

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：多能性幹細胞と栄養外胚葉幹細胞の運命を分ける転写因子とエピジェネティクスの階層性
2. 研究開発代表者：丹羽 仁史（国立大学法人 熊本大学 発生医学研究所 教授）
3. 相手国研究代表者：Janet Rossant (University Professor  
Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Canada)
4. 研究開発の成果

平成27年度においては、まず、ES-TS分化転換過程について、包括的オミックス解析を行うための標準培養手順を、カナダ側研究者と協議を進め、確定した。次に、この確定した手順に基づき、丹羽チームでは、分化転換培養0日、3日、6日の、DNA, RNAならびにChIP-seq法のためのクロマチンサンプルを調製した。クロマチンサンプルについては、Oct3/4, Sox2, Cdx2, Eomes, Elf5について免疫沈降を行い、得られたDNAライブラリーから次世代シーケンサーを用いてデータを取得した。また、田中チームでは、DNAのメチル化状態を解析するための方法（PBAT）の最適化を完了した。これらの解析は、次年度前半に完了させる予定である。

ES-TS分化転換過程におけるエピジェネティック制御の役割を明らかにするために、これまで作成したタモキシフェン誘導型ノックアウトES細胞を、TS細胞へと分化転換する独立の誘導系として、プロゲステロン誘导体RU486で誘導可能なキメラ分子Cdx2GPRhを開発し、その動作を確認した。G9a, Setdb1, Dnmt3a/3b誘導型ノックアウトES細胞については、Cdx2GPRhで分化誘導可能な細胞株を取得した。

このような解析と並行して、ヒト細胞から栄養外胚葉幹細胞を誘導するための試みも行った。洪チームでは、マウスES細胞のTS細胞への分化転換を誘導する転写因子CDX2を薬剤誘導性に発現させることができるヒトES細胞株を樹立し、CDX2強制発現の効果を検討した。この結果、ヒトES細胞においては、CDX2の強制発現は、栄養外胚葉様遺伝子発現パターンを誘導せず、マウスES細胞とは異なる応答を示すことがわかった。一方で、これまでに構築した転写因子誘導発現ヒトES細胞における遺伝子発現プロファイルの解析から、栄養外胚葉様遺伝子発現パターンを誘導する転写因子を複数同定した。これらの転写因子の組み合わせにより、ヒトES細胞を栄養外胚葉幹細胞に分化転換できるかどうか、現在検討を進めている。

また、田中チームでは、これまでにカニクイザル胚盤胞から樹立した栄養膜細胞株について、さらなる解析を行った。その結果、これらの細胞は培養条件の変更により、栄養膜細胞特異的遺伝子の発現が増強すること、そして、マウスTS細胞において特徴的にメチル化が高いDNA領域において、これらの細胞株も高メチル化状態にあることを明らかにした。さらに、変更した培養条件で新たな栄養膜細胞株を試み、3つのカニクイザル胚盤胞からそれぞれこれまでと同様の栄養膜細胞株の樹立に成功した。

カナダ側研究チームとは、標準培養手順の確立のために、条件検討の情報交換を頻繁に行った。また、CDX2によるヒトES細胞分化誘導については、研究試料の提供などの共同研究を進めている。さらに、カニクイザル胚盤胞から樹立した栄養膜細胞株の遺伝子発現パターン解析については、その手法の改善などについて、共同で研究を進めている。