

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440186

研究課題名(和文) 体細胞エピゲノム情報の系統解析による哺乳類の細胞系譜および細胞分化過程の推定

研究課題名(英文) Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information

研究代表者

小柳 香奈子 (Koyanagi, Kanako)

北海道大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：20362840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：受精卵が遺伝子の発現状態を変化させながら、細胞分裂・分化・移動・死を通して、どのようにして多種類の細胞からなる一個体が形成されるのかを理解することは、生物学の大きな目標の一つである。本研究では、体細胞エピゲノム情報の系統解析から *in silico* で細胞系譜を構築し、さらに細胞系譜の祖先節の形質状態、すなわち発生過程の細胞のエピゲノム状態を推定することで、この問題の解決を試みた。その結果、マウス血球系細胞のゲノムワイドなDNAメチル化情報の系統解析により、既知の細胞系譜や分化途中の細胞のDNAメチル化状態の推定が可能なが示された。さらにヒト成体の各種細胞への応用を試みた。

研究成果の概要(英文)：How cells divide and differentiate is a fundamental question in organismal development; however, analyzing differentiation processes in various cell types is laborious and sometimes impossible. Phylogenetic analysis is usually used to reconstruct evolutionary processes based on inherent characters. It could also be used to reconstruct developmental processes based on the developmental changes during cell proliferation and differentiation. In this study, genome-wide epigenetic information from differentiated cells was used to perform phylogenetic analyses. As a result, it was shown that the hierarchical differentiation processes and epigenetic status of differentiating progenitor cells could be inferred based on genom-wide DNA methylation information for murine hematopoiesis. This analysis was also applied to various differentiated cells of human.

研究分野：分子進化学

キーワード：系統解析 細胞分化 エピジェネティクス DNAメチル化 細胞系譜 祖先復元

1. 研究開始当初の背景

細胞系譜は受精卵から成体に至るまでの各細胞の分裂パターンを樹形図状に記述したものであり、個体の発生過程を理解する重要な要素の一つである。初期の細胞系譜解析は、発生過程の直接観察に基づいており、線虫ではこれにより全細胞系譜が記載された (Sulston 1983)。近年では、顕微鏡画像解析技術や細胞にマーカーを導入し観察する clonal assays の発展があり、ホヤやマウスの初期胚などでも細胞系譜の解明が進んでいる (Clarke 1999)。しかしながら胚の観察や侵襲的実験が困難な生物の細胞系譜を明らかにすることは未だ困難である。

また、個体発生の過程において細胞は自己の遺伝子発現を変化させながら、そして記憶しながら分化してゆく。この細胞の記憶は、ゲノム上のエピジェネティック修飾という形で記録される。RNA-seq 法や ChIP-seq 法等の新技术の確立により、個体発生に伴う遺伝子発現情報やエピジェネティック修飾情報をゲノムワイドに研究することが可能となり、例えば ES 細胞から内・中・外胚葉細胞へ分化する過程の遺伝子発現・エピゲノム情報が解析されている (Gifford et al. 2013)。しかしながら、個体発生全過程の細胞の情報を網羅的かつ継時的に取得し解析するのは大変な作業となる。特に、幹細胞など少数のしかし重要な細胞から遺伝子発現・エピゲノム情報を得ることは多くの場合困難である。

2. 研究の目的

これに対し本研究は、分化した成体の体細胞のエピゲノム情報の系統解析から、これらの問題の解決を試みる。系統解析は従来、異なる生物の表現型や遺伝子配列情報の比較から、種あるいは遺伝子の系統樹を推定し、さらに祖先節の形質状態推定からその進化過程を推定してきた。この手法は、十分な情報さえあれば、個体の発生過程の推定へと応用することが原理的に可能である。すなわち、ある個体の分化した様々な細胞のもつ情報の比較から、それらの細胞の分岐過程や、祖先節にあたる分化途中の細胞の状態を推定することが可能だと思われる。そこで本研究ではエピゲノム情報に着目する。エピゲノム情報は、細胞分裂後も基本的に継承されること、分化した多様な細胞はそれぞれ独自のエピゲノム情報を持つこと、また情報量に富むことから、細胞系譜および細胞分化過程の推定のための好条件を満たしている。

