

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02381

研究課題名（和文）DNAメチル化を基盤としたヒト心筋細胞発生分化機構の制御に関する研究

研究課題名（英文）Studies on DNA methylation-based regulation of human cardiomyocyte developmental differentiation mechanisms

研究代表者

西野 光一郎（Nishino, Koichiro）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90508144

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトiPS細胞は心筋発生を研究する上で有用なツールであるが、一方でヒトiPS細胞の分化指向性が問題となっている。本研究では、未分化ヒトiPS細胞から得られる網羅的DNAメチル化データと分化誘導実験から心筋細胞分化の阻害となる因子の同定を試みた。その結果、心筋への分化誘導効率に相関するDNAメチル化可変領域を同定し、特徴的なクロマチン構造の変化を見出した。これらのゲノム領域の異常なエピジェネティック状態が心筋細胞への分化を阻害することが示唆された。本研究で同定したDNAメチル化可変領域のDNAメチル化状態の評価は、未分化ヒトiPS細胞の心筋分化能を予測する新たなバイオマーカーとして有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって未分化状態のヒトiPS細胞における心筋分化に相関するDNAメチル化可変領域を同定することができた。本研究成果は、心筋発生分化の基礎的理解が進むだけでなく、ヒトiPS細胞の株間差を分子レベルで理解する基盤情報となる。また、未分化時にヒトiPS細胞の心筋分化効率を事前評価できるバイオマーカーとしても有用であり、ヒトiPS細胞の品質評価の新たな指標として再生医療研究へ大きく貢献できる成果である。

研究成果の概要（英文）：Human iPSCs are a useful tool for studying cardiomyogenesis, but the differentiation propensity of human iPSCs has become an issue. In this study, we attempted to identify factors that inhibit cardiomyocyte differentiation based on comprehensive DNA methylation data obtained from undifferentiated human iPSCs and differentiation induction experiments. As a result, we identified some DNA methylation variable regions that correlate with the efficiency of induction of differentiation into cardiac cells, and found characteristic changes in chromatin structure. It was suggested that the abnormal epigenetic status of these genomic regions inhibits differentiation into cardiomyocytes. The evaluation of DNA methylation status of the DNA methylation variable regions identified in this study is useful as a new biomarker to predict the cardiomyocyte differentiation potential of undifferentiated human iPSCs.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒトiPS細胞 分化指向性 心筋分化 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

心疾患による年間死亡数は 20 万人を越えており、死因ではがんに次ぐ 2 番目に多い (H29 年度厚生労働省「人口動態統計の概況」)。心筋細胞の発生のメカニズムを詳細に解明することは心疾患の克服に向けての大きな課題である。

ヒト人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) は身体を構成するほぼ全ての細胞に分化可能な無限増殖する細胞であり、様々な遺伝的背景を持つ個人や疾患患者の体細胞から容易に作成可能である。そのため、iPS 細胞は心筋細胞分化を *in vitro* で再現し、そのメカニズムを解明する有用なツールであり、根本治療を目指した再生医療のリソースとしても期待されている。

しかし、同一の親体細胞を使用し、同一の作成方法で樹立し、同一の培養条件で得られたヒト iPS 細胞であっても、細胞株間によって分化能力に違いがある。再生医療を目的にヒト iPS 細胞から様々な細胞への分化誘導系が研究開発されているが、この中でヒト iPS 細胞の分化指向性の問題が最も顕著に現れるのが心筋細胞への分化である。こうした細胞株ごとの分化能力のばらつきは、疾患に起因する分化能の低下等の異常との区別を困難にすることから病態解明や薬剤探索研究の際には特に問題となる。また基礎研究においても再現性や正確性の観点から問題となる。ヒト iPS 細胞由来の細胞を再生医療や基礎研究に用いる際には高品質のヒト iPS 細胞株の事前選別は重要な条件となるが、実際に分化誘導実験を行って選別する以外の選択法はないため研究の時間的・費用的負担を増加させている。

ヒト iPS 細胞株ごとの分化能力のばらつき、特に心筋細胞分化においてヒト iPS 細胞株間の差が著しいということは、細胞株間に明確な差異が存在することを示している。心筋細胞分化のバイオマーカーとしていくつかの遺伝子が報告されているが、残念ながら心筋細胞の分化効率を制御する因子は現在まで報告されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト iPS 細胞が心筋細胞へ分化する際に阻害となる因子の同定を通して、心筋発生分化の理解の深化を目指すことである。

