

令和 3 年 8 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19275

研究課題名（和文）新規長期1細胞追跡法を用いた全能性状態の継時的計測と全能性幹細胞の樹立

研究課題名（英文）Time-series measurement of totipotent state and establishment of totipotent stem cells using a novel long-term single-cell tracking method

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウスまたはヒトの全能性状態を蛍光蛋白で可視化して継時的に観察し、全能性状態を制御する要因を解明するとともに、全能性状態を安定に保つ全能性幹細胞を樹立することを目指した。全能性状態の可視化には、全能性状態での発現上昇が既に報告されているマーカーを用いた。また、我々が新規に特定した、未分化状態で発現が変動する遺伝子についても、全能性状態との関係性を評価した。特に、後者の遺伝子については、発現変動を制御する転写因子群を、CRISPR/Cas9による遺伝子破壊実験により特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「全能性幹細胞」とは、全ての細胞に分化誘導が可能で、かつ、安定的に培養できる細胞を意味する。これまで、ES細胞、生殖幹細胞、神経幹細胞など、様々な幹細胞が樹立され、幹細胞状態の理解や再生医療に役立ってきたが、「全能性幹細胞」の樹立は極めて遅れている。本研究では、マウスとヒトの両方において、全能性状態の検出系の開発と全能性状態の誘導を試みた。マウスを用いた実験は、初期胚実験を自在に行える点で利点があり、一方、ヒト細胞を用いた実験は、再生医療を指向した研究を行う上で必須である。今後、マウスとヒトの各々の実験系の利点を生かしながら、哺乳動物の全能性の共通原理の解明と再生医療への応用を目指したい。

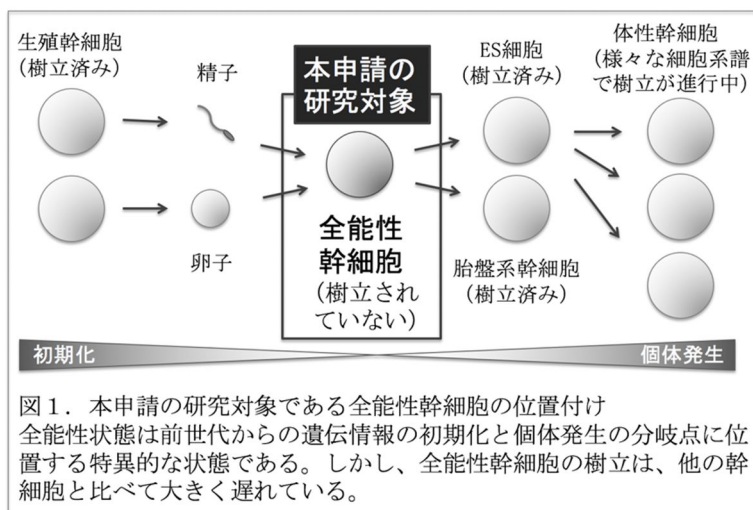
研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to visualize the totipotent state in mice and humans using fluorescent proteins and observed it over time to elucidate the factors that regulate the totipotent state and to establish totipotent stem cells. To visualize the totipotent state, we used markers that have been reported to be upregulated in the totipotent state. We also evaluated the relationship between the totipotent state and a newly identified gene whose expression changes in the undifferentiated state. In particular, for the latter gene, we identified a group of transcription factors that regulate the expression of this gene by gene disruption experiments using CRISPR/Cas9.

研究分野：細胞生物学

キーワード：全能性 幹細胞 ES細胞 iPS細胞 再生医学

1. 研究開始当初の背景

幹細胞培養法の樹立は、基礎医学、再生医学の発展に寄与してきた。既に、ES細胞、生殖幹細胞、神経幹細胞など、様々な幹細胞が樹立され、幹細胞状態の理解や再生医療への応用に寄与してきた。しかし、全ての細胞系譜の上位に位置する「全能性幹細胞」の樹立は、極めて遅れている。全能性状態では、前世代のエピジェネティックなゲノム情報が初期化されるとともに、個体発生の全プログラムが準備状態にある。このような性質は、他の細胞系譜には無い唯一無二のものであり、その解析は新たな学術的分野の開拓に繋がると期待される。全能性状態を規定する分子機構の解明は、ES/iPS細胞の包括的な理解へも重要な視点を与えると考えられる。



2. 研究の目的

近年、マウス ES 細胞が数日に 1 度程度の頻度で一過的に全能性様の遺伝子発現様式 (以下、「全能性状態」と記載) をとることが報告された (Macfarlan et al., *Nature*, 2012)。全能性状態の細胞の割合は ES 細胞全体の 1% 程度と低いが、培養条件を改良することで全能性幹細胞を樹立できる可能性がある。しかし、ES 細胞から自然発生する全能性状態は一過性であるため、全能性状態を正確に評価するには、全能性状態の出現と消退の kinetics の計測が必要であり、個々の細胞を生きたまま長期に渡り追跡せねばならない。そこで本研究では、生細胞の長期 1 細胞追跡法と、新規に同定したマーカー遺伝子を用いて、全能性状態の評価と全能性幹細胞の樹立を目指した。

3. 研究の方法

(1) 全能性状態の可視化

マウス ES 細胞を全能性状態に変換するためには、全能性状態にある細胞を簡便に検出する必要がある。そこで、全能性状態で高い発現を示すことが報告されているレトロトランスポゾン MERVL の LTR プロモーターの下流に蛍光蛋白 H2B-mCherry を配置したベクターを作製し、マウス ES 細胞へ導入した。

我々は、本研究課題の開始時に、マウス ES 細胞において発現が変動する機能未知の遺伝子を特定していた。その遺伝子の発現も蛍光蛋白 Venus で可視化し、Venus の発現変動が全能性状態と相関するかどうかを RNA-seq により検証した。

(2) 全能性状態を制御する転写因子の推定と機能解析

次に、全能性状態を制御する転写因子を特定するために、open chromatin 領域を特定する方法である 1 細胞 ATAC-seq を行った。open chromatin 領域の DNA 配列から、DNA へ結合する転写因子を推定し、さらに、(1) の蛍光蛋白の発現変動と相関して DNA 結合能が変動する転写因子を同定することで、全能性状態を制御する転写因子を推定した。

上記の手法で推測された転写因子の機能を簡便に調べるために、蛍光蛋白を導入しているマウス ES 細胞において、Cas9 蛋白の発現ベクターを恒常的に発現させ、さらに、その細胞に対して種々の guide RNA を効率的に導入するためのベクター系を、PiggyBac トランスポゾンを用いて作製した。3 種類の薬剤耐性遺伝子を有すベクターを作製したので、様々な guide RNA を、様々な組み合わせでマウス ES 細胞において発現させることが可能となった。これにより、異なる転写因子を様々な組み合わせで破壊し、その影響を、蛍光蛋白の発現変動として検出し、全能性を制御する転写因子をスクリーニングした。

(3) 阻害剤を用いた全能性状態の誘導

我々はマウスの実験系において、細胞の初期化を促進する阻害剤を特定していた。そこで、この阻害剤がヒト iPS 細胞の全能性を誘導する活性を検証した。

4. 研究成果

(1) 全能性状態の生細胞での追跡

MERVL-LTR 制御下での H2B-mCherry の発現誘導は、マウス ES 細胞の 1%前後で認められた。生細胞での継時的観察を行うことにより、H2B-mCherry の発現誘導が数時間以内に急激に生じることがわかった。また、H2B-mCherry の発現誘導を認めた細胞のほとんどが死滅することも観察された。我々が用いた H2B-mCherry は、恒常的に発現させてもマウスの発生に影響しないことが証明されていることから、H2B-mCherry の急激な発現上昇を細胞が許容できないのではないかと推定した。現在は、他の蛍光蛋白をレポーターに用いたマウス ES 細胞を用いている。

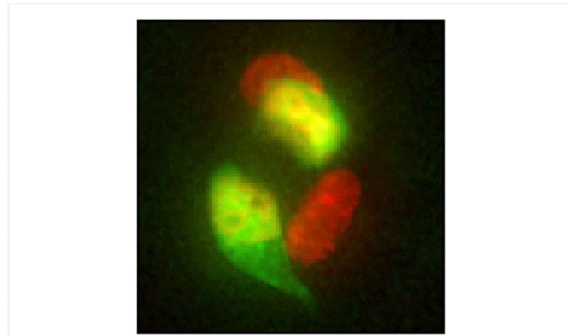


図2. マウスES細胞で発現が変動する遺伝子細胞の核はmCherryで染色し、対象遺伝子の発現をVenusのノックインにより検出した。図は、生細胞の継時的観察過程のスナップショット。

我々が Venus をマーカーに用いて未分化状態での発現変動を新規に同定した機能未知遺伝子については、安定的に生細胞での変動を観察できた(図2)。Venus 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現を RNA-seq で解析したところ、全能性状態のマーカーとして報告されている遺伝子群との逆相関を認めた。これより、Venus を指標にした本遺伝子の発現変動のメカニズムを調べることで、全能性状態の新たな制御機構を明らかにできる可能性が示唆された。

(2) 全能性状態の制御に関与する転写因子の推定と機能解析

Venus の発現変動に伴い DNA 結合能が変動する転写因子群を 1 細胞 ATAC-seq で特定後、それらの転写因子を単独、または複数の組み合わせで、CRISPR/Cas9 により破壊し、Venus の発現への影響を調べた。その結果、破壊によって Venus の発現を上昇または低下させる転写因子セットを特定できた。

(3) 全能性状態に対する阻害剤の効果の評価

マウス細胞において初期化誘導活性のある阻害剤を、ヒト iPS 細胞に対して投与したところ、未分化マーカーの発現の亢進を認めた。さらに、この阻害剤の投与時の培養条件を変えることで、ヒト iPS 細胞の全能性を高められる可能性を示唆する結果を得ている。この結果については、まずは再現性の検証が必要ではあるが、ヒトでの全能性を誘導するための新規の手法に繋がる可能性を期待できる知見と考えている。

(4) 研究成果に基づく今後の展望

本研究課題の開始と時期を同じくして、他の研究グループから全能性幹細胞の作製に関する報告がなされ、この分野は急激な進展を遂げつつある(Posfai et al. *Nature Cell Biol*, 2021)。当初は、マウスの全能性状態の報告が先行していたが、最近では、ヒト細胞においても、全能性状態を誘導できる可能性が報告されてきている(Yu et al. *Nature* 2021, Liu et al. *Nature* 2021)。しかし、とりわけヒトにおいては、倫理的観点から初期発生の実験には制限があり、真の全能性状態の評価方法自体が定まっていない。我々は、本研究課題において、マウスとヒトの両方に対して、全能性制御機構を解析してきた。マウスを用いた実験は、全能性の評価に重要な初期胚実験を自在に行える点で利点があり、一方、ヒト細胞を用いた実験は、再生医学を指向した研究を行う上で必須である。今後は、マウスとヒトの各々の実験系の利点を生かしながら、哺乳動物の全能性の共通原理を明らかにしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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, 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 2019.12.4 福岡（招待講演）
4. 発表年 2019年

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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------