

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670401

研究課題名(和文) シグナル-エピゲノム連関による分化再生と生体維持機構

研究課題名(英文) Regulation of differentiation, regeneration, and homeostasis via signaling-epigenome interaction

研究代表者

山下 潤 (JUN, YAMASHITA)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、エピゲノムを制御する新しいシグナル分子群を同定し、その機能と意義を解析するとともに種々の新しいエピゲノム制御法を開発することを目的とした。新たにエピゲノム制御性液性因子として同定した同定遺伝子(X)の作用機構の解析を行い、(X)がAMと同様に多能性幹細胞初期分化過程において、分化速度の調整に關与していることを明らかにした。さらに分化初期以外の生命現象における(X)の關与を探索している。

研究成果の概要(英文)：Purpose of this study is development of novel manipulating methods of epigenome through identification of signaling molecules being involved in epigenetic regulation.

We identified a humoral factor that regulate differentiation velocity in early differentiation stage of pluripotent stem cells through epigenetic silencing of pluripotent genes. Now we are investigating other physiological functions of the gene than differentiation through epigenetic regulation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：多能性幹細胞 分化 エピジェネティクス 液性因子

## 1. 研究開始当初の背景

染色体等の高次構造により遺伝子発現を制御するエピゲノム制御は、細胞の分化・形質維持・リプログラミングをはじめ、がんや生活習慣病等種々の慢性疾患などへの関与が知られている。しかしこれまで、種々のシグナル、特に細胞外シグナルによるエピゲノム制御機構に関してはほぼ全く報告がない。

代表者はこれまで、心血管系細胞の分化を系統的経時的に解析できる独自の ES 細胞分化システムを構築し、心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。すなわち、マウス ES 細胞から Flk1 陽性の中胚葉細胞を分化誘導し、そこから血管を分化させる新しい分化系を開発した (Nature, 2000)。また心筋分化 (FASEB J, 2005)、動静脈リンパ管内皮分化を含む新しい内皮細胞分化制御機構 (Blood, 2009, 2011; J Cell Biol, 2010; Stem Cells, 2012) など種々の心血管分化機構を明らかにしている。iPS 細胞研究にも世界に先駆けて成功し (Circulation, 2008 ; 2008 年 Circulation 誌基礎科学部門第 1 位 Best Paper Award 受賞) ES/iPS 細胞の分化研究において世界的にも先端的である。代表者らは、ES 細胞の分化途上において Protein kinase A (PKA) を活性化することにより、三胚葉及び内皮細胞の分化が通常約 2 倍早まることを見いだした。PKA の活性化により、ヒストン 3 リジン 9 のジメチル化 (H3K9me2) 酵素である G9a の発現が増加し、抑制性ヒストンメチル化である H3K9me2 が未分化遺伝子 (Oct3/4, Nanog) に早く入るため、未分化遺伝子の発現低下が早まり分化が促進されていた (Cell Stem Cell, 2012)。同研究は、分化の時間の制御という新しい概念を PKA による G9a 発現制御という新しいシグナル-エピゲノム連関により示したものである。PKA を手がかりに上流の因子を探索することにより、エピゲノムを制御する新しいシグナル分子 (特に液性因子) 群を同定し、その新しい作用機構を明らかにするとともに、エピゲノムを制御する新しい手段、新しいエピゲノム治療法の開発等が行えると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、エピゲノムを制御する新しいシグナル分子群を同定し、その機能と意義を解析するとともに種々の新しいエピゲノム制御法開発ことを目的とした。これまでに、アドレノメデュリン (AM) が ES 細胞及び胎生早期において PKA を活性化して ES 細胞の分化タイミングを変化させることを見いだしている。さらに PKA に関与する分子を探索し、種々の生体維持機構へ関与している液性因子 (X) がエピゲノム制御を介して作用している新たな可能性を見いだしている。研究期間内においては、1) AM の分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与、2) 同定遺伝子 (X) の作用機構の解析、3) 新規エ

