

ERATO 齋藤全能性エピゲノムプロジェクト事後評価（最終評価）報告書

【研究総括】 齋藤 通紀（京都大学 大学院医学研究科／教授）

【評価委員】（敬称略、五十音順）

青井 貴之（神戸大学 大学院医学研究科／特命教授）

後藤 由季子（東京大学 大学院薬学系研究科分子生物学教室／教授）

小林 悟（委員長；筑波大学 生命領域学際研究センター／教授）

関島 勝（株式会社 LSI メディエンス／担当部長）

評価の概要

ERATO 齋藤全能性エピゲノムプロジェクトの目的は、マウス及びよりヒトに近いモデル動物であるカンクイザルを用い、生命の根幹である生殖細胞（精子、卵子、その前駆細胞）の発生機構の解明と、それに基づく生殖細胞発生過程の試験管内再構成系の開発を行うことにある。そのためにマウス生殖細胞解析グループ、サル生殖工学開発グループ、サル初期発生機構解析グループ、生殖エピゲノム解析グループ、ヒト始原生殖細胞発生機構再構成グループの5つのグループを発足させ、互いに緊密な連携を取って研究を行った。

本プロジェクトの大きな特徴はカンクイザルを解析対象としたことである。実験動物として幅広く使用されているマウスの初期発生は高等哺乳類とかなり異なり、初期発生や幹細胞研究の適切なモデルとは限らないことが明らかになりつつある。すなわち、マウスだけではヒトへの展開は難しい。しかしながらヒトの初期発生研究にヒトを用いることは出来ないため、ヒトの初期発生に関しては、殆ど明らかになっていない。そこで、よりヒトに近いカンクイザルを用いた初期発生の解析から研究を開始するというアプローチをとっている。この方法は王道ではあるが、時間も費用も掛かることから世界でもまだ希である。本プロジェクトが実験動物としてのカンクイザルの位置を確立させるべく研究を開始したことは、世界に先駆けて行ったものである。

生殖細胞は成体において形成されるが、生殖細胞の元になる始原生殖細胞は発生の初期にのみ存在する。すなわち非常に少数の細胞を研究対象にすることになる。そこで、本プロジェクトでは少数細胞から遺伝子発現を定量する新しい方法論の開発も行った。

体細胞のゲノムは高度にメチル化されており、分化細胞特異的な遺伝子を発現させるため不要な遺伝子はメチル化や特異的なヒストン修飾により不活性化されている。生殖細胞である精子と高度に、卵子は中程度にメチル化されているが、受精卵のゲノムは再び脱メチル化され、ユニークなヒストン修飾とともに全ての遺伝子が活性化され得る状態となる。これが「初期化」と呼ばれる現象である。始原生殖細胞の形成の解析にはゲノムのメチル化パターン変化とゲノムワイドの遺伝子発現解析が必要であり、遺伝子発現解析のためのインフォマティクスの導入、ヒト iPS 細胞から始原生殖細胞の分化誘導やゲノム編集技術による遺伝子改変など、最新の技術の導入も積極的に行い、幅広い研究を行った。更にメスには性染色体である X 染色体が2つ存在しているが、その片方は不活性化されている。これも初期発生時に決定される現象であり、Xist (X Inactive Specific Transcript, X 染色体不活性化特異転写産物) という長鎖非コード RNA により制御されている。本プロジェクトではカンクイザルの初期発生における X 染色体の不活性化機構についても研究を進めた。

プロジェクトが発足して以降、発表論文 49 報（Nature, Science, Cell Stem Cell 等を含む）、特許出願 4 件、書籍・総説 23 報、学会発表 158 件（39 件の海外招待講演を含む）、新聞記事 75 件など順調に成果を挙げた。論文発表に関しては、極めて質の高い論文を出し続け、まさに世界をリードした。若手研究者を海外の学会（ドイツ、フランス、シンガポール、アメリカなど）に参加させるなどのキャリアパス支援も行われた。また、斎藤総括は日本科学技術未来館の幹細胞に関する展示の監修も行うなど、アウトリーチ活動にも取り組んだ。生命の根幹である生殖細胞の発生機構の解明と、それに基づく生殖細胞発生過程の試験管内再構成系の開発を、マウスおよびヒトに近いモデル動物としてカニクイザルを用いて行うという本研究の目的に対して、予想以上の進展を示し、次々と素晴らしい成果を挙げたと判断する。

以上を総合すると、本研究プロジェクトは優れた研究水準を示しており、戦略目標「疾患の予防・診断・治療や再生医療の実現等に向けたエピゲノム比較による疾患解析や幹細胞の分化機構の解明等の基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果が得られたと評価する。

## 1. 研究プロジェクトの設定および運営

### 1-1. プロジェクトの全体構想

本プロジェクトは、生殖細胞のエピゲノム制御機構をマウス、カニクイザルをモデルに解明し、ヒト生殖細胞における全能性獲得の制御基盤の理解に繋げるという非常に挑戦的かつ独創的な構想で研究を行った。アプローチも高度かつユニークであり、*in vivo* の研究における困難さを克服するために、*in vitro* における生殖細胞形成を再現する系を立ち上げたところに大きなブレークスルーがあった。これらを研究基盤とし、マウスにおける生殖細胞形成機構を明らかにし、ヒト生殖細胞を試験管内で再構成することにより、ヒト細胞のエピゲノム制御機構の解明、生殖工学への応用、さらにその異常による病態の理解に繋がることが期待される。同時にこの独創的な挑戦を実行するためのグループ編成と運営についてもバランスが取れていたと考えられる。

以上のことから、本プロジェクトの全体構想は独創性が高く、挑戦的であり ERATO にふさわしい研究であると高く評価する。

### 1-2. プロジェクトの目標・計画

マウスをモデルとして、生殖細胞発生機構の解明と試験管内における再構成と培養系の確立、カニクイザルを用いた霊長類における生殖細胞発生過程の解析とその過程におけるエピゲノム制御機構の解明、さらにヒト多能性幹細胞からヒト始原生殖細胞の誘導という一連の目標を立て、その目標を達成するために、1)マウス生殖細胞解析グループ、2)サル生殖工学開発グループ、3)サル初期発生機構解析グループ、4)生殖エピゲノム解析グループ、5)ヒト始原生殖細胞発生機構再構成グループという 5 つのグループを組織して各グループにおいて適切な研究計画を立案していた。目標設定は明確であり、その達成に向けた計画も妥当である。

以上、「生殖細胞の発生機構の解明」に向けて、適切な目標を掲げた計画であると評価する。

### 1-3. プロジェクトの運営

本プロジェクトでは5つの研究グループを設定し、特徴的なグループリーダーを選定しており、研究総括により十分かつ機能的にチームが束ねられ、研究の目標が明確化されていた。様々な専門性を有するメンバーとの強固な協体制、若手メンバーの活躍など、バランスの取れた強力な運営がなされたと評価される。若手研究者確保には問題ないと判断する。また、備品購入のための物品費、人件費など経費についても明らかな問題点は見いだされない。ただし、産業界・臨床との連携に関しては記載が乏しいが、今後この研究成果を基盤とした応用研究を行うときに重要となるものと考えられる。

以上、本プロジェクトでは適切にグループを設置し、効率良く運営した結果が成果に反映されたと高く評価する。

[研究プロジェクトの全体構想] [研究プロジェクトの目標・計画] [研究プロジェクトの運営]

a+ (十分に的確かつ効果的である)

## 2. 研究の達成状況および得られた研究成果

### 2-1. マウス生殖細胞解析グループ

このグループの特筆すべき成果は、マウス多能性幹細胞から試験管内で始原生殖細胞様細胞 (mPGCLCs: mouse Primordial Germ Cell Like Cell, マウス始原生殖細胞様細胞) を誘導し、ヌードマウス卵巣内への移植により卵母細胞へと分化させ、さらにこの卵母細胞から健全な産仔を得ることに成功した研究成果である。これは *Science* 誌の 2012 年 10 大ブレイクスルーに選出されたことから裏付けられる。上記の特筆すべき成果以外にも、転写因子による mPGCLCs の誘導など非常に多くの成果を上げており、これらの成果は世界的にも生殖細胞発生機構の研究に大きな影響を及ぼした。

多能性細胞から PGCLC を誘導する転写因子の組み合わせ (3 因子) を同定したが、これは、山中 4 因子に類する画期的な成果である。応用面だけでなく、PGC (Primordial Germ Cell, 始原生殖細胞) とはいかなる細胞なのかという観点からも非常に興味深い。PGCLC からの精子や卵子への分化誘導に関しては、世界をリードする成果を上げ、さらにそこから生殖細胞形成機構を培養系にて解析する手法を定着させ、それをを用いて生殖細胞形成過程における遺伝子発現動態などの解析や機能解析など非常にユニークな研究を展開し重要な知見が得られた。すなわち再構成卵巣の中では後期 PGC への移行が確認され、更にヌードマウスの卵巣に移植する事で誘導した卵母細胞を元に卵子が成熟し、受精を経て個体発生することを示した。この成果は生殖医療という観点からも大きなブレイクスルーであり、世界的に大きな反響を得た。いずれも技術的に再生医療に貢献する非常に新しい独自の知見となるという意味で社会的なインパクトが大きい。それと共に、それぞれのステップに関して最小限な条件を絞って行くことでメカニズムについて大きく理解が進みつつある。

倫理的問題にも関連する課題であるが、アウトリーチについては慎重かつ十分に、適切なバランス感覚をもって行われたと判断する。

### 2-2. サル生殖工学開発グループ

カニクイザルは、マーモセットなどの実験材料と比較しヒトに近縁であることから非常に優れた霊長類のモデル動物である。滋賀医科大学の動物生命科学研究センターにおいては、海外からカニクイザルを輸入し飼育するシステムを十分整えたことに加え、カニクイザルを計画的に室内 SPF (Specific pathogen free、特定病原体除去) で人工繁殖することに成功した。その上で、胚の安定供給やその他の解析に必要な実験手法の開発を行い、研究を効果的にサポート出来る体制を構築したことは評価できる。本グループの成果は単に本プロジェクト研究に貢献するのみでなく、日本における生殖細胞研究への貴重な材料の供給という意味でも意義があり、この領域の多くの研究に役立ててほしい。

### 2-3. サル初期発生機構解析

極めてオーソドックスなテーマでありながら、これまで十分に取組みられていなかったことについて、着実な知見の集積を行ったことの意味は極めて大きい。霊長類の始原生殖細胞の発生起源についてはこれまで報告がなく、世界に大きなインパクトを与える重要な成果である。

マウスの生殖系列細胞の遺伝子発現プロファイルと比較検討した結果、霊長類多能性幹細胞はマウス ES 細胞とマウス EpiSC (Epiblast Stem Cell, エピブラスト幹細胞) 細胞の中間の状態に位置づけられることを示した結果は iPS 細胞を用いた再生医療における品質管理やさらにナイーブなヒト iPS 細胞の作製に関連して非常に興味深い結果である。また、カニクイザルの生殖細胞発生過程における細胞動態や遺伝子発現変化を少数細胞から RNA 発現解析する手法 SC3-seq を開発し、カニクイザル着床前後の各ステージにおける胚の遺伝子発現解析を行ない、詳細に捉えることができたことは素晴らしい業績である。今後、マウスの PGC 形成機構との (シグナル分子の発現や機能など) 比較が期待される。同時に、マウスとサルの重要な相違が見いだされ、そのメカニズム等の探求という展開が生まれたことは素晴らしい。それぞれの制御機構が大変興味深い。

### 2-4. 生殖エピゲノム解析グループ

本グループは、少数細胞ならびに 1 細胞レベルでのトランスクリプトーム解析ならびにエピゲノム解析において世界を牽引する技術を持つが、今回は更に微量サンプル ChIP-seq 技術の開発を行った。この技術を mPCGLC 誘導系に適用し、ヒストン修飾ならびに鍵となる転写因子 (Blimp1, PRDM14, Tfap2c, T) の結合部位をゲノムワイドに記述し、その分化誘導過程におけるダイナミックな変化と転写との関係を明らかにした。生殖細胞が将来「多能性」を獲得する系譜であることから、ここで得られたそれぞれの結果は「生殖細胞とは何か」に繋がる知見であり、必ず将来大きな意義を持つてくる重要なものである。これらの情報を基に、ヒトを含む霊長類の生殖エピゲノムプログラミングの分子基盤の解明に繋げることを期待する。違う視点からエピゲノムの変化を捉えるのであれば、生殖細胞の発生過程においては非常にダイナミックに変化し、それらがその後の (次世代も含めた) 遺伝子発現を密接に関連することから、このエピゲノム修飾の integrity は分化する生殖細胞の品質を表す一つの指標と思われる。このような視点を基に、エピゲノム解析から生殖細胞の品質を評価できるのかなどの論議が今後期待される。

技術開発と科学的知見の取得がバランスよく行われ、極めて興味深い成果を創出した。今後も本プロジェクトのユニークな解析技術とユニークなマテリアルを用いて、多くの興味深

い知見が得られるものと大いに期待される

#### 2-5. ヒト始原生殖細胞発生機構再構成グループ

マウスおよびカニクイザルの研究結果を基にして、ヒト iPS 細胞からヒト PGCLCs を *in vitro* で誘導することに成功した。この誘導法はメカニズムの解明などにおいて、本プロジェクト研究の進展に貢献する非常に大きな成果であった。遺伝子発現プロファイルの解析等から、これはヒト初期 PGCs に相当する細胞と考えられるが、より成熟した後期 PGCs の試験管内での誘導という次の目標を達成するための重要な一步である。現段階ではまだ限定された iPS 細胞クローンでのみ成功しており、クローン間の誘導効率の差も大きい。より安定的な誘導方法の確立も重要な課題である。ヒト多能性幹細胞からヒト PGCLCs の試験管内の誘導に関しては競争が激しく、実際に英国のグループも同様の成果を報告している。

#### 2-6. プロジェクト全体

本プロジェクトのユニークなところは、マウス、ヒトのほかに、カニクイザルを用いることで、*in vitro* と *in vivo* で起こる事象を照らし合わせながら研究を進める戦略にあった。本プロジェクトでは、生殖エピゲノムの理解のため 5 つのグループを組織して研究を進め、各グループ共に非常に優れた成果を創出した。プロジェクト全体が有機的に連携しながら、生殖細胞の理解と関連する技術を前進させた。また、プロジェクト外の新規技術も柔軟かつ迅速に取り入れ、研究の中で適切に活用したことも高く評価される。マウスの *in vitro* の培養系及び次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析により、生殖細胞形成機構の理解が飛躍的に進んだことは、この研究プロジェクトの最大の功績であり、この分野に大きなインパクトをもたらした。生命の根幹である生殖細胞の発生機構の解明と、それに基づく生殖細胞発生過程の試験管内再構成系の開発を、マウスおよびヒトに近いモデル動物としてカニクイザルを用いて行うという本研究の目的に対して、予想以上の進展を示し、次々と素晴らしい成果を挙げた。マウス、カニクイザル、ヒトの発生機構の類似性と相違について俯瞰的に解析・考察することができる世界でも数少ない研究プロジェクトといえる。

2016 年度、2017 年度に発表された特筆すべき成果に関しては、高く評価できる。その中でも、マウス・サル・ヒトの多能性幹細胞の遺伝子発現比較は、ヒトへの研究発展の基盤となるもので、*in vitro* における生殖細胞形成過程における遺伝子発現解析へと継続されるべきものである。これにより、生殖細胞形成の種間における相違点を浮き彫りにし、医学分野への応用とともに、基礎研究分野の発展にも寄与する。この点に関しては、カニクイザル胚において PGC が形成される領域を特定した研究、ヒト PGCLC を *in vitro* で誘導するとき働く転写因子カスケードを明らかにした研究も高く評価できる。

