

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07458

研究課題名(和文) 体細胞ヒストン修飾情報の系統解析によるヒトの細胞系譜および細胞分化過程の推定

研究課題名(英文) Inferring cell differentiation process based on phylogenetic analysis of histone modifications of human cells

研究代表者

小柳 香奈子 (Koyanagi, Kanako)

北海道大学・情報科学研究院・准教授

研究者番号：20362840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞動物の発生過程の理解には、各細胞の変遷過程の理解が重要である。しかしながら侵襲的な実験が難しいヒトなど、変遷過程の全種類の細胞を網羅的に取得することは困難な場合も多い。そこで本研究では、得ることが比較的容易な成体の分化した体細胞のエピジェネティック修飾の情報をを用い、進化生物学で用いられる系統解析から、細胞分化過程におけるエピジェネティック修飾の変遷過程の推定を試みた。材料として8種類のヒト血球系細胞の6種類のヒストン修飾を用い、本手法により、細胞分化に関連したヒストン修飾の変遷過程が推定されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティック修飾の状態は、細胞内の各遺伝子の発現状態を反映していると考えられることから、特に発生過程の実験データ取得が困難な生物の個体発生過程の理解に役立てられることが期待される。また、細胞分化の各過程でエピジェネティック修飾に変化がみられた遺伝子群は、特定の系列の細胞を分化させるために必要な遺伝子候補であるので、分化誘導の応用にも貢献することも期待される。

研究成果の概要(英文)：For understanding the development of animals, it is important to reveal the landscape of epigenetic changes in cells during differentiation process. However, analyzing whole differentiation processes in various cell types is laborious and impossible for some organisms. In this study, phylogenetic analysis is applied to reconstruct developmental processes based on the developmental changes of epigenomes of differentiated cells. Using epigenomes of eight types of differentiated human hematopoietic cells, ancestral state estimation based on a phylogenetic tree was applied to map the epigenomic changes of six kinds of histone modifications onto the hierarchical cell differentiation process of hematopoiesis. As a result, it was shown that this approach could infer an appropriate landscape of histone modification changes during hematopoiesis.

研究分野：分子進化学

キーワード：系統解析 細胞分化 エピジェネティクス ヒストン修飾 細胞系譜 祖先推定

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精卵が遺伝子の発現状態を変化させながら、細胞分裂・分化・死を通して、どのようにして多種類の細胞からなる一個体を形成していくのかを理解することは、生物学の大きな目標の一つである。この個体発生過程の分子レベルでの理解は、次世代シーケンサによる技術革新により新たな進展をみせている。RNA-seq や ChIP-seq 等の確立により、個体発生に伴う遺伝子発現情報やエピジェネティック修飾情報をゲノムワイドに研究することが可能となり、細胞分化過程の遺伝子発現・エピゲノム情報が急速に蓄積されてきた (Marioni *et al.* 2017, Avgustinova *et al.* 2016 等)。しかしながら侵襲的な実験が難しいヒトなど、分化過程の全種類の細胞を網羅的に取得することは困難な場合が多い。

2. 研究の目的

この問題を解決するために、得ることが比較的容易な成体の分化した体細胞のエピゲノム情報の系統解析から、*in silico* で哺乳類の細胞系譜を構築し、構築された細胞系譜の祖先節の形質状態を推定することで、発生過程における分化途中の細胞のエピジェネティック修飾状態が推定できるのではないかと考えた。

これまでの研究において、遺伝子発現の抑制に関わる DNA メチル化を用いて手法の妥当性の検証を行った。材料には細胞系譜や分化途中の各種前駆細胞の全ゲノム DNA メチル化状態が明らかとなっているマウスの血球系細胞を用いた。その結果、既知の細胞系譜を再構築できること、77~90%の精度で祖先節にあたる分化途中の細胞の DNA メチル化状態を推定できることが示された (Koyanagi 2015)。

一方でヒストンの化学修飾は、修飾の種類や部位により遺伝子発現の活性化 / 抑制を複雑に制御していることが知られている (Zhou *et al.* 2011)。DNA メチル化に比べて細胞分裂後の維持機構は明確でないが、細胞分化過程に関して DNA メチル化よりも多くの情報を保持しているといえる。そこで本研究では、分化した成体の体細胞のヒストン修飾の情報の系統解析から、細胞分化過程におけるヒストン修飾の変遷過程の推定を試みた。

3. 研究の方法

材料には、Blueprint Project (Fernández *et al.*, 2016, <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/blueprint/>) から利用可能な、8 種類のヒト血球系細胞 (赤芽球、巨核球、好酸球、好中球、単球、NK 細胞、T 細胞、B 細胞) の、6 種類のゲノムワイドなヒストン修飾情報 (H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K27me3, H3K9me3) を用いた。同じ細胞でも複数の組織や個人に由来するサンプルが存在したため、それぞれ計 114、122、118、83、99、104 のサンプルが利用可能であった。

ヒストン修飾の情報は DNA 上の領域情報であり、これを各塩基サイトの修飾状態 (ON/OFF) の配列として扱った。PAUP (Swofford 2003) および RAxML (Stamatakis 2014) を用い、最節約法および最尤法に基づき、分子系統樹推定および祖先節の状態推定を行った。ヒストン修飾のゲノム位置の特徴解析や機能解析には、R/Bioconductor の ChIPseeker package (Yu *et al.*, 2015) を用いた。

4. 研究成果

まず 6 種類のヒストン修飾それぞれについて分子系統樹を推定したところ、細胞間や個体間の heterogeneity が存在し、同じ細胞種が単系統群を形成しなかった。このことは、ヒストン修飾の変動性によりホモプラシーが無視できない程度存在することにより、期待される系統関係が推定できなかったことを示唆している。また、ヒストン修飾の種類によっても結果は異なり、例えば H3K4me1 は期待される血球系細胞の階層的分化過程をよく再現したが、H3K9me3 は期待される階層的分化過程を再現しなかった。このことは、各ヒストン修飾の役割を反映していると思われた。すなわち、H3K4me1 はエンハンサー領域における転写の活性化と関連しており、細胞分化過程との関連性が強いのに対し、H3K9me3 は安定的なヘテロクロマチン形成による転写の抑制と関連しており (Zhou *et al.* 2011) 細胞分化過程との関連性が限定的であることによるものと思われた。

そこで次に、既知の細胞系譜を仮定した上で、すなわち期待される樹形を固定し、その樹形上における祖先節の状態推定を行うことで、細胞分化過程におけるヒストン修飾の変遷過程の推定を行った。その結果、細胞系譜上の各過程におけるヒストン修飾の ON/OFF の変遷過程が推定された (表 1)。

表 1 推定されたヒストン修飾の変化 (bp)

ヒストン修飾の種類	変化	M-L	M-ErMe	M-EoNeMo	ErMe-Er	ErMe-Me	EoNeMo-EoNe	EoNe-Eo	EoNe-Ne	EoNeMo-Mo	L-Nk	L-T	L-B
H3K4me1	ON	9,429,466	39,703,057	22,017,758	35,913,942	34,886,942	24,421,323	25,468,079	26,236,718	19,461,601	33,753,469	27,581,198	33,533,882
	OFF	18,781,513	9,462,402	8,422,473	2,591,383	7,911,598	6,476,176	11,206,242	5,179,445	10,922,953	22,154,142	22,625,207	5,541,398
H3K4me3	ON	1,684,125	991,061	1,313,708	179,792	661,888	795,410	182,598	2,285,809	2,941,744	1,409,903	613,327	5,859,569
	OFF	415,222	2,565,055	563,361	570,719	12,546	1,790,294	2,871,781	105,427	115,196	2,734,433	2,227,015	93,935
H3K27ac	ON	1,139,495	3,438,861	2,601,470	3,244,347	2,338,903	1,414,498	18,385	5,776,718	2,678,442	15,562,073	9,348,850	962,543
	OFF	587,997	914,490	1,041,058	340,141	160,301	748,342	1,998,988	22,581	395,810	467,148	340,135	636,148
H3K36me3	ON	9,220,171	20,703,797	11,042,540	13,320,114	14,424,860	10,380,855	6,095,266	16,615,215	10,233,806	10,266,062	15,715,811	20,588,130
	OFF	11,278,817	13,598,172	10,329,194	5,514,091	5,530,871	10,859,870	13,945,648	3,327,696	6,078,638	24,007,727	13,181,707	4,574,464
H3K27me3	ON	640,647	3,548,907	3,848,679	4,699,466	0	12,056,241	7,385,629	7,662,155	2,485,809	5,584,214	911,630	1,721,789
	OFF	6,597,173	1,447,281	554,443	0	2,288,655	367,596	1,521,212	493,840	3,222,529	886,857	7,829,706	8,627,963
H3K9me3	ON	34,296	12,086,241	1,654,719	19,002,388	88	6,152,032	14,785,266	1,622,564	1,109,078	441,776	872,060	506,071
	OFF	13,774,405	126,221	203,243	346	686,622	1,030,277	385,000	2,544,737	2,620,331	5,127,667	3,316,966	1,646,179

骨髄系細胞(M)、リンパ球系細胞(L)、赤芽球(Er)、巨核球(Me)、好酸球(Eo)、好中球(Ne)、単球(Mo)、NK細胞(Nk)、T細胞(T)、B細胞(B)

この推定結果の妥当性を検証する目的で、推定されたヒストン修飾の変化と、遺伝子位置との関係を調査した。ここで、分子系統樹上の枝を、異なる細胞間の分岐に相当する inter-type branch と、同じ細胞種内の分岐に相当する intra-type branch に分類して解析を行った。その結果、inter-type branch 上で観察されたヒストン修飾の変化は、各ヒストン修飾の特徴をよく反映するゲノム位置（転写開始点、エンハンサー領域など）に多くみられることが明らかとなった（図 1）。例えば、H3K4me3 や H3K27me3 は転写開始点付近のプロモーター領域に多くみられた。これらの修飾はプロモーター領域で転写の活性化及び抑制に関連していることが知られており（Zhou *et al.* 2011）、細胞分化における転写制御に関連するヒストン修飾の変遷が推定されていることが示唆された。

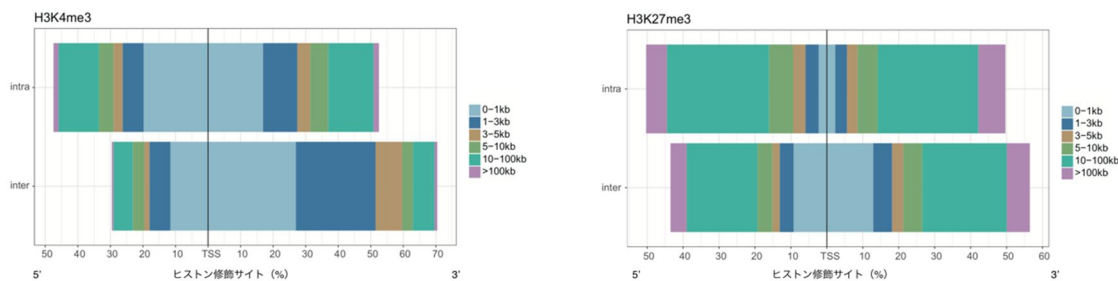


図 1 inter-type branch と intra-type branch 上に推定されたヒストン修飾の転写開始点 (TSS) からの位置の分布

次に、active histone mark として知られる H3K4me3 と H3K27ac の修飾や、ES 細胞や iPS 細胞にみられる bivalent histone mark として知られる H3K4me3 と H3K27me3 の修飾等が、細胞分化のどの過程で、どの遺伝子のプロモーター領域に存在するか、ヒストン修飾と遺伝子機能との関連について解析を行った。その結果、inter-type branch については、各種血球系細胞の分化に重要な遺伝子に、関連するヒストン修飾の変遷が推定された（Koyanagi 2019）。例えば、巨核球への分化過程において、血小板活性化と関連する遺伝子の H3K4me3 の変化が enrich していることが示された。さらに、赤血球・血小板の分化過程に重要な *GATA-1* 遺伝子の周辺について、どのようなヒストン修飾が推定されたかを確認したところ、実験的に active histone mark が示された分化過程と同様の分化時期に、本手法でも active histone mark が推定されていた（表 2）。

以上のことから、本研究手法により細胞分化に関連したヒストン修飾の変遷過程が推定されていることが示唆された。

表 2 各祖先節において *GATA-1* 遺伝子に推定されたヒストン修飾 (bp)

領域	ヒストン修飾の種類	M	ErMe	Er	Me	EoNeMo	EoNe	Eo	Ne	Mo	L	Nk	T	B
5' upstream	H3K4me1	0	2644	2714	2644	0	0	2358	0	0	0	0	0	0
	H3K4me3	0	394	394	394	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H3K27ac	0	501	643	501	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gene	H3K4me3	0	2664	2664	2664	0	0	1389	0	0	0	0	0	0
	H3K27ac	0	1723	1798	2094	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	H3K36me3	0	3587	3888	3587	0	0	2981	0	0	0	0	0	0

