

# 霊長類発生学研究の基盤構築

令和2年度～令和4年度

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）

学術変革領域研究 B

研究成果報告書

令和5年6月

領域代表者 中村友紀

京都大学・白眉センター・特定准教授

## 研究領域の目的、概要

発生学とは、1つの受精卵から個体が構築されるメカニズムを探求する学問である。ヒト胚は受精後一週間ほどで子宮内膜へと着床し、その直後本格的な形態形成プログラムを駆動する。そして均質な多能性細胞 Epiblast (EPI) から実質機能細胞である三胚葉（外/中/内胚葉）分化を伴う原腸陥入が開始される。その後も発生プログラムが協調的に駆動され、基本的な臓器原器や四肢が完成し外見的にいわゆる胎児となる。また、ヒトの流産の約 80% が着床期に起こるとの報告、さらには我が国有数の研究領域である胚性幹細胞 (Embryonic stem cell; ESC) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) を起点とする再生医療/創薬研究は、in vitro における三胚葉分化と臓器形成の再現を前提とすることから、着床後の胚発生は応用に関しても関心が高い。このようにヒト着床後の胚発生研究は、ヒトの根源となる決定的な時期であるとともに応用面においても重要な分野である。

しかしヒト胚の着床期は母体が妊娠に気付かない時期であり胚の採取がほぼ不可能なこと、また遺伝子改変研究も生命倫理議論が未成熟であることから、分子レベルでの知見はほぼない。哺乳類ではこれまで様々な生命現象がマウスをモデルに明らかにされてきたが、着床期胚発生は胚-胎盤-子宮など形態からして大きな種差が表出しており、霊長類の適切な参照対象となりがたい。進化上より近縁な非ヒト霊長類においても、コストを始めとする様々な要因や高度な生殖技術が必要なことからやはり着床後胚を得ることは容易ではなく、包括的な発生学的研究は極めて難しい。さらに一般的な遺伝子改変実験では全身性に変異を持つ個体の選抜を F1 世代で行うが、霊長類では世代時間が長く産子数も少ないことから現実的ではない。このように霊長類着床後の胚発生研究は、試料採取の困難さと世代時間の長さなどの事由により、分子レベルの研究はなく発生メカニズムはほぼブラックボックスのままであった(図1)。




	マウス	非ヒト霊長類	ヒト
着床後胚試料	円筒型  採取可	胚盤構造  採取可能だが極めて困難	胚盤構造  採取不可
利用可能な着床後胚情報	形態情報 遺伝子発現情報 発生メカニズム	形態情報 遺伝子発現情報 のみ利用可能	100年前の 形態情報のみ 利用可能
発生工学技術	遺伝子工学 生殖工学 多種多様に利用可能	可能だが難あり 限定的 ↓ 分子レベル 限定的理解	生命倫理的議論 尽くされていない、 技術的にも難あり。 ↓ 分子レベル 不可能

図1. 霊長類着床後胚に関する発生学の現状

本研究領域「霊長類着床後胚発生研究の基盤創設」ではこれらの問題を解決するため、(A) 霊長類胚を起点とした試験管内胚発生モデルの構築と、(B) 霊長類に最適化された革新的遺伝子工学技術の開発を目指し、以下のような研究項目にて研究開発を行った。

(A) 試料問題の解決に向け、A01 中村らは生理的環境を正確に模倣した試験管内培養法の構築を目標に、in utero 胚における発生現象の分子レベルでの解明を目指した。また A02 高島らは、in vitro における子宮内環境の構築および胚-子宮内膜の相互作用の解明を目指した。

A01 中村班；生体内胚発生を模倣した試験管内胚発生モデル基盤と評価用の情報基盤の構築

A02 高島班；胚と母体の相互作用再現を見据えた試験管内子宮内環境基盤の構築

(B) ファウンダー(F0) 世代で全身性遺伝子改変胚を作製する技術を開発するため、B01 築山らは受精卵に対する遺伝子改変法を改良する方法の開発を行い、B02 渡部らは遺伝子改変を施した幹細胞を起点に機能的配偶子を誘導するための培養法の確立を行うことで、二つの方向から発生工学基盤の構築を目指した。

B01 築山班；ファウンダー(F0) 世代からの解析を可能にする受精卵の遺伝子改変技術基盤の構築

B02 渡部班；ESC/iPSC より遺伝子改変済み配偶子の誘導を可能とする生殖工学基盤の構築

## 研究組織

研究項目 課題番号	研究課題名	役割	氏名	所属・部局・職
X01 総括班 20H05760	霊長類着床後胚研究のコミュニティ基盤の構築	研究代表者	中村 友紀	京都大学, 白眉センター 特定准教授
A01 計画班 20H05761	臓器形成期までの生体内情報取得と生理的 Ex vivo culture法の確立	研究代表者	中村 友紀	京都大学, 白眉センター 特定准教授
		研究分担者	岡本 郁弘	京都大学, 高等研究院 特定講師
A02 計画班 20H05762	胚と母体の相互作用再現を目的とした試験 管内子宮内環境基盤の構築	研究代表者	高島 康弘	京都大学, iPS細胞研究所 准教授
		研究分担者	中家 雅隆	滋賀医科大学, 動物生命科学研究センター 特任助教
B01 計画班 20H05763	ファウンダー(F0)世代からの解析を可能にする受精卵の遺伝子改変技術基盤の構築	研究代表者	築山 智之	滋賀医科大学, 動物生命科学研究センター 特任准教授
B02 計画班 20H05764	生殖細胞を介した遺伝子改変霊長類作製技術の開発	研究代表者	渡部 聡朗	国立研究開発法人国立成育医療研究センター 専門職

## 交付決定額 (配分額)

年度	合計	直接経費	間接経費
2020年度	55,900 千円	43,000 千円	12,900 千円
2021年度	51,350 千円	39,500 千円	11,850 千円
2022年度	51,350 千円	39,500 千円	11,850 千円
総計	158,600 千円	122,000 千円	36,600 千円

## 各研究項目における目標と主な成果

### 研究項目 A01; 生体内胚発生を模倣した試験管内胚発生モデル基盤と評価用の情報基盤の構築

胚試料量の問題を解決するには、生理的な胚発生を再現した *in vitro* での培養系が必要である。A01 中村らはカニクイザル胚を用いた試験管内培養法の開発のため、scRNA-seq 法を用いて *in utero* 胚に出現する全細胞系譜と遺伝子発現動態や、エピゲノム制御の一例として X 染色体不活化動態の解析、さらには着床期胚の外環境である卵黄嚢液内容物の分析など、*in utero* における多角的な胚発生情報の取得を行った。

この過程において、①これまで大きな問題であった scRNA-seq の大きなノイズを除去する数学的アルゴリズム RECODE を開発し、連続的に形質変容する分化過程を正確に描写することを可能にした (*Life Sci Alliance* 2022)。そして、②B01 築山らの協力の下、カニクイザル受精後 15~23 日齢 (E15~23) における *in utero* 胚を採取し、卵黄嚢液を採取すると同時に、10X Genomics 社の scRNA-seq システムと RECODE を用いた解析を行った。その結果、多数のサブタイプを含む

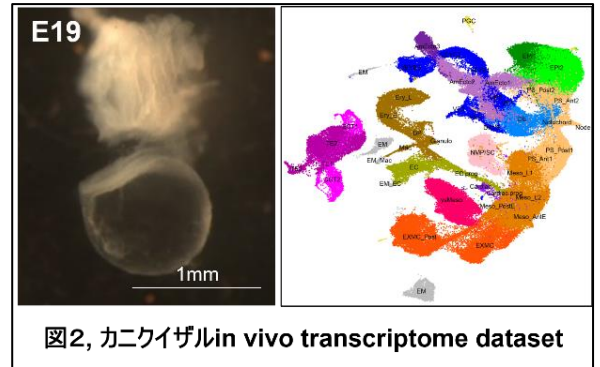


図2, カニクイザル *in vivo* transcriptome dataset

全細胞種とそれぞれに特徴的な発現をする遺伝子を同定した(図2)。そのうち霊長類特異的な構造物である胚体外間質細胞(Extra-embryonic mesenchyme; EXMC)には3種類存在し、そのうち卵黄嚢間質細胞(yolk sac EXMC; ysEXMC)はE19以降に出現することを見出した。また、マウスではysEXMCから出現することが知られている初期の造血細胞(初期血管内皮細胞 Endothelium cells; EC から Erythrocyte; Ery が出現する)が、サルではysEXMCの認められないE15胚でECがすでに存在していることを見出した。これらのことは霊長類における初期造血機構がマウスとは異なる細胞を起源にしている可能性を示唆する(投稿準備中)。

③霊長類におけるX染色体不活化動態に関して、これまでヒト着床直前の胚では両アリルからXISTの発現がみられるにも関わらずどちらもが活性化型であり、どのようなタイミングとメカニズムで不活化が惹起されるか不明であったが、着床前後におけるカニクイザル胚での動態を調べたところ、不活化は着床後約1週間で完了することを見出した。さらに超解像顕微鏡で着床前胚のX染色体を調べたところ、XISTがX染色体上に存在しつつも体細胞のような凝集体が見られないということを見出した(図3)。このことから霊長類のX染色体不活化にはXISTの発現だけでなく、発現後の凝集体形成が必要であることを明らかにした(*Science* 2021)。

さらに④中村らは、*in utero* 胚由来の scRNA-seq データと、カニクイザル多能性幹細胞(Pluripotent Stem Cells; PSCs)から誘導されるカニクイザル始原生殖細胞(Primordial Germ Cells; PGCs)の誘導過程の scRNA-seq データを比較し、カニクイザル PGCLC が羊膜外胚葉様細胞(Amnionic Ectoderm like cells; AmEctoLCs)から出現することを見出した。さらに、生殖系譜へ寄与せず残った AmEctoLC 群はその後 EXMC 系譜へと分化転換することも見出した。以上のことから、長らく大きな論争になっていた霊長類の生殖系譜分化系譜に答えを見出すことができ、さらには他細胞系譜への分化転換から霊長類 PSC の多能性ポテンシャルがマウスとは大きく異なることが明らかにした (投稿準備中)。

