

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770224

研究課題名(和文) ヒストンエピジェネティクスに注目した iPS 細胞の多能性を評価する分子指標の同定

研究課題名(英文) Investigation of molecular indicators related to the degree of pluripotency of iPS cells

研究代表者

杉浦 真由美 (Sugiura, Mayumi)

奈良女子大学・自然科学系・助教

研究者番号：60397841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞の臨床応用のために必須である「iPS細胞の質の評価」を分子レベルで可能にするため、細胞株間の質、特に分化多能性と関連する分子的特徴を解析した。ヒストン修飾に注目して分化能の程度が異なる細胞株間の比較や薬剤処理による多能性回復過程における解析を行い、活性型ヒストン修飾がiPS細胞の多能性の程度と関連し得ることを示した。さらにヒストン修飾関連因子のうちc-Mycと特定のHDACが標的ヒストン修飾や細胞の分化状態に影響を与える可能性を示した。これらの相関はES細胞ではみられなかった。また、複数のiPS細胞のゲノムを詳細に解析し分化能の違いはゲノム安定性の差によるものではないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：Although iPS cells have been generated by various methods, considerable quality variation has been observed. This study aimed at finding the molecular indicators for discriminating the quality of iPSCs. We focused on the histone-epigenetic modifications, and obtained the following results. (1) Acceleration of the histone acetylation was observed only in iPSCs with high developmental potential. (2) TSA-treatment on iPSCs showing low pluripotency elicited a temporary accumulation of histone acetylation, resulting in improving their developmental ability. (3) Analysis of the expression of histone modification-related factors suggested a close correlation between the degree of histone acetylation and the expression level of c-Myc and certain HDAC in iPSCs. Such a close correlation was not observed in ES cells. Gene knockdown experiments showed the HDAC is possible to affect differentiated state of iPSCs. (4) Genome integrity of each iPSC was not direct cause of its developmental potential.

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：iPS ヒストンエピジェネティクス 分化能

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の樹立は、これまでに再生医療の分野で問題視されてきた倫理的問題や拒絶反応の問題を払拭する、胚性幹細胞 (ES 細胞) に代わる画期的な手法と考えられ、臨床応用へ向けて大きな発展が期待されている。しかし、iPS 細胞の特性についてはまだ不明な点も多く、その性質を詳細に解析し、ES 細胞との違いに関して慎重な議論や検証を行うことが必要である。これまでに、安全な (将来癌化しない) iPS 細胞を高効率で作出する方法の開発競争が世界中で行われてきており、現在では、様々な生物種、手法で iPS 細胞の樹立が成功している。しかし、樹立された iPS 細胞間には遺伝子発現や分化能のレベルに差があり、質の多様性があることがわかってきた。そこで、「質の良い、安全な iPS 細胞の特性を明らかにし、それを選び出すこと」が臨床応用へ向けての重要な課題となっている。

これまでに所属研究室では、質の良い iPS 細胞の特性を判断する上で、胚工学を使って分化能を半定量的に判定可能なマウスの系を用いて、遺伝的バックグラウンドによる差を最少にし、ゲノム不安定性を及ぼす可能性のある要因を出来る限り排除するなど、「本質的な品質評価が可能な iPS 細胞株の樹立」に留意して、多くの iPS 細胞を作製してきた。樹立した iPS 細胞の特性を分子生物学的、および胚工学的手法によって調べた結果、4つの iPS 誘導因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) を導入して作製した iPS 細胞 (4F-iPS) と3つの誘導因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4) を導入して作製した iPS 細胞 (3F-iPS) では、iPS 細胞の樹立効率のみならず分化多能性の程度にも差が生じることを明らかにした。両者には形態や、網羅的遺伝子発現解析、ゲノムメチル化解析などでは有意な差が認められないが、キメラマウス作成効率や生殖細胞系列への分化 (ジャームライントランスミッション) を確認することにより差が明らかとなり、4F-iPS 細胞は高い分化多能性を有するのに対し、3F-iPS 細胞はそれが著しく低下していることがわかった [Araki et al, Stem Cells (2011)]. 更に、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (TSA: トリコスタチン A) で処理することにより、完全な多能性をもたない 3F-iPS 細胞の分化能を回復できる可能性を示した。この結果は、iPS 細胞の高度な多分化能の獲得及び維持にはヒストンのアセチル化を含むヒストンエピジェネティクスが深く関与している可能性を示唆した。

2. 研究の目的

本研究は、iPS 細胞株間の質、特に分化多能性と関連し得る分子指標は存在するのか、またその分子的特徴は何に起因しているのかを主にヒストンエピジェネティクスに注目して模索するものである。そして将来的には、質の良い iPS 細胞を評価する分子指標を

定義することによって「より短時間で容易に判断できる iPS 細胞の質の評価方法の確立」に貢献し、iPS 細胞樹立過程において完全な分化多能性が獲得、維持される機構の解明へとつなげていきたい。

具体的な研究目的としては、分化能の程度が異なる iPS 細胞株間におけるヒストンエピジェネティクスの比較や TSA による分化能の回復過程における解析を通して、質の異なる株間を見分ける分子指標を絞り込み、完全な分化多能性を有する iPS 細胞の分子的特徴を明らかにし、それらが何に起因しているのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 「分化能に差がみられる iPS 細胞株間におけるヒストン修飾の比較」。品質 (多能性) に差がある 4F-iPS 細胞と 3F-iPS 細胞のエピゲノムの違いを明らかにするため、胚工学的手法によって分化多能性を評価した複数の iPS 細胞株間で、ヒストン修飾をウエスタンブロッティングによって検出し比較した。アセチル化をはじめ、様々なヒストン修飾抗体を用い、4F-iPS 細胞と 3F-iPS 細胞間で差がある可能性のあるヒストン修飾をスクリーニングした。さらに多数の 4F 及び 3F-iPS 細胞株、ES 細胞における標的ヒストン修飾の比較を行い、iPS 細胞の分化多能性と関連し得るヒストン修飾を絞り込んだ。

(2) 「TSA 処理の iPS 細胞の分化能に対する効果と分化多能性回復過程におけるヒストン修飾の解析」。完全な多能性を示さない iPS 細胞の分化能に対する TSA 処理の効果について再現性を確認するため、複数の 3F-iPS 細胞株に対して TSA 処理を行い、胚工学的手法でキメラマウスを作製することによって分化能をアッセイした。また、その際 TSA の処理濃度や時間、回数等の処理条件の最適化を行った。さらに、TSA 処理による分化能回復過程において、「研究の方法 (1)」によって絞り込んだ標的ヒストン修飾を検出し、その変動を調べた。

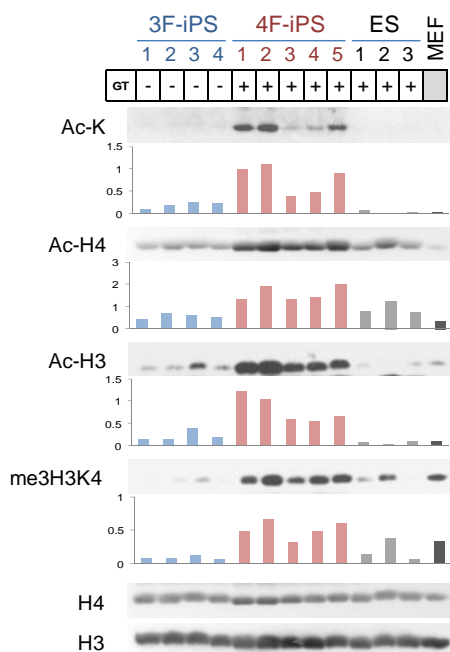
(3) 「iPS 細胞の分化多能性の程度と関連し得るヒストン修飾に影響を及ぼす可能性のある因子の解析」。研究方法 (1) でヒストン修飾を比較した、分化能に差がある 4F-iPS 細胞と 3F-iPS 細胞、そして ES 細胞において、各細胞株間における c-Myc やヒストン修飾関連因子の発現をリアルタイム PCR によって調べ、標的のヒストン修飾との関連を検討した。さらに、標的ヒストン修飾との関連性を見出せたものに対して、iPS 細胞樹立過程における強制発現やノックダウン実験を行った。

(4) 「iPS 細胞の分化多能性に対するゲノム安定性の影響」。iPS 細胞の多能性に影響を与える可能性のある、ヒストンエピジェネティクス以外の要因として、各 iPS 細胞株のゲノムの安定性とその多様性が考えられる。そこで、分化能の程度を確認した iPS 細胞株のゲノムを次世代シーケンスによって解読し、点

突然変異を検出することによってゲノム安定性を調べた。

4. 研究成果

(1) 分化能に差がみられる iPS 細胞株間におけるヒストン修飾の比較を行うため、所属研究室で樹立し多分化能の評価を行った iPS 細胞株 (3F-iPS 細胞と 4F-iPS 細胞) を用いて各ヒストン修飾をウエスタンブロッティングにより検出した。まずは、様々なヒストン修飾抗体を用いて分化能に差がみられる 3F-iPS 細胞と 4F-iPS 細胞間で差があるヒストン修飾をスクリーニングした。そして、差がある可能性が示されたヒストン修飾について、複数の 3F-iPS、4F-iPS 細胞と ES 細胞間でそのシグナル強度を比較した。その結果、胚工学的手法によって高い分化能をもつことが確認されている 4F-iPS 細胞でのみヒストン H3、H4 のアセチル化等の活性型修飾が亢進している傾向にあった (図)。また、4F-iPS 細胞と同様に高い分化能を示す ES 細胞では、このような傾向は見られなかった。



(図) 3F-iPS 細胞と 4F-iPS 細胞、ES 細胞における活性型ヒストン修飾の検出。GT: ジャームライトトランスミクション。

(2) iPS 細胞の分化能に対する TSA 処理の効果について再現性を確認するため、まずは TSA 処理の最適処理条件を検討した。細胞数や TSA 処理の時間やタイミングを検討した結果、処理後のコロニーの形態が良く、未分化状態が維持されている条件として、細胞数 1.5×10^6 に対して TSA (20 nM) を 24 時間、2 回処理する条件を決定した。そして、完全な多能性をもたない 3F-iPS 細胞を処理し、キメラマウス作製効率を調べることによってその分化能の変化をみた。その結果、TSA 処理によってキメラマウス作製効率が上がり、iPS 細胞の寄与率の高いキメラマウスが作製

できることがわかった。これらの結果より、TSA 処理によって 3F-iPS 細胞の分化能が回復することが確認された。さらに、TSA 処理の過程で細胞をサンプリングし、「研究成果 (1)」において絞り込んだ標的ヒストン修飾の変化を調べた。その結果、3F-iPS 細胞を TSA で処理した直後に、4F-iPS 細胞で亢進傾向にあったヒストンの活性型修飾が一時的に増加していることがわかった。

以上の研究成果(1)と(2)より、分化能の程度に差がある iPS 細胞の間にはヒストン修飾パターンに違いがあり、高い分化能を示す iPS 細胞では、アセチル化等の活性型ヒストン修飾が亢進しているという傾向が示された。また、TSA 処理によるアセチル化の亢進は一時的なものであるのに対して、4F-iPS 細胞は高アセチル化状態が維持されているという特徴が見られた。

研究計画の段階では、iPS 細胞の分化多能性の程度と関連し得るヒストン修飾が絞れた際には、それら標的ヒストン修飾のゲノムワイド解析を行い、多能性に関わる分子指標をゲノム上の特定部位にまで絞っていきたいと考えていた。しかし、候補として絞り込んだヒストン修飾は、同様な分化能を示す iPS 細胞株間においても修飾レベルの強度に若干のバラつきが見られ、分化能と対応するようなゲノム上の特定位置におけるヒストン修飾の有無や特徴的なパターンを明らかにすることは困難であると考えた。そこで当初の計画を変更し、高い分化能をもつ細胞でみられた活性型ヒストン修飾の亢進が何に起因しているのかに注目して研究を進めることにした。

(3) iPS 細胞の分化多能性の程度と関連し得る活性型ヒストン修飾に影響を及ぼす因子を探るため、3F-iPS 細胞と 4F-iPS 細胞、ES 細胞において c-Myc やヒストン修飾関連因子の発現を調べ、標的ヒストン修飾のパターンとの比較を行った。その結果、4F-iPS 細胞の高アセチル化状態と c-Myc 及び特定の HDAC の発現レベルとの間に顕著な相関関係があることがわかった。この相関は iPS 細胞でのみみられ、ES 細胞ではみられなかった。これらの結果は、高い分化能を示す 4F-iPS 細胞に特徴的なヒストン修飾パターンの形成や維持に c-Myc と特定の HDAC が関与している可能性を示唆した。さらに、iPS 細胞樹立過程において特定 HDAC の強制発現やノックダウンを行い、この HDAC の発現量の変化が iPS 化に及ぼす影響を調べた。その結果、iPS 細胞の樹立効率には影響しないが、この特定 HDAC の発現量の増減が iPS 細胞の分化状態に影響を与えている可能性が示された。

