

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07246

研究課題名(和文) ヒト細胞におけるX染色体制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating X chromosome regulation in human cells

研究代表者

友田 紀一郎 (Tomoda, Kiichiro)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：50362843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：二本のX染色体が転写的に活性化している(XaXa)女性ドナー由来ヒト人工多能性幹細胞(ヒトiPS細胞)を誘導する条件を再検証することを目的に、マウス多能性幹細胞を用いて解析を行った。その結果、我々の開発した培養条件下で、受精後に見られる遺伝子発現変化を伴い、着床する能力を持つ胚盤胞に類似した構造体が形成された。この構造体をinduced blastocyst-like cyst(iBLC)と名付けて論文発表を行った。この実験系は、ヒトiPS細胞培養条件の改良のみならず、受精後の初期発生の解明のための有用なモデルになると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス多能性幹細胞を用いてヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の培養条件最適化を行った。我々の開発した培養条件下で、受精後に見られる遺伝子発現変化を伴い、着床する能力を持つ胚盤胞に類似した構造(誘導性胚盤胞様囊胞、iBLC)が形成された。この実験系は、ヒトiPS細胞培養条件の改良のみならず、受精後の初期発生の解明のための有用なモデルになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to establish female human induced pluripotent stem (iPS) cell lines with two X chromosomes active (XaXa) to elucidate X chromosome regulation in humans cells. To generate XaXa hiPS lines reproducibly, we optimized a culture condition using mouse pluripotent stem cells. We found that self-organizing 3D floating cysts emerged under one condition tested. The cysts exhibited a blastocoel-like cavity. Their outer cells expressed trophectoderm (TE) lineage markers, and inner cells expressed pluripotency markers. Thus, they resemble natural blastocysts. We named the cysts induced blastocyst-like cysts (iBLCs). When transplanted to pseudopregnant mouse uteruses, they implanted in the uteruses. Then, they induced decidualization and exhibited growth and development before resorption. These results demonstrate that they are implantation-competent. iBLCs may contribute to the understanding of molecular mechanisms that underpin totipotency, embryogenesis, and implantation.

研究分野：多能性幹細胞

キーワード：X染色体不活性化 X染色体再活性化 ヒトiPS細胞 マウス多能性幹細胞 着床 胚盤胞 初期発生 胚性ゲノム活性化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々哺乳動物は性染色体として、メス細胞は2本のX染色体(XX)、オス細胞は一本のX染色体と1本のY染色体(XY)を持つ。よって、理論的には、メス(XX)細胞ではX染色体上の遺伝子(X-linked 遺伝子)は、オス(XY)細胞に比べて2倍の発現量となる。Y染色体上に存在する遺伝子は、そのほぼ全てが、オスがオスである為の性決定にとって重要な機能を担うタンパク質等をコードする。一方で、多くのX-linked 遺伝子は、雌雄に関係なく細胞や個体を維持する上で重要な機能を持つタンパク質をコードしている。よってXX細胞で、1000個以上のX-linked 遺伝子群の発現量が2倍増加すると、細胞機能の異常を引き起こし、XX細胞の細胞死や異常増殖等を誘導する。この雌雄間におけるX-linked 遺伝子発現量の違いを補償し、XX細胞の異常を防ぐのがX染色体不活性化(X chromosome inactivation; 以下 XCI)として知られる機構である(図1)。この機構は、XX細胞だけで機能しているのではなく、XY細胞ではXが一本しかないことを認識し、XCIが起こらないようにする機構としても考える必要がある。XCI機構の研究は、今から50年以上も前、1959年に大野乾がX染色体とバー小体と呼ばれるヘテロクロマチン構造の関係を報告して以来(Ohno et al., 1959)、多くの研究者を引きつけてきた。そして、XCIで中心的役割を担う long non-coding RNA 群の発見、エピジェネティックによる転写制御、核内における染色体テリトリーの形成等、分子生物学や細胞生物学にとって多くのパラダイムを生み出してきた(Payer et al., 2011)。

X染色体制御機構の解析はモデル動物であるマウスの細胞、マウス受精卵や、そこから樹立した未分化な培養細胞である多能性幹細胞の1種であるマウスES細胞

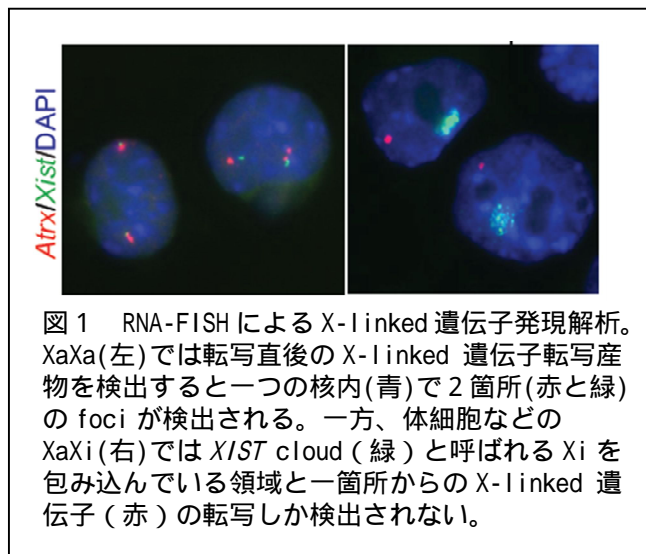


図1 RNA-FISHによるX-linked 遺伝子発現解析。XaXa(左)では転写直後のX-linked 遺伝子転写産物を検出すると一つの核内(青)で2箇所(赤と緑)のfociが検出される。一方、体細胞などのXaXi(右)ではXIST cloud(緑)と呼ばれるXiを包み込んでいる領域と一箇所からのX-linked 遺伝子(赤)の転写しか検出されない。

などのX染色体転写状態の変化を *in vitro* で反映し、生化学的な解析にも使用できる有用な研究材料である。

ところが最近になって、ヒトや他の哺乳動物の受精卵を使った研究が進み、XCIのタイミングおよび制御機構が哺乳動物間で異なることが明らかとなってきた(Okamoto et al., 2011; Petropoulos et al., 2016)。これらの報告は、初期発生段階における性染色体の転写活性化状態を制御する基本的な機構が、哺乳動物間における進化の対象として変化したことを示唆する。また、これまで、ヒトでのX染色体制御機構を研究することが難しかったことも改めて印象付けている。つまり、ヒトの受精卵を使う研究は、倫理的困難さや、分子レベルでの制御機構解明に技術的困難がある。そこで、マウスと同様に、ヒトES細胞や、ES細胞と同様なエピジェネティック状態や遺伝子発現パターンを示すヒトiPS細胞(induced pluripotent stem cells)を用いた研究が、ヒトのX染色体制御機構を進める為に、有効であると考えられる。しかし、ほとんど全てのXXヒトES細胞および、ヒトiPS細胞は、すでにXCIが起こった状態にあり(XaXi)(Tomoda et al., 2012)、これらの細胞をX染色体制御機構の解明、特にXCI機構解明に用いることは不可能であった。

2. 研究の目的

ヒトにおける雌雄遺伝子量補償機構を解明し、性染色体制御という基本的原理における多様性を分子レベルで明らかにする為には、XaXaヒト細胞を効率よく作製し、安定に維持する必要がある。本研究では、まず、XaXaヒトiPS細胞を作製する技術を普遍的なものとし、今後の解析の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は研究申請段階で、ヒト iPS 細胞やマウス多能性幹細胞で得られた結果 (Kime et al., 2016; Tomoda et al., 2012) を元に、XY ヒト iPS 細胞と比べて、X 染色体全領域で X-linked 遺伝子発現量が高い XX ヒト iPS 細胞を誘導する培養条件を見出していた。このことは、誘導した XX ヒト iPS 細胞が XaXa である可能性を強く示唆した。そこでまず、この XX ヒト iPS 細胞が XaXa であることを検討した。検討方法としては、(1) X 関連遺伝子の RNA-FISH による転写直後の転写産物検出、(2) RNA-seq による発現量および SNP 発現解析、そして (3) ATAC-seq による X 染色体クロマチン構造の解析を用いた。

