

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23659415

研究課題名（和文） 心血管細胞の「分化速度」のエピジェネティック制御機構

研究課題名（英文） Epigenetic regulation of “differentiation timing” of cardiovascular cells

研究代表者 山下 潤 (YAMASHITA JUN)

京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：50335288

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、研究代表者らが見出した新しい分化速度制御機構を明らかにし、細胞分化時間を恣意的に制御可能とすることを目的とする。PKA を活性化することにより、i) 中胚葉細胞及び内皮細胞の出現が従来の約 2 倍早くなること、ii) H3K9me2 のヒストン修飾が特異的に亢進すること。PKA による分化速度亢進に G9a が必須であること。PKA 活性化は APC/C-cdh1 の不活化を介して G9a タンパクの分解を抑制すること。G9a は Oct4 及び Nanog の発現を早期に抑制すること。G9aKO マウスでは早期分化が遅延していること、明らかにし、シグナルとエピゲノム制御の新たな連関による細胞分化速度制御機構を明らかにし、Cell Stem Cell 誌に報告した。

## 研究成果の概要（英文）：

Velocity of cell differentiation is strictly controlled and is crucial for normal development and stem cell differentiation. However, underlying mechanisms regulating differentiation velocity are fully unknown. Here we show a molecular mechanism determining differentiation velocity from mouse embryonic stem cells (ESCs). Activation of protein kinase A (PKA) accelerates differentiation velocity to induce approximately 2-times earlier appearance of mesoderm and other germ layer cells, reciprocally correlated with the earlier disappearance of pluripotent markers after ESC differentiation. PKA activation increased protein expression of G9a, a H3K9 methyltransferase, along with earlier H3K9 dimethylation and DNA methylation in Oct3/4 and Nanog gene promoters. Deletion of G9a completely abolished PKA-elicited acceleration of differentiation and epigenetic modification. Furthermore, G9a knockout mice showed prolonged expressions of Oct3/4 and Nanog at embryonic day-7.5 and delayed development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：幹細胞, 分化, エピジェネティクス, ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

種々の幹細胞を用いた細胞分化研究が世界的な規模で盛んに行われているが、現在のところ細胞分化に要する時間は個々の細胞において内因性 (intrinsic) に決定されており、分化速度を恣意的に制御することはできないものと考えられている。培養条件等によ

り、細胞の分化「効率」が変化することは数々報告されているが、分化「速度」については、その”intrinsic”な決定を大きく変化するという報告はない。研究代表者はこれまで、心血管系細胞の分化を系統的経時的に解析できる新しい ES 細胞分化システムを構築し、心血管細胞の分化再生研究を行ってきた。す

なわち、マウス ES 細胞から Flk1 陽性の中胚葉レベルの細胞を分化誘導し、そこから血管を分化させる新しい分化系を開発した (Nature, 2000)。また Flk1 陽性細胞からの心筋分化 (FASEB J, 2005)、動静脈リンパ管内皮分化 (2xArterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)、新しい内皮細胞及び動静脈分化制御機構 (Blood, 2009; J Cell Biol, 2010) など種々の心血管分化機構を明らかにしている。さらにマウス iPS 細胞の心血管分化誘導にも世界に先駆けて成功しており (Circulation, 2008; 2008 年 Circulation 誌基礎科学部門第 1 位 Best Paper Award 受賞)、ES/iPS 細胞の分化研究において世界的にも先端的である。平成 22 年度までに研究代表者らは、マウス ES 細胞の分化途上において、Protein kinase A (PKA) を活性化することにより、「中胚葉および血管内皮細胞の分化を従来の約 2 倍早く誘導する」ことを見出した。これらの結果は、制御不能と思われた分化速度が、恣意的に制御が可能であるとともに、新しい分子機構により制御されていることを示唆する。研究代表者は PKA 活性化時に特定のヒストン修飾が変化していることを突き止めた。さらに、このヒストン修飾を誘導する分子 G9a の機能阻害により cAMP の作用が消失する予備的結果を得ており、「外的シグナル→エピジェネティック制御→遺伝子発現→分化速度制御」に至る一連の新しい分子連関を明らかにできると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、研究代表者らが見出した新しい分化速度制御機構を明らかにし、細胞分化時間を恣意的に制御可能とすることを目的とする。研究期間内においては、(1) 分化速度制御機構における PKA 及び G9a の意義の検討、(2) cAMP による G9a 制御機構の解明、(3) G9a によるヒストン修飾の標的遺伝子の同定、(4) これら標的遺伝子による分化速度制御機構の解明、を行い、分化速度制御の分子実体をエピジェネティクスを含む新しい分子連関として明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 分化速度制御機構における PKA 及び G9a の意義の検討

テトラサイクリン誘導性恒常活性型 PKA 発現 ES 細胞を用いて、PKA を活性化することにより、① 中胚葉細胞及び内皮細胞の出現が従来の約 2 倍早くなること、② H3K9me2 のヒストン修飾が特異的に亢進することを見出している。タモキシフェン誘導性に Cre-loxP システムを用いて G9a をノックアウトできる ES 細胞システムを構築している。G9a の loss-of-function 実験を含め、分化速度制御における PKA 及び G9a の機能的意義を確認す

る。

(2) PKA による G9a 発現制御機構の解明  
PKA による G9a 発現増加の分子機構を解析し、外的シグナル→エピジェネティック制御の連関を明らかにする。

(3) G9a によるヒストン修飾の標的遺伝子の同定

未分化 ES 細胞マーカー Oct4 の H3K9me2 及び DNA メチル化に関与していることが報告されている。Oct4 を含む種々の遺伝子のヒストンメチル化及び DNA メチル化につき検討する。

(4) これら標的遺伝子による分化速度制御機構の解明

G9a の標的分子群のそれぞれの分子機能をもとに分化速度制御の分子機構を明らかにしていく。外的シグナル(cAMP)→エピジェネティック制御→遺伝子発現→細胞のふるまい(分化速度)に至る新しい分子連関過程を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) ES 細胞の分化途上において、テトラサイクリンを投与して PKA を活性化することにより、ES 細胞から三胚葉すべての分化が対照より約 1 日から 2 倍早くなった。そこで PKA の活性化と同時に、タモキシフェンを投与して G9a をノックアウトすると、PKA による分化速度亢進が認められなくなった。PKA による分化速度亢進に G9a が必須であることが明らかとなった。

(2) PKA の主たる下流分子の一つである CREB(cAMP-responsive element binding protein) の関与を検討した。CREB の機能を阻害するため、dominant negative-CREB を発現させたが、PKA による分化速度亢進作用は阻害されなかった。また、PKA によって G9a の mRNA 発現量も変化しなかった。これらの結果より、PKA は Post-translational な機構によって G9a タンパクの発現量を制御していると考えられた。最近、ユビキチンリガーゼ APC/C-cdh1 が G9a を標的として G9a タンパクを分解することが報告された (Takahashi, Mol Cell, 2012)。また、APC/C-cdh1 の機能は PKA により阻害されることも以前報告されている。そこで、同機構が ES 細胞においても機能しているかどうか確認した。Cdh1 cDNA を ES 細胞分化途上に発現させると、G9a タンパク量が減少した。その時同時に PKA を活性化すると、G9a タンパク量の低下が認められなくなった。すなわち、APC/C-cdh1 が ES 細胞分化においても G9a 分解に働いており、同酵素作用が PKA により阻害されることを見出した。PKA 活性化

は APC/C-cdh1 の不活化を介して G9a タンパクの分解を抑制するという post-translational な機構により PKA が G9a 発現量を制御していることを突き止めた。

(3) G9a は Oct4 のプロモーター領域に H3K9me2 及び DNA メチル化修飾を加えることにより Oct4 の発現を抑制することが報告されている。Oct4 に加えて未分化遺伝子 Nanog のプロモーター領域でのこれらエピゲノム修飾を検討した。PKA 活性化により、両遺伝子のプロモーター領域において、H3K9me2 が早く認められた。さらに DNA メチル化修飾は H3K9me2 に引き続いて認められるが、これも PKA の活性化により対照よりも遅くなった。これらの結果より、G9a は、Oct4 や Nanog といった未分化遺伝子のプロモーター領域にヒストンメチル化及び DNA メチル化修飾を加えることにより、これら未分化遺伝子の発現を早期に抑制し、それにより分化が早まると考えられた。

(4) これら PKA と G9a による初期分化速度制御の生体における意義を確認するため、in vivo モデルによる検証を行った。マウス Blastocysts の ex vivo culture を行い、PKA 及び G9a の働きを、それぞれの阻害剤である H89 及び BIX01294 を添加して阻害した。H89 または BIX01294 の投与により、Nanog 発現未分化細胞 (内細胞塊) の残存が遅延した。一方、Primitive endoderm である GATA4 陽性細胞の出現も遅延した。PKA 及び G9a の活性阻害により内細胞塊からの早期分化が抑制されたと考えられた。さらに G9a ノックアウトマウスを用いて検討した。野生型 embryo では、胎生 7.5 日には Oct4 の発現はほぼ消失し、中胚葉マーカー Flk1 の発現が認められる。G9a ノックアウトマウスにおいては、embryo 全体が成長遅延した外観を示すとともに、Oct4 の発現が遅延し、embryo 全体に Oct4 発現が残存していた。Flk1 の発現も認められず、早期分化が遅れていることが明らかとなった。これらの結果より、PKA は G9a の発現亢進効果を介して、未分化遺伝子の抑制的エピゲノム修飾を介して、ES 細胞早期分化調節に働いていることを明らかにした。シグナルとエピゲノム制御の新しい連関と、それによる細胞分化速度制御という新しい概念を示した。同研究は、Cell Stem Cell 誌にアクセプトされた (2012 年 6 月 14 日号掲載予定)。

## 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 2 件)

- ① Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. **Cell Stem Cell**, in press, 査読有
- ② Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Kataoka H, Takayama N, Eto K, Nishikawa SI, Yamashita JK. PKA/CREB signaling triggers initiation of endothelial and hematopoietic cell differentiation via Etv2 induction. **Stem Cells**, 2012, 30:687-696, 査読有 DOI:10.1002/stem.1041.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Yamashita JK. Endothelial and hematopoietic cell differentiation are initiated by PKA/CREB pathway via Etv2 induction. The 19th Annual Meeting of the Japanese vascular and medicine organization. 2011/12/8-10, Tokyo, Japan
- ② Yamamizu K, Matsunaga T, Katayama S, Yamashita JK. PKA - CREB pathway initiates endothelial and hematopoietic cell differentiation through Etv2 induction. American Heart Association Scientific Session. 2011/11/12-16, Orland, USA
- ③ 山水康平, 藤原摩耶子, 立花誠, 片山志織, 今井裕, 眞貝洋一, 山下潤 G9a によるヒストンメチル化を介した PKA の細胞分化速度制御機構の解明 第 84 回日本生化学大会, 2011/9/22, 京都
- ④ 山水康平, 藤原摩耶子, 立花誠, 片山志織, 今井裕, 眞貝洋一, 山下潤 PKA によるヒストンメチル化酵素 G9a を介した細胞分化速度制御機構の解明 第 2 回 Molecular Cardiovascular Conference II, 2011/9/2-4, 小樽
- ⑤ Yamashita JK. Cardiovascular regeneration with ES & iPS cells. The 8th Korea-Japan Joint Symposium of Vascular Biology, 2011/8/25, Busan, Korea

- ⑥ 山下潤  
心臓再生へ向けた多面的アプローチ～  
ES/iPS 細胞を用いた創薬研究と細胞治療～,  
文部科学省私立大学学術高度化推進事業  
ハイテクリサーチセンター整備事業・第4回シンポジウム, 2011/6/25, 東大阪
- ⑦ Yamamizu K, Katayama S, Tachibana M, Shinkai Y, Yamashita JK.  
Protein kinase A accelerates early programming from mouse ES cells through epigenetic inhibition of Oct3/4 and Nanog expression.  
The 9th International Society for Stem cell Research, 2011/6/15-18, Toronto, Canada
- ⑧ 山下潤  
ES/iPS 細胞を用いた再生医-心血管再生を中心に-  
神戸薬科大学 第37回卒後研修講座  
2011/6/5, 神戸
- ⑨ 山下潤  
iPS 細胞の基礎と応用  
再生医療学会エデュケーショナルセミナー,  
2011/5/31, 東京
- ⑩ 山下潤  
心臓再生へ向けた多面的アプローチ～  
ES/iPS 細胞を用いた細胞治療と創薬研究～,  
第24回北摂循環器研究会, 2011/5/24, 吹田
- ⑪ Yamashita JK.  
Development of cardiac regeneration strategies with pluripotent stem cells.  
JST/CIRM Workshop. “Early Translational Research on Stem Cells”,  
2011/5/16, Kobe, Japan

[図書] (計2件)

- ① Yamamizu K, Yamashita JK, Shin-Ichi Nishikawa.  
“Potential of ES Cell Differentiation Culture for Vascular Biology”  
**Handbook of Stem Cells**, in press  
Publisher: Academic Press Inc
- ② Uosaki H, Yamashita JK.  
Chemicals Regulating Cardiomyocyte Differentiation.  
**Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis**, 2011, Chapter 24:471-486  
Publisher: InTech.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: The method of producing the group of cells containing cardiomyocytes and vascular tissue cells  
発明者: 山下潤/升本 英利  
権利者: 京都大学  
種類:  
番号: 61/611,340  
出願年月日: 2012/3/15  
国内外の別: 国外

○取得状況 (計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
<http://maxim2.frontier.kyoto-u.ac.jp/es>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
山下潤 (YAMASHITA JUN)  
京都大学 再生医科学研究所 准教授  
研究者番号: 50335288

(2) 研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者 ( )  
研究者番号: