

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 8日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21790372

研究課題名（和文） ヒト幹細胞のDNAメチル化に基づいた病理診断システムの構築

研究課題名（英文） Study for scoring system of human stem cells based on DNA methylation

研究代表者

西野 光一郎 (NISHINO KOICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

研究成果の概要（和文）：ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、体性幹細胞を用いた再生医療の実現のためには各幹細胞を厳密に評価することが必要不可欠である。本研究では、DNAメチル化の観点から各幹細胞の特性評価を行った。DNAメチル化比較解析から新たなヒト多能性幹細胞エピジェネティックマーカーを同定した。さらにiPS細胞は培養と共にES細胞に近づいていくことを示し、iPS細胞におけるリプログラミング機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Human somatic stem cells and pluripotent stem cells including iPSCs are considered to be powerful resources in regenerative medicine. To define characters of human stem cells, we determined the DNA methylation profiles and compared among them. Continuous passaging of the iPSCs diminished the differences between iPSCs and ESCs, implying that iPSCs lose the characteristics inherited from the parent cells and adapt to very closely resemble ESCs over time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ヒト幹細胞・ヒトiPS細胞・DNAメチル化・診断企画化・標準化

1. 研究開始当初の背景

ヒト胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)の樹立の成功で再生医療への期待が高まっている。しかし実際にはES細胞やiPS細胞を用いた移植細胞への分化研究は研究室レベルのものであり、臨床の医療技術に応用されるまでには時間を要することは否めない。一方、間葉系幹細胞や神経幹細胞、造血幹細胞などの体性幹細胞を用いた再

生医療応用へ向けた研究は現時点での再生医療を支える重要な位置を占める。体性幹細胞は増殖能と分化能に制限があるため、Commitment stem cells というべき側面を持っている。このためES細胞やiPS細胞に比べ、分化の方向を予測しやすく、また癌化するリスクが少ないために再生医療分野における細胞移植治療に有利である。我々はこれまで細胞移植を用いた再生医療を目的と

して骨髄細胞、子宮内膜、胎盤、臍帯血等を由来とする間葉系細胞の分離・培養に成功しており、成育医療センター・バイオリソースとしてセルバンク化し、細胞移植の供給源として細胞提供システムの構築を進めていた。しかし、ヒト間葉系幹細胞および ES/iPS 細胞を移植細胞として安全にかつ安定に供給するためにはより厳密に細胞を評価することが不可欠である。

DNA のメチル化やヒストンの修飾を含むエピジェネティクス制御は、全ての遺伝情報を持つ DNA からその細胞に必要な遺伝情報だけを mRNA の形で引き出すための目印として働く。つまり、エピジェネティクス環境は細胞の組織特異的遺伝子発現パターンを決める記憶装置として働き、各細胞の性質を決定づける基盤となっているのである。これまで、エピジェネティクス制御の代表的な現象である DNA メチル化は、インプリント遺伝子の制御や X 染色体の不活化、細胞の癌化に限られたものとの見方があったが、発生における分化に伴ってゲノム DNA の多くの領域でメチル化・脱メチル化の両方が領域特異的にダイナミックに変化し、各細胞に特異的な DNA メチル化パターンが形成されることが示され(Shiota et al., Genes Cells, 2002)、エピジェネティクス制御は極限られた現象ではなく、広く細胞特異的な遺伝子発現パターンを制御する最上位機構として存在し、細胞の分化方向や性質を制御しているのである。

2. 研究の目的

細胞が持つエピゲノム情報は、細胞種・分化度・癌化により、大きく変化することが知られている。幹細胞から目的細胞への分化誘導効率の評価、目的細胞外への分化および癌化等の安全性評価において、エピジェネティック・プロファイリングが必須の役割を担うと期待できる。本研究の目的は各種間葉系幹細胞、ES 細胞、iPS 細胞のエピジェネティック・プロファイリングを比較解析することにより、各種幹細胞の特性を DNA メチル化の観点から特定し、安全性や再現性を担保する細胞評価系開発の基盤技術を確認することにある。

3. 研究の方法

これまで再生医療応用を目指した成育医療センター・バイオリソースとして、様々な間葉系細胞の分離・培養に成功し、セルバンク化を進めてきた。これら希少なヒト細胞のうち、子宮内膜細胞、羊膜細胞、胎盤動脈細胞、月経血細胞、胎児肺線維芽細胞、指皮膚細胞、指骨髄細胞、及びヒト耳軟骨細胞のゲ

