

平成 2 8 年 6 月 2 4 日現在

機関番号： 1 4 3 0 1

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2014 ~ 2015

課題番号： 2 6 8 4 0 0 7 6

研究課題名（和文）iPS細胞誘導における細胞特異的遺伝子による相互排他的な発現制御機構の解析

研究課題名（英文）Mutual exclusive correlation analysis in iPS cell induction.

研究代表者

引地 貴亮（Takafusa, Hikichi）

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：8 0 3 9 2 0 8 3

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：神経幹細胞用細胞（NPC）および肝臓系幹細胞（HPC）からのiPS細胞への誘導初期の遺伝子変化についてシングルセル解析を行い、遺伝子発現の関連性についてのマッピングを行った。その結果、NPC/HPCにとって重要な遺伝子と未分化細胞特異的な遺伝子の相関関係がクリアに示された。また、ヒストン修飾と併せて比較することで、遺伝子発現制御に重要な役割を持つ因子をリストアップすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Gene expression mapping was performed using single cell analysis in neural progenitor cells and hepatic progenitor cells. As result, relationship between cell type specific genes and pluripotent stem cell genes was made clear. And several transcription factors which have important role in differentiation were enriched by comparison of gene correlation and histon modification analysis.

研究分野： 幹細胞生物学

キーワード： iPS細胞誘導 転写因子

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究結果から、マウス神経系細胞 (NPC) および肝臓系細胞 (HPC) に特異的に発現するいくつかの転写因子が iPS 細胞誘導に干渉すること、また同時にこれらの転写因子が NPC・HPC で中心的な制御因子として重要であることを明らかにしてきた。しかし、実際にどのようなメカニズムにより NPC/HPC の中心転写因子が iPS 細胞等で発現するべき未分化マーカーを制御しているかは未知であった。

2. 研究の目的

iPS 細胞誘導時の NPC/HPC 特異的な中心転写因子による干渉のメカニズムについて研究を進めることは、iPS 細胞誘導に重要な遺伝子発現制御を解明することと同義であると考えた。そこで本研究では、細胞特異的な転写因子と iPS 細胞特異的な転写因子の間の相互排他的な制御関係を発現制御ネットワークマップとして明示し、その iPS 細胞誘導における重要性について解析・評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまではシャーレ上の複数の細胞 (おおむね 1×10^6 個程度) から回収した RNA を用いて遺伝子発現解析を行ってきたが、個々の細胞内での相互排他的な遺伝子発現状態を調べるためにシングルセル (フローサイトメーターもしくはフリーダタイム社製 C1 を用いて 1 個ずつに分離した細胞) における遺伝子発現解析を次世代シーケンサー技術により行った。iPS 細胞誘導時に変化する遺伝子の相関関係をマップとしてあらわすため、NPC および HPC において iPS 細胞誘導の初期、中期、後期にそれぞれの細胞群から 24 ないし 48 個のシングルセルを個々に回収し発現データを収集し、統計解析を行うことでそれぞれの遺伝子の発現量の変化を相関

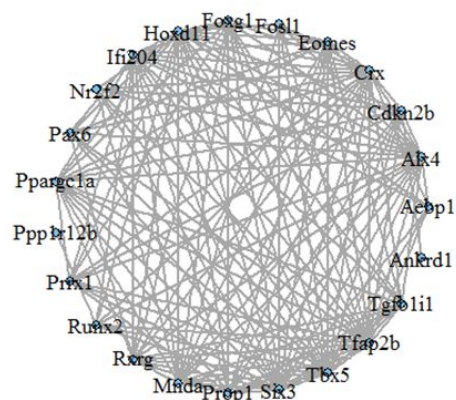
値として導きパターン化した。

(2) NPC、HPC および ES 細胞についてヒストンヒストン H3K27 のアセチル化状態をクロマチン免疫沈降法を用いて特定した。その後、それぞれの細胞間でアセチル化状態の差のある部分を抽出し、その領域に結合しうるタンパク質の結合モチーフ解析を行うことによりリストアップした。

4. 研究成果

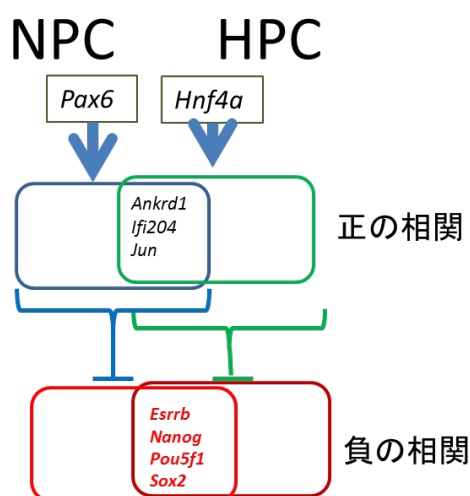
(1) NPC へ iPS 細胞誘導因子を導入後のいくつかの時点においてシングルセルを回収し、個々の細胞における遺伝子発現状態を網羅的に解析し、得られたデータは、発現状態の変化パターンの近いもの (正の相関) 遠いもの (負の相関) の重みづけを行った。その結果、NPC において正に相関している遺伝子は 39 群のかたまりとして分類された。その群のうちの一つは 23 個の遺伝子が協調的に発現しており、さらにこれら遺伝子は NPC において重要な働きを持つと考えられる *Pax6* を含む NPC 特異的な遺伝子によって構成されていた (図 1)。このことから、細胞にとって重要な役割を持つ遺伝子は、いくつもの細胞特異的な遺伝子と協調的に制御されていることが示唆された。同様に HPC においても協調的に発現が制御される 27 群に分類された。

(図 1: 正の相関を示す遺伝子群 一部抜粋)



次に NPC と HPC それぞれの細胞において重要とされる遺伝子 (*Pax6*, *Hnf4a*) を中心とした相関図を作成した (図 2)。NPC において *Pax6* と正の相関を示す遺伝子には NPC で特異的に発現することの確認できている遺伝子が多く含まれており、これは *Pax6* が他の遺伝子の発現を制御する中心転写因子であるという結果とも一致した。また、これまでに細胞集団を用いて行ったマイクロアレイ解析においては特に NPC 特異的な発現が認められていない遺伝子も多数含まれており、シングルセル解析を行うことで初めて明らかとなる知見も含まれていた。

(図 2: *Pax6* / *Hnf4a* を中心とした相関図)



同様の相関結果は HPC における *Hnf4a* を中心とした解析からも得られている。興味深いことに、この NPC と HPC は全く異なる細胞であるにもかかわらず、*Pax6* と *Hnf4a* と正の相関を示す遺伝子のいくつかが共通していることが明らかとなった。さらに *Pax6* と *Hnf4a* と共通して負の相関をする遺伝子に着目してみると、*Esrrb* や *Pou5f1* といった iPS 細胞や ES 細胞において強く発現することが知られている未分化マーカー遺伝子が抽出された (図 2)。このシングルセル解析データを用いて未分化マーカー同士の相関についての解析も行ったが、*Esrrb* や *Pou5f1* 等は互いに

正の相関を示すことが確認されたことから、本研究におけるこの解析手法の信ぴょう性が高いことも強く示唆された。これら 2 つの細胞を比較した結果から、それぞれの細胞における中心転写因子は共通したメカニズムを介して分化誘導時の遺伝子発現制御に深く関与しており、細胞特異的な遺伝子と未分化細胞特異的な遺伝子とが相互排他的に制御されていることが重要な役割を持つものと考察した。

(2) iPS 細胞誘導時に重要な意味を持つヒストン修飾の変化とその変化に関与する因子を特定するため、体細胞 (NPC、HPC) と未分化細胞 (ES 細胞) の間でヒストン H3K27 のアセチル化の比較を行った。アセチル化された H3K27 をアクティブなエンハンサー領域と捉え、NPC もしくは HPC でのみ特異的に結合するであろうタンパク質をモチーフ検索解析により抽出した。いくつかのタンパク質結合モチーフが見つけたが、特に AP1 ファミリー遺伝子の結合配列が NPC および HPC のエンハンサー領域に結合していることが示唆された。この AP1 ファミリー遺伝子の一つである *c-Jun* 遺伝子は、先に示した NPC・HPC それぞれの重要因子である *Pax6* や *Hnf4a* と共通して正の相関を示す遺伝子としても抽出されてきたものであり (図 2)、何らかの意味を持つものとして注目した。*c-Jun* 抗体を用いた ChIP-seq アッセイにより、実際に *c-Jun* が NPC においていくつもの NPC 特異的遺伝子の近傍に結合していることが確認された。さらにヒト角膜上皮細胞を用いた実験においても *JUN* が iPS 細胞誘導に干渉することが示されており、これは種を超えて分化誘導時に重要な役割を持つことを示唆している。現在、AP1 ファミリー遺伝子の分化誘導時における役割についての解析を進めている。

以上の結果から、シングルセル解析結果を利

用した遺伝子発現の相関マップ作成という手法が、分化誘導時に重要な役割を持つ因子の抽出および相互排他的な発現制御研究に非常に有用なツールであることが示された。この解析手法を用いることで、iPS 細胞分化誘導のみならず体細胞分化誘導における重要な遺伝子発現制御機構についての理解を進めることが可能である。

引地 貴亮 (HIKICHI, Takafusa)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員
研究者番号：80392083

(2)研究分担者

(3)連携研究者

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)

Kitazawa K, Hikichi T, Nakamura T (他 13 名) **OVOL2 Maintains the Transcriptional Program of Human Corneal Epithelium by Suppressing Epithelial-to-Mesenchymal Transition.** Cell Reports 2016, 1359-68

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

6．研究組織

(1)研究代表者