

令和元年5月30日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15129

研究課題名(和文) ヒトES細胞の分化過程における転写因子ネットワークの解明と新規分化誘導因子の同定

研究課題名(英文) Elucidating of transcription factor network during the differentiation of human ES cells

研究代表者

秋山 智彦 (AKIYAMA, TOMOHIKO)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：20570691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子導入によるヒトES細胞の分化誘導を制御するオープンクロマチンを同定するためにATACシーケンス法を行った。MYOD1導入による骨格筋分化およびNGN2導入による神経分化の解析を行い、それぞれに特異的に存在するオープンクロマチン領域を数千箇所同定した。さらに発生過程や成体の細胞において元来MYOD1やNGN2が結合するオープンクロマチン領域以外に、ES細胞に導入した際に特異的に出現するオープンクロマチン領域が存在することを明らかになった。これら2タイプのオープンクロマチン領域により制御される近傍遺伝子が協調して働くことによって、ダイレクトな細胞性質変換が可能になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のオープンクロマチン解析では、転写因子ネットワークの変化を詳細に解析することが可能である。個々の転写因子の抗体を用いてゲノム上の転写因子結合サイトを同定する実験では、1500個の転写因子のネットワークを体系的に捉えることができない。オープンクロマチンを調べることにより、細胞分化過程におけるゲノム上の「転写因子結合マップ」を作成することができる。そのため、転写因子ネットワークの全体像が明らかとなり、「幹細胞」と「分化細胞」の違いを生み出す分子基盤を理解できると考えられる。また、新規分化誘導因子が明らかになれば、ES細胞を自在に分化誘導できる革新的技術の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：ATAC sequencing was performed to identify open chromatin that regulates differentiation of human ES cells by introduction of transcription factors. Skeletal muscle differentiation by introducing MYOD1 and neuronal differentiation by introducing NGN2 was analysed and we identified several thousands of open chromatin sites specifically present in the differentiated cells. In addition to the sites that MYOD1 and NGN2 originally bind to in adult tissues, there were open chromatin sites that appear specifically when MYOD1 and NGN2 were introduced into ES cells. Together, direct conversions of ES cells to terminally differentiated cells can be achieved by the coordinated action controlled by these two types of open chromatin sites.

研究分野：転写制御

キーワード：ES細胞 細胞分化 転写制御 クロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分化を制御する遺伝子発現パターンは、転写因子の種類によって規定されており、約1500個ある転写因子を体系的に捉えることは、生命システムの分子基盤を理解する上で意義深い。個々の転写因子については多くの研究がなされ、その機能が明らかにされつつあるが、発生や分化の過程に変化する転写因子の種類やお互いの関係性(以下、転写因子ネットワーク)については、いまだ不明な点が多い。また、これまでの転写因子ネットワーク研究では、三胚葉への初期分化を対象とした研究や各組織の分化過程を部分的に解析する研究が多く「胚性幹細胞」から「最終分化細胞」、すなわち分化の「始点」から「終点」までを網羅した研究は皆無である。

これまで転写因子を強制発現させることにより、細胞分化を *in vitro* で誘導しようとする研究が国内外で行われてきた。この分化誘導法の優れた点は、転写因子の発現操作を介して遺伝子発現パターンを分化方向へ転換させるため、分化過程における転写因子ネットワークの起点が明確なところである。ES細胞を用いて同様の試みがなされているが、ES細胞の場合、未分化状態を維持するゲノムの高次構造(クロマチン構造)が形成されているため、たとえ分化制御にかかわる転写因子を過剰発現しても、プロモーター領域に結合できず、下流の遺伝子発現が誘導されにくいという問題点があった。研究代表者は最近、転写因子の結合を促し、効率よく分化するヒトES細胞を樹立した(Akiyama et al., *Development*, 2016)。このES細胞には、ヒストン脱メチル化酵素JMJD3を発現させており、プロモーター領域の抑制的ヒストンメチル化(H3 Lys 27メチル化)が低メチル化状態になっている。そのため、過剰発現させた転写因子がプロモーターに結合することが可能となり、下流の遺伝子を活性化させて、ES細胞を分化細胞へと効果的に誘導させることができる。

## 2. 研究の目的

本研究では、この新規分化誘導法を用い、分化過程における転写因子ネットワークの全体像をクロマチン構造の視点から明らかにし、細胞分化に必要な新たな転写因子の同定を目指す。

具体的な目的として、(1) 転写因子MYOD1およびHNF1を用いてヒトES細胞から骨格筋および肝細胞を分化誘導し、その分化過程においてゲノム上に結合する転写因子の種類をATACシーケンス法(後述)により明らかにする。(2) また、転写因子ネットワークの解析により、骨格筋と肝細胞の分化制御に共通する新規の転写因子を同定し、その重要性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

転写因子ネットワークを調べる上で重要なことは、DNAに結合して実際に機能している転写因子を捉えることである。そこで本研究では、ATACシーケンス法という方法を用いて、ゲノム上に結合する転写因子を網羅的に特定する。ATAC (Assay for transposase-accessible chromatin)シーケンス法は、クロマチン構造から転写因子の結合サイトを特定する方法である(Buenrostro, *Nat Methods* 2013)。基本的に真核生物ゲノムは、DNAがヒストン蛋白質に巻きついたクロマチンと呼ばれる高次構造から成るが、転写因子が結合している領域はクロマチンが開放されて、DNAがむき出しの状態になる。そのため、この「オープンクロマチン」を特定できれば、転写因子が結合するサイトの予測がつく。ATACシーケンス法は、オープンクロマチン領域にアクセスするトランスポゼースを利用し、オープンになった領域を人工配列タグで標識する方法である。標識タグを鋳型にしたプライマーを用いてPCR増幅し、次世代シーケンサーで解読することにより、オープンクロマチン領域をゲノムワイドに同定することができる。それぞれの転写因子は異なる結合モチーフ配列を持つため、オープンクロマチン領域の配列を解析することにより、ゲノム上に結合する転写因子の種類とその結合サイトを明らかにすることができる。

本研究計画では、ヒトES細胞から骨格筋および肝細胞を分化誘導し、MYOD1およびHNF1を端緒とする転写因子ネットワークを明らかにすることにより、新規分化誘導因子を同定する。

以下のように計画を進めていく。

- (1) MYOD1およびHNF1の強制発現系を用いて骨格筋および肝細胞を分化誘導させる。
- (2) ATACシーケンス法により、分化開始から完了までの転写因子結合サイトを特定する。
- (3) 転写因子結合サイトの情報を用いて転写因子ネットワークを構築する。
- (4) 上記の解析から新規転写因子を同定して同解析と機能解析を行う。

## 4. 研究成果

転写因子導入によるヒトES細胞の分化誘導を制御するcis-elementをゲノムワイドに同定するためにATACシーケンス法を行った。2017年度はMYOD1導入によるES細胞-骨格筋変換におけるオープンクロマチンをATACシーケンス法により解析を行い、これまで知られていない新たなcis-elementの同定に成功した。ヒトES細胞と誘導骨格筋に数万か所あるオープンクロマチン領域を比較し、それぞれに特異的に存在するオープンクロマチン領域を数千箇所同定した。これらのオープンクロマチン領域は、それぞれOCT4の結合、またはMYOD1の結合と関連があり、近傍遺伝子の活性化に関与することがわかった。興味深いことに誘導骨格筋に特異的に出現するオープンクロマチン領域の中で、MYOD1が結合する領域は3割程度であり、残りの大部分の

オープンクロマチン領域は本来 MYOD1 の結合が確認されていない領域であった。さらに、このオープンクロマチン領域は成人由来の骨格筋におけるオープンクロマチン領域とも合致せず、ES 細胞-骨格筋変換に特異的に生じるオープンクロマチン領域であることが明らかとなった。この特異的オープンクロマチン領域は intron や intergenic 領域に存在し、しかも共通したモチーフ配列を含んでおり、その近傍遺伝子の発現制御に関わっていることが示された。

2018 年度は NGN2 導入による ES 細胞-神経細胞分化系において ATAC-シーケンスを行った。当初の計画では、骨格筋と肝細胞分化を行う予定であったが、肝細胞分化系は効率が悪く分化完了までに時間を要するため、代わりに分化効率の非常に高い神経分化系を用いた。NGN2 導入により 1 週間でほぼ 100% の細胞が神経へと分化するので、この間に変化するオープンクロマチンをゲノムワイドに解析した。その結果、骨格筋分化と同様に神経分化においても ES 細胞からダイレクトな変換を起こすために特異的に出現するオープンクロマチン領域の存在が明らかとなった。すなわち、発生過程や成体の細胞において元来 MYOD1 や NGN2 が結合するオープンクロマチン領域以外に、ES 細胞に導入した際に特異的に出現するオープンクロマチン領域が存在することを明らかになった。さらにその領域には MYOD1 導入と NGN2 導入で共通する領域が多くみられることがわかった。これら 2 タイプのオープンクロマチン領域により制御される近傍遺伝子が協調して働くことによって、ダイレクトな細胞性質変換が可能になると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1: Nishihara K, Shiga T, Nakamura E, [Akiyama T](#), Sasaki T, Suzuki S, Ko MSH, Tada N, Okano H, Akamatsu W. Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed with Three Inhibitors Show Accelerated Differentiation Potentials with High Levels of 2-Cell Stage Marker Expression. *Stem Cell Reports*. 2019 Feb 12;12(2):305-318. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.12.018. Epub 2019 Jan 31. PubMed PMID: 30713040; PubMed Central PMCID: PMC6373546. 査読有り

