

研究終了報告書

「細胞融合・分離が可能にする標的細胞の形質転換」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：坪内 知美

1. 研究のねらい

本研究は細胞融合技術と長鎖 DNA 作成技術を駆使して、遺伝情報の改変を伴うことなく標的細胞の形質を自在に操る技術を創出することを目的とするものである。

多能性幹細胞(ES 細胞)をターゲット細胞に融合すると、迅速に、かつ比較的高頻度で多能性幹細胞の転写ネットワークが導入されることがわかっている。このことは、染色体レベルの長鎖 DNA を用いることで、複雑な転写ネットワークを効率良く導入できる可能性を示唆している。しかし現時点では、融合効率の低さや融合に伴う染色体数の増加が障壁となり、再生医療への応用は現実的ではない。そこで本研究では、これらの問題を回避するシステムを構築すると共に細胞融合による形質転換のダイナミクスの理解を深めることで、染色体レベルの長鎖 DNA の細胞導入により細胞形質を操作する基盤技術の構築を目指した。

本研究では特に① 1:1細胞融合系による融合細胞の効率的回収技術の確立 ② 融合細胞の切断とターゲット細胞の単離 ③ 長鎖 DNA とゲノム編集技術を駆使したドナー細胞の体系的創出 を目指してきた。本研究により効率の良い細胞融合・分離のシステムが構築されれば、細胞の転写ネットワークの大々的な改変が可能になる。一方、染色体レベルの長鎖 DNA の導入や、結果誘導される新規形質は様々な細胞応答を引き起こすことも予想される。実際に、人工的な多能性誘導は、ゲノムにストレスを与えることで不安定化する可能性が示唆されている。したがって、人工的な転写ネットワークの転換が細胞に与えるストレスとその細胞応答の評価は必須である。本研究ではこのような細胞応答を評価・理解することで、細胞へのストレスを回避し且つ効率的な形質転換を達成することを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

融合細胞の効率的回収技術は領域内共同研究により確立しつつある。また、個々の融合細胞の動態を解析することで、細胞融合による多能性獲得過程がこれまで考えられていた以上に迅速に進むこと、また一部の細胞集団においては多能性制御因子の発現レベルが多能性幹細胞に限りなく近いレベルで発現していることを明らかにした。

また、細胞周期ステージと多能性制御因子の発現開始には密接な関係があることを明らかにした。ターゲット細胞特異的な転写プロファイルの喪失と多能性幹細胞特異的な転写プロファイルの獲得が秩序だてて進行することを明らかにした。

このように、本研究では細胞融合系を用いることで、1細胞周期内での多能性獲得プロセスを明らかにしつつあり、効率的なドナー核の切り離しと多能性誘導能に長けたドナー細胞の創出に向けて着実に成果を得ている。また現在、領域内共同研究により更に包括的な転写プロファイル解析を進めており、細胞融合による多能性誘導を更に強化する具体的な遺伝子リストが構築される予定である。これが達成されれば多能性誘導能を最大にしたドナー

細胞の創出がこれまで以上に現実的になると期待される。

(2) 詳細

本研究では ① 1:1細胞融合系による融合細胞の効率的回収技術の確立 ② 融合細胞の切断とターゲット細胞の単離 ③ 長鎖 DNA とゲノム編集技術を駆使したドナー細胞の体系的創出 という目標を掲げて研究を進めてきた。このうち②③を達成するには、細胞融合後の細胞応答(ここでは特に多能性誘導)のキネティックスの特定が先行する必要があった。すなわち、②において、ドナー核を排除するタイミングは自律的多能性獲得開始のタイミングに依存する。また③については、細胞融合系における多能性獲得過程を詳細に理解する必要があった。研究成果について以下に示す。

