

博士論文の要約

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

総合研究大学院大学生命科学研究科基礎生物学専攻

熊崎泰成

序論

哺乳類の発生過程では、単一の受精卵から巧妙に制御された分化過程を経て、我々の体を構成する数百種類もの分化細胞が生まれる。胚盤胞から樹立される胚性幹 (ES) 細胞は「多能性」を有しており、体を構成する全ての細胞種へと分化していくことが可能である。生体内では多能性は細胞の分化に伴い失われていき、通常であれば終末まで分化した体細胞が再度獲得することはない。しかし、人為的な操作により体細胞に対して脱分化と多能性再獲得が誘導可能であり、この過程は「リプログラミング」と呼ばれている。細胞可塑性の理解や再生医療への応用を目指して、リプログラミングの機序解明には注目が集まっているが、一般的にリプログラミング効率は低く、時間を有する。誘導対象の細胞の偶発的事象に依存するとも言われており、その機序解明にはリプログラミングが誘導される細胞の特性を個々に理解する必要がある。しかし現時点では全容理解には至っていない。

現在まで、リプログラミング過程は異なる実験系を用いて盛んに研究されてきた。細胞融合法は ES 細胞のような多能性幹細胞と体細胞を融合することによってリプログラミングを誘導する手法である。細胞融合の系を用いる大きな利点は多能性関連因子の発現誘導が融合後数時間のうちに比較的多くの細胞で検出可能になることである。このような特性から、細胞融合はリプログラミングの初期段階を研究する系として適していると言われてきた。

一方、細胞の融合効率の低さから融合後の解析手法が限定されてきた。低頻度で生じる融合細胞を単離するために、フローサイトメトリー (FACS) や薬剤選択が用いられてきたが、どちらも融合後短時間の間に融合細胞を生きのまま単離することは困難であり、融合後の個々の細胞の挙動追跡を行うことは不可能に近かった。

本研究ではこのような点を克服し、細胞融合により誘導されるリプログラミングを1細胞レベルで解析することを実現した。特に、抗体接合ビーズを用いて融合細胞の単離・濃縮を行うことで、生存率を確保しつつ短時間の間に顕微鏡下で融合細胞を観察することを可能にした。また、個々の細胞に対して遺伝子発現レベルを評価することを実現した (第1章)。この実験系を用いることによって、細胞集団解析では捉えられていなかった、個々の細胞のダイバーシティを捉えることができるようになり、多能性関連因子の発現開始時期がこれまで想定されていたよりも顕著に早い細胞や発現レベルが高い細胞が存在することが明らかになった。また、細胞の形態の観察やライブセルイメージングによる融合細胞の細胞周期追跡により、リプログラミングと細胞周期が密接に関係しているこ

とを見出した(第2章)。また、融合細胞のリプログラミング過程で変動する転写ネットワークをより網羅的に解析するため、理化学研究所生命機能科学研究センター(理研BDR)二階堂研究室と共同で融合細胞の1細胞RNAシーケンスとトランスクリプトーム解析を行うための実験系を構築した(第3章)。

第1章 融合細胞のイメージング解析を可能にする実験系の構築

本研究では、抗体接合ビーズを用いたソーティングによって、融合細胞へのダメージを抑えつつ融合後数時間のうちに濃縮する実験系を樹立した。この系ではヒトB(hB)細胞とマウスES(mES)細胞を融合し、ディッシュ上にまいた後に洗浄することで、浮遊細胞である非融合hB細胞を除去する。そして接着細胞を回収し、血球特異的表面抗原であるCD45に結合する抗体を接合したビーズを用いてソーティングを行うことで、非融合mES細胞を除去し融合細胞を濃縮する。この系によって融合細胞を短時間のうちに顕微鏡下で1細胞ごとに判別可能になった。また、細胞へのダメージが抑えられるため、これらの融合細胞の挙動の追跡が1細胞ごとに可能になった。さらに、1分子RNA-FISH(smRNA-FISH)を用いてhB細胞特異的遺伝子や多能性関連因子のmRNAの転写を定量することで、個々の融合細胞のリプログラミングを評価することを可能にした。

第2章 細胞融合によるリプログラミング過程の1細胞解析

第1章で樹立した系を用いることで、融合後5時間の融合細胞で既に多能性関連因子が発現しうることが示された。また、驚くべきことに融合細胞の一部では融合後25時間の時点で人工多能性幹(iPS)細胞と同レベルの多能性関連因子が発現が観察された。細胞集団レベルの解析を行っている先行研究では、多能性関連因子の発現は融合後1日ではわずかにしか検出できず、8日後でさえ多能性幹細胞と比較して数桁低いとされていた。本研究の結果から、細胞融合によって誘導されるリプログラミングはこれまで考えられてきたよりも迅速に進行することが明らかになった。また、hB細胞特異的遺伝子と多能性関連因子を同時に発現している融合細胞はほとんど見られないことから、脱分化と多能性ネットワーク活性化の過程は同時に進行するのではなく、脱分化が先行して完了した後、多能性ネットワークが活性化すると考えられる。

次に、リプログラミングの進行が細胞周期進行と関係しているかを調べた。融合細胞は初めhB細胞とmES細胞由来の二核が細胞質を共有した状態の細胞(ヘテロカリオン)として存在している。その後、一度目の細胞分裂に伴い二つのゲノムが混じり合った核を持つ細胞(ハイブリッド)を形成する。ヘテロカリオンとハイブリッドで多能性関連因子の発現を調べると、融合後同じ時点での*OCT4*の発現レベルに顕著な差は見られなかったが、その他の多能性制御因子の中には発現上昇がハイブリッドでのみ誘導されるものが存在した。これらの結果から、*OCT4*のように時間依存的に発現が開始され上昇する多能性関連因子がある一方、細胞分裂後にのみ発現上昇が誘導される細胞周期依存的制御されると考えられるものが存在することが示された。また、ライブセルイメージングによって融合細胞の細胞周期の追跡を行い、それぞれの細胞に対して多能性関連因子の発現レベルを定量した。その結果、細胞周期の進行が融合後一度目の分裂後もG1期に停滞せず迅速に進行している細胞ほど多能性関連因子の発現が上昇している傾向が見られた。こ

これらの結果から、リプログラミングの進行には、最初の細胞周期から密接な関係があることが明らかになった。

第3章 融合細胞の1細胞トランスクリプトーム解析のためのセットアップ

smRNA-FISHでは一度の解析できる遺伝子数が限定されるため、理研BDR二階堂研究室との共同研究で融合細胞の1細胞RNAシーケンスとトランスクリプトーム解析を目指し、基盤となるプロトコルを確立した。クオリティの高いデータを得るために条件検討を行い、クラスタリング解析によって、リプログラミングが進行している融合細胞の細胞集団によって構成されるクラスターを特定した。このクラスターと他の融合細胞のクラスターとの比較を行うことでリプログラミングの進行に重要な因子やパスウェイの特定が可能になると考えられる。今後さらなる解析によってリプログラミングの進行過程の理解がより進むことが期待される。