ピゲノム制御シグナルの探索同定を行い、種々の生命現象をエピゲノム制御を通して理解し直すとともに、エピゲノムの新しい制御機構の解明とその応用を目指した。

## 3. 研究の方法

1) AM の分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与

PKA のエピゲノム制御に関する研究の中で、cAMP を上昇させ PKA を活性化する作用がある AM 及びその受容体が胎生早期に発現していること、また ES 細胞の分化途上において AM を投与することにより、分化タイミングを早める効果があることをすでに見いだしている。まず AM に関して、実際に G9a を介して H3K9me2 を制御しているのかを ES 細胞分化モデルを用いて検証・確認する。AM 及び受容体は血管内皮及び平滑筋細胞、心筋細胞等に発現し、血管形成や動脈硬化性病変、心不全の形成等多彩な病態に関与していることが知られている。これら胎仔及び成体における AM の作用においてエピゲノム制御が関与しているかどうか検討する。具体的には、ヒト臍帯由来内皮細胞や平滑筋細胞、幹細胞由来心筋細胞等において、AM を作用させたときの G9a 及び H3K9me2 の状態を確認する。さらに可能ならば AM ノックアウトマウスや成熟マウスへの AM 投与時における H3K9me2 の状態を検討する。

2) 液性因子 (X) の同定と機能解析

AM の効果は、constitutive active (CA)-PKA により PKA を強制的に活性化した場合に比べて強くなく部分的であり、PKA の作用をすべて説明するものではなかった。このことは、AM 以外にも PKA を介してエピゲノム制御に関与している液性因子群が存在することを示唆する。そこで AM 以外の因子を探索した。

i) PKA を下流シグナルとすることが報告されている分子を標的とする candidate アッセイ

PKA を下流シグナルとして用いる他の液性因子を候補物質として選択し、組換えタンパクまたは cDNA を用いた機能発現により、エピゲノム制御への作用を検討した。その結果、これまで幹細胞や心血管細胞分化への関与は特に知られていない既報の液性因子 (X とする) が、AM や PKA 活性化と同様に ES 細胞分化系における分化タイミングを早める効果があることを見いだした。G9a 発現、H3K9me2 量などエピゲノム制御作用が存在するか確認する。

ii) (X) の既報の機能についてエピゲノムへの関与を検討

(X) は、同定されてから長い歴史があり、さまざまな生命現象への関与が報告されている。しかしそれらの中でエピゲノム制御が関与した作用であることが示されているものはない。それらの中で、エピゲノム制御を

介したものがああるかどうかを検討する。細胞分化等における細胞形質維持のみならず、広範な生命維持機構におけるエピゲノムの関与と新しい意義を明らかにする。

### 3) 新規エピゲノム制御シグナルの探索同定

i) PKAを下流シグナルとする分子を標的とする candidate アッセイ

ii) ES細胞の分化タイミングをリードアウトとした液性因子スクリーニング

## 4. 研究成果

### 1) AMの分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与

AMのES細胞早期分化及び受精卵の発生早期におけるエピゲノム制御と分化速度への関与を検討した。AM投与によりH3K9me2のメチル化が誘導されるとともにOct4, Nanog, Sox2など未分化維持遺伝子の発現が抑制され、早期の分化が誘導された。AMが内因性のリガンドの一つとして、ヒストンメチル化を介して分化速度制御に関与していることを明らかにした。

### 2) 液性因子(X)の同定と機能解析

i) PKAを下流シグナルとすることが報告されている分子を標的とする candidate アッセイ

同定した液性因子(X)に関してAMと同様の検討を行い、(X)もH3K9me2のメチル化を誘導するとともにOct4, Nanog, Sox2など未分化維持遺伝子発現の抑制と、早期の分化が誘導された。(X)も内因性のリガンドの一つとして、ヒストンメチル化を介して分化速度制御に関与していることを明らかにした。

ii) (X)の既報の機能についてエピゲノムの関与を検討

(X)は、同定されてから長い歴史があり、さまざまな生命現象への関与が報告されている。しかしそれらの中でエピゲノム制御が関与した作用であることが示されているものはない。それらの中で、エピゲノム制御を介したものがああるかどうかを検討する。細胞分化等における細胞形質維持のみならず、広範な生命維持機構におけるエピゲノムの関与と新しい意義を明らかにする。

## 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 2 件)

1. Masumoto H, Ikuno T, Takeda M, Fukushima H, Marui A, Katayama S, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita JK.\* : Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with

cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. **Sci Rep.** 4:6716, 2014. doi:10.1038/srep06716

2. Arita Y, Nakaoka Y, Matsunaga T, Kidoya H, Yamamizu K, Arima Y, Kataoka-Hashimoto T, Ikeoka K, Yasui T, Masaki T, Yamamoto K, Higuchi K, Park JS, Shirai M, Nishiyama K, Yamagishi H, Otsu K, Kurihara H, Minami T, Yamauchi-Takahara K, Koh GY, Mochizuki N, Takakura N, Sakata Y, Yamashita JK., Komuro I. : Myocardium-derived angiopoietin-1 is essential for coronary vein formation in the developing heart. **Nat Commun.** 5:4552, 2014. doi: 10.1038/ncomms5552.

[学会発表](計 10 件)

1. Yamashita JK. : Blood vessels for cardiac regeneration with stem cells. 2014 International Vascular Biology Meeting (2014. 4. 14-17. Kyoto)
2. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた次世代心臓再生治療戦略の開発」, 第35回日本炎症・再生医学会 日本再生医療学会 ジョイントシンポジウム「幹細胞分化から見た再生医療」(2014.7.3. 沖縄)
3. 山下 潤 : Multiple Approaches for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 最先端セミナー(熊本大学リエゾンラボ研究会)(2014.7.16. 熊本)
4. 山下 潤 : 「多能性幹細胞由来心血管細胞の創薬および再生医療への応用」, 第6回メディバイオ事業研究会講演会(山口大学医学部消化器病態内科学・再生医療の実現化ハイウェイセミナー) (2014.7.24. 山口)
5. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた多面的心血管分化再生戦略」, ゲノム創薬・医療フォーラム第2回談話会「再生医療における創薬戦略」(2014.8.7. 東京)
6. Yamashita JK. : Application for High Throughput Drug Screening with human

iPS cell derived cardiomyocyte. iPS related activities in Japan / application for safety evaluation using human iPS cell-derived cardiomyocyte. CiRA-Boehringer Ingelheim iPS Symposium (2014.10.9. Kyoto)

7. Yamashita JK. : Next Generation Strategies for Cardiac Regeneration with Pluripotent Stem Cells, Small Molecules, and Tissue Engineering. 第5回アジア細胞治療学会 (ACTO2014) (2014.11.10. Osaka)
8. Yamashita, JK. : Multiple Approaches for Cardiac Regeneration Using Pluripotent Stem Cells. American Heart Association Scientific Meeting 2014, Joint AHA/Japanese Circulation Society Session: Use of ES/iPS Cells for Cardiovascular Medicine (2014.11.18. Chicago, USA)
9. 山下 潤 : 「ヒト iPS 細胞からの効率的な心筋細胞誘導」, 第11回医薬品レギュラトリーサイエンスフォーラム「ヒト iPS 細胞を利用した安全性薬理試験法の実現に向けて」(2014.12.9. 東京)
10. Yamashita JK: Next-generation cardiac regenerative strategies using iPS cells: 3D tissue engineering and new cell populations. CiRA International Symposium (2015.1.16, Suita, Osaka)
11. 山下 潤 : 「多能性幹細胞の心血管系再生医療への応用」, 第6回再生医療サポートビジネス懇話会 (2015.2.10 京都)
12. 山下 潤 : 「多能性幹細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略 - 血管の重要性を中心に - 」, 第13回下肢の創傷治癒を考える会 (2015.2.12. 高松)

〔図書〕(計0件)

〔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 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
山下研究室のホームページ  
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/yamashita/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山下 潤 (YAMASHITA, Jun)  
京都大学・iPS細胞研究所・教授  
研究者番号 : 50335288

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :