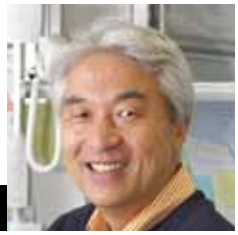
疾患ゲノム動態解析技術開発チーム

Technology and Development Team for Mammalian Genome Dynamics



チームリーダー 阿部 訓也（理博）
Kuniya ABE, Ph.D.

ミッションと事業概要

当技術開発チームでは、バイオリソースセンターに収集された生物遺伝資源のgenotype, phenotype, epigenotypeを解析するための新しい技術・リソースの開発を行い、これを基礎として、ゲノム修飾による生物の発生・成長の制御機構や、生体システムが破綻した状態である疾患発症との関連を解析するための技術、モデル系の開発を行う。その応用として、環境要因・ストレスがゲノム修飾に与える影響やエピジェネティック変異の実態、生物学的意義、疾患発症との関連を追究する。

Aim of our team is to develop technologies and experimental tools/ resources for characterization of 'genotype, phenotype and epigenotype' of biological resources. Through these efforts, we will extend utilities of bioresources collected at RIKEN BRC. Based on these technologies and resource development, we will establish analytical platform for analyses of dynamic nature of mammalian genome in response to changes in various environmental factors. Using this platform, we will explore how environmental factors influence on development and growth of organisms, or on the onset of disease condition.

平成27年度の成果
Development of Technology in 2015-2016

低分子Wntシグナル阻害剤を用いたナイーブ型-プライム型幹細胞転換技術の開発

マウス多能性幹細胞は、未分化性の高い胚性幹細胞（ES細胞）とそれより分化の進んだ状態にあるエピブラスト幹細胞(EpiSC)が存在する。前者は、未分化な「ナイーブ型」と呼ばれ、後者は「プライム型」と呼ばれている。この2種類の幹細胞は、多能性を持つことでは共通しているが、異なる点も多く、EpiSCは、マウスES細胞よりも、ヒトES細胞やヒトiPS細胞（人工多能性幹細胞）に性質が近いヒト型の多能性幹細胞であり、ヒトES細胞やヒトiPS細胞の特徴を知るための重要なモデル細胞である。ナイーブ型-プライム型の変換は、胚発生では、子宮への着床前後に起き、これを契機に胚の性質も大きく変化することから、哺乳類発生研究や幹細胞生物学の重要な研究対象と考えられている。しかし、胚を用いた研究は制約も多く、有効なin vitro　モデル系が必要とされていた。

我々は、重要な細胞シグナル因子であるWnt経路の低分子阻害剤を用いることにより、プライム型幹細胞であるEpiSCをより簡便に効率良く樹立し、安定して維持する新規培養技術の開発に成功した（Sugimotoら、2015）。これまで、マウスES細胞から、EpiSCへの変換を行う試みは為されてきたが、細胞株の系統による効率の違いや変換過程に起きる細胞死等により、再現性高く結果を得ることが困難であった。しかし、この度確立したWnt阻害剤を利用した培養技術を応用することにより、ナイーブ型からプライム型への変換を同調的に効率良く行うことに成功した（Kondoら、投稿準備中）。今後、この細胞変換技術を利用することにより、ヒトを含む哺乳類の発生研究や、この変換過程に起きる、X染色体不活性化に象徴される大規模エピゲノム変動の詳細とその制御機構の解明などへと展開することが期待される。

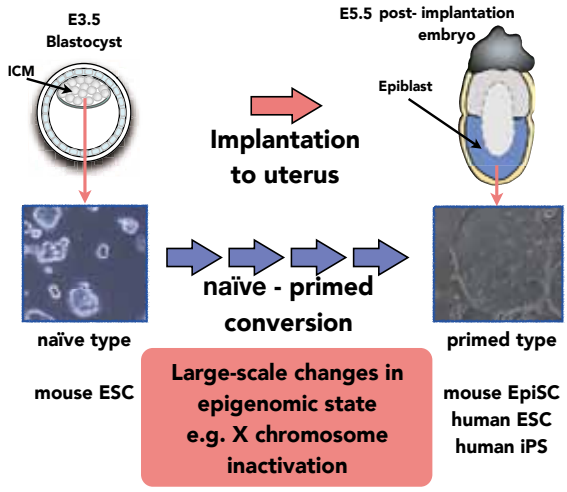


図1　マウス初期胚と多能性幹細胞
左：受精後3.5日の着床前胚を胚盤胞と呼ぶ。中空のボール状の構造の中に、内部細胞塊と呼ばれる多能性細胞の塊があり、ここからナイーブ型のマウスES細胞が樹立される。
右：マウス胚の着床は、受精後4.5日ごろに起き、着床後の胚は、エピブラスト、胚体外外胚葉、臓側内胚葉の3種の組織で構成される。一般に受精後5.5日、あるいは6.5日の胚のエピブラスト（青色部分）から、EpiSCが樹立される。EpiSCは、ヒトES細胞、ヒトiPS細胞とよく似た性質を持つことから、プライム型に分類される。
ナイーブ型とプライム型の幹細胞には、様々な性質の違いがあり、例えばX染色体不活性化に象徴されるエピゲノム状態の大規模な転換が起きている。
Figure 1　Mouse early embryos and pluripotent stem cells
(Left) The preimplantation embryos of embryonic day 3.5 (E3.5) are called blastocysts. There is a cell mass called 'inner cell mass' in the ball-like structure of the blastocyst. Naive-type stem cells, i.e. embryonic stem cells (ESC) are derived from this inner cell mass.
(Right) Implantation of mouse embryos to uterus occurs at around 4.5 days after fertilization. Postimplantation embryos consist of three embryonic tissues such as epiblast, extraembryonic ectoderm, and visceral endoderm. Epiblast stem cells (EpiSCs) are normally derived from epiblast (blue part) of E5.5 or E6.5 embryos. EpiSCs have characteristics similar to those of human ES cells or human iPS cells, and are classified as primed-type pluripotent stem cells. There are many differences in cellular characteristics between naive and primed-type stem cells. For example, large-scale epigenomic changes symbolized by X chromosome inactivation occurs during conversion process from naive to primed state.

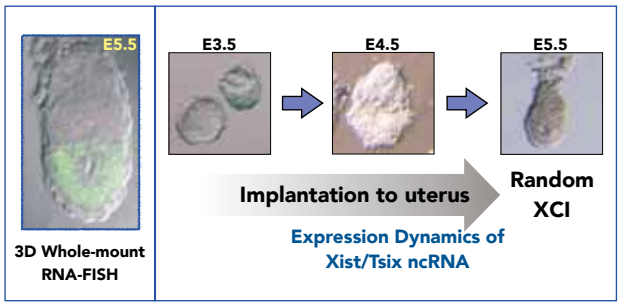


図2　3Dホールマウント　RNA-FISH技術による着床前後期におけるエピゲノム再プログラム化状態の解析
3Dホールマウント RNA-FISH技術は、胚体の構造を破壊することなく各細胞における RNA発現を解析可能な技術である（図左）。X染色体不活性化は、哺乳類雌におけるエピゲノム再プログラム化の代表的な現象であり、このRNA-FISH技術を用いて、不活性化に重要な働きを持つ2種類の非翻訳性RNAであるXist、Tsixの発現ダイナミクスを解析した。
Figure 2 3D whole-mount RNA FISH is a technique to analyze RNA expression in individual cells that constitute whole embryo without destructing intact embryonic structure, which had been developed in our lab. X chromosome inactivation (XCI) is one of the major epigenetic events in mammals. We used this RNA-FISH method to delineate dynamics of two non-coding RNAs with vital functions in XCI, ie. Xist and Tsix, during peri-implantation development in vivo.

X染色体不活性化を指標とした哺乳類エピゲノム変動過程の解析

哺乳類雌の細胞では、2本あるX染色体の一方がランダムに不活性化を受けることが知られている。このランダムX不活性化は乳類におけるエピジェネティックな発生制御の代表的な例として、古くから多くの研究が為されているが、着床前後に起きると考えられているランダムX不活性化の詳細については未だ不明な点が多かった。そこで、不活性化に重要な役割を持つ非翻訳性RNAであるXist、Tsixについて、我々が独自に開発したRNA発現解析技術である“3D Whole-Mount RNA FISH”法を用いて、着床前後胚を構成するすべての細胞におけるX染色体不活性化の状態とその変遷を隈無く調べることに初めて成功した（Shiuraら、投稿中）。この知見を基盤として、今後、哺乳類雌に特有なX不活性化現象のみならず、着床を契機として起きる細胞運命の転換とそのエピジェネティック制御に関する研究が進展していくものと期待される。

A Simple and Robust Method for Cell-type Conversion from naïve to primed-state pluripotent stem cells in mammals.

There are two types of pluripotent stem cells in mammals. One is naïve type and the other is called primed type stem cells. Mouse embryonic stem cells (mESC) derived from pre-implantation embryos represent naïve state, while Epiblast stem cells (EpiSCs) from epiblasts of post-implantation mouse embryos correspond to primed state. EpiSCs show several different characteristics from mouse embryonic stem cells (mESCs). Most of the cellular characteristics of EpiSCs are shared by human pluripotent stem cells such as human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). Naïve to primed state conversion occurs at peri-implantation stage and is associated with significant changes in cellular and epigenetic characteristics. To study this important developmental event, a suitable in vitro experimental system has been needed. Recently we have established a simple and robust technique to derive high quality EpiSCs using an inhibitor of Wnt signaling (Sugimoto et al., 2015). Here we applied a similar culture technique to induce naïve to primed state conversion in vitro. Using this novel technique we succeeded to convert mESC to EpiSC-like cells synchronously and efficiently without massive cell death that have hampered previous attempts (Kondo et al., in preparation). Therefore this stem cell conversion method should facilitate studies on mammalian developmental events and epigenomic reprogramming phenomena such as X chromosome inactivation taking place during the cellular conversion process.

Analysis of mouse peri-implantation development using X chromosome inactivation as an indicator of epigenomic reprogramming

In female mammals, one of the two X chromosomes is inactivated randomly for gene dosage compensation. This random X chromosome inactivation (XCI) has been known as one of the most important epigenetic events in mammals. However, the occurrence of this process in embryonic development has not been studied in detail. To investigate precise kinetics of changes in XCI status, we used “3D whole-mount RNA FISH” method established in our lab to detect Xist and Tsix, two non-coding RNA essential for establishment of XCI, and have succeeded to obtain expression information for Xist/Tsix in all the cells that constitute peri-implantation embryos from embryonic day 3.5 to 5.5 (Shiura et al., submitted). The information of Xist/Tsix expression should serve as a basis for future studies of cell fate changes and its epigenetic regulation triggered by implantation.

職員とメンバー構成
Members

●チームリーダー [Team Leader]
阿部 訓也 Kuniya ABE, Ph.D.

●開発研究員 [Research & Development Scientist]
浦 大樹 Hiroki URA, Ph.D.

●特別研究員 [Postdoctoral Researcher]
鈴木 伸之介 Shinnosuke Suzuki, Ph.D.

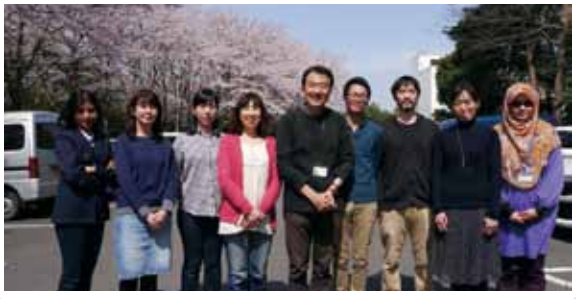
●基礎科学特別研究員 [Special Postdoctoral Researcher]
志浦 寛相 Hirosuke SHIURA, Ph.D.

●テクニカルスタッフII [Technical Staff II]
近藤 昌代 Masayo KONDO　古賀 裕美子 Yumiko KOGA

●アシスタント [Assistant]
草山 美和子 Miwako KUSAYAMA

●研究生 [Research Fellow]
三瀬 名丹 Natan MISE, Ph.D.　曹 麗琴 Liqin CAO, Ph.D.

●国際プログラムアソシエイト [International Program Associate]
Jo Lynn KHOO

●研修生 [Sudent Trainee]
諸山 恵 Megumi MOROYAMA　Sonia TAMANNA
Jaehun PARK

●実習生 [Intern]
Vasu JAISWAL　Maisarah AB SAMAD