

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 24日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659862

研究課題名（和文） 間葉系細胞の分化転換機構解明を目指したエピジェネティック解析

研究課題名（英文） Epigenetic changes in cell fate decision during mesenchymal cell differentiation.

研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：00240747

研究成果の概要（和文）：間葉系分化転換モデルとして 10T1/2 線維芽細胞を用い、脱メチル化ならびにヒストン修飾に影響を与える試薬を作用させ、分化転換に及ぼす影響を調べたところ、Aza-cytidine による筋肉分化誘導に対し、HDAC-inhibitor TSA がその効果を抑制した。同様に myoD 誘導による筋肉分化誘導に対して TSA が抑制した。myogenin promoter の CpG メチル化レベルは Bisulfate シークエンスでは Aza-cytidine で脱メチル化が起きる部位がみられた。一方 myoD による筋肉分化において、amplicon シークエンスによる解析を行ったところ CpG メチル化の変動は認められなかった。

研究成果の概要（英文）： We examined epigenetic changes during cell fate change of mesenchymal cells, using 10T1/2 fibroblastic cells. Aza-cytidine treatment induced myogenic differentiation whereas HDAC-inhibitor TSA blocked it. TSA also blocked ER-myoD induced myogenesis. Bisulfate sequence and targeted amplicon using sequence next generation revealed that myoD induced myogenin expression does not accompanied with change of CpG methylation irrespective of presence of TSA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：細胞分化、間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

生物では、分化した細胞から逆により未分化な状態に戻る脱分化という現象が、まれに起こることは知られていたが、それを人為的にコントロールすることは容易ではない、と考えられていた。ところが、体細胞から胚性幹細胞のような全能性を持った細胞に逆戻り初期化という現象を、人為的に誘導できることを示したのが、山中らによる iPS 細胞である (Takahashi and Yamanaka, Cell 2006)。一方 Weintraub らは分化した体細胞が、別の異なる分化系列に転換する現象、すなわち MyoD を発現することで線維芽細胞、皮膚、脂肪などの体細胞が筋肉細胞へ分化転換することを示した。分化過程のみならず、脱分化や初期化には DNA の CpG メチル化とヒストン

修飾の量あるいは分布が変化することから、エピジェネティックに働く制御分子が重要な役割を担うと考えられている。

一方、転写因子 MyoD から筋肉の最終分化に至る分子カスケードは詳細に検討されており、最近では MyoD のターゲット領域はゲノム上広範囲に存在すること (Cao, et al., Cell 2010)、MyoD がターゲット領域のメチル CpG の脱メチル化を起こす可能性が示唆されている。しかしながら MyoD による他の細胞から筋肉細胞への分化転換には、脱分化を介するか、あるいは直接分化に関わる分子カスケードをオンにするのかは十分に明らかではない。

2. 研究の目的

筋肉細胞で特異的に発現する転写因子 MyoD を、線維芽細胞や皮膚細胞、脂肪細胞において強制発現させると、筋肉細胞の性質を獲得させることができる。それはある分化系列から別の分化系列へ分化転換がおきたと考えられている。ここではゲノム DNA の脱メチル化、ヒストン修飾の変化を伴う脱分化を介するか、あるいは直接的に別の細胞分化系列へ分化誘導するのかは十分に明らかではない。本研究ではとりわけ前者の可能性について、間葉系細胞の分化転換に焦点をあて、エピジェネティックなアプローチで解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Aza-cytidine 処理による線維芽細胞から筋肉への分化転換モデル

10T1/2 線維芽細胞を Aza-cytidine 処理単独あるいはヒストン修飾に影響を与える試薬とともに処理し、間葉系分化に及ぼす影響を観察する。

(2) MyoD の発現誘導による分化転換モデル

MyoD を発現誘導するため estrogen 誘導性の myoD 発現ウイルスベクターを 10T1/2 線維芽細胞に感染させ、estrogen (4OHT) による発現誘導を行う。発現誘導によっておこる筋肉分化に対してヒストン修飾に影響を与える試薬が与える影響を解析する。

(3) Aza-cytidine 処理による線維芽細胞における DNA メチル化の解析

10T1/2 線維芽細胞を Aza-cytidine 処理単独あるいはヒストン修飾に影響を与える試薬とともに処理し、DNA メチル化に及ぼす影響を Bisulfate シークエンスにて myogenin promoter を中心に観察する。

(4) MyoD の発現誘導による DNA メチル化の解析

MyoD の発現誘導により DNA メチル化が見られるか、さらにヒストン修飾に影響を与える試薬によってそのメチル化はどのように変化するかを観察する。

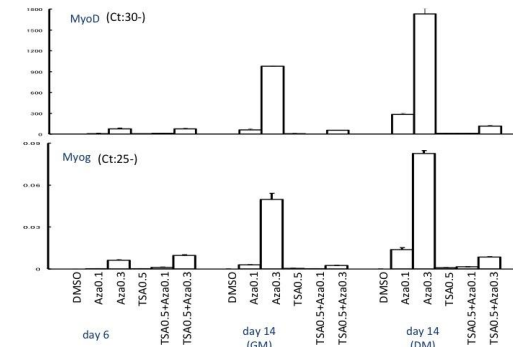
(5) Bisulfate 処理後の amplicon の次世代シークエンスによる解析

