

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660256

研究課題名(和文) エピゲノム・バックグラウンドの操作による直接リプログラミング効率の改善

研究課題名(英文) Optimization of direct reprogramming methods by understanding the epigenomic features of descendant cell types.

研究代表者

小田 真由美 (Oda, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80567511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画では、ES細胞を用いた転写因子の強制発現タイミングと異なる培養条件における細胞分化の傾向と効率を確かめることにより、直接リプログラミングにおける転写因子の役割分担について検討を行った。転写因子強制発現における遺伝子発現変化より、影響範囲の違いによる転写因子のグルーブ化を行い検討の材料とした。また、培養条件による分化効率の違いの検討を各種マーカー遺伝子の発現量の違いにより行い、時系列を追って発現変化を見ることにより転写因子の役割の違いについて明らかにした。対照として、各種組織のDNAメチル化プロファイルを作成し、成熟細胞の持つ特徴的なDNAメチル化パターンを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we assessed the optimization of direct reprogramming method by analyzing the expression data of transcription factor (TF)-induced ES cell lines and found that the efficiency of cell differentiation examined by several cell type-specific markers was changed according to the role of TFs in direct reprogramming process. We also examined different culture conditions that alters genome-wide epigenetic status, and studied the results of TF-induction under different DNA methylation status. For the comparison, DNA methylation profiles of several tissues were made, which is expected to be used for the understanding the cell type-specific epigenomic patterns and the differences between their descendants.

研究分野：エピゲノム学

キーワード：直接リプログラミング DNAメチル化 転写因子 ES細胞 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

体細胞の直接リプログラミング法は、数種類の転写因子を組み合わせ、肝細胞よりも分化能が低く安定な体細胞を、幹細胞を経由せずに直接細胞種間再分化を起こす方法である。この方法の効率化は、幹細胞を経由しないことから再生医療の実用化に対しがん化などのリスクが低く、迅速に細胞の成熟化を誘起することができることから有用性が高い。興味深いことに、これらの直接リプログラミング法に利用される転写因子を転写因子強制発現系 ES 細胞のトランスクリプトームにおいて検討すると、数種類の転写因子の組み合わせの中に異なる遺伝子発現パターンを誘起するものが混在していることがわかる。例えば実際に iCM 細胞 作成法における 3 つの転写因子 (*Tbx5*, *Mef2c*, *Gata4*, Ieda et al., Cell 2011) では、ES 細胞では *Mef2c* がより心筋細胞特異的発現遺伝子を多く誘導するのに対し、*Tbx5* は特異性は低く多くの遺伝子を発現させる。また、肝細胞を誘導する iHep 細胞 作成法の (*Hnf4a*, *Foxa*, Sekiya et al., Nature 2011) では、*Hnf4a* が広く様々な遺伝子を発現させる一方で、*Foxa* は幹細胞特異的な遺伝子をより特異的に発現させる。この転写因子の組み合わせによって体細胞直接リプログラミングを誘導できる事実から、直接リプログラミングを誘導する遺伝子群の中に役割分担がある可能性およびそれぞれの発現誘導のタイミングを変化させることにより直接リプログラミング法の効率を向上させられる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究計画は、複数の転写因子の組み合わせによる細胞の直接リプログラミング法の最適化を目的とする。iCM 細胞 および iHep 細胞 樹立法に基づき直接リプログラミング法の効率改善の試行を行い、エピゲノム状態の変化を介してリプログラミング効率に変化するという仮説のもとに、転写因子の役割分担という視点でリプログラミングを理解し、線維芽細胞への転写因子の強制発現によるエピゲノム変化とリプログラミング効率の法則を明らかにする。さらに、ここで得られた法則を利用し、ヒト細胞においても同じ法則が関連付けられるかどうかを検討し、医療・創薬への応用が可能なヒト分化細胞の作出効率の向上を試みる。また、global メチル化状態を変化させる低血清培地条件が分化効率を変化させることから、低血清培地条件におけるエピゲノム変化と分化効率の違いについても明らかにする。

3. 研究の方法

本研究計画は、まず (1) プライミング遺伝子と方向性決定遺伝子の抽出と、(2) 培養

条件と遺伝子発現の観察を行った。その後、(3) 低血清培養条件における転写因子強制発現の影響を確認し、(4) 転写因子強制発現 ES 細胞のエピゲノム解析を行うための細胞サンプルの作成を行った。

(1) プライミング遺伝子と方向性決定遺伝子の抽出

NIA Array Analysis Tool (<http://lgsun.grc.nia.nih.gov/ANOVA/>、Nishiyama et al., Cell Stem Cell 2009、Correa-Cerro et al., Sci Rep 2011) データベースからプライミング遺伝子と方向性決定遺伝子を抽出した。遺伝子発現の平均値から 3rd Quartile への増加率 (3rd Qt/Mean 値) を指標に、遺伝子群を特異的に発現亢進する遺伝子を抽出したところ、これには山中因子である *Pou5f1*, *Eomes*, *Sox2*, *Klf4* が含まれており、体細胞の状態を。心筋細胞関連遺伝子では、*Mef2c* および *Gata4* を発現させ

Whsc2	Six1	Cdyl2	Smad1	Sox11
Smad7	Hoxa2	Sall4	Hsf2bp	Esx1
Gbx2	Aes	Jun	Fgfbp1	Dppa3
Jmjd2c	Ostf1	Nr5a2	Foxp3	Atf3
Otx1	Nr2f1	Myc	Zfp57	Msc
Ell2	Nkx2.5	Inpp1	Ets1	Bcl6
Mkrm1	Tcl1	Tbx3	Suz12	Ash2l
Tgm2	Foxj2	Hoxa9	Ctnnb1	Sfpi1
Ctbp2	Jarid1a	Aff1	Prickle1	Tcf3
Batf3	Hex1	Nr2f2	Hmga2	Tbx5
Stat3	Etv1	Tgif1	Tuba1a	Hnf4a
Zic1	Sub1	Arnt2	Etv5	Lhx2
Fosl2	Ugp2	Fhl2	Foxn3	Elf5
Cbx8	Nupr1		Smad6	Mybl2
Sox7	Id3	Gadd45a	Foxa1	

プライミング遺伝子候補

Foxg1	X4932441	Gata2	Dlx3	Elf1
Ascl2	K18Rik	Sfrs6	Tcfcp2l1	Ankrd22
Mef2c	Tcf4	Lass2	Zmat4	Sap30
Sox2	Cdx2	Meis2	Id1	Fbxo15
Klf9	T	Mycn	Klf4	Jarid2
Eomes	Grhl2	Gata3	Mettl5	
Pou5f1	Nsbp1	Pdlim1	Tcfap2c	
Myod1	Otx2	Rxra	Rhox6	
Ascl1	Tcea3	Sirt3	Stral3	
Dmrt1	Foxl2	Mbd3	Dedd2	
Irf2	Etv3	Atxn1	Foxc1	
Nanog	Eed	Smad4	Cdyl	
Nrip1	Klf3	Rest	Sox15	
Sox9	Fem1b	Dnmt3b	Trpv2	
Zscan4c	Dppa5a	Zfand3	Nr0b1	

方向性決定遺伝子候補

図 1 3rd Qt/Mean 値による方向性決定遺伝子およびプライミング遺伝子候補リスト。

る *Gata2*, *Gata3* が含まれていたため、これらが心筋細胞の方向性決定遺伝子であると予想された。

一方、プライミング遺伝子には心筋細胞関連遺伝子 *Tbx5* および *Nkx2-5* が含まれていた。肝細胞関連遺伝子では *Foxa1* および *Hnf4a* が含まれていたが、*Foxa1* 遺伝子がより高い 3rd Qt/Mean 値を持っているため、*Foxa1* がプラ

イミング遺伝子と方向性決定遺伝子の両方の役割を持っている可能性が考えられた。

(2) 培養条件と遺伝子発現の観察

低血清培養では分化方向性が変化することが知られているが、ゲノム全体で DNA メチル化度が低くなることがわかっている。ゲノム全体のメチル化状態と転写因子強制発現の影響を調べるために、1%FBS/KSR 培地での培養条件を血清培養のものと比較した。Hnf4a 遺伝子の Tet-OFF プロモータートランスジーンを導入した細胞株では、ドキシサイクリン除去による強制発現でトランスジーンが発現が低く、多能性マーカー遺伝子の低下があまりはっきりと見られなかった。このことから、分化誘導実験には低血清培養が適していると考え、以降低血清培養条件を用いることとした。

(3) 低血清培養条件における転写因子強制発現の影響

続いて Hnf4a と Foxa1 単独での転写因子強制発現を行い、各種マーカー遺伝子の発現を定量 PCR によって調べた。その結果、Hnf4a 遺伝子により、多能性マーカー、外胚葉および中胚葉マーカーの低下が見られ、内胚葉および肝細胞マーカーの発現亢進が見られたことから、転写因子強制発現により効果的に内胚葉への分化が方向付けられていた。一方で、Foxa1 単独の強制発現では、外胚葉および内胚葉マーカーの発現が亢進しており、逆に中胚葉マーカーが抑制されていたことから、内胚葉への分化効率は下がってしまっていた。

興味深いことに、Foxa1 強制発現は、他のマーカー遺伝子の発現パターンにも関わらず、肝細胞マーカー遺伝子のうちアルブミン遺伝子のみを発現亢進していたことから、低血清培養条件で Foxa1 を早期に強制発現することにより分化方向性の異常が起き、体系的細

	1%FBS/KSR	
	Hnf4a	Foxa1
transgene	○	△
肝細胞↑	○	△
内胚葉↑	○	△
幹細胞↓	○	△
外胚葉↓	○	×
中胚葉↓	○	×

図2 低血清状態における転写因子強制発現の影響。Hnf4a で良好な遺伝子発現パターンが見られた。一方、Foxa1 単独では異所的発現が目立った。

胞分化ができない可能性がある。実際に Hnf4a では分化誘導後 2 日目から内在性 Foxa1/2 発現が緩やかに上昇しており、結果として各種肝細胞マーカーがバランスよく発現する様子が見られた。一方、Foxa1 単独では、内在性 Hnf4a 発現がむしろ抑制され、強制発現を行わなかったコントロール区においてアルブミン以外の遺伝子発現が観察されたため、Hnf4a 遺伝子によるプライミングの先行がより効果的に肝細胞を分化させる可能性が高いと結論づけられた。

(4) 転写因子強制発現 ES 細胞のエピゲノム解析

転写因子強制発現 ES 細胞のメチル化状態を解析するために、分化誘導 2 日目の細胞から DNA を抽出し、Foxa2 と各種肝細胞マーカー遺伝子 (Alb, Ttr, Rpd4) のプロモーター領域のバイサルファイト法による DNA メチル化解析を予定していたが、Foxa1 の強制発現が不安定であったため、後述の mRNA を用いた分化誘導の検討のために解析を延期した。また、網羅的解析を行うために、プロモーターを対象とした captured-PBAT 法の習得を行った。また、プロモーター領域がオープンかどうかを解析するための FAIRE-seq 法および ATAC-seq の条件検討を行った。

一方、成熟肝細胞特異的な DNA メチル化パターンを解析するため、肝細胞 DNA を用い、HELP 法 (Khulan *et al.*, Genome Res 2006, Oda *et al.*, Nucleic Acid Res 2009) による DNA メチル化プロファイルを作成した (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE61249>)。心筋細胞および ES 細胞との比較より、肝臓細胞では、肝臓特異的遺伝子プロモーター領域の脱メチル化の他に、gene body 領域の脱メチル化が認められた。これらの領域は DNA メチル化変化の直接の影響に加え、様々なエピジェネティック修飾の変化を伴うため、転写の様々な段階での影響が予想される。これらの DNA メチル化プロファイルは、エピゲノム状態と細胞分化効率の関係性を解析する上で重要な情報となることが期待される。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

本研究計画では、転写因子強制発現 ES 細胞株の利用により、直接リプログラミング法における転写因子の役割について新しい知見を得た。また、低血清培養条件下では多能性マーカーの発現低下が早く効率的な分化が可能であるが、各種転写因子の強制発現のタイミングによって同じ転写因子を用いても分化方向性の決定に違いができることが、直接リプログラミング法の効率に關与してい

る可能性があり、これはエピゲノムの状態変化により転写因子の標的や効果が変化していることを示していると考えられる。

また、今回の検討では、Hnf4a でプライミングされることによって後に内胚葉以外のマーカー遺伝子発現が効率的に抑制されていたことから、Hnf4a によるプライミングでは、内胚葉および幹細胞特異的遺伝子のプロモーターを開放することよりも、内胚葉以外の特異的遺伝子を抑制することが重要と考えられる。一方、早期の Foxa1 の発現は、むしろ内胚葉化を妨げてしまうことで後の肝細胞分化効率を低下させているように観察された。興味深いことに、Foxa1 を早期に発現させた細胞では、肝細胞マーカーのうち Alb のみが高発現し、他の肝細胞マーカー (Ttr、Rpd4) の発現が抑制されており、体系的な肝細胞分化が損なわれていた。この状態では、むしろ内胚葉よりも外胚葉マーカーが高く発現しており、細胞系譜決定機構の異常と、細胞のヘテロ化の双方が起こっている可能性があり、その解明が今後の課題である。

(2) 今後の展望

本研究計画においては、体細胞を用いた直接リプログラミング法における試行には至らなかったが、転写因子強制発現 ES 細胞株に実験系を写したことで、より迅速で詳細な解析ができたことは、転写因子発現タイミングと細胞分化効率の関係を知る上で重要であった。今回の課題において、細胞株および培養条件によってトランスジーン発現に差が見られたことはデータ解釈上での問題点であったが、現在は合成 mRNA を用いた分化誘導法を検討しており、これにより転写因子発現誘導タイミングの試行が容易になるため、今後、より最適化された分化誘導条件による肝細胞分化の効率化を図る。また、シングルセル発現解析およびエピゲノム解析によって細胞のヘテロ化の内訳が解析可能であるため、今回樹立した実験系およびエピゲノムデータは今後一細胞解析の興味深い材料とできる。本研究課題では、細胞分化効率向上のための基本情報が整備され、新しい局面への重要な知見が得られたといえる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)
〔学会発表〕(計3件)

- (1) 小田真由美「細胞特異的遺伝子 gene body 領域における DNA 脱メチル化と転写マシナリーの長期的相互作用の可能性」日本再生医療学会年会 (ポスター発表) 2015 年 3 月 19 日-21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- (2) 小田真由美「細胞特異的遺伝子 gene body 領域における DNA 脱メチル化と転写マシナリーの長期的相互作用」日本分子生物学会年会 (ポスター発表) 2014 年 11 月 25 日-27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- (3) 小田真由美「成熟細胞の細胞特異的遺伝子 gene body 領域における能動的 DNA 脱メチル化分子機構の関与」日本エピジェネティクス研究会 (ポスター発表) 2014 年 5 月 25 日-27 日、東京大学・伊藤国際学術研究センター (東京都文京区)

〔図書〕(計0件)
〔産業財産権〕
出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

〔その他〕

http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/m_oda/
慶應義塾大学医学部・システム医学講座
<http://systemsmedicine.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田真由美 (ODA, Mayumi)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 80567511

(2) 研究協力者

迫田 実希 (SAKOTA, Miki)
慶應義塾大学・医学部・研究員
研究者番号: なし