

「iPS 細胞と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平成25年度終了研究課題－

研究総括 西川 伸一

1. 研究領域の概要

本研究領域は、日本発となる iPS 細胞を樹立する技術によって大きなブレークスルーがもたらされると考えられる分野、すなわち、細胞のリプログラミング、分化転換、幹細胞生物学などを対象としている。また、これまでにない自由で創意に満ちた発想による基礎研究とともに、医療などに将来貢献できる基礎研究も対象としている。

具体的には、1)リプログラム機構の分子レベルでの解析に基づくリプログラミング技術の高度化・簡便化、2)幹細胞分化転換過程の解析と人的調節、3)iPS 細胞を用いたエピジェネティック過程の分子機構解析、4)iPS 細胞を駆使する疾患発症機構の解析、5)ヒト疾患モデルの構築などの研究を対象とする。

これら研究の成果は、疾患の原因の解明や新治療薬の開発に寄与するとともに、倫理的問題や拒絶反応のない細胞移植療法の実現に向けて貢献できるものと信じている。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数： 7件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

1) 選考は、「iPS 細胞と生命機能」領域に設けた選考委員7名の協力を得て、研究総括が行う。

2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。

3) 選考に当たっては、さきがけ共通の選考基準 (URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryoku4.html>) の他、特に下記二点を重視した。

①オリジナリティー： 研究提案が分かりやすく、十分に独創的である。

②実力・可能性： 研究提案書や過去の実績から考えて、テーマ遂行に十分な実力・可能性がある。

4. 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者(該当ない場合は削除)7名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数		
			9件	内 訳	3年型
対象数	73件	21件			

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

1)平成22年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・下島研究者、竹内研究者

研究期間が5年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する。(中間評価結果:
<http://www.jst.go.jp/kisoken/presto/evaluation/mid-term/index.html>.)

・武藤研究者

3年型の大挑戦型で採択されたが、研究期間1年を残して研究を中止したため。

2)加えて、以下を今年度の事後評価対象とする。

・佐々木研究者 (平成20年度採択)



研究期間が5年で、今年度終了するため。

5. 研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月(3年型)

平成 20 年 6 月～平成 26 年 3 月(5年型)

6. 領域の活動状況

領域会議: 11回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 研究実施期間中に全研究者を訪問し、研究環境の整備状況や研究進捗状況の確認、組織の責任者への協力依頼を行った。

7. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成 26 年 1 月 評価会開催

平成 26 年 2 月 研究総括による事後評価

平成 26 年 3 月 被評価者への結果通知

8. 事後評価項目

(1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

(2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

9. 評価結果

第三期・三年型の研究者6名および第一期・五年型の佐々木研究者については、期待以上の研究成果が得られた研究者、全く期待外れに終わった研究者、等いろいろであるが、各研究者の努力と奮闘は感じることが出来た。今後は更なる研究進展を目指し、さきがけの領域で得られたネットワークも大いに活用して精進していただきたいと考える。なお各研究者の研究成果とそれに対する事後評価を、以下に個別に記載する。

1. 北島康司 研究者 「染色体異常症候群における合併症の発症メカニズムの解明」

iPS を扱うのは初めて、また小児科という激務を伴う部門に在籍することから、研究が計画通り進展するかどうか心配したが、完全に杞憂であった。問題をすぐに克服して、ダウン症、及び TAM 患者からの iPS 作製を行い、更に最新のタレン法を用いて遺伝子改変を進めた能力は高く評価する。また、結果を注意深く検討し新しい問題を発掘するという、研究上の好サイクルも回り始めている。ただ、出来れば高いインパクトのある論文として発表したいという強い希望があり、また研究の進展する中で新たな重要な課題の研究も開始しており、3年の期間内では論文は発表できないことは仕方が無いと了承している。さきがけ終了後も、着実に研究を進め、論文発表にこぎ着けて欲しいと考えている。

2. 高島康弘 研究者 「純然たるヒト iPS/ES 細胞の樹立、維持および増殖機構の解析」

胞胚の内部細胞塊と同等のヒト ES 細胞を樹立するための条件の確立という挑戦的な提案であり、ケンブリッジに在籍しているという利点もあるとして採択した。期待通り、独自の新しい条件を確立しつつあるが、論文発表に至っていないので、この点では厳しい評価をせざるを得ない。最近、海外の幾つかの研究室から同じ方向性の論文が出始め競争が激しくなって来た。それぞれの方法はまだ幾つかの点で違いがあるため、他の論文によって今までの奮闘が無になる訳ではないが、早期に論文を発表する事が求められている。また今後、このナイーブ型のヒト ES 細胞は重要な手法として定着するので、日本での研究場所を確保して専門知識を提供する事も、さきがけ研究助成を受けた使命だと考える。

3. 伊達英俊 研究者 「連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発」

ゲノム研究と iPS を組み合わせる疾患メカニズムの例として採択された。当初の予定通り、ネマリ



一の患者及び母親から iPS を作製し、神経分化誘導を行い、全ゲノム配列の決定も行き、候補となる遺伝子まで到達したと評価している。病態の解析については時間がかかると思うが、必ずやり遂げて欲しいと期待する。ただ、病気の名前の由来になったネマリン小体にこだわらず、病態を明らかにする事が重要だと感じた。さきがけ研究に直接関わる成果ではないが、共著論文は発表している。あとは出来るだけ早く、ネマリンミオパシーに関する論文を作成するよう期待する。

4. 堀田秋津 研究者「人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導」

リプログラム過程でクロモソームの染色体構造の凝集度が緩むという独自の観察を基礎に、リプログラムレベルを測定し、質の高い iPS 作製法を開発するという提案だったが、この目標到達には遠かったようだ。ただ、iPS の質を高めるための様々なプロジェクトを推進しており、例えば本現象に関わる遺伝子を特定するために、shRNA で網羅的に遺伝子を抑制するシステムを立ち上げている。そのため、時間がかかり、進捗が遅いものもある程度理解できる。もともと、方法の開発など努力を厭わない研究者なので、今後も最も優れた方法をこの分野に提供するという方向でも活動して欲しいと期待している。

5. 八木田 和弘 研究者「リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係」

多能性幹細胞段階ではサーカディアンリズムがなく、分化とともに発現するという独自に発見した現象について解析を行い、特定遺伝子とリズムの問題まで到達している事は評価する。少しインパクトに欠ける結果とはいうものの、地道にメカニズムを追い求め研究を続けた結論であり、さらに本結果に基づき新しい視点を考え出そうとしている点も評価できる。論文は着実に発表できているが、今後はインパクトのある大きな仕事へどう発展させるかという課題への挑戦が残っている。是非リズム研究に新しい視点をもたらして欲しいと期待する。

6. 渡邊朋信 研究者「分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発」

工学技術を融合するという研究計画で採択されたが、さきがけ期間内には期待通りの結果は殆ど得られなかった。ただ幸いな事に少しずつではあるが、他の研究者との共同研究も生まれ始めており今後に期待したい。もともと機器開発はこのグループの本来の研究領域であるため、論文の数は十分であり、この点は評価できる。今後は、工学と生物学研究の本当のブリッジになるためには何をすれば良いのか、この点を更に深く突き詰めていって欲しいと考える。

7. 佐々木えりか 研究者「iPS 細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立」(5年型)

霊長類で iPS を初め様々な胚操作技術を確認する事は極めて重要であり、5年型として採択された。5年あれば iPS 由来の個体をマーマーモセットでも得られるかと期待したが、研究は殆ど入り口付近で終始してしまったように感じる。マーマーモセット iPS 細胞の樹立も少し遅れたが、最も重要な内部細胞塊や、EpiStemなどを胚に注入したりするための胚操作技術の開発も十分には出来ていない。しかしながら、未発表ながら海外との共同研究も進んでいるようで、最近流行のゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウトマーマーモセットの作製も含めて、今後の研究推進および伸展に大いに期待したいと考える。

10. 評価者

研究総括 西川 伸一 JT 生命誌研究館 顧問

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成 26 年 3 月末現在)

石野 史敏	東京医科歯科大学 難治疾患研究所・教授
岡野 栄之	慶応義塾大学 医学部・教授
相賀 裕美子	情報-システム研究機構 国立遺伝学研究所・教授
中内 啓光	東京大学 医科学研究所・教授
丹羽 仁史	理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター・プロジェクトリーダー
花園 豊	自治医科大学 分子病態治療研究センター・教授
春山 英幸	第一三共 RD ノバーレ株式会社・代表取締役社長

(参考)

件数はいずれも、平成 26 年3月末現在。

(1)外部発表件数

	国内	国際	計
論文	0	20	20
口頭	10	5	15
その他	8	2	10
合計	18	27	45

(2)特許出願件数

国内	国際	計
5	2	7

(3)受賞等

・八木田 和弘

「Asia and Oceania Society for Photobiology (AOSP) Award for Young Scientist」(2013)

(4)招待講演

国際 14 件

国内 6 件

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
北島 康司 (兼任)	染色体異常症候群における合併症の 発症メカニズムの解明 (大阪大学大学院 医学系研究科)	大阪大学大学院 医学系研究科 助教 (大阪大学 医学部附属病院 特任 助教)	55
高島 康弘 (専任)	純然たるヒト iPS/ES 細胞の樹立、維 持および増殖機構の解析 (ケンブリッジ大学 Wellcome Trust Centre)	(独)科学技術振興機構 さきがけ 研究者 (ケンブリッジ大学 研究員)	40
伊達 英俊 (兼任)	連鎖解析と iPS/ES 技術を用いた遺伝 性疾患遺伝子同定法の開発 (東京大学 医学部附属病院)	東京大学 医学部附属病院 特任 助教 (同上)	40
堀田 秋津 (兼任)	人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導 (京都大学 iPS 細胞研究所)	京都大学 iPS 細胞研究所 特定拠 点助教 (同上)	40
八木田 和弘 (兼任)	リプログラミング技術で解く細胞分化と 時計機構の関係 (京都府立医科大学大学院 医学研究 科)	京都府立医科大学大学院 医学研 究科 教授 (大阪大学大学院 医学系研究科 准教授)	47
渡邊 朋信 (兼任)	分化・発生を理解する多次元定量計測 技術の基盤開発 (独)理化学研究所 生命システム研 究センター/大阪大学 免疫学フロンテ ィア研究センター)	(独)理化学研究所 生命システム 研究センター チームリーダー (大阪大学 免疫学フロンティア研 究センター 特任助教)	40

(5年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成〇年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
佐々木 えり か (兼任)	iPS 細胞を用いたヒト疾患モデルマー モセット作製法の確立 (公財)実験動物中央研究所)	(公財)実験動物中央研究所 応用 発生学研究部 部長 (財)実験動物中央研究所 マーモ セット研究部 室長)	100

研究報告書

「iPS細胞を用いたヒト疾患モデルマーマーモセット作製法の確立」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成20年6月～平成26年3月

研究者: 佐々木えりか

1. 研究のねらい

疾患の発症や生理学的メカニズムを分子レベルで解明するために遺伝子改変マウスが果たしてきた役割は極めて大きい。しかしながらヒトとげっ歯類では脳神経機能、代謝経路、薬物感受性などの遺伝的・生理的な差異が大きく、特に医学・薬学研究ではマウスとヒトとの間の差異を埋めるため霊長類を用いた研究が重要となる。

コモンマーマーモセット(マーマーモセット)は、ブラジル北東部原産の小型の霊長類であり、1960年代後半から実験動物としての開発が進められている。マーマーモセットは生理学的、解剖学的にヒトに類似している、小型のため少量の化合物で有効性・安全性の検証が可能である、霊長類の中でも繁殖能力が高いため、複数頭を使用した繰り返し実験が可能である、など多くのメリットを有し、新薬開発、先端医療開発における前臨床研究におけるヒト疾患モデルとして有用な実験動物である。

マーマーモセットを用いたヒト疾患モデル動物作出法としては外科的手法、薬物誘導によるものに限られていたが、2009年に我々が遺伝子改変マーマーモセット作出法を確立したことにより、遺伝子改変によるヒト疾患モデル動物を用いた研究が可能となりつつある。

マウスでは、遺伝子相同的組替え技術を用いて内在性標的遺伝子を破壊した胚性幹(ES)細胞をマウスの胚盤胞期の胚に注入してキメラマウスを作製し、このキメラマウスの生殖巣に存在するES細胞由来の生殖細胞から得られた子孫を用いて遺伝子機能を解析するノックアウト(KO)マウスが多く用いられている。

しかしながら霊長類のES細胞はキメラ個体形成能力を持たないため標的遺伝子KOによるモデル作出は実現していない。霊長類におけるKOモデルを作出するためには、マウスES細胞と同等なキメラ個体形成能力を持つ細胞の樹立が必須である。iPS細胞は、マウスではキメラ動物を作製することも可能であり、今後のモデル動物作製にも有用な細胞である。霊長類のiPS細胞樹立は再生医療の有効性、安全性を検証する前臨床研究に重要な役割を果たすだけでなく、ES細胞に代わって発生工学の重要なツールとなると考えられる。iPS細胞を用いて、よりヒトに近いサル類のヒト疾患モデル動物が作出されれば、再生医療技術の臨床開発において精度の高い有効性・安全性の評価が可能になると期待される。そこで本研究は、マーマーモセットiPS細胞を樹立し、マーマーモセット初期胚への移植によりキメラマーマーモセット作製を目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、マーマーモセットiPS細胞を樹立するためマーマーモセット胎児および成体の肝臓由来細胞よりレトロウイルスベクターを用いて山中4因子+Nanog, Lin28の6因子を導入し、マーマーモセットiPS細胞を樹立した。マーマーモセットiPS細胞は、多能性幹細胞の未分化状態マーマーモセット

カーである SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81 陽性であること、マウスの未分化 ES 細胞で発現が認められる SSEA-1 は陰性であることが示された。また、胚様体の作製、免疫不全マウスを用いたテラトーマ形成試験により、三胚葉への分化能力を持つことが示された。更に、マイクロアレイ解析により、これらの iPS 細胞がマーモセット ES 細胞と類似した遺伝子発現パターンであることが示された。

本研究の実施期間中に、これまでマウス以外の ES 細胞でキメラが形成されなかった理由の説明がなされるようになった。特に多くの研究者に支持されている説は、マウス以外の動物の ES 細胞は、胚盤胞期胚の内部細胞塊から得られていたとしても、マウス ES 細胞よりもマウスの着床後胚の胚盤葉上層細胞由来幹細胞に性質が類似した細胞であるという説である。即ち、マウス以外の動物の ES 細胞は、発生ステージとして 5.5~6.5 日胚に相当すると考えられる。そこでマーモセット ES 細胞に再度、山中 4 因子 + Nanog, Lin28 を導入し、マーモセット ES 細胞をリプログラムすることにより、マウス 3.5~4.5 日胚の発生ステージに戻すことにより、キメラ形成能を獲得できないかを検討した。

その結果、マーモセット ES 細胞においてもコロニーの形態、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF への応答性と言ったマウス ES 細胞において特徴的である性質の獲得が認められ iPES 細胞と名付けた。この iPES 細胞がキメラ個体形成能を有するかを検討するため、マーモセット受精卵へ細胞を注入し、仮親の子宮へ胚移植を行った。その結果、1 匹の産仔が得られたが、胎盤では導入遺伝子由来のクサビラオレンジ遺伝子が検出されたが、その他の非侵襲的に採取可能な体細胞ではクサビラオレンジ遺伝子は検出されず、体細胞キメラとはなっていないことが強く示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A「マーモセット iPS 細胞の樹立」

マーモセット成体骨髄由来細胞、皮膚由来繊維芽細胞、胎児皮膚繊維芽細胞、肝由来細胞に対してヒト山中因子もしくはマーモセット山中因子を Ecotropic もしくは Pantropic レトロウイルスベクターにより導入し、iPS 細胞樹立を試みた。しかしながら、マーモセットにおいては、山中 4 因子のみでは、十分なリプログラミングが認められなかった。次いで、Thomson らがヒト iPS 細胞を樹立する際に用いた 4 因子のうち、山中 4 因子と異なる因

子である Lin28、Nanog を山中 4 因子に加え、合計 6 因子を Pantropic レトロウイルスベクターにより上記のマーモセット細胞に導入した。その結果、胎児肝由来細胞において、マーモセット ES 細胞と形態的に似た細胞が出現した(図1)。この胎児肝由来細胞から得られた iPS 様細胞から 3 株の細胞株を樹立し、未分化マーカーの発現、導入遺伝子のサイレンシング、内因性 6 因子遺伝子の発現、多分化能試験、核型解析、ES 細胞との発現遺伝子の比較を行った。その結果、これらの 3 株全てにおいて多能性幹細胞の未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ、SSEA3、SSEA4、TRA1-60、TRA1-81 陽性であること、導入遺伝子のサイレンシングと内因性遺伝子の発現が認められ、完全にリプログラミングされていることが示

マーモセットES細胞 Fetal Liver iPS

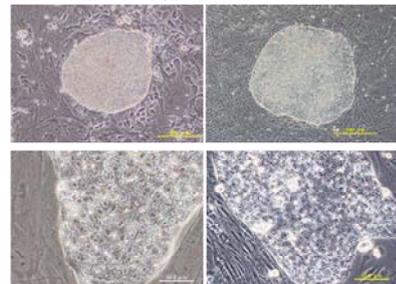


図1. 転写因子 6 因子導入により得られたマーモセット iPS 細胞

された。更に胚様態形成、テラトーマ形成により三胚葉への分化能力を有すること、分化誘導により in vitro で神経細胞へ分化可能である事が示された(図2)。核型解析では、3株のうち2株は正常核型を示したが、1株は3番染色体の欠失が認められた。正常核型を示した iPS1 細胞と ES 細胞とのグローバルな遺伝子発現をマイクロアレイにより比較した結果、胎児肝由来細胞は6因子によってリプログラミングされることにより ES 細胞に類似した遺伝子発現となることが示された。

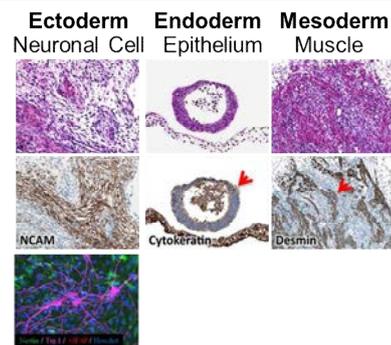


図 2. マーモセット iPS 細胞の分化能力

更に染色体に導入遺伝子が挿入されないマーモセット iPS 細胞の樹立をセンダイウイルスベクターにより試みた。その結果、iPS 細胞様の細胞株の樹立は可能であったが、c-Myc の残存することが示された。

研究テーマ B「キメラ形成能を持つマーモセット iPS 細胞の樹立」

本研究の研究期間内にマウス以外のほ乳類の ES 細胞がキメラ形成能を持たない理由が様々な研究者によって明らかにされつつある。現在、最も有力な説として、マウス ES 細胞は、培養を継続してもマウス胚の 3.5 日～4.5 日胚の epiblast 細胞と同等の性質であるのに対し、その他の動物では、マウス胚の 5.5～6.5 日胚から得られる epiblast stem cell (EpiSC) と類似した細胞である事が挙げられている。そこで、キメラ形成能を持たないマーモセット ES 細胞に山中 4 因子、Nanog、Lin28、クサビラオレンジ遺伝子 cDNA をレンチウイルスベクターにより導入を行った。その結果、マウス ES 細胞似た形態的のコロニーへの変化が認められた(図3)。更にこの細胞は、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF に対する反応性などマウスの ES 細胞に特異的な性質を獲得していることが認められ、この細胞を iPES と名付けた。この iPES 細胞をマーモセット桑実胚期の受精卵に注入し、仮親マーモセット 5 匹の子宮に移植を行った。5 匹中 3 匹が妊娠し、そのうち 1 匹が出産に至った。この産仔について非侵襲的に採取可能な各組織からゲノムを抽出しジェノタイプングを行った結果、胎盤でクサビラオレンジ遺伝子が検出されたものの、毛根、皮膚、血液では検出されなかった。この結果より、単一細胞への乖離に対する耐性、X 染色体の活性化、LIF に対する反応性だけでは、キメラ形成能獲得の十分条件ではないことが示された。一方、マーモセットを含む霊長類では、内部細胞塊の胚盤胞への移植によるキメラ動物作出技術も確立されておらず、この技術確立も今後の課題である。

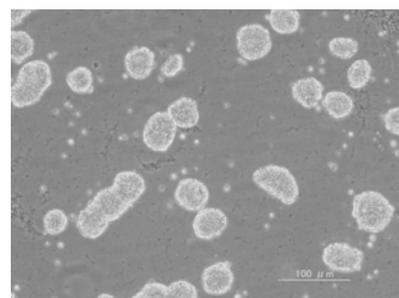


図 3. 6 因子を導入したマーモセット iPES 細胞

3. 今後の展開

多能性幹細胞を用いたキメラ作出は、現在のところマウス、ラット以外では成功していない。ブタでは、胚を用いたキメラ動物作製は可能であり、システムコントロールは確立されているもの

の、マウス ES 様の性質を持つ多能性幹細胞でもキメラブタが作製されていないため、キメラを作製できる多能性幹細胞の十分必要条件がまだ明らかになっていないことが示されている。今後は、マーモセット胚を用いたキメラ個体作出を行い、システムコントロールの確立を目指す。

一方で近年、ゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウト動物の作製が可能になってきている。今後、このゲノム編集技術によるノックアウトマーモセット作製が期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、残念ながら大きな目標に到達することはできなかったがまた、今回のさきがけを通じて、未発表ではあるが Austin Smith 研とマーモセット胚盤胞および内部細胞塊の RNA-seq 解析、John Gurdon 研とマーモセット卵子～胚盤胞までの各ステージにおける胚の RNA-seq 解析を行い、マーモセット胚の免疫染色と併せたマーモセット初期発生様式の理解、キメラ胚作出技術の確立など、今後目標達成に必要な基礎は準備できたと思う。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

霊長類で iPS を初め様々な胚操作技術を確立する事は極めて重要であり、5年型として採択された。5年あれば iPS 由来の個体をマーモセットでも得られるかと期待したが、研究は殆ど入り口付近で終始してしまったように感じる。マーモセット iPS 細胞の樹立も少し遅れたが、最も重要な内部細胞塊や、EpiStem などを胚に注入したりするための胚操作技術の開発も十分には出来ていない。しかしながら、未発表ながら海外との共同研究も進んでいるようで、最近流行のゲノム編集技術による標的遺伝子ノックアウトマーモセットの作製も含めて、今後の研究推進および伸展に大いに期待したいと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Tomioka, I., Maeda, T., Shimada, H., Kawai, K., Okada, Y., Igarashi, H., Oiwa, R., Iwasaki, T., Aoki, M., Kimura, T., Shiozawa, S., Shinohara, H., Suemizu, H., Sasaki, E., Okano, H. (2010) Generating induced pluripotent stem cells from common marmoset (*Callithrix jacchus*) fetal liver cells using defined factors, including Lin28. *Genes to Cells*. 15(9):959-969.
2. Hanazawa, K., Mueller, T., Becker, T., Heistermann, M., Behr, R., Sasaki, E. (2012) Minimally invasive transabdominal collection of preimplantation embryos from the common marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Theriogenology*, 78(4):811-816
3. Tomioka, I., Takahashi, A., Shimada, K., Yoshioka, Sasaki, E. (2012) Birth of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) offspring derived from in vitro-matured oocytes in chemically defined medium. *Theriogenology* 78(4):1487-93

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. サル卵子、合成培地で成熟
(2010年7月5日(月)日経新聞12面)
2. 変わる最先端研究「遺伝子改変ザル」活用
(2010年7月14日(水)日経産業新聞11面)
3. 小型サルからiPS細胞
(2010年8月3日(火)日経新聞34面)
4. あの遺伝子を止めろ「ノックアウト動物作り 手軽に」
(2013年4月29日(月)朝日新聞20面)
5. 「デザイナーベビーの予感」4 ヒト受精卵改変の誘惑
(2013年7月25日 朝日新聞夕刊)
6. 特集 実験動物の最新トレンド
創薬に役立つモデル動物 究極の目標は患者の分身
「霊長類モデル動物 遺伝子可変で利用範囲を広げる」
日経バイオテック(日経BP社)、2012年10月22日発行、6ページ

研究報告書

「染色体異常症候群における合併症の発症メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 北島 康司

1. 研究のねらい

ダウン症候群は 700 人に 1 人という高い頻度で発症し、多彩な合併症を呈する。とくに白血病のリスクが高く、ダウン症新生児の約 10%が一過性骨髄異常増殖症(transient abnormal myelopoiesis; TAM)とよばれる前白血病状態を呈する。TAM 患者の血液中の芽球について調べてみると、X 染色体上にコードされる GATA-1 の遺伝子突然変異がほぼ全例で認められるが、ほとんどの変異が exon2 の開始コドンのすぐ下流に起こり、N 末領域が失われた短縮型のみが産生されていることが分かる。興味深いことに短縮型 GATA-1 が産生されない欠失型変異や C 末端での変異などの症例は報告されていない。またその一方で GATA-1 変異を遺伝的に有する家系では血球の異常増殖はほとんど認められないことから、TAM の発症には 21 番染色体のトリソミーと、GATA-1 短縮型変異の両者が必須と考えられている。この特異な病態を明らかにするためには実験モデル系の構築が必要であるが、これまでヒトトリソミーと GATA-1 変異を正確に表す細胞・動物モデルがなかったため、その発症メカニズムはまだよく分かっていない。

ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の発見により、ヒト21トリソミーを再現できる細胞モデルを構築することが可能となった。そこで本研究では、ダウン症患者由来の疾患特異的ヒト iPS 細胞の作成・分化誘導技術と、人工ヌクレアーゼ、とくに TALE Nuclease を用いた遺伝子/染色体改変技術を組み合わせることによって、21 番染色体核型と GATA-1 変異を再現した病態モデルの確立を行う。さらにそれらの iPS 細胞における造血能を調べることによって、TAM 発症における GATA-1 と 21 番染色体の役割を明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

TAM の発症メカニズムを詳細に解析するため、GATA-1 変異型(full length/short form/null の 3 種類)と 21 番染色体の核型(ディプロイド/トリソミーの 2 種類)の各組み合わせによる 6 種類の iPS 細胞モデルの確立を行った。まず健常児ならびに TAM を発症したダウン症患者の血液検体をもとに疾患特異的ヒト iPS 細胞を樹立し、つづいて TALE Nuclease をもちいた遺伝子改変技術を組み合わせることで GATA-1 の欠失変異導入を行った。さらに染色体除去カセットをもちいたアレル特異的染色体除去技術を確立することにより、すべての iPS 細胞モデルを確立することができた。

次に、これら 6 種類の iPS 細胞を造血分化誘導することにより、ふたつの因子が造血にどのような影響をおよぼすのかについて解析を行った。胚様体形成(embryoid body; EB)をもちいた解析により、21 トリソミー iPS 細胞では赤芽球系・巨核芽球系・骨髄球系いずれの系列についても細胞数の増加が認められ、21 トリソミーそのものに造血亢進作用があることが分か

った。つづいてマウス骨髄間質細胞をもちいたフィーダー細胞との共培養系をもちいることで、欠失型変異をもつ GATA-1 では赤芽球・巨核芽球ともに形成されず、GATA-1 がこれらの細胞系列の分化成熟に重要であることが確認された。そして TAM の成立に重要な役割を果たすと考えられる short form については、巨核芽球の細胞数は GATA-1 full length と同じであるにもかかわらず、その多くが CD34 陽性細胞であることが分かった。すなわち GATA-1 short form が null と異なる作用は、巨核芽球系の分化を途中で停止させ、結果として幼弱な細胞の増殖を引き起こすことである。

白血病の発症には細胞の増殖亢進と、分化の停止のふたつが必要とされることから、TAM は「トリソミーによる造血亢進作用」と「GATA-1 short form による血球分化の途中停止」のふたつの作用によって引き起こされることが示唆された。

(2) 詳細

2-1. TAM の病態解析を可能にする実験モデルの確立

TAM は 21 番トリソミーと GATA-1 変異の相互作用によって発症するが、GATA-1 欠失変異では発症しないことから short form の存在が重要であることが分かる。この GATA-1 変異と 21 番染色体異常の両者がどのような相互作用を起こして病態を引き起こすのかについて詳細に調べるため、細胞を GATA-1 変異型 (full length / short form / null) と 21 番染色体の核型 (ディプロイド / トリソミー) により分類し、以下の 6 通りの iPS 細胞クローンの樹立を目指した。

21番染色体 核型	GATA-1		
	正常型 (full length)	短縮型 (short form)	欠失型 (null)
ディプロイド	A 群	B 群	C 群
トリソミー	D 群	E 群	F 群

まず健常児の臍帯血に対し山中 4 因子を載せた持続発現型センダイウイルス (産業技術総合研究所; 中西真人先生からの供与) を感染させ、iPS 細胞 A 群を得た。つぎに TAM を発症したダウン症患者の末梢血 (芽球比率 65%) に対し、同様にセンダイウイルスによる遺伝子導入を行い、GATA-1 変異なし / ありの 2 種類のヒト iPS 細胞 (D 群 / E 群) を得た。同一血液サンプルから同時に 2 種類の iPS クローンを得ることができたため、別のサンプルから、あるいは別の機会に作成された iPS 同士を比較する場合と比較して、より二次的な影響を排除して造血能の機能解析を行うことができると期待される。

C, F 群の GATA-1 欠失型変異をもつ iPS 細胞を作成するためには遺伝子組み換え技術が必要であるが、一般的にヒト iPS/ES 細胞はマウス ES 細胞などと比べて組換え頻度が低く、遺伝子組み換えは容易でない。そこでヒト iPS 細胞への遺伝子組み換えを可能にする技術の確立を行った。当初は Zinc Finger Nuclease の作成を行ったが、より合成が容易な TALE Nuclease (TALEN) の発明にともない、この TALEN のプロモーター部位・FokI nuclease ドメインなどを改良しヒト iPS 細胞へ応用するための最適化を行った。確立したこの TALEN 技術をもちいて A, D 群 iPS 細胞に対して GATA-1 ターゲティングを行い、それぞれ C, F 群 iPS 細胞を作成することに成功した。

B 群に関しては、まず健常児 iPS 細胞への GATA-1 変異導入を目指したが、薬剤選択マーカーの挿入なしに遺伝子改変を行い N 末端のみを欠失したクローンを得るのはヒト iPS 細胞ではきわめて困難のため、発想を転換し TAM 患者から得た E 群 iPS 細胞に対して、21 番染色体の 3 本のアレルのひとつに欠失誘導を行うことで、B 群の iPS 細胞樹立を行うこととした。

Matsunuma らがマウス ES 細胞で報告した方法(2006 Nat. Methods)を応用し、逆向きの loxP 配列にあいだに PuroΔTK-pA 配列を挟み込んだ‘染色体除去カセット’を、TALEN を用いて 21 番染色体アレルのひとつに挿入し、そこに Cre リコンビナーゼを作用させることにより目的のアレルを除去することが可能となった(図 1)。これにより、上述した 6 種類の iPS 細胞ラインを確立することができた。

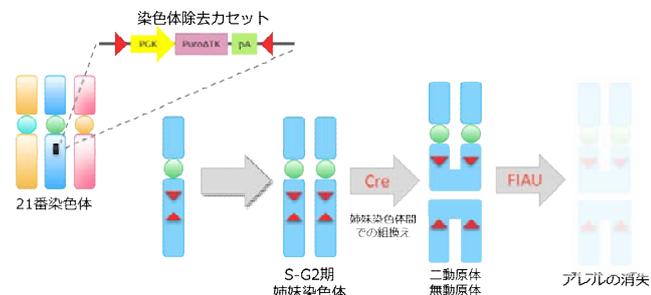


図 1.トリソミーからのアレル特異的染色体除去。
逆向きの loxP 配列をもつ染色体除去カセットをアレルの1つに挿入する。分裂期に Cre が働くと姉妹染色体間で組換えが起こり、セントロメアを 2 つもつ染色体ともたない染色体に分かれる。これらの異常染色体は次世代に受け継がれず染色体消失が起こる。

2-2. TAM-iPS 細胞の血球分化誘導による病態解析

得られたヒト iPS 細胞の各ラインを、胚様体(Embryoid Body; EB)を介した血球分化誘導を行うことにより、GATA-1 変異とトリソミーの作用について解析を行った。まず GATA-1 変異をもたない A 群・D 群を比較することにより、21 トリソミーが造血作用に及ぼす影響について検討を行った。その結果、ダウン症患者(TAM 発症なし)の iPS 細胞から作成した 12 日目の EB では、健常児からのものに比較して、KDR+CD31+陽性細胞(hemogenic endothelial cell)、汎血球マーカーである CD45 陽性細胞の増殖が認められ、さらに CD235(赤芽球系)、CD33(骨髓球系)、CD41(巨核芽球系)などの各マーカー陽性細胞の数も有意に増殖が認められた。このことは 21 トリソミーそのものが血球増殖を亢進していることを示しており、ダウン症新生児で多血症が多く見られるという臨床症状とも合致している。

次に D, E, F 群を用いて血球分化誘導を行うことにより、21 トリソミーを有した状態での GATA-1 変異の作用について解析を行った。その結果、GATA-1 short form および null を有する E, F 群では、CD235 陽性細胞がほとんど形成されず、GATA-1 が赤芽球系列の分化制御において重要な転写因子であるというマウスでの知見を支持する結果が得られたとともに、GATA-1 short form が赤芽球形成には機能を果たさないことが分かった。さらにマウス骨髓間質細胞/胎児肝細胞などをフィーダー細胞とする共培養系をもちいて巨核芽球系の分化をしらべたところ、GATA-1 null 変異をもつ F 群では CD41 陽性細胞がほとんど形成されない一方で、short form を形成する E 群では正常 GATA-1 をもつ D 群とほぼ変わらない細胞数が得られた。しかしながら E 群で誘導されるこの CD41 陽性細胞についてさらに解析を進めると、その多くが CD41 + CD34 + の幼弱な細胞であることが判明した。すなわち GATA-1 short form は血球分化誘導をある段階まで進めるが最終分化には到達しないという特性をもつことが判明した。まだ予備的データの段階であるが、21 トリソミーを持たない B 群ではこの幼弱細胞の増殖は認められず、TAM は 21 トリソミーによる血球増殖亢進作用と

GATA-1 短縮型による分化誘導の途中停止が原因となって発症すると考えられた。

一般的に白血病の発症には細胞の増殖亢進と、正常な細胞分化の阻害のふたつが必要とされる。上記のことから TAM は「トリソミーによる造血亢進作用」と「GATA-1 short form による血球分化の途中停止」のふたつの作用によって引き起こされることが示唆された。

3. 今後の展開

本研究により得られた結果は、21 トリソミーと単一遺伝子の変異が、(単純な相加作用でなく)相乗作用によって重大な病態をもたらすことを示している。巨核芽球系以外の系列にも異常が認められるという予備データも得られており、今後より深く解析を加えていきたい。

また部分トリソミー患者の遺伝子型-表現型解析により、Runx1-Ets2 には含まれた約 5Mb の領域が TAM/AMKL 発症に深く関与するという報告がなされている。私はこの領域を部分的に 1 アレル分のみ欠失した‘部分ディプロイド化 21 トリソミー特異的ヒト iPS 細胞’の作成に成功した。つぎはこの細胞を用いて病態責任領域の同定を行いたいと考えている。

また TAM の重要な臨床的特徴として、多くが 1 ヶ月以内に自然寛解し、その 2 割が数年以内に急性巨核芽球性白血病 (AMKL) として発症することが挙げられる。このメカニズムを明らかにするために、本研究で得られた iPS 細胞を用いてテラトーマを介した骨髄造血環境の再現を行うとともに、コヒーシンや CTCF など AMKL 発症に重要と考えられる遺伝子に変異を導入し、白血病発症のメカニズムを明らかにしていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

さきがけに採択していただいたからの 3 年間あまり、疾患の再現のみで終わらず新たな知見を得られるよう、常に自分に言い聞かせて研究を続けてきた。理想的な患者検体と iPS 樹立技術を得ることができ、また当初は予想しなかった遺伝子改変技術の発達という幸運に恵まれたおかげで、TAM のメカニズムに詳細な解析を加えることができた。さらにトリソミーがゲノム不安定性をもたらすというデータが加わりつつあることから、申請時に提案した事項についてはいずれもなんらかの答えを出すことができたのではないかと考えている。またトリソミーの特異性、細胞に与える影響などについてもデータが集まるにつれ、予想外の発展を見せつつあり、今後さまざまな切り口で研究を重ねることができると感じている。研究期間中に論文発表することができなかったことが重大な反省点であるが、早急に結果をまとめて論文報告するとともに、さきがけ研究期間の終了後もより活発に研究を続け、臨床現場に根ざした基礎研究を進めることが、未熟で何も知らなかった自分にこのような切磋琢磨する場と機会を与えてくださったみなさまの期待に応えることのできる唯一の方法と考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

iPS を扱うのは初めて、また小児科という激務を伴う部門に在籍することから、研究が計画通り進展するかどうか心配したが、完全に杞憂であった。問題をすぐに克服して、ダウン症、及び TAM 患者からの iPS 作製を行い、更に最新のタレン法を用いて遺伝子改変を進めた能力

は高く評価する。また、結果を注意深く検討し新しい問題を発掘するという、研究上の好サイクルも回り始めている。ただ、出来れば高いインパクトのある論文として発表したいという強い希望があり、また研究の進展する中で新たな重要な課題の研究も開始しており、3年の期間内では論文は発表できないことは仕方が無いと了承している。さきがけ終了後も、着実に研究を進め、論文発表にこぎ着けて欲しいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Jang M-H*, Bonaguidi M*, Kitabatake Y* , Sun J, Song J, Kang E, Jun H, Zhong C, Su Y, Guo J, Wang M, Sailor K, Kim J-Y, Gao Y, Christian K, Ming G-I and Song H. (* These authors equally contributed to this work) Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis. Cell Stem Cell 2013 12 (2): 215-23 |
| 2. Jang M-H*, Kitabatake Y* , Kang E, Jun H, Pletnikov M.V, Christian M, Hen R, Lucae S, Binder E, Song H and Ming G-I. (* These authors equally contributed to this work) Secreted Frizzled-related Protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans. Mol Psychiatry 2012 doi: 10.1038/mp.2012.158 |
| 3. 北島 康司 Zinc Finger Nuclease / TALEN ー生物・細胞種をこえる次世代遺伝子改変技術ー 実験医学 2012. 30: 1956-1961 |

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 染色体異常の病態メカニズムに TALEN と iPS 細胞で挑む
北島 康司
ゲノム編集シンポジウム、宮崎、2013
2. iPS 細胞をもちいた小児難治性疾患への取り組み
北島 康司
第 39 回日本小児栄養消化器肝臓学会、大阪、2012
3. 臨床の現場から基礎研究へ iPS 細胞による小児疾患の病態解明
北島 康司
第 2 回大阪大学 iPS 細胞臨床研究シンポジウム、大阪、2011
4. 再生医療が描く未来 iPS 細胞とはなにか その現状と展望
北島 康司
第 2 回メディカル・エコ・タウンカンファレンス、大阪、2011
5. ZFN (Zinc finger nuclease): Emerging technology for versatile genome modification
北島 康司
第 34 回日本分子生物学会シンポジウム、横浜、2011

研究報告書

「純然たるヒトiPS/ES細胞の樹立、維持および増殖機構の解析」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 高島 康弘

1. 研究のねらい

私どもの体を構成するすべての細胞はブラストシストの初期エピブラストより発生、分化する。ES細胞はこの初期エピブラストから樹立される。マウスではMEKのインヒビターであるPD0325901とGSK3のインヒビターであるCHIR99021という2種類のインヒビターを用いた培地(2i培地)を用いる事でin vivoの初期エピブラストにかなり近い基底状態(グランドステート)細胞として維持できるようになった。

一方、ヒトES細胞はマウス同様に初期エピブラストから樹立され、多能性を持つが、発生刺激が加えられ、分化が進んだ状態ではないかと考えられている。そして、マウスにおける着床後の胚より樹立されたエピブラスト幹(EpiS)細胞に近いとされる。

マウスEpiS細胞は多能性をもつ幹細胞であるが、キメラ形成能をもたず、X染色体の活性化もなく、マウスES細胞と異なる。ヒトES/iPS細胞がマウスEpiS細胞と同じであるなら、エピジェネティックにも完全にリプログラミングされた細胞ではない可能性がある。グローバルなDNAメチレーションを見たとき、ヒトiPS細胞のDNAメチレーションはヒトES細胞とは異なったパターンを示し、完全に同じではない。マウスiPS細胞のDNAメチレーションのパターンは培養することで、ES細胞にかなり近い状態になり、ヒトiPS細胞とは異なっている。

現在私たちが培養するヒトES/iPS細胞には多様性、不均一性という問題があり、株間の差が指摘される。さらにiPS細胞の場合、完全にリプログラミングされていない不完全iPS細胞がある。不完全なiPS細胞を除外し、完全にリプログラミングされたiPS細胞を取り出すことは重要である。真にリプログラミングをされたヒトiPS細胞の樹立は純度の高い完全型iPSを樹立することにつながり、ヒトiPS細胞の効率的かつ簡便な樹立方法と培養条件の確立となりうる。また、分化実験においても、現行の問題点を克服しうる可能性がある。

以上から、ヒトにおけるナイーブ型多能性幹細胞の樹立を本研究のねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

マウスで確立された、マウスグランドステート(基底状態、ナイーブ型)ES/iPS細胞と同様の真のヒトiPS細胞、純然たるiPS細胞を樹立することが、本研究の大きなテーマである。

この目的のために、マウスにおけるデータを利用し、研究をすすめた。MEKのインヒビターであるPD0325901とGSK3のインヒビターであるCHIR99021という2種類のインヒビターを用いた培地、2i培地を用いて、ヒトにおける多能性、未分化性を維持する多能性幹細胞をまずは樹立した。樹立した細胞が、多能性幹細胞としての性質を持つのか確認し、このヒト多能性幹細胞がグランドステートとしての性質を保持するのか、解析をすすめた。

マウスナイーブ型細胞の最も大きな特徴であるキメラを形成し、生殖細胞に分化し、世代を

越えるという能力は、ヒトでは確認できない。そこで、他の特徴を利用しながら、樹立した細胞がナイーブ型としてふさわしい細胞である、という確認を行っていった。まず、シグナルがマウスグランドステートと同様になっているのか確認し、網羅的な遺伝子の発現をRNA-seqを用いて比較した。DNAメチレーションを調べ、脱メチル化を伴いエピジェネティックにもグランドステート型へ移行しているか解析した。

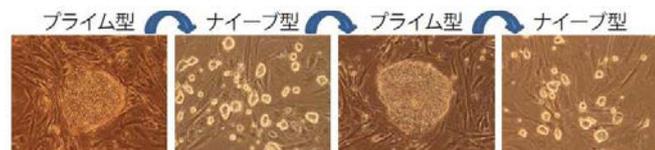
最後に、転写因子ネットワークがグランドステート型になっていることを確認した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「ナイーブ型ヒト iPS 細胞の樹立」

従来型のヒト ES 細胞に2種類の遺伝子、NANOG と KLF2 を導入し、誘導を行った。マウスのナイーブ型が維持可能になる MEK インヒビター PD0325901 と GSK インヒビター CHIR99021 を培地として用いた。その結果、形態の上マウス ES 細胞様の細胞を得ることができた。この細胞は ROCK inhibitor を用いることなく、単一細胞に解離し、継代をすることができる。遺伝子発現を確認したところ、マウスで発現するナイーブ型遺伝子の上昇を認めた。

