

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14431

研究課題名(和文) Gene body領域エピゲノムのモニタリングによる細胞成熟誘導法の最適化

研究課題名(英文) The establishment of cell maturation induction method by the gene body-centered epigenomic monitoring.

研究代表者

小田 真由美(Oda, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80567511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画はglobal DNAメチル化修飾をバックグラウンドとする哺乳類ゲノムにおいて、gene body領域のエピジェネティック状態が細胞成熟に関与する可能性を検討し、これをもとに細胞成熟の評価および誘導を目指す。当初の成熟誘導法の樹立の計画に先立ち心筋細胞と肝細胞の比較を行ったところ、低メチル化を特徴とするgene body領域エピジェネティック・ドメインは心筋細胞により強く、他の細胞にはあまり顕著に見られない特徴であることがわかった。また、DNA脱メチル化代謝中間産物の解析により酸化的脱メチル化過程がこの活性エピジェネティック・ドメインの構築に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to evaluate and induce cell maturation on the basis of the possibility that the epigenetic state of the gene body region may be involved in cell maturation in a mammalian genome whose background is global DNA methylation modification. Comparison of cardiomyocytes and hepatocytes prior to the establishment of the initial maturation induction method revealed that the gene body epigenetic domain characterized by DNA hypomethylation is evident in cardiomyocytes and less pronounced in other cell types. Analysis of DNA demethylation metabolic intermediates in this cardiomyocyte-specific epigenetic domain also showed that the oxidative demethylation process might be involved in the construction of this active epigenetic domains.

研究分野：エピゲノム学

キーワード：DNAメチル化 エピゲノム 酸化的脱メチル化過程 gene body領域 転写伸長反応 細胞成熟 心筋細胞 ゲノム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

速やかで秩序ある細胞分化のためには、細胞分化過程の正確性・頑強性が求められる。また、分化状態の維持のためには細胞種特異的の遺伝子発現パターンの安定が必要である。培養条件で幹細胞から分化させた細胞種は生体内で成熟した細胞に比べて細胞種特異的の遺伝子の転写効率が悪く、細胞分化後の細胞形質の安定性が低いことが問題である。再生医療・創薬におけるモデル細胞としての利用のためには、より成熟・安定した細胞モデルが熱望されている。

哺乳類のような大型のゲノムは global DNA メチル化修飾(ゲノムのほとんどがメチル化される)である、希少な低メチル化領域を有する。主に遺伝子プロモーターおよびエンハンサー領域は低メチル化状態で、様々なトランス因子との相互作用があるが、CpG 配列の密な CpG アイランドと呼ばれる領域は多くが非メチル化であるように、DNA メチル化パターン全体はゲノム配列に依存している。「Gene body 領域」は通常高度に DNA メチル化されているが(自著論文、Suzuki et al. *Genome Res* 2011)、最近我々は成熟細胞では細胞種特異的な高度転写領域が、「gene body 領域」における高度な Pol II および p300 の蓄積と DNA 低メチル化を併せ持つ事実を発見した(現在投稿中)。このことは長期的な転写活動が転写伸長調節を介した転写活性化につながるエピジェネティック修飾マークを形成していくことを示しており、エピゲノム変化が転写マシナリーの配置と共役することによって遺伝子発現パターンのコアを安定させているという可能性を提示するものである。

DNA メチル化修飾を司る DNA メチル化転移酵素ファミリーの変異体は 8.5-9.5 日の胚体サイズで成長が停滞する(Li et al., *Cell* 1992, Okano et al., *Cell* 1999)。このように、DNA メチル化の用量依存性に胚体の成長が制限される(図 1)。これに対し、脱メチル化プロセスに必要な酵素である Tet ファミリーの Tet1 の欠損体は妊娠中期以降の成長遅延が見られるが、viable である(Dawlaty et al., *Cell Stem Cell* 2011)。これは Tet ファミリー(Tet1/2/3)の機能的重複に原因があり、Tet ファミリーの 3 重変異 ES 細胞は分化時に発生異常を起こす(Dawlaty et al., *Dev Cell* 2011)ことから、DNA メチル化の量的・局所的制御の双方が胚の生存に寄与していることが予想される。このように DNA メチル化パターン形成には de novo メチル化と同様に能動的 DNA 脱メチル化の局所的な働きについて検討していくことが必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、ES 細胞を用いた細胞分化成熟モデルにおけるゲノムワイドの DNA メチル化・能動的脱メチル化ドメインおよび転写マシナリー分布の解析から、生物学的根拠に基づいた分化誘導法の最適化および細胞分化・成熟におけるメチル化エピゲノム寄与の分子メカニズムの解明を目的とする。

細胞の成熟度をゲノムワイドな転写効率化と仮定し、DNA メチル化解析および転写マシナリー分布解析を定量的なトランスクリプトーム解析結果と比較することで、細胞分化過程および脱メチル化酵素導入による成熟化誘導時の核内における転写効率変化を計測する。高解像度の定量的エピゲノム解析により、global DNA メチル化レベルと局所的 DNA 脱メチル化の強調による遺伝子発現プロファイルの変化と転写効率化の原理を明らかにし、基礎研究および医学研究分野での応用への期待の高い細胞成熟誘導方法の構築を達成するものである。

モデルとして生体内での細胞成熟過程のエピゲノム動態を調べ、これを指標として培養モデルの成熟誘導のモニタリングを行うことを目指す。幹細胞の分化誘導から成熟誘導へ繋がる細胞分化操作の方法論を生物学的根拠に基づいて構築するものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 生体由来細胞を用いた gene body 領域のエピゲノム解析による成熟指標の評価

細胞成熟の指標となりうる Pol II および p300 の蓄積を直接的にもたらすエピジェネティック修飾を明らかにするために、DNA 脱メチル化の中間産物である 5hmC の分布を解析するため、hMe-Seal 法(Nat Biotechnol 2011 Song et al.)を用いる。また、これらを各種エピジェネティック修飾の分布と比較するために公開された ENCODE データを用い、gene body 領域に注目した比較を行った。

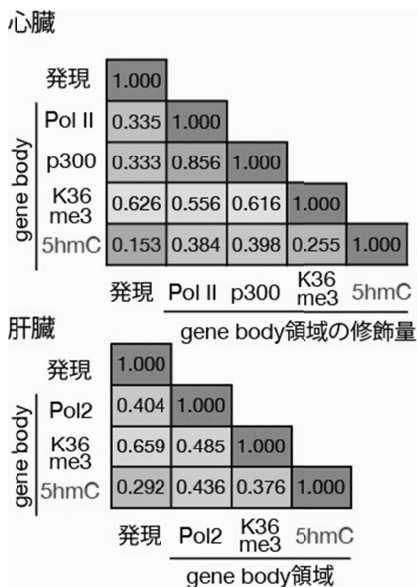
#### (2) ES 細胞を用いた心筋細胞分化誘導法の検討と Myh6 プロモーターレポーターを有する細胞株の作製

(1) で解析されたエピゲノムにおける成熟指標により評価する培養細胞由来分化細胞を作成する。分化誘導法を用いて心筋細胞を作成した。また、心筋細胞の精製のために Myh6 プロモーターレポーターを有する細胞株の作製を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 生体由来細胞を用いた gene body 領域のエピゲノム解析による成熟指標の評価

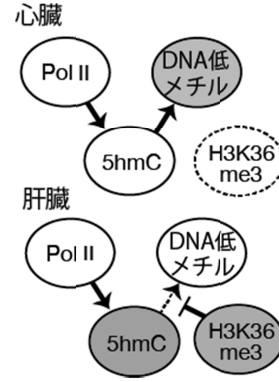
細胞成熟の指標となりうる Pol II および p300 の蓄積をもたらす細胞種特異的なエピゲノム状態を明らかにするために、心臓に対し比較対象として肝臓および ES 細胞のゲノム DNA を用いて hMe-Seal 法を用いた 5hmC 解析を行った。また、この結果を各種エピジェネティック修飾と比較するために ENCODE データセットから Pol II, p300, CTCF, H3K36 トリメチルの ChIP データを取得し、gene body 領域ごとの蓄積量を比較した。その結果、いずれの細胞種においても gene body 領域の活性化マークである H3K36 トリメチルが最も遺伝子発現レベルと高い相関を示していた。興味深いことに、gene body 領域における Pol II 蓄積量は肝臓では H3K36 トリメチルと同様に 5hmC 修飾も遺伝子発現と高い相関を持つのに対し、心筋細胞では発現および H3K36 トリメチルと 5hmC の相関は低かった。一方で、5hmC と Pol II および p300 の相関は 5hmC と発現・H3K36 トリメチルとの相関よりも高く、5hmC と H3K36 トリメチルの分布が異なっていることを示唆した (図 1)。



**図 1: gene body 領域における分子配置の相関** 心筋細胞では 5hmC と H3K36 トリメチルの分布の相関が低い。

このことは、心筋細胞では細胞種特異的遺伝子の gene body 領域を顕著な低メチル化がマークする一方、肝臓では細胞種特異的遺伝子を区別せず活性化遺伝子の gene body 領域に 5hmC が集まっている違いに対応している。つまり、脱メチル化プロセスを示す 5hmC と Dnmt3 による de novo メチル化を H3K36 トリメチルの分布の相関の高い肝臓では gene body 領域に 5hmC が維持され、一方 de novo DNA メチル化と脱メチル化の活性が共存せずバランスの崩れた心筋細胞では、脱メチル化に傾いて低メチル化 gene

body 領域が形成されることを示している (図 2)。



**図 2: Gene body 領域の DNA メチル化状態を決定する要因** de novo メチル化と脱メチル化の活性のバランスが DNA メチル化代謝産物を決める。

この発見は、細胞種特異的発現遺伝子の発現効率向上のための戦略が細胞種ごとに異なっていることを示している。興味深いことに、心筋細胞と肝細胞の特異的遺伝子の遺伝子長 (gene body 長) 分布は大きく異なっており、心筋細胞には長い細胞種特異的遺伝子が多く含まれるため、心筋細胞における gene body 低メチル化を介した体系的な転写効率亢進メカニズムの存在が示唆される。

## (2) ES 細胞を用いた心筋細胞分化誘導法の検討と Myh6 プロモーターレポーターを有する細胞株の作製:

マウス ES 細胞を用いて培養心筋細胞を作成し、hMe-Seal 法による 5hmC の解析を行っている。また、5hmC を介した脱メチル化の有無により細胞種特異的遺伝子の発現効率の変化があるかどうかを検討する必要があると考えられたため、Tet 遺伝子の条件付きノックアウトを用いて検討するための ES 細胞株を作成中である。

(1) の解析の結果から、細胞成熟の指標が細胞種ごとに異なる可能性があること、また、5hmC のみでなく H3K36 トリメチルについても解析が必要である可能性があるため、改めて次のステップとしてその計画について検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, **Oda M**, Ko SBH, Ko MSH, Mandai S, Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E  
**Salt suppresses IFN $\gamma$  inducible chemokines through the IFN $\gamma$ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells.**  
**Scientific reports** 7 (2017年4月) 46580 [査読有り]  
doi: [10.1038/srep46580](https://doi.org/10.1038/srep46580)

Torii H, Kurihara T, Seko Y, Negishi K, Ohnuma K, Inaba T, Kawashima M, Jiang X, Kondo S, Miyauchi M, Miwa Y, Katada Y, Mori K, Kato K, Tsubota K, Goto H, **Oda M**, Hatori M, Tsubota K  
**Violet Light Exposure Can Be a Preventive Strategy Against Myopia Progression.**  
**EBioMedicine** 15 (2017年2月) 210-219 [査読有り]  
doi: [10.1016/j.ebiom.2016.12.007](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.12.007)

Ishiguro KI, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, Kimura H, Akiyama T, **Oda M**, Ko SB, Ko MS  
**Expression analysis of the endogenous Zscan4 locus and its coding proteins in mouse ES cells and preimplantation embryos.**  
**In vitro cellular & developmental biology. Animal** 53 (2016年10月) 179-190 [査読有り]  
doi: [10.1007/s11626-016-0097-y](https://doi.org/10.1007/s11626-016-0097-y)

Akiyama T, Wakabayashi S, Soma A, Sato S, Nakatake Y, **Oda M**, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SB, Ko MS  
**Transient ectopic expression of the histone demethylase JMJD3 accelerates the differentiation of human pluripotent stem cells.**  
**Development (Cambridge, England)** 143 (2016年10月) 3674-3685 [査読有り]  
doi: [10.1242/dev.139360](https://doi.org/10.1242/dev.139360)

Kunitomi A, Yuasa S, Sugiyama F, Saito Y, Seki T, Kusumoto D, Kashimura S, Takei M, Tohyama S, Hashimoto H, Egashira T, Tanimoto Y, Mizuno S, Tanaka S, Okuno H, Yamazawa K, Watanabe H, **Oda M**, Kaneda R, Matsuzaki Y, Nagai T, Okano H, Yagami K, Tanaka M, Fukuda K  
**H1foo Has a Pivotal Role in Qualifying Induced Pluripotent Stem Cells.**  
**Stem cell reports** 6 (2016年6月) 825-833 [査読有り]  
doi: [10.1016/j.stemcr.2016.04.015](https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.015)

Akiyama T, Xin L, **Oda M**, Sharov AA, Amano M, Piao Y, Cadet JS, Dudekula DB, Qian Y, Wang W, Ko SB, Ko MS

**Transient bursts of Zscan4 expression are accompanied by the rapid derepression of heterochromatin in mouse embryonic stem cells.**  
**DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes** 22 (2015年8月) 307-318 [査読有り]  
doi: [10.1093/dnares/dsv013](https://doi.org/10.1093/dnares/dsv013)

[学会発表] (計5件)

**Gene body epigenetic domains participate in the coordination of gene length heterogeneity in cardiomyocyte-specific gene transcription.**  
**Mayumi Oda**, Shunichi Wakabayashi, N. Ari Wijetunga, Shinsuke Yuasa, Hirokazu Enomoto, Ruri Kaneda, Sung Han Yoon, Nishant Mittal, Quang Jing, Masako Suzuki, John M. Grealley, Keiichi Fukuda, and Shinji Makino.  
**Keystone Symposia: Heat development.** (国際学会)2017年3月26日-31日 Keystone Resorts (Keystone, CO, USA) (ポスター発表)

**成熟細胞特有の gene body 領域エピジェネティック・ドメインの構築とゲノム構成要素**  
**小田真由美**, 福田恵一, 牧野伸司  
**第39回日本分子生物学会年会** 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) (招待講演)

**Gene body epigenetic domains and gene length play a role for cell type-specific gene expression.**  
**Mayumi Oda**  
**Mini Seminar on Epigenetic regulation in mammalian cells.** 理研統合生命医学センター(神奈川県・横浜市) 2016年11月7日 (招待講演)

**心筋細胞成熟過程における gene body 領域の 5hmC 維持と細胞種特異的エピゲノムの形成**  
**小田真由美**, 福田恵一, 牧野伸司  
**第38回日本分子生物学会年会** 2015年12月1日-4日神戸ポートピアアイランド(兵庫県・神戸市) (一般口頭発表)

**選択と集中による細胞成熟過程のエピゲノム形成と細胞種特異的 5hmC 分布**  
**小田真由美**, 福田恵一, 牧野伸司  
**第9回日本エピジェネティクス研究会年会** 2015年5月25日-26日東京一ツ橋学術総合センター(東京都・千代田区) (ポスター発表)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：体細胞から肺胞上皮細胞への分化用  
試薬及びその使用  
発明者：石井誠、別役智子、洪実、家田真  
樹、四倉正也、浅村尚生、ヒガブ・アハメ  
ド、中武悠樹、小田真由美  
権利者：学校法人慶應義塾  
種類：特許  
番号：特願 2017-83814  
出願年月日：平成 29 年 4 月 20 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等  
坂口講座テニュアトラック・プログラム  
[http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/m\\_oda/](http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/m_oda/)  
Research Gate  
[https://www.researchgate.net/profile/Mayumi\\_Oda](https://www.researchgate.net/profile/Mayumi_Oda)  
Google Scholar: Mayumi Oda  
[https://scholar.google.com/citations?user=Jl\\_XiDQAAAAJ&hl=en](https://scholar.google.com/citations?user=Jl_XiDQAAAAJ&hl=en)

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