

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501277

研究課題名(和文)細胞老化・脱分化を制御する Ink4 / Arf 遺伝子座の調節機構の解析とその応用

研究課題名(英文)molecular mechanisms of Ink4a/Arf locus that confers cell aging and differentiation

研究代表者

中出 浩司(nakade, koji)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・協力研究員

研究者番号：20392053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子JDP2によるInk4a locusのエピジェネティックな発現制御機構の解析を行い、JDP2がヒストンメチル化因子であるPRC1,PRC2の活性阻害の他に脱メチル化酵素Jmjd3と協調的に働きヒストンの非メチル化を促進するメカニズムを提唱した。またJDP2の分化、脱分化における影響を検討するためにアデノウイルスを用いた遺伝子導入による心筋分化誘導系とiPS誘導系を確立し、それぞれJDP2の抑制下で分化、脱分化効率が上昇することを示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed molecular mechanisms of JDP2 in the epigenetic regulation of Ink4a locus and found that JDP2 helps maintaining non-methylation status of histones by concerting with histone demethylase, Jmjd3, not only by inhibiting the activity of methyltransferases, PRC1 and PRC2. In addition, in order to analyze the effect of JDP2 on differentiation and de-differentiation, we established, as a model, adenoviral gene introduction system that successfully induced cardiomyocyte and iPS from mouse embryo or fibroblast. Using these system, we obtained the result that the inducibility of differentiation and de-differentiation was improved in the absence of JDP2.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍生物学

キーワード：細胞分化 iPS 心筋細胞 アデノウイルスベクター エピジェネティクス ヒストン クロマチンメチル化

1 研究開始当初の背景

(1) 転写制御因子 JDP2(Jun dimerization protein 2)はヒストンに結合してのヒストンのアセチル化やメチル化を阻害することによりエピジェネティックな制御機構で遺伝子発現の調節を行っている。特に JDP2 は senescence と呼ばれる細胞老化に伴う不可逆的な増殖停止現象と関連があり、則ち酸化ストレス等の環境から受ける刺激に応答して JDP2 の発現量が増え p16Ink4a/Arf locus 上のヒストンに結合し、PRC1,PRC2(Polycomb Repressive Complex)によるヒストンメチル化を阻害することにより細胞増殖停止因子 p16Ink4a の発現を促し、細胞周期を停止させる。これらの知見より JDP2 は p16Ink4a の上流にある制御因子の1つであり、細胞工学的応用のためのターゲット因子の候補として注目される。

(2) 最近の細胞工学分野での動向では遺伝子導入によるクロマチン構造変化を含む分化誘導及び脱分化誘導で体細胞を目的細胞へと変換させる技法が注目されている。これらの技法はまだ変換効率が良くなく、その理由として分化・脱分化を阻む細胞周期停止因子やクロマチン安定化因子の存在が考えられる。これらの因子のダウンレギュレーションにより障壁を取り除けば遺伝子導入による目的細胞への変換が容易になり、実際 p16Ink4a/Arf locus を欠損させたマウスより作製した MEF(Mouse Embryo Fibroblast)を用いると iPS(induced pluripotent stem cells)の作製効率が高まるとの報告もある。

2. 研究の目的

(1) JDP2 による p16Ink4a/Arf locus 上のヒストン脱メチル化促進の分子機構の解析。p16Ink4a/Arf locus 上のヒストン H3 リジン 27 残基のメチル化は主にメチル化酵素として分類される Polycomb Repressive complexes (PRC1 及び PRC2)と脱メチル化酵素である Jmjd3 のバランスによって制御されている。これらの因子と相互作用を解析し JDP2 の p16Ink4a/Arf locus 制御機構への関与を明らかにしていく。

(2) JDP2 を介した Ink4a/Arf locus 制御と iPS 作成効率向上化への応用。p16Ink4a/Arf のノックアウトにより Sox2, Klf4, Oct3/4, cMyc の4因子導入による iPS の作成効率が高まることが報告されている。JDP2 は p16Ink4a/Arf の上流にある正の制御因子であり、JDP2 の発現抑制により間接的に p16Ink4a/Arf の発現をコントロールできると考えられる。これにより iPS 作成効率向上を目指し、JDP2 の医用工学的な応用のターゲット遺伝子としての可能性を検討していく。

(3) JDP2 制御のその他の分化系への応用。遺伝子導入による他細胞への分化誘導は直接心筋細胞誘導系 (iCM, induced cardiomyocyte) や、直接肝細胞誘導系 (iHep, induced hepatocyte-like cells)が知られているが、ここではマウス繊維芽細胞に Gata4, Tbx5, Mef2c 等の遺伝子を導入して心筋を誘導する直接心筋細胞誘導系をモデルとして用いて JDP2 の細胞リプログラミングへの影響を調べる。

3. 実験方法

(1) JDP2 によるヒストン脱メチル化促進

の分子機構の解析。

・ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd3 を shRNA でノックダウンし、JDP2 による増殖阻害への影響を見る。Jmjd3 と JDP2 の p16Ink4a/Arf locus への結合をクロマチン免疫沈降法により経時的に追跡する。

(2)JDP2 を介した Ink4a/Arf locus 制御と iPS 作成効率向上化への応用。

JDP2 ノックアウトマウス由来胎児繊維芽細胞にアデノウイルスベクターを用いて Sox2, Klf4, Oct3/4, cMyc を導入し、野性型をホストに用いた場合との iPS 形成の効率を比較検討する。

JDP2 欠損マウスより作製した胎児繊維芽細胞 (JDP2^{-/-}-MEF) は野性型のものと比較して増殖能が高く、iPS 作成の障害となる p16Ink4a 及び Arf の発現量が低い。我々はまず初めに iPS 作成の為の材料としてこの JDP2^{-/-}-MEF を用い、アデノウイルスベクターにより Sox2, Klf4, Oct3/4 及び cMyc を導入していく。アデノウイルスベクターは我々の研究室で開発し、感染条件検討中のものを使用する。一般に iPS 細胞作成にはレトロウイルスやレンチウイルスなどを用いる場合が多いが、これらのウイルスは宿主細胞のゲノムにインテグレーションするためウイルス性遺伝子が細胞内に残ることとインテグレーションのサイトが半ばランダムな為に癌化のリスクが伴う。その点アデノウイルスは非インテグレーション型、且つ非増殖型の為、感染後細胞内で増えることもなく、細胞分裂と共にウイルス濃度が薄まり、やがてウイルスフリーの iPS がえられることが期待される。iPS の評価はアル

カリホスファターゼ染色、Nanog, SSEA1 等 iPS 細胞特異的なタンパク質に対する免疫染色により行われる。

(3) 直接心筋細胞誘導系の確立と誘導系に対する JDP2 制御による影響

心筋誘導関連遺伝子、Gata4, Mef2c, Tbx5 及び補助因子 Myocd, Mesp1, Nkx2.5, Pitx2c, Hand2 の発現ウイルスを作成し、このアデノウイルスベクターを用いて MEF に遺伝子導入することによって心筋誘導系を確立する。心筋細胞樹立の指標としてリアルタイム RT-PCR 法によるマーカー遺伝子 cTnT (cardiac troponin T) と Act2 (alpha Actinin variant 2) の定量的発現測定、同マーカーに対する抗体を用いた細胞標識後フローサイトメトリーによる検出や免疫染色などの技法を用いる。

4. 研究実績の概要

(1) JDP2 によるヒストン脱メチル化促進の分子機構の解析。

MEF に JDP2 を強制発現させると p16Ink4a の発現量があがり細胞増殖が抑制されるが Jumonji ヒストン脱メチル化酵素 (Jmjd3) の発現を Jmjd3 に対する shRNA を用いて抑制すると JDP2 強制発現による細胞増殖抑制は起こらなくなる。Jmjd3 に対する抗体を用いたクロマチン免疫法で Jmjd3 は JDP2 存在下で p16Ink4a locus に結合していた。これらのことから JDP2 は PRC1, PRC2 によるヒストンメチル化を抑制するだけでなくヒストン脱メチル化酵素と協調的に働き p16Ink4a locus 上のヒストンの非メチル化を促していることが示唆された。

(2) アデノウイルスを用いた iPS 誘導系の確

立。

iPS 誘導因子の Sox2, Klf4, Oct3/4, cMyc 4 因子を内在性プロテナーゼで切断される 2A ペプチド配列で繋いだものをベクターに組み込み、一つのウイルスから 4 因子が同時に発現されるアデノウイルス発現系を構築した。これを MEF 細胞に感染させると iPS 様のコロニーが複数個現れた。このコロニーはアルカリフォスファターゼ陽性であった。また iPS のマーカーである SSEA1 や nanog に対する抗体で免疫蛍光染色を行ったところ、これらのコロニーを蛍光観察することができた。

(3) アデノウイルスを用いた直接心筋誘導系の確立と条件の最適化。

Gata4, Mef2c, Tbx5 及び補助因子 Myocd, Mesp1, Nkx2.5, Pitx2c, Hand2 の発現ウイルスを作成した。このうち Gata4, Mef2c, Tbx5 に関しては内在性プロテナーゼで切断される 2A ペプチド配列で繋いだものをベクターに組み込み、一つのウイルスから 3 因子が同時に発現される発現系となっている。この Gata4, Mef2c, Tbx5 を同時発現するウイルスを MEF に感染させると心筋マーカーの cTnT と actinin を発現する細胞が出現し、これに加えてさらに Hand2 または Pitx2c を感染させると心筋誘導効率はあがる。Nkx2.5 単独での共感染では誘導効率はあがらないが、Hand2 または Pitx2c 共に感染させると更に心筋誘導効率を増大させた。また Myocd, Mesp1 の共感染では顕著な誘導効率の変化は認められなかった。

(4) iPS 誘導系及び心筋分化誘導系における JDP2 制御による影響

shRNA で JDP2 の発現を抑制した MEF、又は JDP2 欠損マウスより調製した MEF における遺伝子導入による分化、脱分化への影響を調べた。モデル系として分化系ではアデノウイルスにより Gata4, Mef2c 及び Tbx5 を繊維芽細胞に同時発現させて心筋細胞に分化させる直接心筋分化誘導系 (iCM)、脱分化系では同様にアデノウイルスを用いて Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を同時発現させる iPS 系を用いた。その結果 JDP2 の非存在下ではそれぞれ分化、脱分化効率が上昇する結果が認められ、今後 JDP2 に対する shRNA を利用して効率化を図るなど工学的な応用が望まれる。また今回使用したアデノウイルスは広く研究者間で共有されるべく、バイオリソースセンターに研究成果物として寄託された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Hasegawa N, Abei M, Yokoyama KK, Fukuda K, Seo E, Kawashima R, Nakano Y, Yamada T, Nakade K, Hamada H, Obata Y, Hyodo I. Cyclophosphamide enhances antitumor efficacy of oncolytic adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) in immunocompetent Syrian hamsters. *Int J Cancer*. 2013 Sep 15;133(6):1479-88. doi: 10.1002/ijc.28132. Epub 2013 Apr 4. PMID: 23444104 (査読有)

Inagawa K, Miyamoto K, Yamakawa H, Muraoka N, Sadahiro T, Umei T, Wada R, Katsumata Y, Kaneda R, Nakade K, Kurihara

C, Obata Y, Miyake K, Fukuda K, Ieda M. *Circ Res.* 2012 Oct 12;111(9):1147-56. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.271148. Epub 2012 Aug 28. (査読有)

[学会発表] (計5件)

中出浩司、栗原千登勢、村田武英、小幡裕
— “複数因子同時発現アデノウイルスベクターを用いた直接心筋分化誘導系の確立” 第36回日本分子生物学会年会、神戸、12月4日(2013).

栗原千登勢、中出浩司、村田武英、小幡裕
— “組換えアデノウイルスバンクの概要と2A自己開裂ペプチドを介したGFP共発現組換えアデノウイルスの開発” 第36回日本分子生物学会年会、神戸、12月3日(2013).

中出浩司、栗原千登勢、村田武英、小幡裕
— “Induction of cardiomyocytes mediated by Adenoviral vector” 第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日(2012).

栗原千登勢、中出浩司、村田武英、小幡裕
— “組換えアデノウイルスバンクの開発” 第35回日本分子生物学会年会、福岡、12月11日(2012).

中出浩司、栗原千登勢、村田武英、小幡裕
— “アデノウイルスバンクの開発” 第34回日本分子生物学会年会、横浜、12月13日(2011)

6. 研究代表者

(1) 研究代表者

中出 浩司 (NAKADE, Koji)

理化学研究所 バイオリソースセンター 遺伝子材料開発室 協力研究員