研究テーマ A 「細胞融合系による融合細胞の効率的回収技術の確立」

狙った細胞同士を効率良く融合し経時的に評価するにはマイクロ流路を用いた融合系の確立が必要と考え、リソグラフィを用いたマイクロ流路の作成に挑んできた。ベースモデルとして切り離し時にも有効と思われるスリット型の流路を選択し、鋳型作成及びポジ型・ネガ型の異なるレジストを用いたマイクロ流路の作成技術、スパッタ装置を用いたアルミ蒸着による電極の作成技術を習得した。前例に倣って実績のあるフォトリソグラフィ技術を使ってマイクロ流路の作成を行ってきたが、1 μ m幅スリットを実現するのは技術的に限界に近く、作成精度が安定しなかった。そこで領域内共同研究により、既存のモデルでは実現することができなかったデバイスのデザイン・開発を行ってきた。本デバイスでは細胞融合からライブイメージングの開始を(顕微鏡の設定も含めて)30分-1時間以内に達成できると見込まれる。引き続き効率の良く生存率の高い融合細胞の単離を可能にしていく。

研究テーマ B 「融合細胞の切断とターゲット細胞の単離」

細胞融合により形質操作した後に、操作に使用したドナー細胞(ドナーベシクル、染色体)の削除が可能になれば、操作後の細胞の応用が格段に広がる。融合細胞では非常に迅速に(一部の)多能性因子の発現開始が見られるが、これが具体的にどのタイミングで起こるかは不明であった。そこで iPS 樹立過程においては「成熟期(maturation step)」で発現が開始されると言われている転写因子に着目し、これらの発現タイミングを調べたところ、細胞融合後1細胞周期内に発現開始することを見出した。

自律的多能性獲得が開始するタイミングを特定し、ドナー核の単離のタイミングと手法を特定するために細胞周期を異なるステージに停止させる実験を試みたが融合細胞では期待した効果が得られなかった。現在融合細胞の多能性制御因子の転写ネットワークの確立のタイミングを特定するために、トランスクリプトーム解析を進めている。

研究テーマ C 「長鎖 DNA とゲノム編集技術を駆使したドナー細胞の体系的創出」

長鎖 DNA のゲノム編集は領域内共同研究により達成することを目標として掲げていたが、マイクロ流路作成、1細胞 RNA-seq 解析、複製開始点解析(以下)の共同研究が並行して進んでいるため、優先度を下げた。特に当初は iPS 細胞樹立過程において効果のあるとき

れる因子を網羅的に操作することを計画していたが、細胞融合による多能性誘導応答は必ずしも iPS 細胞樹立過程と同じプロセスを経て進行する保障はなく、より有効な因子の抽出には融合細胞における多能性獲得過程の分子機構をより包括的に理解することを先行させるべきだと考えた。

また、上で記載した融合細胞のトランスクリプトームを経時的に抽出することができれば、細胞融合系で多能性誘導の鍵となる因子を特定しうる。これまでに、融合細胞を融合後の異なるタイミングで単離する条件を確立した(図1)。今後多能性誘導の鍵を握る候補因子をリスト化し、多能性誘導能力を強化したスーパードナー細胞の構築へと繋げて行く。

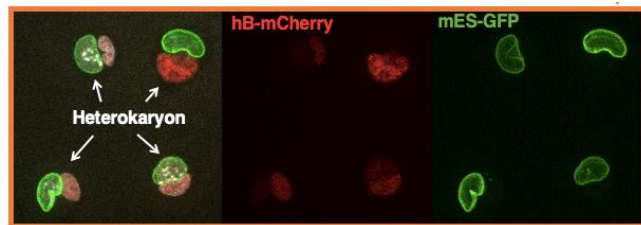


図1 融合細胞トランスクリプトーム解析のための融合細胞の単離

本さがけ研究を通じて実現した領域内外の研究者・産業界との連携について

A マイクロ流体チップを用いた電氣的融合法の確立(山西 CREST グループとの共同研究)

昨年度より CREST の山西グループとの共同研究によりマイクロ流体チップの作成を開始し、既存モデルに加えてスリットを使わず融合細胞の取り出しをより容易にするデバイスの作成に取り組んできた。現在評価が進行中である。

B 融合細胞 RNA-seq 法の確立(二階堂領域アドバイザー研究チームとの共同研究)

細胞融合による多能性誘導過程は、細胞周期の進行と密接な関係があることが示唆された。そこで、より包括的に分裂前後の多能性転写ネットワークを取得するために、融合細胞のトランスクリプトームを包括的に検出できないかと考えた。融合細胞ではドナー細胞とターゲット細胞の RNA が混在するため、これらを区別しない限りリプログラミング過程の遺伝子発現プロファイルを取得することはできない。得られたシーケンス情報を更にドナー由来、ターゲット由来の情報に振り分ける試みと解析が現在進行中である。

C 多能性幹細胞における DNA 複製開始点分布解析(大学さがけ研究員との共同研究)

ES 細胞を含む多能性幹細胞は、染色体構造や細胞周期制御において他の細胞種と異なる制御を受けている。細胞融合により多能性幹細胞に形質転換を起こす際にはこれらの性質もターゲット細胞に導入されることが予想される。

我々の研究室の先行研究より、多能性幹細胞特異的な DNA 複製制御が明らかになりつつある。多能性幹細胞特異的な DNA 複製開始制御について理解を深めるために、大学研究員との共同研究によりマウス ES 細胞における Pu-seq システムの構築を行った。

3. 今後の展開

本研究より、融合技術を用いた細胞の形質操作の実現に向け基盤となる実験系及び情報が蓄積しつつあると考えている。融合デバイスの構築はさがけ研究終了後も引き続き山西 CREST グループに参画させて頂き継続する。また、この共同研究をきっかけに、様々なインジェクション手法を専門とされる先生方と巡り会うことができたため、細胞融合に限定せず核抽出液、タンパク質、長鎖 DNA と手法の幅を広げていく。また、融合細胞 RNA 解析についても解析が進行中なので、ここから抽出される情報をもとに、スーパードナー細胞の創出、ターゲット核の削除とつなげていく。

具体的には細胞融合系において自律的多能性獲得が起こるまでの転写ネットワークの活性化(抑制)の経時的变化をプロットし、上流かつ決定打となる因子の候補を抽出する。更にこれらをドナー細胞にあらかじめ持たせることで多能性獲得が亢進するかを検証する。これにより、現存の技術では達成できていない迅速且つ大々的な細胞の形質転換技術の創出を目指す。

4. 自己評価

本研究では融合技術を用いて既存の技術では達成できない細胞操作技術を創出することを目指してきた。このために、通常では挑戦できなかったリソグラフィを用いたマイクロ流路の作成技術を習得できたことは良かった。実際には自身で自在にデバイスを作成するところには至らなかったが、この取り組みをきっかけにして工学分野の研究者と交わる機会を多く持てた。工学分野の研究者は温度、力、熱、電気、などの物理的な条件を微細に操作する技術を備えており、細胞生物学との融合がもたらす有用性について考えるきっかけとなった。また、現存の技術では少数の因子の発現制御が限界であるが、ゲノムデザイン・ライト技術が成熟するにつれて、いずれ緻密に制御された転写ネットワークを細胞に丸ごと放り込むことが可能になることが期待される。しかし、放り込むネットワークそのものが完全であっても、受け手の細胞のネットワークとの相互作用は更に複雑である。細胞融合による形質転換メカニズムの理解は、このようなドナー・ターゲット(細胞)の相互作用の理解に向けた先駆的な知見をもたらしていると考えている。ただ、現時点で成果論文につなげることができなかったことが大きな反省点である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表
準備中

(2) 特許出願
該当なし

(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)

1. Tsubouchi, T. and Pereira, C.F. Reprogramming Stars #1: Genome Programming Through the Cell Cycle. *Cell Reprogram.* (2021) 23(3):153-157. doi: 10.1089/cell.2021.29039.tt. Jun 17 2021

2. **Front Line Chromosome Research Meeting (Cancer Institute, Tokyo) 2019 招待講演**
Probing the cause of DNA damage in nuclei induced to undergo reprogramming by stem cell-fusion

3. **Cold Spring Harbor Laboratory meeting on “Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance”** Cold Spring Harbor, USA: 2019
“A unique regulation of dNTP levels in mammalian pluripotent stem cells”

4. **Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Yokohama) 2018 招待講演**
Symposium1S-02 “Molecular Mechanism for Cell Division”
A mechanism that ensures completion of DNA replication in pluripotent stem cells