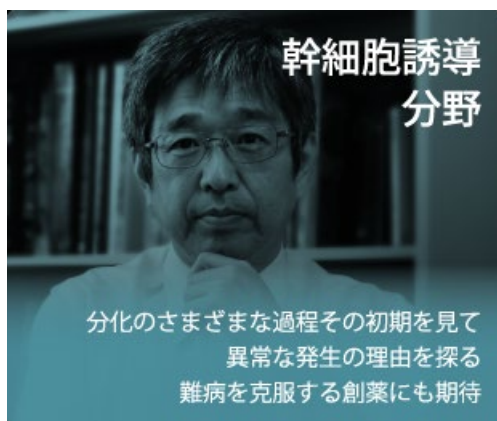
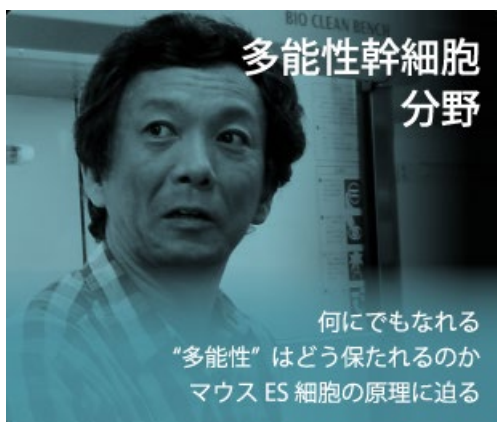

幹細胞部門

Division of Stem Cell Research

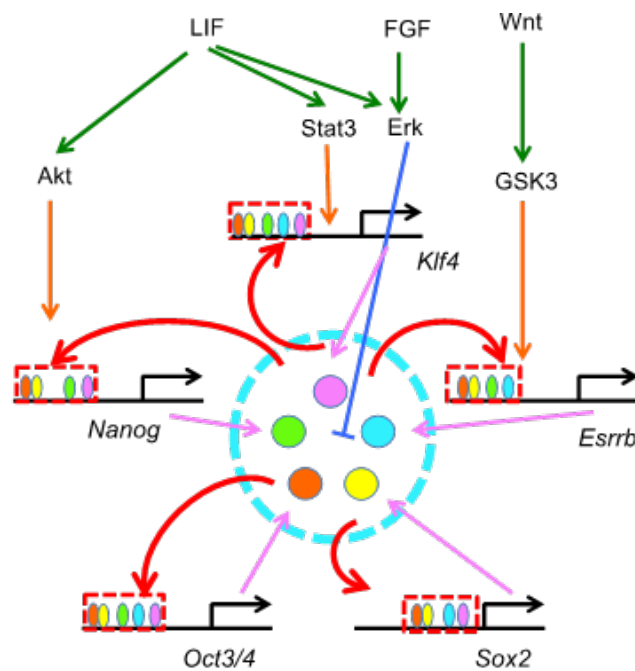


多能性幹細胞分野

Department of Pluripotent Stem Cell Biology

胚性幹細胞などが持つ分化多能性は、胚を構成する全ての種類の終末分化細胞へと分化できる能力として定義される。当分野では、この多能性を規定する分子機構の解明を目指して研究を進めている。より具体的には、(1) 多能性を維持する転写因子ネットワークとエピジェネティック制御機構の解析、(2) 分化に伴う多能性維持プログラムの遷移メカニズムの解析、(3) 多能性を維持する実行分子機構の解析、などのテーマで基礎研究を進めている。このような研究を通じて、細胞分化に伴う遺伝子発現プログラム制御機構の基本原則を解明することを、究極的目標としている。

Pluripotency is defined as an ability of a cell to differentiate all types of terminally-differentiated cells in an organism. We are studying about the molecular mechanisms determining cellular pluripotency in mouse embryonic stem (ES) cells. The projects are divided into 3 subjects: (1) Analysis of the functions of transcription factor network and epigenetic mechanisms to maintain pluripotency, (2) Analysis of the mechanisms governing the transition of transcription factor network during differentiation, and (3) Analysis of the molecular mechanisms that direct the maintenance of pluripotency. We aim to reveal the general principles governing the regulation of gene expression program in cellular differentiation.



構成員 Staff (2024.3)

名前	職名	Name and Position
丹羽 仁史	教授	Hitoshi Niwa, Professor
岡野 正樹	准教授	Masaki Okano, Associate Professor
遠藤 充浩	助教	Mitsuhiro Endoh, Assistant Professor
遠藤 多美枝	技術補佐員	Tamie Endoh, Technical Staff
古賀 愛子	事務補佐員	Aiko Koga, Secretary Assistant
Lusubilo Mwalilino	大学院生	Graduate Student

元在籍者 Staff in the past (2018.4～2024.3)

名前	Name	在籍期間	在籍時職名	転出先
山根 万里子	Mariko Yamane	2016.4-2018.12	研究員	理化学研究所
松浦 公美	Kumi Matsuura	2016.4-2021.3	技術補佐員	熊本大学

研究概略 Projects

多能性幹細胞は、胎児～成体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力（多能性）を維持したまま自己複製を続ける幹細胞である。マウス発生過程においては、多能性を有する細胞は胚盤胞から着床後しばらくの時期にのみ一過性に存在する。しかし、胚に存在する多能性細胞は、適切な培養条件においては自己複製を行う多能性幹細胞として長期にわたり維持できる。マウス胚性幹細胞（embryonic stem cells: ES 細胞）は、そのような正常胚に由来する多能性幹細胞として初めて 1981 年に樹立された。その後 40 年以上にわたり、多能性幹細胞がどのようにして多能性を維持し自己複製を続けるのか、その分子機構の解明に向けた努力が続けられてきた。2006 年の誘導型多能性幹細胞(iPS 細胞)の樹立は、その様な研究からスピニングアウトした成果と言える。しかし、今日に至ってもなお、多能性幹細胞を規定する分子機構が解明されたとは言い難い。我々はその理解に一步でも近づくために、転写因子とエピジェネティック機構による多能性幹細胞特異的遺伝子発現制御機構の解析を続けている。この研究は主に、転写因子ネットワークによりシグナル入力を統合し分化運命を決定する基本原理の解明と、エピジェネティック制御が転写因子と協調して分化不可逆性を規定する基本原理の解明とに分けられる。

1 転写因子ネットワークによりシグナル入力を統合し分化運命を決定する基本原理の解明

LIF シグナル入力は、Jak-Stat3 経路と Akt-PI3K 経路を介して、異なる標的転写因子を活性化することにより、ES 細胞の自己複製を促進している(Niwa et al, Nature, 2009)。当初我々は Klf ファミリーと Tbx3 を標的転写因子として同定し、これらの機能解析を進めた。3 つの Klf ファミリーに属する転写因子(*Klf2*, *Klf4*, *Klf5*)が、多能性維持について重複して機能していることが、過去の研究において示唆されていた。我々は、まず *Klf2*, *Klf4*, *Klf5* の重複機能を厳密に解析するために、これら 3 つの遺伝子の組み合わせを網羅する誘導型ノックアウト ES 細胞を作成し、*Klf2/4/5* 三重欠損 ES 細胞のみが自己複製できないことから、これら 3 つの Klf ファミリーの重複機能が自己複製に必須であることを完全に証明した。さらに、Klf ファミリー以外の転写因子の組み合わせによる機能代償実験から、Klf ファミリーによる自己複製維持は、*Nanog*, *Tbx3*, *Esrrb* といった複数の転写因子の発現制御に帰結しうることを見出した。これらの結果は、naïve 型多能性を維持する転写因子ネットワークの構造を解明する上で重要な知見と考えている(Yamane et al, Development, 2018)。

これまでに得られた知見を踏まえて、改めて転写因子ネットワークの基本概念について整理した。転写因子ネットワークとは、複数の転写因子が相互に転写を制御し、これがシグナル入力を条件として安定化できる状態として定義される。この際、複数の転写因子は、スーパーエンハンサーなどの制御領域を介して、共通の標的遺伝子を協調的に制御する。この転写因子ネットワークは、分化に伴い別のネットワークへと遷移するが、この遷移する次の状態は、遷移前のネットワークと共有される転写因子が規定しうる。また、個々の転写因子の機能はネットワークにより規定される。このような考え方に基けば、転写因子の機能冗長性や、転写因子ネットワークの進化による進化的新奇性の獲得について、包括的な説明が可能となることを示した(Niwa, Development, 2018)。

2 マウス ES 細胞で発現する 2 細胞特異的遺伝子発現を制御する転写因子サブネットワークの解析

マウス ES 細胞の長期にわたる自己複製の維持には、*Zscan4* をはじめとする 2 細胞期関連遺伝子群の発現が、テロメア長の維持とゲノム安定性の維持に必要であることが報告されている。そこで我々は、この 2 細胞期関連遺伝子群の間歇的発現を制御する転写制御機構の解明に取り組んでいる。これまでに、転写因子 Nr0b1 は 2 細胞期関連遺伝子の発現頻度を適切に維持するための抑制因子として機能していること、細胞周期延長を伴うテロメア長の短縮が、*Zscan4* 発現の引き金となることを明らかにした(Fujii et al, Sci Rep, 2015; Futatsugi et al, Stem Cell Rep, 2016)。さらに、2 細胞期関連遺伝子の発現を誘導するマスター制御因子と考えられている *Dux* を欠損させた ES 細胞に薬剤誘導性 *Dux* 遺伝子を導入することにより、*Dux* による 2 細胞期関連遺伝子発現制御機構の検討を行った。この結果、外来性 *Dux* 遺伝子の持続的誘導が、一過性の *Zscan4* 遺伝子の発現を誘導することを見出した。*Dux* の発現が維持された状態であっても、*Zscan4* の発現は 9 時間目をピークとして減少したことから、2 細胞期関連サブネットワークに negative feedback loop が存在することが示唆された。そこで、*Zscan4* に遅れて一過性に活性化される 2 細胞期関連遺伝子として *Zfp352* を同定し、その機能を解析した。しかし、*Zfp352* の機能は想定される negative feedback loop において代償されうることが明らかになった(Lusubillo et al, Genes Cells, 2023)。

3 エピジェネティック制御が転写因子と協調して分化不可逆性を規定する基本原理の解明

ES 細胞においては、セントロメアとテロメア領域を除き、クロマチンが開いた状態に維持されているが、この特殊な状態を維持する機構は明らかではない。我々は、ES 細胞で高発現するヒストンアセチル化酵素 *Myst2* と *Myst4* に着目し、これらの機能解析を行った。その結果、*Myst2* 欠損 ES 細胞は、血清含有培養では増殖能の低下を示し、この表現型は *Myst4* 欠損を組み合わせたことにより増強した。一方で、ES 細胞においても *Myst2* はこれまで報告されていた他の細胞種と同様の組成の複合体を形成していた。そこで、全ての *Myst* 複合体の機能を検証するために、*Myst* 複合体に共通して含まれる因子である *Meaf6* について誘導型ノックアウト ES 細胞を作成し、その機能を解析した。すると、*Meaf6* 欠損 ES 細胞は、培養条件に依存せず完全に増殖を停止した。興味深いことに、*Meaf6* 欠損はヒストンアセチル化にはほとんど影響を与えなかったが、*Myst2* と PHD finger 因子(*Jade1*, *Brpf3* など)との相互作用を増強した。これより、*Meaf6* には、*Myst* 複合体の stoichiometry 制御能があることを明らかにした(Matsuura et al, Exp Cell Res, 2020)。

論文目録 Publications

1. Mwalilino, L., Yamane, M., Ishiguro, K., Usuki, S., Endoh, M. and Niwa, H.: The role of Zfp352 in the regulation of transient expression of 2-cell specific genes in mouse embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 28, 831-844, 2023. Doi: [10.1111/gtc.13070](https://doi.org/10.1111/gtc.13070)
2. Shimada, R., Kato, Y., Takeda, N., Fujimura, S., Yasunaga, K.I., Usuki, S., Niwa, H., Araki, K. and Ishiguro, K.I.: STRA8-RB interaction is required for timely entry of meiosis in mouse female germ cells. *Nat Commun*, 14, 6443, 2023. Doi: [10.1038/s41467-023-42259-6](https://doi.org/10.1038/s41467-023-42259-6)
3. Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., Araki, K., Takemoto, K., Ishiguro, K.I., Aoki, H., Kato, Y. and Kojima, M.: The polyol pathway is an evolutionally conserved system for sensing glucose uptake. *PLOS Biol*, 20, e3001678, 2022. Doi: [10.1371/journal.pbio.3001678](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001678)
4. Horisawa-Takada, Y., Koderu, C., Takemoto, K., Sakashita, A., Horisawa, K., Maeda, R., Shimada, R., Usuki, S., Fujimura, S., Tani, N., Matsuura, K., Akiyama, T., Suzuki, A., Niwa, H., Tachibana, M., Ohba, T., Katabuchi, H., Namekawa, S.H., Araki, K. and Ishiguro K.I.: Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis. *Nat Commun*, 12, 3184, 2021. Doi: [10.1038/s41467-021-23378-4](https://doi.org/10.1038/s41467-021-23378-4)
5. Naganuma, H., Miike, K., Ohmori, T., Tanigawa, S., Ichikawa, T., Yamane, M., Eto, M., Niwa, H., Kobayashi, A. and Nishinakamura, R.: Molecular detection of maturation stages in the developing kidney. *Dev Biol*, 470, 62-73, 2021. Doi: [10.1016/j.ydbio.2020.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.11.002)
6. Matsuura, K., Tani, N., Usuki, S., Torikai-Nishikawa, S., Okano, M. and Niwa, H.*: MEAF6 is essential for cell proliferation and plays a role in the assembly of KAT7 complexes. *Exp Cell Res*, 396, 112279, 2020. Doi: [10.1016/j.yexcr.2020.112279](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112279)
7. Tenjin, Y., Matsuura, K., Kudoh, S., Usuki, S., Yamada, T., Matsuo, A., Sato, Y., Saito, H., Fujino, K., Wakimoto, J., Ichimura, T., Kohrogi, H., Sakagami, T., Niwa, H. and Ito, T.: Distinct transcriptional programs of SOX2 in different types of small cell lung cancers. *Lab Invest*, 2020. Doi: [10.1038/s41374-020-00479-0](https://doi.org/10.1038/s41374-020-00479-0)
8. Nasser, H., Adhikary, P., Abdel-Daim, A., Noyori, O., Panaampon, J., Kariya, R., Okada, S., Ma, W., Baba, M., Takizawa, H., Yamane, M., Niwa, H. and Suzu, S.: Establishment of bone-marrow-derived M-CSF receptor-dependent self-renewing macrophages. *Cell Death Discov*, 6, 63, 2020. Doi: [10.1038/s41420-020-00300-3](https://doi.org/10.1038/s41420-020-00300-3)

9. Hamidi, S., Nakaya, Y., Nagai, H., Alev, C., Kasukawa, T., Chhabra, S., Lee, R., Niwa, H., Warmflash, A., Shibata, T. and Sheng, G.: Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation. *Development*, 147, 2020. Doi: [10.1242/dev.184960](https://doi.org/10.1242/dev.184960)
10. Ishiguro, K., Matsuura, K., Tani, N., Takeda, N., Usuki, S., Yamane, M., Sugimoto, M., Fujimura, S., Hosokawa, M., Chuma, S., Ko, M., Araki, K. and Niwa, H.: MEIOSIN directs the switch from mitosis to meiosis in mammalian germ cells. *Dev Cell*, 52, 429-445, 2020. Doi: [10.1016/j.devcel.2020.01.010](https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.01.010)
11. Azami, T., Matsumoto, K., Jeon, H., Waku, T., Muratani, M., Niwa, H., Takahashi, S. and Ema, M.: Klf5 suppresses ERK signaling in mouse pluripotent stem cells. *PLoS One*, 13, e0207321, 2018. Doi: [10.1371/journal.pone.0207321](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207321)
12. Yamane, M., Ohtsuka, S., Matsuura, K., Nakamura, A. and Niwa, H.: Overlapping functions of Kruppel-like factor family members: targetting multiple transcription factors to maintain the naïve pluripotency of mouse embryonic stem cells. *Development*, 145, 2018. Doi: [10.1242/dev.162404](https://doi.org/10.1242/dev.162404)

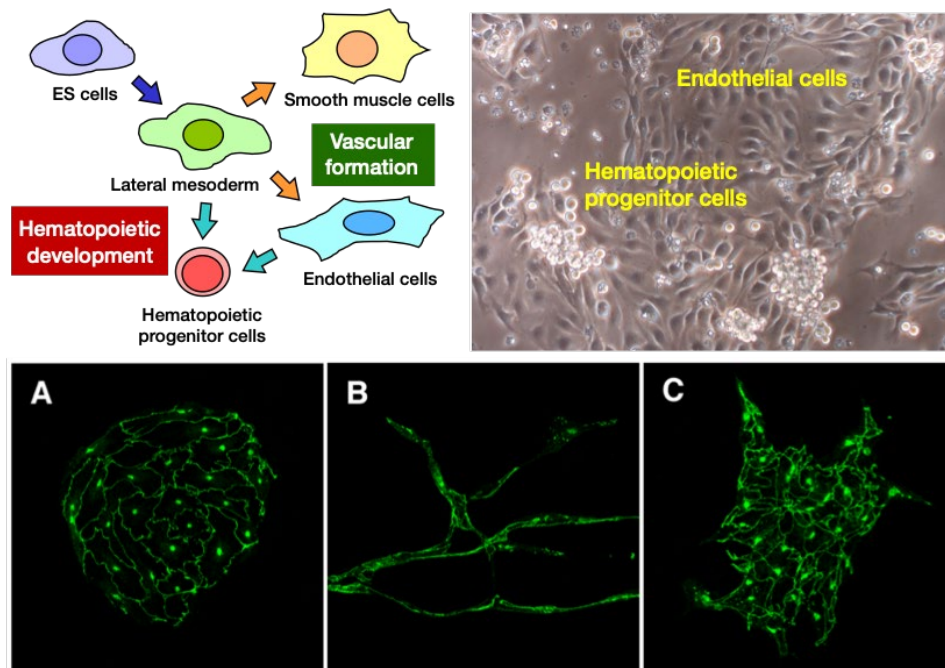
著書・総説目録 Publications

1. Niwa, H. and Mwalilino, L.: Ensemble of old and new techniques escorts ESCs to bona fide embryo-like structures. *Cell Stem Cell*, 29, 1423-1425, 2022. Doi: [10.1016/j.stem.2022.09.004](https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.09.004)
2. Endoh, M. and Niwa, H.: Stepwise pluripotency transitions in mouse stem cells. *EMBO Rep*, 23, e55010, 2022. Doi: [10.15252/embr.202255010](https://doi.org/10.15252/embr.202255010)
3. Niwa, H.: The principles that govern transcription factor network functions in stem cells. *Development*, 145, dev157420, 2018. Doi: [10.1242/dev.157420](https://doi.org/10.1242/dev.157420)

組織幹細胞分野 Department of Cell Differentiation

造血・血管システムが構築される仕組みを分子・細胞学的に解明することを目標として、胚性幹細胞の試験管内分化系を用い、造血幹細胞の自己複製能と多分化能が成立する機構、および血管系が形態的に組織化される機構について解析している。造血幹細胞の発生メカニズムを解明するために、胚性幹細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系の確立を目指している。血管形成に関わる増殖因子と転写因子の細胞生物学的作用を理解することにより、血管形成過程を制御する分子機構の解明を目指している。

We aim to unravel molecular and cellular mechanisms underlying the development of the hematopoietic and vascular systems. Using an *in vitro* differentiation system of murine embryonic stem cells, we are trying to identify the genetic program by which the hematopoietic stem cell's self-renewal capacity and multiple potentials are established. Our system also makes it possible to elucidate cell biological functions of angiogenic growth factors and transcription factors, providing a clue to how the morphogenic activity of endothelial cells is regulated by angiogenic stimuli to form a hierarchically organized vascular architecture.



Upper left: Schematic diagram of *in vitro* differentiation of ES cells into the hematopoietic and vascular lineages. **Upper right:** Hematopoietic and endothelial differentiation of ES cell-derived lateral mesodermal cells in culture. **Lower:** Morphological changes of ES cell-derived vascular endothelial cells. (A) Wild-type, unstimulated. (B) Wild-type, VEGF-stimulated. (C) *Foxo1*-deficient, VEGF-stimulated.

構成員 Staff (2024.3)

名前	職名	Name and Position
小川 峰太郎	教授	Minetaro Ogawa, Professor
古賀 沙緒里	助教	Saori Koga, Assistant Professor
鶴田 真理子	大学院生(博士)	Mariko Tsuruda, Graduate Student
杜 文瀟	研究生	Wenxiao Du, Research Student
高井 都至	学部生(医学部)	Satoshi Takai, Undergraduate Student
千々岩 照将	学部生(医学部)	Terumasa Chijiiwa, Undergraduate Student

元在籍者 Staff in the past (2018.4～2024.3)

名前	Name	在籍期間	在籍時職名
趙 雪宇	Xueyu Zhao	2021.4 - 2023.3	大学院生 (修士)
大崎 毅	Tsuyoshi Osaki	2021.4 - 2023.3	大学院生 (修士)
伊瀬知 里香	Rika Isechi	2021.4 - 2023.3	大学院生 (修士)
權藤 大輝	Daiki Gondo	2020.4 - 2022.3	大学院生 (修士)
荒木 愛	Ai Araki	2019.4 - 2021.3	大学院生 (修士)
清野 麻衣	Mai Kiyono	2018.4 - 2020.3	大学院生 (修士)
大城 将吾	Shogo Oshiro	2017. 12 - 2020. 3	学部生 (薬学部)
成富 未果	Mika Naritomi	2017.7 - 2021.3	学部生 (医学部)
Katrin Frenzel	Katrin Frenzel	2023.11 - 2023.12	インターン生

研究概略 Projects

1. 造血幹細胞の発生メカニズム

哺乳類の個体発生において、最初に胚体外卵黄嚢で起きる胚型赤血球の産生を胚型造血と呼ぶ。胚型造血よりやや遅れて発生し、胎仔肝を経て最終的に骨髄に定着する造血を成体型造血と呼ぶ。成体型造血には造血幹細胞に依存する系譜と依存しない系譜が存在する。卵黄嚢や胚体内内臓葉の造血性内皮細胞は造血幹細胞を経ずに成体型血液前駆細胞に分化することが近年明らかにされてきた (Yokomizo *et al.* 2022)。一方、造血幹細胞は胚体内の AGM (aorta-gonad-mesonephros) 領域において背側大動脈の造血性内皮細胞から発生する。まず造血性内皮細胞からプレ造血幹細胞が分化し、これが胎仔肝に移動して造血幹細胞に分化すると考えられている。本研究は、造血性内皮細胞と造血幹細胞の発生機序を明らかにし、マウス ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養法の開発を目指している。

1-1. 造血性内皮細胞の発生における BMP4 の機能

マウス ES 細胞から分化誘導した側板中胚葉細胞を OP9 ストロマ細胞と凝集させて培養すると、造血性内皮細胞と VE-cad⁺CD41⁺前駆細胞を順に経て、成体型血液細胞に効率よく分化する。この培養系に高濃度の BMP4 を添加すると、側板中胚葉細胞から造血性内皮細胞への分化が促進され、さらに VE-cad⁺CD41⁺前駆細胞の増殖も促進されることを見出した。BMP4 は ES 細胞の中胚葉細胞への分化を促進することが知られているが、造血性内皮細胞の発生を促進する作用もあることが明らかになった (Tsuruda *et al.* 2021)。ES 細胞から造血幹細胞への分化誘導を実現するために有用な知見である。

1-2. 造血幹細胞を経ないマスト細胞の新しい発生経路

花粉症などのアレルギー反応に関わるマスト細胞は、造血幹細胞が起源であると考えられている。マウス胚体から単離した造血性内皮細胞をマスト細胞に効率よく分化させる培養系を新たに確立した。この培養系では、マスト細胞は造血幹細胞を経ずに発生することを明らかにした。さらに、マウス胚体から単離した造血性内皮細胞を新生仔マウスの腹腔内へ移植すると、結合組織型マスト細胞に分化することを見出した。造血性内皮細胞が造血幹細胞の発生と無関係にマスト細胞を産生し、その一部が腹腔内マスト細胞に寄与する可能性が示唆された (Tsuruda *et al.* 2022)。マスト細胞の個体発生に関する新たな視点となり、マスト細胞の発生起源が組織内局在や細胞機能とどのように関係するか解明する手掛かりになると期待される。

1-3. 造血性内皮細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養系の開発

ES 細胞から造血幹細胞を分化誘導する培養条件を探索するために、マウス胚体から採取した造血性内皮細胞から造血幹細胞を誘導する培養条件を決定した。胎生 11 日齢 AGM のプレ造血幹細胞を Stem Cell Factor (SCF) とトロンプオエチン (TPO) の存在下に無血清培養し、長期骨髄造血再構築能を持つ造血幹細胞に分化させることに成功した。胎生 10 日齢 AGM の造血性内皮細胞は SCF と TPO に加えて血管内皮細胞株をフィーダー細胞として用いることにより、造血幹細胞へ分化誘導できることを見出した。造血幹細胞の発生に必要なシグナル因子の組み合わせが各発生段階で変化することが示唆される (Morino-Koga *et al.* 2024)。

2. 血管形成の細胞生物学的メカニズム

血管の発生は、血管芽細胞から分化した血管内皮細胞が原始的な血管叢を形成する脈管形成過程、既存の血管から新たな血管が出芽して階層性のある血管網へ発達する血管新生過程を経て進行する。ES 細胞から血管内皮細胞を分化誘導してコロニーを形成させる培養系は、細胞間接着・運動・細胞形態を詳細に観察し、血管新生を調節する様々な因子の細胞生物学的な役割を解明する優れたシステムである。本研究は、血管新生因子に応答した血管内皮細胞の細胞伸長のメカニズムを解明し、血管新生を細胞生物学的に制御する方法の開発を目指している (Tsuiji-Tamura *et al.* 2018)。

2-1. 血管内皮細胞における Tagln/SM22 の血管新生抑制機能

アクチン結合タンパクである Transgelin/SM22 は平滑筋細胞のマーカーとして知られているが、血管内皮細胞も SM22 を発現することを見出した。マウス ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は VEGF 刺激に応答して細胞伸長を起こすが、これに伴って SM22 プロモーターの活性化と内在性 SM22 タンパクの発現が上昇した。マウス胎仔肢芽の血管内皮細胞でも SM22 タンパクの発現が確認され、血管新生過程で血管内皮細胞が SM22 を発現することを始めて明らかにした。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において SM22 の 3 つのアイソフォームをノックダウンすると、VEGF 存在下での血管様構造の形成が促進されたことから、SM22 は血管新生を抑制する機能 (負のフィードバック) を持つことが明らかになった (Tsuiji-Tamura *et al.* 2021)。

2-2. Foxo1 による血管内皮細胞伸長促進の分子メカニズム

FOXO1 は細胞周期抑制やアポトーシス誘導などで役割を担う転写因子として知られている。Foxo1(-/-)マウスは血管新生の障害により胎生致死となること、Foxo1(-/-)マウス ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞は VEGF 存在下でも伸長することができず異常な形態を示すことから、血管新生における血管内皮細胞の伸長に FOXO1 が必須であることを既に報告していた。マウス ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を用いて、FOXO1 が血管内皮細胞の伸長を促進するための標的遺伝子を探索し、Ppp1r14c 遺伝子を特定した。PPP1R14C はミオシン軽鎖ホスファターゼ (MLCP) の触媒サブユニットである PP1 を阻害するタンパクであり、ミオシン軽鎖のリン酸化を促進する。ミオシン軽鎖のリン酸化は血管内皮細胞の伸長と血管新生に必要である。FOXO1 は PPP1R14C の発現を介して MLCP の活性を抑制し、血管内皮細胞におけるミオシン軽鎖のリン酸化と細胞伸長を促進することにより、血管新生を正に制御することを明らかにした。これは、FOXO1 を介した血管新生の新たな調節メカニズムを提唱するものであり、血管発生に関する理解の深化のみならず、臨床における血管新生制御技術の開発にも貢献するものと期待される (Tsuiji-Tamura *et al.* 2023)。

論文目録 Publications

1. Tsuji-Tamura, K. and M. Ogawa. FOXO1 promotes endothelial cell elongation and angiogenesis by up-regulating the phosphorylation of myosin light chain 2. *Angiogenesis* 26: 523-545, 2023. DOI: [10.1007/s10456-023-09884-7](https://doi.org/10.1007/s10456-023-09884-7)
2. Yokomizo, T., T. Ideue, S. Morino-Koga, C. Y. Tham, T. Sato, N. Takeda, Y. Kubota, M. Kurokawa, N. Komatsu, M. Ogawa, K. Araki, M. Osato and T. Suda. Independent origins of fetal liver hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature* 609: 779-784, 2022. DOI: [10.1038/s41586-022-05203-0](https://doi.org/10.1038/s41586-022-05203-0)
3. Tsuruda, M., S. Morino-Koga and M. Ogawa. Hematopoietic stem cell-independent differentiation of mast cells from mouse intraembryonic VE-cadherin⁺ cells. *Stem Cells* 40: 332-345, 2022. DOI: [10.1093/stmcls/sxac001](https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac001)
4. Tsuruda, M., S. Morino-Koga and M. Ogawa. Bone morphogenetic protein 4 differently promotes distinct VE-cadherin⁺ precursor stages during the definitive hematopoietic development from embryonic stem cell-derived mesodermal cells. *Exp. Hematol.* 103: 40-51.e7, 2021. DOI: [10.1016/j.exphem.2021.08.008](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2021.08.008)
5. Tsuji-Tamura, K., S. Morino-Koga, S. Suzuki and M. Ogawa. The canonical smooth muscle cell marker TAGLN is present in endothelial cells and is involved in angiogenesis. *J. Cell Sci.* 134: jcs254920, 2021. DOI: [10.1242/jcs.254920](https://doi.org/10.1242/jcs.254920)
6. Tsuji-Tamura, K. and M. Ogawa. Morphology regulation in vascular endothelial cells. *Inflamm. Regen.* 38: 25, 2018. DOI: [10.1186/s41232-018-0083-8](https://doi.org/10.1186/s41232-018-0083-8)

受賞 Awards

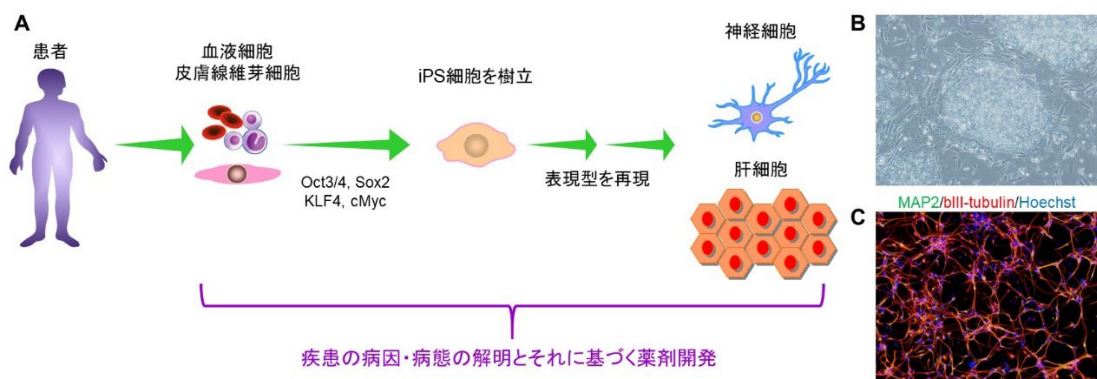
1. 鶴田真理子：第45回日本分子生物学会年会「Science Pitch Award」、「EMBO Science Pitch Prize」（演題名：マウス胎仔の造血性内皮細胞から造血幹細胞への試験管内分化誘導系の構築）2022.12（千葉）

幹細胞誘導分野

Department of Cell Modulation

私たちの教室では、多能性幹細胞の研究から得られた知見をもとに、新しい治療コンセプトの提供やそれに基づく薬剤開発を行い、新薬をベッドサイドへ届けること目標に研究を進めている。新たに開発したセンダイベクターを使い 100 疾患以上の疾患から iPS 細胞樹立を行い、リソース化し、数十施設の研究者へ配布すると共に、一部を細胞ライブラリーとして提供・登録している。疾患研究では、代謝酵素遺伝子の変異によって起こる先天代謝異常症や加齢性神経変性疾患や自己免疫疾患を中心に、iPS 細胞から疾患の標的である神経細胞や血管内皮細胞の誘導、機能解析、薬剤開発を行っている。独自に開発した試験管内神経シナプス機能解析法を使い、異常表現型を明らかとし、その原因の解明研究を進めている。また、数疾患において、薬剤を開発中である。一方、ES/iPS 細胞を使い間葉系幹細胞(MSC)の発生起源や分化経路を解明し、多能性幹細胞からの MSC の誘導方法を確立した。加えて、誘導した MSC 移植が疾患モデルマウスに対して有効であることを明らかとした。

In our laboratory, we are conducting research based on the knowledge gained from pluripotent stem cell research, providing new concepts and developing drugs for the treatments, with the goal of delivering new drugs to the bedside. Using the newly developed Sendai vector, we have established iPS cells from over 100 diseases, and have made them into a resource that will be distributed to researchers at dozens of facilities. In addition, we are providing and registering the disease-specific iPS cells as a cell library. In disease research, we are studying inborn errors of metabolism caused by mutations in metabolic enzyme genes, age-related neurodegenerative diseases, and autoimmune diseases, including induction of target cells from iPS cells, functional analysis, and drug development. Our study revealed the abnormal phenotype using an originally developed in vitro method for analysis of neuronal synaptic function. We are also investigating the causes of the abnormal phenotypes and developing drugs for several diseases. On the other hand, using ES/iPS cells, we have elucidated developmental origins and differentiation pathways of mesenchymal stem cells (MSCs), established the induction method from ES/iPS cells to MSCs, and demonstrated that the MSC transplantation is effective in treating disease model mice.



疾患研究の概要図(A)、iPS細胞のコロニー(B)とiPS細胞由来の神経細胞(C)

構成員 Staff (2024.3)

名前	職名	Name and Position
江良 択実	教授	Takumi Era, Professor
沼川 忠広	助教	Tadahiro Numakawa, assistant professor
横内 裕二	研究員	Yuji Yokouchi, Researcher
Jing Pu	研究員	Jing Pu, Researcher
堀田 知里	技術補佐員	Tisato Horita, Technical assistant
張 雨萌	大学院生	Yumeng Zhang, Graduated student
Lee Ki-Seok	大学院生	Lee Ki-Seok, Graduated student

元在籍者 Staff in the past (2018.4～2024.3)

名前	Name	在籍期間	在籍時職名	転出先
曾我 美南	Minami Soga	2009.4-2022.3	大学院生、研究員、助教	熊本大学大学院 先端機構
白井 玲美奈	Remina Shirai	2019.4-2022.3	研究員	東京薬科大学・ 特任助教
小高 陽樹	Youki Odaka	2015.6-202.3	大学院生、研究員	産総研・研究員
渡部 佐耶加	Sayaka Watanabe	2016.5-2019.5	研究員	製薬企業
伊住 真央	Mao Isumi	2018.4-2020.3	大学院生	製薬企業
松下 紘三	Kouzo Matsushita	2016.6-2019.9	大学院生、研究員	熊大整形外科
眞下 容子	Youko Mashimo	2015.4-2019.3	大学院生	
江藤 真哉	Shinya Eto	2014.10-2018.9	大学院生	ベンチャー企業
徳田 雄平	Yuhei Tokuda	2014.2-2019.3	医学部学生	広島市民病院

研究概略 Projects

1. 難治性疾患からの iPS 細胞の樹立、バンク登録と全国の研究施設への配布

難病の患者難病の患者より iPS 細胞樹立用の皮膚由来線維芽細胞(124 疾患、366 症例)と血液細胞(94 疾患、187 症例)の樹立と収集を行った。このうち、皮膚由来線維芽細胞から、74 疾患 156 症例の、血液細胞から 54 疾患、89 症例の難病由来 iPS 細胞(1 症例から 10 株程度、合計 2,450 株以上)を樹立した。令和 4 年度、5 年度には、19 疾患、50 例から樹立した iPS 細胞 50 株を新たに理研 BRC に登録し、以前から登録したものと合わせて、のべ 167 株の疾患由来 iPS 細胞を登録済である。これらの iPS 細胞は、理研 BRC からの配布以外でも、すでに全国の研究施設や企業（総数 40 施設以上）への配布を行った。

2. iPS 細胞を用いた疾患研究

先天代謝異常症とは、糖質代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝の経路、いずれかの異常によって起こる、組織・臓器障害の総称である。主に代謝酵素の遺伝子変異による活性低下が原因である。多くが中枢神経障害を症状にもち、その重症度が予後を左右する。この中でも脂質代謝異常である GM1 ガングリオシドーシス(GM1G)、テイ・サック病(TSD)、シアリドーシス(SD)、ゴーシェ病(GD)、ニーマンピック病 C 型(NPC)を主に研究している。これらの疾患では、欠損酵素やトランスポーターの基質である中間代謝物質の体内での蓄積や上昇が起こる。頻度はそれぞれ 1-2 人/10 万人であり、合わせて、国内に 500 名以上の患者がいると推定される。加えて、アルツハイマー病や強皮症などの研究を行っている。

2-1. 神経シナプス機能の異常

神経細胞の誘導方法を確立し、誘導した神経細胞のシナプス機能をイメージングによる解析する方法を確立した。前シナプスでの神経伝達物質放出能の極端な低下という共通の機能異常表現型を GM1G、TSD、SD にて明らかとした。この表現型はモデルマウスの初代培養の神経細胞でも見られた。加えて、SD にて、後シナプスでのカルシウム動態の過剰な反応という機能異常表現型を明らかとした。GM1G では、正常神経細胞に原因酵素の基質を加えて蓄積させることで、これらの表現型を再現できるので、中間代謝物質の蓄積がこの異常機能や細胞死の原因となっていることを明らかとした。また、GM1G にて、細胞死抑制や蓄積物質減少効果をもつ化合物がシナプス機能異常を改善させることも明らかとした。

2-2. シナプス機能異常の分子機序の解明

SD では、遺伝子発現解析やシナプス分画(シナプトソーム)の網羅的プロテオーム解析から、シナプス構成分子やシナプス小胞の輸送に関連する分子 (SNARE 蛋白)の有意な発現低下と糖エネルギー代謝に関与する酵素の有意な低下が見られた。糖エネルギー代謝については、グルコース依存性の ATP の産生の低下や糖代謝阻害剤にて正常神経細胞に同様のプレシナプス機能低下を引き起こすことから、シナプスにおいて、糖エネルギー代謝能の低下が機能異常の一因となっていることを明らかとした。一方、カルシウム過剰反応では、イオン共役型グルタミン酸受容体とカルシウムチャネルの発現異常が関与していることが示唆

された。

3. 薬剤開発

先天代謝異常症を中心に他疾患も加えて、6 疾患において、モデル細胞での効果をもつ候補 3 剤、モデル動物での有効性確認済 3 剤、治験薬剤 2 剤(他施設共同医師主導治験中)、計 8 剤を開発中である。先天代謝異常症では、中間代謝物蓄積抑制が治療効果を生むという新コンセプトのもと、中間代謝物の蓄積を可視化した化合物スクリーニング系(HTS)を複数疾患で樹立した。これらの HTS と神経細胞での異常表現型を効果判定に用い、既知薬ライブラリーから、複数のヒット薬を同定した。このヒット薬は、神経細胞での GM1 ガングリオシドの蓄積を有意に減少させて、試験管内でのシナプス機能を改善させることから、GM1G の治療薬候補となりえることを明らかとした。さらに、NPC では新たなデキストリン化合物が疾患モデルマウスの神経障害による運動機能障害の進行を抑制し、生存期間を延長もさせて、生命予後の改善効果があることを明らかとした。

4. 遺伝子修復(ゲノム編集法)の研究

ヒトのゲノムには 遺伝病の原因となる約 4 万の疾患特異的一塩基多様体(single nucleotide variants, SNV)が存在し、それらが単独または複数が組み合わさることで何らかの遺伝性疾患が発症する。疾患 SNV のゲノム修復医療実現への第一歩として、疾患特異的 iPS 細胞におけるアレル特異的一塩基置換法 One-SHOT を開発した。CORRECT, MhAX などの従来法では 2 回の遺伝子操作が必要であったが、本法は、1. 一回の遺伝子操作使用、2. 編集済クローンを識別するための新しい一塩基ミスマッチ検出 PCR 法の開発、3. 薬剤耐性遺伝子の一時的発現による遺伝子導入クローンで、実施・終了できる。加えて、4. 一塩基変異を識別する高い標的識別能をもつ新しい編集ツールの濃縮、5. マスタープレート維持による培養操作の省力化、6. 鋳型として ssODN の使用、といった構成要素を組み合わせることで、実施時間とコストを従来法の 1/3 程度に短縮・減少させた。

5. 間葉系幹細胞の研究

間葉系幹細胞は成体の骨髄や脂肪組織に広く分布し、線維芽細胞状の形態をもち、試験管内にて増殖可能な組織幹細胞である。この細胞は、骨、軟骨、脂肪細胞に分化できる能力を持ち、それ以外にも、筋肉細胞など様々な間葉系細胞へ分化する能力をもっている。成体の骨髄や脂肪組織に存在する間葉系幹細胞は、胎生期中胚葉にその起源があることを、遺伝子改変マウスを使い明らかとした。また胎生期には、神経上皮細胞や神経堤細胞から生まれる間葉系幹細胞も認められるが、出生後急速に消失することも明らかとした。これらの発生学的新知見をもとに、ヒト iPS 細胞から異なる 2 つの中胚葉と神経上皮由来間葉系幹細胞を誘導することに成功した。2 つの間葉系幹細胞は、褥瘡や変形性関節症モデルマウスへの治療効果を有するが、その効果が異なる。この原因の 1 つが 2 つの幹細胞の分泌する分泌因子の差によることを明らかとした。

論文目録 Publications

1. Yue F, Era T, Yamaguchi T and Kosho T. Pathophysiological Investigation of Skeletal Deformities of Musculocontractural Ehlers-Danlos Syndrome Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Genes*, 14: 730, 2023.
2. Ishi Y, Era T, Yuzawa S, Okamoto M, Sawaya R, Motegi H, Yamaguchi S, Terasaka S, Houkin K and Fujimura M. Analysis of induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with mosaic neurofibromatosis type 2. *Am J Med Genet*. 188:1863-1867, 2022.
3. Umemoto T, Johansson A, Al Ahmad S, Hashimoto M, Kubota S, Kikuchi K, Odaka H, Era T, Kurotaki D, Sashida G and Suda T. ATP citrate lyase controls hematopoietic stem cell fate and supports bone marrow regeneration. *EMBO J*. 41:e109463, 2022.
4. Nishida T, Yokoyama R, Kubohira Y, Maeda Y, Takeo T, Nakagata N, Takagi H, Ishikura K, Yanagihara K, Misumi S, Kishimoto N, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Soga M, Era T, Onodera R, Higashi T, Motoyama K. Lactose-Appended Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Lowers Cholesterol Accumulation and Alleviates Motor Dysfunction in Niemann-Pick Type C Disease Model Mice. *ACS Appl Bio Mater*. 5:2377-2388, 2022.
5. Monde K, Satou Y, Goto M, Uchiyama Y, Ito J, Kaitsuka T, Terasawa H, Monde N, Yamaga S, Matsusako T, Wei FY, Inoue I, Tomizawa K, Ono A, Era T, Sawa T, Maeda Y. Movements of Ancient Human Endogenous Retroviruses Detected in SOX2-Expressing Cells. *J. Virol*. 96:e0035622, 2022.
6. Bilal M, Nawaz A, Kado T, Aslam MR, Igarashi Y, Nishimura A, Watanabe Y, Kuwano T, Liu J, Miwa H, Era T, Ikuta K, Imura J, Yagi K, Nakagawa T, Fujisaka S, Tobe K. Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet. *Mol Metab*. 54:101328. 2021.
7. Saito R, Miyajima T, Iwamoto T, Wu C, Suzuki K, Hossain MA, Munakata M, Era T, Eto Y. A neuropathological cell model derived from Niemann-Pick disease type C patient-specific iPSCs shows disruption of the p62/SQSTM1-KEAP1-NRF2 Axis and impaired formation of neuronal networks. *Mol Genet Metab Rep*. 28:100784, 2021.
8. Yamada Y, Ishitsuka Y, Kondo Y, Nakahara S, Nishiyama A, Yakeo T, Nakagata N, Motoyama K, Higashi T, Arima H, Kamei S, Shuto T, Kai H, Hayashino Y, Sugita M, Kikuchi T, Hirata F, Miwa T, Takeda H, Orita Y, Seki T, Ohta T, Kurauchi Y, Katsuki H, Matsuo M, Higaki K, Ohono K, Matsumoto S, Era T and Irie T. Differential mode of cholesterol inclusion with 2-hydroxypropyl-cyclodextrins impacts safety margin in treating Niemann-Pick disease type C. *Br J Pharmacol*. 178: 2727-2746, 2021.
9. Odaka H, Numakawa T, Soga M, Kido J, Matsumoto S, Kajihara R, Okumiya T, Tani N, Tanoue Y, Fukuda T, Furuya H, Inoue T and Era T. An iPSC-based neural model of sialidosis uncovers glycolytic impairment-causing presynaptic dysfunction and deregulation of Ca²⁺dynamics. *Neurobiol Dis*. 152: 105279, 2021.
10. Ohmori T, DeI S, Tanigawa S, Miike K, Islam M, Soga M, Era T, Shiona S, Nakanishi K, Nakazato H and Nishinakamura R. Impaired NEPHRIN localization in kidney organoids derived from nephrotic patient iPS cells. *Sci Rep*. 11: 3982, 2021.

11. Homma K, Toda E, Osada H, Nagai N, Era T, Tsubota K, Okano H and Ozawa Y. Taurine rescues mitochondria-related metabolic impairments in the patient-derived induced pluripotent stem cells and epithelial-mesenchymal transition in the retinal pigment epithelium. *Redox Biol.* 101921, 2021.
12. Katagami Y, Kondo T, Suga M, Yada Y, Imamura K, Shibukawa R, Sagara Y, Okanishi Y, Tsukita K, Hirayama K, Era T and Inoue H. Generation of a human induced pluripotent stem cell line, BRCi009-A, derived from a patient with glycogen storage disease type 1a. *Stem Cell Res.* 49:102095, 2020.
13. Kajihara R, Numakawa T, Odaka H, Yaginuma Y, Fusaki N, Okumiya T, Furuya H, Inui S and Era T. Novel drug candidates improve ganglioside accumulation and neural dysfunction in GM1 gangliosidosis models with autophagy activation. *Stem Cell Rep.* 14:909-923, 2020.
14. Yokouchi Y, Suzuki S, Ohtsuki N, Yamamoto K, Noguchi S, Soejima Y, Goto M, Ishioka K, Nakamura I, Suzuki S, Takenoshita S and Era T. Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing. *Sci Rep.* 10: 13927, 2020.
15. Matsushita K, Numakawa T, Odaka H, Kajihara R, Soga M, Ozasa S, Nakamura K, Mizuta H and Era T. Presynaptic Dysfunction in Neurons Derived from Tay-Sachs iPSCs. *Neuroscience.* 414: 128-140, 2019.
16. Tanigawa S, Naganuma H, Kaku Y, Era T, Sakuma T, Yamamoto T, Taguchi A and Nishinakamura R. Activin Is Superior to BMP7 for Efficient Maintenance of Human iPSC-Derived Nephron Progenitors. *Stem Cell Rep.* 13:322-337, 2019.
17. Maeda Y, Motoyama K, Nishiyama R, Higashi T, Onodera R, Nakamura H, Takeo T, Nakagata N, Yamada Y, Ishitsuka Y, Kondo Y, Irie T, Era T and Arima H. In vivo Efficacy and Safety Evaluation of Lactosyl- β -cyclodextrin as a Therapeutic Agent for Hepatomegaly in Niemann-Pick Type C Disease. *Nanomaterials.* 9: E802, 2019.
18. Kuboyama T, Yagi K, Naoi T, Era T, Yagi N, Nakasato Y, Yabuuchi H, Takahashi S, Shinohara F, Iwai H, Koubara-Yamada A, Hasegawa K, Miwa A. Simplifying the Chemical Structure of Cationic Lipids for siRNA-Lipid Nanoparticles. *ACS Med Chem Lett.* 10: 749-753, 2019.

著書・総説目録 Publications

1. Kajihara R, Numakawa T and Era T. Rapid and Simplified Induction of Neural Stem/Progenitor Cells (NSCs/NPCs) and Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs). *Bio protoc.* 11: e3914, 2021.
2. Kido J, Nakamura K and Era T. Role of induced pluripotent stem cells in lysosomal diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* 108: 103540, 2020.

その他（招待講演・受賞・報道・特許・アウトリーチ活動など）

招待講演、シンポジウム等

1. 江良択実. ライソゾーム病の新規異常表現型の解析と薬剤開発. 第63回日本先天代謝

異常学会学術集会、2022 年 11 月 24 日、招待講演.

2. Takumi Era Deviation and differentiation in mesenchymal stem cell. Online Trial Meeting Symposium “Stem-ness across plant and animal kingdoms ~their similarities and differences~” 2020 年 9 月 24-25 日 第 53 回日本発生生物学会年会
3. Kajihara R., Numakawa T., Odaka H., Okumiya T., Furuya H., Era T. Drug development for GM1 gangliosidosis using the patient-derived iPS cells. 第18回 日本再生医療学会総会、2019年3月21日-23日
4. Odaka H. and Takumi Era. Patient-specific iPSC-based disease model of sialidosis revealed synaptic dysfunction in neurons. Joint Symposium with Molecular Neurodegeneration - Meet the Editors-in-Chief -, 2019年3月5日
5. Takumi Era, Derivation, Induction and Gene manipulation in Mesenchymal Stem Cell. The 25th Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy. Symposium 5 “Cardiovascular diseases and Regenerative Medicine”. 23ed July, 2019. Tokyo.
6. 江良沢実 “iPS 細胞/幹細胞が拓く最新医学研究” 疾患由来 iPS 細胞を使った疾患解析と薬剤開発、第 67 回日本輸血・細胞治療学会学術総会、シンポジウム 4 2019 年 5 月 23 日
7. 江良沢実、iPS細胞を使った難治性疾患研究、東北大学シンポジウム iPS細胞研究の最前線と倫理問題、2019年2月12日

市民講座等

1. 江良沢実 熊本県難病相談・支援センターと共催の市民公開講座 iPS 細胞研究の現状と未来 2023 年 9 月 30 日
2. 江良沢実 熊本県難病相談・支援センターと共催の市民公開講座 iPS 細胞研究の現状と未来 2022 年 11 月 26 日
3. 江良沢実 熊本県難病相談・支援センターと共催の市民公開講座 iPS 細胞研究の現状と未来への希望について 2022 年 2 月 6 日
4. 江良沢実 市民公開講座、肥後医育を語る～最終回 戦後より現在を語る～ 2020 年 10 月 14 日、15 日、19 日、21 日、22 日
5. 江良沢実 iPS 細胞研究が拓く医療の未来 くまもと県民カレッジリレー講座「キャンパスパレア」、2019 年 8 月 29 日

特許

米国

発明の名称： コレステロール蓄積疾患治療薬、およびそのスクリーニング方法

特許番号： 第 10588921 号

イギリス、ドイツ、フランス

発明の名称： コレステロール蓄積疾患治療薬、およびそのスクリーニング方法

特許番号： 第 3078379 号

国内

発明の名称： アルツハイマー病予防剤又は治療剤、そのスクリーニング方法、及びアルツハイマー病予防用又は治療用組成物

登録番号 第 7445251 号

発明の名称： GM1 ガングリオシドーシス予防剤又は治療剤、及び GM1 ガングリオシドーシス予防用又は治療用組成物

登録番号 第 7333608 号

発明の名称： コレステロール蓄積疾患治療薬のスクリーニング方法

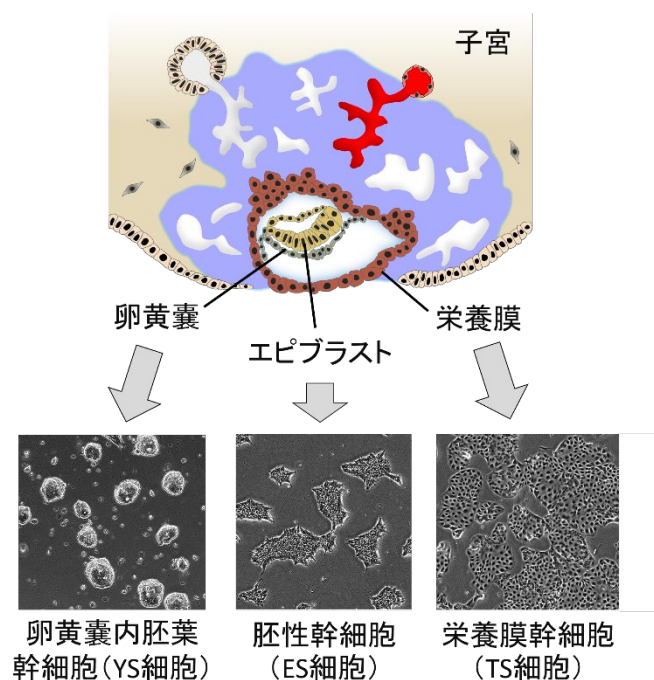
特許番号 第 6755495 号

胎盤発生分野

Department of Trophoblast Development

胎盤は胎児の生存・発育に欠かすことのできない臓器であり、その異常は流産や早産、胎児発育不全を含むさまざまな疾患の発症原因となる。胎盤は哺乳類の間で広く保存されているものの、その形態や構成細胞は極めて多様である。そのため、マウスなどの実験動物を用いて得られた結果をヒトへと外挿することは容易ではない。胎盤の主要な機能を担う細胞は栄養膜細胞と呼ばれ、栄養膜幹（TS）細胞より発生する。私たちは、2018年に世界で初めてヒト TS 細胞を試験管内で培養することに成功した。ヒト TS 細胞は、全ての栄養膜細胞系列への分化能を維持したまま半永久的に培養することが出来るため、ヒト胎盤の発生や機能を研究するための優れたモデルとなる。私たちの研究室では、ヒト TS 細胞に加え、ヒトの卵黄嚢を構成する上皮幹細胞の長期培養にも成功している。現在、これらの幹細胞培養技術を組み合わせることで、ヒトの初期発生の理解と試験管内再構築を目指している。

The placenta is essential for normal development of the fetus, and its abnormalities can cause various pregnancy complications. Although the placenta is conserved among mammals, its morphology and constituent cells are diverse. Thus, it is difficult to extrapolate the results obtained using mice to humans. Trophoblast cells in the placenta arise from trophoblast stem (TS) cells. We succeeded in the establishment of human TS cells in 2018. Human TS cells can proliferate without losing their ability to differentiate into all trophoblast lineages, making them an excellent model for studying placental development and function. Our laboratory has also succeeded in establishing a new stem cell line from the human yolk sac. We are trying to utilize these stem cell culture techniques to understand and reconstruct early human development in vitro.



構成員 Staff (2024.3)

名前	職名	Name and Position
岡江 寛明	教授	Hiroaki Okae, Professor
大池 輝	助教	Akira Oike, Assistant Professor
関谷 麻杜	特別研究員	Asato Sekiya, Postdoctoral researcher
古賀 愛子	事務補佐員	Aiko Koga, Administrative assistant

研究概略 Projects

私たちが初めて樹立に成功したヒト TS 細胞 (*Cell Stem Cell* 2018) を用い、ゲノム編集技術の開発、栄養膜細胞系列の運命決定機構の解析、疾患モデルの開発などを進めてきた。また、国内外の研究室にヒト TS 細胞を提供し、共同研究を実施している。具体的な研究成果を以下に示す。

1. ヒト胎盤の発生制御機構の解明.

ヒト TS 細胞は高い増殖能力をもつものの、遺伝子導入、抗生物質選択、シングルセルクローニングなどに対して極めて脆弱であった。そこで、ヒト TS 細胞の培養条件の改良を行った。その結果、BMP4 と高濃度の TGF β 阻害剤を培地に添加することで、安定的な遺伝子改変が可能であることを見出した。次に、新たな培養条件を用いて、ヒト TS 細胞における CRISPR スクリーニングを実施し、ヒト TS 細胞の増殖・分化を制御する遺伝子を網羅的に探索した。その結果、ヒト TS 細胞の増殖に関与する遺伝子を 221、絨毛外栄養膜細胞への分化に関与する遺伝子を 31、合胞体栄養膜細胞への分化に関与する遺伝子を 70 同定した。同定した遺伝子のうち、転写因子である GCM1 と DLX3 について個別にノックアウト TS 細胞を作製し、これらの転写因子がヒト栄養膜細胞の分化において中心的な役割を担うことを明らかにした。また、ノックアウト TS 細胞の RNA-seq、ヒストン修飾に対する ChIP-seq、H3K4me3 に対する HiChIP を実施し、GCM1 と DLX3 のターゲット遺伝子を推測した。さらに、ヒト TS 細胞における CRISPR スクリーニングによって得られた結果と、これまでに報告されている遺伝子改変マウスの表現型とを比較することで、①ヒトとマウスの TS 細胞の増殖に必要な転写因子には大きな違いが見られること、②ヒトとマウスの合胞体栄養膜細胞の分化はよく似た遺伝子によって制御されていること、③ヒトの絨毛外栄養膜に対応するマウスの栄養膜細胞は存在しない可能性が高いことなど、ヒトとマウスの栄養膜細胞の対応関係を明らかにした (*PNAS* 2023)。

2. 幹細胞を用いたヒトの初期発生研究.

マウスでは、ES 細胞から TS 細胞を誘導する系が確立されたことで (Niwa et al., *Cell* 2005 など)、栄養膜細胞の運命決定機構に関する研究が飛躍的に進んだ。一方、ヒトでは同様の分化誘導系は報告されていなかった。そこで、ヒト TS 細胞の培養条件を用い、ヒト ES/iPS 細胞から TS 細胞が誘導可能かどうかを検討した。その結果、ナীব型ヒト ES/iPS 細胞は TS 細胞へと自発的に分化できるが、プライム型 ES/iPS 細胞は分化できないことを見出した。このような表現型の違いの原因を探るため、WGBS、RNA-seq、miRNA-seq を行い、プライム型 ES/iPS 細胞では 19 番染色体上の miRNA クラスター(C19MC)が DNA メチル化によって抑制されていることを明らかにした。一方、ナীব型 ES/iPS 細胞や TS 細胞では、C19MC は脱メチル化状態にあった。ゲノム・エピゲノム編集技術を用いて C19MC のプロモーター領域を改変したところ、① C19MC が TS 細胞の維持および分化に必須であること、② C19MC を再活性化させたプライム型 ES/iPS 細胞は TS 細胞へと分化可能であることを突き止めた。また、C19MC に含まれる miRNA のターゲット遺伝子の予測を行い、p53 シグナルに関連する遺伝子群が濃縮されていることを明らかにした (*Nat Commun* 2022)。

私たちはヒト胎盤から TS 細胞を樹立する手法を確立したが、他の胚体外組織の幹細胞

はいまだ樹立されていない。そこで、私たちはヒト卵黄嚢および羊膜の長期培養系の確立にも取り組んでいる。胎盤、卵黄嚢、羊膜はいずれも上皮細胞と胚外中胚葉で構成されているため、胎盤、卵黄嚢、羊膜の上皮幹細胞はよく似た条件で培養可能ではないかと推測した。実際に、ヒト TS 細胞の培養条件を一部改変することで、ヒト卵黄嚢組織から Yolk sac endoderm stem cell (YS 細胞) を、ヒト ES/iPS 細胞から誘導した羊膜上皮様細胞から羊膜オルガノイドを樹立することに成功し、現在詳細な解析を進めている (未発表)。

3. ヒト TS 細胞を用いた疾患モデルの開発.

全胎状奇胎は、父親由来のゲノムのみを持つ雄核発生胚より生じ、栄養膜細胞の異常増殖を主な特徴とする。栄養膜細胞の異常増殖の原因を明らかにするため、疾患 TS 細胞を樹立した。まず、増殖能の解析を行ったところ、この細胞が接触阻害による細胞周期停止に対し抵抗性を示すことを明らかにした。さらに、RNA-seq や WGBS 解析による詳細な解析を行い、全胎状奇胎由来の TS 細胞では母方発現するインプリント遺伝子の発現が抑制されていることを確認した。さらに、正常な TS 細胞では、母方発現するインプリント遺伝子の一つである KIP2 (CDKN1C) の発現が細胞密度依存的に誘導されるのに対し、全胎状奇胎由来の TS 細胞では誘導が見られないことを突き止めた。ゲノム編集技術を用いて KIP2 をノックアウトした TS 細胞を作製したところ、全胎状奇胎由来の TS 細胞と同様に、接触阻害による細胞周期停止に対し抵抗性を示すことを見出した。また、全胎状奇胎由来の TS 細胞において KIP2 を強制発現させると、細胞周期の停止が誘導された。よって、全胎状奇胎由来の TS 細胞の増殖異常は、KIP2 の発現低下によって説明できることが明らかとなった。以上より、疾患 TS 細胞が妊娠合併症の研究に有用であることを実証した (PNAS 2019)。

多くの妊娠合併症は妊娠中期以降に発症するが、妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞を樹立する技術は確立されていない。そこで、リプログラミングの手法を用い、妊娠中期以降の胎盤から TS 細胞の誘導を試みた。まず、妊娠初期および満期の栄養膜細胞を単離し、遺伝子発現比較を行った。その結果、初期の栄養膜細胞で特異的に発現する転写因子を 3 種類同定した (HAND1, SALL4, ZFP42)。また、満期の栄養膜細胞を TS 細胞用の培地で培養とすると、細胞老化を起こす可能性が示唆された。そこで、同定した転写因子に加え、細胞老化を抑制する作用を持つ p53 のドミナントネガティブ変異体 (p53DN) を満期の栄養膜細胞に導入した。その結果、SALL4 と p53DN を導入した場合に限り、TS 細胞様の形態を示す細胞株が得られた。

次に、満期由来 TS 細胞が正常な染色体を維持しているかどうか確認するため、マイクロアレイを用いた SNP 解析を行った。その結果、11 番染色体短腕部位で、高頻度に LOH が観察された (7/11 症例)。さらに解析を進めたところ、LOH を示す細胞では、母親由来のアレルが欠損し、細胞周期を負に制御するインプリント遺伝子 KIP2 の発現が抑制されていることを見出した。そこで、SALL4 と p53DN に加え、KIP2 の発現を一時的に抑えるために shKIP2 を満期の栄養膜細胞に導入し、TS 細胞の樹立を行った。その結果、LOH がみられたのは、39 ライン中わずか 4 ラインと著しく減少した。よって、SALL4、p53DN、shKIP2 を組み合わせることで、満期胎盤から質の高い TS 細胞が樹立可能であることが明らかとなった。最適化したリプログラミングの条件を用いて、代表的な周産期合併症である妊娠高血圧腎症より疾患 TS 細胞を樹立し、病態の再現が可能かどうかについて検討を進めている (未発表)。

論文目録 Publications

1. Shibata, S., S. Endo, L. A. E. Nagai, H. Kobayashi E, **A. Oike**, N. Kobayashi, A. Kitamura, T. Hori, Y. Nashimoto, R. Nakato, H. Hamada, H. Kaji, C. Kikutake, M. Suyama, M. Saito, N. Yaegashi, **H. Okae**, and T. Arima. "Modeling Embryo-Endometrial Interface Recapitulating Human Embryo Implantation." *Sci Adv* 10, no. 8 (Feb 23 2024): eadi4819. <https://dx.doi.org/10.1126/sciadv.adi4819>.
2. Hori, T., **H. Okae**, S. Shibata, N. Kobayashi, E. H. Kobayashi, **A. Oike**, **A. Sekiya**, T. Arima, and H. Kaji. "Trophoblast Stem Cell-Based Organoid Models of the Human Placental Barrier." *Nat Commun* 15, no. 1 (Feb 8 2024): 962. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-45279-y>.
3. Shimizu, T., **A. Oike**, E. H. Kobayashi, **A. Sekiya**, N. Kobayashi, S. Shibata, H. Hamada, M. Saito, N. Yaegashi, M. Suyama, T. Arima, and **H. Okae**. "Crispr Screening in Human Trophoblast Stem Cells Reveals Both Shared and Distinct Aspects of Human and Mouse Placental Development." *Proc Natl Acad Sci USA* 120, no. 51 (Dec 19 2023): e2311372120. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2311372120>.
4. Varberg, K. M., E. M. Dominguez, B. Koseva, J. M. Varberg, R. P. McNally, A. Moreno-Irusta, E. R. Wesley, K. Iqbal, W. A. Cheung, C. Schwendinger-Schreck, C. Smail, **H. Okae**, T. Arima, M. Lydic, K. Holoch, C. Marsh, M. J. Soares, and E. Grundberg. "Extravillous Trophoblast Cell Lineage Development Is Associated with Active Remodeling of the Chromatin Landscape." *Nat Commun* 14, no. 1 (Aug 10 2023): 4826. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-40424-5>.
5. Frost, J. M., S. M. Amante, **H. Okae**, E. M. Jones, B. Ashley, R. M. Lewis, J. K. Cleal, M. P. Caley, T. Arima, T. Maffucci, and M. R. Branco. "Regulation of Human Trophoblast Gene Expression by Endogenous Retroviruses." *Nat Struct Mol Biol* 30, no. 4 (Apr 2023): 527-38. <https://dx.doi.org/10.1038/s41594-023-00960-6>.
6. Kuna, M., P. Dhakal, K. Iqbal, E. M. Dominguez, L. N. Kent, M. Muto, A. Moreno-Irusta, K. Kozai, K. M. Varberg, **H. Okae**, T. Arima, H. M. Sucov, and M. J. Soares. "Cited2 Is a Conserved Regulator of the Uterine-Placental Interface." *Proc Natl Acad Sci USA* 120, no. 3 (Jan 17 2023): e2213622120. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2213622120>.
7. Jeyarajah, M. J., G. Jaju Bhattad, R. D. Kelly, K. J. Baines, A. Jaremek, F. P. Yang, **H. Okae**, T. Arima, V. Dumeaux, and S. J. Renaud. "The Multifaceted Role of Gcm1 During Trophoblast Differentiation in the Human Placenta." *Proc Natl Acad Sci USA* 119, no. 49 (Dec 6 2022): e2203071119. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2203071119>.
8. Kobayashi, N., **H. Okae**, H. Hiura, N. Kubota, E. H. Kobayashi, S. Shibata, A. Oike, T. Hori, C. Kikutake, H. Hamada, H. Kaji, M. Suyama, M. L. Bortolin-Cavaille, J. Cavaille, and T. Arima. "The MicroRNA Cluster C19mc Confers Differentiation Potential into Trophoblast Lineages Upon Human Pluripotent Stem Cells." *Nat Commun* 13, no. 1 (Jun 2 2022): 3071. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-30775-w>.

9. Hada, M., H. Miura, A. Tanigawa, S. Matoba, K. Inoue, N. Ogonuki, M. Hirose, N. Watanabe, R. Nakato, K. Fujiki, A. Hasegawa, A. Sakashita, **H. Okae**, K. Miura, D. Shikata, T. Arima, K. Shirahige, I. Hiratani, and A. Ogura. "Highly Rigid H3.1/H3.2-H3k9me3 Domains Set a Barrier for Cell Fate Reprogramming in Trophoblast Stem Cells." *Genes Dev* 36, no. 1-2 (Jan 1 2022): 84-102. <https://dx.doi.org/10.1101/gad.348782.121>.
10. Kobayashi, E. H., S. Shibata, **A. Oike**, N. Kobayashi, H. Hamada, **H. Okae**, and T. Arima. "Genomic Imprinting in Human Placentation." *Reprod Med Biol* 21, no. 1 (Jan-Dec 2022): e12490. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12490>.
11. Muto, M., D. Chakraborty, K. M. Varberg, A. Moreno-Irusta, K. Iqbal, R. L. Scott, R. P. McNally, R. H. Choudhury, J. D. Aplin, **H. Okae**, T. Arima, S. Matsumoto, M. Ema, A. E. Mast, E. Grundberg, and M. J. Soares. "Intersection of Regulatory Pathways Controlling Hemostasis and Hemochorial Placentation." *Proc Natl Acad Sci USA* 118, no. 50 (Dec 14 2021). <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2111267118>.
12. Nagai, H., M. Okada, Y. Nagai, Y. Sakuraba, **H. Okae**, R. Suzuki, and S. Sugimura. "Abnormal Cleavage Is Involved in the Self-Correction of Bovine Preimplantation Embryos." *Biochem Biophys Res Commun* 562 (Jul 12 2021): 76-82. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.05.028>.
13. Varberg, K. M., K. Iqbal, M. Muto, M. E. Simon, R. L. Scott, K. Kozai, R. H. Choudhury, J. D. Aplin, R. Biswell, M. Gibson, H. **Okae, T.**, Arima, J. L. Vivian, E. Grundberg, and M. J. Soares. "Ascl2 Reciprocally Controls Key Trophoblast Lineage Decisions During Hemochorial Placenta Development." *Proc Natl Acad Sci USA* 118, no. 10 (Mar 9 2021). <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2016517118>.
14. Ruengsinpinya, L., T. Murakami, E. Nakamura, Y. Takahata, K. Hata, Y. Nakaminami, **H. Okae**, and R. Nishimura. "G Protein Subunit Beta1 Is an Important Mediator of the Late Stage of Endochondral Ossification." *Biochem Biophys Res Commun* 533, no. 1 (Nov 26 2020): 90-96. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.119>.
15. Castel, G., D. Meistermann, B. Bretin, J. Firmin, J. Blin, S. Loubersac, A. Bruneau, S. Chevolleau, S. Kilens, C. Chariou, A. Gaignerie, Q. Francheteau, H. Kagawa, E. Charpentier, L. Flippe, V. Francois-Campion, S. Haider, B. Dietrich, M. Knoefler, T. Arima, J. Bourdon, N. Rivron, D. Masson, T. Fournier, **H. Okae**, T. Freour, and L. David. "Induction of Human Trophoblast Stem Cells from Somatic Cells and Pluripotent Stem Cells." *Cell Rep* 33, no. 8 (Nov 24 2020): 108419. <https://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108419>.
16. Shibata, S., E. H. Kobayashi, N. Kobayashi, A. Oike, **H. Okae**, and T. Arima. "Unique Features and Emerging in Vitro Models of Human Placental Development." *Reprod Med Biol* 19, no. 4 (Oct 2020): 301-13. <https://dx.doi.org/10.1002/rmb2.12347>.
17. Cinkornpumin, J. K., S. Y. Kwon, Y. Guo, I. Hossain, J. Sirois, C. S. Russett, H. W. Tseng, **H. Okae**, T. Arima, T. F. Duchaine, W. Liu, and W. A. Pastor. "Naive Human Embryonic Stem Cells Can Give

- Rise to Cells with a Trophoblast-Like Transcriptome and Methylome." *Stem Cell Reports* 15, no. 1 (Jul 14 2020): 198-213. <https://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.003>.
18. Bhattacharya, B., P. Home, A. Ganguly, S. Ray, A. Ghosh, M. R. Islam, V. French, C. Marsh, S. Gunewardena, **H. Okae**, T. Arima, and S. Paul. "Atypical Protein Kinase C Iota (Pkclambda/Iota) Ensures Mammalian Development by Establishing the Maternal-Fetal Exchange Interface." *Proc Natl Acad Sci USA* 117, no. 25 (Jun 23 2020): 14280-91. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1920201117>.
 19. Jaju Bhattad, G., M. J. Jeyarajah, M. G. McGill, V. Dumeaux, **H. Okae**, T. Arima, P. Lajoie, N. G. Berube, and S. J. Renaud. "Histone Deacetylase 1 and 2 Drive Differentiation and Fusion of Progenitor Cells in Human Placental Trophoblasts." *Cell Death Dis* 11, no. 5 (May 4 2020): 311. <https://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-2500-6>.
 20. Murakami, T., L. Ruengsinpinya, E. Nakamura, Y. Takahata, K. Hata, **H. Okae**, S. Taniguchi, M. Takahashi, and R. Nishimura. "Cutting Edge: G Protein Subunit Beta 1 Negatively Regulates Nlrp3 Inflammasome Activation." *J Immunol* 202, no. 7 (Apr 1 2019): 1942-47. <https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1801388>.
 21. Dodo, M., H. Kitamura, H. Shima, D. Saigusa, S. M. Wati, N. Ota, F. Katsuoka, H. Chiba, **H. Okae**, T. Arima, K. Igarashi, T. Koseki, H. Sekine, and H. Motohashi. "Lactate Dehydrogenase C Is Required for the Protein Expression of a Sperm-Specific Isoform of Lactate Dehydrogenase A." *J Biochem* 165, no. 4 (Apr 1 2019): 323-34. <https://dx.doi.org/10.1093/jb/mvy108>.
 22. Hattori, H., H. Hiura, A. Kitamura, N. Miyauchi, N. Kobayashi, S. Takahashi, **H. Okae**, K. Kyono, M. Kagami, T. Ogata, and T. Arima. "Association of Four Imprinting Disorders and Art." *Clin Epigenetics* 11, no. 1 (Feb 7 2019): 21. <https://dx.doi.org/10.1186/s13148-019-0623-3>.
 23. Takahashi, S., **H. Okae**, N. Kobayashi, A. Kitamura, K. Kumada, N. Yaegashi, and T. Arima. "Loss of P57(Kip2) Expression Confers Resistance to Contact Inhibition in Human Androgenetic Trophoblast Stem Cells." *Proc Natl Acad Sci USA* (Dec 2 2019). <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1916019116>.

著書・総説目録 Publications

1. 「ヒト初期発生におけるエピジェネティクス」岡江寛明, 有馬隆博. 実験医学. 羊土社. 39:896-901 (2021)
2. 「ヒト胎盤発生と幹細胞」柴田峻, 岡江寛明, 有馬隆博. 生体の科学. 医学書院. 72:155-159 (2021)
3. 「ヒト栄養膜幹細胞と病態」小林枝里, 岡江寛明, 有馬隆博. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY. メディカルレビュー社. 28:213-218 (2021)
4. 「胎盤の遺伝子工学的応用 perinatal stem cell」岡江寛明, 有馬隆博. 基礎と臨床の両側面からみた胎盤学. メディカルレビュー社. 448:310-315 (2019)
5. 「ヒト栄養膜幹細胞の樹立」岡江寛明, 有馬隆博. 実験医学. 羊土社. 36:1375-1378 (2018)

その他（招待講演・受賞・報道・特許・アウトリーチ活動など）

招待講演

1. 「遺伝子からひも解くヒトとマウス胎盤の対応関係」岡江寛明. 第 68 回日本生殖医学会学術講演会. 2023 年 11 月 9 日
2. “Disease modeling with human trophoblast stem cells” H. Okae. The 18th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences. 2023 年 10 月 6 日
3. 「遺伝子機能にもとづくヒトとマウス胎盤の進化的対応関係の理解」岡江寛明. 第 41 回日本受精着床学会総会・学術講演会. 2023 年 7 月 28 日
4. “The microRNA cluster C19MC confers differentiation potential into trophoblast lineages upon human PSCs” H. Okae. IRCMS seminar "New Horizons in Developmental Biology" 2023 年 2 月 20 日
5. 「疾患特異的ヒト胎盤幹細胞の樹立」岡江寛明. 第 66 回日本生殖医学会学術講演会・総会. 2021 年 11 月 11 日
6. “Epigenetic restriction of human pluripotency by silencing of the chromosome 19 miRNA cluster” 岡江寛明. 第 43 回日本分子生物学会年会. 2020 年 12 月 3 日
7. 「分化全能性の消失に関わるインプリント遺伝子の同定」岡江寛明. 日本繁殖生物学会第 113 回大会. 2020 年 9 月 24 日
8. “Identification of an epigenetic barrier between human embryonic and trophoblast stem cells” H. Okae. 第 93 回日本生化学会大会. 2020 年 9 月 15 日
9. “Derivation of human trophoblast stem cells” H. Okae, T. Arima. Cold Spring Harbor Asia Conference, China. 2018 年 5 月 7 日

受賞

令和 2 年度 東北大学大学院教育貢献賞

報道

1. 「人工臓器で受精卵着床再現」熊本日新聞. 2024 年 2 月 27 日
2. 「東北大など、ヒト胎盤の発生や分化に必須な遺伝子を同定し制御機構を解明」日本経済新聞. 2022 年 6 月 13 日
3. 「東北大、ヒトの全胎状奇胎より胎盤幹細胞株を作製することに成功」日本経済新聞. 2019 年 12 月 3 日

特許

1. 「ヒト子宮内膜オルガノイドモデルを作成し、TS オルガノイドとの混合培養」有馬隆博、柴田峻、岡江寛明. PCT/JP2021/030100. 2021 年 8 月 18 日
2. 「胎盤細胞の機能を評価する細胞培養装置」堀武志、梶弘和、天野倉大成、岡江寛明、有馬隆博. PCT/JP2021/020598. 2021 年 5 月 31 日
3. 「胎盤オルガノイド及びその作製方法」堀武志、梶弘和、岡江寛明、有馬隆博. 特願 2021-032926. 2021 年 3 月 2 日出願

4. 「疾患(満期胎盤由来)TS細胞の作製方法」有馬隆博、岡江寛明. PCT/JP2020/277665.
2020年7月17日出願

集会の主催

1. 新学術領域「全能性プログラム」若手勉強会. 2022年7月6日～7日
2. 第42回日本分子生物学会年会 ワークショップ「生命のゆりかご胚体外の発生とエピゲノム」2019年12月5日
3. 日本発生生物学会 2023年大会組織委員会メンバー