

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25560408

研究課題名(和文) エピジェネティクス変化を指標とする幹細胞の化学分化誘導プロセスの解析

研究課題名(英文) Analysis of stem cell differentiation process on the basis of epigenetic change

研究代表者

中尾 洋一 (Nakao, Yoichi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60282696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：生細胞ベースヒストン修飾プロファイル解析法を用いて、選択的なヒストン修飾変化を引き起こす化合物を海洋無脊椎動物から探索し、それらが幹細胞分化に与える影響を解析した。スクリーニングの結果、ヒストン修飾をひとつもしくは複数変動させるサンプルが多数認められた。そのうち、H3K9アセチル化を誘導する活性本体としてヒストン脱アセチル化酵素阻害剤として知られるpsammaplin Aが同定された。Psammaplin Aは胚様体形成において中胚葉および内胚葉への分化を促進した。また海綿Mycale sp.から強力なHDAC1阻害活性ならびに神経分化阻害活性を有する画分を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have screened activities causing selective histone modification using the crude extracts library prepared from marine organisms. We have searched for active substances from the hit samples and evaluated their effects on the stem cell differentiation. As the result of the screening, many hit samples showed up. We have isolated psammaplin A, known as an inhibitor against HDAC, as the active substance causing H3K9 acetylation. Psammaplin A induced differentiation to mesoderm and endoderm in the process of the formation of embryoid body. On the other side, an active fraction, showing strong inhibition against HDAC1 and differentiation to neural cells, was obtained from the marine sponge Mycale sp.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：生体分子科学・生物分子化学

キーワード：生物活性物質の探索

1. 研究開始当初の背景

多様なヒストン修飾の組み合わせパターンに基づくエピジェネティックなゲノム制御システムは、細胞の種類・性質を定義する重要な基盤となっている。エピジェネティクスが発生における細胞の分化や、がんをはじめとする様々な疾患の発症に深く関わっていることは、既に広く受け入れられている。一方、ヒストン修飾を人為的に変化することで細胞分化を制御するという試みも進められている。近年、iPS 細胞を用いた再生医療が現実味を増しており、エピジェネティクスに基づく幹細胞分化法の開発は急務であるといえる。我々はこれまでに、iPS 細胞による *in vitro* 血管再構築系に対して、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 azumamide が血管新生阻害活性を示すことなどを報告してきた (Nakao et al (2008) *Bioorg Med Chem Lett* 18: 2982-4)。このように、ヒストン修飾は分化制御の有望な標的であり、世界的に注目されている。

これまでの研究はヒストン修飾酵素に着目したものが主であった。しかし酵素を単に阻害するだけでは、ヒストン修飾の部位選択性や細胞種依存的な効果を制御することは困難である。そこで我々は生細胞のヒストン各部位の修飾パターンそのものに着目し、選択的なヒストン修飾パターン変化を引き起こす活性をモニターできるアッセイ系を開発した。これにより、*in vitro* で任意の方向に分化させた細胞について、計 20 種類のヒストン修飾プロファイルの評価するハイスループットなスクリーニングが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、連携研究者の木村らと共同開発した cell-base ヒストン修飾プロファイル解析法を用いて、選択的なヒストン修飾パターンを引き起こす化合物を海洋無脊椎動物から探索した。さらにマウス ES 細胞 *in vitro* 分化モデルを用いて、活性化化合物が細胞分化の様々な段階に与える影響を評価した。

3. 研究の方法

(1) 海洋生物抽出物ライブラリー

日本各地やベトナム、ミクロネシアの近海で採集した海綿、ホヤなどの海洋無脊椎動物をメタノールで抽出・濃縮し、得られた抽出物をクロロホルムと水によって 2 層分配してライブラリーとした。

(2) cell-base ヒストン修飾プロファイル解析に基づく化合物スクリーニング

ヒト乳腺がん細胞 MDA-MB-231 もしくはヒト網膜色素上皮細胞 hTERT-RPE1 を 96 ウェルプレートに播種し、培地中に抽出物を添加して 24 時間培養した。その後、連携研究者の木村が開発した 20 種類の蛍光標識ヒストン修飾特異的抗体 (Kimura et al (2008) *Cell Struct Funct.* 33: 61-73) により、最大で 5 色同時の多重免疫染色を行い、ヒストン修飾レベ

ルの変化を評価した。ヒットサンプルからは活性本体である化合物を単離し、NMR や MS などのスペクトル解析により構造を決定した。

(3) マウス ES 細胞 *in vitro* 分化モデルを用いたサンプルの影響解析

Neural Stem Sphere (NSS) 法 (Otsu et al (2011) *Neurosci Res* 69: 314-321) を改変した 4 stage-NSS 法によりマウス ES 細胞を以下の 4 段階に分けて分化させ、各段階に対する化合物の影響を評価した。

①マウス ES 細胞から胚様体 (EB) を形成する過程にサンプルを添加し、EB の直径および未分化・初期分化マーカー遺伝子発現への影響を評価した。

②EB を浮遊培養して Neural Stem Sphere (NSS) を形成する過程にサンプルを添加し、NSS の直径および神経外胚葉マーカー遺伝子発現への影響を評価した。

③NSS を接着培養することにより神経幹細胞 (NSC) が放射状に遊走する過程にサンプルを添加し、NSC の細胞数および遊走距離への影響を評価した。

④増殖した NSC をニューロンまたはアストロサイトへ選択的に分化誘導する過程にサンプルを添加し、免疫染色により各種分化マーカーの発現を解析することで、分化への影響を評価した。

