

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880023

研究課題名(和文)植物由来遺伝子によるiPS細胞樹立効率の検討

研究課題名(英文)Examination of somatic cell reprogramming efficiency with plant gene

研究代表者

蝉 克憲 (Semi, Katsunori)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：90633058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞初期化を理解するためには、ゲノムワイドにエピゲノムの変化を観察することが必要である。DNAメチル化状態をゲノムワイドに解析するために、RRBS法による解析を行った。その結果、不完全な初期化に伴い形成された腫瘍細胞は、起源細胞の特徴を残しつつ、ES細胞に近いメチル化パターンを示すことが明らかとなった。この腫瘍細胞において遺伝子変異が認められなかったことから、エピゲノム異常に伴う発がんであることが示唆された。さらに、エピゲノム修飾因子を発現させた際に、樹立効率の向上が認められるかどうかを検討するため、植物遺伝子の強制発現を行ったが、単一の遺伝子発現では樹立効率の優位な上昇は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The global epigenetic alteration is induced by the expression of reprogramming factors during the somatic cell reprogramming. To understand of genome-wide epigenetic alteration, it is useful for the elucidation of the reprogramming mechanism. To analyze the genome-wide DNA methylation during the somatic cell reprogramming process, we performed DNA methylation analysis by RRBS methods. This result showed tumor cells gained de novo DNA methylation at ESC-methylated region, whereas kidney-methylated region retained their original methylation status. And these tumor cells have no genetic mutation at oncogenes. These results suggest that incomplete reprogramming can induce the tumor cell by the epigenetic abnormal alteration. Further, we performed forced expression of reprogramming factors with epigenetic modifier which derived from plant gene, but efficiency was not dramatically improved.

研究分野：生物系・農学・境界農学

科研費の分科・細目：発生・分化制御

キーワード：体細胞初期化 iPS細胞 DNAメチル化 植物遺伝子

1. 研究開始当初の背景

初期化 4 因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc)の強制発現により、iPS(induced Pluripotent Stem)細胞の樹立が可能となった。さらに、近年の報告から、iPS 細胞樹立の過程にはダイナミックなエピゲノムの改変が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。一方、植物細胞は高い分化可塑性を持つことが知られており、簡単な処理により全能性を持つ細胞集団(カルス)を誘導することが可能である。また、哺乳動物細胞以上にエピゲノムによって遺伝子発現の制御がなされていることから、植物が持つエピゲノム修飾因子は、哺乳類細胞以上のエピゲノム変動を誘導できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、iPS 細胞樹立過程におけるエピゲノム変化の内、DNA のメチル化に着目し、DNA メチル化変化の同定手法の確立と、リプログラミング過程で変化するエピゲノムの積極的な改変によるリプログラミング効率への影響を解析することを目的としている。さらに、前述の様に、植物はより高度にエピゲノム制御がなされている生物である。外来遺伝子として植物のエピゲノム修飾因子を用い、体細胞リプログラミング過程において、積極的にエピゲノム変化を誘導することで、それら遺伝子の強制発現による体細胞リプログラミングへの影響を観察する。

3. 研究の方法

(1) ゲノムワイドな DNA メチル化解析法の確立

ゲノムワイドな DNA メチル化解析法として、High-throughput sequencer とメチル化感受性酵素 *MspI* を用いた RRBS(Reduced Representation of Bisulfite Sequencing)法の改変法である mRRBS 法(Boyle et al., *Genome Biology* 2012)を選択した。また、シーケンスデータの解析には、Bismark(Krunker et al., *Bioinformatics* 2011)を使用した。体細胞初期過程における DNA メチル化変化を観察するためのサンプルとして、腎臓組織、及び、不完全なリプログラミングにより誘導された腎臓腫瘍、リプログラミングを誘導後に腎臓内に形成されたテラトーマより単離した iPS 細胞、マウス ES 細胞を用いた。

(2) 植物遺伝子の入手及び、強制発現ベクターへのサブクローニング

エピゲノム変化を誘導するシロイヌナズナ遺伝子の完全長 cDNA クローンは、理研バイオリソースセンターから入手した。本実験では、強制発現系としてレトロウイルスを用いた。レトロウイルスベクターとして、pMXs-gw を用い、

gateway システムを利用して、各々の遺伝子の導入を行った。

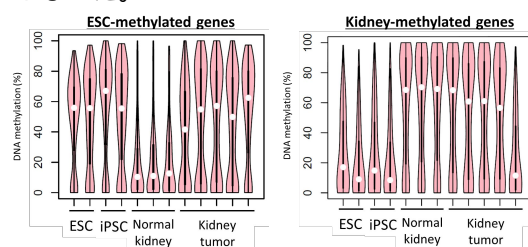
(3) MEF(mouse embryonic fibroblast)を用いたリプログラミング効率の検討

体細胞である MEF の初期化を誘導するために、ドキシサイクリン存在下で Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc を発現誘導可能なマウス(OSKM-KH2)胎仔より MEF の単離・培養を行った。樹立された MEF に対して、PlatE 細胞を用いて作成したレトロウイルスを用いて、植物遺伝子の強制発現を行い、感染後 3 日目に継代し、ES 細胞の培養系へと移した。その後、ES 細胞培養条件下で培養を続け、出現したコロニー数により、リプログラミング効率の検討を行った。

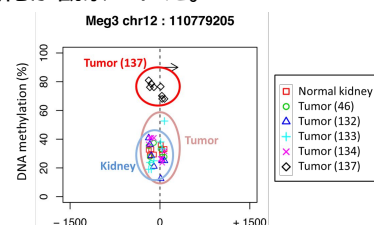
4. 研究成果

ゲノムワイドな DNA メチル化解析法の確立

生体内で体細胞初期化を誘導することが可能な OSKM-KH2 マウスより、トランスジーンである初期化 4 因子を発現する腎臓組織、及び、不完全なリプログラミングにより誘導された腎臓腫瘍、リプログラミングを誘導後、腎臓内に形成されたテラトーマより単離した iPS 細胞、マウス ES 細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、リプログラミング過程に伴う DNA メチル化の変化を mRRBS 法により同定した。その結果、生体内で形成されたテラトーマより単離された iPS 細胞は、ES 細胞と類似した DNA メチル化パターンを示すのに対して、不完全なリプログラミングにより形成された腎臓腫瘍では、腎臓の性質が維持されたまま、一部 ES 細胞と類似した DNA メチル化パターンが形成されていることが明らかとなった。



また、腎臓腫瘍において、体細胞において DNA のメチル化パターンが生涯維持されていると考えられているインプリンティング遺伝子の近傍領域において、DNA メチル化パターンの変化が観察され、また、幾つかのインプリンティング遺伝子については発現アレルの変化が観察された。



さらに、がん遺伝子における遺伝子変異の有無を Exome-seq 法を用いて検討した結果、変異が認められなかったことから、不完全な初期化に伴い腎臓に形成された腫瘍は、エピゲノム変化により誘導された腫瘍であることが明らかとなった。

植物遺伝子の強制発現による、リプログラミング効率の検討

シロイヌナズナにおいて同定されているエピゲノム修飾因子の内、植物細胞において、DNA のメチル化、脱メチル化に關与する幾つかの遺伝子を選択し、ドキシサイクリン存在下で初期化 4 因子を強制発現可能な MEF に対して強制発現後、リプログラミング効率の検討を行った。しかしながら、リプログラミング効率を優位に上昇させることができなかった。これは、エピゲノム修飾因子の多くが、複合体を形成して作用することから、単一遺伝子の強制発現ではエピゲノム変化を誘導することが不十分である可能性が考えられる。

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 5 件)

Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.

Cell. 2014 13;156(4):663-77

doi: 10.1016/j.cell.2014.01.005.

査読有

Urayama S, Semi K, Sanosaka T, Hori Y, Namihira M, Kohyama J, Takizawa T, Nakashima K.

Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation.

Cell Struct Funct. 2013;38(1):55-66. 2013

https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/38/1/38_12034/_article

査読有

Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A, Yamada Y.

EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice.

J Clin Invest. 2013 Feb 1;123(2):600-10.

doi: 10.1172/JCI63572. 2013.

査読有

Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K, Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. Int J Cancer. 2013 Mar 15;132(6):1240-8.

doi: 10.1002/ijc.27963. 2012 Dec 17. Review.

査読有

Fujimoto Y, Abematsu M, Falk A, Tsujimura K, Sanosaka T, Juliandi B, Semi K, Namihira M, Komiya S, Smith A, Nakashima K.

Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human induced pluripotent stem cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells.

Stem Cells. 2012 Jun;30(6):1163-73.

doi: 10.1002/stem.1083.

査読有

[学会発表](計 3 件)

Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, Yamada Y.

Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.

ISSCR 2014/06/18-21 Canada, Vancouver

八木正樹, 蛭克憲, Woltjen Knut, 山中伸弥, 山田泰広

Analysis of genomic imprinting during iPS cell derivation

日本発生生物学会大会 2014/05/27-30, 愛知県

蛭克憲, 大西紘太郎, 田中彰人, 山本拓也, 山中伸弥 Woltjen Knut, 山田泰広

生体内における体細胞初期化過程の DNA メチル化解析

エピジェネティクス研究会 2013/05/30-31, 奈良県

[図書](計 2 件)

蛭克憲, 山田泰広

南山堂、幹細胞研究と再生医療、2013、238

蛭克憲, 山田泰広

メディカル ドゥ、遺伝子医学 MOOK エピジェネティクスと病気、2013、288

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

生体内における体細胞の不完全な初期化はエピゲノム制御の変化による発がんを惹起する

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8458>

遺伝子の変異によらないがん化の仕組みを解明 ~iPS細胞技術の応用~

<https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/140214-095605.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蝉 克憲 (SEMI, Katsunori)

京都大学 iPS 細胞研究所・

初期化機構研究部門・特定研究員

研究者番号：90633058

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：