

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

2022年度  
年次報告書

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

本年度は、ヒト多能性幹細胞から顔面組織発生を再現する誘導系の開発に取り組み、咽頭弓様組織を効率的に誘導することに成功した。誘導された咽頭弓様組織は FGF、BMP 及びエンドセリンシグナルに応答し、初期の顔面形成過程と同様のマーカー遺伝子発現パターンを再現した。また、ヒト多能性幹細胞からの脊索誘導系に適した光硬化性ハイドロゲルによる物理的拘束条件の効果について検討した。その結果、初期胚に見られる様な1本の脊索様構造を持つ組織の誘導に成功した。さらに、前年度までに開発した CRISPR スクリーニングを用いた遺伝子制御ネットワーク推定技術に分化系に応用した。具体的には、前年度までに実施したヒト iPS 細胞の胚性内胚葉への分化に関与する因子の CRISPR スクリーニングから得られた候補のうち、既知の分化必須遺伝子群 (Activin 経路等5遺伝子)、及び、新規を含む分化抑制遺伝子群 (21 遺伝子) を選抜し、一細胞 CRISPR スクリーニング用ライブラリーを作製した。ヒト ES 細胞株 2 株を用いて、分化前後で一細胞 CRISPR スクリーニング解析を実施した。初期のデータ解析では、特に分化抑制遺伝子の欠損により分化マーカーを強く発現する集団が検出され、スクリーニング系が機能していることが示唆された。また、ヒト ES/iPS 細胞の多能性維持に関して推定した遺伝子制御ネットワークと制御点 (FVS) の検証実験のために、同一細胞内において複数の遺伝子の発現誘導と発現抑制を同時に可能とする遺伝子制御システムを CRISPR-a/i を改変することにより構築した。この過程で既存の CRISPR-i システムに改良を加え更に効率よく発現抑制が誘導できる系とした。さらに、推定されたネットワークにおいて、鍵因子 FVS は複数の選び方があり得たが、ヒト初期胚の scRNA-seq データを用いて、三胚葉分化時における外胚葉、内胚葉、中胚葉の発現の違いを最もよく捉える FVS を探索する方法を開発した。さらにその FVS を操作することで、効率よく細胞種を誘導する操作法を決定した。

### 【代表的な原著論文情報】

1) Delamination of trophoblast-like syncytia from the amniotic ectodermal analogue in human primed embryonic stem cell-based differentiation model, Ohgushi, M., Taniyama, N., Vandenbon, A., Eiraku, M., Cell Rep, 39,12, 110973, 2022