

2023 年度年次報告書

多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出

2019 年度採択研究代表者

永樂 元次

京都大学 医生物学研究所

教授

遺伝子制御ネットワークの理解に基づく臓器創出技術の開発

主たる共同研究者:

望月 敦史 (京都大学 医生物学研究所 教授)

遊佐 宏介 (京都大学 医生物学研究所 教授)

## 研究成果の概要

今年度は、咽頭弓に似た構造をヒト多能性幹細胞から誘導する手法を開発し、誘導された組織が BMP およびエンドセリンシグナルにより、上顎・下顎への選択的な誘導が可能であることを示し、Nature Communications 誌に掲載された (Seto et al. Nat Comm 2024)。また、ヒト多能性幹細胞の培養に適したハイドロゲルを開発し、その形状および硬さを光を用いて制御することで、空間的な分化パターンを作り出すことに成功した。この成果は Development 誌に掲載された (Wnag et al., Development 2024)。さらに、これまでに開発した遺伝子ネットワークを推定する新しい手法を用いて推定された FVS 遺伝子の発現操作により遺伝子発現ネットワークダイナミクスの制御が可能かどうか検証するため、多遺伝子発現操作 CRISPR-a/i ツールの開発、および検証実験を実施した。7つの遺伝子に対し最適の gRNA を搭載したレンチウイルスベクターを作製し、CRISPR-a/i システムを導入した iPS 細胞に発現、経時的サンプリングを行ない single-cell RNA-seq 解析を実施した結果、脊索中胚葉誘導を予測した制御において実際にマーカー遺伝子を発現する細胞群を誘導することに成功した。この single-cell 解析から 7 遺伝子の同時制御時には予備検討時ほどの制御効率を得られない gRNA が見られたが、多因子制御下でも高効率に機能する gRNA に置換することで脊索中胚葉マーカーの発現がより亢進する結果も得た。さらに、分化過程での細胞の遺伝子制御ネットワークの推定を目的として、胚性内胚葉分化に関わる遺伝子を CRISPR スクリーニングで同定している。現在、これらの遺伝子がどのように胚性内胚葉分化に関わっているか解析中で、今後 single-cell CRISPR 解析を実施し GRN の推定を進めていく。

### 【代表的な原著論文情報】

- 1) Mochizuki A., Controlling complex dynamical systems based on the structure of the networks. *Biophysics and Physicobiology*, 20(2): e200019 (2023)
- 2) Ishikawa M, Sugino S, Masuda Y, Tarumoto Y, Seto Y, Taniyama N, Wagai F, Yamauchi Y, Kojima Y, Kiryu H, Yusa K, Eiraku M, Mochizuki A., RENGE infers gene regulatory networks using time-series single-cell RNA-seq data with CRISPR perturbations, *Commun Biol*, 6, 1290, (2023).
- 3) Hishida A., Okada T., Mochizuki A., Patterns of change in regulatory modules of chemical reaction systems induced by network modification. *PNAS Nexus*, 3(1): pgad441 (2023)
- 4) Seto Y, Ogihara R, Takizawa K, Eiraku M., In vitro induction of patterned branchial arch-like aggregate from human pluripotent stem cells. *Nat Commun.*, 15(1):1351 (2024)
- 5) Wang Z, Numada A, Wagai F, Oda Y, Ohgushi M, Maki K, Adachi T, Eiraku M. Spatial cell fate manipulation of human pluripotent stem cells by controlling the microenvironment using photocurable hydrogel. *Development*, 151(6): dev201621 (2024)