上記 (4) でみられた変化をさらに詳細に解析するため Bisulfate 処理後の amplicon を次世代シークエンスによって多数の配列の変化を観察する。

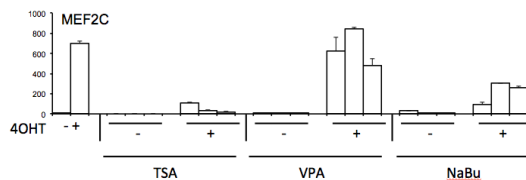
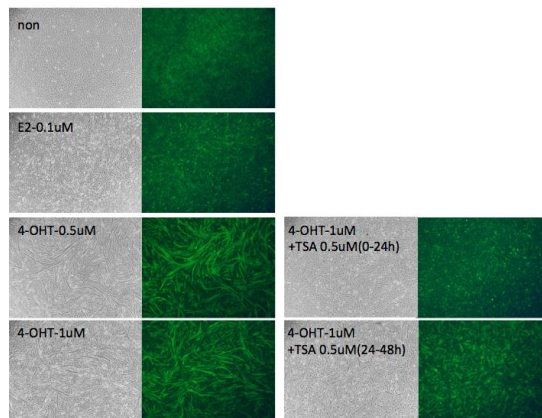
4. 研究成果

(1) Aza-cytidine 処理による線維芽細胞から筋肉への分化転換モデル

Aza-cytidine 処理 (Aza) 高効率に筋肉に分化するが、同時に HDAC-inhibitor TSA を処理すると、筋肉分化が顕著に抑制された。

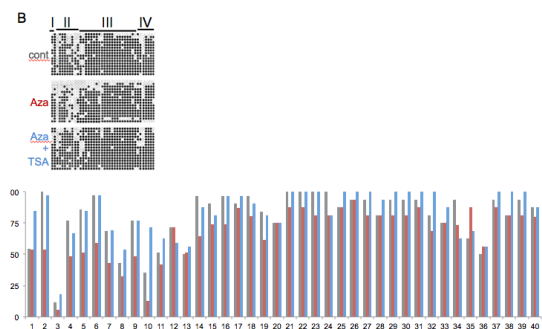


(2) MyoD の発現誘導による分化転換モデル
estrogen-responsive elements を持つ myoD を発現することで筋肉分化が誘導され、それは TSA によって顕著に抑制され、他の HDAC-inhibitor である VPA Sodium Butyrate では起きなかった。



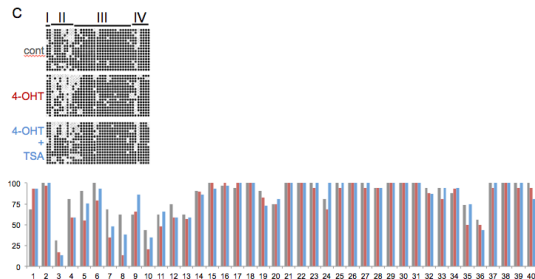
(3) Aza-cytidine 処理による線維芽細胞における DNA メチル化の解析

myogenin promoter の DNA メチル化の解析では Aza-cytidine 処理により、脱メチル化が起きるが、TSA によって顕著に抑制された。



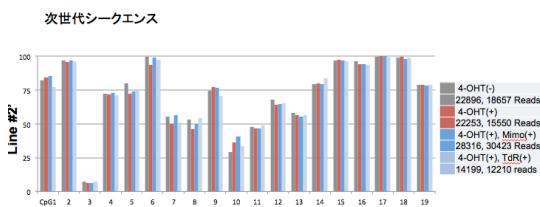
(4) MyoD の発現誘導による DNA メチル化の解析

myoD を発現することで筋肉分化が起きる際の myogenin promoter の DNA メチル化の解析では myoD でメチル化レベルが下がり、TSA にそれが抑制される傾向がみられた。



(5) Bisulfate 処理後の amplicon の次世代シーケンスによる解析

amplicon の次世代シーケンスによる解析ではどの条件でもメチル化レベルの変化が見られなかった。



これらから、MyoD による myogenin promoter の活性化ならびに TSA による抑制にはプロモーター近傍の脱メチル化は関わらず、別の機構が存在する可能性が示唆され、現在その点を解析中である。

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 8 件)

① Ideno H, Shimada A, Imaizumi K, Kimura H, Abe M, Nakashima K, Nifuji A. Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns*. 13: 84-90, 2013. (査読有)

② Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from iPSCs or ESCs. *Nature* 494: 100-104, 2013. (査読有)

③ Nifuji A Molecular mechanisms of skeletal tissue formation. *J Physical Fitness and Sports Medicine*. 2 (1),1-8, 2013

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpfs/2/1/2_1/_article (査読有)

④ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Pöschl E, Nifuji A. Improved methods for detection of β -galactosidase (lacZ) activity in hard tissue. *Histochem Cell Biol*. 137:841-847, 2012. (査読有)

⑤ Shibata N, Hayashi T, Fukumura R, Fujii J, Kudome-Takamatsu T, Nishimura O, Sano S, Son F, Suzuki N, Araki R, Abe M, Agata K. Comprehensive gene expression analyses in pluripotent stem cells of a planarian, *Dugesia japonica*. *Int J Dev Biol*. 56(1-3):93-102, 2012 doi: 10.1387/ijdb.113434ns. (査読有)

⑥ Li Z, Sun K, Sunayama M, Araki R, Ueno K, Abe M, Misawa H.

