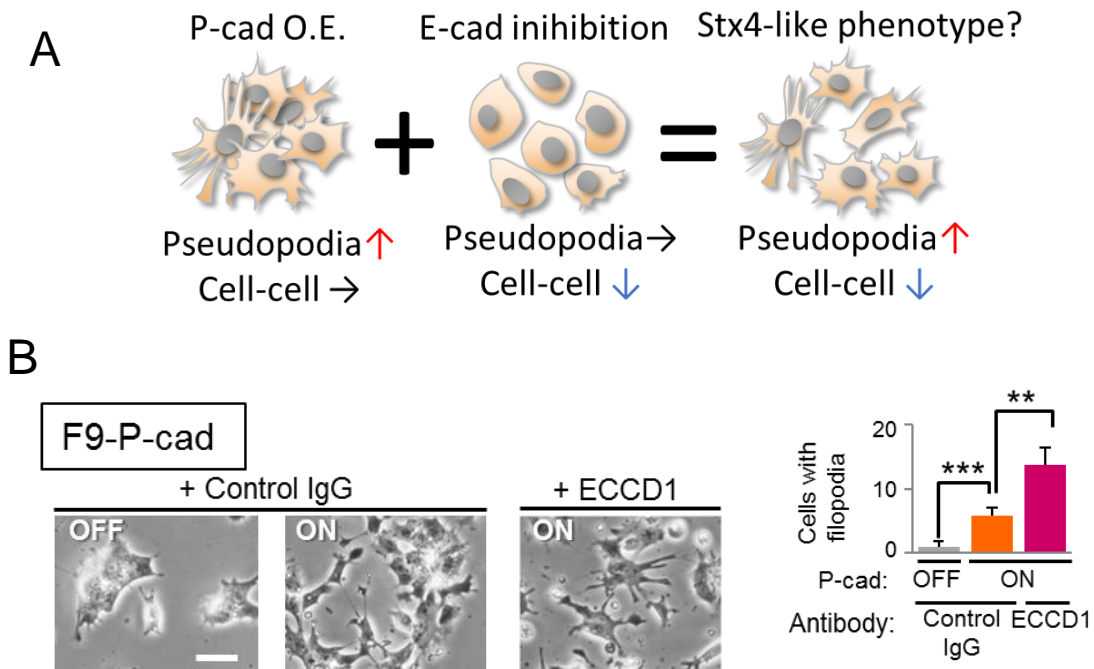


図 4-6: 人工的な E- to P-cadherin スwitchの模倣による形態への影響

P-cadherin 発現誘導細胞 (F9-P-cad) にコントロール抗体および ECCD1 抗体をそれぞれ添加し、その形態を観察した。

A: E- to P-cadherin スwitch再現の模式図

B: 左: 明視野の写真

右: 仮足形成細胞数の定量化

N = 4 ** P<0.01 *** P<0.001 スケールバー: 20 μm

長期的な細胞外 syntaxin-4 の発現による分化への影響

培養系では内胚葉のみに分化誘導が可能なF9 細胞において、短期的にsyntaxin-4 を発現させても、分化には影響がないことが示されたため、次に長期間発現させた場合の分化への影響について調べることにした。これまで使用していたDOXによる発現誘導細胞であるF9-STsxt4 は、DOX添加4日前後で細胞がアポトーシスを起こし長期間の維持ができなかった。そのため、幹細胞では過剰発現の程度が緩やかなCMV (Cytomegalovirus) プロモーターの下流にシグナルペプチドを付加したsyntaxin-4 導入したコンストラクトを用いて細胞外syntaxin-4 の安定発現細胞株sig-stx4 を作製した。コントロールのEmptyベクターを導入した細胞と比べ、syntaxin-4 の安定発現細胞では仮足形成の促進が観察された (図 4-7 A)。またその際のF9 細胞が内胚葉系列へ分化し際に発現上昇することが知られるGata4、Cofilin およびVimentinについて確認したところ、全ての発現量の上昇が確認できた (図 4-7 B)。したがって、F9 細胞において、細胞外syntaxin-4 の短期間の発現では形態のみに作用するが、長期間発現することで内胚葉へも分化誘導が行われる可能性が示された。

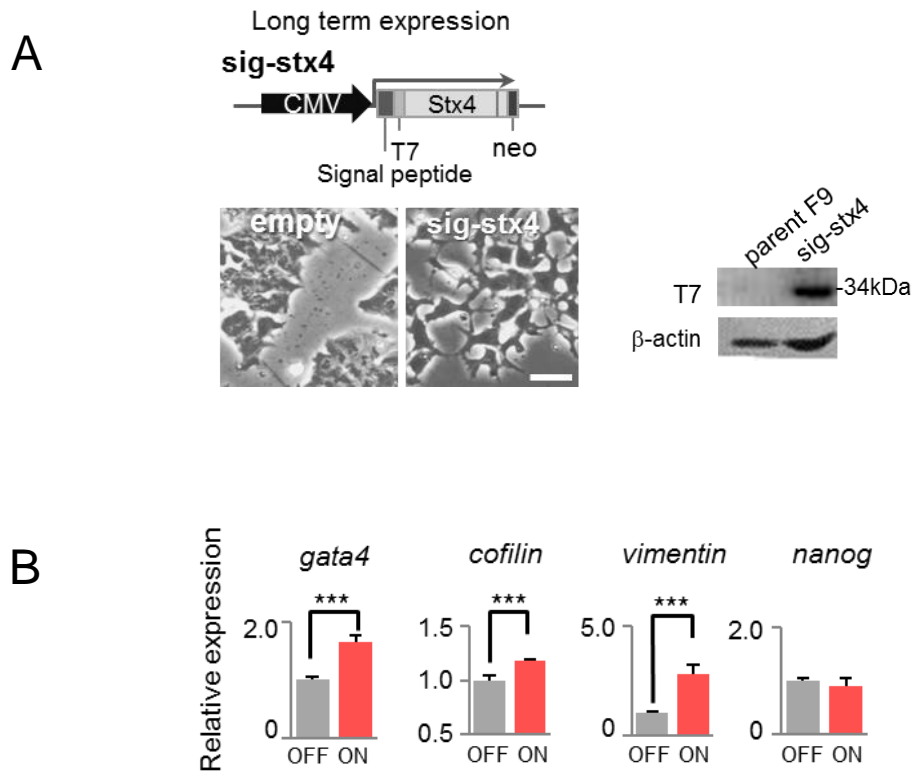


図 4-7: 細胞外 syntaxin-4 安定発現細胞の分化への影響

A: 細胞外 syntaxin-4 を長期間安定発現させるために CMV プロモーターの下流にシグナルペプチドと T7 タグを付加した syntaxin-4 を繋いだコンストラクトを F9 細胞に導入した (sig-stx4)。スケールバー: 20 μ m

上: コンストラクトの模式図

右: T7 抗体を用いて導入した syntaxin-4 の発現確認を行った。

下: コントロールの Empty ベクターを導入した細胞と sig-stx4 細胞の形態

B: コントロール細胞と sig-stx4 細胞の RNA を抽出し、F9 細胞が内胚葉へ分化した際のマー

第 5 節 P19CL6 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能 (P-cadherin と中胚葉分化の関係)

細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態への影響

前述のF9 細胞を用いた実験において、syntaxin-4 による形態変化にはE- to P-cadherin スイッチが深く関与する可能性が示されたが、このcadherinスイッチと中胚葉分化の関係については未だ明らかになっていない。そこで次に、F9 細胞と同様に*zscan4* の発現は見られない一方で、培養条件下でも中胚葉への分化誘導が可能なEC細胞の一種、P19CL6 細胞を用いることとした^{77,78}。細胞外syntaxin-4 発現誘導P19CL6 細胞 (P19-STstx4) を作製し発現確認を行ったのちに (図 5-1 A)、その形態について観察したところ、ES細胞と同様に細胞外syntaxin-4 により細胞形態の扁平化が確認された (図 5-1 B)。

