

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「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」

研究終了報告書

研究期間 2019年10月～2025年03月

研究代表者：永樂 元次
(京都大学 医生物学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

本研究は、ヒト多能性幹細胞(hPSC)の分化系を用いてヒト初期発生の制御ネットワークを網羅的に解明し、細胞状態予測と精緻な制御技術の開発を行うことで、新たな臓器創出技術を創出することを目的とした。ヒト初期発生の遺伝子制御ネットワークを解明するためには hPSCからの各細胞状態への効率の良い分化誘導系と、遺伝子発現の相関ではなく因果関係を含んだ情報からのネットワーク構造の推定手法およびその制御方法を開発する必要がある。本目的のために、永樂グループは hPSC から体軸組織 (notochord) および咽頭弓組織や嗅上皮組織など、これまでに誘導法が確立していない複数の組織の誘導法を新たに開発した (Seto et al., Nat Comm 2024, Kuroda et al., submitted, Muramoto et al., Nat Comm in revision)。また、分化誘導を局所制御するための新たな細胞足場材料を開発した。遊佐グループは hPSC 培養系に最適な 1 細胞 CRISPR 解析法 (scCRISPR-seq) を確立すると同時に、複数遺伝子の発現を正および負に同時に制御するための技術を開発した。また、望月グループは遺伝子摂動後の発現時系列データから、遺伝子制御ネットワークを推定する新規手法 RENGE を開発した。この手法は、摂動の影響がネットワーク上を段階的に伝播していく過程を、時間発展として捉える推定アルゴリズムに特徴がある。これにより、遺伝子摂動の直接的影響と間接的効果を区別して捉えることが可能となった。この方法は、ヒト iPS 細胞に適用され、未分化性維持に重要な 103 遺伝子を含む遺伝子ネットワークが推定された。これにより、発生生物学における過去数十年にわたり蓄積された知見を、わずか 1 回の実験データから再現することに成功した。また、これまでに知られていない多能性ネットワークの新規コア因子を同定した (Ishikawa et al., Comm Biol 2023)。さらに、推定された遺伝子ネットワークから決定される feedback vertex set (FVS) (回帰頂点集合) を操作することで、これまでには効率的な誘導が難しいとされていた、notochord の細胞をヒト多能性幹細胞から誘導することに成功した。また、RENGE の分化系への応用が可能であることをさらに実証するために、本手法を頭部神経堤細胞への分化系に適用し、ヒト神経堤細胞分化誘導の遺伝子制御ネットワークを明らかにした。これらの結果は、本プロジェクトにより確立された、ヒト発生遺伝子制御ネットワーク推定とその制御を含む新たな方法論がヒトの細胞状態の制御に有効であることを示すものであり、当初の目的の大部分が期間内に達成されたといえる。今後は、新しい制御法による分化誘導を含むデータをまとめて、インパクトのある論文として発表し本プロジェクトの成果にしたい。

(2) 顕著な成果

< 優れた基礎研究としての成果 >

1. ヒト多能性幹細胞から脊索を含むオルガノイドの誘導およびその系譜解析

概要:これまでにヒト多能性幹細胞から脊索を含む初期発生を再現できる分化誘導法は報告されていなかった。我々は、新規の3次元培養法を開発することで、脊索を30%の効率で誘導できる新たな培養条件を同定した。本手法では 7 日以内に node の細胞が誘導され、その後、この細胞は Brachyury / Shh を同時発現する notochord へと分化する。さらに、その細胞を単離し、系譜を解析したところ、神経管の floor plate の細胞へ高い割合で分化していたことが明らかとなった。この結果は、マウスと異なりヒトの node は notochord だけでなく floor plate の細胞の原基としても働くことを示唆している。

2. 複数遺伝子の両方向同時遺伝子発現操作系の確立

概要:通常の遺伝学的解析では、一つの着目遺伝子に対し遺伝子摂動 (抑制または活性化) を行う。本研究では、Linkage logic により提案された複数の FVS (回帰頂点集合) に該当する遺伝子を摂動操作する必要があり、また摂動すべき方向も正負が混在する。このため CRISPR-activation と CRISPR-interference を最適化し、これを同一細胞内で使用できるよう新たな CRISPR-a/i システムを開発し実用化した。

3. 細胞の化学反応システムからの細胞機能制御を理解するためのツール開発

概要:反応ネットワークの部分構造があるトポジカルな基準を満たす「緩衝構造」であるとき、パラメータ変化の影響がその部分構造内部のみに限局し、外部には伝わらないことを示した「限局則」に対して、その逆が成立することを証明した。これにより、外部シグナルの影響が定常状態ではシステムの一部にしか反映しない、Perfect adaptation のような振る舞いが観測される場合には、必ずシステム中に対応する緩衝構造が存在することが示された。つまり振る舞いの観測だけで、反応ネットワークの構造の絞り込みが、原理的に可能であることを示した。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. ヒト多能性幹細胞から咽頭弓への分化誘導法の開発

概要:ヒトの顔面を形成する顎骨や歯、頭骨などは、頭部神経堤に由来する咽頭弓から発生する。その発生過程は複雑で、未知な部分が多い。我々は初めてヒト咽頭弓の発生を再現できるオルガノイド技術を確立した。本手法を用いてヒト多能性幹細胞から誘導された組織は、上顎および下顎のパターン形成を再現し、また下顎特異的な組織であるメッケル軟骨の誘導も可能にした。この技術は、顔面形成の発生過程を解析する新たなツールとなるだけでなく、顔面形成異常の病態解明に寄与することが期待される。

2. ヒト多能性幹細胞から内胚葉系への分化効率の向上

概要:ヒト多能性幹細胞から作り出される内胚葉系細胞は肝細胞、膵臓ベータ細胞、肺上皮細胞等多種に渡る。再生医療への応用も考えられている細胞種であるが、その分化効率はヒト多能性幹細胞の株間のばらつきが大きい。CRISPR スクリーニングによって内胚葉分化に関わる因子を同定し、低分子化合物を使った効率の良い分化系を構築することができた。

3. 摂動を与えた遺伝子の発現変化を計測した時系列データから、遺伝子制御ネットワークを推定する新規手法(RENGE)の開発

概要:遺伝子に網羅的に摂動を与え、その後発現変化を計測した時系列データから、遺伝子制御ネットワークを推定する新規手法 RENGE を開発した。この手法は、摂動の影響がネットワーク上を段階的に伝播していく過程を、時間発展として捉える推定アルゴリズムに特徴がある。これにより、遺伝子摂動の直接的影響と間接的効果を区別して捉えることが可能となった。この方法をヒト iPS 細胞に適用し、未分化性維持に重要な 103 遺伝子を含む遺伝子ネットワークを推定した。発生生物学における過去数十年の知見の蓄積を、わずか 1 回の実験データから再現した。

＜代表的な論文＞

1. Seto Y, Ogihara R, Takizawa K, Eiraku M. (2024) In vitro induction of patterned branchial arch-like aggregate from human pluripotent stem cells. Nat Commun. Feb 14;15(1):1351

概要:ヒトの顔面を形成する顎骨や歯、頭骨などは、頭部神経堤を由来にする咽頭弓から発生する。その発生過程は複雑で、未知な部分が多い。我々は初めてヒト咽頭弓の発生を再現できるオルガノイド技術を確立した。本手法を用いてヒト多能性幹細胞から誘導された組織は、上顎および下顎のパターン形成を再現し、また下顎特異的な組織であるメッケル軟骨の誘導も可能にした。この技術は、顔面形成の発生過程を解析する新たなツールとなるだけでなく、顔面形成異常の病態解明に寄与することが期待される。

2. Daniel F. Kaemena, Masahito Yoshihara, Meryam Beniaffa, James Ashmore, Suling Zhao, Mårten Bertenstam, Victor Olariu, Shintaro Katayama, Keisuke Okita, Simon R. Tomlinson, Kosuke Yusa & Keisuke Kaji (2023) B1 SINE-binding ZFP266 impedes mouse iPSC generation through suppression of chromatin opening mediated by reprogramming factors. Nat. Commun. 14:488

概要:CRISPR スクリーニングをマウス線維芽細胞の iPS リプログラミングに適用し、必須あるいは阻害遺伝子を複数同定した。うち阻害因子 ZFP266 は SINE に結合する転写抑制因子であり、リプログラミングに伴い起こるクロマチンの開裂を抑制することで、リプログラミングの効率を

低下させていた。遺伝子破壊することでその効率を飛躍的に向上させることができた。

3. Kobayashi K., Maeda K., Tokuoka M., Mochizuki A. and Satou Y. (2021) Using linkage logic theory to control dynamics of a gene regulatory network of a chordate embryo. *Sci. Rep.* **11**, 4001.
概要:我々が開発したリンクージロジック理論によれば、ネットワークの構造から決まる feedback vertex set (FVS) を操作することで、システム全体のダイナミクスを制御できるはずである。ホヤの遺伝子ネットワークを解析したところ、5 因子からなる FVS が特定された。これらのそれぞれを活性化もしくは抑制する操作により、6 種の組織のそれぞれが一意に誘導された。一方で、筋肉組織だけは誘導できず、ネットワーク情報が不完全である可能性が示唆された。そこで、未発見の遺伝子制御の候補を理論的に予測し、実験解析によりそのうちの 1 つが実在することを確認した。この制御を加えた新たなネットワークは、FVS として 6 つの因子を含む。新たな 6 つの因子を操作することで、7 種全ての組織が誘導できることが示された。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 永樂グループ

研究代表者: 永樂 元次(国立大学法人京都大学 医生物学研究所 教授)

研究題目: 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

研究項目

- ・ 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
- ・ 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
- ・ 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

主たる共同研究者: 望月 敦史(国立大学法人京都大学 医生物学研究所 教授)

研究題目: 分化ダイナミクス解明に向けたネットワークシステムの理論的研究

研究項目

- ・ 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
- ・ 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

③ 遊佐グループ

主たる共同研究者: 遊佐 宏介(国立大学法人京都大学 医生物学研究所 教授)

研究題目: CRISPRスクリーニング法の遺伝子制御ネットワーク解析への応用

研究項目

- ・ 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
- ・ 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

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

ヒト初期発生に関する幹細胞制御技術について理化学研究 BDR および京都大学 ASHBi と密に議論を交わしながら研究を進めた。その過程で複数の共同研究が立ち上がった。特に理研 BDR の藤原チームリーダーとは発生過程の細胞外基質(ECM)ダイナミクスに関する議論を交わし、その過程で永樂が所属する京都大学工学研究科の高分子を専門とする研究者を交えた共同研究に発展した。そのネットワークは学術変革領域「マルチモーダル ECM」(代表: 藤原裕展)の立ち上げにつながった。また、scCRISPR-seq の開発については遊佐の前所属であるサンガーリン研究所と連携しながら行なった。