

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790730

研究課題名（和文） 心筋細胞分化の段階的 DNA メチル化プロファイリングと幹細胞分化能評価ツールの開発

研究課題名（英文） Epigenomic analysis of DNA methylation pattern in cardiomyocyte development and evaluation of stem cell differentiation methods.

研究代表者

小田 真由美（ODA MAYUMI）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80567511

研究成果の概要（和文）：エピゲノム情報はその分化可能性を評価する指標となることが考えられるが、どのような領域のエピジェネティック状態が細胞の性質に影響しうかは明らかでない。本研究では、細胞種に特徴的な未知のエピゲノム変化を探索し、幹細胞の分化可能性評価のためのエピゲノム情報基盤を整備することが目的である。本研究計画内において、申請者らは心筋細胞特異的な gene body 領域の低メチル化状態を見出した。広範囲に渡る低メチル化状態は、転写およびエピジェネティック因子の蓄積を伴っており、細胞の特性に密接に関わるエピゲノムを形成する一因となる。本研究計画では、エピゲノム情報による幹細胞評価系の整備に重要な細胞特異的エピジェネティック状態を見出した。

研究成果の概要（英文）：Epigenome is thought to represent the developmental potential of given cells. However, it has been unknown where is the genomic regions that define the ability of cells, like stemness or spectrum of cell-type specific potentials. In this study, we sought unknown alteration of epigenomic status between the undifferentiated and differentiated cells to know how the epigenetic status represents the cellular features. We found the gene body DNA hypomethylation in cardiomyocyte-specific genes. Since this hypomethylation was developmentally regulated and accompanied the genome-scale redistribution of transcriptional and epigenetic factors in larger area, like with the extensive enrichment of Pol II and p300 in a more than 50-kb region, these events can intimately associate with cell type-specific events. In this study, we found the regional epigenetic alterations as an impact on cell type-specificities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：DNA メチル化、エピゲノム、細胞特異的遺伝子発現、心筋細胞、転写調節

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究においては、心臓疾患に対する再生医療への期待がある。iPS 細胞を始めとする幹細胞をソースとした再生医療では、培養幹細胞の細胞株間における品質の差が問題となっている。iPS 細胞のもつ分化能の差には、多能性を持つ ES 細胞とのエピジェネティックな差が関与していると考えられている。樹立された iPS 細胞での特定の細胞系列への分化傾向を作るエピジェネティックなバックグラウンドの一つとして、iPS 細胞を樹立する由来細胞が持つエピジェネティック・バックグラウンドがあり、特定の細胞への“分化しやすさ”を誘導していると考えられるが、それに関連するエピゲノムの違いがゲノム領域のどこでどのように起きているかはわかっていない。したがって、各領域のエピジェネティック状態の成立のメカニズムを個別に調べていくことでエピゲノムを分類することができると考えられ、その情報によって iPS 細胞などの幹細胞をはじめとする各種細胞の発生学的なポテンシャルを評価することが出来ると考えられる。そのためには、DNA メチル化解析をプロモーター領域に限定せず広く行い、株ごとの“分化しやすさ”と DNA メチル化状態の違いを関連付けることが必要である。

2. 研究の目的

細胞の発生学的ポテンシャル評価のためのエピゲノム理解のため、本研究計画では、分化・成熟した細胞種を手本とし、そのエピゲノムを幹細胞および各発生段階で比較することにより細胞特異的なエピゲノムのなりたちを理解する。iPS 細胞など幹細胞の評価のための DNA メチル化エピゲノムの基盤を整えることが本計画の目的である。

3. 研究の方法

本研究の要となるエピゲノム解析には、申請者らが開発した、DNA メチル感受性制限酵素 HpaII を用いたゲノムワイド DNA メチル化解析法である HELP 法を用いた。この方法は、既存の主にプロモーターを標的とした解析法とは異なり、偏りなくゲノム全体を解析することが可能である。また、HpaII を用いて作ったライブラリーの内部対照として、MspI ライブラリーを用いるため、より定量的な結果が得られる。このことから、サンプル間およびゲノムの領域間の比較が可能である。

HELP 法による DNA メチル化解析では、メチル化 DNA のコピー数比で観察できるため、解析対象細胞の純度が重要である。そこで、分化・成熟細胞として、心筋細胞を胎仔期・新生仔期および成体期から単離し、解析に用

