

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19189

研究課題名(和文) 霊長類・げっ歯類に保存される全能性制御機構の解明

研究課題名(英文) Totipotency conserved in primates and rodents

研究代表者

高島 康弘 (Takashima, Yasuhiro)

京都大学・iPS細胞研究所・准教授

研究者番号：70469930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：全能性とは、受精卵が有する個体を構成するすべての種類の細胞(胚体外細胞を含む)に分化することができる能力である。げっ歯類であるマウスES細胞は、胎盤へ分化できないとされ、多能性幹細胞とされる。一方、本研究において、霊長類であるヒトES/iPS細胞から着床前胚である胚盤胞の栄養外胚葉に分化誘導することができた。さらに誘導した栄養外胚葉から胎盤を構成する細胞性栄養膜細胞や合胞体性栄養膜細胞、絨毛外性栄養膜細胞に誘導することに成功した。すなわちナীব型ヒト多能性幹細胞は広義の全能性を有するとする研究成果を得、論文として報告した(Io et al., Cell Stem Cell)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナীব型ヒト多能性幹細胞(PSC)から胎盤を構成する細胞が誘導できた。マウスと違いヒトPSCは広義の全能性を有する。またナীব型ヒトPSCからヒト卵割期様細胞を取り出すことにも成功しており、卵割期細胞や胚盤胞の細胞を幹細胞として解析することも可能にした。ヒト胚は倫理や質の問題があるが、樹立した幹細胞を用いてヒト胚研究を補完することが可能になり、ヒト初期発生研究の基盤として学術的意義がある。また胎盤は妊娠を維持する上で必須の臓器である。本研究で構築したモデルは、従来の倫理的規制を遵守したまま、初期胚の研究の可能性を広げ、不妊症や、胎盤に関連した妊娠合併症の病態解明に繋がる社会的意義も有する。

研究成果の概要(英文)：Totipotency is the ability of a fertilized egg to differentiate into all types of cells including extraembryonic cells that make up an individual. Mouse ES cells, which belong to rodents, are considered to be pluripotent stem cells (PSCs) because they can not differentiate into the trophoblast lineage of the placenta. In this study, however, we were able to induce naive human ES/iPS cells to the trophoblast of blastocysts at the pre-implantation stage. Furthermore, we succeeded in inducing cytotrophoblast, syncytiotrophoblast, and extravillous trophoblast, which constitute the placenta, from naive PSC-derived trophoblast. Thus, naive human PSCs, are possibly totipotent in the broad sense of the word (Io et al., Cell Stem Cell).

研究分野：幹細胞

キーワード：多能性幹細胞 全能性 胚体外細胞 未分化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全能性とは、受精卵が有する個体を構成するすべての種類の細胞(胚体外細胞を含む)に分化することができる能力である。げっ歯類であるマウス ES 細胞は、胎盤へ分化できないとされ、多能性幹細胞とされる。研究代表者は、ナীব型ヒト多能性幹細胞(リセット細胞)を樹立することに成功した(Takashima et al. Cell 2014)。naive 型ヒト ES/iPS 細胞は、着床前胚の胚盤胞のエピブラストあるいは内部細胞塊に近い遺伝子発現を示す細胞であるが、この細胞の機能的な能力は知られていなかった。またマウスとヒトの ES/iPS 細胞の違いもまだ理解されていなかった。

2. 研究の目的

naive 型ヒト ES/iPS 細胞の分化能力を確認するために、胚体外細胞への分化を試みることにした。特に胚体外細胞で最も重要とされる胎盤細胞への分化を試みることにした。

ヒトとマウスは、胎盤の構造、子宮の構造、ホルモン応答性等、差異があり、マウスの知見をヒトに応用することは必ずしも適切ではない。着床前から着床期にかけての初期発生様式に関してもげっ歯類であるマウスと霊長類は遺伝子発現に異なる点があり、ヒトあるいは非ヒト霊長類での初期発生研究が重要である。妊娠合併症の約 15%は胎盤あるいは子宮内・胚体外組織に原因があるとされる。また 10 組に 1 組は不妊治療を行っていることも知られている。質の高い受精卵を子宮内に戻した場合ですら流産する場合は多く、胚のみならず胎盤や子宮も含めた包括的な理解が重要である。しかしながら、ヒト生体内における着床は妊娠しているかも不明な時期であり、生体で研究することは困難である。そこで本研究では、ヒト多能性幹細胞を用いて、胎盤細胞の誘導し、胎盤分化モデルを作製する。またアクセスが可能な霊長類組織サンプルやヒト組織サンプルを採取し、網羅的遺伝子発現を解析することや試験管内培養モデルを確立する。一方で、マウス ES/iPS 細胞において、一部の細胞で 2 細胞期様細胞が存在することが知られる。卵割期は、まさしく全能性を有する細胞であると考えられる。またマウス 2 細胞期は、zygotic genome activation (ZGA) が起こる時期であり、胚由来遺伝子の発現が始まる。naive 型ヒト ES/iPS 細胞を利用し、マウスと同様にヒトにおける卵割期細胞を解析し、ヒトの全能性に迫ることを目指す。

本研究を通して、妊娠を維持する上で必須の臓器である胎盤を構築することによって、従来の倫理的規制を遵守したまま、初期胚の研究の可能性を広げ、不妊症や、胎盤に関連した妊娠合併症の病態解明に繋がる成果とする。また卵割期細胞や胚盤胞の細胞を幹細胞として解析することを可能にする。その結果、樹立した幹細胞を用いてヒト胚の研究を可能にし、倫理や質の問題があるヒト胚を補完する幹細胞を用いたヒト初期発生研究の基盤を作る。

3. 研究の方法

胎盤の絨毛を構成するトロホブラスト細胞は、胚(胎児)由来である。研究代表者が 2014 年に樹立した naive 型ヒト ES/iPS 細胞は、着床前胚盤胞のエピブラストに一致し、今までできなかった着床前のより早期の初期発生研究を可能とした。そこで ES/iPS 細胞を利用し、トロホブラスト細胞の誘導を試み、全能性の一つの証明を行う。

naive 型ヒト ES/iPS 細胞を用いて卵割期様細胞の存在を確認し、純化し、卵割期様細胞を解析することで、ヒト全能性解析の基盤を作る。

(1) 着床前栄養外胚葉への誘導

胎盤は胎児の外側にある栄養膜という組織から成り、妊娠を維持する上でとても重要な臓器である。これまで、マウスの栄養膜細胞の発生についての研究はなされてきたが、発現する遺伝子などで、ヒトの栄養膜の発生とは異なる点も多くある。一方、ヒトの栄養膜の研究は絨毛癌の癌細胞株を使ったものがあるが、この細胞は通常の細胞とは違う性質を持つ癌細胞であるため、正常の発生モデルに置き換えることは難しいという問題があった。そこで naive 型ヒト ES/iPS 細胞から誘導する。誘導する際、報告されているヒト胚の single-cell (sc) RNA-seq に基づき、着床前胚盤胞の栄養外胚葉(TE)を誘導する。naive 型 ES/iPS 細胞由来栄養外胚葉(nTE)と胚盤胞の TE を比較解析する。

(2) 栄養外胚葉を起点として、胎盤細胞への分化系譜を明らかにする。

胚は子宮に着床した後、TE は細胞性栄養膜細胞(CT)へと分化し、その後合胞性栄養膜(ST)と絨毛外栄養膜(EVT)の両方へ分化し、CT、ST、EVT が絨毛及び胎盤を構成していく。近年、有馬博士、岡江博士の研究グループによって胎盤から CT 幹細胞が樹立できる報告がなされた。nTE(naive 型 ES/iPS 細胞由来 TE)から試験管内で nCT、nST、nEVT に誘導する。子宮に着床したカニクイザル胚(E15 前後)や、培養したヒト胚、妊娠第一期の胎盤の遺伝子発現を調べ、誘導に

必要なシグナルを決定する。また nTE から nCT への系譜を解析する。

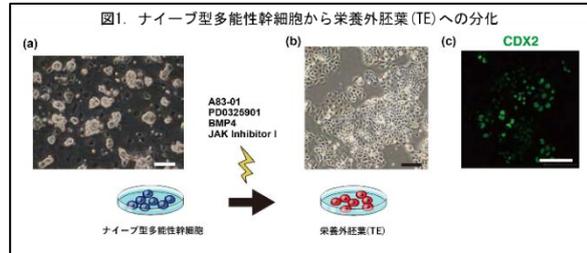
(3) naïve 型ヒト ES/iPS 細胞における卵割期遺伝子を発現する細胞の同定と解析
卵割期遺伝子の上流と報告される DUX4 を中心とし、解析をすすめる。DUX4 は 4 番染色体のサブテロメア領域に存在し、10 回以上の繰り返しを持つ 1 ユニット 3.3kb の D4Z4 反復配列を持ち、この部位がメチル化されることで DUX4 の発現は抑制されている。また 10 番染色体にも同様の配列を持つ。DUX4 結合配列-GFP ベクターを用いて、ヒト 8 細胞期様細胞を純化・追跡する。