以上の結果より、分化多能性に差がある iPS 細胞株間を見分ける分子指標の候補として、ヒストンアセチル化等の活性型ヒストン修飾の存在を明らかにし、その特徴的なヒストン修飾の形成や細胞の分化状態には c-Myc と特定 HDAC が関与している可能性を示した。

(4) iPS 細胞の分化多能性の違いが各細胞株のゲノム安定性の差によって生じている可能性を検証するため、胚工学的手法によって分化能を確認した複数の iPS 細胞株のゲノムを詳細に解析した。その結果、高い分化能を示す株においてもゲノム中に多数の点突然変異が存在することを明らかにした。この特徴は iPS 細胞ゲノムに特有の性質であり、iPS 細胞株間の分化能の違いはゲノム安定性の差によるものではないことを確認した。

本研究の成果は、将来的に iPS 細胞の評価や iPS 化のメカニズムの解析に大きく貢献するものと期待される。

なお、本研究は独立行政法人放射線医学総合研究所の安倍真澄特別上席研究員、荒木良子室長の指導、協力のもとに行われたものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mayumi Sugiura, Yasuji Kasama, Ryoko Araki, Yuko Hoki, Misato Sunayama, Masahiro Uda, Miki Nakamura, Shunsuke Ando and Masumi Abe, Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells, Stem Cell Reports, 査読有, 2(1): 52-63. (2014) DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.11.006. eCollection 2014 Jan 14.

〔学会発表〕(計 8 件)

杉浦真由美、法喜ゆう子、砂山美里、宇田昌広、荒木良子、安倍真澄、Acceleration of the histone acetylation in pluripotent iPS cells、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

荒木良子、杉浦真由美、笠間康次、砂山美里、宇田昌広、安藤俊輔、中村美樹、法喜ゆう子、安倍真澄、iPS cells generation-associated point mutations、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

砂山美里、杉浦真由美、法喜ゆう子、笠間康次、宇田昌広、中村美樹、安藤俊輔、荒木良子、安倍真澄、Point mutations in ES cells、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

Yuko Hoki, Mayumi Sugiura, Yasuji Kasama, Misato Sunayama, Masahiro Uda, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Ryoko Araki, Masumi Abe, Point mutations in ES cells, International Society for Stem Cell Research-ISSCR 11th Annual Meeting, June 12-15, 2013, Boston MA, USA

Ryoko Araki, Mayumi Sugiura, Yasuji Kasama, Misato Sunayama, Masahiro Uda, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Yuko Hoki, Masumi Abe, iPS cells generation-associated point mutations, International Society for Stem Cell Research-ISSCR 11th Annual Meeting, June 12-15, 2013, Boston MA, USA.

杉浦真由美、笠間康次、藤森ゆう子、宇田昌広、中村美樹、安藤俊輔、砂山美里、荒木良子、安倍真澄、A comparison between iPSCs and ESCs reveals that genome reprogramming during iPSC generation causes transversion-predominant point mutations、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡

Masumi Abe, Mayumi Sugiura, Yasuji Kasama, Yuko Hoki-Fujimori, Masahiro Uda, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Misato Sunayama and Ryoko Araki, A Comparison between iPSCs and ESCs reveals reprogramming-associated point mutations, International Society for Stem Cell Research-ISSCR 10th Annual Meeting, June 13-16, 2012, Pacifico Yokohama

Ryoko Araki, Masahiro Uda, Yuko Hoki-Fujimori, Miki Nakamura, Shunsuke Ando, Misato Sunayama, Mayumi Sugiura, Hisashi Ideno, Akemi Shimada, Akira Nifuji and Masumi Abe, A comparison between immunogenicity of iPSCs and of ESCs, International Society for Stem Cell Research-ISSCR 10th Annual Meeting, June 13-16, 2012, Pacifico Yokohama

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 真由美 (Sugiura, Mayumi)
奈良女子大学・自然科学系・助教
研究者番号：60397841