

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03829

研究課題名（和文）De novo DNAメチル化の消去が及ぼすヒトES/iPS細胞の初期胚化の検証

研究課題名（英文）Verification of the effect of De novo DNA methylation elimination on early embryogenesis of human ES/iPS cells.

研究代表者

福田 篤（Fukuda, Atsushi）

東海大学・医学部・講師

研究者番号：00638091

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト多能性幹細胞は、体を構成するほぼ全ての細胞に分化することが可能なin vitro産物であり、カウンターパートであるヒト初期胚細胞と比較して、DNAメチル化が著しく亢進していることが明らかとなっている。本研究では、ヒト多能性幹細胞特異的なDe novo DNAメチル化を除去することで、どの程度ヒト初期胚細胞に類似出来るかを転写やエピゲノムの観点からアプローチした。研究の結果、de novo DNAメチル化欠損が及ぼす影響は、用いる株で大きく異なることが示された。さらにDNMT3A/3Bは、女性多能性幹細胞でのX染色体不活化維持に必須であるlncRNA XIST遺伝子を制御することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞は、体を構成するほぼ全ての細胞に分化可能な細胞であり、再生・細胞医療において中心的な役割を担っている。近年は、特定の疾患由来のiPS細胞など、疾患ゲノムを考慮したGenotype-Phenotype解析にも活用され、創薬開発分野でも注目を浴びている。ヒト多能性幹細胞は、ヒトの初期胚細胞と同様の機能を持つと推測されているが、試験管産物特有の異常も報告されている。本研究では、ヒト多能性幹細胞の試験管産物特有の現象を解明することで、より高品質なヒト多能性幹細胞の作製と応用的基盤の構築を目指すことを目的とした。

研究成果の概要（英文）：Human pluripotent stem cells (hPSCs) are in vitro products capable of differentiating into almost all the cells that make up the body. however, genome wide DNA methylation status of hPSCs are different compared to those of human preimplantation embryos (epiblast).

In this study, we asked how blocking of de novo DNA methyltransferases activity in hPSCs affects transcriptome and epigenomic status. The deep sequencing analysis revealed that the effect of transcriptomic status in de novo DNA methyltransferases deletion greatly depends on genetic background. Interestingly, we found that female cell specific abnormality, erosion of X-chromosome dosage compensation, is prevented by the mutations. Thus, our findings indicate that de novo DNA methyltransferases activity is one of the drivers responsible for in vitro specific abnormality in hPSCs.

研究分野：ヒト多能性幹細胞

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ヒト多能性幹細胞 (ES/iPS 細胞: hPSC) は、多分化能を有することから再生医療、創薬スクリーニングやヒトの初期発生における *ex vivo* モデリング細胞として利用されている。これまでに樹立された hPSC の殆どは、Primed 型 hPSC と呼ばれ、初期胚における胚盤胞のエピプラストのカウンターパートとして考えられており、ヒトの初期胚発生を研究する最適なツールでもある。しかし、ゲノムワイドなトランスクリプトーム/エピゲノム解析から Primed 型 hPSC は、ヒト初期胚エピプラストとは大きく異なることが明らかとなった (Smith et al. Nature. 2010. Guo et al. Nature. 2014)。倫理的観点からヒトの初期胚を基礎研究的に利用することは極めて困難であり、hPSC はその代替として唯一の細胞であるが、初期胚との違いは、本来のヒト胚モデリングに影響する可能性がある。また、これまでの報告から、女性 (XX 型) hPSC では、代表的なエピゲノム制御機構である X 染色体不活化が培養により不可逆的に破綻することが明らかとなった (Mekmohubad et al. Cell Stem Cell. 2012)。さらに、近年開発された Naïve 型ヒト多能性幹細胞 (Naïve hPSC) は、染色体異常を伴うだけでなく、直接的な細胞分化は不可能であり、Primed 型へと戻す必要があることが報告されている (Theunissen et al. Cell Stem Cell. 2014)。即ち、既存の hPSC ではヒト初期胚の分化を正確に模倣することが困難である

2. 研究の目的

ヒトエピプラストに類似した正常な hPSC を作成することは、ヒトの初期胚発生のモデリング細胞として有用である。さらに、従来 XX 型 Primed hPSC では、培養により不可逆的な X 染色体不活化の破綻が引き起こされ、X 連鎖遺伝子の病態モデリングの模倣が不可能になる (Mekmohubad et al. Cell Stem Cell. 2012)。それ故、多くの hPSC を用いた研究では、XY (男性) 株が優先的に使用される傾向がある。従って、新規のヒト初期胚型 hPSC 作成は、ヒトの生物学的側面だけでなく、女性医学の観点からも重要であると考えられる。これまでの研究から、hPSC は長期培養により DNA メチル化状態が著しく変動することが明らかとなっている (Nishino et al. PLoS Genetics. 2012. Nazor et al. Cell Stem Cell. 2012)。さらに、X 染色体不活化状態も、培養とともに異常化することが報告されている (Mekmohubad et al. Cell Stem Cell. 2012)。そこで、本研究では、hPSC で著しく高発現する *de novo* メチル化酵素 (DNMT3A/3B) を樹立直後の複数の hPSC 株で消去し、エピプラストの特性を維持した新規 semi-primed 型 hPSC の特性評価を行う。

3. 研究の方法

樹立後間もない hPSC での DNMT3A/3B 欠損 semi-primed 型 hPSC は正常な X 染色体不活化を維持し、自己複製能が備わっていることが明らかとなっている。しかし、その分化能や詳細な semi-Primed 型 hPSC としての特性は不明な点が多い。さらに、遺伝的多様性を考慮すると複数の semi-Primed 型 hPSC で DNMT3A/3B 除去の影響を検証する必要がある。これまでの研究成果から、hPSC の CRISPR/Cas9 システムによる DNMT3A/3B 除去は容易であることが示されており (Cho et al. Nature Genetics. 2015.) 全ての遺伝子改変ツールは申請者の研究室で既に使用されている。本研究では、樹立直後と長期培養後の複数の hPSC 株において DNMT3A/3B を除去した semi-primed 型 hPSC を作成し、エピプラストとの比較解析、および分化能解析を行う。さらに、分化能試験では、DNMT3A/3B の薬剤誘導性レスキュー型 semi-Primed 型 hPSC も用いることで、本来備わっている *de novo* DNA メチル化の活性を維持した状態への変換も可能なシステムを構築する。

< 本研究の流れ >

- (1) 複数の Primed 型 hPSC 株の DNMT3A/3B 除去: SEES 細胞株、iPS 細胞株で現在実施中
- (2) Single cell RNA-seq 解析: 公共データにおけるエピプラストとの比較解析を行う。なお、HUES21 株では作成済のため、即座に解析予定である。
- (3) DNA メチローム解析: Semi-Primed 型のエピゲノム状態を把握するために、RRBS 解析を行う。In vivo データは (Smith et al. Nature. 2010) を参考に、Inner cell mass (ICM) との比較解析を実施する。
- (4) DNMT3A/3B レスキュー Semi-Primed 型 hPSC の作成と分化能試験: 複数の新規に樹立された Semi-Primed 型 hPSC に対して行う。

4. 研究成果

ヒト多能性幹細胞は体を構成するほぼ全ての細胞に分化することが可能である一方、*in vitro*

産物である。カウンターパートであるヒト初期胚細胞と比較し、ヒト多能性幹細胞では DNA メチル化が著しく亢進していることがこれまでの報告で明らかとなっている。本研究では、ヒト多能性幹細胞特異的な De novo DNA メチル化を除去することで、どの程度ヒト初期胚細胞に類似出来るかを転写やエピゲノムの観点から明らかにする。

本年度は、de novo DNA メチル化酵素である DNMT3A 及び 3B 欠損ヒト多能性幹細胞における転写解析を実施した。RNA-sequencing 解析の結果、de novo DNA メチル化欠損が及ぼす影響は、用いる株によって大きく異なることが示された。さらに、DNMT3A/3B は、女性多能性幹細胞における X 染色体不活化維持に必須である long-non coding RNA XIST 遺伝子を制御することを発見した。これらのデータの一部は、国際共同研究成果の 1 つとして、責任著者として論文を発表した (Fukuda et al. Stem Cell Reports. 2021)。

分化能に関する試験においては、非常に興味深いことに、De novo DNAm を欠いた、semi-Primed 型の hES 細胞では、X 染色体不活化状態によって分化能が変化することを見出した (Motosugi et al. Cell Rep. Methods. 2022)。これらの結果は、De novo DNAm による細胞分化能の上流に X 染色体不活化が位置付けられていることを示しており、遺伝的背景の多様性だけでなく、エピゲノム多様性も分化能に影響することが明らかとなった。

ヒト初期胚データとの統合解析においては、single cell レベルでの遺伝子発現解析が望まれることから、統合解析のプラットフォームを確立するとともに、ゲノムワイドな DNA メチル化解析を実施する体制へと移行している。一方、DNA メチル化状態における解析では、DNMT3A/3B 欠損ヒト多能性幹細胞株では、特定の染色体において著しく DNA メチル化レベルの変動が激しいことが明らかとなった。また、ゲノムワイドレベルでの著しい DNA メチル化低下が確認され、エピゲノムの観点から初期胚に類似していることが示唆されている。これらの解析は、ゲノム上の CpG 配列を標的としたプロモーター領域において実施しているため、今後は、non-CpG 領域、Gene Body 領域を対象に解析を進めることで、統合的に De novo DNAm の除去が及ぼす初期胚化への影響を解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsushi Fukuda, Dane Z Hazelbaker, Nami Motosugi, Jin Hao, Francesco Limone, Amanda Beccard, Patrizia Mazzucato, Angelica Messana, Chisa Okada, Irune Guerra San Juan, Menglu Qian, Akihiro Umezawa, Hidenori Akutsu, Lindy E Barrett, Kevin Eggan	4. 巻 16(9)
2. 論文標題 De novo DNA methyltransferases DNMT3A and DNMT3B are essential for XIST silencing for erosion of dosage compensation in pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2138-2148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2021.07.015	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------