

「多能性不均質さ解消機構の理解と再生医療への応用」

研究期間：2019年10月～2023年3月
研究者：橋本昌和

1. 研究のねらい

細胞競合は組織内において適応度の相対的に低い細胞が、より高い細胞によって排除される現象で、多細胞社会の恒常性を維持するための重要な生体機構である。本研究では「均質な多細胞社会において、細胞はどのようにして隣の細胞の状態を知り、どう付き合うのか？」について理解することに挑戦する。具体的には多能性組織であるマウス着床前胚のエピブラスト形成過程において、多能性の高い細胞がより低い細胞を競合的に排除する局面において、ある細胞が隣接する細胞の多能性の状態をいかに認識し、組織内での均質性構築のために生かすか殺すかの判断をするメカニズムの解明を目指す。

また、その *in vivo* (エピブラスト) における細胞間認識機構を理解することによって、*in vitro* 系における多能性幹細胞である ES 細胞や iPS 細胞の均質性の操作技術を創出し、再生医療における基盤技術とすることで本領域の戦略目標の達成に貢献したい。

本研究のねらいは以下の三本柱から構成される。

- ① *in vivo* で、エピブラスト形成過程において隣接細胞の多能性状態を認識する機構の解明
- ② *in vitro* で、ES 細胞が多能性を指標とした細胞競合を起こす系(競合誘導)の確立
- ③ 均質な ES/iPS 細胞コロニーの樹立方法を再生医療への応用・発展させる

①で得られた *in vivo* におけるエピブラストの知見を元に、②では ES 細胞を用いた *in vitro* での多能性均質化の再現をめざす。また、②の *in vitro* 培養系でライブイメージングや細胞間相互作用にかかわる因子のスクリーニングなどの *in vivo* では困難な解析を行い、①にフィードバックする。さらに③では②の系を応用し、再生医療技術への最適化を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

マウス着床前胚 E4.5 のエピブラストの scRNAseq を行った結果、エピブラストが形成される際に排除される不適応細胞は E4.0 相当の内部細胞塊の細胞と近い遺伝子発現パターンであったことから、12 時間ほど発生の遅れている(あるいはその時点で発生が停止している)細胞であることが明らかになった。また、E4.5 におけるエピブラスト細胞と排除される細胞のあいだでリガンド-受容体の関係にあるようなペアをそれぞれ特異的に発現している遺伝子を同定した。当該受容体(以下 receptor)を強制発現させる Tg マウスを作出するとその胚自身はエピブラスト形成能力があるものの、野生型とのキメラ胚を作成すると receptor 強制発現細胞がエピブラストから排除された。また、発生の 12 時間遅れた胚を人為的に作成すると発生の進んだ胚によってエピブラストから排除されることがわかった。しかし、この発生の遅れた細胞にド

ミナントネガティブ型の receptor を発現させると発生の進んだ細胞とのキメラ胚のエピブラストから排除されるのを免れた。野生型胚において、エピブラスト細胞は発生が進行すると当該リガンド(以下 ligand)の発現が上昇し、受容体である receptor の発現が低下することから、エピブラスト形成時において、何らかの理由で発生の停止あるいは遅延を起こした細胞は、自身が高発現する receptor を介して、周辺の発生の進んだ細胞から ligand の刺激を受け、過剰にシグナルが入り、細胞死が誘導される可能性が考えられた。ligand シグナルはこれまで原始内胚葉への分化誘導に重要と考えられてきたが、不適応細胞の排除にも利用しているようである。

マウスの着床前胚はこのシグナルを巧みに利用し、発生遅延細胞を排除することでエピブラストの多能性の不均質さを解消していることが明らかになった。

また、ES 細胞を用いてエピブラストで起こる細胞競合を模倣する実験系も確立した。Hippo シグナル因子の Lats を強制発現する細胞は YAP が細胞質に局在し、Lats のリン酸化活性を失わせたもの(LatsKD)を強制発現させると YAP は核に局在する。これらを胚培養培地に LIF を添加すると細胞競合を引き起こし、YAP が核局在する LatsKD 発現細胞が勝者となる系を確立した。しかし、予想外にも勝者となる LatsKD ES 細胞はマウス胚にインジェクションすると 100%キメラとしてエピブラストに寄与できるものの、出生にまでは至らないため、YAP の核移行は ES 細胞では悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ①「in vivo で、エピブラスト形成過程において隣接細胞の多能性状態を認識する機構の解明」について

体の元となるエピブラストの多能性を均質にするため、細胞競合によって多能性の低い細胞を排除することをこれまでの研究から明らかにして来た。しかし、細胞がどのように隣接する細胞の多能性の状態を知るのかわかっていない。そこでそのメカニズムを解明するため、エピブラストの細胞をばらして scRNAseq を行うことで、多能性の低い細胞特異的に発現するような表面抗原などがいないか検証しようと考えた。

得られたシーケンスの結果から、エピブラストとなる winner 細胞と排除される loser 細胞の間で、細胞間認識に関わる可能性のある分子を同定するため、リガンド-レセプターの関係にある因子の探索をおこなったところ、有力な候補が得られ、以下 ligand , receptor とした。

これらのことから、当該シグナルを過剰に受けた細胞が排除されるのではないかと考え、このシグナルを過剰に受けるモデルとして Tet ON システムによる receptor コンディショナルトランスジェニック(Tg)マウスを作成した。全ての細胞で receptor を過剰に発現する胚は正常にエピブラストを形成できたものの、receptor Tg 細胞と野生型細胞からなるキメラ胚を作成したところ、receptor Tg 細胞はエピブラストから排除された(右図)。

また、E3.5 や E4.0 における ICM の scRNAseq の結果を主成分分析にかけると、loser 細胞は E4.0 の ICM に極めて近い発現を示した。

このことから loser 細胞は約 12 時間(0.5 日)発生が遅延している・あるいは停止していることが考えられた。人為的に 12 時間発生をずらした 2 種類の野生型胚を集合キメラにすると、発

生の遅れた細胞がエピブラストから飲み排除されることから、発生遅延細胞が生理的条件下でも排除される可能性が示唆された。

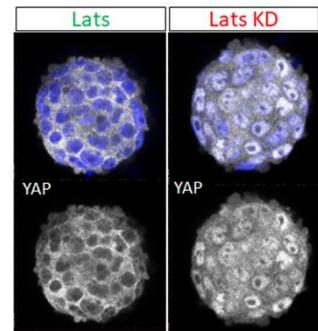
つづいて、この遅延細胞が当該シグナルを過剰に受けるがために排除されるのかを検証するために人為的に発生を 12 時間遅らせた胚にドミナントネガティブ型の receptor (dn receptor)を発現させ、当該シグナルを受けないように操作した。すると dn receptor 発現細胞は発生が遅れていてもエピブラストから排除されないことを確認した(下図)。

エピブラスト形成過程において発生が進行すると ligand の発現が上昇し、receptor の発現が減少することを加味すると、上記の成果より、発生遅延を起こした細胞は receptor を強く発現しており、周囲の発生の進んだ細胞の ligand によるシグナル入力を強く受け、細胞死に至っている可能性が示唆された。

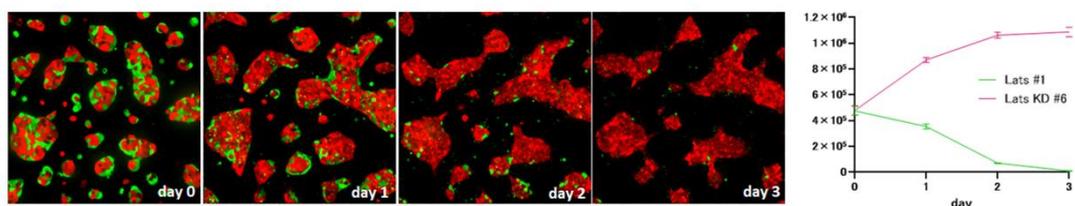
最終的に排除細胞をどのようにして細胞死まで至らせるのか?などの解決すべき問題はまだまだあるが、本来の第一目的であった細胞間で認識し合う機構については当該シグナルが重要な役割を担うことを明らかにでき、目標を達成できたと言える。

研究テーマ②「in vitro で、ES 細胞が多能性を指標とした細胞競合を起こす系(競合誘導)の確立」について

マウスエピブラストにおける細胞競合を性質の近い多能性幹細胞である ES 細胞で模倣し、loss of function などのゲノムワイドスクリーニングを可能にすることを目指した。まず、エピブラスト同様 YAP の局在レベル依存的に競合がおこるかを検証するため、人為的に YAP が細胞質に局在する系統および YAP が核に局在する系統の樹立を目指した。YAP の局在は Hippo シグナルによって制御されるため、Hippo 構成因子であるリン酸化酵素の Lats+GFP を強制発現させ YAP を細胞質にとどまらせることと、ドミナントネガティブに働くリン酸化ドメインを失活させた Lats Kinase Dead(Lats KD+mCherry)を強制発現させ YAP を核へ移行させることを狙った。予想通り、それぞれの ES 細胞で



YAP の局在を DOX 依存的に細胞質 or 核のパターンをつくりだすことに成功した(右図)。この 2 種類の ES 細胞は、それぞれ 8 細胞期胚にインジェクションするとともにエピブラストに寄与できるが、両方を混ぜてインジェクションすると YAP が核移行する Lats KD ES 細胞がエピブラストに寄与し、YAP が細胞質に局在する Lats ES 細胞は排除された。これはこれら 2 種類の ES 細胞に細胞競合のポテンシャルがあることを示唆しているが、通常の ES 細胞培養培地(Serum/LIF/2i)で、ES 細胞のみをまぜて培養しても競合はおきなかった。ES 細胞が胚の中では競合をおこすことから、胚の中での環境を再現するため、胚培養培地 KSOM に栄養外胚葉から分泌されると考えられる LIF や WNT が存在する状況を作り出した(KSOM+LIF+Gsk3b 阻害剤)。この環境下では ES 細胞だけでも単独では 2 種類とも生存し、