*in vitro* gametogenesis 技術を真に確立・利用するために、マウス PGCLC から精子形成可能な GSC (Germline Stem Cell, 配偶子幹細胞) 様の細胞を誘導する技術、過剰染色体を持つマウス iPS から正常な遺伝子型の iPS を選択し、精子にまで分化させる技術 (国際共同研究により遂行)、エピゲノムリプログラミングまで可能なマウス PGCLC の培養増殖技術の確立に関する研究も高く評価できる。さらに、PGC からの雌性生殖細胞への運命決定機構に関する研究や生殖細胞形成過程におけるエピゲノム解析など基礎研究に資するものも多い。

医療や創薬への出口を求めて「ヒト細胞を用いた成果を示す」プロジェクトも多く見受

けられるが、本プロジェクトではしっかりと基礎的研究を行い、それを用いた発展的な研究の礎となることを目指したことを評価する。真に社会に貢献し得るレベルの科学を展開するためには、適切な動物を用いた研究の重要性は極めて高いことは言うまでもなく、本プロジェクトでは今後も引き続き、動物、とくにカニクイザルを用いた研究を重視し、ヒト細胞を用いる研究と対照しながら進めてゆくというスタイルを堅持していただきたい。予備評価段階でも多くの注目すべき成果を上げていたが、最終評価に至り、その期待を上回る高い成果が得られている。これには、研究総括の資質としてのラボ運営および研究ストラテジーに対する能力が遺憾なく発揮されたもので、称賛に価する。

〔研究の達成状況および得られた研究成果〕 a+（十分に高い水準にある）

### 3. 研究成果の科学技術、社会・経済への貢献

#### 3-1. 科学技術への貢献

ヒト多能性幹細胞の発生過程における位置付けやカニクイザル始原生殖細胞の発生機構に関して重要な新知見を生み出し、科学的に大きな貢献をした。基礎科学上のインパクト、国内外の先行・競合研究と比較した上でもずば抜けて優れ、国際的に高く評価される先導的・独創的なものであり、世界を牽引している位置にある数少ないグループの一つだと評価する。この成果を基盤として多くの分野へ貢献が期待される。本プロジェクトは短期的な社会実装が期待される研究がより重視される社会情勢の中で、本来科学者が担うべき仕事に注力しているという印象を強くうけるものであり、このような学問のあり方が目覚ましい成果を上げていることは、長期的な科学の発展のために大きく貢献するものである。

以上、本プロジェクトの研究成果はきわめて独創的、かつ先導的であり、国際的にも高く評価されるものである。従って科学技術に大きく貢献するものであると評価する。

#### 3-2. 社会・経済への貢献

マウスを用いた研究から、カニクイザルやヒトにおける生殖細胞形成機構へと軸足を移し、それらにおける生殖細胞形成機構を明らかにし、最終的にはヒトでの理解を進めることで、医療やモデル細胞の創出による創薬などの分野へと発展が可能と考える。本プロジェクトの成果は不妊治療、生殖関連疾患の治療・診断に大きく貢献する可能性があり、社会的な関心を集めている。大きな経済的貢献に将来繋がる可能性もあるなど、現時点で必ずしも想定しえない大きな社会・経済への貢献が生まれる可能性を有しているものと考えられる。特にエピゲノム解析に欠かせない微量 ChIP-seq 法はプロジェクト前半で、1 細胞由来の微量 (1ng) total RNA からトランスクリプトーム解析を供する SC3-seq 法は、生殖細胞の分化過程の体系化と種の違いを分析する上で有効な技術で、知財化も図られた。これらの技術は、幅広く活用されており、注視される成果である。

ゲノム編集技術の進歩により、最新の技術を活用すれば、我々はこれまで不可能だった研究も行うことが出来るようになった。こうした技術を活用して進められた当該プロジェクトの目標は、生命の萌芽とも言える生殖細胞の神秘を解明し、試験管の中で再現することを目指したものであるが、生命倫理面での議論をよぶ事は避けがたい課題である。生命の真理を探究するには、社会に受け入れられる事が重要で、研究総括自らこれらの課題に正視し、社会に向けて提言を発信した (Trends in Molecular Medicine 2017)。しかしながら、これら