ヒト心筋発生を研究する上で iPS 細胞は有用なツールであるが、一方でヒト iPS 細胞の特性は変化を受けやすい側面を持つ。培地、細胞外基質、培養温度、保存方法、継代方法、継代数や扱う培養技術者の手技など様々な影響を受けやすく、同一細胞株にもかかわらず異なる施設間で特性が変化する事例は多く報告されている。この影響を受けやすい特性の為に、ヒト iPS 細胞の標準株というものが確立できない。つまり、研究や再生医療に最適な iPS 細胞を選別するために、その都度分化誘導実験を行い、高い分化効率を示す株の選定を行うことが必要となる。それ故ヒト iPS 細胞の分化指向性に関する研究は重要な課題である。この課題の解決のため心筋細胞への分化効率の異なる iPS 細胞株を多数解析し、株間の差を分子レベルで理解し、且つ心筋細胞分化効率に影響を及ぼす因子の同定することが必要であり、その成果は多分化能の維持機構のみならず、心筋発生の分子機序を解明することに繋がる。

分化指向性に影響を及ぼす株間の差は、細胞内分子間の微細な違いに起因することは想像に難くない。つまり、株間の差は数種類のマスター因子によって支配されるのではなく、エピゲノム、トランスクリプトーム、クロマチン構造などの細胞内分子ネットワークのバランスの乱れや変異に起因すると考えられる。よって、細胞から得られるビッグデータを包括的に解析、評価することが心筋への分化指向性を正確に解析できる手段となる。

本研究では、ヒト iPS 細胞から得られる様々な網羅的データと同一株を実際に分化誘

導して得られる分化誘導効率の実測値を取得し、これらを比較解析することにより心筋細胞分化の阻害となる因子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

未分化ヒト iPS 細胞を StemFit AK02N(Ajinomoto) 培地で 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 条件下で培養し、一部の細胞を分化誘導実験用に凍結保存し、残りの細胞からゲノム DNA 及び RNA の抽出を行った。未分化ヒト iPS 細胞の DNA メチル化プロファイルの取得には、Illumina 社の Infinium MethylationEPIC BeadChip を用いた。未分化ヒト iPS 細胞の遺伝子発現プロファイルは、Agilent 社の SurePrint G3 human GE microarray を用いて取得した。

続いて上記未分化ヒト iPS 細胞のデータに対応する心筋分化誘導効率実測値を取得した。心筋細胞への分化誘導には、STEMdiff Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Kit(StemCell Technologies)を用いた。Matrigel 播種後、心筋分化誘導を行い、誘導後 15 日目に細胞を回収した。回収した細胞は固定後、抗 Cardiac Troponin T(cTnT)抗体で標識後、フローサイトメーターによる cTnT 陽性細胞数の測定値から、心筋分化効率を算出した。

得られた未分化時の DNA メチル化データと心筋細胞分化データをセットとして *in silico* 解析を行い、心筋への分化指向性に関わる DNA メチル化部位を検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト iPS 細胞各株の心筋分化能評価

各ヒト iPS 細胞株を心筋分化誘導後 15 日目に回収し、心筋特異的のマーカである cTnT 抗体で染色し、陽性細胞数をフローサイトメーターで計測後、心筋細胞分化効率を評価した (図 1)。

心筋分化効率は、0~80%の間でばらつきを示し、ヒト iPS 細胞は株ごとに分化指向性を持つことが改めて示された。心筋分化効率 0~5%を低分化群、30~50%を中分化群、60%以上を高分化群として解析を進めた。なお、*OCT-4*、*NANOG*、*DPPA4*

を含む 12 の多分化能マーカー遺伝子の DNA メチル化状態と遺伝子発現について検証した結果、いずれの株も多能性幹細胞特異的なパターンを示し、本研究で用いたヒト iPS 細胞株はすべて多能性を有することを確認している。

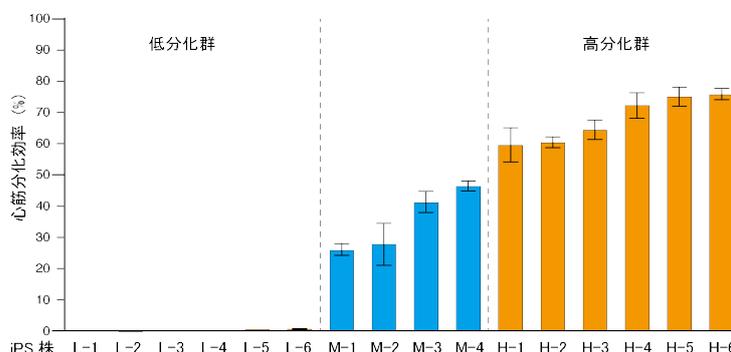


図1 各ヒト iPS 細胞の心筋分化効率  
分化効率は 0~80% と各株で顕著な分化指向性を示した。

#### (2) 未分化ヒト iPS 細胞の DNA メチル化および遺伝子発現プロファイル解析

Infinium MethylationEPIC BeadChip (約 80 万プローブ) および SurePrint G3 human GE microarray (約 6 万プローブ) により得られたデータを用いて階層的クラスタリング解析 (HCA) および主成分解析 (PCA) をを行い、心筋分化効率データとの関連について解析した。DNA メチル化データを用いた HCA 解析では、ヒト iPS 細胞株は 2 つのクラスターに分類された。しかし、2 つのクラスターと心筋分化効率との間に相関性は認められなかった。PCA 解析に関しても相関性は認められなかった。同様に遺伝子発現データを用いた場合においても心筋分化効率との相関は認められなかった。

#### (3) ヒト iPS 細胞の性別と心筋分化効率の関連解析

性別による心筋分化効率への影響を検証するためにヒト iPS 細胞の男女の性別で分

け、それぞれ HCA、PCA および心筋分化効率との相関について解析を行ったが、相関性は認められなかった (図 2)。

#### (4) 2 群間比較による DNA メチル化可変部の探索

次に心筋低分化群と高分化群の *in silico* 解析から心筋分化指向性に関連する DNA メチル化可変部位の同定を試みた。Infinium MethylationEPIC BeadChip で得られた 863,025 CpG 部位の DNA メチル化情報を基に 2 群間でメチル化率の平均値の差が  $\beta$  値 0.3 以上のものを基準に選別を行った結果、6 箇所の心筋分化関連 DNA メチル化可変部位を同定した。この 6 CpG 部位は、5 領域、3 遺伝子を含んでいた (図 3 上)。この 5 領域の染色体上の領域特異性を確認するために染色体上の位置を解析したが、特定部位への集積は認められなかった (図 3 下)。この 5 領域は、高分化群ではいずれも低メチル化状態を示し、一方、低分化群では高メチル化状態を示していた。この 5 領域の DNA

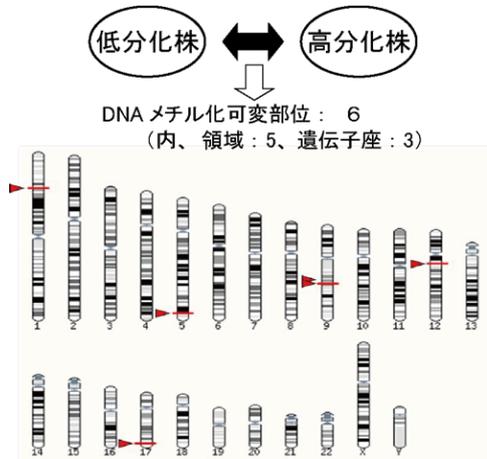


図 3 心筋分化指向性関連領域の同定  
863,025 CpG 部位の DNA メチル化データから低分化群、高分化群の 2 群間比較により、心筋分化関連 DNA メチル化可変部位を 6 箇所同定した。この 6 箇所の染色体上の位置に偏りは認められなかった。

#### (6) 心筋分化関連 DNA メチル化可変領域におけるクロマチン修飾解析

3 つの心筋分化関連 DNA メチル化可変領域を持つ遺伝子の発現と心筋分化効率との間に相関性が認められないことから、心筋分化関連 DNA メチル化可変領域はクロマチン構造に関与して心筋細胞への分化に関与していることが示唆される。そこで ChIP-Atlas データベースから未分化ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞の H3K4me3、H3K27me3、JARID2、CTCF、EZH2、および ATAC-seq のデータを取得して心筋分化時におけるクロマチン状態の変化について解析した。その結果、心筋分化関連 DNA メチル化可変領域のいくつかは未分化状態において H3K4me3、H3K27me3 のバイバレント状態にあり、心筋分化後 H3K27me3 が消失する動きを捉えた。ATAC-Seq の結果からこれらの領域は遺伝子間領域に存在しているが、未分化、心筋のどちらの状態においてもオープンクロマチンとして存在していることが明らかになった (図 4)。

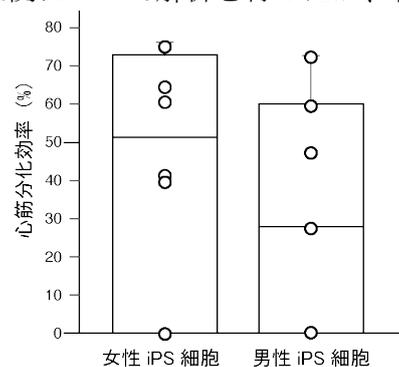


図 2 性別と心筋分化効率の関連解析  
マンホイットニー U 検定により性別と心筋分化効率の関連について解析した。解析の結果、性別による心筋分化効率の違いは認められなかった。

この 5 領域の DNA メチル化状態をデータベースで得られた心筋細胞の DNA メチル化データを用いて解析すると、心筋組織では 5 領域いずれも DNA メチル化率は低く、高分化 iPS 細胞群の DNA メチル化状態は心筋組織に維持されていることが示された。

#### (5) 心筋分化関連 DNA メチル化可変領域と遺伝子発現との相関解析

同定した 5 つの心筋分化関連 DNA メチル化可変領域のうち 3 領域は遺伝子領域に位置していたため、この 3 領域の DNA メチル化状態と該当遺伝子の発現量との相関、および遺伝子発現量と心筋分化効率との相関について解析を行った。その結果、DNA メチル化率と遺伝子発現量、遺伝子発現量と心筋分化効率について低分化群と高分化群の間に相関は認められなかった。

### (7)心筋分化指向性メカニズム

これらの結果から、本研究で同定した5領域の異常な高メチル化が心筋細胞への分化を阻害することが示唆された。この領域の異常な高メチル化がH3K4me3、H3K27me3のバイバレントメチル化やオープンクロマチンなどの正常なクロマチン状態を乱すことにより心筋分化が阻害されることが考えられる。本研究では心筋分化におけるエピジェネティックな制御を明らかにし、心筋分化を理解する上で重要な情報を得た。また、本研究で同定したDNAメチル化可変領域のDNAメチル化状態の評価は、未分化ヒトiPS細胞の心筋分化能を予測する新たなバイオマーカーとしての応用が期待できる。

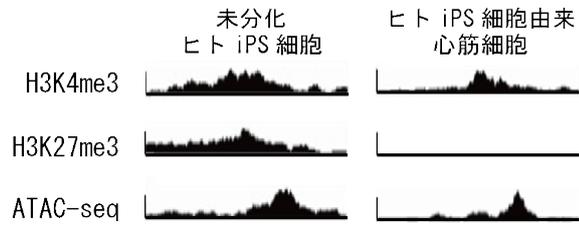


図4 心筋分化に伴うクロマチン修飾

本研究で同定された心筋分化関連DNAメチル化可変部位では、未分化iPS細胞から心筋細胞への分化においてH3K4me3、H3K27me3のバイバレント状態からH3K27me3の消失が起こる。この領域のDNAメチル化異常が、バイバレント修飾変化とオープンクロマチン状態の障害を引き起こす可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Arai Yoshikazu, Nishino Koichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Epigenetic mutagen-like environmental chemicals alter neural differentiation of human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 571 ~ 583
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/jts.48.571	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 Sekiya Asato, Takasawa Ken, Arai Yoshikazu, Horike Shin-ichi, Akutsu Hidenori, Umezawa Akihiro, Nishino Koichiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Variation of DNA methylation on the IRX1/2 genes is responsible for the neural differentiation propensity in human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 620 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.11.007	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関谷 麻杜・高澤 建・新井 良和・堀家 慎一・阿久津 英憲・梅澤 明弘・西野 光一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞の神経分化指向性を予測するエピゲノムマーカーの同
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 目黒 牧子、齋藤 健吾、新明 洋平、島津 美幸、岡田 源作、西野 光一郎、河崎 洋志、堀家 慎一
2. 発表標題 高次脳機能・脳構造の構築に関わるゲノム刷り込み遺伝子の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 住吉 凧海、関谷 麻杜、西野 光一郎、井上 健太郎
2. 発表標題 iPS細胞のDNAメチル化解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田里美、関谷麻杜、新井良和、西野光一郎
2. 発表標題 ヒトiPS細胞におけるBCOR遺伝子のDNAメチル化による発現制御機構の解析
3. 学会等名 第115回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関谷 麻杜、高澤 建、新井 良和、阿久津 英憲、梅澤 明弘、西野 光一郎
2. 発表標題 エピゲノム情報に基づく機械学習によるヒトiPS細胞の神経分化指向性の解明
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋真央、関谷麻杜、新井良和、西野光一郎
2. 発表標題 ヒト多能性幹細胞における未分化状態維持機構の解明
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田里美、関谷麻杜、高橋真央、新井良和、西野光一郎
2. 発表標題 DNAメチル化によるBCOR遺伝子発現制御機構の解明
3. 学会等名 第114回日本繁殖生物学会大会
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------