

氏名 熊崎 泰成

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2536 号

学位授与の日付 2024 年 9 月 27 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 細胞融合法を用いたリプログラミング過程の 1 細胞解析

論文審査委員 主査 中山 潤一
基礎生物学コース 教授
坪内 知美
基礎生物学コース 准教授
定塚 勝樹
基礎生物学コース 助教
高島 康弘
京都大学 iPS 細胞研究所
未来生命科学開拓部門 教授

博士論文の要旨

氏 名：熊崎 泰成

論文題目：細胞融合法を用いたリプログラミング過程の1細胞解析
(Single-cell analysis of the reprogramming process using the cell fusion system)

During mammalian development, a single fertilized egg undergoes a sophisticated differentiation process to produce several hundreds of different cell types that compose our bodies. Embryonic stem (ES) cells are the stem cells that arise during the blastocyst stage and are responsible for producing all the cell types that compose an organism (i.e., they are “pluripotent”). *In vivo*, pluripotency is lost upon differentiation and is not reacquired by somatic cells. However, experimentally, somatic cells can be induced to dedifferentiate and reacquire pluripotency through a process known as “reprogramming”.

To date, the reprogramming process has been intensively investigated using several different systems. The cell fusion system induces reprogramming by physically fusing pluripotent stem cells (such as ES cells) to somatic cells. The advantage of using the cell fusion system is that the induction of pluripotency-associated factors can be detected within hours among a relatively large population. Thus, the cell fusion offers a tractable system to study early steps of reprogramming.

On the other hand, limitation of using this system is its low fusion efficiency. To date, fused cells have been isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) or by drug selection, using cells expressing different fluorescent proteins or different drug-resistant genes. However, isolation of fused cells immediately after cell fusion has been difficult with these approaches, especially when decent viability is desired, preventing the direct tracking of fused cells under the microscope.

In this study, I established a protocol to enrich fused cells within hours with

minimal cell damage using antibody-conjugated beads sorting. This system enabled us to identify and track individual fused cells under microscope. In addition, I established a protocol to evaluate reprogramming levels by quantitating the number of specific mRNA molecules using single molecule RNA-FISH (smFISH).

Using the system I established, I showed that the induction of the pluripotency-associated genes can occur as early as 5 hours after fusion in a small subpopulation of fused cells. Strikingly, I also found that a subpopulation of the fused cells expresses pluripotency-associated genes to the level of iPS cells as early as 25 hours after fusion. In previous studies using bulk fused populations, the expression of pluripotency-associated genes was barely detectable at 1 day after fusion and the expression level was multiple orders lower than that of pluripotent stem cells even at 8 days post-fusion. My results suggest that the reprogramming induced by cell fusion can progress with faster kinetics than previously believed. I also found that a somatic gene and a pluripotency-associated gene rarely co-express within a cell. Thus, dedifferentiation step appears to be separated in time from the induction of pluripotency-gene network at the cellular level.

Next, I sought to investigate whether the progression of reprogramming may be linked to cell cycle progression. Fused cells are initially observed as heterokaryons, in which two nuclei originating from two different cell types are sharing a cytoplasm but physically separated, but then the two genomes are mixed to form a single nucleus after the first division, leading to the formation of hybrid cells. When I investigated expression levels of the pluripotency-associated genes in heterokaryons and in hybrids, I found that human *OCT4* gene expression levels were not significantly different from each other within the same time point, while human *NANOG* expression was only induced in the hybrids. These results indicate that the initiation and upregulation of pluripotency-associated factors such as *OCT4* occur in a time-dependent manner regardless of whether a cell has undergone cell division, but

other factors, such as *NANOG* can only be induced after cell division.

To extend this study further, I set up a system to carry out single-cell RNA sequencing of fused cells in collaboration with the Nikaido group at RIKEN. The cluster analysis identified a few clusters representing populations undergoing reprogramming. Further analyses should greatly advance our understandings in the reprogramming process.

In summary, I established new experimental systems that allow us to analyze the reprogramming process of fused cells at a single cell level and uncovered several important aspects regarding cell-fusion induced reprogramming. Further studies are expected to deepen our understandings in the molecular basis of the reprogramming process.

Results of the Doctoral Thesis Defense

博士論文審査結果

Name in Full

氏名 熊崎 泰成

Title

論文題目 細胞融合法を用いたリプログラミング過程の1細胞解析

哺乳類では、発生の初期に一時的に出現する分化多能性（体を構成する全ての細胞種を産生する能力）が個体内で保持されることはなく、また新たに出現することもない。しかし、ディッシュ上では多能性制御因子を複数発現させることで、体細胞に分化多能性を再導入（リプログラミング誘導）することができる。初期胚から得られる胚性幹細胞（ES細胞）及び体細胞に分化多能性を再獲得させたiPS細胞は、共に疾患の機序解明や再生医療への応用展開が期待されることから、iPS細胞樹立までの分子メカニズムについても注目され盛んに研究が進められている。しかし、多能性制御因子の発現によるリプログラミングは一般的に効率が悪く、時間も有する。一方で、ES細胞と体細胞を融合することで、分化した体細胞が初期化する現象が明らかにされている。この細胞融合をトリガーとするリプログラミング応答を細胞集団として解析すると、わずかではあるが融合後半日から1日で検出可能になることが知られており、リプログラミングの初期応答を理解するためには有効である。ただし、細胞融合効率が非常に低いため下流の実験内容が制限されてきた。

申請者である熊崎氏は、リプログラミング誘導刺激に対して起こる不均一な細胞応答の機序を、細胞融合法と1細胞解析系を確立することで理解することを目的として研究を行った。まず、抗体ビーズを用いて融合細胞を濃縮することで、これまで困難であった顕微鏡下での融合細胞の観察を可能にし、また生物種特異的に1分子RNA-FISHを行うことでリプログラミング効率を個々の細胞で評価することを可能にした。また、この実験系を用いて、細胞融合によるリプログラミング誘導はこれまでに考えられていたよりも迅速に進行すること、また、一部の融合細胞ではiPS細胞と同程度の多能性幹細胞関連遺伝子の発現が24時間以内に認められることを見出した。さらに、融合直後の2核の状態と、最初の分裂を経て1核になった融合細胞を区別して評価することで、融合細胞が最初の細胞分裂を経る前に体細胞の転写プログラムを抑制すること、多能性制御因子である*OCT4*遺伝子の発現開始は分裂前に起こり、*NANOG*遺伝子の発現開始は分裂後に起きることを見出した。また、ライブイメージングにより細胞周期の滞りない進行がリプログラミングの進行に重要であることを示した。これらの結果は、細胞融合に誘導されるリプログラミングが細胞周期ステージと密に連動していることを示している。また理研BDRとの共同研究により、融合細胞の1細胞トランスクリプトーム解析を可能にした。

以上の研究は、融合細胞の1細胞解析を確立することで、細胞融合によるリプログラミング制御機構の一端をこれまでにない時間精度で明らかにした画期的な研究成果である。また、これらのうち結果の一部は既に*Cellular Reprogramming*誌に筆頭著者として受理されている。以上より、審査委員会は熊崎氏を博士の学位を授与するに相応しいと評価した。