ノム DNA を採取し、Illumina HumanMethylation27K を用いて、14,000 遺伝子のプロモーター領域内の 27,000 箇所におよぶ大規模な DNA メチル化解析を行い、各細胞の DNA メチル化プロファイリングを行った。さらに、子宮内膜細胞、羊膜細胞、胎盤動脈細胞、月経血細胞、胎児肺線維芽細胞から iPS 細胞を作成し、同様に DNA メチル化プロファイリングを行った。バイオインフォマティクス手法を駆使して各細胞の DNA メチル化状態の比較解析を行い、細胞特異的メチル化可変遺伝子(T-DMR 遺伝子)の同定を行った。特定の遺伝子についてはマイクロアレイや RT-PCR を用いて発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 間葉系細胞の DNA メチル化プロファイル
子宮内膜細胞、羊膜細胞、胎盤動脈細胞、月経血細胞、胎児肺線維芽細胞の DNA メチル化プロファイル比較解析ではクラスター解析、主成分解析の結果、由来の異なる細胞が明確に判別でき、細胞の種類や特性に一致する分類が明確に可能であることが明らかになった。また、5 種類のヒト細胞における個々のメチル化状態について詳細に解析を行ったところ、解析した 26,770 箇所のうち、21,430 箇所は異なる細胞間で DNA メチル化状態に差はなく、全体の 19.95% の 5,340 が細胞特異的メチル化可変領域(T-DMR)であった。各細胞特異的な T-DMR 遺伝子の数は、子宮内膜細胞 43、羊膜細胞 246、胎盤動脈細胞 438、月経血細胞 84、および胎児肺線維芽細胞 321 遺伝子であった。細胞特異的 T-DMR 遺伝子の内訳を見ると、子宮内膜細胞では、HOXA9、羊膜細胞では、ZIC5、HOXB4、胎児肺線維芽細胞では、HOXB6、ZNF581、など発生、分化に重要な役割を示す遺伝子群が同定されているのが分かる。HOX や GATA、FOX 関連遺伝子などが遺伝子発現解析ではなく DNA メチル化解析から抽出されてきた点は非常に興味深く、細胞の維持や分化の方向を規定する分子マーカーとして利用価値が高い。

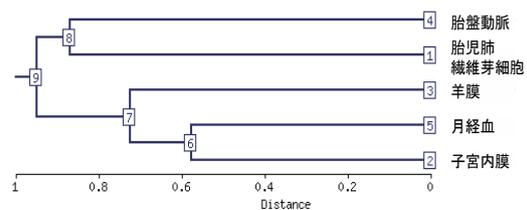


図1 間葉系細胞の階層的クラスタリング解析

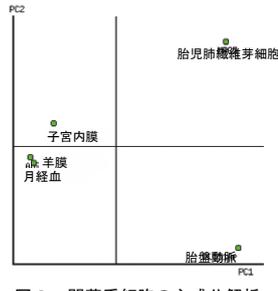


図2 間葉系細胞の主成分解析

(2) iPS 細胞の DNA メチル化プロファイル

さらにヒト iPS 細胞の網羅的な DNA メチル化解析、網羅的発現遺伝子解析結果を加え、比較横断的解析から再生医療に向けた細胞の品質の規格化と管理を行うための有用なデータを取得することができた。

子宮内膜細胞、羊膜細胞、胎盤動脈細胞、月経血細胞、胎児肺線維芽細胞から iPS 細胞を樹立した。

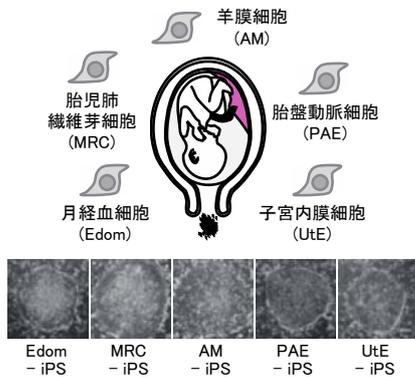


図3 樹立したヒト iPS 細胞株の一部。様々なヒト組織から iPS 細胞の樹立に成功している。

これまでの研究では、限られたヒト iPS 細胞を用いて、限られた継代数および亜株で解析がされてきた。自ら樹立を行っている利点を生かし、ヒト iPS 細胞株とこれらを長期培養した際の経時的なサンプルを得ることが可能であり、これら豊富なヒト iPS 細胞サンプルを用いて、バイオインフォマティクス手法による解析から、ヒト多能性幹細胞におけるリプログラミング機構の一端を解明した (*PLoS Genetics*, 2011)。

ヒト iPS 細胞 22 株を用いて Illumina HumanMethylation27K による 14,000 遺伝子、27,000 箇所 DNA メチル化解析を行った結果、多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域を同定し、特に *SALL4*, *EPHA1*, *PTPN6*, *RAB25*, *GBP4*, *LYST*, *SP100*, *UBE1L* の各遺伝子が新たな幹細胞エピジェネティックマーカーとして有用であることを示した。さらに iPS 細胞における異常メチル化領域を同定し、詳細な解析を行った。22 iPS 細胞株間で共通の異常メ

チル化領域は検出できなかった。しかし、各 iPS 細胞株と ES 細胞を比較すると、200-300 領域において ES-iPS 間で異常メチル化領域が検出されたことから iPS 細胞における異常メチル化はゲノム DNA 上にランダムに起こる現象であることを明らかにした。これら異常メチル化は一過性の高メチル化を経て長期培養と共に消失し、iPS 細胞は ES 細胞に性質が近づいていくことが明らかになった。これらの結果は iPS 細胞におけるリプログラミング機構の一端を明らかにしたものである。iPS/ES 細胞特異的メチル化可変領域の DNA メチル化状態の測定と異常メチル化領域の数の検定は、ヒト iPS 細胞比較評価指標として有用である。

これらの結果は iPS 細胞の評価系として応用の面でも価値が高く、生物学のみならず、再生医療においてもヒト多能性幹細胞の規格化、標準化を進める重要な成果である。さらには山中博士が提唱する iPS 細胞誘導の確率モデル (*Nature*, 460:49, 2009) が正しいことをエピジェネティクス動態から明らかにしたことで高く評価されている。

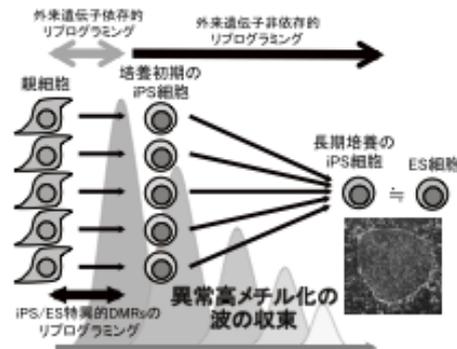


図4 外来遺伝子非依存性リプログラミング
外来遺伝子依存性リプログラミングでは、OCT4、NANOG を含む iPS/ES 細胞特異的 DNA メチル化可変遺伝子群の適切な DNA メチル化変化が行われる。長期培養における外来遺伝子非依存性リプログラミングでは、ランダムに起こる一過性の異常高メチル化の波が徐々に収束し、ES 細胞に近づく。

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)

- ① Nishino K and Umezawa A
「Induced Pluripotent Stem Cells from Human Extra-Embryonic Amnion Cells: Role of DNA Methylation in Maintaining Stemness」
Stem Cells and Cancer Stem Cells. 4:59-65. 2012
- ② 西野光一郎、梅澤明弘
「iPS 細胞におけるメチル化動態」

- 医学のあゆみ、第 243 巻、321-322、2012
- ③ 西野光一郎、梅澤明弘
「iPS 細胞とゲノムメチル化ダイナミクス」
実験医学増刊、第 30 巻、1556-1561、2012
- ④ Nishino K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Fukawatase Y, Chikazawa E, Sakaguchi H, Akutsu H, Umezawa A
「DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time」
PLoS Genetics. 7:e1002085. 2011
- ⑤ 西野光一郎、梅澤明弘
「iPS 細胞とゲノムメチル化」
医学のあゆみ、第 239 巻、1259-1264、2011
- ⑥ 梅澤明弘、西野光一郎
「エピジェネティクスと疾患（再生医療とエピジェネティクスの接点）」
実験医学増刊、第 28 巻、2546-2551、2010

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西野光一郎、梅澤明弘
「ヒト胎児性がん細胞のエピジェネティクス」
第 6 回 日本エピジェネティクス研究会
平成 24 年 5 月 14 日-15 日 千代田区
- ② 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、深渡瀬嘉洋、近澤英美、坂口啓成、阿久津英憲、梅澤明弘
「ヒト iPS 細胞の長期培養における異常メチル化動態の解析」
第 5 回 日本エピジェネティクス研究会
平成 23 年 5 月 19 日-20 日 熊本市
- ③ 梅澤明弘、西野光一郎
「胎児性がん細胞のエピジェネティクス」大阪大学タンパク質研究所セミナー
「疾患におけるエピゲノム異常の分子機構」
平成 23 年 11 月 17 日-19 日 吹田市
- ④ 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、深渡瀬嘉洋、近澤英美、坂口啓成、牧野初音、阿久津英憲、梅澤明弘
「ヒト iPS 細胞における幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域の同」
第 4 回 日本エピジェネティクス研究会
平成 22 年 5 月 28 日-29 日 米子市
- ⑤ Koichiro Nishino, Masashi Toyoda, Mayu Yamazaki-Inoue, Hatsune Makino, Yoshihiro Fukawatase, Emi Chikazawa, Yoriko Takahashi, Hidenori Akutsu and Akihiro Umezawa
「Defining hypo-methylated region of stem cell-specific promoters despite general hyper-methylation status in human iPS cells」
第 16 回 日本遺伝子治療学会国際大会
平成 22 年 7 月 1 日-3 日 宇都宮市

[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]

ホームページ等

宮崎大学農学部獣医機能生化学研究室

http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_biochem/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西野 光一郎 (NISHINO KOICHIRO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし