

研究テーマ： 新規初期化因子によるヒト初期胚様幹細胞の作製

カロリンスカ研究所

吉原 正仁

【背景・目的】

近年、ヒト iPS 細胞を用いた再生医療研究が進んでいるが、ヒト iPS 細胞は安定した維持培養が困難であり、目的細胞を安定して効率良く得るという目標は未だ達成されていない。その理由の一つとして、ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞よりも分化が進んだ着床後胚に近い段階にあり、完全に未分化な状態でないと考えられている。

本研究は、ヒト着床前初期胚のトランスクリプトーム解析によって得られた情報をもとに、ヒト初期胚で中枢的な機能を担う転写因子群を同定し、これらをリプログラミング因子として体細胞に導入することで、受精卵に近い、より未分化な幹細胞の作製を目的とする。この幹細胞は、従来のヒト iPS 細胞よりも高い多分化能を有し、安定した維持培養が可能であることが期待される。

【研究経過】

所属先機関では着床前のヒト初期胚（卵母細胞、受精卵、4 細胞期、8 細胞期）を用いたシングルセル・トランスクリプトーム解析により、山中 4 因子よりも初期の 8 細胞期までに、Paired (PRD)-like ホメオドメインを持つ転写因子群の発現が上昇することを発見した (Töhönen V *et al. Nat Commun.* 2015)。これらの転写因子群は新規リプログラミング因子としての応用が期待される。

今回はさらに、ヒト正常組織における遺伝子発現データベースとの比較により、ヒト初期胚特異的に発現する遺伝子の検索を試みたところ、5 つの転写因子を含む 7 つの遺伝子の同定に成功した。これらの遺伝子はいずれも、4 細胞期から 8 細胞期にかけて発現上昇し、その後発現が低下していた。このうち 1 つの転写因子については既に iPS 細胞へのリプログラミング効率を向上することが報告されていることから、他の 4 つの転写因子についても同様の効果が期待される。また、これまで、数々の研究グループにより、従来のヒト iPS 細胞 (prime 型) よりも着床前胚に近く未分化な、naïve 型幹細胞の作製が試みられてきた (Huang K *et al. Cell Stem Cell.* 2014)。今回、これら 7 つの遺伝子群について prime 型幹細胞と naïve 型幹細胞で発現比較を行ったところ、いずれも naïve 型幹細胞で高発現していたが、prime 型幹細胞ではその発現が低下していた。一方、山中 4 因子を含む従来のリプログラミング因子は prime 型幹細胞・naïve 型幹細胞いずれにおいても発現しており、明らかに我々が同定した遺伝子群と異なる発現パターンを示していた。以上の結果より、これら 7 つの遺伝子群は、従来の prime 型ヒト iPS 細胞よりも未分化な段階において機能することが示唆され、今後、ヒト初期胚様幹細胞の作製や、作製した幹細胞の評価への応用が望まれる。

次に、これらの遺伝子群の中で、将来的に体細胞へと分化する細胞群であるエピブラストにおいて高発現していた 1 つの転写因子「X」に着目した。この転写因子 X をヒト iPS 細胞に導入し、single-cell tagged reverse transcription (STRT; Islam S *et al. Nat Protoc.* 2012) 法による RNA-seq 解析を行った。NANOG は多能性維持に重要な役割を担っていることが知られているが、興味深いことに、この転写因子 X を強制発現させたところ、転写因子 X の発現上昇に伴い、NANOG の発現が増加していた。また、ヒト初期胚のトランスクリプトームデータの再解析においても、この転写因子 X と NANOG の発現が有意に関連していたことから、転写因子 X が NANOG の発現を制御していることが示唆された。さらに、NANOG 以外にもエピブラスト特異的遺伝子が多く発現上昇していたことから、エピブラスト特異的マーカー遺伝子群・原始内胚葉特異的マーカー遺伝子群・栄養外胚葉特異的マーカー遺伝子群の遺伝子セット (Petropoulos S *et al. Cell.* 2016) を用いてエンリッチメント解析 (Gene Set Enrichment Analysis:

GSEA; Subramanian A *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005) を行ったところ、エピブラスト特異的マーカー遺伝子群が発現上昇遺伝子群において有意に濃縮していた。同様に、naïve 型幹細胞に高発現する遺伝子群も発現上昇遺伝子群に有意に濃縮していた。最後に、STRT RNA-seq によって得られた、発現上昇遺伝子群のプロモーター配列におけるモチーフ探索を MEME (Multiple Em for Motif Elicitation; Bailey TL *et al. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol.* 1994) を用いて行ったところ、Töhönen らによって同定された、ヒト初期発生段階において濃縮していたモチーフ (EEA: EGA-enriched Alu-motif; Töhönen V *et al. Nat Commun.* 2015) を含む塩基配列が有意に濃縮していた。以上の結果から、転写因子 X はヒト初期発生段階において中枢的な機能を担うことが示唆され、多能性や未分化状態の維持にも関与することが期待されることから、新規リプログラミング因子として非常に強力な候補因子であると考えられる。

【今後の予定・展望】

今後、他のリプログラミング候補因子についても、ヒト iPS 細胞に強制発現させた後にトランスクリプトーム解析を行い、それらの標的遺伝子の検索を行う予定である。また、先日、我々の共同研究グループは、山中 4 因子および先述の EEA をターゲットとすることで、CRISPR-Cas9 系を利用した内在性遺伝子の活性化 (CRISPRa) により、ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立に成功した (Weltner J *et al. Nat Commun.* 2018)。現在、この手法を用いた iPS 細胞樹立の際に、同時にこれらのリプログラミング候補因子を導入することにより、リプログラミング効率の検討を行っている。転写因子 X を含む一部の候補因子については、既にリプログラミング効率が向上することを確認しており、今後は複数の候補因子を組み合わせることで、より高いリプログラミング効率を示す遺伝子群を同定する予定である。

最終的にこれらの候補因子を用いてヒト初期胚様幹細胞の作製に成功した際には、トランスクリプトーム解析およびメチローム解析を行い、従来のヒト iPS 細胞やヒト初期胚のデータと比較することで、相違点や類似点を検討する予定である。さらにクロマチン免疫沈降シーケンス解析 (ChIP-seq) により、新規リプログラミング因子による遺伝子発現制御機構の解明を目指す。最後に、胚様体形成能や三胚葉組織への分化能を評価し、従来の iPS 細胞との比較検討を行う予定である。

これらの新規リプログラミング因子を用いて作製したヒト初期胚様幹細胞は樹立効率が高く、従来の iPS 細胞よりも未分化な状態であり、より均一で高い分化能を有することが期待される。これにより効率よく高品質な幹細胞の提供が可能になり、目的細胞を安定して得ることで、再生医療や創薬への貢献が期待される。

【研究成果】

1. **Yoshihara M**, Bieder A, Falk A, Kere J, Tapia-Páez I. Ciliary gene expression profiling during human neuronal differentiation. Osaka University - Karolinska Institutet Joint Symposium in Neuroscience. Stockholm, Sweden. 2018 年 2 月.
2. **Yoshihara M**. An overview of transcriptome study. Karolinska Institutet - RIKEN Joint International Doctoral Course 2018. Stockholm, Sweden. 2018 年 3 月.