(4) HDAC 阻害活性試験

HDAC1 および HDAC6 の *in vitro* 阻害活性試験は、理化学研究所・吉田化学遺伝学研究室の協力のもと行った。

4. 研究成果

(1) これまでに約 2100 検体の海洋生物抽出物をスクリーニングした結果、特異的な活性を示す抽出エキスを 20 種類以上見出してきた。その中で、H3K9 および H4K5 のアセチル化亢進作用を示すサンプルに着目して活性本体の単離を試みたところ、HDAC 阻害剤として知られる既知化合物 psammaplin A (Kim et al (2007) *Exp Mol Med* 39: 47-55) が得られた。既知ヒストン修飾制御化合物が同定されたことにより、本スクリーニング系の有用性が確認されたといえる。Psammaplin A が分化に及ぼす影響を 4 stage-NSS 法により解析したところ、EB 形成時に psammaplin A (1 $\mu\text{g/ml}$) を添加することで神経分化マーカーである Pax6 および Nestin の発現量が減少し、一方で中胚葉マーカーの Brachyury および内胚葉マーカーの Sox17 の発現量が増加することを見出した。

(2) 以前我々は海綿 *Mycale* sp. 抽出物に HDAC 阻害活性を認め、ここから azumamide 類を同定した。今回改めて鹿児島県産海綿 *Mycale* sp. を抽出、分画し、HDAC 阻害活性を調べたところ、24 の画分のうち 6 画分に HDAC1 および HDAC6 に対する阻害活性が認められた。そのうち 3 画分は azumamide C

(IC₅₀=620 ng/ml) より 10 倍以上強力な HDAC1 阻害活性 (IC₅₀<50 ng/mL) を示した。この 3 つの画分について 4-stage NSS 法による評価を行った。NSC に対する細胞毒性は画分により大きく異なった (IC₅₀=0.08, 0.4, 10 µg/ml)。3 画分を NSC からニューロン・アストロサイトへの分化誘導系に対しそれぞれ IC₅₀ 値の 50 分の 1 の濃度で添加したところ、いずれも分化を抑制する作用を示した。特にニューロンへの分化を強く抑制する傾向が見られ、選択的な効果が示唆された。

表 1 *Mycale* sp.由来画分の生理活性

	HDAC1 (ng/ml)	細胞毒性 (µg/ml)	ニューロン (%)	アストロサイト (%)
1	46	0.4	62	56
2	47	10	27	68
3	36	0.08	19	71

HDAC1 阻害活性と細胞毒性の IC₅₀ 値、ならびにコントロールと比較した時のニューロン・アストロサイトそれぞれへの分化効率を示す。

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 0 件)

[学会発表] (計 9 件)

[口頭発表]

- ① 大塚悟史、嶋根みゆき、野村仁、石田貴彬、新井大祐、田中克典、中尾洋一、浅野茂隆、マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化誘導系の化学毒性・薬効評価への応用、文部科学省復興対策特別人材育成事業 平成 25 年度 第 3 回集中講義及び若手放射線生物学研究会 第 4 回勉強会 (大分、2013.12) .
- ② 片岡亮佑、新井大祐、林陽子、木村宏、中尾洋一、多重免疫染色法を利用したヒストン修飾制御剤の探索、文部科学省復興対策特別人材育成事業 平成 25 年度 第 3 回集中講義及び若手放射線生物学研究会 第 4 回勉強会 (大分、2013.12)

[ポスター発表]

- ③ 大塚悟史、嶋根みゆき、野村仁、石田貴彬、新井大祐、田中克典、中尾洋一、浅野茂隆、マウス ES 細胞を用いた *in vitro* 神経分化誘導系の化学毒性・薬効評価への応用、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12)
- ④ 神平梨絵、喜納惟斗、林陽子、木村宏、新井大祐、中尾洋一、H3K9 アセチル化

誘導活性を有する海洋天然化合物の探索、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12)

- ⑤ 佐久間千晶、林陽子、木村宏、Kind K. Kanto、新井大祐、中尾洋一、海洋生物からのヒストン修飾制御剤の探索、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12)
- ⑥ 片岡亮佑、新井大祐、林陽子、木村宏、中尾洋一、多重免疫染色法を利用したヒストン修飾制御剤の探索、第 36 回日本分子生物学会年会 (神戸、2013.12)
- ⑦ 佐久間千晶、林陽子、木村宏、中尾洋一、海洋生物からのヒストン修飾制御剤の探索、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 (奈良、2013.5)
- ⑧ 神平梨絵、喜納惟斗、林陽子、木村宏、中尾洋一、H3K9 アセチル化誘導活性を有する海洋天然化合物の探索、第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 (奈良、2013.5)
- ⑨ 大塚悟史、嶋根みゆき、野村仁、石田貴彬、新井大祐、田中克典、中尾洋一、浅野茂隆、Evaluation of the effects on neural differentiation by anti-angiogenic agents in the *in vitro* neural differentiation model using mouse ES cells. 生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム、FBT-1203 (東京、2013.12)

[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

<http://www.chem.waseda.ac.jp/nakao/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中尾洋一 (NAKAO, Yoichi)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：60282696

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

木村宏 (KIMURA, Hiroshi)

大阪大学・生命機能研究科・准教授

研究者番号：30241392

山下潤 (YAMASHITA, Jun)

京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50335288