2: Hiratsuka K, Monkawa T, [Akiyama T](#), Nakatake Y, Oda M, Goparaju SK, Kimura H, Chikazawa-Nohtomi N, Sato S, Ishiguro K, Yamaguchi S, Suzuki S, Morizane R, Ko SBH, Itoh H, Ko MSH. Induction of human pluripotent stem cells into kidney tissues by synthetic mRNAs encoding transcription factors. *Sci Rep*. 2019 Jan 29;9(1):913. doi: 10.1038/s41598-018-37485-8. PubMed PMID: 30696889; PubMed Central PMCID: PMC6351687. 査読有り

3: Ida H, [Akiyama T](#), Ishiguro K, Goparaju SK, Nakatake Y, Chikazawa-Nohtomi N, Sato S, Kimura H, Yokoyama Y, Nagino M, Ko MSH, Ko SBH. Establishment of a rapid and footprint-free protocol for differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic endocrine cells with synthetic mRNAs encoding transcription factors. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Oct 25;9(1):277. doi: 10.1186/s13287-018-1038-3. PubMed PMID: 30359326; PubMed Central PMCID: PMC6203190. 査読有り

4: [Akiyama T](#), Sato S, Chikazawa-Nohtomi N, Soma A, Kimura H, Wakabayashi S, Ko SBH, Ko MSH. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into skeletal muscle cells by combining RNA-based MYOD1-expression and POU5F1-silencing. *Sci Rep*. 2018 Jan 19;8(1):1189. doi: 10.1038/s41598-017-19114-y. PubMed PMID: 29352121; PubMed Central PMCID: PMC5775307. 査読有り

5: Hirayama M, Ko SBH, Kawakita T, [Akiyama T](#), Goparaju SK, Soma A, Nakatake Y, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Shimmura S, Tsubota K, Ko MSH. Identification of transcription factors that promote the differentiation of human pluripotent stem cells into lacrimal gland epithelium-like cells. *NPJ Aging Mech Dis*. 2017 Jan 24;3:1. doi: 10.1038/s41514-016-0001-8. eCollection 2017. PubMed PMID: 28649419; PubMed Central PMCID: PMC5445629. 査読有り

6: [Akiyama T](#), Wakabayashi S, Soma A, Sato S, Nakatake Y, Oda M, Murakami M, Sakota M, Chikazawa-Nohtomi N, Ko SBH, Ko MSH. Epigenetic Manipulation

Facilitates the Generation of Skeletal Muscle Cells from Pluripotent Stem Cells. Stem Cells Int. 2017;2017:7215010. doi: 10.1155/2017/7215010. Epub 2017 Apr 9. Review. PubMed PMID: 28491098; PubMed Central PMCID: PMC5401757. 査読有り

7: Goparaju SK, Kohda K, Ibata K, Soma A, Nakatake Y, Akiyama T, Wakabayashi S, Matsushita M, Sakota M, Kimura H, Yuzaki M, Ko SB, Ko MS. Rapid differentiation of human pluripotent stem cells into functional neurons by mRNAs encoding transcription factors. Sci Rep. 2017 Feb 13;7:42367. doi: 10.1038/srep42367. PubMed PMID: 28205555; PubMed Central PMCID: PMC5304326. 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 2つのヒストン脱メチル化酵素により制御される転写調節機構 秋山智彦  
熊本大学発生医学研究所第 348 回発生研セミナー(招待講演) 2019 年

2. マスター転写因子とヒストン脱メチル化酵素の関連性 秋山智彦  
第 41 回日本分子生物学会(招待講演) 2019 年

3. Transcriptome Manipulation to Facilitate the Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells 秋山智彦 幹細胞シンポジウム(招待講演) 2018 年

4. 転写因子導入によるヒト多能性幹細胞の分化誘導の自在化を目指して 秋山智彦  
熊本大学発生研セミナー(招待講演) 2017 年

5. 転写因子およびクロマチン制御因子による分化誘導の自在化を目指して 秋山智彦  
分子生物学会フォーラム(招待講演) 2017 年

6. ヒト ES 細胞の直接分化誘導に関わる accessible chromatin 構造 秋山智彦  
次世代生命科学研究会(招待講演) 2017 年

7. Accelerated differentiation of human pluripotent stem cells by ectopic expression of histone demethylase 秋山智彦 日本発生生物学会(招待講演) 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。