



## 1. 研究実施内容

### 1-1. 研究実施の概要 公開

丹羽グループは、エピジェネティックランドスケープに寄与すると考えられるエピジェネティック修飾酵素をコードする遺伝子の誘導型ノックアウト ES 細胞の作成を行った。本年度は、ヒストン H3K9 メチル化に関わる Setdb1/Eset と G9a、H3K27 メチル化に関わる Eed、DNA メチル化に関わる Dnmt3a について、それぞれ誘導型ノックアウトベクターを作成し、これらをマウス ES 細胞に導入し、最終的に誘導型ノックアウト ES 細胞を樹立した。これらのうち、Setdb1/Eset、G9a、Dnmt3a については、誘導型ノックアウト ES 細胞がキメラ形成能を保持していることを確認した。また、Dnmt3b についても誘導型ノックアウトベクターを作成し、現在誘導型ノックアウト ES 細胞の樹立を進めている。

洪グループは、「ES-TS 分化転換のトランスクリプトーム解析とこれに関わる転写因子の機能解析」という研究題目を担当している。平成 25 年度は、ヒトでの ES-TS 分化の最有力候補である CDX2 を自在に強制発現できるヒト ES 細胞 (tetCDX2-hESC) を作製した。ドキシサイクリン (Dox) で誘導後、48 時間後、72 時間後には、未分化のヒト ES 細胞と明らかに異なる細胞形態になっていることを観察した。また、この形態は、マウスの ES 細胞で Cdx2 を誘導した時に観察されるような栄養外胚葉細胞とは異なっていることを認めたが、細胞の種類について判定することはできなかった。そこで、RNA-Seq 法にて詳細なトランスクリプトーム解析を行った。その結果、2 倍以上発現に差のある遺伝子に注目すると、Dox 誘導後 72 時間後で、610 個の遺伝子の発現が増加し、627 個の遺伝子の発現が減少していることがわかった。発現が上昇している遺伝子のリストの中に、明らかに胎盤・栄養外胚葉に特異的に発現している遺伝子は認められず、それ以外の細胞に分化していると考えられた。また、我々がすでに樹立している 137 個の転写因子を人工的に誘導できるマウスの ES 細胞株の網羅的解析から、胎盤組織 (栄養外胚葉幹細胞) の遺伝子発現パターンが似ている 21 個の転写因子 (Cdx2 を含む) を同定した。

田中グループは、「ES-TS 分化転換におけるエピゲノム変化:DNA メチル化プロファイル解析」を担当する。DNA メチル化解析に限らず、ES-TS 分化転換過程のエピゲノム解析を行う際、フィーダー細胞の混入が大きな問題となる。マウス TS 細胞は、フィーダー細胞である胎仔繊維芽細胞 (MEF) そのものではなくその培養上清 (MEF-CM) を用いることでも継代維持することが出来る。しかし MEF-CM は初代培養細胞を用いるためロット間の差異が大きく、ロットによっては TS 細胞の未分化維持因子である FGF4 様の活性を含むことも経験的に判明している。

田中グループは、フィーダーや、同じくロット間差異の大きい血清に頼らない TS 細胞の維持条件を探索し、血清代替品 (Knockout Serum Replacement, KSR) と適切な細胞外基質、およびその他の因子を組み合わせることで増殖能を維持できることを見いだした。平成 25 年度は、TS 細胞無血清培養条件の ES-TS 分化転換への適用が可能かどうかを判断するために、まず無血清条件で維持したマウス TS 細胞の遺伝子発現を網羅的に解析し、通常血清条件で維持した mTSC のそれと比較した。その結果、マウス TS 細胞マーカーである Cdx2 や Eomes などに有意な発現の違いは認められず、全遺伝子発現パターンが維持されていることが確認できた。無血清条件で維持した TS 細胞も FGF4 を除くことで分化が誘導され、さらに、キメラ作製実験により胎盤への特異的な寄与が認められた。すなわち、本無血清条件でも TS 細胞の分化能は維持されていることが明らか

かとなった。現在、本条件を適用した ES-TS 分化転換の検証を行っている。

本共同研究プログラムの大きな目的の1つは、ヒト TS 細胞の樹立である。これまで、ヒト胚盤胞からの TS 細胞樹立の報告は無い。ヒト以外の霊長類胚由来細胞の樹立とその性状解析からヒト胚由来 TS 細胞樹立に重要な情報が得られるものと期待されるが、これまでアカゲザル胚盤胞から低酸素条件で TS 様細胞が樹立されたとの報告が1例あるのみで、しかも分化能に関し十分な解析が成されているとは言い難い。またこの細胞は、マウス TS 細胞と異なり、FGF への依存性はない。当初研究計画に記載していなかったことであるが、平成25年度に京都大学および滋賀医科大学の協力を得てカニクイザル胚盤胞を入手することが可能となったため、カニクイザル胚由来細胞株樹立の試みを開始した。マウス TS 細胞樹立条件を適用した結果、これまでに、継代維持が可能な細胞株を1ライン得ている。この細胞は上皮様のコロニーを形成し、FGF4 により増殖が促進される。今後、新たな胚盤胞をもちいて樹立の再現性を確認するとともに、得られているラインについてその細胞種の同定や分化能の有無の解析などを行う予定である。

研究交流として、丹羽、田中はそれぞれ独立にトロントを訪問し、Dr Rossant との議論を行った。また、平成 25 年 8 月 1 日には慶応大学に日本側メンバーが集まり、研究実施のための打ち合わせを行った。平成 26 年 1 月 17 日には慶応大学で日本側・カナダ側全メンバーが集まり、これまでの成果を報告するとともに、今後の全体方針について議論した。

## 2. 研究実施体制 公開

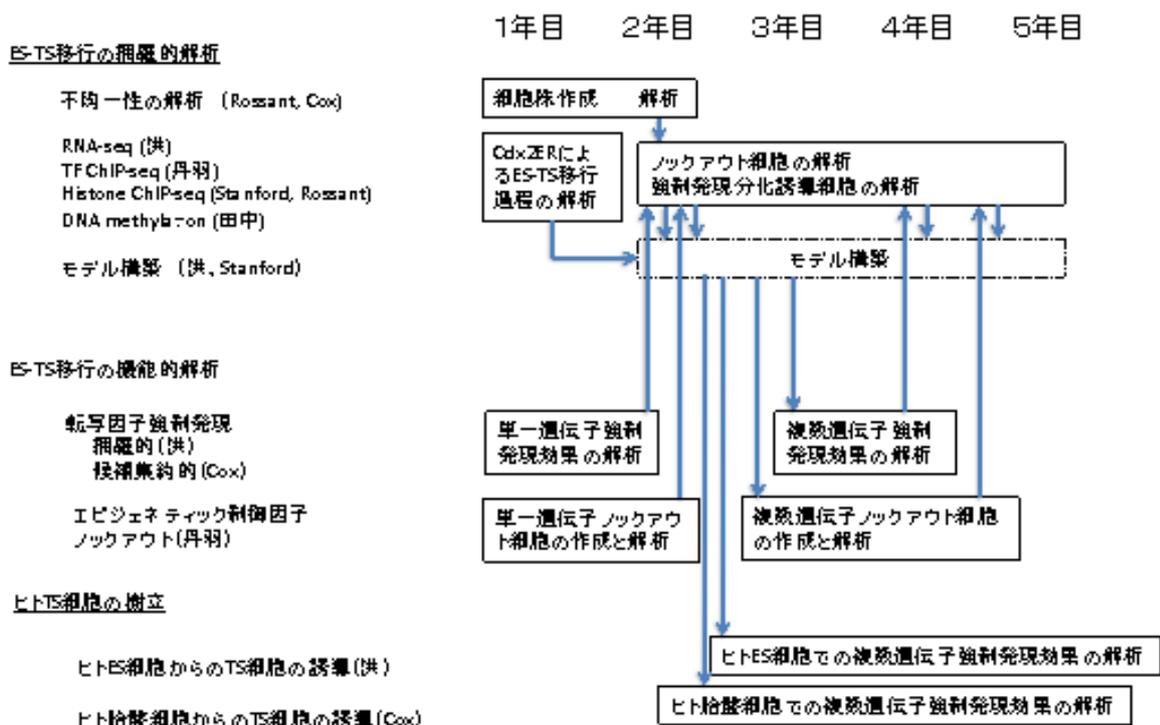
### 2-1. 日本側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	丹羽 仁史	独立行政法人 理化学研究所	多能性幹細胞 研究プロジェクト	プロジェクト リーダー
主な共同研究者	洪 実	慶應義塾大学	システム医学 講座	教授
主な共同研究者	田中 智	東京大学	大学院農学生命 科学研究所	准教授

### 2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	Janet Rossant	The Hospital for Sick Children	Developmental and Stem Cell Biology	教授
主な共同研究者	William Stanford	Ottawa Hospital Research Institute	Sprott Centre for Stem Cell Research	教授
主な共同研究者	Brian Cox	University of Toronto	Dept of Physiology	准教授

### 2-3. 両国の研究実施体制



3. 原著論文発表 公開

3-1. 原著論文発表

① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	( 0 件)
国際誌 0 件	( 0 件)
計 0 件	( 0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

② 未発行論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	( 0 件)
国際誌 0 件	( 0 件)
計 0 件	( 0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る