

## 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 6月 3日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500425

研究課題名（和文）ヒト ES 細胞および iPS 細胞の細胞株特性に対するポリコム遺伝子群の関与

研究課題名（英文）Involvement of Polycomb group genes in cell line property of human ES and iPS cells

研究代表者

友常 大八郎（TOMOTSUNE DAIHACHIRO）

信州大学・医学部・助教

研究者番号：80283802

研究成果の概要（和文）：本研究では将来の再生医療を視野に入れ、ES 細胞や iPS 細胞の細胞株特性を分化の傾向性と対比させながら解析した。細胞株特性と分化のし易さの関連をグローバルに解析する目的で、自然に未分化状態が失われる（分化し始める）状況を実験系として確立させ、遺伝子発現をマイクロアレイで解析した。ここでさまざまな細胞株で普遍的に発現が変化している遺伝子を抽出し、ポリコムを用いた ChIP 解析を行った。

研究成果の概要（英文）：In this study, we produced the spontaneous differentiation, and then analyzed global changes of gene expression during the spontaneous differentiation using DNA microarray. As results of the microarray analysis using four human pluripotent stem cell lines, we found that some genes were commonly up- or down-regulated during the collapse of undifferentiated state. Furthermore, we analyzed the role of polycomb group during the collapse of undifferentiated state by ChIP-seq and ChIP-QPCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：再生医療

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：ヒト ES 細胞・ヒト iPS 細胞・ポリコム

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト ES 細胞やヒト iPS 細胞は人の身体を構成している全ての細胞種に分化することができる能力(多分化能)を持っていることから、疾患のある組織を健康な組織で置き換える再生医療(細胞置換治療)において、その細胞供給源になると期待されていた。このような再生医療の実現において重要になること

の一つは、ES 細胞や iPS 細胞を未分化のまま維持し、必要に応じて分化させる手法の確立である。ES 細胞や iPS 細胞の未分化維持機構は解明されつつあったが、ES 細胞や iPS 細胞は細胞株ごとに未分化維持のされやすさの程度は大きく異なるため、細胞株ごとに適した未分化維持培養の方法が求められる。しかし、細胞株と未分化維持特性の関係につ

いてはほとんど分かってなかった。また、未分化維持の機構が解明されつつあっても、通常の培養においてどのような「乱れ（分化誘発因子）」が作用しているのかについてはほとんど研究されていなかった。ES 細胞や iPS 細胞はアクチビンやレチノイン酸で分化誘導されることが知られていたが、ES 細胞や iPS 細胞は、通常の培養条件下において、そのような誘導因子の添加なしで自発的に分化する性質があることが知られている。そのため、MEF（マウス胎児線維芽細胞）などを用いて積極的に未分化維持を行う必要があった。アクチビンやレチノイン酸などの誘導因子による分化というのは、ヒトやマウスの個体発生を模倣しているものであり、ある意味自然の分化と言えるが、それらの分化因子を添加していない維持培養において自然に生じているものではない。しかし、多くの分化研究、未分化維持研究は、アクチビンやレチノイン酸を用いるものであり、維持培養における自然な分化を研究しているものではなかった。

## 2. 研究の目的

(1) ES 細胞や iPS 細胞の細胞株における未分化維持特性を把握するために、細胞株ごとの分化傾向の違いを明らかにする。また、再現性のある分化誘導条件を実現するために、EB 作製におけるローテーション法の特徴を解析する。

(2) 通常の維持培養において生じる自発的な分化（未分化破綻）を再現性よく実現する実験系の確立を行う。

(3) 未分化状態の細胞と自発的に分化した細胞の遺伝子発現プロファイルを、細胞株ごとに網羅的に解析し、a) ある細胞株に特徴的な変動を示す遺伝子とともに、b) いずれの細胞株でも同様に変動する遺伝子を抽出する。前者 (a) は細胞株ごとの未分化維持特性や分化の傾向性の違いをもたらす遺伝子である可能性があり、後者 (b) は自発的な分化に直接的に関与する遺伝子である可能性がある。そのような観点から、各遺伝子についての既知の機能を参照しながら、詳細な解析を進める遺伝子を絞り込む。

(4) 上で抽出された遺伝子を中心に解析を進め、細胞株特性や分化特性とポリコム遺伝子群をはじめとするエピジェネティック因子と関連づける。つまり、自発的な分化をもたらす「乱れ（遺伝子発現変化）」とそれを抑制するクロマチンの「恒常性維持機構（未分化維持機構）」の関係を把握し、そこに細胞株ごとの未分化維持性などの差異、たとえばある細胞株に特徴的な未分化維持機構における欠陥を見いだす。

(5) 以上を総合し、細胞株特性や分化特性について、将来の再生医療におけるルーチン

ワークにも活用できるほど簡便かつ有効に把握する指標を見いだす。

## 3. 研究の方法

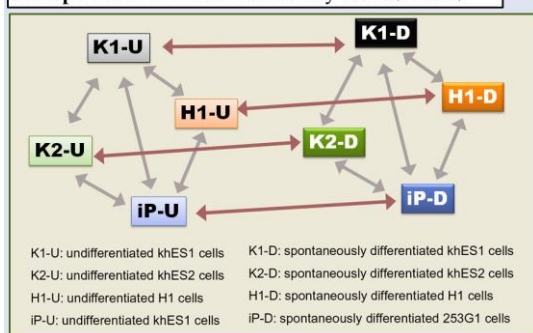
(1)、細胞株ごとの分化傾向の違いを明らかにするため、3つの ES 細胞株 khES1 (Kyoto), khES2 (Kyoto), H1 (Wisconsin) と 1つの iPS 細胞株 253G1 (Kyoto) を用い、代表的な未分化維持因子 (Nanog, Oct3/4, Sox2) などの発現を各細胞株で解析した (リアルタイム PCR 法)。また、分化傾向についてはローテーション法による EB 作製によって行い、特に心筋への分化を解析した。

(2) 通常の維持培養において生じる自発的な分化を再現性よく実現する実験系として、MEF を除去した培養法を試みた。MEF の除去は MEF と ES (や iPS) 細胞の培養ディッシュに対する接着性の違いを利用し、通常の培養法で得られた MEF と ES 細胞 (iPS 細胞) の混合液をゼラチンコートディッシュに播種し、3時間培養し、先に接着する MEF を含まない培養上清を単離することによって行った。ES 細胞や iPS 細胞は通常の培地ではゼラチンコートディッシュ (MEF 無し) に接着しないため、上で得られた培養上清

(ES 細胞や iPS 細胞だけが含まれる) を遠心、上清除去し、MEF のコンディション培地に懸濁した後に、マトリゲルディッシュに播種した。この条件は MEF の影響下ある未分化維持培養法となるため、次の日からの培地交換では MEF のコンディション培地が変わって、MEF 由来因子を含まない通常の ES 培地で行った。

(3) 遺伝子発現プロファイルの解析は DNA マイクロアレイを用い、上記 4つの細胞株とそれぞれが自発的に分化した郡を比較した。

### Comparison of DNA microarray data (arrow)



DNA マイクロアレイの結果は Scatter Plot によって各サンプルの遺伝子発現全体ごとの比較を行い、そこで細胞株ごとの遺伝子発現における差異と、未分化分化間に関する遺伝子発現における差異を把握したうえで、個々の遺伝子について発現変化を normalized data によって検討した。

(4) DNA マイクロアレイの結果から選択された遺伝子の発現変化はリアルタイム

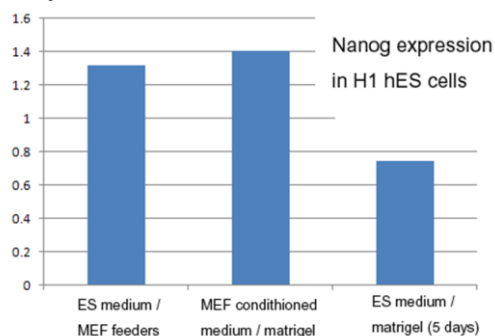
PCR によって再確認した。また、免疫染色によってタンパク質レベルでの発現変化を確認するとともに、ES 細胞や iPS 細胞のコロニーにおける個々の細胞について、どのような細胞（コロニーのどこに存在する細胞）がどのように分化しているかを解析した。

(5) ポリコム遺伝子群の関与については ChIP 解析などを用いて行った。まず、RT-PCR によって、それぞれの細胞株における遺伝子発現を確認し、ChIP 解析を行うポリコムの抗体を選択した。さらに、ポリコムの標的に特徴的とされる bivalent (二価) 領域を検出する抗 Tri-Methyl Histone H3 (Lys4 と Lys27) 抗体も用いた。まず、既知のポリコムとその結合部位との組み合わせについて解析し、ChIP 解析が適切に行われていることを確認した後、抗 Bmi-1 抗体を用いて H1 株における未分化細胞サンプルと自発的に分化したサンプルに対して ChIP を行った。さらに、他のポリコムと bivalent 抗体を用いて、自発的に分化した H1 株のサンプルの ChIP を行った。ここで得られた DNA 断片の収量を測定し、ChIP-seq には bivalent 抗体を用いた 2 サンプルを使った。他の 4 サンプルを含めた 6 サンプルについて ChIP-QPCR に用いた。