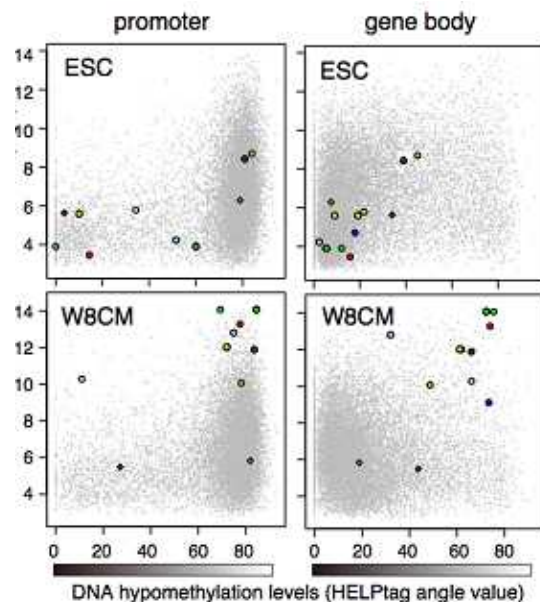
いた。心筋細胞のみで形成される胎仔期の組織に対し、心臓線維芽細胞の混入がみられる新生仔期組織は、Percoll を用いた濃度勾配分離法を用い、成体期組織は、Langendorff 灌流法を用いたコラゲナーゼ処理による細胞分離を行ない、心筋細胞の純度の高い細胞集団を用いた。コントロールとして、肝臓組織を用いた。

DNA メチル化エピゲノム情報を遺伝子ごとのプロモーターおよび gene body 領域について計算し、中央値を取って比較した。また、比較のため、ENCODE database より各種組織および細胞のエピゲノム情報を取得し、同様に計算して比較を行った。

4. 研究成果

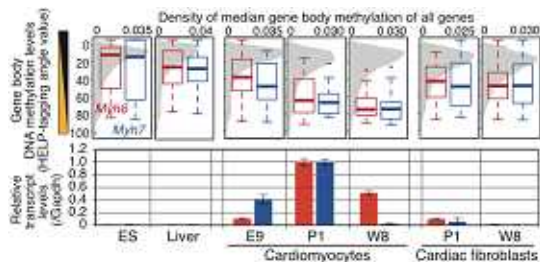
本研究計画では、様々な分化段階から精製された心筋細胞を用いたエピゲノム解析により、ゲノム全体において量的にメチル化状態の変化する領域を発見した。これは、心筋特異的ミオシン重鎖遺伝子を始めとする複数の細胞特異的遺伝子の gene body 領域（プロモーター以外のエクソン-イントロンを含むコード領域）の低メチル化状態であった。また、心筋細胞が一旦分化した後、成熟過程で徐々に脱メチル化されることが明らかになった。また、このような比較的稀な DNA メチル化変化は Pol II および p300 などの DNA 結合因子を蓄積していた。このことは、DNA メチル化の分布が核内における DNA 結合因子の分配に強い関係をもつことを示していた。

(1) gene body 領域の低メチル化が比較的少数の遺伝子に起こっており、その中に含まれる一部の心筋細胞特異的遺伝子に細胞種特異的に起こっている。



ES 細胞と心筋細胞(W8CM)における DNA 非メチル化度(X 軸)と発現(Y 軸)の比較。いずれの細胞種でも低メチル化プロモーターが大多数であるのに対し、低メチル化 gene body は minority である。そんななかにおいて、複数の心筋細胞特異的遺伝子(彩色された円) は、高発現および gene body 低メチル化状態にあり、選択的に低 DNA メチル化状態にあると考えられる。

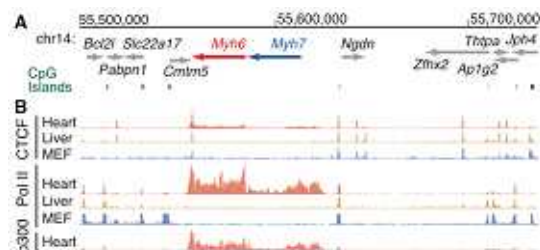
(2)心筋細胞特異的な gene body 領域の低メチル化は、成熟過程に伴って進行するゆるやかな脱メチル化によって起こっている。



ミオシン重鎖タンパク遺伝子座位での gene body 領域での脱メチル化(ボックスプロット)と遺伝子発現(棒グラフ)。2 つの遺伝子(赤 : 成体性アイソフォーム、青 : 胎仔性アイソフォーム)の gene body 領域全体が、心筋細胞の成熟にともなって脱メチル化している。

2 つの遺伝子の発現は発生にともなって変化しており、gene body の DNA メチル化は発現と直接の影響を受けてはいない。しかし、長期的な遺伝子座位の転写活性を考えると、このミオシン重鎖タンパク遺伝子領域は、心筋細胞特異的なエピジェネティック状態を継続的に維持していると考えられる。

(3)低メチル化状態の gene body 領域には転写を行う RNA ポリメラーゼ (Pol II) とヒストンアセチル化酵素 p300 が細胞特異的に蓄積されていた。



この DNA 結合因子の蓄積により、これらの低メチル化 gene body を持つ遺伝子は核内で上位にランク付けされたことから、一部の gene body 領域の低メチル化は、転写に関する DNA 結合因子のつよい蓄積と強い相関を持

っていることがわかった。更に、この遺伝子領域では Pol II と p300 の比が変化しており、量的な変化の他に質的な変化も起こっていることが考えられる。DNA 低メチル化が、核内における DNA 結合因子の分布様式に密接な関わりを持っていることが示唆される。

興味深いことに、心筋細胞特異的遺伝子以外の低メチル化遺伝子においても、Pol II および p300 の弱い蓄積が見られ、これらは細胞特異的ではなかった。このことは、低メチル化 gene body 領域がこれら DNA 結合因子の非特異的な結合を受けやすいことを示しており、これは DNA 結合因子を不必要に蓄積する可能性を示している。このような傾向から、低メチル化状態が DNA 結合因子の蓄積しやすさに関与しており、gene body 領域の DNA メチル化が各内の DNA 結合因子の分布に干渉していることを示している。

gene body 領域は転写伸長の場であることから、転写伸長に伴って DNA 脱メチル化している可能性があるが、gene body における DNA メチル化の機能はわかっていないため、この領域はそれを明らかにするための重要な領域となりうる。重要な点は、このような非プロモーター領域のエピジェネティック状態の違いが、どのように他の細胞種での遺伝子発現に干渉するかということである。本研究計画では、分化細胞種から樹立した iPS 細胞の評価のため、DNA メチル化エピゲノムの違いが幹細胞にどう影響し得るか調べるための対象領域として gene body 領域を考慮に入れることで、DNA メチル化の DNA 結合因子の正しい分布への貢献の可能性を示す。

このような低メチル化状態は、細胞種特異的に高発現する遺伝子のなかでは、比較的長くエクソンが多い遺伝子に観察されたことから、長く複雑な転写時・転写後プロセッシングを必要とする遺伝子の長期的で安定な転写に関わっていることが考えられる。一方で、今後はこのような広範囲にわたる低 DNA メチル化領域が細胞の成熟度および分化可能性に与える影響が、この領域をモデルとして解明されていくことが期待される。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Suzuki M, Oda M, Ramos MP, Pascual M, Lau K, Stasiek E, Agyiri F, Thompson RF, Glass JL, Jing Q, Sandstrom R, Fazzari MJ, Hansen RS, Stamatoyannopoulos JA, McLellan AS, Grelly JM. Late-replicating heterochromatin is characterized by decreased cytosine methylation in the

human genome. Genome Research.(2011)21, 1833-1840. [査読あり]

2. Kodo K, Nishizawa T, Furutani M, Arai S, Ishihara K, Oda M, Makino S, Fukuda K, Takahashi T, Matsuoka R, Nakanishi T, Yamagishi H. Genetic analysis of essential cardiac transcription factors in 256 patients with non-syndromic congenital heart defects. Circulation Journal.(2011) 76, 1703-1711 [査読あり]

[学会発表](計 5 件)

1. Mayumi Oda, Shinji Makino, Hirokazu Enomoto, Kojiro Yae, Ruri Kaneda, Shinsuke Yuasa and Keiichi Fukuda. "Cell Type-specific Gene Body DNA Hypomethylation in Cardiac Genes Contributes to Transcriptional Efficiency in Cardiomyocyte Maturation.", 日本エビジェネティクス研究会年会, 2012 年 5 月 14 日-15 日, 一橋学術総合センター(東京).

2. Mayumi Oda, Shinji Makino, Hirokazu Enomoto, Ruri Kaneda, Shinsuke Yuasa and Keiichi Fukuda. "Escape of Gene Body DNA Methylation in Cardiac Genes is Cooperative with the Cell Type-specific Expression Patterns." Weinstein meeting 2012, 2012 年 5 月 2 日-4 日, シカゴ(アメリカ).

3. Mayumi Oda, Shinji Makino, Hirokazu Enomoto, Kojiro Yae, Ruri Kaneda, Shinsuke Yuasa, and Keiichi Fukuda. "Cell Type-specific Gene Body DNA Hypomethylation in Cardiac Genes Contributes to Transcriptional Efficiency in Cardiomyocyte Maturation.", 2011 年 3 月 16 日-18 日日本循環器学会年会, 福岡国際会議場(福岡).

4. Mayumi Oda, Shinji Makino, Shinsuke Yuasa, Sung Han Yoon, Yuta Higashikuse, Kojiro Yae, Ruri Kaneda, Mitsushige Murata, Motoaki Sano, John M. Grealia and Keiichi Fukuda. "DNA Methylation Changes in The b-MHC Locus Mediate Gene Regulation by Antisense RNA in Postnatal Cardiomyocyte Development." American Heart Association, Scientific Sessions. 2011 年 11 月 12 日-16 日, オーランド(アメリカ).

5. Mayumi Oda, Shinji Makino, Shinsuke Yuasa, Ruri Kaneda, Masako Suzuki, John M. Grealia and Keiichi Fukuda. "Gene Body DNA

Methylation Level in Cardiac Myosin Heavy Chain (MHC) Gene Locus is Cell Type- and Locus- Specifically Suppressed and Contributes to the Transcriptional Efficacy at Postnatal Development of Mouse Cardiomyocytes." Weinstein meeting 2011, 2011 年 5 月 5 日-7 日, シンシナティ(アメリカ).

[その他]

Research map

<http://researchmap.jp/odamame/>

坂口光洋記念講座ホームページ:小田真由美

http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/sakaguchi/scholar/m_oda/

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小田 真由美 (ODA MAYUMI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80567511