4. 研究成果

(1) いくつかの X-linked 遺伝子を用いて RNA-FISH を行ったところ、XaXa であると考えられたヒト iPS 細胞においても、XaXi と同様に、核内の 1 箇所からの転写産物しか検出されなかった (図 1 参照)。このことから、解析したヒト iPS 細胞が XaXa でない可能性が示唆された。

(2) RNA-seq により細胞内で発現している遺伝子発現量の総量を解析したところ、XaXa と考えられた細胞では、発現している X 遺伝子の総量と、発現している常染色体遺伝子の総量の比 (X/A) が 1 に近かった。一方、XaXi および XY 細胞では 0.5 付近であった。このことは、XaXa と思われるヒト iPS 細胞では、予想どおり、2 本の X 染色体における転写が活性化していることを示唆した。

(3) 染色体はクロマチン構造を変化させることで、転写因子等との結合状態を調節する。例えば、クロマチンがオープンの状態であると、染色体と転写因子等の結合が可能となり、転写が活性化することが考えられる。ATAC-seq を用いると、この染色体の構造状態を網羅的に解析できる。ATAC-seq を行ったところ、XaXa と考えられるヒト iPS 細胞では、XaXi のヒト iPS 細胞と比較して、X 染色体がよりオープンなクロマチン状態であることが分かった。通常、Xi はヘテロクロマチン (クロマチンが著しく閉じている状態) を形成している。このことから、XaXa と思われるヒト iPS 細胞では、予想どおり、2 本の X 染色体における転写が活性化していることが示唆された。

(4) X 染色体の転写活性化状態は、多能性幹細胞の分化状態と密接な関係にある。真に XaXa 細胞であるなら、分化誘導とともに活性化していた一本の X 染色体が転写的に不活性化 (X 不活性化) される。そこで X 不活性化が実際に起こることを確認する為に、XaXa と考えられるヒト iPS 細胞を通常のヒト iPS 細胞培養条件に戻し、遺伝子発現量を解析した。RNA-seq の結果、X 遺伝子の発現量が減少することが確認でき、XaXa から XaXi への変化 (X 不活性化) が示唆された。そこで、X 不活性化のマーカーである *XIST* の発現解析を行った。その結果、RNA-FISH や発現量解析からは *XIST* の誘導を検出することはできなかった。以上より、XaXa であると思われるヒト iPS 細胞が、真の XaXa 細胞でない可能性が強まった。

(5) 真の XaXa ヒト iPS 細胞を誘導する培養条件を再検証することを目的に、マウス多能性幹細胞を用いて解析を行った。その結果、我々が新たに開発した培養条件下で、2 細胞期で見られる遺伝子発現が活性化した。初期発生の過程で受精直後の卵は、1 回の卵割を経て 2 細胞期に入る。マウスにおける 2 細胞期の遺伝子発現は、受精直後の胚性ゲノム活性化 (zygotic genome activation, ZGA) として位置づけられ、細胞の全能性と関連がある。全能性は、多能性が体を形成する全ての細胞に分化する能力を表すのに対して、それに加えて胎盤などの胚体外組織をも形成する能力を示す。2 細胞期で見られる遺伝子が活性化している細胞群をさらに培養したところ、胚盤胞 (blastocyst) のような形態と遺伝子発現をもつ構造が、自発的に形成された。この構造体を、擬妊娠マウスの子宮に移植したところ、低い頻度ながらも、着床した。この構造体を induced blastocyst-like cyst (iBLC、誘導性胚盤胞様嚢胞) と名付け、論文発表を行った (Kime et al., 2019)。この実験系は、ヒト iPS 細胞培養条件の改良のみならず、受精後の初期発生の解明等のための有用なモデルになると考えられる。

参考文献

Kime, C., Kiyonari, H., Ohtsuka, S., Kohbayashi, E., Asahi, M., Yamanaka, S., Takahashi, M., and Tomoda, K. (2019). Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 13, 485-498.

Kime, C., Sakaki-Yumoto, M., Goodrich, L., Hayashi, Y., Sami, S., Derynck, R., Asahi, M., Panning, B., Yamanaka, S., and Tomoda, K. (2016). Autotaxin-mediated lipid signaling intersects with LIF and BMP signaling to promote the naive pluripotency transcription

factor program. Proc Natl Acad Sci U S A.

Ohno, S., Kaplan, W.D., and Kinosita, R. (1959). Formation of the sex chromatin by a single X-chromosome in liver cells of *Rattus norvegicus*. *Exp Cell Res* *18*, 415-418.

Okamoto, I., Patrat, C., Thepot, D., Peynot, N., Fauque, P., Daniel, N., Diabangouaya, P., Wolf, J.P., Renard, J.P., Duranthon, V., *et al.* (2011). Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. *Nature* *472*, 370-374.

Payer, B., Lee, J.T., and Namekawa, S.H. (2011). X-inactivation and X-reactivation: epigenetic hallmarks of mammalian reproduction and pluripotent stem cells. *Hum Genet* *130*, 265-280.

Petropoulos, S., Edsgard, D., Reinius, B., Deng, Q., Panula, S.P., Codeluppi, S., Plaza Reyes, A., Linnarsson, S., Sandberg, R., and Lanner, F. (2016). Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* *165*, 1012-1026.

Tomoda, K., Takahashi, K., Leung, K., Okada, A., Narita, M., Yamada, N.A., Eilertson, K.E., Tsang, P., Baba, S., White, M.P., *et al.* (2012). Derivation conditions impact X-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *11*, 91-99.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 友田紀一郎	4. 巻 90
2. 論文標題 多能性幹細胞：Naive型とPrimed型多能性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 187-191
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kime Cody, Kiyonari Hiroshi, Ohtsuka Satoshi, Kohbayashi Eiko, Asahi Michio, Yamanaka Shinya, Takahashi Masayo, Tomoda Kiichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 485 ~ 498
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2019.07.011	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kime, C. Kiyonari, H. Ohtsuka, S. Kohbayashi, E. Asahi, M. Yamanaka, S. Takahashi, M. Tomoda, K.
2. 発表標題 Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 ISSCR 2019 annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kime, C. Kiyonari, H. Ohtsuka, S. Kohbayashi, E. Asahi, M. Yamanaka, S. Takahashi, M. Tomoda, K.
2. 発表標題 Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kime, C. Kiyonari, H. Ohtsuka, S. Kohbayashi, E. Asahi, M. Yamanaka, S. Takahashi, M. Tomoda, K.
2. 発表標題 Induced 2C Expression and Implantation-Competent Blastocyst-like Cysts from Primed Pluripotent Stem Cells
3. 学会等名 The CiRA 2019 International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiichiro Tomoda
2. 発表標題 Next Breakthroughs in Pluripotent Stem Cell Applications
3. 学会等名 31st International Microprocesses and Nanotechnology Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kiichiro Tomoda, Michio Asahi
2. 発表標題 Culture conditions affect epigenetic features of pluripotent stem cells.
3. 学会等名 The 90th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoda Kiichiro, Hirofumi Morihara, Marina Watanabe, Asahi Michio,
2. 発表標題 Molecular Elucidation of Fabry Disease Using Human iPS Cells Modified with CRISPR Interference.
3. 学会等名 Consortium of Biological Sciences 2017
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
連携研究者	朝日 通雄 (Asahi Michio) (10397614)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	