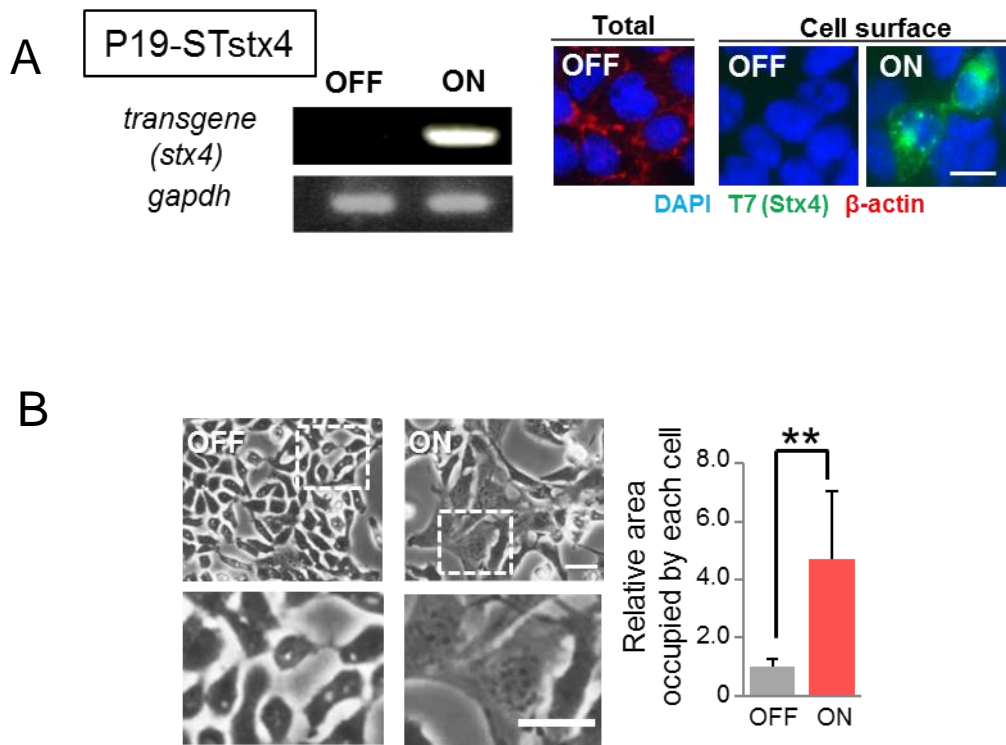


図 5-1: 細胞外 syntaxin-4 による P19CL6 細胞の形態変化

A: 細胞外 syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) に DOX を添加して 3 日後 RT-PCR と免疫染色を行い syntaxin-4 の発現を確認した。インターナルコントロール: *gapdh*

T7 (緑)、β-actin (赤)、DAPI (青)

B: P19-STstx4 細胞に DOX を添加して 3 日後細胞形態を観察した。

左: 明視野の写真 下の図は上の拡大図を示す。スケールバー: 20 μm

右: 各細胞の占める面積の平均値 N=10 **: P < 0.01

細胞外syntaxin-4 による中胚葉分化への影響

P19CL6 細胞でも細胞外syntaxin-4 により細胞形態の変化が見られたことから、ES細胞と同様にE-to P-cadherinスイッチおよび中胚葉分化マーカーの発現について変化が見られるのか確認した。P19CL6 細胞ではE-cadherinの発現は検出限界以下であったが、P-cadherinは細胞外syntaxin-4 により発現上昇することがわかった (図 5-2 A)。またその際、中胚葉マーカーである α SMAの発現をウエスタンブロッティングおよび免疫染色で確認したところ、細胞外syntaxin-4 によって発現量が上昇することが判明した (図 5-2 B)。さらに、免疫染色の結果から α SMAを強く発現した細胞より扁平化することが確認できた。また、他の分化マーカーについてmRNAレベルで検討したところ中胚葉マーカーである*brachyury*は発現上昇したが、その他の分化マーカーは変動しなかった (図 5-2 C)。このことから、P19CL6 細胞においても細胞外syntaxin-4 は形態変化および中胚葉分化を促進することが確かめられた。

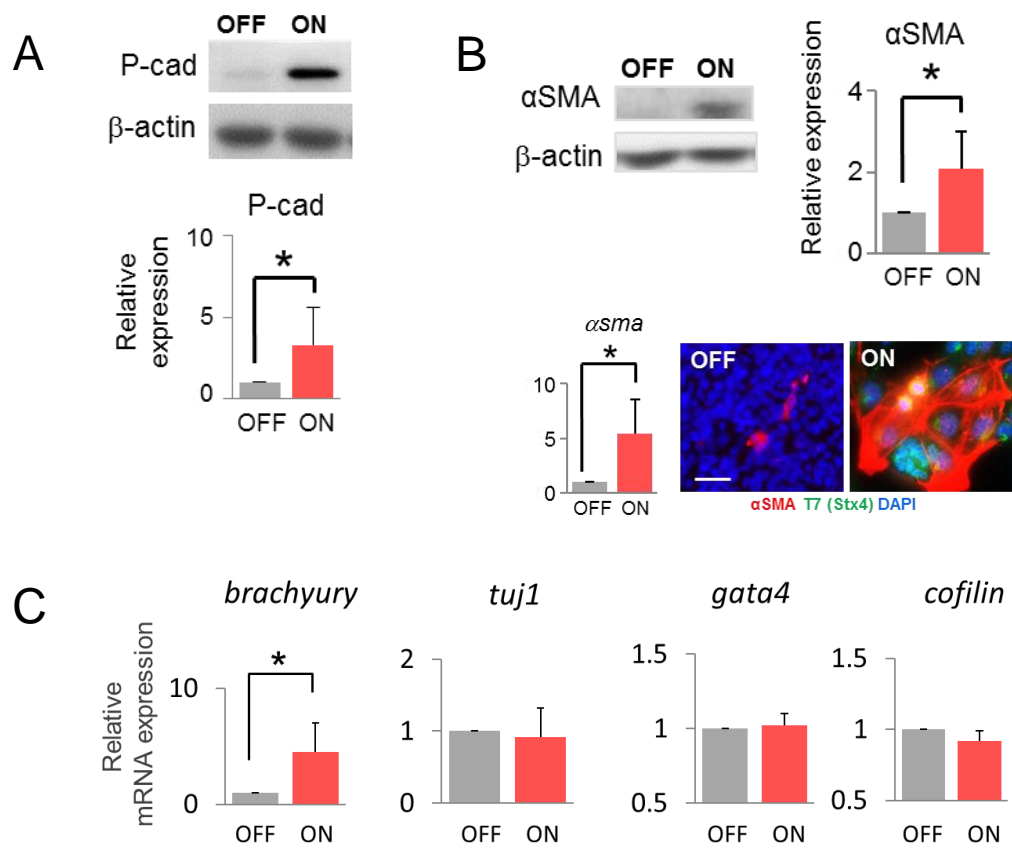


図 5-2: 細胞外 syntaxin-4 による P-cadherin および中胚葉分化への影響

細胞外 syntaxin-4 発現誘導 P19CL6 細胞 (P19-STstx4) に DOX を添加して 3 日後サンプルを回収した。

A: P-cadherin の発現をウエスタンブロットングにて確認した。

N = 4 * : P < 0.05

B: 中胚葉マーカーの αSMA の発現をウエスタンブロットング、qRT-PCR および免疫染色にて確認した。

左: αSMA のタンパク質レベルの発現量 中: αSMA の mRNA レベルでの発現量

N = 4 * P < 0.05

右: αSMA の免疫染色 αSMA (赤)、T7 (緑)、DAPI (青) スケールバー: 20 μm

C: 各分化マーカーの mRNA レベルの発現量 Brachyury (中胚葉)、Tuj1 (外胚葉)、Gata4 (内胚葉)、Cofilin (細胞骨格) N = 4 * : P < 0.05

P-cadherin強制発現による形態と中胚葉分化への影響

最後に、P-cadherinの発現と形態変化及び中胚葉分化への影響を調べるため、親株のP19CL6細胞にP-cadherinを一過的に発現させた際の形態および中胚葉マーカーについて検討した。免疫染色によってP-cadherinを発現した細胞では細胞の扁平化及び仮足形成が確認された (図 5-3 A)。一方、mRNAを回収し*p-cadherin*および中胚葉マーカーである*asma*の発現を確認したところ、*p-cadherin*の発現上昇は確認されたが、*asma*の発現に変化は見られなかった (図 5-3 B)。このことから、P-cadherinは中胚葉分化には寄与しない可能性が示された。

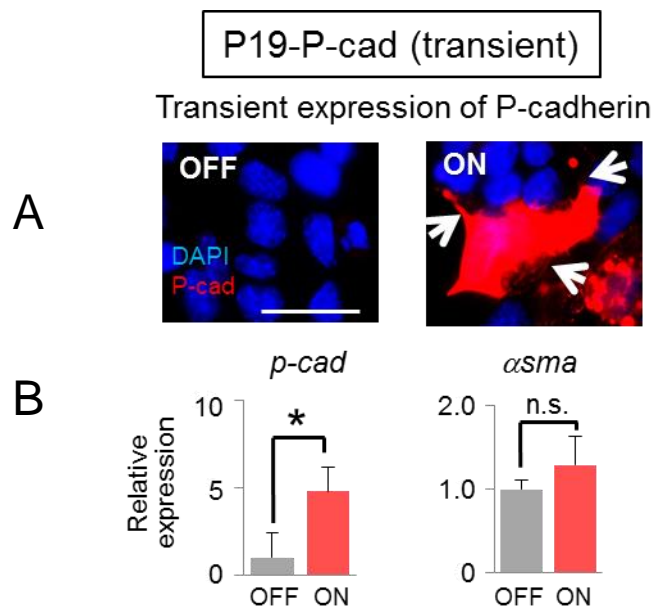


図 5-3: P-cadherin 強制発現による形態および中胚葉分化への影響

P-cadherinを一過的に発現した P19CL6 細胞 (P19-P-cad) を用い免疫染色にて形態変化を、qRT-PCRにて中胚葉分化への影響を調べた。

A: P-cadherin の免疫染色 P-cadherin (赤) DAPI (青) スケールバー: 20 μ m

B: *p-cadherin* および中胚葉マーカーの *asma* の発現を qRT-PCRにて確認した。

N=4 *P<0.05

第5章 考察

syntaxin-4 の細胞外局在について

本研究結果より、t-SNAREタンパク質であるsyntaxin-4 は、ES細胞集団の一部で局所的に細胞外に提示され、形態変化や中胚葉系列への分化を誘導することが明らかとなった。さらに、これらの変化は未分化維持因子LIFの添加培地において確認されたことから、syntaxin-4 の細胞外提示は未分化なES細胞における分化状態の不安定化に関与する可能性が考えられる (図 6)。しかし、未だsyntaxin-4 がどのようなメカニズムで細胞外に提示されるのかについては明らかになっていない。今回の結果からMEK1/2 およびGSK3 β の阻害剤である 2iによってsyntaxin-4 の細胞外での発現が抑制されたことから、syntaxin-4 の細胞外提示にはMEKおよびGSK3 β のシグナルが関与する可能性があると考えられる。一方、最近の研究で、syntaxin-4 と立体構造が酷似したepimorphin (syntaxin-2) は細胞膜でAnexin II やSynaptotagminと複合体を形成しており、アポトーシスシグナルに応答した膜反転に伴い細胞外に提示されることがわかっている⁵⁵。さらに、ES細胞では単一コロニーの一部で局所的にアポトーシスが誘導される細胞競合という現象が確認されており、2iはそのアポトーシスを抑制することが明らかになっている^{79,80}。これらのことから、2iによってES細胞集団での局所的なアポトーシスシグナルが抑制されたことで、間接的にsyntaxin-4 の細胞外提示が阻害された可能性も考えられる。また、これまで 2iは、ES細胞からEpiblast様の細胞への分化に必要なFGFシグナルを阻害することで未分化状態の維持に寄与すると考えられてきたが⁸¹、今回 2iを作用させた状態でも、細胞外syntaxin-4を強制的に発現させることで分化が誘導されたことから、2iによる未分化状態の維持にはsyntaxin-4 の細胞外提示阻害も重要である可能性が見いだされた。

syntaxin-4 フラグメントの効果

本研究で用いたsyntaxin-4の組み換えタンパク質であるF1 (syntaxin-4のHelix aおよびb) はES細胞で見られた細胞外syntaxin-4による形態変化および分化を阻害するアンタゴニストとして作用することがわかった。この効果はsyntaxin-4 強制発現細胞だけでなく、親株のES細胞でも見られた。F1 がアンタゴニストとして機能する際の結合パートナーとしては二つに分子が想定される。ひとつは細胞外syntaxin-4 の受容体であり、もうひとつは細胞外提示されたsyntaxin-4 自身である。後者については、培養液中に添加したF1 が細胞外syntaxin-4 と直接結合し、その立体構造を変化させたことで、受容体への結合が抑制された可能性が考えられる。先行研究において、epimorphinおよびsyntaxin-4 は細胞内で多量体を形成することが示されている^{57,82}。これにはsyntaxinファミリー分子はコイルドコイル領域を持つため、疎水結合によりsyntaxin同士で多量体形成をしやすい構造であることが原因として考えられる⁴⁷。一方、形態変化に関しては、F1 だけでなくF3 も抑制効果を示していた。全く違う配列をもつF1 とF3 が同一受容体に結合することは考えにくい。フラグメントをPBSで透析する段階で、溶解液に用いた尿素の拡散と共に、F3 はその大部分が凝集し、析出してくることがわかっている。このことから今回阻害効果を示したF1 および3 のどちらか一方、もしくはその両者は、内在性の細胞外syntaxin-4 と直接結合しアンタゴニストとして作用した可能性が考えられる。フラグメントによる阻害効果のメカニズムを探るためにも、さらなる細胞外syntaxin-4 によるシグナル経路を調べるためにも受容体の同定は必須であるが、これまで細胞外syntaxin-4 の効果が報告されている表皮や乳腺の細胞においても受容体は同定されていない^{52,66}。syntaxin-4 と立体構造が酷似しているepimorphinの受容体はIntegrin α V β 1 であり⁵⁵、さらに、今回明らかとなったPI3Kの活性化にもIntegrin β 1 が関与することから⁸³、細胞外syntaxin-4 の受容体もIntegrinである可能性が考えられる。

syntaxin-4 による形態変化におけるGSK3 β シグナルの関与

強制的にsyntaxin-4 を細胞外に発現誘導した際、2iによって形態の扁平化が阻害された。syntaxin-4 はGSK3 β を抑制することで知られるPI3K/Aktシグナル³を阻害することが今回明らかになった。そのため、syntaxin-4 による形態変化にはGSK3 β シグナルが関与する可能性もあると考えられる。さらに、GSK3 β はE-cadherinの発現制御にも深く関与するとともに、ES細胞のコロニー形成の抑制にも働くことが示されている^{84,85}。以上のことからsyntaxin-4 による形態変化にはPI3K/Aktシグナル抑制によるGSK3 β の活性化が寄与している可能性は主として考えられるが、実際に関連性を調べるにはGSK3 β のリン酸化や局在変化とともにその下流シグナルの活性化を追跡する必要がある。

syntaxin-4 による形態変化とE- to P-cadherinスイッチの関係

今回、E- to P-cadherinスイッチは細胞外syntaxin4 による形態変化の鍵となる可能性が示された。ES細胞において、PI3K/AktシグナルはE-cadherinを正に制御することが報告されているため、syntaxin-4 によるPI3K/Aktシグナルの抑制がE-cadherinの発現減少の引き金となった可能性が考えられる^{86,87}。また、PI3K/AktはLIFシグナルによって活性化され未分化維持に働く主要な経路の一つであるが、本実験においては、LIF存在下でもsyntaxin-4 の細胞外提示により分化が促進された。このことから、syntaxin-4 によるPI3Kシグナルの抑制効果はLIFからのPI3K/Aktシグナルに対して優勢に働いたと考えられる^{28,88}。また、E-cadherinの発現減少は細胞質で働く β -cateninを増加させることが知られており、細胞膜近傍から離れた β -cateninは*p-cadherin*の転写活性を促進することが報告されていることからsyntaxin-4 による*p-cadherin*の発現上昇には β -cateninが関与する可能性があると考えられる⁸⁹。別の報告で*p-cadherin*の発現上昇には、p63 やC/EBP β といった他の転写因子が関与することも示

されているが^{90,91}、それらの遺伝子はsyntaxin-4 発現誘導時のトランスクリプトーム解析から発現変動しないことを確認している。また、クラシックcadherinに属するE-、P-およびN-cadherinは細胞間接着の主要な因子として知られているが、別の機能として、Small GTPaseを介した細胞運動に対しても効果を示すことが明らかにされている⁹²⁻⁹⁴。最近の研究で、E-cadherinではなくP-cadherin特異的にCdc42の活性化を介して、細胞遊走の促進を行う機構が新たに判明した⁹⁵。さらに、乳腺や膵臓などの悪性度の高い癌でP-cadherinは高発現しており、それらが癌細胞の浸潤・転移を促進することも示されている⁹⁶。また、P-cadherinの細胞遊走や形態への影響にはIntegrin $\alpha 6\beta 4$ などが関わることも報告されているため³²、このような細胞膜に発現しているタンパク質の機能によりsyntaxin-4による形態変化は制御されている可能性もある。

PI3K/Aktシグナルと細胞外syntaxin-4による分化の関係

PI3K/AktシグナルはES細胞の分化を誘導するMAPK経路を阻害するとともに、多能性関連遺伝子である*nanog*をはじめとする未分化維持に関わる因子を発現上昇させることがわかっている^{88,97}。そのため、細胞外syntaxin-4による分化刺激によりPI3K/Aktシグナルの不活性化が引き起こされたことは合点がいく。しかし、PI3K/Aktシグナルを阻害した実験において、syntaxin-4によって発現が減少する*zscan4*では同様の変化があったのに対し、中胚葉分化マーカーである*brachyury*は変化が見られなかった。このことから、PI3K/Aktシグナルは未分化性を維持させるための主要な因子ではあるが、その不活性化のみで中胚葉への分化が促進されるわけではないことがわかった。syntaxin-4によるES細胞の分化誘導にはPI3K/Aktシグナル以外にもさらに主として機能する経路が存在すると考えられる。

分化と形態変化の関係

本研究において、細胞分化と形態変化の関連は非常に重要なポイントのひとつである。細胞分化にともなって形態変化が観察されることは一般的によく知られているが、これに当てはまらない場合もいくつか存在する。たとえば、E-cadherinの組み換えタンパク質を工学的に作製し、ES細胞に作用させた細胞は形態の扁平化は見られるのに対し、分化は誘導されない⁹⁸。今回の研究においても、P19CL6細胞にP-cadherinを強制発現し、細胞形態の扁平化を促しても、中胚葉分化には大きく作用しないことがわかった。またES細胞に2iを作用させた場合、細胞外syntaxin-4による形態変化は阻害されたが、分化は誘導されていた。これらの結果から、今回のES細胞の分化は形態非依存的に起こるものではないと示唆される。一方、F9細胞の実験において、細胞外syntaxin-4の短期間の発現誘導では形態変化のみが見られたのに対し、長期的に発現させることで、内胚葉系列への分化マーカーが発現してくることが示された。このことから、細胞外syntaxin-4は細胞形態に大きく作用し、それが引き金となって内胚葉（中胚葉以外）の分化にも寄与する可能性も考えられる。

生体内における細胞外syntaxin-4の機能

これまでの結果からは生体内での初期発生に細胞外syntaxin-4がどのように関与するのかについてはわかっていない。しかし、今回明らかとなった細胞外syntaxin-4のEMT様の形態変化や、中胚葉マーカー*brachyury*の発現は、生体内で初めに起こる細胞遊走である原腸陥入や、神経堤細胞の遊走で見られる変化に近い^{99,100}。また、細胞内のsyntaxin-4の全身でのKOマウスは原腸陥入が起きた直後の胎生7日目までで致死となることがわかっている¹⁰¹。プレリナリーな結果ではあるが、ラット胎児の原腸陥入時期に相当する胎生8.5日目において、細胞外syntaxin-4のホールマウント染色を行ったところ、原腸陥入領域に特異的な発現というものは確認できなかった。また、徳島大学との共同研究において、シグナルペプ

チドとT7 タグを付加したsyntaxin-4 を強制発現するマウスの作製を試みたが、計 62 個の遺伝子導入を行った受精卵から、胎生 13 日まで発生が進んだ個体は1つしか得られず、しかもその 1 個体についてT7 抗体を用いて解析したところ、導入したsyntaxin-4 はタンパク質レベルで発現していないことが判明した。このことから、細胞外syntaxin-4 を強制発現させることで、胎生 13 日までの発生に支障をきたす可能性も考えられるが、胚発生と細胞外syntaxin-4 の関係を結論づけるには、さらなる詳細な対象実験および再現性によって注意深く検証する必要がある。

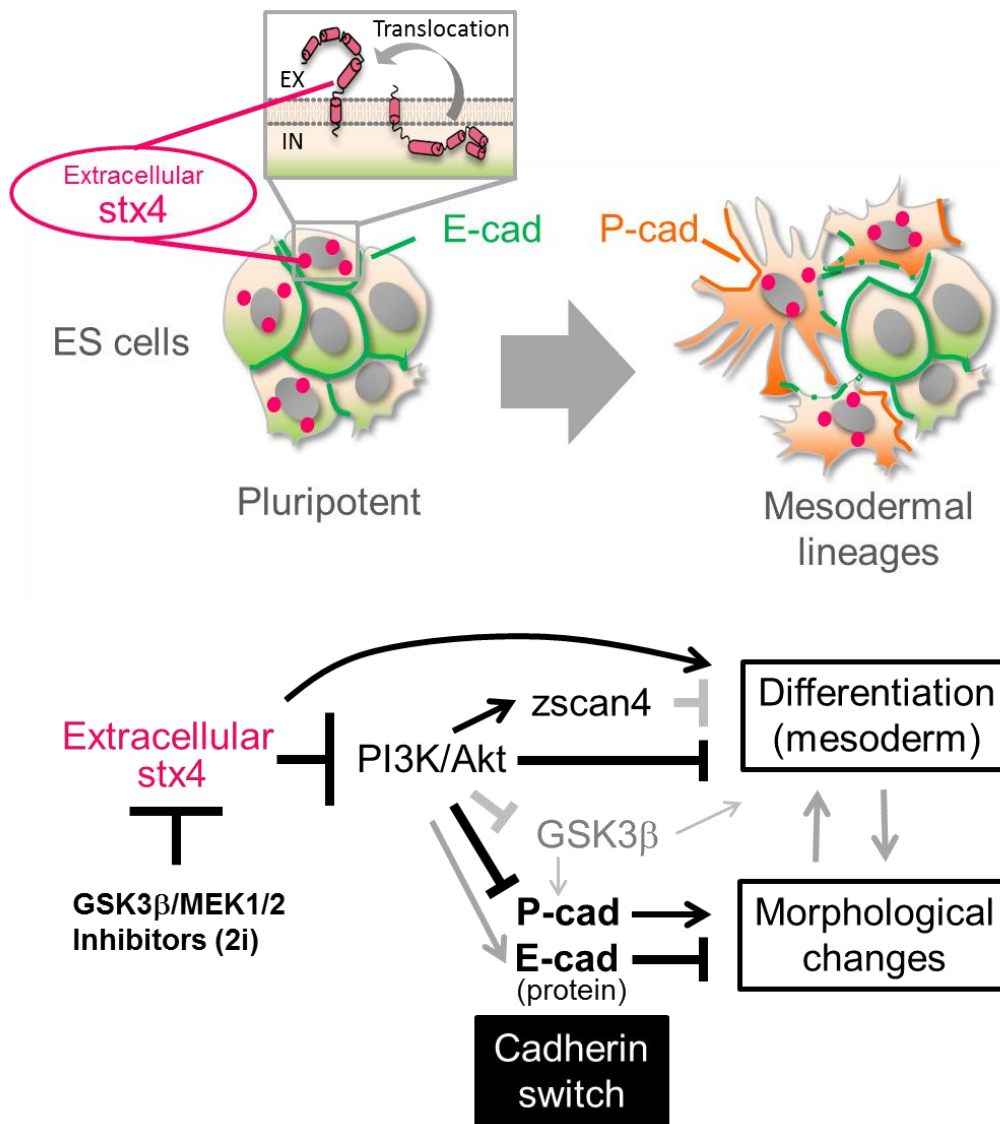


図 6: 細胞外 syntaxin-4 の発現と機能のモデル

上: ES 細胞における細胞外 syntaxin-4 の機能の模式図

未分化維持因子 LIF 存在下の ES 細胞表面で細胞外 syntaxin-4 はコロニー内で不均一に発現し中胚葉分化および cadherin スイッチを誘導する

下: 細胞外 syntaxin-4 のシグナル伝達経路

黒色: 本研究から明らかになった経路

灰色: 先行研究から考えられる経路

細胞外に提示された syntaxin-4 により、PI3K/Akt シグナルを介した分化や形態変化が誘導される。さらに、syntaxin-4 の細胞外提示は ES 細胞の均一化に寄与する 2i で抑制されることから、ES 細胞の分化の不均一性に syntaxin-4 が関与する可能性が考えられる

第 6 章 参考文献

- 1 Bianconi, E. *et al.* An estimation of the number of cells in the human body. *Annals of Human Biology* **40**, 463–471, doi:10.3109/03014460.2013.807878 (2013).
- 2 Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147, doi:10.1126/science.282.5391.1145 (1998).
- 3 Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–156, doi:10.1038/292154a0 (1981).
- 4 Marks, H. *et al.* The Transcriptional and Epigenomic Foundations of Ground State Pluripotency. *Cell* **149**, 590–604, doi:10.1016/j.cell.2012.03.026 (2012).
- 5 Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E. & Terada, N. A heterogeneous expression pattern for nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells* **25**, 2534–2542, doi:10.1634/stemcells.2007-0126 (2007).
- 6 Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K. & Niwa, H. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**, 909–918, doi:10.1242/dev.017400 (2008).
- 7 Chambers, I. *et al.* Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* **450**, 1230–U1238, doi:10.1038/nature06403 (2007).
- 8 Lowell, S., Benchoua, A., Heavey, B. & Smith, A. G. Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. *Plos Biology* **4**, 805–818, doi:10.1371/journal.pbio.0040121 (2006).
- 9 Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D. & Adachi, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature* **460**, 118–122, doi:10.1038/nature08113 (2009).
- 10 Martello, G., Bertone, P. & Smith, A. Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *Embo Journal* **32**, 2561–2574, doi:10.1038/emboj.2013.177 (2013).
- 11 Do, D. V. *et al.* A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4–NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes & Development* **27**, 1378–1390, doi:10.1101/gad.221176.113 (2013).
- 12 Kobayashi, T. *et al.* The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes & Development* **23**, 1870–1875, doi:10.1101/gad.1823109 (2009).
- 13 Huang, F. *et al.* miR-1-Mediated Induction of Cardiogenesis in Mesenchymal Stem Cells via Downregulation of *Hes-1* (vol 2013, 216286, 2013). *Biomed Research International*, doi:10.1155/2016/8510747 (2016).

- 14 Indulekha, C. L. *et al.* Hes-1 regulates the excitatory fate of neural progenitors through modulation of Tlx3 (HOX11L2) expression. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 611–627, doi:10.1007/s00018-011-0765-8 (2012).
- 15 Kobayashi, T. & Kageyama, R. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of mouse embryonic stem (ES) cells by regulating Notch signaling activation. *Neuroscience Research* **68**, E134–E134, doi:10.1016/j.neures.2010.07.2164 (2010).
- 16 Eastham, A. M. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Research* **67**, 11254–11262, doi:10.1158/0008-5472.can-07-2253 (2007).
- 17 Ji, L. J., LaPointe, V. L. S., Evans, N. D. & Stevens, M. M. Changes in embryonic stem cell colony morphology and early differentiation markers driven by colloidal crystal topographical cues. *European Cells & Materials* **23**, 135–146 (2012).
- 18 Li, X. A. *et al.* Calcineurin-NFAT Signaling Critically Regulates Early Lineage Specification in Mouse Embryonic Stem Cells and Embryos. *Cell Stem Cell* **8**, 46–58, doi:10.1016/j.stem.2010.11.027 (2011).
- 19 Kim, Y. S., Yi, B. R., Kim, N. H. & Choi, K. C. Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells. *Experimental and Molecular Medicine* **46**, doi:10.1038/emm.2014.44 (2014).
- 20 Larue, L. *et al.* A role for cadherins in tissue formation. *Development* **122**, 3185–3194 (1996).
- 21 Ho, J. C., Ueda, J. & Shimizu, T. The impact of mechanical stress on stem cell properties: The link between cell shape and pluripotency. *Histology and Histopathology* **31**, 41–50 (2016).
- 22 Nobusue, H. *et al.* Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nature Communications* **5**, doi:10.1038/ncomms4368 (2014).
- 23 Kanzaki, M. & Pessin, J. E. Insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes is dependent upon cortical actin remodeling. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 42436–42444, doi:10.1074/jbc.M108297200 (2001).
- 24 Ullmann, U. *et al.* Epithelial-mesenchymal transition process in human embryonic stem cells cultured in feeder-free conditions. *Molecular Human Reproduction* **13**, 21–32, doi:10.1093/molehr/gal091 (2007).
- 25 Peinado, H. C., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *International Journal of Developmental Biology* **48**, 365–375, doi:10.1387/ijdb.041794hp (2004).

- 26 Medici, D., Hay, E. D. & Olsen, B. R. Snail and Slug Promote Epithelial-Mesenchymal Transition through beta-Catenin-T-Cell Factor-4-dependent Expression of Transforming Growth Factor-beta 3. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4875-4887, doi:10.1091/mbc.E08-05-0506 (2008).
- 27 Ten Berge, D. *et al.* Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nature Cell Biology* **13**, 1070-U1088, doi:10.1038/ncb2314 (2011).
- 28 Bechard, M., Trost, R., Singh, A. M. & Dalton, S. Frat Is a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt-Regulated Determinant of Glycogen Synthase Kinase 3 beta Subcellular Localization in Pluripotent Cells. *Molecular and Cellular Biology* **32**, 288-296, doi:10.1128/mcb.05372-11 (2012).
- 29 Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y. & Johnson, K. R. Cadherin switching. *J. Cell Sci.* **121**, 727-735, doi:10.1242/jcs.000455 (2008).
- 30 Lade-Keller, J. *et al.* E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *British Journal of Dermatology* **169**, 618-628, doi:10.1111/bjd.12426 (2013).
- 31 Ribeiro, A. S. & Paredes, J. P-cadherin linking breast cancer stem cells and invasion: a promising marker to identify an "intermediate/metastable" EMT state. *Frontiers in Oncology* **4**, doi:10.3389/fonc.2014.00371 (2015).
- 32 Vieira, A. F. *et al.* P-cadherin signals through the laminin receptor alpha 6 beta 4 integrin to induce stem cell and invasive properties to basal-like breast cancer cells. *Oncotarget* **5**, 679-692 (2014).
- 33 Vieira, A. F. & Paredes, J. P-cadherin and the journey to cancer metastasis. *Molecular Cancer* **14**, doi:10.1186/s12943-015-0448-4 (2015).
- 34 Paredes, J. *et al.* P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clinical Cancer Research* **11**, 5869-5877, doi:10.1158/1078-0432.ccr-05-0059 (2005).
- 35 Ribeiro, A. S. *et al.* Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells. *Oncogene* **29**, 392-402, doi:10.1038/onc.2009.338 (2010).
- 36 Hamatani, T., Carter, M. G., Sharov, A. A. & Ko, M. S. H. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental Cell* **6**, 117-131, doi:10.1016/s1534-5807(03)00373-3 (2004).
- 37 Falco, G. *et al.* Zscan4: A novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Developmental Biology* **307**, 539-550,

- doi:10.1016/j.ydbio.2007.05.003 (2007).
- 38 Zalzman, M. *et al.* Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* **464**, 858–U866, doi:10.1038/nature08882 (2010).
- 39 Hirata, T. *et al.* Zscan4 transiently reactivates early embryonic genes during the generation of induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports* **2**, doi:10.1038/srep00208 (2012).
- 40 Amano, T. *et al.* Zscan4 restores the developmental potency of embryonic stem cells. *Nature Communications* **4**, doi:10.1038/ncomms2966 (2013).
- 41 Storm, M. P. *et al.* Characterization of the Phosphoinositide 3-Kinase-Dependent Transcriptome in Murine Embryonic Stem Cells: Identification of Novel Regulators of Pluripotency. *Stem Cells* **27**, 764–775, doi:10.1002/stem.3 (2009).
- 42 Furusawa, C. & Kaneko, K. Theory of robustness of irreversible differentiation in a stem cell system: Chaos hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **209**, 395–416, doi:10.1006/jtbi.2001.2264 (2001).
- 43 Wray, J. *et al.* Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation (vol 13, pg 838, 2011). *Nature Cell Biology* **14**, 555–555, doi:10.1038/ncb0512-555a (2012).
- 44 Ying, Q. L. *et al.* The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519–U515, doi:10.1038/nature06968 (2008).
- 45 Jewell, J. L., Oh, E. & Thurmond, D. C. Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4. *Am. J. Physiol. -Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R517–R531, doi:10.1152/ajpregu.00597.2009 (2010).
- 46 Latham, C. F. *et al.* Molecular dissection of the Munc18c/syntaxin4 interaction: Implications for regulation of membrane trafficking. *Traffic* **7**, 1408–1419, doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00474.x (2006).
- 47 Bennett, M. K. *et al.* THE SYNTAXIN FAMILY OF VESICULAR TRANSPORT RECEPTORS. *Cell* **74**, 863–873, doi:10.1016/0092-8674(93)90466-4 (1993).
- 48 Chen, C. S. *et al.* Homology with Vesicle Fusion Mediator Syntaxin-1a Predicts Determinants of Epimorphin/Syntaxin-2 Function in Mammary Epithelial Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 6877–6884, doi:10.1074/jbc.M805908200 (2009).
- 49 Hagiwara, N., Kadono, N., Miyazaki, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties. *Cell and Tissue Research* **354**, 581–591,

- doi:10.1007/s00441-013-1680-0 (2013).
- 50 Hirai, Y. *et al.* Epimorphin functions as a key morphoregulator for mammary epithelial cells. *Journal of Cell Biology* **140**, 159–169, doi:10.1083/jcb.140.1.159 (1998).
- 51 Hirai, Y. Epimorphin as a morphogen: Does a protein for intracellular vesicular targeting act as an extracellular signaling molecule? *Cell Biology International* **25**, 193–195, doi:10.1006/cbir.2000.0618 (2001).
- 52 Kadono, N., Hagiwara, N., Tagawa, T., Maekubo, K. & Hirai, Y. Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Is a Potent Cornification Regulator of Epidermal Keratinocytes. *Molecular Medicine* **21**, doi:10.2119/molmed.2014.00234 (2015).
- 53 Radisky, D. C., Stallings-Mann, M., Hirai, Y. & Bissell, M. J. Single proteins might have dual but related functions in intracellular and extracellular microenvironments. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 228–U285, doi:10.1038/nrm2633 (2009).
- 54 Hirai, Y. *et al.* Epimorphin mediates mammary luminal morphogenesis through control of C/EBP beta. *Journal of Cell Biology* **153**, 785–794, doi:10.1083/jcb.153.4.785 (2001).
- 55 Hirai, Y. *et al.* Non-classical export of epimorphin and its adhesion to alpha v-integrin in regulation of epithelial morphogenesis. *J. Cell Sci.* **120**, 2032–2043, doi:10.1242/jcs.006247 (2007).
- 56 Okugawa, Y. & Hirai, Y. Overexpression of extracellular epimorphin leads to impaired epidermal differentiation in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1884–1893, doi:10.1038/jid.2008.22 (2008).
- 57 Kadono, N., Miyazaki, T., Okugawa, Y., Nakajima, K. & Hirai, Y. The impact of extracellular syntaxin4 on HaCaT keratinocyte behavior. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**, 1200–1205, doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.107 (2012).
- 58 Inoue, A., Obata, K. & Akagawa, K. Cloning and Sequence Analysis of cDNA for a Neuronal Cell. Membrane Antigen, HPC-1. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 10613–10619 (1992).
- 59 Spring, J., Kato, M. & Bernfield, M. Epimorphin is related to a new class of neuronal and yeast vesicle targeting proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 124–125 (1993).
- 60 Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M. Isolation of placental cadherin cDNA: identification of a novel gene family of cell-cell adhesion molecules. *Embo Journal* **6**, 3655–3661 (1987).

- 61 Okashita, N. *et al.* PRDM14 promotes active DNA demethylation through the Ten-eleven
translocation (TET)-mediated base excision repair pathway in embryonic stem cells.
Development **141**, 269–280, doi:10.1242/dev.099622 (2014).
- 62 Wang, W. *et al.* Chromosomal transposition of PiggyBac in mouse embryonic stem cells.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
105, 9290–9295, doi:10.1073/pnas.0801017105 (2008).
- 63 Guo, G. *et al.* Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state
pluripotency. *Development* **136**, 1063–1069, doi:10.1242/dev.030957 (2009).
- 64 Woltjen, K. *et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced
pluripotent stem cells. *Nature* **458**, 766–U106, doi:10.1038/nature07863 (2009).
- 65 Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years
of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089 (2012).
- 66 Shirai K, H. N., Horigome T, Hirose Y, KAdono N, Hirai Y. Extracellularly Extruded
Syntaxin-4 Binds to Laminin and Syndecan-1 to Regulate Mammary Epithelial
Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* **9999**, 1–13, doi:10.1002/jcb.25661
(2016).
- 67 Park, J. H., Hong, S. W., Yun, S., Lee, D. K. & Shin, C. Effect of siRNA with an
Asymmetric RNA/dTdT Overhang on RNA Interference Activity. *Nucleic Acid*
Therapeutics **24**, 364–371, doi:10.1089/nat.2014.0494 (2014).
- 68 Maeda, M., Johnson, K. R. & Wheelock, M. J. Cadherin switching: essential for
behavioral but not morphological changes during an epithelium-to-mesenchyme
transition. *J. Cell Sci.* **118**, 873–887, doi:10.1242/jcs.01634 (2005).
- 69 Bamburg, J. R. Proteins of the ADF/cofilin family: Essential regulators of actin
dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **15**, 185–230,
doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.185 (1999).
- 70 Hay, E. D. Extracellular matrix, cell skeletons, and embryonic development.
American Journal of Medical Genetics **34**, 14–29, doi:10.1002/ajmg.1320340107
(1989).
- 71 Mani, S. A. *et al.* Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis
and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proceedings of the*
National Academy of Sciences of the United States of America **104**, 10069–10074,
doi:10.1073/pnas.0703900104 (2007).
- 72 Furusawa, C. & Kaneko, K. A Dynamical-Systems View of Stem Cell Biology. *Science*
338, 215–217, doi:10.1126/science.1224311 (2012).
- 73 E Lehtonen, A. L. a. J. T. eratocarcinoma stem cells as a model for differentiation
in the mouse embryo. *International Journal of Developmental Biology* **33**, 105–115

- (1989).
- 74 Linney, E., Neill, S. D. & Prestridge, D. S. Retroviral vector gene expression in F9 embryonal carcinoma cells. *Journal of Virology* **61**, 3248–3253 (1987).
- 75 Jr., L. J. K. a. G. B. P. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research* **24** (1964).
- 76 Komiya, S. *et al.* Apical membrane and junctional complex formation during simple epithelial cell differentiation of F9 cells. *Genes to Cells* **10**, 1065–1080, doi:10.1111/j.1365-2443.2005.00899.x (2005).
- 77 Mummery, C. L., Feijen, A., Moolenaar, W. H., Vandenbrink, C. E. & Delaat, S. W. Establishment of a differentiated mesodermal line from P19 EC cells expressing functional PDGF and EGF receptors. *Experimental Cell Research* **165**, 229–242, doi:10.1016/0014-4827(86)90547-1 (1986).
- 78 Wen, J. Y. *et al.* Proteomic analysis of cardiomyocytes differentiation in mouse embryonic carcinoma P19CL6 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **102**, 149–160, doi:10.1002/jcb.21285 (2007).
- 79 Morgani, S. M. & Brickman, J. M. The molecular underpinnings of totipotency. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **369**, doi:10.1098/rstb.2013.0549 (2014).
- 80 Sancho, M. *et al.* Competitive Interactions Eliminate Unfit Embryonic Stem Cells at the Onset of Differentiation. *Developmental Cell* **26**, 19–30, doi:10.1016/j.devcel.2013.06.012 (2013).
- 81 Kunath, T. *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, doi:10.1242/dev.02880 (2007).
- 82 Sieber, J. J., Willig, K. I., Heintzmann, R., Hell, S. W. & Lang, T. The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophysical Journal* **90**, 2843–2851, doi:10.1529/biophysj.105.079574 (2006).
- 83 Izmailyan, R. *et al.* Integrin beta 1 Mediates Vaccinia Virus Entry through Activation of PI3K/Akt Signaling. *Journal of Virology* **86**, 6677–6687, doi:10.1128/jvi.06860-11 (2012).
- 84 Cartwright, P. *et al.* LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885–896, doi:10.1242/dev.01670 (2005).
- 85 Huang, T. S. *et al.* A Regulatory Network Involving beta-Catenin, E-Cadherin, PI3K/Akt, and Slug Balances Self-Renewal and Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Response to Wnt Signaling. *Stem Cells* **33**, 1419–1433,

- doi:10.1002/stem.1944 (2015).
- 86 Barber, A. G. *et al.* PI3K/AKT pathway regulates E-cadherin and Desmoglein 2 in aggressive prostate cancer. *Cancer Medicine* **4**, 1258–1271, doi:10.1002/cam4.463 (2015).
- 87 Paling, N. R. D., Wheadon, H., Bone, H. K. & Welham, M. J. Regulation of embryonic stem cell self-renewal by phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 48063–48070, doi:10.1074/jbc.M406467200 (2004).
- 88 Watanabe, S. *et al.* Activation of Akt signaling is sufficient to maintain pluripotency in mouse and primate embryonic stem cells. *Oncogene* **25**, 2697–2707, doi:10.1038/sj.onc.1209307 (2006).
- 89 Faraldo, M. M. *et al.* beta-Catenin regulates P-cadherin expression in mammary basal epithelial cells. *Febs Letters* **581**, 831–836, doi:10.1016/j.febslet.2007.01.053 (2007).
- 90 Albergaria, A. *et al.* ICI 182,780 induces P-cadherin overexpression in breast cancer cells through chromatin remodelling at the promoter level: a role for C/EBP beta in CDH3 gene activation. *Human Molecular Genetics* **19**, 2554–2566, doi:10.1093/hmg/ddq134 (2010).
- 91 Shimomura, Y., Wajid, M., Shapiro, L. & Christiano, A. M. P-cadherin is a p63 target gene with a crucial role in the developing human limb bud and hair follicle. *Development* **135**, 743–753, doi:10.1242/dev.006718 (2008).
- 92 Priya, R. & Yap, A. S. Making a Choice: How Cadherin Switching Controls Cell Migration. *Developmental Cell* **34**, 383–384, doi:10.1016/j.devcel.2015.08.002 (2015).
- 93 Scarpa, E. *et al.* Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental Cell* **34**, 421–434, doi:10.1016/j.devcel.2015.06.012 (2015).
- 94 Takeichi, M. MORPHOGENETIC ROLES OF CLASSIC CADHERINS. *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 619–627, doi:10.1016/0955-0674(95)80102-2 (1995).
- 95 Plutoni, C. *et al.* P-cadherin promotes collective cell migration via a Cdc42-mediated increase in mechanical forces. *Journal of Cell Biology* **212**, 199–217, doi:10.1083/jcb.201505105 (2016).
- 96 Mandeville, J. A. *et al.* P-cadherin as a prognostic indicator and a modulator of migratory behaviour in bladder carcinoma cells. *Bju International* **102**, 1707–1714, doi:10.1111/j.1464-410X.2008.08115.x (2008).
- 97 Hishida, T. *et al.* Functional Compensation Between Myc and PI3K Signaling Supports Self-Renewal of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells* **33**, 713–725,

- doi:10.1002/stem.1893 (2015).
- 98 Haque, A., Yue, X. S., Motazedian, A., Tagawa, Y. & Akaike, T. Characterization and neural differentiation of mouse embryonic and induced pluripotent stem cells on cadherin-based substrata. *Biomaterials* **33**, 5094–5106, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.04.003 (2012).
- 99 Basilicata, M. F., Frank, M., Solter, D., Brabletz, T. & Stemmler, M. P. Inappropriate cadherin switching in the mouse epiblast compromises proper signaling between the epiblast and the extraembryonic ectoderm during gastrulation. *Scientific Reports* **6**, doi:10.1038/srep26562 (2016).
- 100 Rogers, C. D., Saxena, A. & Bronner, M. E. Sip1 mediates an E-cadherin-to-N-cadherin switch during cranial neural crest EMT. *Journal of Cell Biology* **203**, 835–847, doi:10.1083/jcb.201305050 (2013).
- 101 Yang, C. M. *et al.* Syntaxin 4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* **107**, 1311–1318, doi:10.1172/jci12274 (2001).

第 7 章 参考資料

第 4 章、第 3 節において記載した細胞外syntaxin-4 により発現量が有意に変動した遺伝子リスト(発現変動が 4 倍以上かつ有意水準q-valueが 0.01 以下のもの) を以下に記載する。

Up-regulated (42 Genes)	P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
		2.68E-25	2.71E-22	6.441901436	Pvalb
	1.67E-08	0.00000148	6.378982017	Nebl	XLOC_011635
	1.55E-07	0.00000991	5.757701258	Frrs1l	XLOC_014504
	0.0000997	0.00234889	4.91686417	Wfdc1	XLOC_020241
	0.00020709	0.00425449	4.784127639	Spink2	XLOC_015948
	0.00036427	0.00651313	4.783773456	Rims1	XLOC_000682
	0.00043172	0.00741562	4.637929669	4933422H20Rik	XLOC_003133
	2.46E-08	0.00000207	4.356547654	Fut1	XLOC_018045
	0.0000185	0.00057796	3.729680477	Edn3	XLOC_011535
	0.00035223	0.00636155	3.727069834	Tsga10	XLOC_000722
	8.85E-07	0.0000447	3.461856888	Duoxa1	XLOC_012226
	4.09E-30	8.3E-27	3.454956441	T	XLOC_008204
	0.00050787	0.0083368	3.271532311	5730405O15Rik	XLOC_022189
	2.62E-09	2.73E-07	3.020340997	Col4a5	XLOC_022552
	2.24E-08	0.00000192	2.819239058	Gad1	XLOC_010906
	0.0000963	0.00227932	2.814505944	Gm3414	XLOC_015880
	1.51E-47	1.75E-43	2.743397167	Stx4a	XLOC_018464
	4.93E-35	1.64E-31	2.710025626	Shf	XLOC_012227
	4.08E-17	1.5E-14	2.68816501	Frem2	XLOC_013206
	0.00010698	0.00248674	2.651385185	Fer1l4	XLOC_012397
	3.07E-07	0.0000178	2.633984759	Cxx1c	XLOC_022295
	0.00000112	0.0000548	2.631951397	Cdx1	XLOC_009752
	0.000017	0.00053887	2.577476868	Gm16023	XLOC_015025
	0.00023762	0.00470864	2.576832407	Hmcn1	XLOC_001055
	1.76E-08	0.00000155	2.571844654	Pcdh7	XLOC_015247
	5.69E-10	6.99E-08	2.502587699	Thsd4	XLOC_021823
	4.28E-22	2.93E-19	2.43136854	St3gal1	XLOC_007118
	2.67E-17	1.02E-14	2.334411538	Madcam1	XLOC_001545
	0.00000353	0.00014362	2.325212618	4930556M19Rik	XLOC_006631
	2.17E-17	8.55E-15	2.325148438	Sp5	XLOC_010904
	0.0000836	0.00201733	2.291380548	Fgf8	XLOC_010538
	0.00000403	0.0001606	2.257592134	Col4a6	XLOC_023056
	6.11E-11	9.36E-09	2.233708625	Cxcl12	XLOC_016819
	0.0000002	0.0000123	2.200744747	Tnc	XLOC_014555
	4.71E-21	2.96E-18	2.159019052	Chac1	XLOC_011169
	0.00000169	0.000077	2.123771292	Plekhh3	XLOC_003878
	0.0000283	0.00083244	2.077028614	Rcor1	XLOC_004479
	5.71E-23	4.57E-20	2.070049006	Pck2	XLOC_005979
	0.000026	0.00077332	2.066478069	Sat2	XLOC_002687
	0.00040337	0.00701793	2.063773572	Arhgap5	XLOC_004192
	4.08E-52	9.47E-48	2.049901227	Cdh3	XLOC_020182
	0.00000134	0.0000641	2.041189264	Bpifb5	XLOC_011387

Down-regulated
(96 Genes)

P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
0.0000162	0.00051574	-2.045192342	Ces2e	XLOC_020145
0.00046709	0.00783342	-2.060269848	Cox7b2	XLOC_015920
1.5E-11	2.74E-09	-2.06093586	Slc13a5	XLOC_003575
0.00063112	0.0099254	-2.069395521	Tmprss11d	XLOC_015960
3.16E-12	6.63E-10	-2.070620985	Spink3	XLOC_009712
6.99E-15	1.98E-12	-2.11919187	Gpnmb	XLOC_016567
4.15E-09	4.19E-07	-2.121817674	Tmem92	XLOC_003748
0.00042281	0.00729261	-2.132696181	Mst1	XLOC_021379
0.00000543	0.00020529	-2.189481543	Gm12794	XLOC_013928
0.00021672	0.0044077	-2.192903602	Grin2a	XLOC_007817
1.33E-09	0.00000015	-2.20954754	Vdr	XLOC_007348
1.96E-17	7.97E-15	-2.21703053	Cyp1a1	XLOC_021140
0.0000034	0.00013917	-2.232918512	Ccr4	XLOC_022068
5.27E-23	4.37E-20	-2.235700067	Gpa33	XLOC_000496
0.00000228	0.00010019	-2.245182553	Mapk10	XLOC_016033
8.65E-07	0.0000438	-2.254647813	Spesp1	XLOC_021833
3.16E-16	1.01E-13	-2.295469837	Fbp2	XLOC_005567
4.78E-08	0.00000355	-2.348389077	Gm2016	XLOC_004340
0.0000469	0.00125862	-2.36029789	Ctrl	XLOC_020697
0.0000693	0.00174267	-2.360350273	Hist3h2a	XLOC_002598
0.00019785	0.00412442	-2.366275168	Cml2	XLOC_017295
0.0000105	0.00036549	-2.391585229	Gm11544	XLOC_003749
0.0000063	0.00023315	-2.400233761	Zscan4e	XLOC_018693
6.78E-09	6.38E-07	-2.405978803	D030018L15Rik	XLOC_007336
0.000024	0.00072132	-2.412144203	Wdr20b	XLOC_004221
4.28E-30	8.3E-27	-2.415227709	Gm7102	XLOC_010593
0.00048738	0.00810348	-2.427818194	Krt5	XLOC_007415
0.00053241	0.00862386	-2.456332486	Nckap5	XLOC_000972
0.0005324	0.00862386	-2.456335165	Krt15	XLOC_003852
0.00053235	0.00862386	-2.456349832	AI847159	XLOC_012262
1.08E-13	2.68E-11	-2.495241359	Usp17le	XLOC_019383
0.00000854	0.00030421	-2.510470321	Ndnf	XLOC_016631
0.0000173	0.00054724	-2.511268196	Spink10	XLOC_009523
0.00029671	0.00558443	-2.532795091	Csf1r	XLOC_009515
0.0004492	0.00765491	-2.533664955	Dnajb13	XLOC_019296
1.07E-16	3.64E-14	-2.542263112	Gm8300	XLOC_004335
2.3E-32	5.93E-29	-2.566794203	Dusp27	XLOC_001128
8.02E-12	1.55E-09	-2.601310778	Usp17la	XLOC_018303
0.00050022	0.00825203	-2.605538775	Cyp11a1	XLOC_021144
0.0000909	0.00217432	-2.674528102	Tm4sf1	XLOC_013213
8.94E-27	1.09E-23	-2.720357356	Gm2022	XLOC_004341
0.0000391	0.00108262	-2.755101271	Gm5622	XLOC_005944
0.00000032	0.0000184	-2.770381603	Prmt8	XLOC_017485
7.05E-20	4E-17	-2.779433838	1700030L20Rik	XLOC_013600
6.19E-14	1.6E-11	-2.781311721	Gm5039	XLOC_004760
0.00061814	0.00976089	-2.795392758	Cd96	XLOC_008017
0.00008	0.00194813	-2.805727893	Tesc	XLOC_015487
0.0002569	0.0050042	-2.80923818	Xirp2	XLOC_010888

P-value	Q-value	logFC	Gene_Sym	Gene_ID
8.75E-08	0.00000603	-2.847680419	Gm1995	XLOC_004339
0.0000229	0.00069536	-2.863481368	Ctxn3	XLOC_009496
2.12E-36	8.21E-33	-2.873074653	Dcdc2c	XLOC_004573
0.00021871	0.0044399	-2.88228013	BB287469	XLOC_004337
0.00032465	0.0060176	-2.912221171	AI662270	XLOC_002863
7.46E-14	1.88E-11	-2.920541889	Gm4971	XLOC_019176
1.24E-17	5.34E-15	-2.965025919	Zscan4a	XLOC_018690
0.00000442	0.00017278	-2.977802365	Gm13119	XLOC_014241
3.11E-23	2.78E-20	-2.984901882	D17Ert648e	XLOC_008774
6.06E-10	7.41E-08	-3.104147993	Gm2027	XLOC_004182
3.9E-46	3.02E-42	-3.122619226	Gm20767	XLOC_005282
0.00000552	0.00020807	-3.135977495	Gm13128	XLOC_014240
2.27E-08	0.00000193	-3.144462691	Fam159b	XLOC_005717
3.07E-26	3.57E-23	-3.176211149	Zscan4c	XLOC_017668
2.56E-07	0.0000152	-3.215734392	Tdpoz4	XLOC_012842
7.82E-28	1.3E-24	-3.228172572	AF067061	XLOC_005283
4.38E-19	2.19E-16	-3.230645622	Gm5662	XLOC_004758
3.09E-19	1.59E-16	-3.252258567	B020031M17Rik	XLOC_005755
0.00063188	0.00993056	-3.292229707	Trim43a	XLOC_021282
2.36E-19	1.25E-16	-3.342710106	Zscan4f	XLOC_017669
0.00023327	0.00464629	-3.396578899	Pramel6	XLOC_011007
1.85E-08	0.00000161	-3.401444404	Usp17lc	XLOC_018272
2.89E-34	8.39E-31	-3.412070659	Gm8994	XLOC_016945
0.00000136	0.0000649	-3.42872639	Cdhr2	XLOC_005090
2.94E-18	1.31E-15	-3.451114743	Zscan4d	XLOC_018692
0.00000802	0.00028902	-3.480606389	Cyp26b1	XLOC_017281
0.00011942	0.0027295	-3.493623914	Gm13109	XLOC_014944
0.0000611	0.00156284	-3.584555422	Usp17ld	XLOC_019337
0.0000312	0.0009057	-3.67007993	Ube2dnl1	XLOC_022491
1.56E-14	4.2E-12	-3.680689609	Tcstv3	XLOC_005285
2.99E-12	6.32E-10	-3.75088191	Cyp2b23	XLOC_018879
1.44E-07	0.00000926	-3.782138646	BC147527	XLOC_005284
2.18E-09	2.32E-07	-3.908072628	Gm4858	XLOC_012832
9.1E-08	0.00000624	-4.030260041	9330159F19Rik	XLOC_001362
0.0000167	0.0005305	-4.030877571	AF067063	XLOC_005753
0.00000107	0.0000524	-4.034966212	Iqub	XLOC_017044
1.81E-08	0.00000159	-4.377729415	Edn2	XLOC_014042
4.43E-19	2.19E-16	-4.723561445	Usp17lb	XLOC_019384
0.00048896	0.00812396	-4.792300963	Dpep3	XLOC_020701
0.00018905	0.00397638	-4.796045477	BC080695	XLOC_014232
0.00018903	0.00397638	-4.796063808	A430089I19Rik	XLOC_016009
0.0000903	0.00216313	-4.928822088	Zscan4b	XLOC_018691
0.00041638	0.00720649	-4.937617042	Gm13078	XLOC_014234
0.00023877	0.00472746	-5.042242675	Trim75	XLOC_020503
0.0000347	0.00098271	-5.16086524	Tdpoz3	XLOC_012843
0.0000208	0.000639	-5.16254066	Gm6890	XLOC_022378
0.0000111	0.00037847	-5.361193588	AU015228	XLOC_011247
0.00000483	0.00018667	-5.36358869	Gm21319	XLOC_004755

第 8 章 付録

本研究の内容はCell & tissue researchおよびScientific Reportsに投稿し、査読を経て掲載された。次ページから「Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells」 および「Extracellularly syntaxin-4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells that impacts cell adhesion properties」を付録として添付する。

第 9 章 研究業績

論文 (査読付)

○Hagiwara N, Shirai K, Kido T, Horigome T, Yasue A, Adachi N, Hirai Y
「Membrane translocation of t-SNARE protein syntaxin-4 abrogates ground-state pluripotency in mouse embryonic stem cells」 Scientific Reports 2017 Jan 6;7:39868.
doi: 10.1038/srep39868

○Hagiwara N, Kadono N, Miyazaki T, Maekubo K, Hirai Yohei「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」 Cell and Tissue Research 2013 Nov;354(2) :pp581-91

Shirai K, ○Hagiwara N, Horigome T, Hirose Y, Kadono N, Hirai Y. 「Extracellularly extruded syntaxin-4 binds to laminin and syndecan-1 to regulate mammary epithelial morphogenesis.」 J.Cell. Biochem 2016.10.1002/jcb.25661

Miyazaki T, Kadono N, Konishi Y, ○Hagiwara N, Maekubo K, Hirai Yohei
「Effluent syntaxin3 from dying cells affords protection against apoptosis in epidermal keratinocytes.」Exp. Dermatology 2013 Dec;22(12) :pp845-7

Miura M, ○Hagiwara N, Derek C Radisky, Hirai Y 「CCAAT/enhancer binding protein beta (C/EBP beta) isoform balance as a regulator of epithelial-mesenchymal transition in mouse mammary epithelial cells」 Experimental Cell Research 2014 Sep 10;327(1)

Kadono N, OHagiwara N, Tagawa T, Maekubo K, Hirai Y. 「Extracellularly Extruded Syntaxin-4 Is a Potent Cornification Regulator of Epidermal Keratinocytes.」 Mol Med. 2015 Jan 14;21:77-86.

査読なし

○萩原 奈津美、葛野 奈々子、平井 洋平

「表皮形成におけるEGF受容体とエピモルフィン」『生体の化学』公益財団法人金原一郎記念医学医療 振興財団 2013年64巻5号P.456-457

学会発表 (査読なし)

・国際会議における発表 (ポスター発表)

○ Hagiwara N, Hirai Y「 Plasmalemmal syntaxins as potential regulators of the EC cell differentiation」CDB 国際シンポジウム (神戸) 2014年3月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Plasmalemmal syntaxins regulate cell adhesion properties EC cells, leading to their cytodifferentiation.」第12回国際幹細胞学会 (カナダ) 2014年6月

○ Hagiwara N, Hirai Y「Functional expression of plasmalemmal syntaxins on germ-layer differentiation executed by their extracellular localization」国際合同発生生物学会 (スペイン) 2014年10月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Spontaneous expression of extracellular Syntaxins perturbs stemness in embryonic stem cells」 アメリカ細胞生物学会 (アメリカ) 2015 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Spontaneously extruded syntaxin4 disturb stemness of embryonic stem cells via regulation of zscan4 family.」

第 14 回国際幹細胞学会 (アメリカ) 2016 年 6 月

・国内会議における発表

口頭発表

○ Hagiwara N, Hirai Y

「Extracellular syntaxin4 induces differentiation and survival in teratocarcinoma F9 cells.」

第 35 回日本分子生物学会大会(福岡) Flash talk 2012 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」

第 46 回日本発生生物学会 サテライトワークショップ 2013 年 5 月

○ Hagiwara N 「万能細胞における不均一性のメカニズム解明」 第 2 回超異分野学会
2015 年 3 月

ポスター発表

○Hagiwara N, Hirai Y

「The effect of extracellularly presented syntaxin 4 on the differentiation and survival of F9 teratocarcinoma cells 」 第 45 回日本発生生物学会大会 (神戸) 2012 年 5 月

○Hagiwara N, Hirai Y

「Extracellular syntaxin4 induces differentiation and survival in teratocarcinoma F9 cells.」

第 35 回日本分子生物学会大会 (福岡) 2012 年 12 月

○Hagiwara N, Hirai Y「Extracellular syntaxin4 triggers the differentiation program in teratocarcinoma F9 cells with impacts on cell adhesion properties.」

第 46 回日本発生生物学会大会 (島根) 2013 年 5 月

○Hagiwara N, Hirai Y 「EC細胞における細胞外syntaxin4 による細胞接着と分化への影響」 第 36 回日本分子生物学会 (神戸) 2013 年 12 月

○Hagiwara N, Hirai Y 「細胞外で機能発揮するsyntaxinsの三胚葉分化への影響」

第 37 回日本分子生物学会 (横浜) 2014 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「 The t-SNARE Syntaxins exert morphological and differentiation-inducing functions upon their extracellular localization.」 第 67 回日本細胞生物学会大会 (船堀) 2015 年 7 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「細胞表面に局所的に提示されたSyntaxinは胚性幹細胞の未分化性を破綻させる」 第 68 回日本分子生物学会大会 (神戸) 2016 年 12 月

○ Hagiwara N, Hirai Y 「Spontaneously extruded syntaxin4 disturbs stemness of embryonic stem cells via regulation of PI3K/Akt signaling.」 第 39 回日本分子生物学会 (横浜) 2016 年 12 月

第 10 章 謝辞

本研究を行うにあたり、抗E-、P- cadherin抗体およびP-cadherinのcDNAをご提供くださった理研の竹市先生、また、ES細胞および発現コンストラクトをご提供いただきました関先生に心より感謝申し上げます。。

ご多忙の中、主査・副査としてご助言・ご助力いただきました大谷 清先生、鈴木 信太郎先生、また、学生実習や、卒業研究発表などの数々の発表会で厳しくも温かく、ご指導を賜りました生命科学専攻の先生方、並びに学生の皆様に深く感謝致します。

仮配生の時から 5 年間、どんなときでも親身になってご指導くださいました平井 洋平先生、本当にありがとうございました。研究者としてのはじめの一步を平井先生の下で踏み出せたことが私にとって一番の幸運です。

また、悔いなく充実した研究生生活を過ごすことができたのは個性溢れる平井研究室のメンバーと安達直樹先生のおかげです。本当にありがとうございました。

最後に、これまで自由奔放な私を温かく見守り、全面的に応援してくれる家族がいることを心から幸せに思います。

今まで本当にありがとうございました。これからもよろしくお願いします。