#### 4. 研究成果

(1) ES 細胞や iPS 細胞の分化条件を確立する研究で、ローテーション法の特性を詳細に把握することができた (論文印刷中)。ローテーション法による EB 作製に関しては、ローテーションの回転速度によって分化に大きな違いが生じ、心筋細胞への分化には 100rpm の回転速度が最適で、再現性よく心筋へ分化することが分かった。また、各細胞株の分化特性については、細胞株ごとに大きな違いがあり、H1 が最も分化しやすく未分化維持もされにくいことが分かり、khES1 や iPS 細胞株 (253G1) は未分化維持傾向が強く、khES2 は未分化維持傾向があるものの分化もされやすいことが分かった。

(2) 未分化破綻の条件検討により、自然に分化が進行する実験系を見いだすことができた。

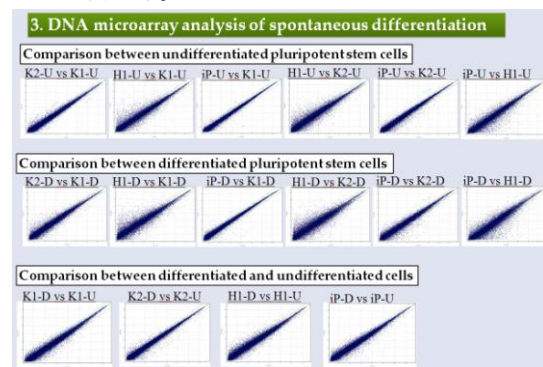


上の図は未分化維持の中心的な因子の一つ

である Nanog の発現をリアルタイム PCR によって解析したものであるが、本研究で開発された自発的分化の実験系で穏やかな発現低下が見られた。これは未分化破綻が生じた初期の状態として我々が想定していたもので、実際の細胞の状態を顕微鏡で観察してみても、日常的な維持培養でしばしば生じてしまう自発的な分化における細胞やコロニーの形態を再現していた。また、分化マーカーを用いた免疫染色でも自発的な分化に特徴的な形態を示す細胞において分化マーカーが発現し、Nanog の発現が無くなっていることが分かった。

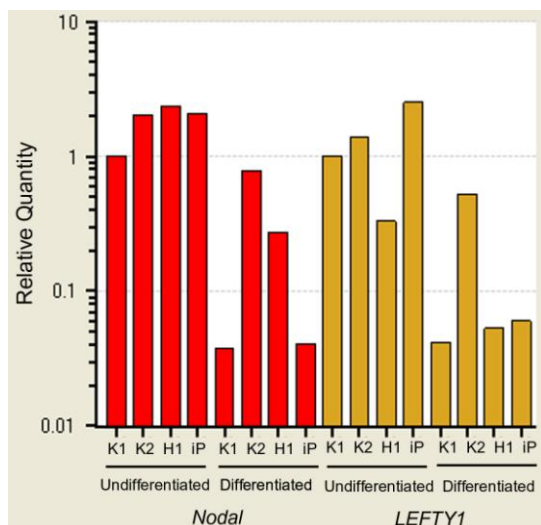
(3) DNA マイクロアレイ解析により、細胞株ごとの発現プロファイルの違いを網羅的に明らかにし、細胞株特性の原因となっている可能性のある具体的な遺伝子を予想することができた。H1 株は未分化維持の培養環境でも未分化特異的な遺伝子の発現が低く、その一方で分化特異的な遺伝子の発現は高い傾向にある。それと正反対なのが khES1 と iPS 細胞株 (253G1) である。この点で特殊な発現プロファイルを示したのが khES2 株である。khES2 においては未分化特異的な遺伝子の発現が高く、自発的な分化においてもそれらの遺伝子はあるレベルに保たれているが、分化に関連したいくつかの遺伝子は未分化維持の状況で比較的高い発現を示していた。これらの結果は各細胞株の分化傾向についての解析結果と一致する。

