

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム (カナダ)

(英語) International Collaborative Research Program, Strategic International Collaborative Research Program (SICORP) Canada

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Genetic and epigenetic hierarchies distinguishing pluripotent and trophoblast stem cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人熊本大学発生医学研究所 教授 丹羽 仁史

所属 役職 氏名：(英語) Hitoshi Niwa, Professor, Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University

実施期間：平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) ES-TS 分化転換のトランスクリプトーム解析とこれに関わる転写因子の機能解析
分担開発課題名 (英語) Transcriptome and functional analysis of transcription factors related to ES-TS trans-differentiation

研究開発分担者 (日本語) 慶應義塾大学医学部坂口光洋記念講座 (システム医学) 教授 洪 実

所属 役職 氏名：(英語) Minoru S.H. Ko, MD, Ph.D., Professor, Keio University School of Medicine

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 田中智

所属 役職 氏名：(英語) Satoshi Tanaka, Ph.D., Associate Professor, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

II. 成果の概要（総括研究報告）

我々は、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を解析し、これを用いてヒト栄養外胚葉幹細胞の作出することを目指している。このために、転写因子ネットワークの遷移過程の解析と、エピジェネティック制御機構の解析を並行して進めるとともに、ヒト ES 細胞、カニクイザル栄養膜細胞の解析も進めている。本年度は、丹羽グループが、転写因子ネットワークの遷移過程の解析として、標準化した ES-TS 分化転換プロトコールに従い分化誘導した細胞の時系列サンプルを採取し、ES 細胞特異的 (Oct3/4, Sox2) ならびに TS 細胞特異的 (Cdx2, Eomes, Elf5) 転写因子のクロマチン免疫沈降・塩基配列解析 (ChIP-seq 解析) を行った。これらの結果の解析から Elf5 については抗体の affinity が低いと考えられたため、Ty1 タグを Elf5 にノックインした ES 細胞を新たに作成し、これで ChIP-seq 解析をやり直した。また、エピジェネティック制御機構の解析としては、昨年度開発した Cdx2GPRh と MerCreMer の組み合わせにより、Setdb1, G9a, Eed について、標準作業手順に適合する分化誘導操作が可能なエピジェネティック制御因子の誘導型ノックアウト ES 細胞と、その動作確認を行った。さらに、これまでに作成していた Dnmt3a/Dnmt3b 誘導型ノックアウト ES 細胞をもとに、標準作業手順に適合する分化誘導操作が可能な Dnmt1/Dnmt3a/Dnmt3b 誘導型ノックアウト ES 細胞を作成した。洪グループは、約 700 個の転写因子の誘導発現ヒト ES 細胞の遺伝子発現解析から、栄養外胚葉マーカーの発現を誘導できる転写因子を選別した。さらに、これらを組み合わせヒト ES 細胞に導入することにより、栄養膜細胞マーカー遺伝子である CDX2 および HAND1 の発現を更新させる特定の組み合わせを同定した。田中グループは、新規カニクイザル栄養膜細胞株 (CyTRF) の性状解析を進めた。カナダ側の Stanford 博士の協力により RNA-seq データの解析を行い、CyTRF が栄養膜細胞系譜の細胞であると結論した。また、培養条件の変更により、CyTRF が、浸潤能の高い絨毛外栄養膜細胞 (Extra-villous trophoblast, EVT) と、細胞融合によって多核化する合胞体性栄養膜細胞 (Syncytiotrophoblast, STB) への分化能を合わせ持つ、カニクイザル栄養膜前駆細胞 (macaque trophoblast progenitor cell, macTP 細胞) であることを確認した。また、丹羽グループと共同で、標準化した ES-TS 分化転換プロトコールに従い分化誘導した細胞の時系列サンプルにおいて、PBAT 法による DNA メチル化解析を行った。

We are aiming to disclose genetic and epigenetic hierarchies distinguishing pluripotent and trophoblast stem cells and to apply this achievement for establishment of human trophoblast stem (TS) cells. For this purpose, we performed the analysis of the transition of transcription factor network along the transition of embryonic stem (ES) cells to TS cells and the impact of epigenetic regulation on the transition, as well as the analyses of human ES cells and monkey trophoblast cells. Niwa group collected the samples during the transition of ES cells to TS cells under the standardized condition and performed chromatin immuno-precipitation with massive parallel DNA sequencing (ChIP-seq) analyses for ES-specific (Oct3/4, Sox2) and TS-specific (Cdx2, Eomes and Elf5) transcription factors. Among them, the quality of the data was poor for Elf5, which might be due to low Ab affinity. To overcome this trouble, a new ES cell line carrying Ty1 epitope in the Elf5 allele was made by Crispr/Cas9-mediated knock-in strategy, and these ES cells were applied for ChIP-seq analysis of Elf5. In addition, the inducible knockout ES cells for Setdb1, G9a and Eed, as well as Dnmt1/Dnmt3a/Dnmt3b triple inducible KO ES cells that was newly produced, were adopted for the transition to TS cells with Cdx2GFRh and MerCreMer. Ko group analyzed the transcriptome data of human ES cell lines that carry inducible transgenes for 700 transcription factors. Multiple transcription factors were selected for their potential to induce expression of trophoblast-related genes, and the abilities of their combinatorial overexpressions to activate the

trophoblast markers CDX2 and HAND1 were assessed in human ES cells. As the result, a specific combination was identified. Tanaka group analyzed CyTRF cells derived from cynomolgus monkey blastocysts. The analysis of RNA-seq data was performed with Dr Stanford. As the result, it was confirmed that CyTRF cells are the cells in trophoctoderm lineage. These CyTRF cells undergo differentiation to extra-villus trophoblast and syncytiotrophoblast in the particular culture condition, indicating that they are macaque trophoblast progenitor cells. The analysis of DNA methylation of the samples during the transition of ES cells to TS cells under the standardized condition was performed by PBAT method.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム(カナダ)

(英語) Strategic International Collaborative Research Program (Canada)

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Genetic and epigenetic hierarchies distinguishing pluripotent and trophoblast stem cells

研究開発担当者 (日本語) 慶應義塾大学医学部坂口光洋記念講座(システム医学) 教授 洪 実

所属 役職 氏名：(英語) Minoru S.H. Ko, MD, Ph.D., Professor, Keio University School of Medicine

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：国立大学法人熊本大学・発生医学研究所・丹羽仁史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0件、国際誌 0件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム(カナダ)

(英語) Strategic International Collaborative Research Program (Canada)

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Genetic and epigenetic hierarchies distinguishing pluripotent and trophoblast stem cells

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授 田中智

所属 役職 氏名：(英語) Satoshi Tanaka, Ph.D., Associate Professor, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

II. 成果の概要(総括研究報告)

研究開発代表者：国立大学法人熊本大学・発生医学研究所・丹羽仁史 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧(国内誌 0 件、国際誌 0 件)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願