

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710221

研究課題名(和文) 網膜幹細胞から膵臓細胞への分化転換に機能する新規分子機構のゲノムワイド解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of novel molecular mechanism of direct reprogramming from retinal stem cell to pancreatic cell

研究代表者

穂積 俊矢 (Hozumi, Shunya)

広島大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10597222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：多分化能を持つ幹細胞から3つの胚葉(内胚葉・中胚葉・外胚葉)が分化する過程において、それぞれの胚葉特異的な遺伝子が発現する一方、他の胚葉への分化に必要な遺伝子発現は抑制される。分化した細胞から異なった細胞へ分化する現象を分化転換と呼び、分化転換には遺伝子発現の変換が必要である。申請者の研究成果からNotch情報伝達系を阻害することにより、ゼブラフィッシュの網膜・脳・脊椎(中枢神経系)において、膵臓マーカー遺伝子を含む内胚葉遺伝子や中胚葉遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった。この胚葉を超えた遺伝子発現の分子機構を解明することにより、再生医療で用いられる分化転換技術の発展の一助となりうる。

研究成果の概要(英文)：It is well known that three primary germ layer cells, known as ectoderm, mesoderm, and endoderm, are differentiated from pluripotent stem cells in vertebrates through the induction of cell lineage specific gene expression. Although it was thought that the lineage-specified differentiated cells are very stable, recent studies revealed that the differentiated cells could be reprogrammed by overexpression of germ layer specific transcription factors, called direct reprogramming, which changes the profiles of gene expression. However, it is still difficult to convert one germ layer cells into another germ layer fate. In this study, I found that inhibition of Notch signaling ectopically induces expression of mesodermal and endodermal genes, such as pancreatic genes, in zebrafish central nervous system. These results will help to promote the direct conversion technology in regenerative medicine.

研究分野：発生生物学、細胞生物学

キーワード：分化転換 神経細胞 内胚葉 中胚葉 遺伝子発現 Notch エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

分化した細胞から異なった細胞へ分化する現象や、分化する細胞系列が限定された幹細胞から、異なった系列の細胞が分化する現象を分化転換と呼ぶ。発生初期の多能性幹細胞である内部細胞塊は内胚葉・中胚葉・外胚葉の様々な細胞に分化する能力(分化多能性)を有しているのに対し、発生過程が進むにつれて分化多能性は失われ、臓器や器官に存在する組織幹細胞は分化できる細胞系列が限られており、分化転換は抑制されている。例えば、網膜に存在する網膜幹細胞からは最終的に光受容に関わる神経細胞のみに分化し、他の器官や臓器の細胞には分化しない。このように細胞系譜を超えた分化転換を抑制する分子機構はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでにメッセンジャーRNA(mRNA)のスプライシングに機能する *Ddx46* 遺伝子のゼブラフィッシュ変異体 (*Ddx46* 変異体)の網膜において、神経マーカー遺伝子の発現が減少し、一方、膵臓マーカー遺伝子の発現上昇が見られることを発見した。マウス膵臓内分泌細胞の細胞から細胞への分化転換や、イモリのレンズ再生時の分化転換では、DNA やヒストンのメチル化修飾などのエピジェネティック修飾が関与することが示唆される。しかし、網膜を含む中枢神経から膵臓細胞への細胞系譜を超えた分化転換の分子機構はほとんど解明されていない。本研究課題の *Ddx46* タンパク質が関与する新規分子機構の解析により、中枢神経細胞における細胞系譜を超えた分化転換を抑制する分子機構を解明できると考えている。また、神経細胞から膵臓細胞への分化転換に必要な遺伝子を同定することで、神経細胞から膵臓細胞への分化誘導法の確立を目指す。

3. 研究の方法

実験 1. *Ddx46* タンパク質が発現を抑制し、分化転換に機能する因子の同定

Ddx46 タンパク質は mRNA スプライシングを介して遺伝子発現に機能している。このことから、*Ddx46* 変異体の網膜幹細胞において、発現量が変化している遺伝子を解析した。

実験(1-1) 分化転換に関与する遺伝子群の発現解析

Ddx46 変異体で発現量が変化している遺伝子を同定するため、細胞分化に重要な役割を持つ遺伝子の発現解析を *in situ* ハイブリダイゼーションや RT-PCR により行った。発現解析の結果、*Ddx46* 変異体において Notch 情報伝達系関連遺伝子の発現低下が認められた。よって、以下の実験は Notch 情報伝達系に注目して実験を行った。

実験(1-2) *Ddx46* 変異体の網膜における mRNA スプライシングの検出

mRNA スプライシングの異常が、Notch 情報伝達系関連遺伝子の転写量減少の原因である可能性があるため、mRNA スプライシングの異常を RT-PCR により確認した。

実験(1-3) Notch 情報伝達系の阻害による中枢神経の内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現の検出

実験(1-1)、(1-2)により Notch 情報伝達系の低下が網膜における膵臓マーカー遺伝子発現の原因であることが予想されたため、Notch 情報伝達系が抑制されている *minb bomb* (*mib*)変異体や Notch 情報伝達阻害剤を用いて、網膜を含む中枢神経の遺伝子発現を、膵臓マーカー遺伝子を含む内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子について発現解析を行った。

実験 2. Notch 情報伝達系阻害胚におけるヒストンメチル化酵素の阻害実験

これまでに分化転換の過程において、エピジェネティック修飾による遺伝子発現の変化が重要であることが示唆されている。

Notch 情報伝達系阻害胚では、中枢神経において内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現が検出されたため、エピジェネティクスの変化が予想された。この仮説を証明するために、Notch 情報伝達系阻害胚においてヒストンメチル化に関与する酵素の機能阻害実験を行い、ヒストンのメチル化が細胞系譜を超えた遺伝子発現に必要である可能性を検討した。

実験 3. 細胞系譜を超えた遺伝子発現における転写因子の同定

これまでに Notch 情報伝達系が発現を制御している転写因子の中で、運命決定に機能しているものが複数同定されている。それらの転写因子に注目し、中枢神経において過剰発現実験・機能阻害実験を行い、初期内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

実験(1-1)、実験(1-2)

細胞運命に関与する遺伝子を選択し、発現解析を行った結果、Notch 情報伝達系の構成因子である *deltaA* や *her6* の発現が低下し、mRNA スプライシングの異常も検出された。この結果から、*Ddx46* 変異体の網膜における膵臓マーカー遺伝子の発現は、Notch 情報伝達系の異常によるものであることが示唆された。

実験(1-3)

mib 変異体や Notch 情報伝達系阻害剤処理胚において、膵臓マーカー遺伝子を含む内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現解析を行ったところ、網膜・脳・脊椎の中枢神経系において、複数の初期内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現が検出された。それに加え、脊椎では

神経細胞マーカー遺伝子の発現低下が検出された。

この遺伝子発現は初期発生の初期内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現を制御する Nodal signal の阻害により抑制されることから、Notch 情報伝達阻害胚の中枢神経における内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子の発現においても Nodal signal が関与していることが明らかとなった。

実験2

ヒトやゼブラフィッシュなどでは、遺伝子発現の活性化を促進するヒストン H3K4 のメチル化酵素として mixed-lineage leukemia (MLL) が機能することが報告されている。Notch 情報伝達型阻害胚の中枢神経において、MLL の阻害実験を行ったところ、初期内胚葉遺伝子の発現が抑制された。この結果から、Notch 情報伝達系阻害胚の中枢神経における細胞系譜を超えた遺伝子発現には、ヒストンのメチル化による遺伝子発現の活性化が必要であることが示唆された。

実験3

Notch情報伝達系により、中枢神経において発現が抑制される転写因子に着目し、機能阻害実験を行った結果、bHLH型転写因子である Achaete-scute family bHLH transcription factor 1a (Ascl1a) が、Notch情報伝達系阻害胚の中枢神経における初期内胚葉遺伝子・中胚葉遺伝子発現の原因であることが明らかとなった。一方、Ascl1aの過剰発現実験では、この内胚葉・中胚葉遺伝子発現は検出されなかったことから、Ascl1aと共に機能する因子が必要であることが予想された。

[国内外における位置づけとインパクト]