(4) 非ヒト霊長類 ES/iPS 細胞を用いた解析
naïve 型マーマーセット ES 細胞を樹立し、霊長類での研究の基盤をつくる。

4. 研究成果

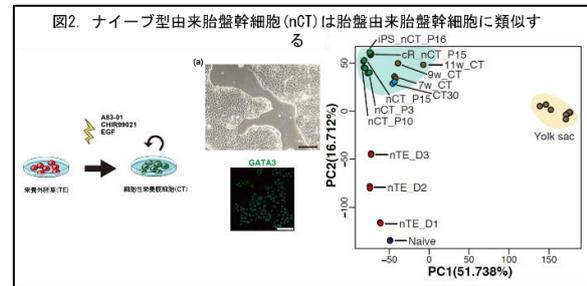
(1) 着床前栄養外胚葉への誘導

報告されているヒト胚の scRNA-seq を解析した結果、胚盤胞の TE において TACSTD2 と ENPEP の二つの表面抗原が発現することを同定した。またこの表面抗原を利用し、シグナルのスクリーニングを行った結果、BMP、A83-01、PD0325901、JAK inhibitor I という 4 因子を用いて naïve 型 ES/iPS 細胞から TE を作製することに成功した (naïve 型 ES/iPS 細胞由来 TE (nTE)) (図 1)。

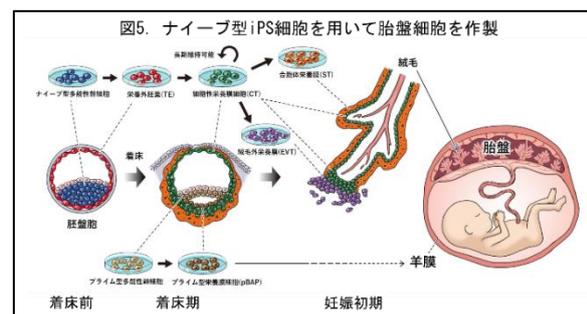
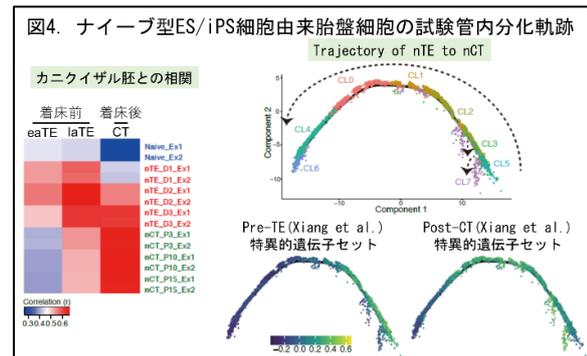
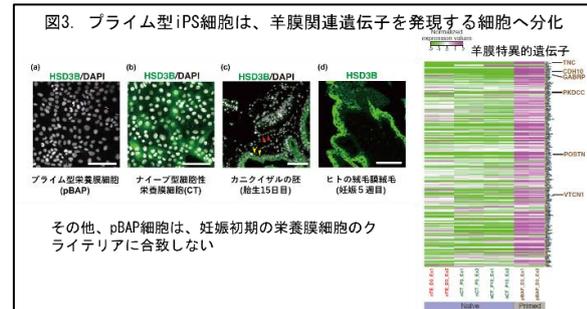


