

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04683

研究課題名(和文) マウスES細胞の超未分化状態の解明と他種ES/iPS細胞の初期化への応用

研究課題名(英文) Elucidation of super-undifferentiated state of mouse ES cells and application to reprogramming of ES/iPS cells of other species

研究代表者

堀江 恭二 (Horie, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、マウスES細胞において、新規の不均一性を同定した。遺伝子発現の網羅的解析により、この不均一性の性状を解明し、未分化性が高い細胞集団を同定した。この細胞集団からキメラマウスを高効率で作製できることも示し、この細胞集団の多能性の高さを証明した。さらに、1細胞レベルでの転写因子の活性計測と、CRISPR/Cas9を用いた転写因子の破壊実験により、本不均一性を規定する転写因子ネットワークを明らかにした。このネットワークの操作により、マウス以外の生物種において高品質のES/iPS細胞を作製できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マウスES細胞の解析を通じて、一見して均一に見えるマウスES細胞の多能性が、個々の細胞ごとに異なることを明らかにした。さらに、多能性状態の不均一性を制御する遺伝子群を同定し、これらの遺伝子群の発現レベルを変えることで、多能性状態を人為的に操作できる可能性を示した。この遺伝子群は、ヒトをはじめとする他の生物種でも保存されている。よって、今回の知見は、様々な生物種のES/iPS細胞へも適用できると考えられ、再生医学や発生生物学の発展への寄与を期待できる。

研究成果の概要(英文)：We identified a novel heterogeneity in mouse ES cells. By comprehensive analysis of gene expression, we identified a highly undifferentiated cell population. We also showed that chimeric mice could be produced from this cell population with high efficiency, demonstrating the high pluripotency of this cell population. Furthermore, the transcription factor network that regulates this heterogeneity was identified by measuring the transcription factor activity at the one-cell level and by disrupting transcription factors using CRISPR/Cas9. The manipulation of this network may lead to producing high-quality ES/iPS cells in species other than mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：ES細胞 iPS細胞 遺伝子 未分化状態 分化 CRISPR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

順遺伝学では、様々な遺伝子ヘランダムに変異を導入し、その中から目的の表現型を示すものを選択する。変異導入に際して研究者の恣意が介入しないため、予期せぬブレークスルーを期待できる。申請者これまで、マウスをモデルに用いて、順遺伝学の新たな手法を開発してきた。Sleeping Beauty トランスポゾン をマウスの生殖細胞で転移させる方法を開発し、300 系統の変異マウスを作製した (Horie et al. PNAS 98:9191, 2001, Horie et al. Mol Cell Biol 23:9189, 2002)。また、マウス ES 細胞で両アレルを迅速に破壊する手法を開発し (Yusa, Horie et al. Nature 429:896, 2004)、遺伝子トラップ法と組み合わせて、2,000 株のヘテロ変異体と 200 株のホモ変異体 ES 細胞を作製した (Horie et al. Nature Methods 8:1071, 2011)。これらの変異体を用いて新規の遺伝子機能を明らかにするとともに (Umemura et al. PLoS One, 8: e67241, 2013)、変異体を理研 BRC や医薬基盤研へ寄託してきた。

上記の手法を、マウス初期発生の研究へ適用する過程で、遺伝子発現の時系列情報の重要性を感じた。そこで、遺伝子トラップベクターへ蛍光蛋白 Venus を導入し、マウス ES 細胞での様々な遺伝子の発現パターンと未分化状態の関係を調べた。その結果、過去に報告されていない、ES 細胞で不均一な発現を示す遺伝子を同定した (図 1)。Venus 高発現細胞と低発現細胞を分画したところ、細胞集塊の形態や分化能に違いを認めたことから、同定した遺伝子は、ES 細胞の多能性の不均一性を反映すると推測された。また、本遺伝子と相同性の高い配列が、ゲノム上の特定部位 (約 2Mb) にクラスターを為すことを見出し、この領域全体が ES 細胞の多能性制御に関わっている可能性も示唆された (図 2)。このように、我々が同定したマウス ES 細胞の不均一性は新規性が高く、この解析を通じて、マウス ES 細胞の多能性制御のみならず、ヒトをはじめとする様々な種の ES/iPS 細胞の理解が深まると期待された。