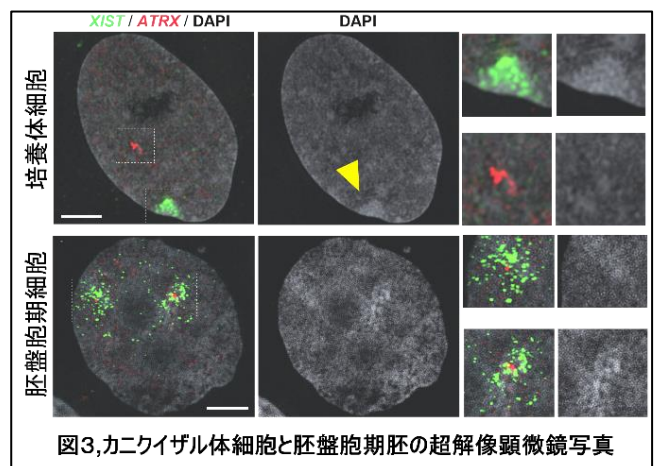
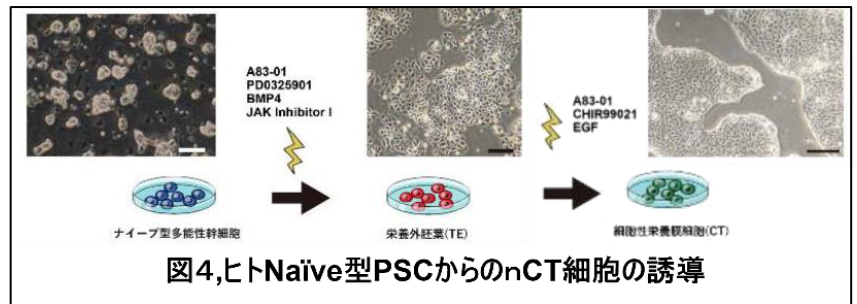


図3, カニクイザル体細胞と胚盤胎期胚の超解像顕微鏡写真

## 研究項目 A02; 胚と母体の相互作用再現を見据えた試験管内子宮内環境基盤の構築

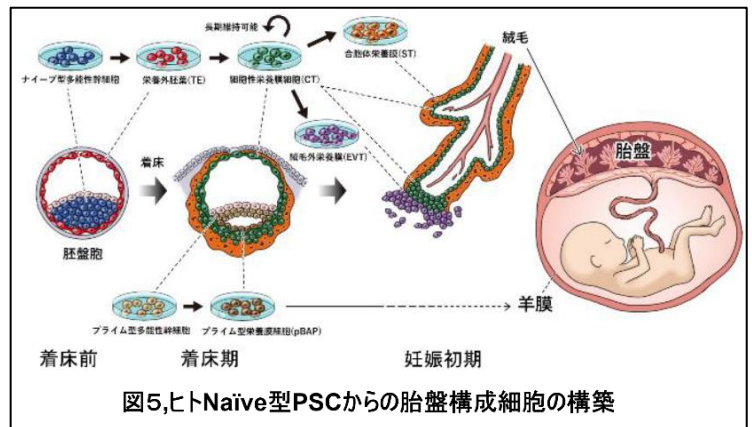
着床後の胚発生は、胚と母体との相互作用の上で成り立つ。**A02 高島ら**は、Naïve 型ヒトPSCを起点にした胎盤構成細胞群の誘導と、ヒトとカニクイザルの非妊娠期/着床成立期における子宮内膜の解析とともに子宮内膜オルガノイドの誘導を行い、胚と母体の相互作用環境の理解と再構築を試みた。

①高島らがこれまでに確立しているヒトNaïve型PSCを起点にBMP/A83-01 (Activin inhibitor)/ PD0325901 (Mek inhibitor)/ Jaki (Jak inhibitor)を添加した培養系を用いることで、胎盤の基となる栄養膜外胚葉 (Naïve PSC derived Trophectoderm, nTE)を誘導することに成功した。



さらにnTEをA83-01/ CHIR99021 (GSK3b inhibitor)/ EGFを含む培地に移すことで、細胞性栄養膜細胞(cytotrophoblast, CT)へ、さらに培養を続けることで合体性栄養膜(syncytiotrophoblast, ST)と絨毛外栄養膜(Extravillous trophoblast, EVT)へと分化させることに成功した(図4)。In vivoにおいて胚が子宮に着床した後、TEからCTが分化し、その後ST, EVTが分化することで絨毛及び胎盤が構成されることから、Naïve型PSCから胎盤を構成する全細胞種の誘導に成功した。一方ヒトPrimed型PSCを同様の因子BMP/A83/PD03を含む培地で分化誘導するとTE様細胞(Primed derived TE, pTE)が出現するという報告があることから、nTEとpTEの遺伝子発現を比較したところ、pTEはTEではなくAmEctoに類似した細胞であることを見出した。以上のことからNaïve型PSCを起点とすることで真の胎盤構成細胞の分化系譜再現が可能になることを見出した(図5) (Cell Stem Cell 2021, STAR Protocol 2021)。