この誘導条件は、H9ES 細胞、Edi2ES 細胞、Shef4ES 細胞、ピギーバックを用いた神経幹細胞由来 iPS 細胞、レトロウイルスを用いた線維芽細胞由来 iPS 細胞、センダイウイルスを用いた線維芽細胞由来 iPS 細胞、ケラチノサイト由来 iPS 細胞、ヒト脂肪組織由来 iPS 細胞で行われ、いずれの株でも樹立が可能であった(図1)。



(図1)H9ES細胞のナイーブ化を行った。培地をプライム型にすることにより、プライム型に戻る。再びナイーブ型にすることも可能である。

研究テーマ B 「ナイーブ型ヒト iPS 細胞の解析」

ナイーブ型細胞を従来型の培養条件で培養したところ、再びプライム型の形態になり、遺伝子発現もプライム型に戻った。分化能を調べたところ、ナイーブ型からの直接分化、プライム型に戻してからからの分化、ともに in vitro で三胚葉に分化する能力を認めた。また、NOD-SCID マウスの腎皮膜下に移植をしたところ、テラトーマも形成し、樹立したナイーブ型細胞は多能性を示した。

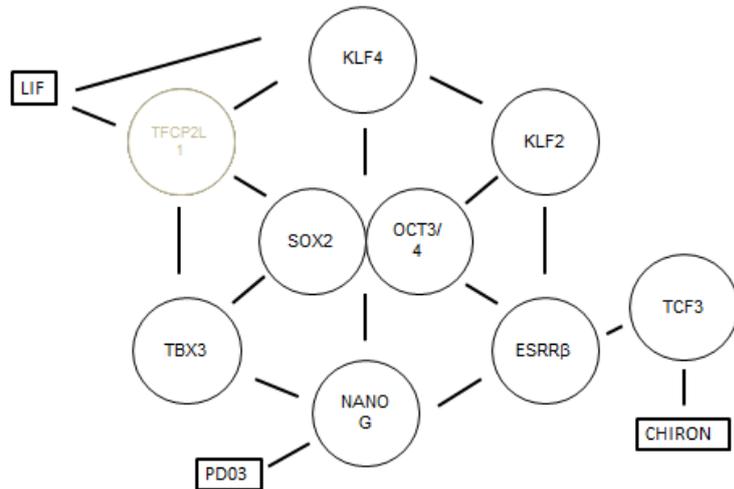
Activin/TGF シグナルを SB431542 や A83-01 によって阻害しても、ヒトナイーブ型細胞は維持された。また、LIF を加えることで、STAT3 が活性化されることと LIF の下流の遺伝子が上昇することを確認した。逆に STAT3 をノックダウンすると、ヒトナイーブ型としての維持はできなくなる。

マウスにおいて、ブラストシストの初期エピブラストでは、DNA メチレーションが脱メチル化しており、2i 培地で培養したマウスナイーブ型 ES 細胞も脱メチル化していることが知られている。樹立したヒトナイーブ型 iPS 細胞の DNA メチレーションをバイサルファイト DNA シークエンスによって、網羅的に調べたところ、元々のヒト ES 細胞に比較し、グローバルな DNA メチレーションの低下を認めた。

研究テーマC「ナীব型ヒトiPS細胞の転写因子ネットワーク」

マウスナীব型多能性幹細胞は、転写因子ネットワークにより多能性を維持している。この転写因子ネットワークはキイになる転写因子が阻害されると、ネットワークは破壊され、多能性、未分化性は維持できなくなる。

ヒトにおけるナীব型転写因子ノックダウンのネットワークへの影響



ももとのヒトES細胞はキイとなる転写因子TFCP2L1の機能を阻害しても多能性を維持できた。しかしながら、樹立したナীব型では、TFCP2L1を阻害すると、多能性は維持できなくなった。すなわち、樹立したヒトナীব型は、遺伝子の発現が、変化しているだけではなく、機能的にも

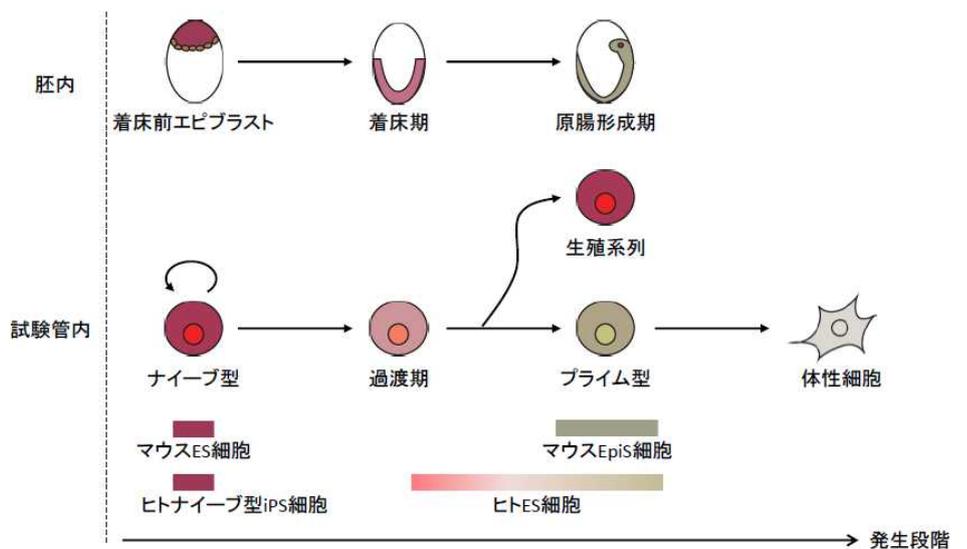
役割を話している事がわかった。通常のヒト多能性幹細胞からマウス型のナীব型転写因子ネットワークへと変化をしていることを確認できた。

3. 今後の展開

樹立したヒトナীব型iPS細胞は脱メチル化状態であることから、in vivoの初期エピブラストにより近い細胞であると共に、in vitro分化の開始点の細胞として有効な細胞となりうるかもしれない。

従来のプライム型ヒトiPS細胞にはエピジェネティックなメモリーや分化抵抗性の問題に加えて、株間の多様性の問題があった。プライム型は、発生を開始し、さまざまな分化段階にコミットしてしまっている可能性がある(図2)。着床前

(図2) 多能性幹細胞と発生段階のモデル



の初期エピブラストという一つの状態に収束したナীব型はプライム型とは異なり一つの発生ステージであり、分化誘導が容易になる可能性がある。またすでにDNAメチル化されているプライム

型の場合、メチル化された方向と違う分化系列に成熟した細胞として最終分化をさせようとするとき、遺伝子発現に問題が生じる事も推測される。

今後は、この細胞が実際に期待するような有用な細胞であるのかを確認したい。

4. 評価

(1) 自己評価

研究のねらいは、ヒトグランドステート多能性幹細胞を樹立する事で、このことに関しては、何とか目標を達成できたと考える。今後は、ピアレビューを受け、論文として、世の中に発表することである。この点においては、当初の目的の研究成果はほぼ得られたと考える。

しかしながら、iPS 細胞をめぐる研究の発展は早く、実用面での要求も強い。この細胞はマウスのような完成したグランドステートとしては、増殖能力、安定性の面からまだ十分とは言えないと考える。より完成したヒトグランドステート多能性幹細胞の樹立は、私のライフワークの一つとして、今後発展できればと考える。

同時に、今後の展開で記したように、樹立した細胞が有用な細胞であるのかの確認は、さきかけ研究内には完成出来なかった。この点は、早急に確認する事を目指す。

最後に、質の高い研究を目指すべきであるが、コンスタントに結果を出していくことも大切であり、スピードも要求される。この点は反省点であり、今後、気をつけて研究を進めたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

胞胚の内部細胞塊と同等のヒト ES 細胞を樹立するための条件の確立という挑戦的な提案であり、ケンブリッジに在籍しているという利点もあるとして採択した。期待通り、独自の新しい条件を確立しつつあるが、論文発表に至っていないので、この点では厳しい評価をせざるを得ない。最近、海外の幾つかの研究室から同じ方向性の論文が出始め競争が激しくなって来た。それぞれの方法はまだ幾つかの点で違いがあるため、他の論文によって今までの奮闘が無になる訳ではないが、早期に論文を発表する事が求められている。また今後、このナイーブ型のヒト ES 細胞は重要な手法として定着するので、日本での研究場所を確保して専門知識を提供する事も、さきかけ研究助成を受けた使命だと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Mohsen-Kanson T, Hafner AL, Wdziekonski B, **Takashima Y**, Villageois P, Carrière A, Svensson M, Bagnis C, Chignon-Sicard B, Svensson PA, Casteilla L, Smith A and Dani C. Differentiation of human induced pluripotent stem cells into brown and white adipocytes: Role of Pax3. *Stem Cells* in press, on line 3 Dec 2013
2. Stricker S, Feber A, Engstrom PG, Caren H, Kurian KM, **Takashima Y**, Watts C, Way M, Dirks P, Bertone P, Smith A, Beck S, and Pollard SM. Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. *Genes and Dev* 2013;27:654–669

3. Falk A, Koch P, Kesavan J, **Takashima Y**, Ladewig J, Alexander M, Wiskow O, Taylor J, Trotter T, Pollard S, Smith A, Brüstle O. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. *PLOS ONE* 2012;7:e29597

4. Camnasio S, Carri DA, Lombardo A, Grad I, Mariotti C, Castucci A, Rozell B, Riso PL, Castiglioni V, Zuccato C, Rochon C, **Takashima Y**, Diaferia G, Biunno I, Gellera C, Jaconi M, Smith A, Hovatta O, Naldini L, Donato SD, Feki A, Cattaneo E. The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity. *Neurobiol Dis.* 2012 46(1):41-51

5. Moretti A, Bellin M, Jung CB, Thies TM, **Takashima Y**, Bernshausen A, Schiemann M, Fischer S, Moosmang S, Smith AG, Lam JT, Laugwitz KL. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1+ cardiovascular progenitors. *FASEB J.* 2010 24(3):700-11

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<招待講演>

1. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 17 Sep 2013 Stockholm, Sweeden
2. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 20 Sep 2012 Stockholm, Sweeden
3. Takashima Y “Human pluripotency” Cellular reprogramming course in Karolinska Institutet 15 Sep 2011 Stockholm, Sweeden

<著作物>

1. 高島康弘 2つの多能性幹細胞—ナীব型とプライム型 「生物の科学 遺伝」NTS Vol68 NO1 2014; p.37-43
2. 高島康弘 ES/iPS 細胞—無垢なる生命のはじまりから再生医学— 「幹細胞研究と再生医療」南山堂 2013; p.43-53

研究報告書

「連鎖解析とiPS/ES細胞技術を用いた遺伝性疾患遺伝子同定法の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 伊達 英俊

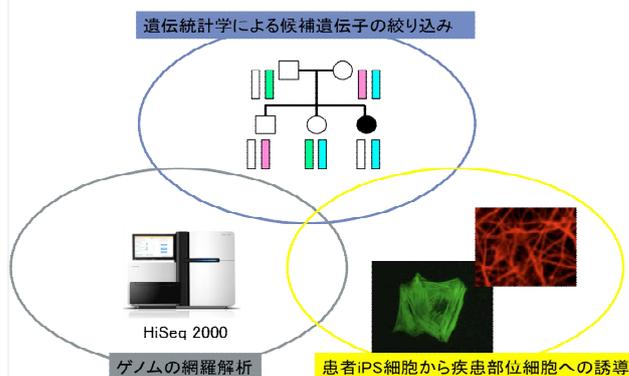
1. 研究のねらい

遺伝性疾患の原因遺伝子が存在する候補領域を決定する連鎖解析は、家系の大きさ(家系内に発症者が多く、親、親類のゲノム情報の利用が可能な家系)や同一疾患家系の集積に依存しており、90年代以降、頻度の高い遺伝性疾患の原因遺伝子が連鎖解析により数多く同定されてきた。遺伝性疾患の原因遺伝子が存在する候補領域を決定する連鎖解析は、家系の大きさや同一疾患家系の集積に依存しており、家系情報が多い疾患の原因遺伝子同定には、連鎖解析は強力なツールである。しかし、頻度の低い(家族内の発症者が少ない家系 or 親類のゲノム情報がない単一家系)の遺伝性疾患に対して、連鎖解析での候補遺伝子の絞り込みは、非常に困難である。現在、見いだされる遺伝性疾患家系は1～2家系ほどの稀な疾患が主で、有効な連鎖解析が難しく、新たな解析手法が必要となってきた。

本研究では、患者由来の細胞からiPS細胞を用いて、in vitroで病変部位細胞を再現し、患者特異的な表現形と、連鎖解析や次世代ゲノムなどのゲノムデータによる候補遺伝子から一家系のみで疾患の原因遺伝子を効率よく同定することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要



本研究課題では、左図のように、家系解析による遺伝情報、大規模なDNA塩基解析情報、および患者iPS細胞から誘導した疾患部位細胞からの細胞情報の3種のデータを合わせて、今まで困難であった一家系からの原因遺伝子同定を試みる。ここでは、長年類似疾患が確認されていない筋疾患である拡張性心筋症を伴うネマリ

ンミオパチーの一家系を対象とした。

本疾患は、

- 筋萎縮症のKugelberg-Wellander病として1966年に報告。以来同一疾患の報告無し
- 優性遺伝形式
- 生検により筋組織にネマリン小体を認める
- 電気生理より筋原性疾患と診断
- 剖検より心筋線維の糸状の萎縮
- 患者iPS細胞から誘導した心筋細胞の構造異常と骨格筋細胞にネマリン蓄積が期待で

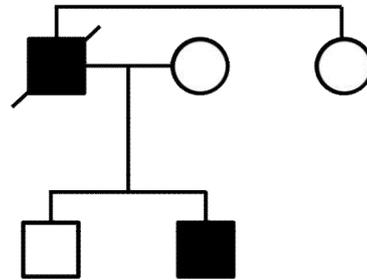
きる

以上、骨格筋細胞と心筋細胞に表現形を呈する優性遺伝形式の一家系の原因遺伝子を同定する目的で解析を行なった。

(2) 詳細

ゲノム解析

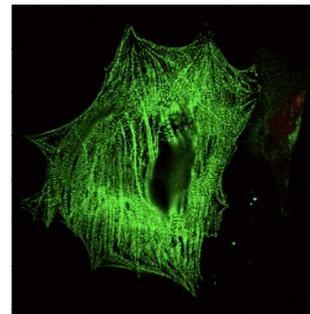
- インフォームドコンセントの元、右図5名のゲノムDNAを末梢血から抽出
- 既同定済みの類症のネマリンミオパチーおよび拡張性心筋症の原因遺伝子に変異が無い事を確認
- SNP タイピングより候補領域を決定。その領域から6691個が候補遺伝子
- 患者ゲノムに対しての全ゲノム解析および健康者1800人のゲノム情報との検索により、候補遺伝子を2個に絞り込んだ
- 一つは、構造タンパク質であり、もう一つは開始コドンから22番目のアミノ酸がストップコドンに変化する塩基置換であり、どちらも候補遺伝子になりうるものであった。
- 骨格筋および心筋細胞で2候補遺伝子すべてが発現していることをRT-PCRで確認



拡張性心筋症を伴うネマリンミオパチーの一家系

患者由来 iPS 細胞樹立

インフォームドコンセントの元、患者および母親(非発症者)の末梢血からT細胞を増幅させ、センダイウイルスベクターを用いて山中4因子を導入し、iPS細胞を樹立した。これらの細胞に対して、各種未分化マーカーで免疫染色およびアルカリフォスファターゼ染色を実施し、未分化性を有していることを確認した。また、テラトーマ形成能を有し、三胚葉に分化することを確認した。



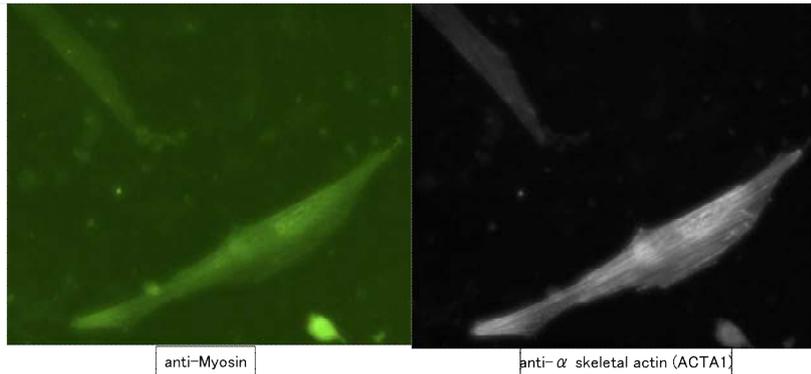
α -actininで免疫染色

心筋細胞への誘導

iPS細胞をDMEM(20%FBS)下でEB(胚様体)形成し約1ヶ月で拍動する細胞体を単離し、心筋細胞特異的マーカーを用いた免疫染色を行い、心筋細胞分化を確認した。心筋細胞に負荷を与えるため、 $10\mu\text{M}$ のノルアドレナリン刺激を1週間与えたが、患者細胞のみに期待されるような α -アクチニンの局在変化は見られず、コントロール細胞にも局在変化がみられた。

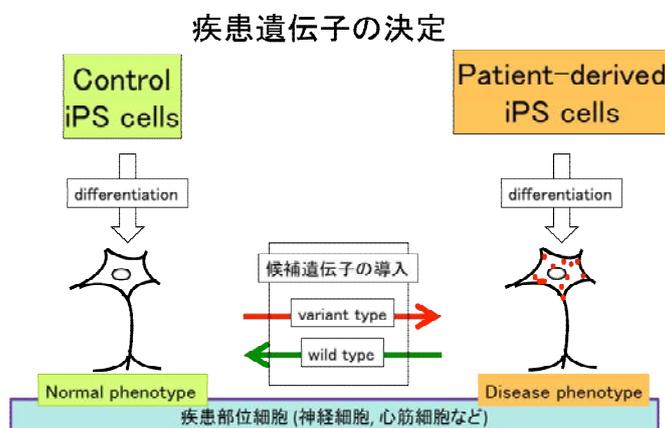
骨格筋細胞への誘導

Dox 誘導型 MyoD 発現 piggy ベクター(京都大学 iPS 細胞研究所 櫻井英俊博士から供与)を iPS 細胞に導入し、各種骨格筋細胞マーカーを用いた免疫染色を行い、骨格筋細胞分化を確認した。



一ヶ月以上長期培養を試みたが、期待されるようなネマリン小体は骨格筋細胞には認められなかった。

候補遺伝子から原因遺伝子への決定



ゲノム解析から候補遺伝子が2つに絞り込まれた。一つは2遺伝子とも骨格筋細胞および心筋細胞で発現していることは確認できた。どちらの塩基置換も疾患原因となりうるし、希少変異ともない。左図に示すように、コントロール iPS 細胞に候補変異遺伝子を導入・疾患部位細胞に誘導し、患者由来細胞と同様な表現形を示すかどうか。また患者 iPS 細胞の

ゲノムを正常型に編集して、表現形が消失するか否かで疾患遺伝子を決定する。現在までのところ、残念ながら顕微鏡下での患者特異的な表現形は得られていない。現在は mRNA、タンパク質レベルでの患者特異的な表現形を探索している。

3. 今後の展開

原因遺伝子決定後は、その遺伝子変異によりどうして骨格筋細胞にネマリン小体が蓄積されるのか、および拡張性心筋症になってしまうのかという病態解明を実施する。本疾患は母親由来のアリルは正常型である。樹立した患者 iPS 細胞を用いて、この正常型の発現を上げると筋機能が回復されるのか？または父親由来の異常型アリルの発現を抑制すれば筋機能回復がみられるかどうかを中心に、治療法を探る。

4. 評価

(1) 自己評価

研究の狙いは、①iPS 細胞を樹立し、②疾患部位細胞へ分化誘導を行い、③患者特異的な表現形を得る事である。

これに関して、

- ・ 患者由来 iPS 細胞樹立の手技習得
- ・ 疾患部位細胞への分化誘導の手技習得

以上の2点は研究期間内に得られ、今後の研究に大きく貢献できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

ゲノム研究と iPS を組み合わせる疾患メカニズムの例として採択された。当初の予定通り、ネマリンミオパシーの患者及び母親から iPS を作製し、神経分化誘導を行い、全ゲノム配列の決定も行い、候補となる遺伝子まで到達したと評価している。病態の解析については時間がかかると思うが、必ずやり遂げて欲しいと期待する。ただ、病気の名前の由来になったネマリン小体にこだわらず、病態を明らかにする事が重要だと感じた。さきがけ研究に直接関わる成果ではないが、共著論文は発表している。あとは出来るだけ早く、ネマリンミオパシーに関する論文を作成するよう期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Multiple-System Atrophy Research Collaboration: Mutations in COQ2 in familial and sporadic multiple-system atrophy. *N Engl J Med*. 2013, 369, 233-244,
2. Takahashi Y, Fukuda Y, Yoshimura J, Toyoda A, Kurppa K, Moritoyo H, Belzil VV, Dion PA, Higasa K, Doi K, Ishiura H, Mitsui J, Date H, Ahsan B, Matsukawa T, Ichikawa Y, Moritoyo T, Ikoma M, Hashimoto T, Kimura F, Murayama S, Onodera O, Nishizawa M, Yoshida M, Atsuta N, Sobue G; JaCALS, Fifita JA, Williams KL, Blair IP, Nicholson GA, Gonzalez-Perez P, Brown RH Jr, Nomoto M, Elenius K, Rouleau GA, Fujiyama A, Morishita S, Goto J, Tsuji S.: ERBB4 mutations that disrupt the neuregulin-ErbB4 pathway cause amyotrophic lateral sclerosis type 19. *Am J Hum Genet* 2013. 900-9005

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Date H, Ichikawa Y, Ahsan B, Tsuji S. Development for cloning method for the hereditary unknown disease gene using patient-derived iPS cells. International Society for Stem Cell Research 2012, June 14 10th Annual Meeting Yokohama.

研究報告書

「人為的核内環境制御による高品質 iPS 細胞の誘導」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 堀田 秋津

1. 研究のねらい

体細胞に数種類の転写因子を導入することによって作成される iPS 細胞は、分化多能性を持つ為、損傷した臓器を分化細胞によって補完する再生医療など、多様な応用が期待されている。しかしながら、iPS 細胞の誘導過程は確率論的かつ非効率であり、作出された iPS 細胞における「質のばらつき」が大きな問題となっている。iPS 細胞誘導過程において、ゲノム一次配列は基本的に変化しないが、遺伝子発現パターンを制御するエピジェネティックな環境は大きく変化して、ES 細胞のそれに変化していく。ES 細胞等多能性幹細胞の核内環境を多面的に捉え、そこに関わる因子を明らかにすることで、iPS 細胞誘導メカニズムの更なる理解を目指した。

2. 研究成果

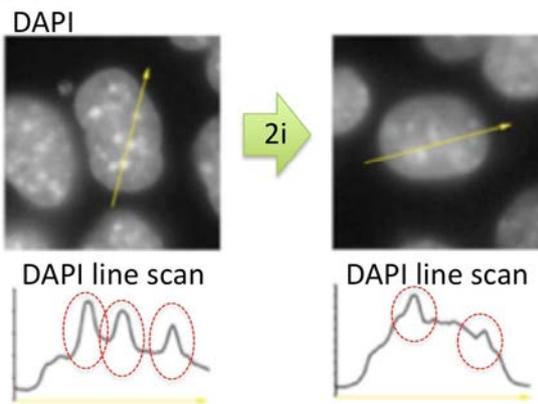
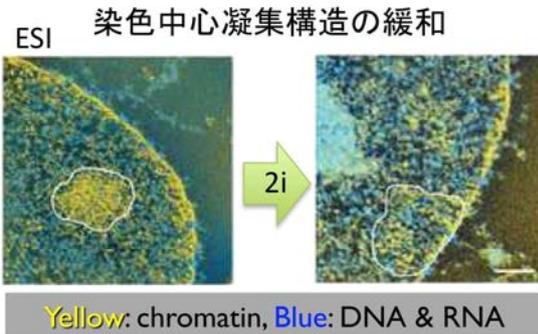
(1) 概要

初期化に失敗した出来損ないの iPS 細胞が、真の ES 細胞に近い状態へと変化する過程に着目し、核内のクロマチン構造変化とそれに伴うエピジェネティクス経路の包括的な理解を目指した。クロマチン構造変化を観察すると、線維芽細胞や出来損ないの iPS 細胞についてはヘテロクロマチン構造が凝集しているのに対し、真の iPS 細胞や ES 細胞はヘテロクロマチン構造が緩和していることが明らかとなった。また、外来遺伝子サイレンシングに関わる宿主因子群を同定することを目指し、*piggyBac* トランスポゾンを利用した shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングシステムを開発した。ES/iPS 細胞における強制発現ベクターや Knock-down ライブラリーにより、エピジェネティクス状態や核内環境を操作することを目標としている。

(2) 詳細

研究テーマ1「iPS 細胞におけるヘテロクロマチン構造の緩和」

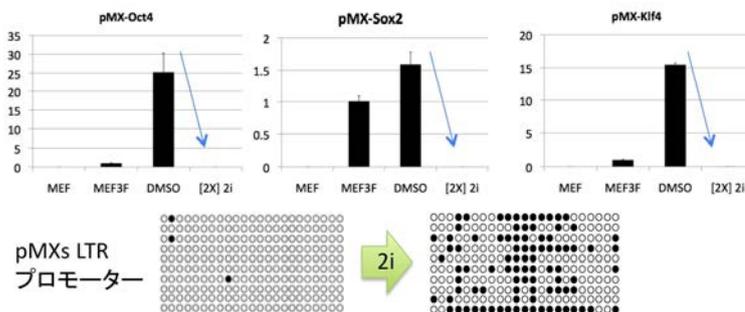
マウス細胞核内の染色中心(クロモセーター)は Major Satellite および Minor Satellite の繰返し配列で構成されており、DAPI 染色や H3K9me3 の明るいドットとして観察可能な、高度凝集クロマチン構造を取る事が知られている。ESI (Electron Spectroscopic Imaging)と呼ばれる特殊な電子顕微鏡を用いてリン(P)と窒素(N)を可視化すると、この染色中心の核内での物理的構造が体細胞や出来損ないの iPS 細胞では高度に凝集しているものの、真の iPS 細胞や ES 細胞、マウス着床前胚の ICM では凝集構造が緩和していることが明らかとなった[右図]。出来損ない iPS 細胞を真の iPS 細胞に変換するために、MEK/ERK 経路阻害剤 (PD0325901) と GSK3 阻害剤阻害剤 (CHIR99021)を添加する 2i 処理後には、この染色中心凝集構造が緩和し、DAPI 染色によるスポット蛍光強度が緩和し、マウス ES 細胞と同等の構造になることも確認した。



研究テーマ2「iPS 細胞におけるレトロウイルス・トランスポゾンのサイレンシング」

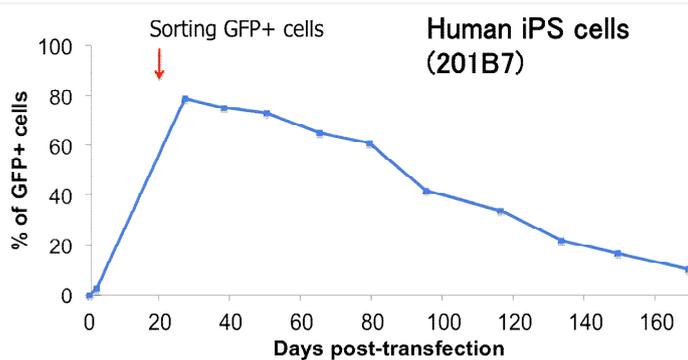
出来損ない iPS 細胞において、pMXs レトロウイルスベクターで導入された山中3因子は、サイレンシングに失敗して発現が持続している。この時、pMXs ベクターの LTR プロモーターで

2i処理後のpMXsレトロウイルスベクターのサイレンシング



は、DNA のメチル化が全く起っていない。しかし、2i 処理後にはレトロウイルスのサイレンシングが引き起され、LTR LTR が部分的に DNA メチル化を受ける事を確認した。[左図]

一方、蛾由来の DNA トランスポゾンである *piggyBac* は、ヒト ES 細胞などでサイレンシングを受けにくいとの報告がある。本当に ES/iPS 細胞でサイレンシングを受けないのかを確認するために、*piggyBac* ベクターを ES 細胞、iPS 細胞に導入して長期に渡って GFP レポーター発現を追った所、徐々に導入遺伝子の発現が低下して行くことを見出した[下図]。



同様の発現低下は、Dnmt3a, Dnmt3b 欠損 ES 細胞にも起こること、またこの時 piggyBac ベクター内部に CpG メチル化は見られないことから、サイレンシングの誘導に DNA メチル化は必要で無いことが分かった。

研究テーマ3・shRNA ライブラリーを用いたゲノム規模機能解析

高品質 iPS 細胞が低品質 iPS 細胞と明らかに異なるもう一つの側面は、レトロウイルス等の外来遺伝子をサイレンシングする機構を備えている点にある。このサイレンシング機構は、高品質 iPS 細胞だけでなく、ES 細胞や初期胚でも観察される機構である[Hotta et al., J Cell Bio, 2008]。MoMLV タイプのレトロウイルスに関しては、今までの研究で Trim28, Zfp809, Eset 等、いくつかの抑制因子が報告されているが、他のウイルスやトランスポゾンに関する発現抑制機構はほとんど研究が進んでいない。そこで、外来遺伝子の発現抑制機構に関与する因子を探索するべく、ゲノム規模のスクリーニング実験が必要であると考えた。

昨今、ゲノム規模の shRNA スクリーニングは、ある生命現象を基底する遺伝子群を同定する為に広く用いられている。shRNA を目的細胞の染色体へ挿入することで、長期間安定に遺伝子発現を抑制可能という利点がある。現行では shRNA をレンチウイルスベクターに搭載したものが大多数であるが、下の表で示した様に、ウイルスを使用する煩雑性・安全性、作成過程におけるバイアス、ES/iPS 細胞での外来遺伝子発現抑制[申請者文献⑧]等々が問題となっている。そこで申請者は、piggyBacトランスポゾンを利用して shRNA を導入可能な新規ベクターを開発する事とした。piggyBac ベクターは、ベクターと転移酵素をコードするプラスミドを導入するだけで、簡便に高効率で目的細胞の染色体に挿入できる新しいタイプのベクターである。下の表で挙げた様に、同じ挿入型ベクターのレトロウイルス/レンチウイルスと比べても多くの利点を持っており、利便性が格段に優れている。

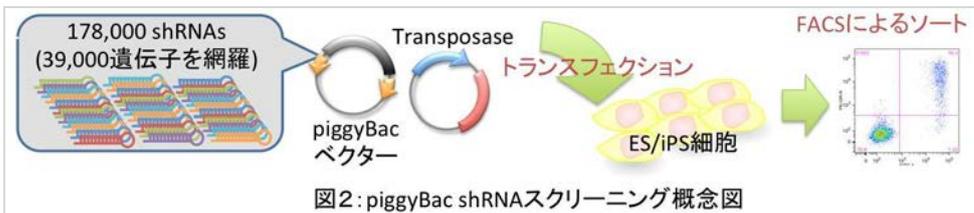
レンチウイルス shRNA ライブラリーの問題点	piggyBac shRNA ライブラリーの利点
× 封込レベル P2での取扱が必要。	◎プラスミド DNA の調整のみでライブラリーが完成(P1 レベル)
× ライブラリーの作成に大量のプラスミド DNA とパッケージング細胞が必要。	◎プラスミド DNA を細胞にトランスフェクションするだけの簡便操作。コストも安い。
× ウイルス作成過程において、ライブラリーの一部が選択的に失われ、バイアスがかかる。	◎操作ステップが少ないため、選択によるライブラリーのバイアスを最小限にできる

× 多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)ではベクター導入効率が低い。

◎ 多能性幹細胞(ES/iPS 細胞)でも導入しやすく、発現抑制を受け難い。

・piggyBac-shRNA ライブラリーの構築

shRNA 発現用 *piggyBac* ベクターを新たに構築し、マウス ES 細胞において GFP に対するノックダウンを行った所、80%程度の抑制効果が3週間以上安定して持続可能であることを確認した。また、SBI より購入した shRNA ライブラリーのプールを *piggyBac* ベクターへ乗せ替えた。さらに、構築した shRNA ライブラリーの数を確認するために、MiSeq を利用して超並列シーケンスを行なった所、既知のマウス遺伝子(RefSeq ベース)およそ 30,000 をターゲットとする約 60,000 shRNA が存在することを確認した。



このライブラリーを用いて、トランスポゾンベクターを長期培養した際に多能性幹細胞においてサイレンシングに影響する因子のスクリーニングを行なった。その結果、多数の転写制御因子が見出され現在はその中からいくつかの因子に絞って解析を進めている。

研究テーマ4・人工ヌクレアーゼによるES/iPS細胞のゲノム編集技術確立

cDNA の強制発現、shRNA によるノックダウンの他に、ES/iPS 細胞における遺伝子機能解析を促進するために、TALEN や CRISPR/Cas9 技術を利用したゲノム編集技術の検討を行った。その結果、これまで相同組換えが困難であったヒト iPS 細胞においても、高効率でゲノム編集が可能となることを見出した。現在、上記スクリーニングで見出した因子を、ゲノム編集技術でノックアウトする実験にも取り組んでいる。

3. 今後の展開

piggyBac shRNA ライブラリースクリーニングによって同定された因子について解析を進め、なるべく早く論文を投稿したい。今回構築したライブラリーは非常に簡便にゲノム規模のスクリーニングを進める事ができるので、未知の生命現象や病態発症機構を解明する際に有用であると感じがえる。トランスポゾンのサイレンシング誘導因子に関しては、遺伝子発現機構の解明のみならず、将来的には多能性幹細胞の特性や、外来/内在遺伝子を見分けて制御している機構などの解明に繋がるのではないかと期待している。

4. 評価

(1) 自己評価

当初の目的であった、iPS 細胞誘導過程におけるエピジェネティックの直接的な制御因子解析については、研究所内での実験テーマ重複や海外研究の先行もあり、思うような成果を挙げることが出来なかった。しかし、iPS 細胞研究で威力を発揮する発現ベクター、shRNA ライブラ

リー、ゲノム編集技術やバイオインフォマティクス解析などの技術開発については、一定の寄与が出来たのではと考えている。今後は同定因子の解析と詰めの実験を進め、なるべく早く論文にまとめたいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

リプログラム過程でクロモソームの染色体構造の凝集度が緩むという独自の観察を基礎に、リプログラムレベルを測定し、質の高いiPS作製法を開発するという提案だったが、この目標到達には遠かったようだ。ただ、iPSの質を高めるための様々なプロジェクトを推進しており、例えば本現象に関わる遺伝子を特定するために、shRNAで網羅的に遺伝子を抑制するシステムを立ち上げている。そのため、時間がかかり、進捗が遅いのもある程度理解できる。もともと、方法の開発など努力を厭わない研究者なので、今後も最も優れた方法をこの分野に提供するという方向でも活動して欲しいと期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Fussner E*, Djuric U*, Strauss M, <u>Hotta A</u> , Perez-Iratxeta C, Lanner F, Dilworth FJ, Ellis J, Bazett-Jones DP.(*: equal contribution) "Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming." EMBO Journal, 2011; Vol.30 (9): p1778-1789.
2. Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, <u>Hotta A</u> , Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi myopathy in vitro." PLoS ONE, 2013; Vol.8 (4): e61540.
3. Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, <u>Hotta A</u> , Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J "Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate." Stem Cell Reports, 2013; Vol.1 (4): p283-292.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・ 李 紅梅, Knut Woltjen, 高橋和利, 山中伸弥, 堀田秋津. "TALENを用いたヒトiPS細胞におけるゲノム編集" 細胞工学, 2013; Vol.32 (5): p526-531. (総説)
- ・ 堀田秋津. "iPS細胞の小分子制御" 学術の動向, 2011; Vol.16 (5): p62-65. (総説)
- ・ Li HL, Nakano T, Hotta A "Genetic correction using engineered nucleases for gene therapy applications." Development Growth & Differentiation, 2014; online publication. (Review)
- ・ Hotta A and Yamanaka S. "Biomaterials and Regenerative Medicine: Chapter 2 Induced Pluripotent Stem Cells", 2014, in press. (Book chapter)

研究報告書

「リプログラミング技術で解く細胞分化と時計機構の関係」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 八木田 和弘

1. 研究のねらい

睡眠覚醒や血圧、体温、内分泌さらには代謝など、様々な生理機能には日内変動が見られ、この約一日周期のリズムを circadian rhythm(概日リズム)とよぶ。概日リズムを生み出している概日時計(体内時計)は全身の臓器組織に細胞レベルで備わっており、個体レベルのリズムと同時に個々の細胞機能リズムを制御している。このように公汎な生理機能に関わるため、概日リズム障害は様々な疾患リスクとの関連が示されている。

我々は、最近、マウスES細胞の *in vitro* 分化誘導系を利用して、ES細胞の分化に伴い *in vitro* で細胞自律的に概日時計が形成されること、分化して概日時計が形成された細胞をリプログラミングして iPS 細胞にすると再びリズムが消失すること、を示し概日時計と細胞分化との密接な関連を見いだした(Yagita et al, *PNAS*, 2010)。この発見は、個体レベルや臓器レベルで見られる生理機能リズムを制御する概日時計と細胞の運命決定を制御する細胞分化機構との間に関連があることを初めて示したものである。

そこで、さきがけ研究では細胞分化の制御機構と概日時計の成立がどのような分子レベルでのクロストークによって連関しているのか、分化異常を示すようなモデルES細胞およびiPS細胞を用いて解き明かすことを目指した。細胞分化に伴う概日時計の成立機構が解明されれば、i) 普遍的な細胞機能である概日時計を指標にした細胞評価、ii) 胎児性腫瘍などの発生メカニズムとの関連解明、iii) 自閉症などの先天性脳機能発達障害における睡眠リズム障害発症メカニズム理解、など社会的な要請も高い研究に展開できると考えている。

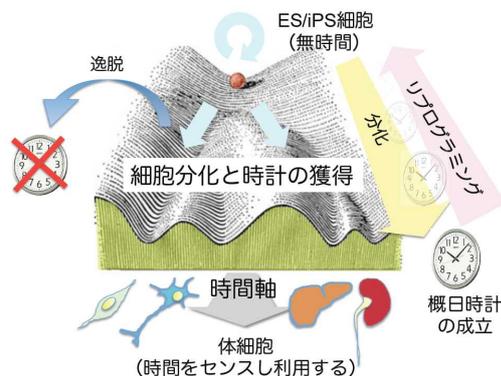
2. 研究成果

(1) 概要

さきがけ研究では、リプログラミング技術を用いて、「細胞分化と概日時計の機能連関」を分子レベルで解き明かすことを目的として研究を行った。その上で、まず、細胞分化に異常を来すようなモデルES細胞やiPS細胞を用いた *in vitro* 概日時計形成評価法の確立が必要であり、遺伝子変異などによる概日時計の異常がES細胞やiPS細胞を用いて *in vitro* で再現できることが必須の条件となる。さらに、*in vitro* 概日時計形成評価法で検出したリズム異常の生理的意義を評価するためにも、個体発生における概日時計発生機序との比較検討を行う必要がある。また、ES細胞やiPS細胞から臓器・組織が形成された後での概日時計評価系の確立など、様々な新規アッセイ系の構築をも同時に進める必要がある。

その結果、現在までに、1) 遺伝子変異 ES 細胞バンクを用いた概日時計成立異常スクリーニング系の確立、2) マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞自律的発生の解明、3) マウス大腿骨をモデルとした超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立、などの成果を上げた。さらに、細胞分化異常による概日時計成立機構の破綻メカニズムなどの解明を進めており、具体的な分子機序についても明らかになってきている。

細胞分化と密接に関連した概日時計の成立



(2) 詳細

研究テーマ A 「遺伝子変異 ES 細胞バンクを用いた概日時計成立異常スクリーニング系の確立」

ES細胞の*in vitro*分化誘導により概日時計が細胞自律的に形成されるが、我々が開発した*in vitro*概日時計形成法が遺伝的変異によるリズム異常を検出する事が可能かどうかを検討した。時計遺伝子のうち、遺伝子欠損により長周期を示すCKI δ および、遺伝子欠損により胚性致死になるCK2 α の二つの遺伝子に着目し、これらの遺伝子に変異が導入された変異ES細胞株を用いて検討した結果、我々の開発した方法で遺伝子変異による概日リズム異常を検出できることを証明した。さらに、本研究により、胎生致死に陥る遺伝子変異であっても、正確に*in vitro*で概日時計表現型の評価ができるようになった。

研究テーマ B 「マウス embryo を用いた個体発生における概日時計の細胞自律的発生の解明」

概日時計の発生について、概日時計レポーターmPER2::LucをノックインしたmPER2^{Luc}マウス胎仔組織および器官培養系を用いて解析した。おもに線維芽細胞からなるマウス胎仔末梢組織の分散培養系において、E10.5胚の細胞では概日リズムは検出されなかった。しかし、さらに培養を継続したところ、3～4日で振幅は非常に小さいものの約24時間周期のリズムが出始める細胞が一部に認められた。培養8日後にはほとんどの細胞にはっきりとした概日リズムが見られ、ES細胞の分化誘導系と同様に、マウス胎仔の細胞にも細胞自律性の概日時計発生が認められた。さらに、マウスE13.5胚から顎下腺を採取して器官培養を行い、顎下腺における概日リズムの発生過程をイメージング解析したところ、線維芽細胞と同様に当初見られなかった概日リズムが、器官培養の過程で組織自律的に概日時計が形成されることを見いだした。これにより、ES細胞の分化誘導過程のみならず胎仔組織においても細胞自律性の概日時計発生が証明された。

研究テーマC「マウス大腿骨をモデルとした超長期器官培養による概日時計イメージング法の確立」

概日時計は全身の臓器・組織に存在しており、様々な臓器機能を制御している。しかし、現在のところ、末梢臓器の器官培養や組織培養を長期間継続して行うことが困難であり、また、臓器全体をリアルタイムにイメージングできる高感度発光イメージング装置が存在せず、発生発達過程などでの臓器レベルの概日時計の機能解析はほぼ不可能な状況であった。そこで、我々は末梢の概日時計成立の生理的意義を解析できる実験系の開発を目的として、マウス大腿骨の超長期器官培養系の確立およびマウス臓器全体をリアルタイムイメージングできる高感度発光イメージング装置の開発を行った。その結果、マウス大腿骨のほぼ全体像が高精細にイメージングできる装置を作製し、ex vivoで大腿骨骨端軟骨の概日時計振動を約300日にわたって連続測定することに成功した。その結果、マウス大腿骨の骨端軟骨は、強く時計遺伝子mPER2を発現すること、非常に明瞭な概日リズムを刻むこと、を明らかにした。

3. 今後の展開

今後は、さらに「細胞分化と概日時計の因果関係」を証明するために、さらなる細胞分化異常モデルES細胞およびiPS細胞を用いて網羅的遺伝子発現およびゲノム解析を行い、最終的に概日時計の形成を導くコア転写因子の同定とこれに伴って制御される遺伝子ネットワーク「Clock モジュール」を抽出する。これは、概日時計発生機構を解明するだけにとどまらず、全ての体細胞における正常な分化の指標となる可能性があり、普遍的な細胞機能を評価する新たな視点を提供できるものと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

細胞分化と概日時計成立の因果関係を分子レベルで解き明かし、全身の細胞に概日時計が形成される意義やその破綻が意味する病態、さらにはES細胞やiPS細胞および生殖細胞に概日時計が無い(あってはならない)理由を知ることが科学的ねらいとして定めて研究を行った。さきがけの研究期間内に公表できた我々の論文は3編(さきがけ研究として行ったもののみ)、また投稿中および間もなく投稿に至る論文が2つあり、成果をあげることができたと考えている。また、国際学会における賞の受賞(AOSP Award for Young Scientist)および特許出願もそれぞれ1件有り、成果の社会への還元についても積極的に取り組んだ。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

多能性幹細胞段階ではサーカディアンリズムがなく、分化とともに発現するという独自に見た現象について解析を行い、特定遺伝子とリズムの問題まで到達している事は評価する。少しインパクトに欠ける結果とはいうものの、地道にメカニズムを追い求め研究を続けた結論であり、さらに本結果に基づき新しい視点を考え出そうとしている点も評価できる。論文は着実に発表できているが、今後はインパクトのある大きな仕事へどう発展させるかという課題への

挑戦が残っている。是非リズム研究に新しい視点をもたらして欲しいと期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N, **Yagita K***. Cell and Tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Lett.*, in press. (*Corresponding author)
2. Okubo N, Minami Y, Fujiwara H, Umemura Y, Tsuchiya Y, Shirai Y, Oda R, Inokawa H, Kubo T, **Yagita K***. Prolonged Bioluminescence Monitoring in Mouse ex vivo Bone Culture Revealed Persistent Circadian Rhythms in Articular Cartilages and Growth Plates., *PLoS One*, 2013, 8, e78306 (*Corresponding author)
3. Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, Takeda J, Inokawa H, Horie K, **Yagita K***. An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2a as an endogenous clock regulator. *PLoS One*, 2013, 8, e67241 (*Corresponding author)

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 八木田和弘

発明の名称: 体内時計を指標とした細胞評価法の確立

出 願 人: 京都府立医科大学

出 願 日: 2012/1/6

出 願 番 号: 特願 2012-1506

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1) 国際学会

[招待講演・シンポジウム・ワークショップ]

- 1: Yagita K., ES cell-based approach elucidating the integrated physiology of mammalian circadian systems. *4th International Symposium on Photoc Bioimaging 2012*, Sapporo, 2012 (Invited speaker)
- 2: Yagita K., Cell-autonomous development of mammalian circadian clock during the differentiation culture of ES cells. *International Conference for Histochemistry and Cytochemistry 2012*, Kyoto, 2012 (Invited speaker)
- 3: Yagita K., Chronogenesis and cellular differentiation., *Gordon Research Conferences: Chronobiology*, Lucca, 2011 (Invited speaker)
- 4: Yagita K., Development of circadian oscillator in mammals., *12th Society for Research on Biological Rhythms*, Destin, Florida, 2010 (Invited speaker)

2) 国内学会



[特別講演・シンポジウム, ワークショップ]

1. 八木田和弘, :「イメージング技術を用いた生体機能の Cutting Edge」, 関西実験動物研究会 30周年記念大会, 京都, Dec. 6. 2013 (シンポジスト)
2. 八木田和弘, :「ES 細胞を用いた概日時計の in vitro 再現と分化制御機構との関連」, 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, Dec. 5. 2013 (ワークショップ講演・オーガナイザー)
3. 八木田和弘, :「MYC induced disruption of circadian clock development」, 第 86 回日本生化学会, 横浜, Sep. 11. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
4. 八木田和弘, :「体内時計はいつ動き出すか」, 第 14 回日本抗加齢医学会, 横浜, June. 30. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
5. 八木田和弘, :「ES cell-based in vitro evaluation system of circadian clock phenotypes in mammals」, 第 90 回日本生理学会大会, 東京, Mar. 27. 2013 (シンポジスト・オーガナイザー)
6. 八木田和弘, :「体内時計の発生・発達」, 第 1 回日本発達神経科学会, 明石, 2012 (特別講演)
7. 八木田和弘, :「発生発達期における概日リズムの階層的形成」, 第 17 回日本行動神経内分泌研究会, 京都, 2012 (教育講演)
8. 八木田和弘, :「時間軸生物学:細胞分化と概日時計の接点」, 第 12 回日本抗加齢医学会総会, 横浜, 2012 (シンポジスト・オーガナイザー)
9. 八木田和弘, :「Circadian clock and Cellular Differentiation」, 第 89 回日本生理学会, 松本, 2012 (シンポジスト・オーガナイザー)
10. 八木田和弘, :「Circadian clock and Cellular Differentiation: Development, Regeneration and Cancer」, 第 34 回日本分子生物学会, 神戸, 2011 (ワークショップ講演・オーガナイザー)
11. 八木田和弘, :「細胞分化と概日時計の発生」, 第 64 回日本自律神経学会, 秋田, 2011 (シンポジスト・オーガナイザー)

3) 受賞

1. 「Asia and Oceania Society for Photobiology (AOSP) Award for Young Scientist」, (2013)

研究報告書

「分化・発生を理解する多次元定量計測技術の基盤開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 渡邊 朋信

1. 研究のねらい

生命科学の進歩は、計測技術の進歩と共に在る。例えば、1990 年、生命の機能を要素に分解・分析すれば、医学・生命科学に多大な貢献が成されると期待され、ヒトが持つ全ゲノム配列を解読するヒトゲノム計画が開始されたが、それに伴いシーケンサやマイクロアレイ技術の開発が爆発的に発展した。今や、ゲノム情報は圧倒的速度で解析可能となり、遺伝子・蛋白質発現やそれらの相互作用などの情報が網羅的に取得可能である。シーケンサ・マイクロアレイ技術の発展は、生物・医学的情報に、革命的な変化をもたらした。しかしながら、未だ生命の仕組みは解明されていない。例えば、一卵性双生児は、例えゲノム情報が全く同じであったとしても、同じ人間に成長することはありえないが、上記をこれまでの生命理解だけでは説明することはできない。分析・分解型の情報だけでは、生命は語れないのである。21 世紀に入り、生命科学は、生命現象を、従来の要素分解型の理解に留まらず、分解された要素達の相互作用が織り成す複雑系の動的平衡として理解していく段階へと向かっている。生命現象を形成する素子とその現象全体の振る舞いとを層を超えた観察・計測が求められ、そのための技術開発もまた求められる。

生命科学に必要な技術開発は、計測技術に限ることではなく、アッセイ法の開発やゲノム編集法、細胞株の樹立など、生化学的・細胞生物学的手法でも行われている。近年、山中伸弥教授により人工多能性幹細胞(iPS 細胞)が発明された。iPS 細胞は、生命倫理・拒絶反応問題を回避できる幹細胞として、生命研究にパラダイムシフト起し、日本における iPS 細胞に関する研究、あるいは、iPS 細胞を用いた研究は、基礎・応用ともに盛んに行われている。一方、計測技術においては、光学顕微鏡を基盤技術とし、生命を形作る素子である蛋白質の機能や細胞を実時間観察・計測する技術の開発が進んでいる。しかしながら、上記二つの技術は、双方共に日本が世界最先端であるにも関わらず、日本におけるこれら二つを用いた融合研究は、世界から遅れていると言わざるを得ない。今後も当該分野において日本が世界に向けてイニシアティブを示す為には、融合研究をさらに推し進めることが必須であろう。来たる次世代の生命科学研究に向けて、生命現象の『動的』挙動を観察・計測するための様々技術開発、本研究では特に iPS 研究に係る技術開発を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

細胞の分化・リプログラミングのメカニズムには未だ不明な点が多い。その大きな要因として、細胞の「多能性」は、様々な種類の遺伝子発現、エピジェネティクスなどの複雑な相互作用により制御されている事が挙げられる。近年盛んに開発が進んでいるオミックス技術は、遺伝子・蛋白質発現やそれらの相互作用などの分解・分析的情報の網羅的解析を可能とし、上記の問題解決に貢献している。しかしながら、これらは一瞬を切り取った静的

情報であり、また、大量の細胞群のアンサンブルから得られる平均化された情報である。細胞は決して均一な集団ではなく、ひとつひとつが個性を持つ(ヘテロジェナイティ)。ヘテロジェナイティの動的変化が生命現象において決定的な役割を果たすことが明らかになりつつあり、現在の生命科学における計測技術開発の方向性は、『動的』かつ『単細胞精度』へ向かっている。本研究課題においても、細胞の状態を、『動的』かつ『単細胞精度』で観察し、識別・選別し得る技術の開発を中心に行った。

本研究課題の技術開発は、主に光学顕微鏡技術を基盤としたが、その他、生体蛍光プローブの開発や、ナノ・マイクロデバイス技術、質量分析技術など、幅広く技術を取り入れて、総合的・統括的に行った。光学顕微鏡では、広範囲と高解像度との両方を同時に達成できる超解像顕微鏡法、波長 1 ミクロンを超える光を用いた新規深部イメージング装置を開発し、従来の仕様を超えた顕微鏡画像を取得することを可能とした。培養インキュベータに二光子顕微鏡を組み込んだ顕微鏡システムは 1 週間以上の長期培養中の観察を可能とし、さらに、観察対象(例えば、細胞隕)の自動走査や細胞自動認識アルゴリズムを組み込むことで、統括的な観測システムとした。上記により、未分化マーカー発現パターンの細胞と細胞隕間とのバイスケールでヘテロジェナイティを同時観察することができた。生体内プローブの開発では、世界で初めて蛍光蛋白質に疎水感受性を持たせることにより、細胞核内における DNA の凝集を「色」として可視化することに成功した。計測技術のみならず、リプログラミングを促進する技術の開発も行い、既存技術の仕様改善を含めると、合計11の技術開発を行った。

本報告書では、本研究期間中に開発された技術の中で、iPS 研究に有用であった、あるいは、今後有用であると予想される技術のみ、下記に詳細を記す。

(2) 詳細

研究テーマ A「細胞の分化状態を非染色で定義できる光学技術と方法論の開発」

従来は、細胞種を定義するために、遺伝子や蛋白質の網羅的な発現パターンが用いられている。この方法を単細胞レベルで行うことは難しい。一方、細胞種を定義するだけなら、細胞種特有の情報であれば何でも良いと言える。また、iPS 細胞由来の細胞・組織の医療応用を見すえた場合に、細胞分化の状態を蛍光マーカー等で標識することは好ましくなく、非染色・非浸襲での細胞観察が望まれる。そこで我々は、細胞種を識別する『指紋』として、非染色観察が可能な顕微鏡法の一つであるラマン散乱分光法を用いて、細胞の分化状態を定義する技術の開発を行った。

ラマン散乱光とは、物質に光を照射した際における散乱光の一つであり、物質を構成する全ての分子振動の情報を含む。細胞は、様々な物質から構成されているため、細胞のラマン散乱スペクトルは、複雑すぎて要素分解不可能であるが、細胞種によって異なる可能性が強く示唆されている。しかしながら、ラマン散乱光は、非常に微弱であり、信号取得のためには細胞に損傷を与えるほどの強い光照射を必要とする。本研究課題では、ラマン散乱分光顕微鏡の感度を従来の約 100 倍程度向上させ、細胞のラマン散乱分光スペクトルを、細胞を生きのまま取得できる装置を構築した。

上記顕微鏡装置を用いて、細胞株がラマン散乱分光スペクトルにより識別・分離できる

こと、および、分化前後でラマン散乱分光スペクトルが変化することを示した。さらには、胚性幹細胞(ES 細胞)が、未分化維持培養時から分化誘導を行った際に、ラマン散乱分光スペクトルにより定義された細胞状態が、分化誘導後の経時に従い変化する様子を追跡することに成功した。

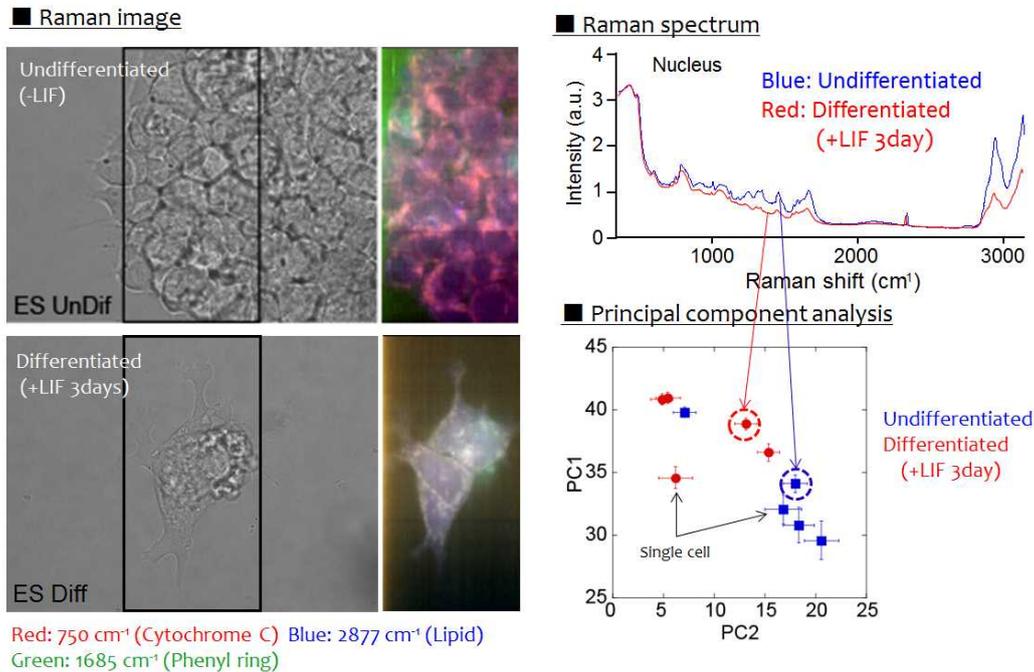


図 1. LIF 除去前と除去後 3 日目の ES 細胞から得られたラマン散乱スペクトル

ラマン散乱光による細胞指紋法に合わせ、我々は、非線形効果の一つである、第二高調波発生を用いた細胞分化状態の識別法も開発してきた。第二高調波は、蛋白質の電氣的偏向による発生する光であり、微小管や筋肉など繰り返し構造から強く発生する光であり、また、その内部の構造情報を含む。我々は、神経細胞における微小管の状態の違い、あるいは、筋肉細胞内における筋肉繊維の状態の違いを、第二高調波により識別できる方法を確立した。本手法は、神経細胞や心筋細胞の分化状態の確認や品質確認、病理診断などに応用する予定である。

研究テーマ B「単細胞セクレトミクス技術の確立」

本研究期間内で開発された技術の中で、もっとも有効的であり、迅速な実用化が見込まれる技術が、単細胞セクレトミクス技術である。現在のオミックス技術の解析標的は、細胞内に在る物質に限られており、分泌液のオミックス技術(セクレトミクス)は確立されていない。細胞外への分泌物質は培養溶液に速やかに拡散し大幅に希釈されるため、検出困難だからである。本研究課題では、マイクロデバイスの開発、および、ナノスプレー技術の応用等により、単細胞感度での分泌液網羅解析(単細胞セクレトミクス技術)を確立した。

本研究期間内に我々は、単細胞をマイクロウェルに閉じ込め、その周辺の隙間にある僅から細胞外液を用いることで、単細胞における細胞外分泌液の質量分析に成功している(図 2、特願 2013-114722)。我々が作成したマイクロウェルでは、ガラス表面に細胞ひとつが収まる大きさ(直径 10~40μm)の円状の親水性被膜が配列されている。その他の部分は、疎水性被膜により覆われている。溶液に含まれる細胞が、重力により十分にガラス表

面近傍に近づいてくるまで待った後に油を散布することで、親水性被膜上にドーム型の小さなウェルが生成され、そこに細胞が捕捉される。

本手法をもちいて、完全な多能性を示す人工多能性幹細胞(iPS 細胞)と不完全な iPS 細胞とを、分泌液の違いで識別することに挑戦した。上記二つの iPS 細胞では、分泌液の成分に、僅かではあるが確実な違いが発見された。251m/z 付近に特徴的なピークが検出され、これは Pentadecane であると考えられる。Pentadecane と分化多能性との関連性の詳細は不明ではあるが、本研究課題で解発された単細胞分泌液質量分析によって、細胞の未分化状態維持には Pentadecane の放出が関連していることが、世界で初めて示された。

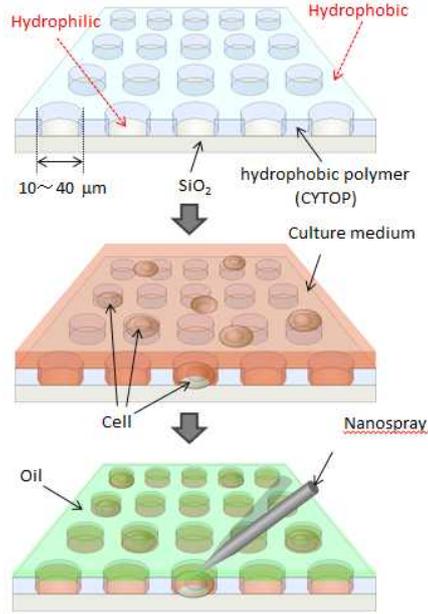


図 2. 単細胞分泌液質量分析法の概略図

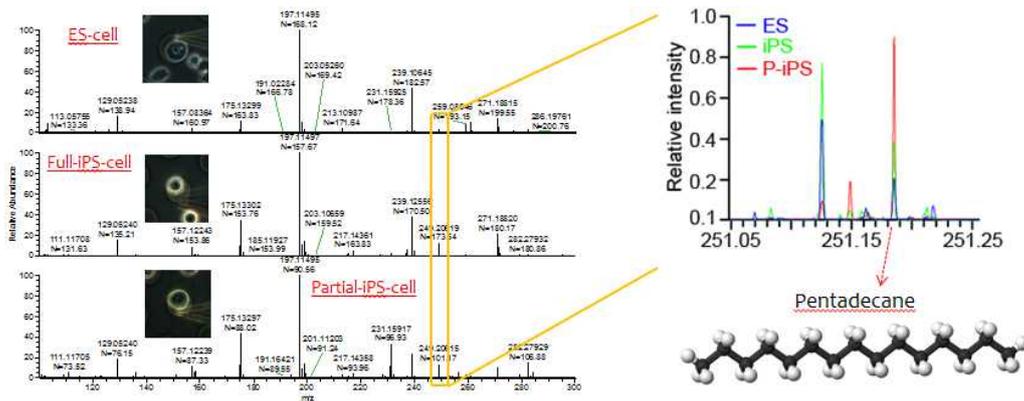


図 3. ES 細胞、partial-iPS、full-iPS 細胞ひとつの分泌液質量分析

研究テーマ C「力学刺激による iPS リプログラミングの促進と誘導」

複雑系理論によれば、細胞と言う複雑系が大きく変わる際には、要素間の相互作用には、自己触媒反応、つまり、ポジティブフィードバックが必ず存在する。即ち、リプログラミングの結果に表れる細胞状態の変化を、リプログラミング前の細胞に刺激として強制的に与えれば、その細胞のリプログラミングが促進されるはずである。本研究では、この仮説の是非を試みる実験を行った。

体細胞が iPS 細胞にリプログラミングされると、アクチンフィラメントがモノマー化し、細胞コロニーは丸い形状に変化する。本研究課題では、0.2~1.0kPa の硬さのゲル基盤を作製した。繊維芽細胞を上記ゲル基盤上で培養することで、細胞は球状コロニーを形成する。0.2kPa 状で培養したマウス繊維芽細胞では、約 4 日後に、ほぼ全てのコロニーにおいて、Oct4, Nanog, Rex 陽性であり、ヒト繊維芽細胞ではさらに SSEA3 陽性であった。Oct3/4 の発現増加より前に、Rock2 の発現が著しく低下しており、Rock2 の発現低下が Oct3/4 の発

現を促進していると考えられる。しかしながら、アルカリホスファターゼ活性は、一部のコロニーにしか確認できず、また、このコロニーから得られた細胞には、テラトーマ形成能が無かったことから、未分化マーカーを発現しているものの、未分化能は獲得していないことが分かった。一方で、ゲルの硬さの刺激のみで、リプログラミングに関連する遺伝子発現が修飾されていることは間違いなく、山中ファクターを加えた iPS 細胞の樹立においては、柔らかいゲルを用いることで、樹立効率は 5 倍程度向上した。今後、より詳細に調べると共に、ES/iPS 細胞の安定培養などにも応用していく予定である。

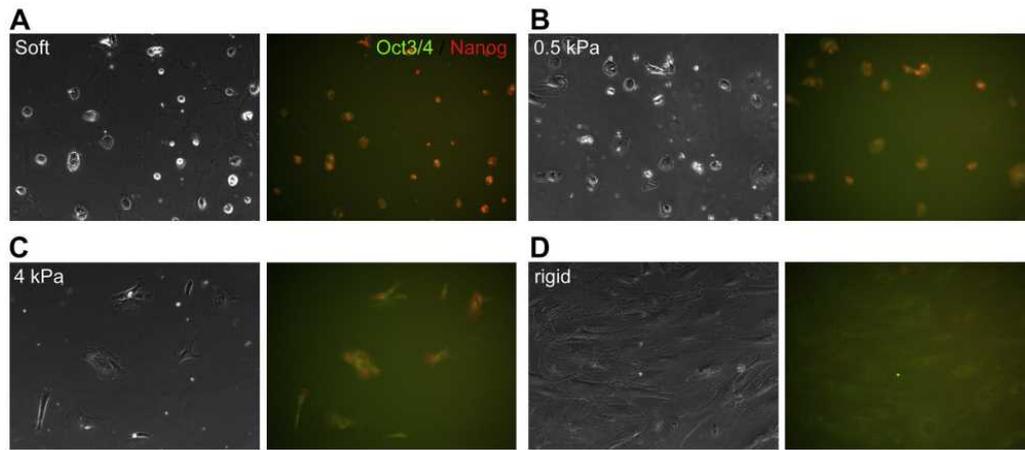


図 4. 様々な硬さのゲル状で培養した繊維芽細胞の顕微鏡像

3. 今後の展開

分解・分析型の研究が発展し、遺伝子や蛋白質が要素として複雑に相互作用を成し、複雑系として働くと言う概念が、定着しつつある。一方で、系全体が系外部から受ける信号によって、個々の要素の振る舞いが変わる。生命を複雑系として正しく理解するためには、要素のネットワーク(局視的視点)と系全体の挙動(巨視的視点)との二つの層をまたぐ情報が必要となる。今後は、本研究課題で開発された技術を使用しながら、時に、さらなる技術開発を行いながら、細胞分化・リプログラミングを遺伝子発現ネットワーク、および、細胞間相互作用の層の異なる複雑系として解き明かす予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

研究開始時に計画していた研究結果には遠く及ばない結果となった。上記は、当該研究者の iPS 研究に関する知識・技術不足が大きな要因である。この点に関し、本研究課題は低評価であると言わざるを得ない。特に当該研究者は、当該研究者の保有する基盤技術・知識だけを基盤として、目下の技術開発を行っていたことは否めない。上記は、ひとえに当該研究者の本研究領域における技術的課題・問題点を理解していなかったことに原因がある。しかしながら、3年半の研究期間において、iPS/ES 細胞に関して 3 本の論文を掲載するまでに至り、研究期間終了後にはなるが、今後は、iPS 研究者のひとりとして技術開発が行えると考えている。さきがけ終了後は、染色体異常を単細胞単位で生きたまま検出する、mRNA の発現の生

細胞内網羅的計測など、本領域における根本的問題を解決しえる抜本的な技術基盤の開発を行う。

一方で、計測技術と iPS 研究を繋ぐことに関しては、一定の基準に到達したと言える。三年間で実に 11 個もの新規技術を開発し、その中で 4 つに関しては、iPS 研究を専門とする研究者に評価され共同研究が開始されている。単細胞セレクトミクス技術に関しては、世界で初めて技術を確立した結果となり、本さがけ領域の指針とは多少ずれるものの、生命研究において基盤となりうる技術を開発したと言える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

工学技術を融合するという研究計画で採択されたが、さがけ期間内には期待通りの結果は殆ど得られなかった。ただ幸いな事に少しずつではあるが、他の研究者との共同研究も生まれ始めており今後に期待したい。もともと機器開発はこのグループの本来の研究領域であるため、論文の数は十分であり、この点は評価できる。今後は、工学と生物学研究の本当のブリッジになるためには何をすれば良いのか、この点を更に深く突き詰めていって欲しいと考える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|--|
| 1. Higuchi S, <u>Watanabe TM</u> , Kawauchi K, Ichimura T, Fujita H. Culturing of mouse and human cells on soft substrates promote the expression of stem cell markers. J Biosci Bioeng., 2014, in press |
| 2. Ichimura T, Chiu LD, Fujita K, Kawata S, <u>Watanabe TM</u> , Yanagida T, Fujita H. Visualizing cell state transition using Raman spectroscopy. PLoS One. 2014, 9, e84478 |
| 3. <u>Watanabe TM</u> , Fujii F, Jin T, Umemoto E, Miyasaka M, Fujita H, Yanagida T. Four-dimensional spatial nanometry of single particles in living cells using polarized quantum rods. Biophys J. 2013, 105:555-564 |
| 4. <u>Watanabe TM</u> , Tsukasaki Y, Fujita H, Ichimura T, Saitoh T, Akira S, Yanagida T. Distinct modulated pupil function system for real-time imaging of living cells. PLoS One. 2012, 7, e44028. |
| 5. <u>Watanabe TM</u> , Higuchi S, Kawauchi K, Tsukasaki Y, Ichimura T, Fujita H. Chromatin plasticity as a differentiation index during muscle differentiation of C2C12 myoblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2012, 418, 742-747 |

(その他 6 件)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 4 件

1.

発 明 者 : 藤田英明, 升島努, 渡邊朋信, 野地博行, 金秀炫

発明の名称： 細胞分泌液網羅的分析装置、および、方法
出願人： (独) 理化学研究所
出願日： 2013/5/20
出願番号： 特願 2013-114722

2.
発明者： 渡邊朋信, 慶澤景子
発明の名称： 細胞内蛋白質濃度計測方法
出願人： (独) 科学技術振興機構
出願日： 2013/1/13
出願番号： 特願 2013-016819

3
発明者： 渡邊朋信
発明の名称： 観察装置及び観察方法
出願人： 大阪大学
出願日： 2011/2/7
出願番号： PCT/JP2011/052543, 特願 2012-509339

4
発明者： 渡邊朋信, 慶澤景子
発明の名称： 改変蛍光蛋白質
出願人： (独) 科学技術振興機構
出願日： 2010/11/12
出願番号： PCT/JP2011/075932, 特願 2012-516252

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会・シンポジウムにおける招待講演

1. Tomonobu M Watanabe, Resolution Enhancement Method using a Wide Field Fluorescence Microscope, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry , Kyoto, 8/29/2012
2. Tomonobu M. Watanabe, Katsumi Imada, Keiko Yoshizawa, Masayoshi Nishiyama, Chiaki Kato, Fumiyoshi Abe, and Toshio Yanagida, Intracellular Pressure Measurement by using Pressure sensitive yellow fluorescent protein, 56th Annual Meeting on Biophysical Society, San Diego, California, USA , 2/4/2012
3. Tomonobu M Watanabe, High speed superresolution & pressure indicative fluorescent protein, Seminar at Research Center for Applied Sciences Academia Sinica (RCAS), Taipei, Taiwan, 10/25/2011
4. Tomonobu M. Watanabe, Yoshikazu Tsukasaki, Tatsuya Saitoh, Shizuo Akira, Toshio Yanagida, High speed Resolution Enhancement by optical pupil function modulating system, 55th Annual Meeting on Biophysical Society, Baltimore, Maryland, USA , 3/8/2011
5. Tomonobu M Watanabe, Simple Superresolution Methods by Using a Conventional Fluorescent Microscope, International Symposium on Photonic Bioimaging, Hokkaido, 2/08/2011

(その他 3 件)

国内学会・シンポジウムにおける招待講演

1. 渡邊朋信、物理パラメーターを計測する蛍光蛋白質の開発、第 6 回 CREST 講演会・光が拓いた新しい細胞解析技術、東京、2013 年 8 月 24 日
2. 渡邊朋信、光学顕微鏡で生細胞の内部を観て測る、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会、大阪、2013 年 5 月 22 日
3. 渡邊朋信、Resolution enhancement method focusing on usability and applicability for cell biology、第 45 回日本発生生物学会・第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸、2012 年 5 月 31 日
4. 渡邊朋信、高速超解像技術と圧力感受性蛍光蛋白質の開発、第 5 回 NIBB バイオイメージングフォーラム、岡崎、2011 年 1 月 11 日
5. 渡邊朋信、ナノシステムを定量する新規計測技術の総合的開発、第 84 回日本生化学会学会大会、京都、2011 年 9 月 16 日

(その他 11 件)

和文書籍・総説・解説

1. 渡邊朋信, 市村垂生, 「15 章 1 分子を見る光学顕微鏡」, 化学同人「1 分子生物学」(2014)
2. 渡邊朋信, 市村垂生, 神隆「生体分子のナノスケール動態を光で追う」日本興業出版、光アライアンス 2013 年 4 月号(2013)
3. 渡邊朋信, 「超解像光学顕微鏡で観える HIV-1 の成熟過程」羊土社 実験医学 2013 年 4 月号 (2013)