

永樂 元次

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
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

§ 1. 研究成果の概要

過去数十年間の遺伝学および発生生物学的知見の蓄積により、脊椎動物の個体発生に関与する膨大な数の遺伝子リストが得られた。しかしながら、これらの遺伝子間の関係性を表す制御ネットワークについては依然としてその全貌は不明である。ヒトの発生過程を制御する遺伝子ネットワークを知ることは、試験管内で個体発生を再現し機能的な臓器を ES/iPS 細胞などの多能性幹細胞から作製するために重要である。また作ることで初めて到達する理解のレベルというものもあるので、試験管内で臓器を作ることは発生生物学の一つの到達点であるが我々はまだその段階にいない。

我々の研究グループはヒト多能性幹細胞からの各胚葉への分化誘導系と 1 細胞 CRISPR スクリーニング技術を組み合わせることで、ヒト初期発生を制御する網羅的な遺伝子制御ネットワークを明らかにすることを目的としている。

上記の目的を達成するために、初年度である本年度は以下の3つの項目の研究を行った。

1) ヒト ES 細胞から各組織への均一な分化培養系の構築

均一な培養をするためには初期条件を揃える必要がある。マイクロパターン技術を用いて細胞数とコロニーの初期形状を揃えることで均一な培養を実現した。本手法を前脳神経組織、網膜神経組織、プラコード組織、神経堤前駆組織、原始線条組織へのヒト ES 細胞からの誘導に適用し、ほぼ全ての細胞がこれらの細胞へと分化する技術を確立した。

2) ヒト ES 細胞からの分化培養系に適した 1 細胞 CRISPR スクリーニング系の構築

1 細胞 CRISPR スクリーニング系の確立に必要な基礎データを取得するため、幹細胞維持に関わると考えられる 48 遺伝子 (既知遺伝子及び他にスクリーニングにより同定された遺伝子) に対し 2 ガイド RNA を設計し、ライブラリー化した。Cas9 発現 iPS 細胞に対しライブラリーを導入し、3、4、6、8 日後に感染細胞を回収し、1 細胞 RNA-seq サンプルを作製、次世代シーケンサー解析を行った。データ解析の結果、1 細胞ごとのガイド RNA とトランスクリプトームによる表現系の妥当な関係性があることを確認し、基本的な 1 細胞 CRISPR スクリーニング系が確立できた。

3) scRNAseq データから制御ネットワークを推定するための新たな統計的手法の開発

本課題では、1 細胞 CRISPR スクリーニング系における 1 細胞 RNA-seq データから、遺伝子制御ネットワークを推定するための統計的手法の開発を行う。初年度は、手法の骨格となる基本アイデアを確立し、具体的なアルゴリズムの開発に取り掛かった。実際のデータを解析する前段階として、

仮想的なネットワークを用いて仮想的な遺伝子摂動－発現応答データを作成し、このデータを解析することでアルゴリズムの開発を進めることを考えている。人工的なデータを対象とすることで、ネットワークの構造などの条件を様々に変えた場合を試すことが可能となる。これによりネットワーク推定の手法の信頼性を高める。

§ 2. 研究実施体制

(1) 永樂グループ

- ① 研究代表者:永樂 元次 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)
- ② 研究項目
 1. 網羅的スクリーニングによるヒト初期発生過程の細胞状態を制御する分子ネットワークの解明(遊佐グループと共同)
 2. ネットワーク構造に基づく分化ダイナミクスの解明と制御点の予測(望月グループと共同)
 3. 自己組織化と局所制御を組み合わせたヒト初期発生過程の再現技術の開発

(2) 望月グループ

- ① 主たる共同研究者:望月 敦史 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)
- ② 研究項目
 2. ネットワーク構造に基づく分化ダイナミクスの解明と制御点の予測

(3) 遊佐グループ

- ① 主たる共同研究者:遊佐 宏介 (京都大学ウイルス・再生医科学研究所 教授)
- ② 研究項目
 1. 網羅的スクリーニングによるヒト初期発生過程の細胞状態を制御する分子ネットワークの解明