

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14714

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞における分化偏向性の解消

研究課題名(英文) Establishment of new human pluripotent stem cell with unbiased differentiation potency.

研究代表者

中村 友紀 (Nakamura, Tomonori)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：90648429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞(PSC)は全成体細胞に寄与する能力を保持しつつ、無限増殖も可能な細胞である。本研究ではin vivoにおける多能性細胞の挙動を模倣することで、ヒトPSCに見られる分化偏向性を排した、新規培養系の確立を試みた。目的のin vivo多能性細胞は着床直後に相当するため、scRNA-seqを用いたカニクイザル着床胚の形質解析とカニクイザルPSCを用いた培養条件の検討、そしてヒトPSCでの再現を目指した。この過程において、これまで不安定であったサルPSCの新規培養系の確立に至るとともに、意外にもscRNA-seq解析における普遍的な障壁を発見し、さらに解決策を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトiPSCが樹立されて以来、モデル動物としての非ヒト霊長類が見直されてきている。また、霊長類に関わらず昨今の分子生物学ではscRNA-seqを筆頭に単一細胞レベルの研究領域に突入している。これらの状況を鑑みると本研究成果はこれからの時代の基礎となる知見や技術になり、学術的意義は高いと考える。今後本研究の成果をもとに有意義な研究を展開していきたい。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cells (PSCs) are cells that can proliferate indefinitely while retaining the ability to contribute to whole adult cells. In this study, we attempted to establish a new culture system that eliminates the differentiation bias seen in human PSCs by mimicking the environment in vivo. Since the target in vivo pluripotent cells correspond immediately after implantation, we aimed to analyze the traits of cynomolgus monkey implantation embryos using scRNA-seq, examine the culture conditions using the monkey PSC, and reproduce them in human PSC. In this process, we have established a new robust and stable culture system for monkey PSC, which has been unstable, and surprisingly discovered a universal problem in scRNA-seq analysis, and found a solution.

研究分野：発生、幹細胞生物学

キーワード：カニクイザル 多能性幹細胞 scRNA-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞(Embryonic stem cell; ESC)や人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPSC)を含む多能性幹細胞(Pluripotent stem cells; PSC)は、三胚葉への分化能を有したまま無限に増殖する能力を持つ。初めてヒト iPSC が樹立されて以来(Takahashi et al., 2007, Cell)、目覚ましい発展により加齢黄斑変性をはじめ臨床研究や治験が開始されるほどになった。しかし、未だ真の応用には大きな障壁がいくつもあり、そのうちの一つが使用株の選定である。ヒト PSC では、同じ遺伝的背景を持っていても株間における分化誘導時の効率に大きな違いがみられる(Kajiwara et al., 2012, PNAS; Nishizawa et al., 2016, CellStemCell; Yokobayashi et al., 2017, B.O.R.)。これを分化偏向性という。この問題の回避策として、相当数の iPSC 株を樹立後、分化誘導実験により選別を行い適切な株を使用するといった方法が考えられているが、この方法では選別やその後のストック保持に莫大な労力と時間がかかる。結果として、大きな能力を秘めるヒト PSC の応用範囲を狭める恐れがあった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、カニクイザルをモデルに *in vivo* の胚発生を調べるとともに、*in vivo* の状況を模倣することでカニクイザル/ヒト PSC における分化偏向性を排した新規の培養法の開発を目標とした。特に既存の培養条件では霊長類 PSC は Primed 型と呼ばれる原腸陥入中期-後期に当たる EPI と相同な形質を有していることから、より早期、原腸陥入前の EPI と相同な状態の再現を目指した。

3. 研究の方法

申請者はこれまで、申請者は非ヒト霊長類であるカニクイザル(*Macaca fascicularis*)の着床前後胚を解析し、ヒト/サル PSC がサル原腸陥入中期の EPI に相当することをすでに見出していた(Nakamura et al., 2016, Nature; Nakamura et al., 2017, Sci. Data)。これらを踏まえ、本研究では具体的には以下の3つの項目について検討を進めた。

既存の *In vivo* における scRNA-seq データを再解析するとともに、新たにより早期の着床胚よりデータを取得し原腸陥入前 EPI の遺伝子発現状態を調べた。そして、下記に記すレポーターPSC 作出に使う、原腸陥入期状態を示唆する最適な遺伝子を探索した。

安定な Primed 型カニクイザル PSC の培養系確立と、レポーターカニクイザル PSC の作出を目指した。これまでのカニクイザル PSC 培養系は最適化が不十分であり不安定であり、細胞株のクローン化が難しくレポーター作成が非常に困難であった。これを解決するため、まず Primed 型カニクイザル PSC の培養系改良を行い、そののちに原腸陥入期 EPI の状態を示すレポーターPSC の確立を目指した。

In vivo の情報とレポーターPSC を用いて、原腸陥入前と相同なカニクイザル/ヒト PSC の培養系確立を目指した。*In vivo* において関連するサイトカインや成長因子を中心に条件を検討した。その際、独自で開発した低コストな RNA-seq 法 SC3-seq(Nakamura et al., 2015, N.A.R.)を用いた transcriptome レベルでの検証を行った。

4. 研究成果

まず現状の Primed 型カニクイザルの培養条件改良の検討を行い、新たな安定培養培地

AITS(AlbuMax, Insuline-Transferrin-Serenite)の開発に成功した。これによりクローン化が容易
 になっただけでなく、従来法では維持困難であった株も安定的に培養可能になり、さらに
 100 倍以上に増殖が可能になった(図1A, B, Sakai*, Nakamura* et al., 2019, B.O.R.)。そしてこ
 の方法を用いて、原腸陥入前期特異的なレポーターPSC の樹立に成功した (Nakamura et al,
 未発表)。またヒトではより安定な glutamine 二量体(GlutaMax, Thermo Scientific)の代謝が可
 能だが、カニクイザル PSC は不可能であることも見出した(Sakai*, Nakamura* et al., 2019,
 B.O.R.)。さらにこの培養系を使うことで、サル始原生殖細胞様細胞(Primordial germ cell-like
 cells: PGCLCs)の誘導系も樹立し、ヒト PGCLCs や in vivo における PGC と相同な細胞が得
 られることを報告した(図1C, D, Sakai*, Nakamura* et al., 2019, B.O.R.)。分化偏向性の影響に
 よりヒト PGCLC 誘導においても誘導効率に株間の大きな差がみられることが知られてお
 り、カニクイザル PGCLC 誘導においても全く誘導できない株が見られたが、AITS 培養法
 の確立により様々な PSC 株の検討が可能になり、適切なカニクイザル PGCLC 誘導に至る
 ことができた(図1、Sakai*, Nakamura* et al., 2019, B.O.R.)。

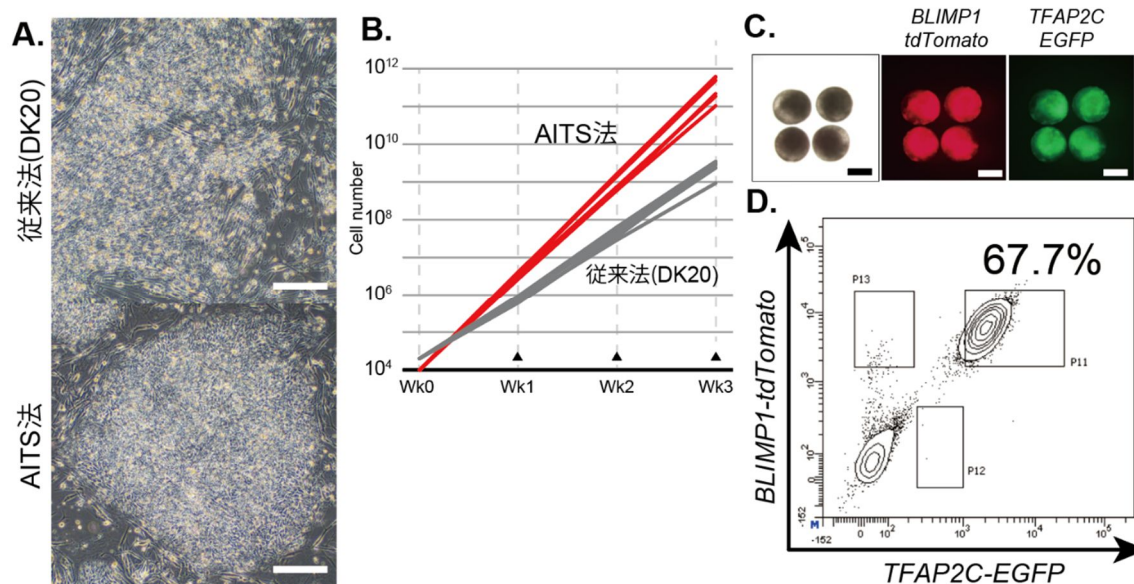


図1 AITS法の開発。

A. 従来法(DK20, DMEM/F12+KSR)とAITS法でのカニクイザルESCの形態

B. 従来法とAITS法での増殖速度

C. AITS法を用いて作出された、BLIMP1-tdTomato, TFAP2C-EGFPを持つサルESCを起点に誘導されたサルPGCLC

D. FACSによるサルPGCLCにおけるBLIMP1-tdTomato, TFAP2C-EGFPの検出

従来法では不安定であったサルESCがAITS法により安定化し、100倍以上の増殖が可能
 になった。シングルセルでの継代、クローン化も可能になったことでサルPGCLC誘導が可能な
 サルESCの選別や、ターゲティングも可能となった。

In vivo における遺伝子発現状態を調べるにあたり、まず既存のデータを用いた再解析を
 行った。その際、いくつかの主要マーカーの発現から期待される形に、細胞がクラスタリン
 グされない事象が見られた。原腸陥入前状態の正しい情報を得るにはこれらの問題を解決
 する必要があるため、純粋数学者らと数学的なメカニズムから共同研究を行ったところ、
 scRNA-seq には“次元の呪い”という数理解析上の問題が生じていることを見出した(Imoto*,
 Nakamura* et al, 投稿中)。次元の呪いとは、様々な観測ノイズが高次元空間において蓄積さ
 れることで、サンプル間の関係性を正しく描写することができなくなる現象であり、これに
 より大きなサンプリングノイズを包含する scRNA-seq ではクラスタリングに支障をきたす。

この問題に対し我々は、新たな数理解析的ノイズ除去法である RECODE (Resolution of curse of dimensionality)を開発した(図 2, Imoto*, Nakamura* et al, 投稿中)。これにより、scRNA-seq に内包されるノイズが除去され、各遺伝子の真の値を抽出できるようになった(図 2A, B)。さらにクラスタリングにおける問題も解消され真のデータ構造抽出が可能になり、数千細胞の中から数個しかない希少細胞種の同定も可能になることを示すとともに、これまで transcriptome 情報が同定できていなかったマウス胚の種々の細胞種を同定することに成功した(図 2C, Imoto*, Nakamura* et al, 投稿中)。

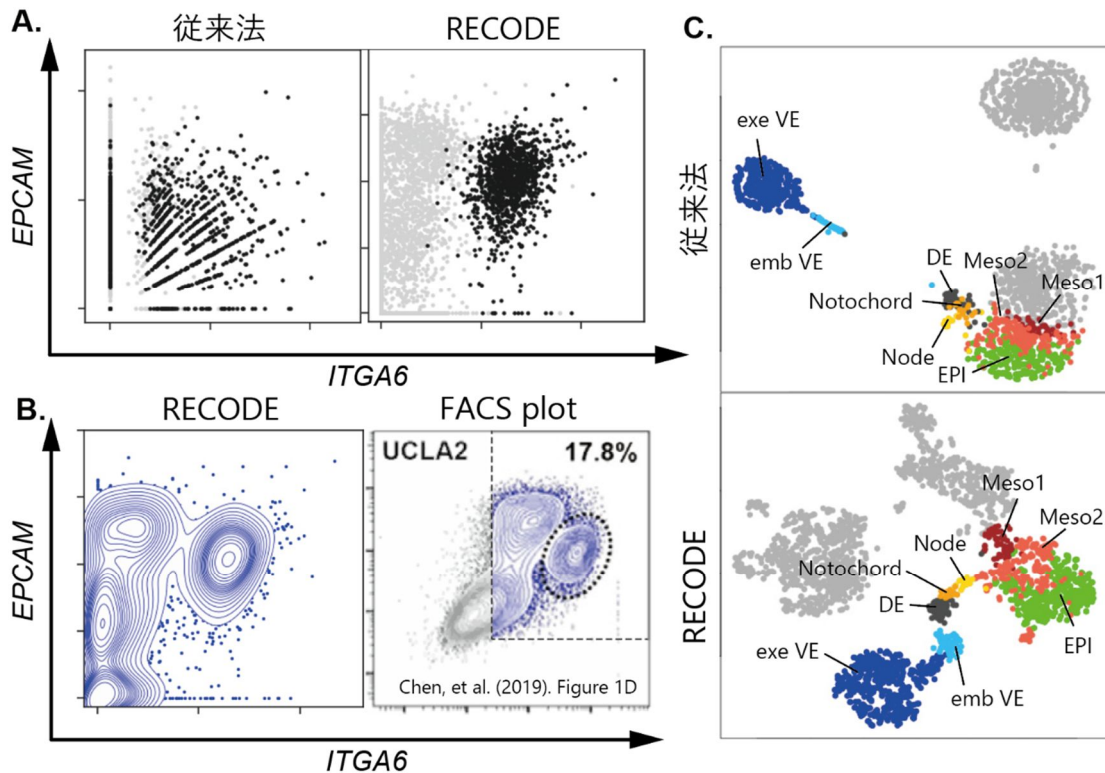


図2 ノイズ削減法RECODEの開発。

A. ヒトPGCLC誘導4日目で取得されたscRNA-seqデータを用いて、ヒトPGCLC特異的に発現しているEPCAMとITGA6の発現をプロットした図。黒がヒトPGCLCを示す。従来法ではノイズにより発現量が離散的に表現されてしまうが、RECODE処理をすることで連続的なプロットとなり、さらにヒトPGCLCが確かにEPCAM-ITGA6両陽性となる。

B. (左)、A右図と同じデータを用いて等高線プロットを描いたもの。(右)免疫染色とFACSにてヒトPGCLC誘導4日目の細胞におけるEPCAM-ITGA6の発現を調べた図(Chen et al. 2019より)。RECODEを用いることでscRNA-seq(mRNA)とFACS(Protein)で相同な図が得られるようになった。

C. マウス原腸陥入期胚(E7.5)より取得されたscRNA-seqデータを用いて、tSNE解析を行った結果図。マウスではE7.5付近からは胚体内内胚葉(DE)と胚体外内胚葉(VE)が混ざる現象が知られているが、RECODEによりそれが再現されている。またRECODE処理ではNodeとNotochordの分離も可能となり、これら類似した近い細胞種も正確に分離することが可能になった。

ヒト iPSC が樹立されて以来、モデル動物としての非ヒト霊長類が見直されてきた。また、霊長類に関わらず昨今の分子生物学では scRNA-seq を筆頭に単一細胞レベルの研究領域に突入している。これらの状況を鑑みると本研究成果はこれからの時代の基盤となる知見や技術になり、学術的意義は高いと考える。現在まで、本研究の当初の目標である分化配向性の解消までは残念ながら至っていないが、サル PGCLC 誘導法の確立やノイズ削減法 RECODE の開発など付随して得られたこれまでの成果をもとに、さらなる検討を重ね目標達成を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 8件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagaoka So I., Nakaki Fumio, Miyauchi Hidetaka, Nosaka Yoshiaki, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Hayashi Katsuhiko, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 367
2. 論文標題 ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science	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) 10.1126/science.aaw4115	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Sakai Yoshitake, Nakamura Tomonori, Okamoto Ikuhiro, Gyobu-Motani Sayuri, Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Tsukiyama Tomoyuki, Iwatani Chiduru, Tsuchiya Hideaki, Ema Masatsugu, Morizane Asuka, Takahashi Jun, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 102
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys †	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 620 ~ 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz205	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Yamashiro Chika, Sasaki Kotaro, Yabuta Yukihiro, Kojima Yoji, Nakamura Tomonori, Okamoto Ikuhiro, Yokobayashi Shihori, Murase Yusuke, Ishikura Yukiko, Shirane Kenjiro, Sasaki Hiroyuki, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 362
2. 論文標題 Generation of human oogonia from induced pluripotent stem cells in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 356 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aat1674	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Ohta Hiroshi, Yabuta Yukihiro, Kurimoto Kazuki, Nakamura Tomonori, Murase Yusuke, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 104
2. 論文標題 Cyclosporin A and FGF signaling support the proliferation/survival of mouse primordial germ cell-like cells in vitro †	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 344 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioaa195	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Nakamura Tomonori, Fujiwara Kohei, Saitou Mitinori, Tsukiyama Tomoyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Non-human primates as a model for human development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2021.03.021	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 Kojima Yoji, Yamashiro Chika, Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Okamoto Ikuhiro, Iwatani Chizuru, Tsuchiya Hideaki, Nakaya Masataka, Tsukiyama Tomoyuki, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 4
2. 論文標題 GATA transcription factors, SOX17 and TFAP2C, drive the human germ-cell specification program	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000974	査読の有無 有
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 該当する

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murase Yusuke, Yabuta Yukihiro, Ohta Hiroshi, Yamashiro Chika, Nakamura Tomonori, Yamamoto Takuya, Saitou Mitinori	4. 巻 39
2. 論文標題 Long term expansion with germline potential of human primordial germ cell like cells in?vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104929	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomonori Nakamura
2. 発表標題 Dissecting the spectrum of pluripotency in primates
3. 学会等名 第53回日本発生生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomonori Nakamura
2. 発表標題 Induction of the Germ-Cell Fate from Pluripotent Stem Cells in Cynomolgus Monkeys
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村友紀
2. 発表標題 次元の呪い-高次元観測データにおけるノイズとノイズ低減解析法-
3. 学会等名 第6回六甲医学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Nakamura
2. 発表標題 Identifying cells hidden by curse of dimensionality
3. 学会等名 京都大学大学院医学研究科、発生・細胞生物・システムズバイオロジー大学院コース、リトリート（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomonori Nakamura
2. 発表標題 Identifying cells hidden by curse of dimensionality
3. 学会等名 The 1st ASHBi SignAC international workshop 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 データ処理方法、データ処理装置およびデータ処理プログラム	発明者 井元佑介、中村友紀、平岡裕章、齋藤通紀	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-102852	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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