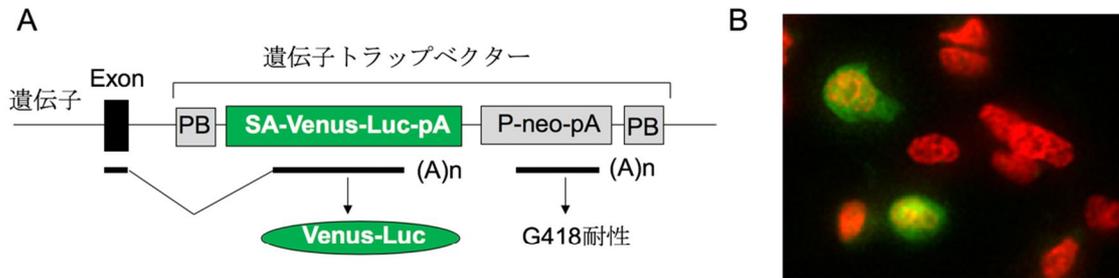


図 1. 遺伝子トラップ法を用いた、マウスES細胞で不均一な発現を示す遺伝子の同定。

(A) スクリーニングに用いた遺伝子トラップベクターの構造。SA, スプライスアクセプター; P, プロモーター; pA, ポリA付加シグナル; PB, PiggyBac トランスポゾン; Luc, ルシフェラーゼ。

(B) 本研究で解析した遺伝子の発現様式。緑は、(A)の遺伝子トラップにより発現されたVenusを示す。赤は、未分化ES細胞のマーカであるNanogの発現を、核局在性のmCherry蛍光タンパクのノックインにより計測した。

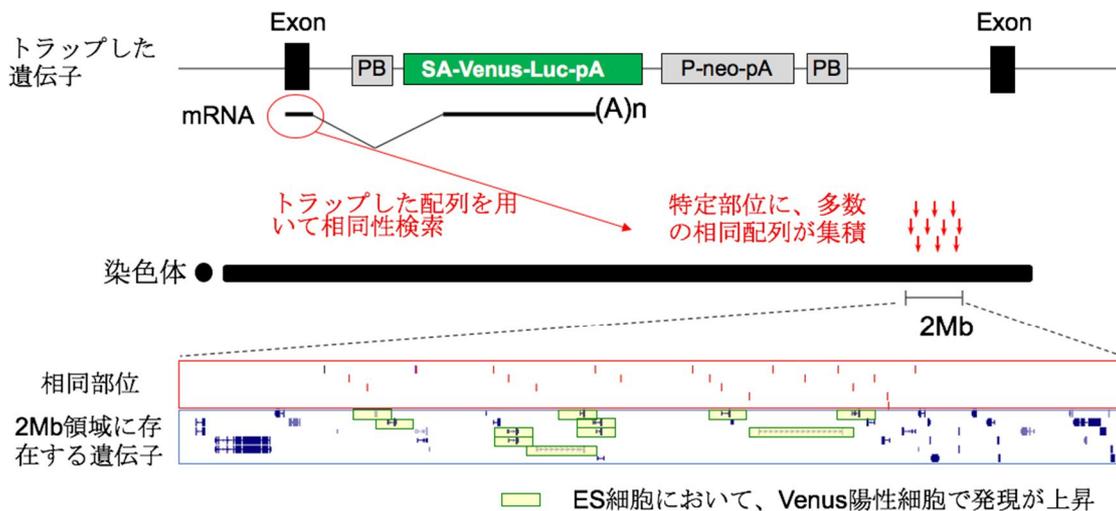


図 2. 本研究で新規に同定した、ES細胞で不均一な発現を示す遺伝子の配列は、マウスゲノムの約2Mbの特定領域に、多数の相同配列を有す。

2. 研究の目的

我々が遺伝子トラップ法により新規に同定した ES 細胞の不均一性 (図 1) の意義を、未分化性・多能性という観点から明らかにする。特に、この不均一性の中から、未分化性が極めて高い状態を特定する。さらに、この不均一性を制御する遺伝子ネットワークを同定し、未分化性が極めて高い状態を人為的に誘導する方法を確立する。この方法を、マウス以外の生物種へも適用し、様々な動物種の ES/iPS 細胞の高未分化状態での安定培養と、胚盤胞への注入による動物個体制作を目指す。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養条件とキメラマウスの作製

