

「ヒト多能性幹細胞を用いた性差・多様性に基づく分化研究」

【研究概要】

ヒトは多様な遺伝的な背景をもつ生物であり、遺伝的背景は疾患をはじめとする様々な細胞の機能に影響を与える。ヒトの多様性の中でも“性差”は、最も大きな素因の1つである。これまでに、ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS細胞: human Pluripotent Stem Cell: hPSC) の誕生によって、体を構成するほぼ全ての細胞をin vitroで作出することが可能となり、ヒトの生物学的知見を深めるだけでなく、再生医療、創薬スクリーニングなどの応用的な側面にも、遺伝的背景を考慮した研究が可能となっている。

2014年のNature詩では、米国NIHがヒト細胞や動物実験において“性差”の影響を考慮する必要があると報告した。しかし、これまでの殆どの研究では、実験動物を含め、“性差”が細胞の分化能や機能にどのように影響を及ぼしているのかを明確に示した報告は数少ない。特に、hPSCは“性差”を考慮した研究ツールとしては最適であるにも関わらず、解析が女性 (XX型) hPSC特有のエピゲノム異常によって不可能となっている。

通常、XX型のヒト細胞は、2対あるX染色体のうち一方を抑制する、X染色体不活化 (X-Chromosome Inactivation: XCI) 機構が備わっており、XXとXY細胞のX染色体遺伝子量補正を行っている。しかし、XX型のヒト多能性幹細胞では、培養により必ずXCIが不可逆的に破綻し、vivoには存在しない細胞状態となる。XCIの破綻から、XX型のヒトES/iPS細胞は、癌細胞様の遺伝子発現状態となるだけでなく、X連鎖疾患の病態モデリングが不可能となる。その結果、多くの研究者はXY型のhPSCを好んで使用するのが現状である。従って、細胞の分化能や機能研究においてヒトの“性差”を正しく評価することが不可能であり、真に男女平等にhPSCを活用することが出来ない。

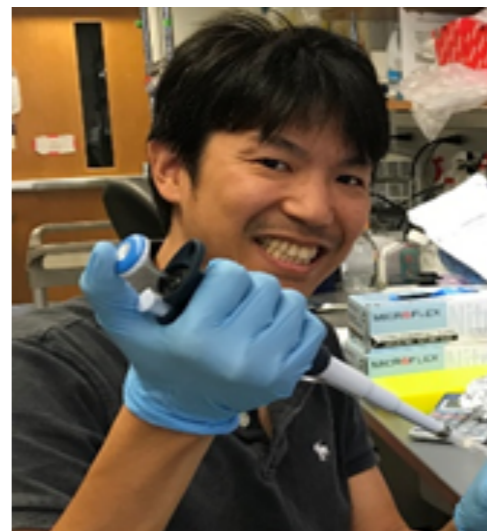
本研究では、ヒトの“性差”が及ぼす分化能や機能差をヒトES/iPS細胞を用いて解明し、ヒトの多様性を性差の観点から明らかにすることを目標とする。ゲノム編集技術や3Dオルガノイド分化、次世代シーケンサー解析など統合的解析を通じて、ヒトの多様性、性差の影響をヒトES/iPS細胞の転写やエピゲノム状態に基づき理解することで、ヒト多能性幹細胞における創薬開発や病態モデリングの有用性向上を目指す。

【研究成果】

これまでに、計11のヒト多能性幹細胞株 (7つの女性 (XX型) 株、4つの男性 (XY型) 株) に対し運動神経分化実験を行い、その分化能を評価した。特にXX型では、X染色体不活化の影響を考慮した解析から、多くの株においてX染色体不活化の有無が運動神経分化能に影響を及ぼすことが明らかとなった。即ち、性差を考慮したヒト多能性幹細胞の分化能評価において、X染色体不活化の影響は極めて重要なファクターとなることが示された。多能性細胞における性差やX染色体不活化の影響をin vivoとエビデンスに基づく知見から捉えるべく、Xist遺伝子欠損マウスにおけるトランスクリプトームデータやシングルセル定量PCRデータを再解析した。その結果、in vivoにおいても特定の細胞系譜にはX染色体不活化に起因する性差の違いがあることを明らかにした (Fukuda et al. FEBS Letter. 2019)。これらの結果から、ヒト多能性幹細胞で見られた性差における分化能の差異は、X染色体不活化の影響を受けることがin vivoレベルでも生じることが明らかとなった。一方、XX型、XY型のそれぞれの細胞株間においても神経発生能のバラつきは生じ、個体差の影響が明らかとなった。これらの特徴を多能性幹細胞レベルで評価すべく、一部の株はシングルセルトランスクリプトーム解析を行った。その結果、ある株ではX染色体不活化か細胞のHeterogeneityを規定する因子であることが明らかとなった。本解析は、一部のヒト多能性幹細胞株で行われているため、次年度以降に全株を対象に実施し、神経分化能との統合解析を進める。XX型のヒト多能性幹細胞では、通常の培養環境下においてX染色体不活化の消失が避けられない。近年の研究では、Lnc RNA XACTがX染色体不活化の消失に伴うX染色体活性化に影響することが示唆されていることから、本年度はゲノム編集技術を用いて機能解析を行った。XACT遺伝子の欠損では、X染色体不活化の再獲得は観察されず、X染色体遺伝子群の発現量にも影響がないことが明らかとなった。

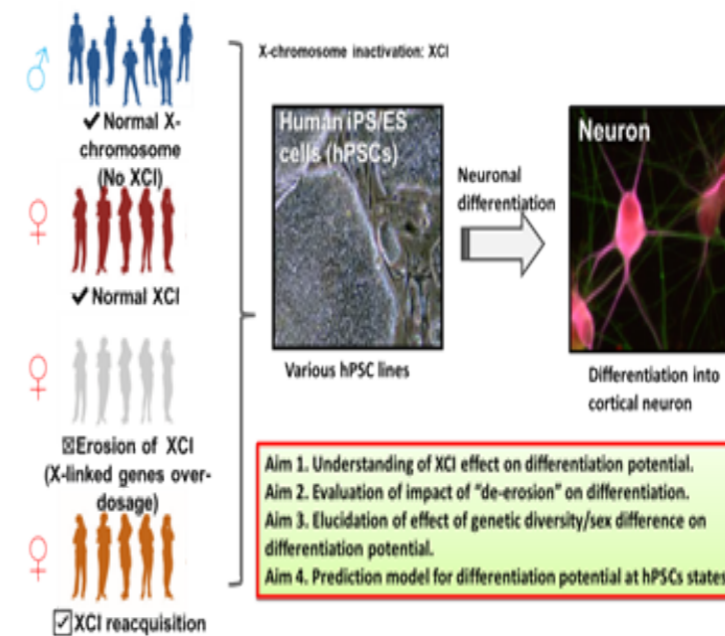
【今後の展望】

代表的な性特異的疾患 (発症は主に女兒) であるレット症候群におけるhPSCを用いた病態メカニズム研究では、XCIの破綻が原因で、疾患のモデリングをXY型hPSCで代替研究しており、患者特有の遺伝的背景を考慮した疾患メカニズムの解明が困難である。本研究を通じて、“Genotype-Phenotype”に基づく病態モデリングを可能にし、X連鎖疾患病態モデリング研究の基盤システムを世界に先立って作成することが期待できる。



プロジェクトリーダー：福田 篤
Fukuda Atushi

医学部医学科基礎医学系 分子生命科学 准教授



ヒト多能性幹細胞における分化能を多様性と性差の観点から明らかにする。特に、神経分化に注目することで、創薬開発におけるヒト多能性幹細胞の活用性向上を目指す。

Selected Papers,

• Motosugi N, Sugiyama A, Otomo A, Sakata Y, Araki T, Hadano S, Kumasaka N, Fukuda A. Effect of PCDH19 missense mutation on cell-to-cell proximity and neuronal development under heterotypic condition. PNAS Nexus . 2024 Feb 8;3(3):pgae060.

• Motosugi N, Sugiyama A, Okada C, Otomo A, Umezawa A, Akutsu H, Hadano S, Fukuda A, De-erosion of X chromosome dosage compensation by the editing of XIST regulatory regions restores the differentiation potential in hPSCs. Cell Rep Methods. 29;2(12):100352. 2022, DOI:10.1016/j.crmeth.2022.100352

• Sakata Y, Zhang H, Sugiyama A, Motosugi N, Kimura H, Okamura Y, Fukuda A, Nanosheet coating improves stability of human pluripotent stem cell culture on glass substrates. Biochem Biophys Res Commun. 2; 650:55-61. 2023, DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.01.077