骨髄系細胞(M)、リンパ球系細胞(L)、赤芽球(Er)、巨核球(Me)、好酸球(Eo)、好中球(Ne)、単球(Mo)、NK細胞(Nk)、T細胞(T)、B細胞(B)

展望

ヒト細胞のヒストン修飾は細胞間や個体間の heterogeneity が存在し、既知の細胞系譜が仮定できない血球系細胞以外のヒト全身の各種体細胞を用いた解析には至らなかった。一方でここ数年、CRISPR/Cas9 genome-editing system を用いた突然変異導入によるバーコードを用いたシングルセル解析による細胞系譜推定の有用性が示されている(McKenna *et al.*, 2016、Kalhor *et al.*, 2018 等)。したがって、細胞系譜推定はこのようなゲノム DNA や DNA メチル化の情報を用いて行い、推定された樹形に基づいて、ヒストン修飾の状態を推定する等、様々な情報を統合することで、有用な推定が可能になると思われた。

また近年ではシングルセルの遺伝子発現情報から、細胞の発生過程を偽時間に沿って再構成する trajectory 解析がさかんに報告されるようになってきた(Saelens *et al.* 2019 等)。しかしながら

発生途中過程の細胞を得ることが出来ない場合は、依然として分化途中の細胞の状態を推定する、本研究のような解析が必要だと思われる。エピゲノム状態はゲノム上の各遺伝子の発現状態を反映していることから、相互の情報を考慮しながら細胞分化過程の推定を行うことで、個体発生過程の理解が進むことが期待される。

引用文献

- Avgustinova A, Benitah SA (2016) Epigenetic control of adult stem cell function. *Nature reviews Molecular cell biology* 17:643–658. doi: 10.1038/nrm.2016.76
- Fernández JM, la Torre de V, Richardson D, et al (2016) The BLUEPRINT Data Analysis Portal. *Cell Systems* 3:491–495.e5. doi: 10.1016/j.cels.2016.10.021
- Kalhor R, Kalhor K, Mejia L, et al (2018) Developmental barcoding of whole mouse via homing CRISPR. *Science* 361:893–. doi: 10.1126/science.aat9804
- Koyanagi KO (2015) Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information: hematopoiesis as a model case. *Genome Biol Evol* 7:699–705. doi: 10.1093/gbe/evv024
- Koyanagi KO (2019) Inferring changes in histone modification during cell differentiation by T ancestral state estimation based on phylogenetic trees of cell types: Human hematopoiesis as a model case. *Gene: X* 3:100021 doi:10.1016/j.gene.2019.100021
- Marioni JC, Arendt D (2017) How Single-Cell Genomics Is Changing Evolutionary and Developmental Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33:537–553. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100616-060818
- McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA, et al (2016) Whole-organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science (New York, NY)* 353:aaf7907. doi: 10.1126/science.aaf7907
- Saelens W, Cannoodt R, Todorov H, Saeys Y (2019) A comparison of single-cell trajectory inference methods. *Nature Publishing Group* 1–15. doi: 10.1038/s41587-019-0071-9
- Stamatakis A (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)* 30:1312–1313. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033
- Swofford DL. 2003. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) version 4. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Yu G, Wang L-G, He Q-Y (2015) ChIPseeker: an R/Bioconductor package for ChIP peak annotation, comparison and visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)* 31:2382–2383. doi: 10.1093/bioinformatics/btv145
- Zhou VW, Goren A, Bernstein BE (2011) Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nature Reviews Genetics* 12:7–18. doi: 10.1038/nrg2905

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanao O. Koyanagi	4. 巻 3
2. 論文標題 Inferring changes in histone modification during cell differentiation by ancestral state estimation based on phylogenetic trees of cell types: Human hematopoiesis as a model case	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene: X	6. 最初と最後の頁 100021
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2019.10002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kanao O. Koyanagi
2. 発表標題 Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information
3. 学会等名 Society for Molecular Biology and Evolution（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小柳香奈子
2. 発表標題 エピゲノム情報の系統解析による細胞分化過程の推定 -哺乳類の血球系細胞分化をモデルとして
3. 学会等名 分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kanao O. Koyanagi
2. 発表標題 Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information
3. 学会等名 CDB Symposium 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----