マウス ES 細胞の培地には、N2B27 無血清培地に Mek と Gsk3 に対する阻害剤、および、LIF を添加したもの (2i/LIF 培地) を用いた。2i/LIF 培地においては、マウス ES 細胞の遺伝子発現は極めて均一化すると報告されている (Ying et al., Nature 453:519, 2008)。本研究で対象としている不均一性は、「2i/LIF 培地においても不均一」なことに新規性がある。ES 細胞からのキメラマウスの作製は、ES 細胞を 8 細胞期胚、または胚盤胞へ注入することで行った。

(2) 次世代シーケンサー解析

RNA-seq には、flow cytometry で分画した Venus 高発現、低発現細胞、および、分画を行わない細胞から精製した total RNA を用いた。Single cell ATAC-seq (scATAC-seq) は、C1 (フリューダイン社) を用いて、RNA-seq と同様の細胞分画を解析した。

(3) CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊とゲノム改変

転写因子の遺伝子破壊に際しては、まず、Venus を挿入したマウス ES 細胞株に対して、Cas9 を恒常的に発現させた。次に、PiggyBac トランスポゾン骨格に持つ guide RNA 発現ベクターへ、転写因子に対する guide RNA 配列をクローニングした。このベクターを PiggyBac トランスポゼースと共に ES 細胞へ導入して、トランスポゾンベクターをゲノムへ挿入することにより、guide RNA を ES 細胞内で恒常的に発現させ、遺伝子破壊を効率化した。一方、2Mb のゲノム領域 (図 2) を欠失させる際には、欠失させる領域の外側に guide RNA を設定し、発現ベクターを用いて、Cas9 とともに ES 細胞で一過性に発現させた。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞の不均一性の RNA-seq による評価

Venus 高発現細胞と低発現細胞を flow cytometry により分画し、RNA-seq によって発現の異なる遺伝子群を同定した。その結果、Venus 低発現細胞において、未分化性の高い細胞に特徴的な遺伝子群を特定できた。初期発生においては、トランスポゾンの発現も変遷することが知られているので、RNA-seq のデータから各種トランスポゾンの発現レベルも調べたが、この場合も同様に、Venus 低発現細胞において、発生初期に特徴的なトランスポゾンが高く発現していた。本研究を開始する時点では、flow cytometry で分画後の細胞集塊の形態から、Venus 高発現細胞の方が未分化性が高いと考えていたが、RNA-seq の結果は、予想に反して逆であった。

(2) マウス ES 細胞の不均一性の意義の、キメラマウス作製効率による評価

Venus の発現レベルの不均一性の意義をマウス個体レベルで調べるために、Venus 高発現細胞と低発現細胞を flow cytometry により分画し、キメラマウス形成能を調べた。その結果、Venus 低発現細胞を用いた場合に、キメラ率の高いマウスが得られた。これより、Venus が低い状態の方が、ES 細胞の未分化性や多能性が高いと推測された。この結果は、(1) の RNA-seq の結果と一致するものであり、我々の同定した遺伝子発現の不均一性の重要性に確証が得られた。

(3) scATAC-seq と CRISPR/Cas9 による、マウス ES 細胞の不均一性を制御する転写因子の推定

scATAC-seq 解析によって、Venus 高発現細胞と低発現細胞の間で DNA 結合活性に差のある転写因子群を特定した。個々の転写因子を CRISPR/Cas9 を用いて破壊したところ、Venus の発現レベルが変化するものを複数個同定できた。これらの転写因子は、ES 細胞の不均一性を制御していると考えられる。さらに、1 細胞レベルで DNA 結合活性の強さが互いに相関する転写因子群を、scATAC-seq データ解析により同定した (図 3)。同定した転写遺伝子群について、CRISPR/Cas9 を用いて 2 つ、または、3 つを同時破壊したところ、単独での破壊時と比べて、Venus の変動レベルが増強したもの (図 4) や、逆に減弱したものを特定できた。前者は、複数の転写因子が互いに共役して機能していることを示唆しており、後者は、転写因子が細胞内で拮抗していることを示唆する。これより、マウス ES 細胞の多能性の不均一性を制御する転写因子ネットワークを推定できた (図 3 右)。

(4) ノックインマウスの樹立

(3) で作製したキメラマウスを野生型マウスと交配することで、我々が同定した発現変動を示す遺伝子へ Venus がノックインされたマウス系統を樹立できた。このマウスを用いることで、ES 細胞以外の様々な細胞系譜において、本遺伝子発現の不均一性の有無を解析することが可能

となり、本研究成果を個体レベルの解析へ発展させる上で有用と期待できる。

(5) 遺伝子クラスターの欠失

CRISPR/Cas9 を用いることによって、図2で示す約2Mbの領域全体の欠失を試みた。欠失部位両側に設定したプライマーを用いたPCRによって、両アレル共に欠失できた可能性の高い細胞株を単離できているが、2Mb領域が完全にゲノムから消失しているかについては、慎重な確認が必要である。

(6) 今後の展望

本研究により、我々が新規に同定したマウスES細胞の不均一性が、同時に、多能性の不均一性も反映することが明らかになった。さらに、不均一性を制御する転写因子ネットワークも特定できた。これより、これらの転写因子の発現ベクターを構築して、一過性に転写因子を高発現させることで、マウスES細胞の多能性を自在に操作できると期待できる。それに成功した際には、マウス以外の生物種のES/iPS細胞においても発現ベクターを導入し、多能性を操作したい。マウス以外の生物種では、ES/iPS細胞を未分化性の高い状態で維持するのは容易ではなく、過去に報告はあるものの、今尚、改善が求められている。本研究成果を、様々な生物種へ応用できる基盤技術として発展させたい。

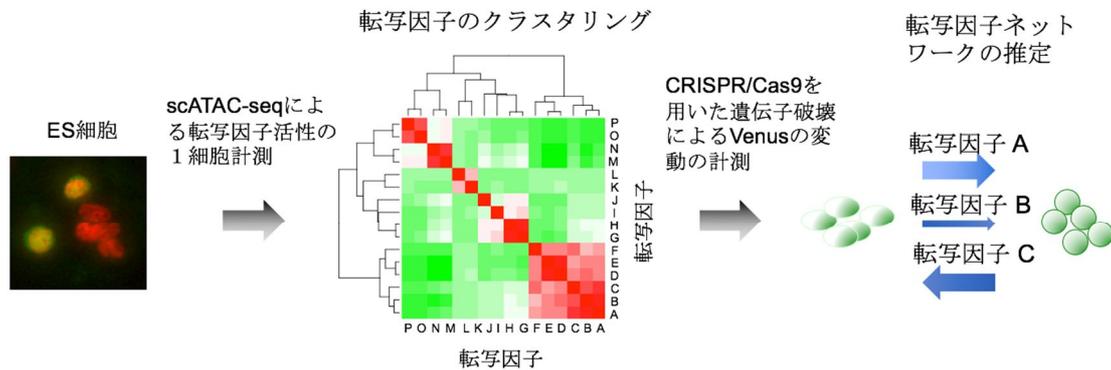


図3. ES細胞の遺伝子発現の不均一性を制御する転写因子ネットワークを特定するためのワークフロー

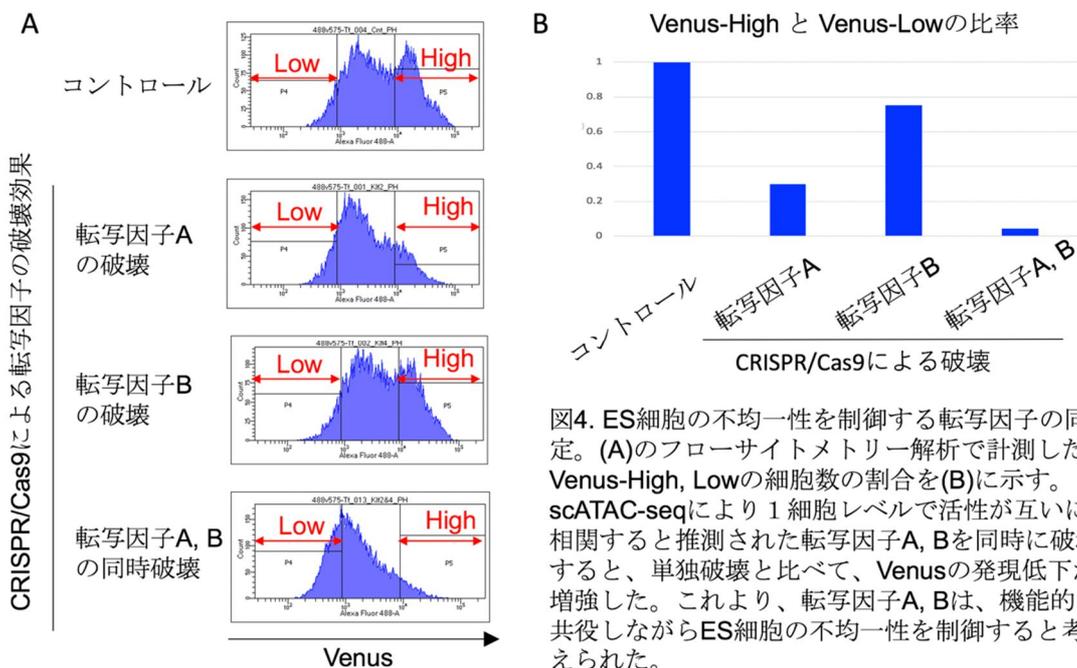


図4. ES細胞の不均一性を制御する転写因子の同定。(A)のフローサイトメトリー解析で計測したVenus-High, Lowの細胞数の割合を(B)に示す。scATAC-seqにより1細胞レベルで活性が互いに相関すると推測された転写因子A, Bを同時に破壊すると、単独破壊と比べて、Venusの発現低下が増強した。これより、転写因子A, Bは、機能的に共役しながらES細胞の不均一性を制御すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Junko Yoshida, Keiko Akagi, Ryo Misawa, Chikara Kokubu, Junji Takeda & Kyoji Horie | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Chromatin states shape insertion profiles of the piggyBac, Tol2 and Sleeping Beauty transposons and murine leukemia virus | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Sci Rep | 6. 最初と最後の頁 43613 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep43613 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kyoji Horie, Junko Yoshida |
| 2. 発表標題 Identifying heterogeneity of ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells |
| 3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堀江恭二, 渡邊仁美, 西村陽介, 渡邊日佳流, 関真秀, 清田晃央, 加藤輝, 若本祐一, 鈴木穰, 山田拓司, 近藤玄, 吉田純子 |
| 2. 発表標題 Ground stateにおけるマウスES細胞の不均一性の同定 |
| 3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kyoji Horie, Hitomi Watanabe, Yosuke Nishimura, Hikaru Watanabe, Masahide Seki, Akio Seita, Kagayaki Kato, Yuichi Wakayama, Jun Sese, Yutaka Suzuki, Takuji Yamada, Gen Kondoh, Junko Yoshida |
| 2. 発表標題 Identifying the heterogeneity of ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells and elucidating its regulatory mechanism |
| 3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|--|--|----|
| 連携 研究者 | 吉田 純子 (Yoshida Junko) (30769196) | 奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601) | |