の課題は、医療技術の発展を待ち望む人々と医療に携わる医師、研究者の間だけでは解決できない問題を含んでいる。一方、この分野の商業目的での利活用は、海外中心に拡大することが予想されるが、生命倫理と安全性という観点からも、堅実な研究と着実な技術進歩が重要である。その為にも、官民によるこの分野の継続的研究支援を切望する。

〔科学技術への貢献〕〔社会・経済への貢献〕 a+（十分な貢献が期待できる）

#### 4. その他特記すべき事項

##### 4-1. 若手研究者支援

本プロジェクトに参加した若手研究者は飛躍的な活躍をしており、国内外での学会発表や筆頭著者として多くのトップジャーナルにおける論文の成果発表が認められる。また、学生などのプロジェクト参加があり、若手支援が考慮されたと推察される。特にトランスクリプトーム解析やエピゲノム解析など膨大なデータから有用な情報を得るバイオインフォマティクスの解析とウェットの実験ができる若手研究者が育成されていると判断した。

##### 4-2. アウトリーチ活動

アウトリーチ活動を含め社会への貢献に関しては、公的・私的機関において、また新聞報道などのプレスリリースにおいて、本プロジェクトの成果や生殖細胞を誘導する研究の現状と展望について発信を行った。さらに、特許出願も継続的に行っており、社会・経済への貢献が認められた。特に、ヒトにおける *in vitro* gametogenesis は、生殖医療などの医療分野において期待が非常に大きく、科学技術イノベーションに大きく寄与すると容易に予想できるが、克服すべき技術的な問題点や倫理的問題など具体化までに長い道のりが続く。この点を真摯に、論文や総説などを媒体として、発信している点も評価できる。報告書にも記載されている通りに、「応用に向けての具体的なロードマップを記すのは時期尚早である」。この言葉に、研究総括の応用に向けての意欲と、基礎科学を見据える真摯な科学者としての意思が感じられる。

#### 5. 総合評価

本プロジェクトは継続的に質の高い学術論文を発表しており、専門分野のみならず多くの科学分野に大きなインパクトを与えてきた。近年の大型プロジェクトの中でも極めてインパクトの高いものであり、科学の進歩、社会への貢献についても高く評価できる。「科学技術の源流をつくり」「社会・経済の変革をもたらす」という ERATO の目的を達成しうる、卓越した研究が本プロジェクトでなされている。本プロジェクトの成果と近年のゲノム編集技術の急激な進歩により、生殖細胞に対する遺伝子操作への関心が益々高まっていくと考えられる。本プロジェクトの研究者は、この分野をリードするエキスパートとして、倫理観と科学的根拠を基に本分野の議論を正しい方向に導いて欲しい。本プロジェクトで創出された研究成果は、世界の基礎生命科学および再生医療の基盤研究の分野全体の中で、この数年における代表的なものと言って良い。種の起源とその継承の根源である生殖細胞の成り立ちについて、マウスーサルーヒトについて体系的にかつ緻密に解析・研究された当該プロジェクト

の成果は、今後の基礎学問体系の礎となるものと期待され、また医療、創薬、育種等での活用可能な優れた知見と技術が蓄積されており、ERATO の目的・課題に十分答える成果が得られたと判断する。日本が誇る研究成果であり、ERATO 制度の成功例として今後も輝くこととなるであろう。

以上、総合的に判断すると、本プロジェクトは卓越した研究水準を示していると認められ、戦略目標「疾患の予防・診断・治療や再生医療の実現等に向けたエピゲノム比較による疾患解析や幹細胞の分化機構の解明等の基盤技術の創出」の達成に資する十分な成果が得られたと評価する。

〔総合評価〕 A+（戦略目標の達成に資する十分な成果が得られた）

以上