

報告番号	甲 第 12841 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **Identification of differentiation regulators based on transcriptional heterogeneity**
(転写の不均質性に基づく分化制御因子の特定)

氏 名 安藤 達哉

論 文 内 容 の 要 旨

細胞集団間の不均質性はこれまで実験的に証明することが難しいことから、その現象の多くが無視され、生物学的に意味のあるばらつきというより技術的なノイズとして扱われてきた。しかし、細胞の不均質性は新しい概念ではなく、30年以上前に細菌のクローン集団の不均質性として研究されている。その時点で、同じ遺伝的背景の細胞集団のばらつきとして記述されている。細胞不均質性の元となるものを解明しようといくつかの研究がなされており、ひとつの単純な説明は区別可能な細胞集団の混合物に由来するというものである。しかし、細胞集団の状態は静的なものではなく、これが生物学的な複雑性を反映している。細胞周期や概日リズム、縮日リズムのように細胞の状態は時間とともに動的に変動する。ある測定時点での細胞集団の細胞状態が異なっているため、これが細胞集団の不均質性を規定するというのがもうひとつの説明である。少数の分化マーカーなどの前もって選ばれた遺伝子に注目していくつかの細胞不均質性の研究が行われてきたが、細胞不均質性の複雑な現象はまだよく理解されていない。これらの現象を分子メカニズムも含め理解することは生物科学の次のフロンティアである。

ごく近年になって、細胞集団における表現型の不均質性がさまざまな生理学プロセスや病態生理学的な状態や治療に対する反応において観測可能になり、疾患治療開発に課題を投じている。例えば、がん治療薬に対する反応は不均質であり、再生医療の分野では細胞の不均質性のため分化・培養に時間がかかり、効果のない細胞や毒性を示す細胞が含まれ

てしまうという問題がある。これら細胞の不均質性のメカニズムを解明し、不均質性そのものを調節することで効果の高い治療が可能になることや、患者の要望に合わせ素早く安全な細胞を供給できるようになることが期待できる。

本研究では、不均質性の中でも転写のばらつきに焦点をおき、神経細胞やグリア細胞分化における転写ばらつき変化とその制御を体系的に解析できるフレームワークの構築を目指した。転写ばらつきの基本的な性質を明らかにすることから開始し、分化過程でのばらつき挙動を利用して分化制御因子を特定することを目標に掲げた。

本論文は 4 章から構成され、序章として細胞集団の不均質性研究の歴史と現在までの知見、不均質研究と疾患治療応用への課題、近年の測定技術や解析理論の発展による新しい研究の可能性、そしてこれら課題や可能性を踏まえた本論文の目的についてまとめた。

第 2 章では、不均質性のひとつである細胞集団間の転写のばらつきが神経細胞分化においてどのように変化するかについて論じる。具体的には、転写のばらつきの基本的な性質、ヒトとマウス間での転写ばらつき挙動の保存、網羅的転写ばらつき解析の有用性について研究事例をまとめた。

第 3 章では、転写のばらつきがアストロサイト細胞分化において神経細胞と同様に変化するかについて論じる。ばらつきをより正確に見るための単細胞転写解析の優位性の確認を行うとともに、不均質性解析によりアストロサイト分化制御因子を特定し、実験的に検証可能かをまとめた。

第 4 章は本研究の締章として、細胞の不均質性を転写産物挙動に注目し網羅的に解析することにより未知の特性や分子メカニズムを見出すことができる可能性を考察すると共に、その将来性についてまとめた。

第 2 章では、動的システム理論に基づくデータ解析により、神経細胞分化における転写のばらつきの挙動を明らかにし、特徴的な挙動を示す遺伝子を検出することで神経分化制御因子を特定した事例を示す。

これまで幹細胞において、Notch signaling 遺伝子群など一部の遺伝子の時系列発現パターンが振動しており、お互いに時系列発現パターンが似ていることが知られていた。この発現パターンは個々の細胞間で同期していないため、ある時間で細胞ごとの遺伝子発現を見ると発現量が一定でなく大きくばらついており、不均質性を示す。この振動発現挙動は細胞が神経細胞に分化していくと消失し、細胞間で一定の発現量を示し、不均質性が失われることが分かっていた。しかし、この転写挙動を今まで網羅的に測定・解析することは測定技術、データ解析技術の観点から大きな課題となっていた。

本研究では、網羅的に測定した細胞集団の神経分化時における転写プロファイルに動的システム理論に基づく解析法を適用することで、転写のばらつきを検出し、分化制御因子候補を特定できる可能性を検証した。マウスの胚性幹細胞において互いに発現パターンの

似ている（共発現している）遺伝子群の大きなばらつきが、神経分化とともに小さくなるという現象を検出できた。これらばらつきと共発現の指標が神経分化により大きく減少する遺伝子群は、体節の調整や神経の移動、転写制御など分化や発達に関わる遺伝子を有意に多く含むことがわかった。さらにこれらの遺伝子群は神経分化に遺伝的に関連し、神経分化を上流で制御している遺伝子が有意に多かった。これらの結果から分化前のばらつき挙動変化の検出は、神経分化を予測可能なバイオマーカーとなりうるが、それだけでなく分化制御因子の特定にも有用である可能性が考えられた。また、これらの遺伝子の転写挙動変化は、マウス胚性幹細胞の神経分化だけでなく、ヒト iPSC 細胞でも同様に見られることがわかった。

第 3 章では、遺伝子転写における不均質性変化を、神経細胞分化だけでなくアストロサイト細胞分化で検出した研究事例を示す。

第 2 章の研究では、細胞塊集団の平均値を複数回測定することにより細胞集団間のばらつきを評価していた。近年、細胞塊集団の平均値でなく 1 細胞ごと遺伝子発現プロファイルを測定できる Single cell RNA-seq 技術が開発され、細胞間の転写ばらつきをより正確に評価できるようになってきた。しかし、アストロサイト分化における転写ばらつき挙動についてはほとんど解明されていなかった。そこで本検証では、第 2 章の神経分化での転写不均質性解析をアストロサイトに拡張し、最近公開されたアストロサイト分化時の 1 細胞転写プロファイルデータを動的システム理論の観点から解析することで、アストロサイト分化における転写不均質性の解明を目指した。

神経幹細胞において互いに共発現している遺伝子の転写ばらつきを、未分化状態とアストロサイト細胞分化状態で比較したところ、未分化状態で大きいばらつきが分化状態では小さくなっていることがわかった。これは神経分化時で検出できた転写不均質性と同じ挙動である。転写のばらつきと類似性が大きく変化する遺伝子を特定したところ、アストロサイト分化に関わる遺伝子が有意に多く含まれることがわかった。転写メカニズムとして、これらの遺伝子は既知の神経幹細胞での振動遺伝子である転写因子 *Ascl1* に制御されている可能性が高いことがわかった。ばらつきおよび他の遺伝子との発現パターンの類似性が分化により大きく変化し、*Ascl1* と同一転写制御下にある *Nstr2* を化合物で阻害したところ、*Nstr2* が神経幹細胞からアストロサイト分化の初期細胞運命決定に重要な役割を果たすことが示唆された。

本論文の研究成果より、仮説フリーで体系的に転写データを解析する基盤となるワークフローを構築し、これらを分化時転写データに適用することで細胞不均質性の特性や分子メカニズムに対する洞察を得ることができた。さらにデータ駆動型仮説生成により不均質性解析から分化制御因子を特定できるという仮説を立て、生物学的実験によりこの仮説を実証することができた。本研究で構築したデータによる仮説生成から実験検証に至る細胞

不均質性研究の基盤は、効果の高い治療開発や効率的で安全な再生医療の実現を加速するものと期待される。