(2) 栄養外胚葉を起点として、胎盤細胞への分化系譜を明らかにする。

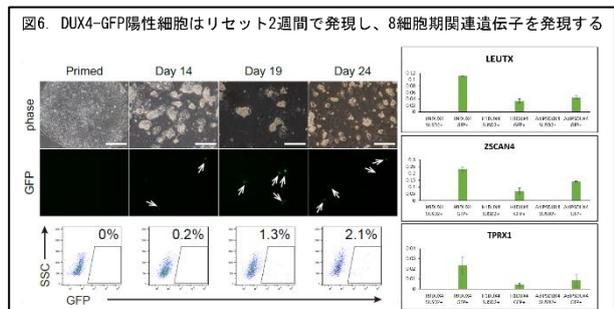
TE は子宮に着床し、CT に分化する。ヒト第 1 妊娠期検体を利用し、CT に発現する表面抗原を検索した結果、SIGLEC6 を同定した。またシグナルに関わる受容体を検索し、A83-01、CHIR99021、EGF (ACE) が重要であることを同定した。これは既報の論文データとも合致する結果であった。nTE から ACE 培地を用いて培養したところ、実際に CT に誘導できた (nCT) (図 2)。誘導した nCT は ST および EVT にも誘導できた。一方、従来型の primed 型 ES/iPS 細胞を分化させると、CT には分化せず、羊膜細胞に分化することが分かった (図 3)。最後に scRNA-seq を利用し、in vivo カニクイザル胚やヒト胚の長期培養と比較した結果、我々の誘導方法は TE から CT への発生と非常に類似していることが分かった (図 4)。さらに報告されたヒト胚を培養し得られた single-cell RNA-sequence の結果にもよく一致していた。これらを図 5 にまとめるが、naïve 型ヒト多能性幹細胞から誘導したトロホブラスト細胞は、ヒト着床期を含むトロホブラスト発生を模倣していることを示唆した (Io et al. Cell Stem Cell 2021)。本分化システムは着床期を理解するために非常に有用なモデルであることが分かった。さらに詳細なプロトコルを論文として報告した (Io et al. STAR Protocols 2021)。



(3) naïve 型ヒト ES/iPS 細胞における卵割期遺伝子を発現する細胞の同定と解析
卵割期遺伝子の上流と報告される DUX4 の結合配列に GFP をつけた DUX4-GFP ベクターを naïve 型および primed 型ヒト ES/iPS 細胞に導入した。Primed 型 ES/iPS 細胞から naïve 型へリセットを行うと、約 2 週間程度から約 1% 程度の割合において、DUX4-GFP 陽性細胞が出現

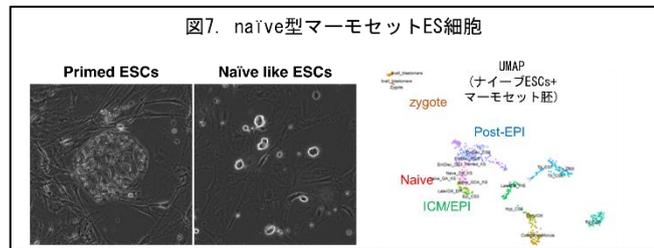


する。ナイーブ型 ES/iPS 細胞においても数%前後の割合で存在することが分かった。さらに DUX4-GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで純化し取り出し、遺伝子発現を解析したところ、8 細胞期に関連する遺伝子が発現することが分かった(図 6)。



(4)非ヒト霊長類 ES/iPS 細胞を用いた解析

naïve 型マーマセット ES 細胞の樹立に成功した。形態・遺伝子発現が naïve 型ヒト ES/iPS 細胞によく似ており、網羅的解析においても着床前胚のエピプラストに似ていることが分かった(図 7)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Shono Mayumi, Kishimoto Keiko, Hikabe Ori, Hayashi Masafumi, Semi Katsunori, Takashima Yasuhiro, Sasaki Erika, Kato Kiyoko, Hayashi Katsuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Induction of primordial germ cell-like cells from common marmoset embryonic stem cells by inhibition of WNT and retinoic acid signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29850-z	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 -
1. 著者名 Kubiura-Ichimarū Musashi, Penfold Christopher, Kojima Kazuaki, Dollet Constance, Yabukami Haruka, Semi Katsunori, Takashima Yasuhiro, Boroviak Thorsten, Kawaji Hideya, Woltjen Knut, Minoda Aki, Sasaki Erika, Watanabe Toshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 mRNA-based generation of marmoset PGCLCs capable of differentiation into gonocyte-like cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.09.20.508677	査読の有無 無
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
1. 著者名 Kunitomi Akira, Hirohata Ryoko, Arreola Vanessa, Osawa Mitsujiro, Kato Tomoaki M., Nomura Masaki, Kawaguchi Jitsutaro, Hara Hiroto, Kusano Kohji, Takashima Yasuhiro, Takahashi Kazutoshi, Fukuda Keiichi, Takasu Naoko, Yamanaka Shinya	4. 巻 2
2. 論文標題 Improved Sendai viral system for reprogramming to naive pluripotency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports Methods	6. 最初と最後の頁 100317 ~ 100317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.crmeth.2022.100317	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
1. 著者名 Okubo Takumi, Takashima Yasuhiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Exploring the human extraembryonic mesoderm using naive pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2022.08.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Io Shingo, Iemura Yoshiki, Takashima Yasuhiro	4. 巻 2
2. 論文標題 Optimized protocol for naive human pluripotent stem cell-derived trophoblast induction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100921 ~ 100921
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100921	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 -

1. 著者名 Kishimoto Keiko, Shimada Akiko, Shinohara Haruka, Takahashi Tsukasa, Yamada Yuko, Higuchi Yuichiro, Yoneda Nao, Suemizu Hiroshi, Kawai Kenji, Kurotaki Yoko, Hanazawa Kisaburo, Takashima Yasuhiro, Sasaki Erika	4. 巻 53
2. 論文標題 Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102252 ~ 102252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102252	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 -

1. 著者名 Takahashi Kazutoshi, Nakamura Michiko, Okubo Chikako, Kliesmete Zane, Ohnuki Mari, Narita Megumi, Watanabe Akira, Ueda Mai, Takashima Yasuhiro, Hellmann Ines, Yamanaka Shinya	4. 巻 17
2. 論文標題 The pluripotent stem cell-specific transcript ESRG is dispensable for human pluripotency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009587 ~ 1009587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009587	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 -

1. 著者名 Io Shingo, Kabata Mio, Iemura Yoshiki, Semi Katsunori, Morone Nobuhiro, Minagawa Atsutaka, Wang Bo, Okamoto Ikuhiro, Nakamura Tomonori, Kojima Yoji, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Kaswandy Belinda, Kondoh Eiji, Kaneko Shin, Woltjen Knut, Saitou Mitinori, Yamamoto Takuya, Mandai Masaki, Takashima Yasuhiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Capturing human trophoblast development with naive pluripotent stem cells in vitro	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1039.e13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.03.013	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22件（うち招待講演 19件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞に関する研究
3. 学会等名 山梨大学発生物学技術開発・実践特別教育プログラム共催（第63回セミナー）（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 次世代iPS細胞の可能性とヒト胚モデル
3. 学会等名 大学発シーズマッチングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Living Systems Institute Seminar, University of Exeter（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 幹細胞を利用したヒト初期発生学の創出
3. 学会等名 再生ELSI研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modelling peri-implantation development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 iPS細胞の誕生・現在・未来
3. 学会等名 大阪府高齢者大学校 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modelling peri-implantation development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第19回幹細胞シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive human pluripotent stem cells
3. 学会等名 ?SY-STEM（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ナイーブ型多能性幹細胞に関する成果と可能性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ナイーブ型多能性幹細胞の維持培養法
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 CiRA Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Studying primate early development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第11回日本マーマセット研究会大会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Analyzing human peri-implantation development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 ASHBi Symposium 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Analysing human peri-implantation development using in vitro models by naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Placental Biology Course University of Cambridge (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 ヒトのいのちから人を人為的に作る研究の進展とその倫理的問題
3. 学会等名 ゲノム問題検討会議 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高島 康弘
2. 発表標題 iPS細胞の誕生とこれから
3. 学会等名 大阪府高齢者大学校 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuhiro Takashima
2. 発表標題 Modeling in vitro embryonic development using naive pluripotent stem cells
3. 学会等名 Epigenetics in Early Mammalian Development (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 松藤 未夏, 大久保 巧, 高島 康弘
2. 発表標題 ヒトにおいて、N-cadherinは原始内胚葉の接着に必要である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 望月 俊吾, 遠山 周吾, 菱木 貴子, 岩崎 未央, 高島 康弘
2. 発表標題 Naive型ヒト多能性幹細胞の網羅的解析とFeeder free化への挑戦
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高里 実	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 129
3. 書名 実験医学2021年11月号	

〔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
---------	---------

英国	University of Exeter			
----	----------------------	--	--	--