

ERATO 齋藤全能性エピゲノムプロジェクト事後評価（予備評価）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）
小林 悟（委員長；筑波大学 生命領域学際研究センター／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）
中西 淳（武田薬品工業株式会社／主席部員）

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ている。

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っており、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ている。

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卵子も高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、幅広い研究を行っている。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 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ている。

プロジェクトが発足して以降、発表論文 23 報（Nature, Cell Stem Cell, Science 等を含む）、特許出願 3 件、書籍・総説 15 報、学会発表 105 件（27 件の海外招待講演を含む）、新聞記事 39 件など順調に成果を挙げている。論文発表に関しては、極めて質の高い論文を出し続けており、まさに世界をリードしている。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

かなど）に参加させるなどのキャリアパス支援も行われている。また、齋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でいる。

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」に資する十分な成果が得られていると評価する。

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行っている。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る。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ると考えられる。

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る。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る。様々な専門性を有するメンバーとの強固な協同体制、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ていると評価される。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する。

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。

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）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の他にも、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ている。

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 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ている。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ている。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ミニマル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。in vitro の系で明らかになりつつある生殖細胞の形成機構が、in vivo の現象を（トランスクリプトームなどを観察することによって）大筋において mimic できていると考えられるが、どの程度 in vitro と in vivo の発生過程が同じであるのかを確認しつつ進めるべきと考える。

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ている。知財確保の点において、本研究から創出された様々な成果が余すことなく有効に知財化されているか否かは報告書やヒアリングからは十分に読み取ることができなかった。この点については十分に留意し、知財担当者との緊密な連携が図られることが望まれる。

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が十分整えられていることに加え、カニクイザルを計画的に室内 SPF で人工繁殖することに成功し、安定供給体制の構築にて進展を見せている。カニクイザルを実験材料として、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点は非常にすばらしい。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。

アウトリーチ活動については、動物愛護の観点等から、デリケートな問題を孕むが、今後、本プロジェクトの霊長類の部分に関する論文がアクセプトになるなどすれば、その中で重要な意義をもつサルを用いた実験についても、一般に公表せざるを得ないことから、早期よりサルを用いる研究の意義についての啓発活動が検討されるべきかもしれない。本グループが開発した技術で、知財取得の可能性のあるものがないか、十分な検討がなされることが望まれる。

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、これまで十分に組み込まれていなかったことに

ついて、着実な知見の集積を行っていることの、生命科学上の意義は極めて大きい。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 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、今後、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。

前項のサル生殖工学グループに関しても述べたのと同じく、アウトリーチを戦略的に行う必要があるだろう。知財戦略については、今回の報告からは十分に読み取ることができなかったが、適切な取り組みが望まれる。

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 技術の開発を行なった。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っ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リ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ている。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大いに期待される。知財戦略については、今回の報告からは十分に読み取ることができなかったが、適切な取り組みが望まれる。

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、今後の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る。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歩である。現段階ではまだ限定された iPSC 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績を報告している。

このグループでは機能的な生殖細胞にまで分化可能な系の構築まで視野に入れているように思われる。この点は、医療を視野に入れるときに重要と思われるが、マウスにおいても生殖腺を構

成する体細胞の働きを借りなければ機能的な生殖細胞には分化できない。このヒトの生殖腺を構成する体細胞はどのように調整するのが今後の課題となるであろう。英国ではヒト胎児組織の利用が可能とのことであるが、カニクイザルの生殖細胞系の制御機構解析という本プロジェクトの独創性と利点を最大限活用し、ヒト後期 PGCLCs の試験管内誘導に関して世界との競争に打ち勝っていただきたい。目標達成に向けて順調に進捗しており、今後の発展も期待されるが、倫理的な問題に関しても十分に議論され事を望む。

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ているという戦略にある。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てきた。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ている。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ている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ている。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。

細胞質のゲノム、すなわちミトコンドリアのゲノムの *integrity* やコピー数など、マウスにおける *in vitro* の生殖細胞形成により得られる生殖細胞の品質に関しても今後研究の対象とすべきではないだろうか。細胞質ゲノムはサルや人への応用を目指す上で重要な視点となると思われる。また現時点において、本プロジェクトで用いられるマテリアルの中で唯一のミッシング・ピースと思われるのは、カニクイザルのナイーブタイプの多能性幹細胞であろう。今後、樹立・解析等の検討を行う必要があると思われる。

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すべきであろう。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。

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見を生み出し、科学的に大きな貢献をしている。基礎科学上のインパクト、国内外の先行・競争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・独創的なものである。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され、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だと考えられる。しかし、その場合は、倫理的な問題をも含めて、どのような点を解決する必要があるのか、そのための方策などロードマップを示して、その発展の可能性を論議すべきであろう。

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、筆頭著者として多くのトップジャーナルへ論文が掲載もしくは投稿中となっている。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ように見受けられる。しかし、若手人材育成の具体的な成果についてはやや見えにくい面があった。これら若手研究者は、今後の本研究分野だけでなく、多くの生物学の研究において重要なポジションを占めると考えられるので、若手研究者のキャリアパスとして本プロジェクトが機能したかについては、プロジェクト終了後にフォローすべき点である。

4-2. アウトリーチ活動

アウトリーチ活動については、多くのメディアからの取材対応などを通じ、研究内容の紹介をうけている。サルを実験に用いることや、ヒト細胞での成果など、今後世に出ることがほぼ確実な内容についてのアウトリーチについて、早期から戦略的に進めてゆくことが望まれる。研究代表者のアウトリーチ活動については多数の講演やメディア報道数など十分であったと評価できるが、若手研究者のアウトリーチ活動についてさらに積極的にサポートすることを期待する。

5. 総合評価

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。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ると評価する。

以上