次に②非妊娠期および着床期の子宮内膜の変化を解明するため、ヒトとカニクイザルの子宮内膜組織を用いたscRNA-seq解析を行い、脱落膜化における遺伝子発現変化を捉えることに成功した(カニクイザル試料に関してはB01 築山らの協力の下、試料採取を行った。また着床期試料に関してはA01 中村らと協力することで、使用個体の削減を図った)。また子宮内膜オルガノイドの誘導では、EGF/Rsponsin-1を含む培地で内膜上皮が、ウシ血清を含む培地で間質細胞が安定に維持培養できることを見出した。更にこれらにホルモン刺激を与えることで、脱落膜期の遺伝子を発現する子宮内膜細胞群を誘導することに成功した(投稿準備中)。



## 研究項目 B01; ファウンダー(F0)世代からの解析を可能にする受精卵の遺伝子改変技術基盤の構築

胚発生を駆動する分子メカニズムの研究には、遺伝子導入を用いた介入研究が必須である。**B01 築山ら**はこれまで、カニクイザル受精前後の卵/胚への遺伝子導入により複数の遺伝子改変サルを作出してきたが、DNA改変活性の残存により2細胞期以降の割球においてランダムに遺伝子改変が起こるモザイク性や、用いるウイルスベクターによる挿入遺伝子のサイズ制限問題に直面していた。本項目では、改変用ベクターに長大なインサートを挿入することが可能なpiggyBacトランスポゾンを利用することで、挿入遺伝子のサイズ制限を回避し、導入/転移を司る転移酵素piggyBacトランスポゼース(PBse)をより厳密に制御する手法を開発すること



で、2細胞期以降の転移を抑制するモザイク性問題の回避を試みた。

PBase の高度な制御を確立するためタンパク質不安定化ドメインとの融合を行い、さらには PBase の残存を視覚的に評価するため蛍光タンパク質も融合した改変 PBase を作成した。この改変 PBase を用いた piggyBac システムの条件検討をマウス胚を用いて行ったところ、1細胞期のみ PBase の活性が限局する条件を見出し、モザイク性を排したトランスジェニック胚の作出に成功した(図6)。次にカニクイザル胚を用いた検証を行ったところ、

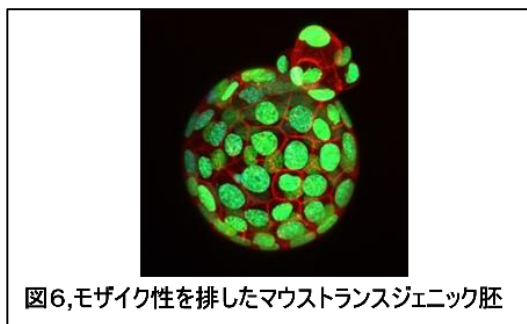


図6,モザイク性を排したマウストランスジェニック胚

全身で均質に導入遺伝子を発現するトランスジェニックサルの作出に成功した。現在、得られたトランスジェニックサルにおけるモザイク性の詳細な評価と表現型の有無を検証中である(投稿準備中)。

### 研究項目 B02; ESC/iPSC より遺伝子改変済み配偶子の誘導を可能とする生殖工学基盤の構築

現在霊長類における遺伝子導入実験は主に受精卵に対して遺伝子導入が行われているが、もしPSCから機能的配偶子が誘導できれば無尽蔵に試料が得られるだけでなく、遺伝子改変PSCを起点とすることで全身性の遺伝子改変動物の作出が可能になる。B02 渡部らはこれまで、マーモセットPSCを起点に霊長類PGCLC分化に必須の遺伝子であるSOX17のmRNAを導入することで効率よくPGCLCを誘導する方法を開発していた。本項目ではこれを発展させ、マーモセット雄性生殖細胞系譜の分化誘導系確立とその性状解析を試みた。そのためマーモセットPGCLCとマウス精巣体細胞、もしくはマーモセット新生児精巣細胞との再構成精巣の作出を行い、雄性生殖細胞分化過程を再現できるかどうか検証した。

まず①マウス精巣体細胞とEGFPでラベルしたマーモセットPGCLCの凝集細胞塊を作出し、免疫不全マウスの腎被膜下に移植したところ、精細管構造とそこに発生の進んだGonocyteマーカー陽性かつEGFP陽性のマーモセット由来細胞が認められた。さらに長期間腎被膜下に置くと、多くの場合がん化様の現象が起こってしまったが、一部でゲノムワイドなDNAのメチル化低下が認められ、生殖系譜特異的な現象であるエピゲノムプログラミングが進行していることが認められた

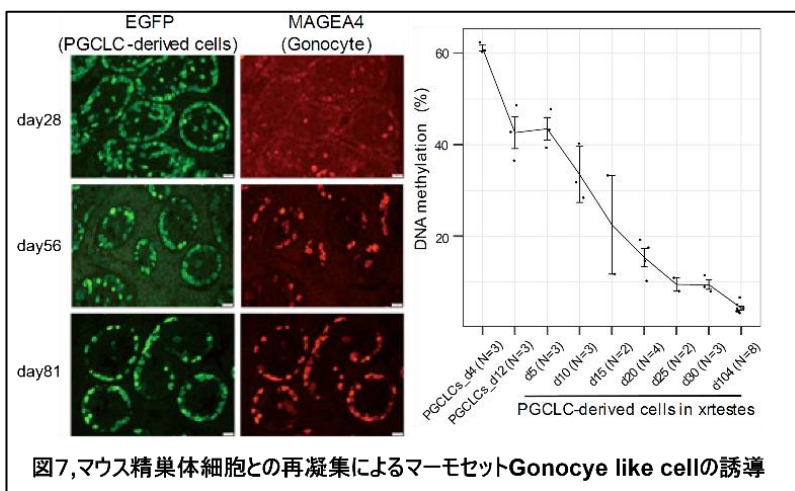


図7,マウス精巣体細胞との再凝集によるマーモセットGonocyte like cellの誘導

(図7) (bioRxiv 2023)。

次に②同種での培養を試みるため、マーモセット新生児精巣細胞(新生児生殖細胞も含む)を採取すると同時に、同個体からiPSCを樹立しEGFPによる蛍光標識の後にPGCLC誘導を行った。それらPGCLCと精巣細胞から凝集塊を作出し、それらの由来となった個体の腎被膜下へ移植し発生能を調べたところ、Gonocyteマーカー、EGFP両陽性のPGCLC由来細胞が認められた(図8)。またマウスとの再凝集と異なり、現在まで同種間ではがん化様の現象が認められていないことから、引き続き発生の様子を観察している(投稿準備中)。

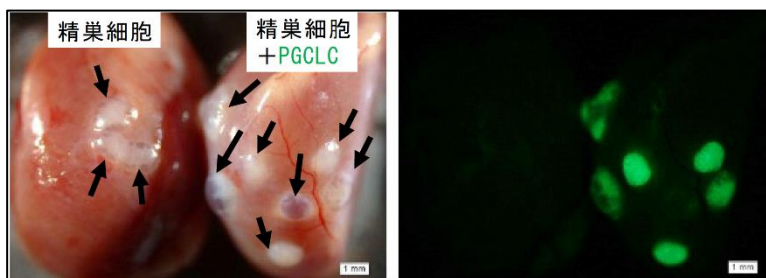


図8,マーモセット新生児精巣細胞との再凝集によるマーモセットGonocyte like cellの誘導

## 全体の総括

本領域研究では、それまで長きにわたり進展の乏しかった霊長類着床期胚発生学の創出を見据え、*in vitro*での胚培養系の構築と子宮内発生環境の構築、また霊長類個体に最適化した遺伝子改変技術の開発と幹細胞からの生殖細胞誘導研究を行ってきた。そしてそれぞれの研究計画において、確かな実験結果や論文発表など一定の成果を得ることができた。特に COVID19 やウクライナ紛争による世界情勢の変化によりサル個体輸入価格が急騰し（領域研究開始時の5倍以上、10年前の20倍）、わずかな試料採取も困難になってしまった中で成果発表につなげることができたことから、領域として十分な成果を得られたと考える。一方で、オンラインを駆使したセミナーを主催することによって、日本国内のみならず、米国や欧州の研究者とのインターアクションをすることができた。COVID19の影響を受けたが、逆に新しいネットワーク、コミュニティが構築できたと自負する。近年、世界中で霊長類を用いた発生学研究が盛んになってきており、本領域はその先頭を走ってきた。我々の成果は今後の霊長類発生学研究に大きな貢献をすると期待されるため、まず研究期間内に発表できなかったデータを早急に論文公開することを目指す。そして、今後も世界に後れを取らぬよう尽力するとともに、強力な資金力を背景に躍進する中国らとは一線を画した発想や角度からの研究を発展させていく。

## 研究発表・成果物

### 領域ホームページ

「霊長類発生学研究の基盤構築」；<https://www.primate-dev-biol.ashbi.kyoto-u.ac.jp/>

### 論文発表

1. Eto, T., Ueda, H., Ito, R., Takahashi, T., **Watanabe, T.**, Goto, M., Sotomaru, Y., Tanaka, N., and Takahashi, R. (2021). Establishment of an integrated automated embryonic manipulation system for producing genetically modified mice. *Scientific Reports* 11. 10.1038/s41598-021-91148-9.
2. Io, S., Iemura, Y., and **Takashima, Y.** (2021). Optimized protocol for naive human pluripotent stem cell-derived trophoblast induction. *STAR Protoc* 2, 100921. 10.1016/j.xpro.2021.100921.
3. Io, S., Kabata, M., Iemura, Y., Semi, K., Morone, N., Minagawa, A., Wang, B., Okamoto, I., **Nakamura, T.**, Kojima, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Kaswandy, B., Kondoh, E., Kaneko, S., Woltjen, K., Saitou, M., Yamamoto, T., Mandai, M. and **Takashima, Y.** (2021). Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells *in vitro*. *Cell Stem Cell* 28, 1023-1039 e1013. 10.1016/j.stem.2021.03.013.
4. Ishikura, Y., Ohta, H., Sato, T., Murase, Y., Yabuta, Y., Kojima, Y., Yamashiro, C., **Nakamura, T.**, Yamamoto, T., Ogawa, T., and Saitou, M. (2021). *In vitro* reconstitution of the whole male germ-cell development from mouse pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 10.1016/j.stem.2021.08.005.
5. Jayakumar, V., Nishimura, O., Kadota, M., Hirose, N., Sano, H., Murakawa, Y., Yamamoto, Y., Nakaya, M., **Tsukivama, T.**, Seita, Y., et al. (2021). Chromosomal-scale de novo genome assemblies of *Cynomolgus* Macaque and Common Marmoset. *Sci Data* 8, 159. 10.1038/s41597-021-00935-6.
6. Kishimoto, K., Shimada, A., Shinohara, H., Takahashi, T., Yamada, Y., Higuchi, Y., Yoneda, N., Suemizu, H., Kawai, K., Kurotaki, Y., Hanazawa, K., **Takashima, Y.** and Sasaki, E. (2021). Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions. *Stem Cell Res* 53, 102252. 10.1016/j.scr.2021.102252.
7. Kojima, Y., Yamashiro, C., Murase, Y., Yabuta, Y., Okamoto, I., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakaya, M., **Tsukivama, T.**, **Nakamura, T.**,