(1) 本研究結果では、Notch情報伝達系の抑制により、外胚葉である中枢神経において、内胚葉遺伝子と中胚葉遺伝子の発現が認められた。この現象は失われた分化多能性が回復したことを示しており、これまで報告されていない新規の発見である。

(2) これまで、初期培養の線維芽細胞に数種類の転写因子を過剰発現することで、人為的に目的の細胞へ分化が可能であることが多く報告されているが、生体内における報告例は非常に少ない。生体内において、Notch情報伝達系の阻害により、中枢神経で内胚葉遺伝子と中胚葉遺伝子の発現を誘導できたことは、これまで例がなくインパクトは高い。

[今後の展望]

(1) 本研究では中枢神経において内胚葉・中胚葉遺伝子の発現を誘導できたが、それ以外の組織・器官では誘導できなかった。他の組織・器官で内胚葉・中胚葉遺伝子の発現を誘導するには、Ascl1a と共に機能する因子の同定が不可欠であり、今後はこの因子の同定を

行う。この因子は中枢神経特異的に発現している可能性が高い。

(2) これまでの実験結果から、中枢神経において内胚葉遺伝子と中胚葉遺伝子の発現を誘導できたが、発現誘導する遺伝子の選択ができず、目的の細胞に分化誘導できない。次のステップとして、発現誘導する遺伝子をコントロールし、目的の細胞へ分化誘導させる方法を模索する必要がある。

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3件)(査読あり)

(1) K. Takayama, N. Shimoda, S. Takanaga, S. Hozumi, Y. Kikuchi.

“Expression patterns of dnmt3aa, dnmt3ab, and dnmt4 during development and fin regeneration in zebrafish” Gene Expression Patterns, 14(2), 2014, 105-110

(2) R. Hirabayashi*, S. Hozumi*, S. Higashijima, Y. Kikuchi. (*These two authors contributed equally to this work)

“Ddx46 Is Required for Multi-Lineage Differentiation of Hematopoietic Stem Cells in Zebrafish” Stem Cells and Development, 22(18), 2013, 2532-2542

(3) S. Hozumi, R. Hirabayashi, A. Yoshizawa, M. Ogata, T. Ishitani, M. Tsutsumi, A. Kuroiwa, M. Itoh, Y. Kikuchi.

“DEAD-box protein Ddx46 is required for the development of the digestive organs and brain in Zebrafish” PLoS ONE, 7 (3), 2012, e33675

[学会発表](計5件)

(1) 穂積 俊矢, 宮本 良祐, 桑 昭苑, 菊池 裕
遺伝子発現制御解析による細胞可塑性コントロール機構の解明

第87回日本生化学会大会, 2014年10月15日
~2014年10月18日, 国立京都国際会館(京都府・京都市)

(2) 穂積 俊矢, 宮本 良祐, 桑 昭苑, 菊池 裕
「bHLH型転写因子による神経細胞での内胚葉・中胚葉性遺伝子発現誘導機構の解明」

日本遺伝学会第86回大会, 2014年09月17日
~2014年09月19日, 長浜バイオ大学(滋賀県・長浜市)

(3) 高山 和也, 高永 俊佑, 下田 修義, 穂積 俊矢, 菊池 裕

「ゼブラフィッシュにおける Dnmt4, Dnmt3aa, Dnmt3ab の発現解析」

第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日~6日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

(4) 穂積 俊矢、平林 諒、東島 眞一、菊池 裕
「mRNA スプライシング因子 Ddx46 は造血
幹細胞の維持や血球分化に必要である」
日本遺伝学会第 85 回大会, 2013 年 09 月 19 日
~ 21 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈
川県・横浜市)

(5) Shunya Hozumi, Ryo Hirabayashi, Akio
Yoshizawa, Mitsuko Ogata, Tohru Ishitani,
Makiko Tsutsumi, Atsushi Kuroiwa, Motoyuki
Itoh, Yutaka Kikuchi.
“DEAD-box protein Ddx46 is required for the
development of the digestive organs and brain in
zebrafish.” 10th International Conference
Zebrafish Development and Genetics, 2012年06
月20日~24日 アメリカ・ウィスコンシン

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等
広島大学大学院 理学研究科 生物科学専攻
発生生物学研究室ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/zebra/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

穂積 俊矢 (Hozumi Shunya)

広島大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10597222