A simultaneous space sampling method for DNA fraction collection using a comb structure in microfluidic devices.

Electrophoresis. 32(23),3392-82011, 2011. doi: 10.1002/elps.201100362. (査読有)

⑦ Araki R, Hoki Y, Uda M, Nakamura M, Jincho Y, Tamura C, Sunayama M, Ando S, Sugiura M, Yoshida MA, Kasama Y, Abe M. Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells.

Stem Cells. 29(9):1362-70, 2011. doi: 10.1002/stem.685. (査読有)

⑧ Tasaki J, Shibata N, Nishimura O, Itomi K, Tabata Y, Son F, Suzuki N, Araki R, Abe M, Agata K, Umesono Y.

ERK signaling controls blastema cell differentiation during planarian regeneration.

Development.138(12):2417-27, 2011. doi: 10.1242/dev.060764. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

① Uda M, Araki R, Hoki Y, Sayama M, Nakamura M, Ando S, Sugiura M, Ideno H, Shimada A, Nifuji A, Abe M. Limited and comparable immunogenicity of terminally differentiated cells derived from both iPSCs and ESCs. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場, 福岡.

② Kamiunten T, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Expression of three histone 3 lysine 9 methyltransferases during development of mouse molar. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場、福岡.

③ Wada S, Shimada A, Ideno H, Nakamura Y, Nakashima K, Nifuji A. Soluble factors may mediate signals from tendons to bone. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月13日, 福岡国際会議場、福岡.

④ Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Kimura H, Nakashima K, Nifuji A. Histone 3 lysine 9 methyltransferases G9a, GLP and SETDB1 are predominantly expressed in the prehypertrophic chondrocytes during the growth plate chondrocyte development. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場、福岡.

⑤ Ideno H, Nakashima K, Imaizumi K, Kasama Y, Araki R, Abe M, Nifuji A. Region-specific CpG demethylation patterns of the myogenin promoter is required for MyoD mediated myogenic conversion from fibroblasts into myoblasts. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日, 福岡国際会議場、福岡.

⑥ 出野 尚、中島 和久、荒木 良子、今泉和彦、二藤 彰
MyoD-induced myogenic conversion requires cell proliferation
第67回日本体力医学会大会 2012年9月14日 長良川国際会議場 岐阜

⑦ 出野 尚、中島和久、荒木良子、今泉 和彦、安倍 真澄、二藤 彰
TSAによるmyogeninプロモーター脱メチル化制御を介した筋芽細胞への分化転換の抑制.
第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月20日、京王プラザホテル、東京.

⑧ 小松浩一郎、島田 明美、出野 尚、柴田達也、中島和久、二藤 彰. アレンドロネートの細胞内取込みによる骨形成の促進. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 2012年7月19日、京王プラザホテル、東京.

⑨ Ideno H, Araki R, Imaizumi K, Abe M, Nifuji A.

The myogenic conversion from fibroblasts into myogenic cells is blocked by Trichostatin A through suppression of myogenin expression. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川

⑩ Shimada A, Shibata T, Komatsu K, Ideno H, Nifuji A. Pre-incubation of whole teeth in collagen gel enrich progenitor cells of mouse periodontal ligament. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜会議センター、神奈川

⑪ Shimada A, Komatsu K, Nakashima K, Amizuka N, Brachvogel B, Nifuji A. Annexin a5 Expression Regulates Periodontal Tissue and Cementum Formation. 2011 Annual Meeting of ASBMR, 2011年9月19日, San Diego, California, USA.

⑫ 出野 尚、荒木 良子、今泉 和彦、安倍真澄、二藤 彰 DNAメチル化阻害剤とHDAC阻害剤による筋細胞分化制御
第66回体力医学会大会, 2011年9月17日, 下関市海峡メッセ, 山口

⑬ 島田 明美、小松浩一郎、中島 和久、網塚 憲生、Bent Brachvogel、二藤 彰. 歯周組織形成過程におけるAnnexin a5の発現と機能. 第29回日本骨代謝学会学術集会, 2011年7月28日, 大阪国際会議場, 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二藤 彰 (NIFUJI AKIRA)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 00240747

(2) 研究分担者

中島 和久 (NAKASHIMA KAZUHISA)
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号: 90252692

荒木 良子 (ARAKI RYOKO)
放射線医学総合研究所・重粒子センター・研究員
研究者番号: 40392211

(3) 連携研究者

なし