- et al. (2021). GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program. *Life Science Alliance* 4, e202000974. 10.26508/lsa.202000974.
8. **Nakamura, T.**, Fujiwara, K., Saitou, M., and **Tsukiyama, T.** (2021). Non-human primates as a model for human development. *Stem Cell Reports* 16, 1093-1103. 10.1016/j.stemcr.2021.03.021.
  9. Okamoto, I., **Nakamura, T.**, Sasaki, K., Yabuta, Y., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Nakamura, S.I., Ema, M., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2021). The X chromosome dosage compensation program during the development of cynomolgus monkeys. *Science* 374, eabd8887. 10.1126/science.abd8887.
  10. Semi, K., and **Takahima, Y.** (2021). Pluripotent stem cells for the study of early human embryology. *Development, Growth & Differentiation*. 10.1111/dgd.12715.
  11. Takahashi, K., Nakamura, M., Okubo, C., Kliesmete, Z., Ohnuki, M., Narita, M., Watanabe, A., Ueda, M., **Takahima, Y.**, Hellmann, I., and Yamanaka, S. (2021). The pluripotent stem cell-specific transcript ESRG is dispensable for human pluripotency. *PLoS Genet* 17, e1009587. 10.1371/journal.pgen.1009587.
  12. **Watanabe, T.**, and Sasaki, E. (2021). Efficient Induction of Primate iPS Cells Using a Combination of RNA Transfection and Chemical Compounds. *Methods Mol Biol*. 10.1007/7651\_2021\_373.
  13. Yokobayashi, S., Yabuta, Y., Nakagawa, M., Okita, K., Hu, B., Murase, Y., **Nakamura, T.**, Bourque, G., Majewski, J., Yamamoto, T., and Saitou, M. (2021). Inherent genomic properties underlie the epigenomic heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. *Cell Reports* 37, 109909. 10.1016/j.celrep.2021.109909.
  14. Hikiyama, R., Morimura, T., Ayaki, T., **Tsukiyama, T.**, Morimura, N., Kusui, M., Wada, H., Minamiyama, S., Shodai, A., Asada-Utsugi, M., et al. (2022). Conformational change of RNA-helicase DHX30 by ALS/FTD-linked FUS induces mitochondrial dysfunction and cytosolic aggregates. *Sci Rep* 12, 16030. 10.1038/s41598-022-20405-2.
  15. Imoto, Y., **Nakamura, T.**, Escolar, E.G., Yoshiwaki, M., Kojima, Y., Yabuta, Y., Katou, Y., Yamamoto, T., Hiraoka, Y., and Saitou, M. (2022). Resolution of the curse of dimensionality in single-cell RNA sequencing data analysis. *Life Sci Alliance* 5. 10.26508/lsa.202201591.
  16. Kubiura-Ichimarū, M., Penfold, C., Kojima, K., Dollet, C., Yabukami, H., Semi, K., **Takahima, Y.**, Boroviak, T., Kawaji, H., Woltjen, K., Minoda, A., Sasaki, E., and **Watanabe, T.** (2022). mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells. *bioRxiv*, 2022.2009.2020.508677. 10.1101/2022.09.20.508677.
  17. Kunitomi, A., Hirohata, R., Arreola, V., Osawa, M., Kato, T.M., Nomura, M., Kawaguchi, J., Hara, H., Kusano, K., **Takahima, Y.**, et al. (2022). Improved Sendai viral system for reprogramming to naive pluripotency. *Cell Rep Methods* 2, 100317. 10.1016/j.crmeth.2022.100317.
  18. Mizuta, K., Katou, Y., Nakakita, B., Kishine, A., Nosaka, Y., Saito, S., Iwatani, C., Tsuchiya, H., Kawamoto, I., Nakaya, M., **Tsukiyama, T.**, Nagano, M., Kojima, Y., **Nakamura, T.**, Yabuta, Y., Horie, A., Mandai, M., Ohta, H. and Saitou, M.. (2022). Ex vivo reconstitution of fetal oocyte development in humans and cynomolgus monkeys. *EMBO J* 41, e110815. 10.15252/embj.2022110815.
  19. Nagai, H., Tanoue, Y., **Nakamura, T.**, Chan, C.J.J., Yamada, S., Saitou, M., Fukuda, T., and Sheng, G. (2022). Mesothelial fusion mediates chorioallantoic membrane formation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 377, 20210263. 10.1098/rstb.2021.0263.
  20. Okubo, T., and **Takahima, Y.** (2022). Exploring the human extraembryonic mesoderm using naive pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 29, 1290-1291. 10.1016/j.stem.2022.08.005.
  21. Tsujihana, K., Tanegashima, K., Santo, Y., Yamada, H., Akazawa, S., Nakao, R., Tominaga, K., Saito, R., Nishito, Y., Hata, R.I., **Nakamura, T.**, et al. (2022). Circadian protection against bacterial skin infection by epidermal CXCL14-mediated innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2116027119. 10.1073/pnas.2116027119.



22. Watanabe, C., Shibuya, H., Ichiyama, Y., Okamura, E., Tsukiyama-Fujii, S., **Tsukiyama, T.**, Matsumoto, S., Matsushita, J., Azami, T., Kubota, Y., et al. (2022). Essential Roles of Exocyst Complex Component 3-like 2 on Cardiovascular Development in Mice. *Life* 12. 10.3390/life12111730.
23. Gyobu-Motani, S., Yabuta, Y., Mizuta, K., Katou, Y., Okamoto, I., Kawasaki, M., Kitamura, A., **Tsukiyama, T.**, Iwatani, C., Tsuchiya, H., Tsujimura, T., Yamamoto, T., **Nakamura, T.** and Saitou, M.. (2023). Induction of fetal meiotic oocytes from embryonic stem cells in cynomolgus monkeys. *EMBO J*, e112962. 10.15252/embj.2022112962.
24. Shono, M., Kishimoto, K., Hikabe, O., Hayashi, M., Semi, K., **Takashima, Y.**, Sasaki, E., Kato, K., and Hayashi, K. (2023). Induction of primordial germ cell-like cells from common marmoset embryonic stem cells by inhibition of WNT and retinoic acid signaling. *Sci Rep* 13, 3186. 10.1038/s41598-023-29850-z.

## 講演、発表

### <2020 年度>

1. Tomonori Nakamura, Identifying cells hidden by curse of dimensionality, 1st ASHBi SignAC Workshop
2. 渡部 聡朗, Christopher Penfold, 蟬 克憲, 岩崎 師壽江, 篠原 晴香, 高島 康弘, Thorsten Boroviak, Knut Woltjen, 佐々木 えりか, マーモセット iPS 細胞からの始原生殖細胞様細胞の誘導, 第 10 回日本マーモセット研究会大会
3. 高島 康弘, 大久保 巧, ナイーブ型多能性幹細胞を用いた着床期モデルの構築, 第 10 回日本マーモセット研究会大会
4. 中村 友紀, 研究者とは? どうしたらなれる?, 群馬県甘楽町立中学校、進路相談会

### <2021 年度>

5. Tomonori Nakamura, A developmental coordinate of three-germ layer differentiation in primates, 第 4 4 回分子生物学会
6. Tomonori Nakamura, High-resolution scRNA-seq analysis of primate embryogenesis by a novel noise reduction method, -RECODE, International Joint Usage/Research Center-Young Researchers Symposium, Tokyo University
7. Tomoyuki Tsukitama, Generation of transgenic cynomolgus monkeys using piggyBac transposition., 第 4 4 回分子生物学会
8. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells, 第 127 回日本解剖学会総会・全国学術集会
9. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells, SY-STEM
10. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells, CiRA Symposium
11. Yasuhiro Takashima, Studying primate early development using naive pluripotent stem cells, 第 11 回日本マーモセット研究会大会
12. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells, 第 4 4 回日本分子生物学会年会
13. Yasuhiro Takashima, Analyzing human peri-implantation development using naive pluripotent stem cells, ASHBi Symposium 2021
14. Yasuhiro Takashima, Analysing human peri-implantation development using in vitro models by naive pluripotent stem cells, Placental Biology Course University of Cambridge
15. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells, Epigenetics in Early Mammalian Development
16. 高島 康弘, ナイーブ型多能性幹細胞に関する成果と可能性, 第 21 回日本再生医療学会総会
17. 高島 康弘, ナイーブ型多能性幹細胞の維持培養法, 第 21 回日本再生医療学会総会
18. 高島 康弘, ヒトのいのちとからだを人為的に作る研究の進展とその倫理的問題, ゲノム問題検討会議
19. 高島 康弘, iPS 細胞の誕生とこれから, 大阪府高齢者大学校
20. 小島 一晃, 近藤 洋介, 坂本 晃海, 向笠 圭亮, 井上 貴史, 黒滝 陽子, 佐々木 えりか, 仲木 竜, 渡部 聡朗, 霊長類マーモセット雄性生殖細胞における DNA メチル化確立過程のシングルセル解析, 第 4 4 回分子生物学会

21. 松藤 未夏, 大久保 巧, 高島 康弘, ヒトにおいて、N-cadherin は原始内胚葉の接着に必要である, 第44回日本分子生物学会年会
22. 中村友紀, シングルセル生物学 ~生命現象理解におけるパラダイムシフト~, 京都大学学術情報メディアセンターセミナー
23. 中村友紀, 非ヒト霊長類を用いた霊長類三胚葉分化動態の解明に向けて, 第21回日本再生医療学会総会
24. 渡部聡朗, Genomic and epigenomic integrity controls during primate male germ cell development, 第44回分子生物学会
25. 渡部聡朗, Primates have a distinct spermatogonial stem cell system to maintain the genomic integrity, マーモセット研究会
26. 望月 俊吾, 遠山 周吾, 菱木 貴子, 岩崎 未央, 高島 康弘, Naive 型ヒト多能性幹細胞の網羅的解析と Feeder free 化への挑戦, 第44回日本分子生物学会年会
27. Kubiura-Ichimarū M. and Watanabe T., mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells, Totipotency and germ cell development

#### <2022 年度>

28. Tomonori Nakamura, A comprehensive high-resolution transcriptomic profiling of primate embryogenesis just after implantation, 第21回 武田科学振興財団生命科学シンポジウム,
29. Toshiaki Watanabe, Marmoset germ cell differentiation from pluripotent cells, 55th Society for the Study of Reproduction annual conference
30. Yasuhiro Takashima, Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells, Living Systems Institute Seminar, University of Exeter
31. Yasuhiro Takashima, Modelling peri-implantation development using naive human pluripotent stem cells, Cold Spring Harbor Asia
32. 高島 康弘, ヒト多能性幹細胞に関する研究, 山梨大学発生活工学技術開発・実践特別教育プログラム共催(第63回セミナー)
33. 高島 康弘, 次世代 iPS 細胞の可能性とヒト胚モデル, 大学発シーズマッチングセミナー
34. 高島 康弘, 幹細胞を利用したヒト初期発生学の創出, 再生 ELSI 研究会
35. 高島 康弘, ヒト多能性幹細胞を用いた疑似胚盤胞に関する研究の現状と展望, 内閣府 科学技術・イノベーション推進会議 第132回生命倫理専門調査会
36. 高島 康弘, iPS 細胞の誕生・現在・未来, 大阪府高齢者大学校
37. 小島一晃, 近藤洋介, 小原実穂, Dollet Constance, 山海直, 仲木竜, 渡部聡朗, 霊長類コモンマーモセット及びカニクイザルの雄性生殖細胞における DNA メチル化確立過程のシングルセル解析, 日本実験動物学会
38. 中家 雅隆, 築山 智之, piggyBac トランスポゾンシステムを利用したトランスジェニックカニクイザルの作出, 日本繁殖生物学会
39. 中村友紀, カニクイザルを用いた霊長類着床直後の胚発生研究, 第76回日本人類学会、第38回日本霊長類学会、連合大会
40. 中村友紀, “次元の呪い”からの解放 ~ シングルセル解析の真の力を解き放つ ~, 新学術領域研究「配偶子インテグリティ」オンラインセミナー
41. 渡部聡朗, 多能性幹細胞からのマーモセット初期生殖細胞発生系の構築, マーモセット研究会

#### 領域主催シンポジウム、ワークショップ

- ・ 第44回分子生物学会、シンポジウム 1AS-02

「1AS-非ヒト霊長類を用いた霊長類発生学研究の進展に向けて, Toward a new era for primate developmental biology 」

Organizer: Tomonori Nakamura, Yasuhiro Takashima

Speaker: Tomonori Nakamura, Jun Wu (University of Texas Southwestern Medical Center), Tomoyuki Tsukiyama, Toshiaki Watanabe, Jun Hatakeyama (IMEG, Kumamoto Univ), Yasuhiro Takashima.

• PDB seminar series ; 不定期に開催した領域主催オンラインワークショップ (講演者と所属)

- #001 Dr. Tomomi Aida      Massachusetts Institute of Technology, Boston, USA
- #002 Drs., Hideaki Masaki/ Ayaka Yanagida      The Institute of Medical Science, The University of Tokyo
- #003 Dr. Harunobu Kagawa Institute of Molecular Biotechnology, Vienna, Austria
- #004 Dr. Ikuhiro Okamoto      Institute for the Advanced Study of Human Biology (WPI-ASHBi), Kyoto-University
- #005 Dr. Masaki Kinoshita      School of Biosciences, University of Nottingham, England
- #006 阿部由希子先生      東京大学医学系研究科, 附属疾患生命工学センター
- #007 Dr. Masatoshi Ohgushi Institute for Life and Medical Sciences, Kyoto University
- #008 Dr. Vincent Pasque      Department of Development and Regeneration, KU Leuven, Belgium
- #009 Dr. Ikuo K, Suzuki      Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, The University of Tokyo

### 産業財産権

• 井元祐介、中村友紀、平岡裕章、斎藤 通紀、観測ノイズ削減法の開発、特許 2020-102852