(4) 細胞株ごとの違いを総当たりで比較したパターン (Scatter Plot の比較) は未分化状態でも自発的分化の状態でも非常に似ていた (下図)。



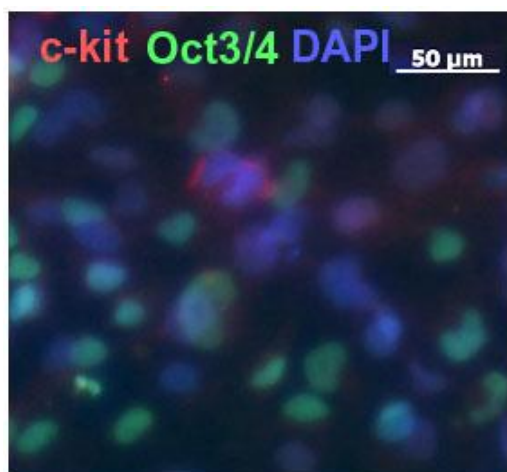
しかし、細胞株間で遺伝子発現に大きな違いがあるにもかかわらず、わずかな分化 (自発的分化) において、いずれの細胞株でも必ず発現が上昇あるいは低下する複数の遺伝子が存在することが分かった。このような遺伝子は自発的分化に際して普遍的に発現変動する遺伝子であり、自発的分化という事象に直接的に関与する遺伝子である可能性が高い。そこで、DNA マイクロアレイの具体的なデータから、遺伝子発現が普遍の変動する遺伝子を数十種類抽出した。

(5) 上で抽出された遺伝子（自発的分化関連遺伝子）について、その発現変動をリアルタイム PCR によって再確認した（いくつかの例を下図に示す）。



一般的な傾向として、自発的分化において変動する遺伝子と、分化あるいは未分化特異的な遺伝子にもかかわらずあまり変動しない遺伝子があることが分かった。また、*khES2* は自発的分化による発現変動が少ない（自発的分化を起こしにくい）という傾向も見られた。これらの結果は遺伝子発現の Scatter Plot による解析結果を具体的に裏付ける結果である。

(6) さらに、自発的分化関連遺伝子について、免疫染色によってタンパク質レベルでの発現変化を確認するとともに、ES 細胞や iPS 細胞のコロニーにおける個々の細胞について、どのような細胞（コロニーのどこに存在する細胞）がどの遺伝子を発現しているかを解析した（一例を下図に示す）。



自発的分化において発現が上昇する遺伝子（例えば *c-kit*）が発現している細胞では、同様に自発的分化で発現が上昇する他の遺伝

子の発現は見られるものの、発現が低下する遺伝子（例えば *Oct3/4*）の発現は見られなかった。この結果は、培養皿全体の細胞を用いた遺伝子発現解析（DNA マイクロアレイや RT-PCR）の結果は、個々の細胞に関する出来事を反映していることを示している。

(7) ChIP-seq 解析と ChIP-QPCR 解析により、DNA マイクロアレイ解析において見いだされた細胞株特性関連遺伝子や未分化破綻（分化開始）関連遺伝子とポリコムとの関連性を解析した。いくつかの遺伝子において、自発的分化と整合するポリコムの結合や Tri-Methyl Histone H3 が見られ、自発的分化とポリコム遺伝子との関連が示唆された。このような指標と自発的分化において普遍的に発現変動する遺伝子の組み合わせにより、将来の再生医療の現場で役立つ未分化維持の検査指標が実現できると期待される。

## 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 1 件）

- ① Akimi Mogi, Shunsuke Takei, Hisashi Shimizu, Haruki Miura, Daihachiro Tomotsune\*, and Katsunori Sasaki, Fluid dynamic forces created by rotary orbital suspension culture promote cardiomyogenic differentiation of human embryonic stem cells. *J. Med. Biol. Eng.* 印刷中、2013、査読有、\*責任著者、DOI: 10.5405/jmbe.1356

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① Daihachiro Tomotsune, Akimi Mogi, Fengming Yue, Susumu Yoshie, Shoko Masuda, Ayana Sakurai, Daiki Fujita, Mika Morisaki-Nagai, Sakiko Takizawa-Shirasawa, Tadayuki Yokoyama, Katsunori Sasaki, GLOBAL ANALYSIS OF STABILITY OF UNDIFFERENTIATED STATE IN HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS. 第 11 回国際幹細胞学会（ISSCR）、2013.6.12、ボストン（アメリカ合衆国）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

友常 大八郎 (TOMOTSUNE DAIHACHIRO)  
信州大学・医学部・助教  
研究者番号：80283802

(3) 連携研究者

佐々木 克典 (SASAKI KATSUNORI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：30170666

岳 鳳鳴 (YUE FENGMING)

信州大学・医学部・助教

研究者番号：20532865

(4) 研究協力者

茂木 亜希海 (MOGI AKIMI)

信州大学・医学系研究科・大学院生

研究者番号：なし