共培養条件下では競合を起こし LatsKD ES 細胞 (赤色) が勝者となった (下図)。

上記成果から、本テーマの目標は達成されたと言える。

研究テーマ③ 「均質な ES/iPS 細胞コロニーの樹立方法を再生医療への応用・発展させる」について

上記研究テーマ②において YAP が核移行する ES 細胞は勝者となること、およびその細胞における Sox2 などの多能性因子の発現が YAP が細胞質に局在する細胞よりも高かったことから、より多能性の高い、高品質な ES 細胞がセレクションされていると考えられた。しかし、このような YAP 核移行型の競合の勝者である ES 細胞 8 細胞期胚にインジェクションすると、エピブラストに寄与するものの、その後の発生に異常をきたし、胎生致死となった。一方で YAP が細胞質に局在し続ける条件で培養した ES 細胞は正常にエピブラストに寄与しその ES 細胞 100%キメラ胚は出産・正常に成長することができた。

これらの結果から、ES 細胞として維持する過程においては、YAP は細胞質にいる方が望ましいと予想される。ES 細胞の競合誘導はあくまで YAP が核移行するものをセレクションする手法なので、ES 細胞の多能性という指標では機能の低いものを選んでしまうことになり、再生医療への応用は断念した。しかし、ES 細胞を多能性を高く保ったまま維持する手法について、YAP の局在の観点から重要な知見が得られたと言える。

3. 今後の展開

ヒト着床前胚においても一部の割球において染色体分配の異常を引き起こし、それらは発生に影響を及ぼすため排除されることが報告されている。しかし、そのメカニズムや生理的意義は解明されていない。本研究成果はモザイク胚を用いた実験系であるため、ヒト初期胚におけるモザイク変異のよいモデルとなりうる。今後は本研究において活用した手法を用いて、なぜ発生遅延細胞が出現するのか？その細胞を排除する意義は何か？についての研究を展開し、そのメカニズム解明のあかつきにはヒトの不妊の原因解明などに将来つながる可能性がある。

また、ES 細胞の維持における YAP の役割について重要な知見が得られそうであり、薬剤スクリーニングの実験系により、再生医療の臨床現場において多能性幹細胞を品質良くメンテナンスする条件を確立することも可能となると考えられる。

4. 自己評価

全体を通して、第一目標であった細胞間相互作用による多能性不均質さ解消機構については scRNAseq による因子のスクリーニングと得られた候補分子を中心とした機能的解析から、大きく理解を進めることができたと言っている。今後、この内容を詰めて論文にする予定である。

ES 細胞を用いた実験は当初細胞間相互作用に関わる因子のスクリーニングに使用する予定であったが、上記 scRNAseq でおおまかな答えが出たため、スクリーニングの手間で停止している。しかしながら、ES 細胞における YAP 局在の役割については複数の議論がある状況の中で、それに対して結論を与えるような結果が得られていることから、これをもとに研究を進展させることでさらに重要な成果につながる可能性を含んでいるため、価値のあるテーマだったと言える。

再生医療への応用に関しては、勝者となる ES 細胞が多能性が低いものである可能性が高かったため、断念することとなったが、上記のようにエピプラスト形成や ES 細胞樹立の局面と維持の局面で YAP の役割が大きく異なる可能性が示唆されたため、方向転換して発展させて行く予定である。

また、他のさきがけ研究領域との交流から、どのようにして発生遅延細胞が出現するのかについての新たな共同研究プログラムに発展し、研究者としての飛躍につながった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. Uchimura A*, Matsumoto H, Satoh Y, Minakuchi Y, Wakayama S, Wakayama T, Higuchi M, Hashimoto M, Fukumura R, Toyoda A, Gondo Y, Yagi T
Early embryonic mutations reveal dynamics of somatic and germ cell lineages in mice
Genome Research 32(5):945-955 (2022)

概要:成体マウスの尻尾組織の全ゲノムディープシーケンスによって当該マウスの初期胚の頃に発生した体細胞突然変異およびその出現頻度を同定し、それらの情報を元に当該マウスの受精卵から原腸陥入期までの細胞系譜を再構成することに成功した。

2. Deletion of the Dishevelled Family of Genes Disrupts Anterior-Posterior Axis Specification and Selectively Prevents Mesoderm Differentiation.
Ngo J, Hashimoto M, Hiroshi Hamada, Wynshaw-Boris A*
Developmental Biology 464(2):161-175 (2020)

概要:Wnt シグナルを細胞内で伝達する Dishevelled ファミリーDvl1,2,3 のトリプルノックアウトマウスを作成し、中胚葉が形成されないことと前後軸形成に異常をきたすことを見出し、in vivo における Dvl ファミリーの役割の解明に貢献した。

(2) 特許出願

特になし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. 橋本昌和
細胞競合を介したマウスエピプラスト形成機構
第 42 回日本分子生物学会ワークショップ 招待講演 (2019)
2. 橋本昌和
マウス胚のエピプラスト形成の時空間制御機構
第 72 回日本細胞生物学会シンポジウム 招待講演 (2020)