

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22452

研究課題名(和文) ヒト特異的進化を生じさせたエピゲノム変遷プログラムの変化とその分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for changes in epigenome dynamics that have been involved in human-specific traits

研究代表者

一柳 健司 (Ichiyangi, Kenji)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：70401560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト特異的な形質の発現起源を理解するには近縁種との比較が有効である。本研究では、京都大学霊長類研究所のチンパンジー個体からiPS細胞を樹立し、その分化能、トランスクリプトーム、エピゲノムといった細胞状態をヒトiPS細胞と比較した。これらの観点ではヒトとチンパンジーのiPS細胞で大きな違いはなかった。そこで、次にiPS細胞をニューロンに分化させるプロトコルを確立した。この分化誘導系を用いて、ヒトとチンパンジーのニューロン発現過程にどのようなエピゲノムの違いが生じ、どのような細胞性質の違いが生じるかを明らかにする素地を作ることができたと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト特異的な形質や形態の理解には近縁種と発生学的な観点から比較する研究が有用であるが、実際の発現過程を解析することは困難である。ヒトiPS細胞およびチンパンジーを含む非ヒト霊長類のiPS細胞を用いた比較解析研究は新たなヒト進化学の方法として注目されている。本研究によって、ヒトとチンパンジーのiPS細胞の状態は大きく変わっていないことが確認され、これらを用いることにより、さまざまな分化誘導実験と比較解析が可能になった。また、ニューロンへの分化誘導系も着実に確立することができた。これは他の霊長類のiPS細胞を用いても同様に分化させることができる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：Comparison of closely related species is a powerful tool to elucidate the origin of human-specific traits. In this study, we have established iPSC cells from chimpanzee individuals in Primate Research Institute, Kyoto University. We then compared their pluripotency, transcriptomes, and epigenomes with those of human iPSC cells. The iPSC cells from the two species were very similar in these regards. We established a protocol to induce differentiation of iPSC cells into neurons, which will be used to reveal interspecies changes in the epigenetic program during neuronal differentiation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピゲノム 進化 iPS細胞 レトロトランスポゾン 転写因子 神経前駆細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生物進化において、種固有の形質はタンパク質配列の変化や遺伝子の獲得等によって生じる一方、遺伝子発現の量やパターンの変化によっても生じる。ヒトはヒト科霊長類の中で、高度な脳機能、低下した筋肉、細化した体毛、アルツハイマー病の罹患率上昇など、様々な特異的形質をもつ。

そこで、ヒトと他種を分ける筋肉や神経の形質に着目し、成人・成獣における違いが発生過程でどのように生じるのかを明らかにすることを考えた。特に、発生過程の遺伝子発現の変遷プログラムはエンハンサーなどのシス配列の制御を受けるとともに、**DNA** メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな制御も受けていることに注目し、エピゲノムが細胞分化に伴ってどのように変遷するのかをヒトとチンパンジーで比較し、その変遷が遺伝子発現や表現型差とどのように関わっているのかを明らかにすることが重要であると考えた。このようなエピゲノム差がゲノム配列による制御を受けている可能性もあるが、その規則性は未知であった。

ヒトでは胎児組織での遺伝子発現、エピゲノムの解析や個体のゲノム改変は不可能であり、これまで「ヒト進化の発生学的かつ遺伝的な分子基盤」に迫ることはできなかった。しかし、**iPS** 細胞の樹立方法が確立され、それらの細胞を目的の細胞に分化させる技術も進展したことにより、今や胎児期の細胞分化の様子を培養ディッシュの中で再現できる時代となった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒトおよびチンパンジーの**iPS** 細胞を用いて、細胞分化に付随するエピゲノムや遺伝子発現の変遷と最終的な分化細胞の質的变化を同定することを通して、ヒト進化過程の一端と進化におけるエピジェネティクスの役割を明らかにすることを目的とした。

遺伝子配列(アミノ酸配列)の差より遺伝子発現の差が種を分けるというアイデアは半世紀前に提唱され、近年、転写制御シス配列の変化が形態進化に大きな役割を持つことが明らかにされつつある。さらにヒト集団内や集団間の遺伝的多様性の解析から、正の選択を受けてきた配列が非コード領域にもあることが分かってきた。しかし、これらの正選択を受けた配列が表現型と結びつく分子機構は不明である。この分子機構の一つはエピゲノム変化であると考えられ、成体組織でのエピゲノム変化を解析している例は多いが、発生過程でのエピゲノム変遷プログラムの変化として捉えることで新たなブレークスルーを生み出すことを目指した。

## 3. 研究の方法

### 3.1 チンパンジー*iPS* 細胞の樹立

チンパンジー3個体(オス1、メス2、京都大学霊長類研究所飼育)の線維芽細胞に**POU5F1**, **SOX2**, **KLF4**, **L-MYC**, **LIN28**および**p53 shRNA**を発現するエピソーマルベクターを導入し、未分化細胞のコロニーを得た。核型を確認し、さらに**POU5F1**、**SOX2**、**NANOG**、**SALL4**など、未分化細胞特異的遺伝子が発現していることを免疫染色で確認して、これらを**iPS**細胞とした。

### 3.2 ニューロン分化誘導系の確立

ニューロスフェア形成法を用いて、7日間培養することで、**iPS**細胞からニューロスフェアへと分化誘導し、**PAX6**などの外胚葉マーカー遺伝子の発現を免疫染色で確認した。さらに誘導初

日から7日まで2日おきに細胞を回収しmRNA-seq解析を行った。ニューロスフェア形成後、接着培養に戻して培地からFGF2とEGFを除去することにより、ニューロンへの分化誘導が可能であるか検討した。

### 3.3 ヒトおよびチンパンジーiPS細胞のトランスクリプトーム比較

分化誘導における経時変化を解析するにあたり、スタートとなるiPS細胞がどれくらい似ているかを確認することは重要である。また、違いがある場合、どのようなメカニズムによって違いが生じているのかを明らかにすることで、進化におけるトランスクリプトーム変化のメカニズムを明らかにできると考えた。そこで、ヒト2個体、チンパンジー2個体(全てメス)のiPS細胞を同じ条件で培養し、RNAを回収してmRNA-seqを行った。

### 3.4 ヒトおよびチンパンジーiPS細胞のエピゲノム比較

エピジェネティックな制御にはDNAやヒストンの翻訳後修飾が主要な役割を果たすことが知られている。そこで、転写活性化と関わりが深いヒストンH3の4番目のリジンのトリメチル化(H3K4me3)とH3の27番目のリジンのアセチル化(H3K27ac)および転写抑制と関わりが深いH3の27番目のリジンのトリメチル化(H3K27me3)についてChIP-seq解析を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 チンパンジーiPS細胞の樹立

確立したiPS細胞を用いて、胚様体分化誘導を行うと、POU5F1、SOX2、NANOG、SALL4などの発現が消失し、初期外胚葉や中内胚葉で発現する遺伝子が発現するようになったことから、iPS細胞としての性質を持つことを認めた。

### 4.2 ニューロン分化誘導系の確立

iPS細胞からニューロスフェアへと分化誘導した初日から7日まで、2日おきに細胞を回収しmRNA-seq解析を行ったところ、未分化細胞特異的遺伝子群の発現低下と初期外胚葉特異的遺伝子群の発現上昇を確認した。ニューロスフェア形成後、接着培養に戻して培地からFGF2とEGFを除去することにより、細胞形態、遺伝子発現ともにニューロンと認められる細胞に変化させることができた。これらの結果により、ヒトiPS細胞からニューロスフェアを経て得ることのできるニューロンと同等の細胞を得ることができた。従って、分化誘導過程のエピゲノム変化のタイムコースを解析する素地を作ることができた。

### 4.3 ヒトおよびチンパンジーiPS細胞のトランスクリプトーム比較

ヒト2個体、チンパンジー2個体(全てメス)のiPS細胞を用いてmRNA-seqを行った結果、種を超えて遺伝子発現プロファイルは高い類似性を示すことが分かった。これは、特定の未分化マーカー遺伝子のみならず、多くの遺伝子の発現量が種間でも同じようになっていることを意味し、品質的にも両種のiPS細胞が比較可能なくらい似ていることが確認できた。一方、ヒトiPS細胞はL1レトロトランスポソンの発現がチンパンジーiPS細胞よりも低く、L1の転移頻度も低いことが以前に報告されていたが(Marchette et al, Nature 2013)、L1発現量に際立った種間差はなかった。その他のレトロトランスポソンの発現量も似ていたが、PTERVなど種特異的なレトロトランスポソンについては、もちろん、そのレトロトランスポソンがある種でのみ発現していた。なお、PTERVがいつ発現するのかはこれまで知られていなかったが、iPS細胞で高い発現を示すことが分かり、胚発生のごく初期(生殖細胞が分化する前)に転移することでチンパンジー集団の中でコピー数を増やしている可能性が示唆された。

### 4.4 ヒトおよびチンパンジーiPS細胞のエピゲノム比較

H3K27acのChIP-seqについては結果を得ることはできたが、信頼のおけるピークが少なく、

種間比較解析を行う品質ではなかった。今後、再度実施する予定である。**H3K4me3** と **H3K27me3** は質の高いデータを得ることができ、同種2個体間で大部分のピークが共通していた。それらの共通ピークをその種のピークと定義し、異種間で比較を行うと、同様に大部分のピークが一致していた。これはトランスクリプトームが種間でよく似ていることと一致する。一方、どちらの修飾においても種間差がある領域を検出した。**H3K4me3** のピークについては、**4~5%**の領域においてヒト特異的あるいはチンパンジー特異的な領域があった。**H3K27me3** ピークでは **13%** (約 **700** 領域) がヒト特異的であった一方、チンパンジー特異的な領域は **2%** (約 **100** 領域) に留まった。この差を反映して、ヒト **iPS** 細胞の方が **H3K4me3** と **H3K27me3** の両方の修飾を持つ **bivalent** 領域が多いことが明らかになった。これらの種特異的な **H3K4me3** や **H3K27me3** のピーク領域の塩基配列を種間比較したが、他の領域に比べて特に変異頻度が高いわけではなかった。しかし、種特異的な **H3K4me3** ピークを精査すると、**POU5F1** や **SOX2** といった未分化細胞で発現する転写因子の結合部位に変異が多く生じていることが明らかになった。したがって、これらの結合部位での変異が種間のエピゲノム差を生み出す要因の一つになっている可能性が示唆された。**iPS** 細胞から分化させて得られた神経堤細胞の活性化エンハンサーの種特異性 (**Prescott et al., Cell 2015**) と比べたところ、興味深いことに、**iPS** 細胞のエピゲノム差とはほとんど一致しなかった。従って、神経堤細胞でみられるエピゲノム種間差は、その大部分が分化過程で生じるものと考えられ、分化過程におけるエピゲノム比較解析の重要性が明らかとなった。

ゲノム変化にはレトロトランスポゾン挿入もある。これまでも、我々はレトロトランスポゾンの挿入によって精子 **DNA** メチル化状態が変化することを明らかにしてきた (**Fukuda et al., Hum Mol Genet 2017**)。そのようなことがヒストン修飾でも生じているのかを調べたところ、**LTR5** というレトロトランスポゾン挿入によって、種特異的な **H3K4me3** ピークが生じていることが明らかとなった。**LTR5** は **iPS** 細胞で高発現しているレトロトランスポゾンで、**POU5F1** と **SOX2** の結合配列を持つ。つまり、**LTR5** 挿入によって **H3K4me3** ピークが新たに作られることは、塩基置換で **POU5F1** や **SOX2** の結合配列が生じると **H3K4me3** ピークが新たに作られるという上記の結果とも一致する。しかも、興味深いことに、**LTR5** が遺伝子近傍に挿入されている場合、近傍遺伝子の発現が上昇していることも発見した。

今後は、本研究で確立した分化誘導技術とエピゲノム・トランスクリプトーム種間比較解析技術を用いて、分化過程におけるエピゲノム変遷プログラムの進化を明らかにし、その要因を改名していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kitajima R, Nakai R, Imamura T, Kameda T, Kozuka D, Hirai H, Ito H, Imai H, Imamura M.	4. 巻 44
2. 論文標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 101749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2020.101749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yu-Ching Lin ZY, Nakai R, Hirai H, Kozuka D, Katayama S, Nakamura S, Okada S, Kitajima R, Imai H, Okano H, Imamura M	4. 巻 112
2. 論文標題 Reprogramming of chimpanzee fibroblasts into a multipotent cancerous but not fully pluripotent state by transducing iPSC factors in 2i/LIF culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Differentiation	6. 最初と最後の頁 67-76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.diff.2020.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 今村公紀, 仲井理沙子	4. 巻 -
2. 論文標題 チンパンジーの細胞をリプログラミング - iPSC細胞作製の副産物が示す神経堤細胞様の特性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 academist Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 今村公紀	4. 巻 11
2. 論文標題 生命医科学における霊長類のiPS細胞	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 遺伝子医学	6. 最初と最後の頁 162-166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 平田真由、一柳 朋子、橋本 拓磨、今村 公紀、一柳 健司
2. 発表標題 ヒトおよびチンパンジー iPS細胞を用いたヒストン修飾の比較解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲井理沙子、リンザッカリーユーチン、平井啓久、小塚大揮、片山聖也、中村紳一郎、岡田佐和子、北島龍之介、今井啓雄、岡野栄之、今村公紀
2. 発表標題 iPSC初期化因子導入による2i/LIF培養条件下でのチンパンジー線維芽細胞のリプログラミング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 霊長類 iPS細胞を用いたヒト進化生物学/進化医学
3. 学会等名 中部幹細胞クラブシンポジウム2019 「『幹細胞人類学』-幹細胞でヒトの発生・生理・疾患・進化を理解する-」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 iPS細胞×霊長類学で広がる研究
3. 学会等名 NBRPニホンザル 第15回公開シンポジウム「ニホンザル研究～ここがおもしろい～」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一柳健司
2. 発表標題 霊長類のエピゲノム進化におけるシス制御配列やトランスポゾン配列の役割
3. 学会等名 中部幹細胞クラブシンポジウム2019「『幹細胞人類学』-幹細胞でヒトの発生・生理・疾患・進化を理解する-」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一柳健司
2. 発表標題 霊長類iPS細胞を用いたエピゲノム進化の解析
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 一柳健司
2. 発表標題 ヒトとチンパンジーのiPS細胞のエピゲノム比較解析
3. 学会等名 第50回ホミにゼーション研究会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hirohisa Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Takuya Imamura, Tomonori Kameda, Daiki Kozuka, Hiroo Hirai, Haruka Ito, Hiroo Imai, Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of chimpanzee induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 2020 ICGSK-APCC7 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Zachary Yu-Ching Lin, Risako Nakai, Hiroo Hirai, Daiki Kozuka, Seiya Katayama, Shin-ichiro Nakamura, Sawako Okada, Ryunosuke Kitajima, Hiroo Imai, Hideyuki Okano, Masanori Imamura
2. 発表標題 Reprogramming of chimpanzee fibroblasts into a multipotent cancerous state by transducing iPSC factors in 2i/LIF culture
3. 学会等名 2020 ICGSK-APCC7 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Imamura
2. 発表標題 Modeling of early neural development in vitro by direct neurosphere formation culture of human/non-human primate induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 小塚大揮, 平井啓久, 井藤晴香, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 チンパンジーiPS細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第36回日本霊長類学会大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 井藤晴香, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 霊長類 iPS 細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第10回日本マーモセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 仲井理沙子, 北島龍之介, 今村拓也, 亀田朋典, 井藤晴香, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀
2. 発表標題 霊長類 iPS 細胞を用いたダイレクトニューロスフェア形成培養による初期神経発生の再現
3. 学会等名 第 65 回プリマーテス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村公紀
2. 発表標題 霊長類幹細胞研究の総括
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>研究室ホームページ (一柳)  <a href="http://nuagr2.agr.nagoya-u.ac.jp/~ged/research.html">http://nuagr2.agr.nagoya-u.ac.jp/~ged/research.html</a>  研究室ホームページ (今村)  <a href="http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/molecular_biology/research/index.html">http://www.pri.kyoto-u.ac.jp/sections/molecular_biology/research/index.html</a></p>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	今村 公紀  (Imamura Masanori)  (80567743)	京都大学・霊長類研究所・助教    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関