3. 研究の方法

エピゲノム情報としては DNA メチル化に着目した。DNA メチル化は研究が進んでおり、

遺伝子発現との関連、細胞分裂後の維持機構、哺乳類の発生過程において重要な役割を果たすこと等が知られている (Smith & Meissner 2013)。

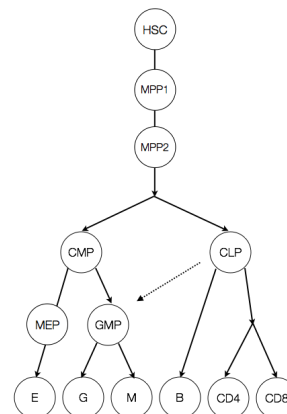
まず DNA メチル化情報の整形を行った。DNA メチル化の情報はゲノム上の各サイトにおける連続値である。DNA メチル化の程度が 0.4 を超えると遺伝子発現抑制がみられるという報告に基づき (Bock et al. 2012)、本研究では 0.4 を閾値としてメチル化情報を 0(OFF)/1(ON)の 2 値に変換して系統解析に用いた。

次に遺伝子配列や表現型の系統解析で用いられる手法に基づき、既存のソフトウェア (PAUP, RAxML, BayesTraits) を用いて、最節約法・最尤法・ベイズ法に基づく系統樹および祖先節推定を行った。最尤法・ベイズ法については、メチル化⇌脱メチル化 (ON⇌OFF) のパラメータ推定も同時に行った。

4. 研究成果

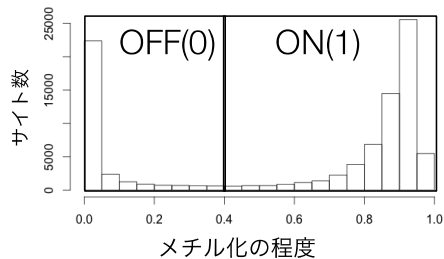
(1) 血球系細胞を用いた研究

血球系細胞の分化過程は研究が進んでおり、その細胞系譜や、造血幹細胞をはじめとする分化途中の各種細胞のエピゲノム情報や、細胞分化にともない発現が変化する遺伝子の存在が明らかになっている (図 1、Rieger & Schroeder 2012)。これらの既知情報と推定された結果とを比較することで、本手法の詳細な検討が可能である。そこで、マウスの各種血球細胞 (造血幹細胞 hematopoietic stem cell (HSC)、分化途中の前駆細胞 6 種 multipotent progenitor 1 (MPP1), multipotent progenitor 2 (MPP2), common myeloid progenitor (CMP), megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP), granulocyte-monocyte progenitor (GMP), common lymphoid progenitor (CLP) cell、分化細胞 6 種: nucleated erythrocytes (E), granulocytes (G), monocytes (M), B cells, helper T cells (CD4), cytotoxic T cells (CD8)) のゲノムワイドな DNA メチル化情報 (Bock et al. 2012) を用いて解析を行った。



【図 1】血球系細胞の分化過程

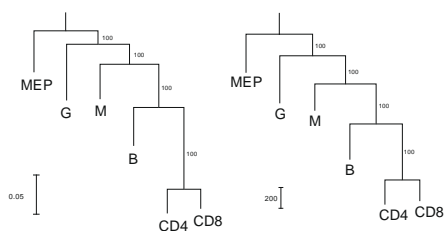
まず、DNA メチル化レベルの頻度解析を行った。その結果、ほとんどのメチル化サイトのメチル化レベルは 0.0 あるいは 1.0 に近いことが確認され(図 2)、メチル化情報を二値化して系統解析することによる影響は限定的であることが示唆された。



【図 2】メチル化情報の頻度分布

次に、血球系細胞分化の過程において、DNA メチル化レベルがどのように変化するかを調査した。HSC が 6 種類の細胞 (E, G, M, B, CD4, CD8) へと分化する過程でみられる変化を、STABLE/UP/DOWN/UNKNOWN に分類した。その結果、大部分のサイトは STABLE であったが、単純な変化 (UP/DOWN) をするサイトと複雑な変化をするサイト (UNKNOWN) の比は 10:1 程度であることがわかり、系統解析に適したサイト (UP/DOWN) が十分に存在することが示唆された。

次に、分化した 6 種類の細胞 (MEP, G, M, B, CD4, CD8) の DNA メチル化情報を用いて、最節約法、最尤法、ベイズ法に基づき系統樹を推定した。アウトグループには HSC, MPP1, MPP2 を用いた。推定された系統樹と、既知の細胞系譜との比較を行った結果、既知の細胞系譜を概ね反映する結果が得られた(図 3)。しかしながら myeloid 系細胞 (MEP, G, M) の単系統性は支持されなかった。



【図 3】推定された系統樹
(左) 最尤法、(右) 最節約法

異なる系統で独立にメチル化あるいは脱メチル化が起きる homoplasy は系統解析を歪める可能性があり、細胞分化過程の再構築に適さない。そのような細胞分化過程の再構築に適さない DNA メチル化サイトがどの程度存在するのか、検証を行った。その結果、homoplasy サイトと non-homoplasy サイトの

存在比はおよそ 1:6 であることがわかった。さらにそれぞれのサイトの特徴を知る目的で、近傍の遺伝子の機能的な特徴を調べたところ、homoplasy サイトには特定の機能はみられなかったが、non-homoplasy サイトには転写制御、免疫反応、造血などの特徴があることが示された。したがって non-homoplasy サイトは、造血細胞の分化過程をよく反映したメチル化状態を維持していることが示唆された。

最後に、系統樹上の各祖先節の状態の推定を行い、既知の細胞分化途中の前駆細胞 3 種 (CLP, GMP and CMP) の DNA メチル化情報との比較を行った。その結果、77.0~89.8% のサイトの DNA メチル化状態 (ON/OFF) が正しく推定された。

以上のことから、DNA メチル化に基づく系統解析による細胞系譜推定および細胞分化途中の細胞のエピゲノム状態の推定の可能性が示された。myeloid 系細胞の単系統性が支持されなかった点については、近年、既知の細胞系譜と異なる分化経路を辿る細胞の存在が示されていること (Kawamoto 2010; Görgens et al. 2013; Ema et al. 2014)、今回用いたデータが細胞集団のデータであることから、そのようなデータの不均一性が原因である可能性が考えられた。

(2) 全身の各種分化細胞を用いた研究

(1)で得られた知見に基づき、ヒト成体の各種分化細胞への応用を試みた。具体的には、ENCODE プロジェクト (The ENCODE Project Consortium 2012) から公開されているヒト成体 (肺、胃、肝臓、膵臓、腎臓、副腎、骨芽細胞、骨格筋、心臓、左心室、心筋、子宮筋、脳、皮膚、乳房、子宮、精巣、胎盤、メラニン細胞、白血球、線維芽細胞) の各種細胞のゲノムワイドな DNA メチル化情報を用いて系統解析を行った。

その結果、胃・肝臓・肺などの内胚葉由来の器官、脳や腺などの外胚葉由来の器官、骨芽細胞や線維芽細胞などの中胚葉由来の器官、生殖器官、心筋や子宮筋などの筋組織は、それぞれ系統樹上で単系統群をなすことが示された。また祖先節の状態推定により、細胞分化過程の各系統の各段階における、ゲノム上の各サイトの DNA メチル化状態の変遷過程を推定することができた。

(3) 今後の展望

個体発生における細胞分裂の過程は、体細胞ゲノム上におきた突然変異を用いた系統解析からも推定可能であるが、個体発生で得られる体細胞突然変異の量は十分とは言えず、系統解析で十分な解像度を得ることが難しい。しかしながら 2016 年になって、CRISPR/Cas9 genome-editing system を用いて積極的に突然変異を導入することで、この問題を克服する論文が発表された (McKenna et al. 2016)。

一方で、本研究で推定された細胞の分化過程は、細胞分化にともなうエピジェネティック変化の平均像と捉えることができる。エピジェネティック修飾の状態は、ゲノム上の各遺伝子の発現状態を反映している。したがって、細胞系譜の祖先節の形質状態、すなわち分化途中の細胞におけるエピジェネティック修飾の状態が推定できれば、これに基づき発現する遺伝子セットの変遷過程の推定も可能だと思われる。体細胞ゲノム変異の情報から細胞系譜推定を行う手法では、このような情報は得られない。したがって、両者を補完的に統合して理解することが重要だと思われる。

近年、シングルセル解析技術も急速な勢いで発展し、遺伝子発現情報のみならず、DNAメチル化解析手法も発表された(Smallwood et al. 2017)。今後は、体細胞ゲノム変異の情報をういて得られた細胞分裂の過程、本手法により推定されるエピジェネティック修飾の変遷過程および遺伝子発現状態の変遷過程を、一細胞レベルで統合解析することで、個体発生過程の理解が進むことが期待される。

<引用文献>

Bock C et al. 2012. DNA Methylation Dynamics during In Vivo Differentiation of Blood and Skin Stem Cells. *Molecular Cell*. 47:633–647. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.019.

Clarke JDW et al. 1999. Fate maps old and new. *Nature Cell Biology* 1(4):E103-9. doi: 10.1038/12105

Ema H et al. 2014. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Experimental Hematology*. 42:74–82. doi: 10.1016/j.exphem.2013.11.004.

Gifford CA et al. 2013. Transcriptional and epigenetic dynamics during specification of human embryonic stem cells. *Cell*. 153:1149–1163. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.037.

Görgens A et al. 2013. Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Reports*. 3:1539–1552. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.025.

Kawamoto H et al. 2010. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol Rev*. 238(1):23-36. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00959.x.

McKenna A et al. 2016. Whole organism lineage tracing by combinatorial and cumulative genome editing. *Science*. 353(6298):aaf7907.

doi: 10.1126/science.aaf7907.

Rieger MA et al. 2012. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 4:a008250–a008250. doi: 10.1101/cshperspect.a008250.

Smallwood SEBA et al. 2017. Genome-wide base-resolution mapping of DNAmethylation in single cells using single-cell bisulfite sequencing (scBS-seq). *Nature Protocols*. 12:534–547. doi: 10.1038/nprot.2016.187.

Smith ZD et al. 2013. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics*. 14:204–220. doi: 10.1038/nrg3354.

Sulston JE et al. 1983. The Embryonic Cell Lineage of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1983 100(1):64-119.

The ENCODE Project Consortium 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*. 488:57–74. doi: 10.1038/nature11247.

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 1 件)

Kanako O. Koyanagi “Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information: hematopoiesis as a model case.” *Genome Biology and Evolution* (2015) 7(3):699-705. (査読有)
DOI: 10.1093/gbe/evv024

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Kanako O. Koyanagi “Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information.” CDB symposium (神戸市) 2017年3月

2. Kanako O. Koyanagi “Inferring cell differentiation processes based on phylogenetic analysis of genome-wide epigenetic information.” THE 40th NAITO CONFERENCE on Epigenetics—From Histone Code to Therapeutic Strategy (札幌市) 2015年9月

3. 小柳香奈子 「ヒストン修飾情報の系統解析による細胞分化過程の推定 —ヒト血球系細胞をモデルとして」日本進化学会 第17回大会(東京都) 2015年8月

4. Kanako O. Koyanagi “Inferring cell differentiation processes based on the phylogenetic analysis of genome-wide DNA methylation data: Hematopoiesis as a model case.” Keystone Symposia Conference (アメリカ) 2015年3月
5. 小柳香奈子 「エピジェネティック情報の最尤推定による細胞分化過程の推定—マウス血球系細胞をモデルとして」日本進化学会 第16回大会(高槻市) 2014年8月
6. 小柳香奈子 「エピジェネティック情報の系統解析による細胞分化過程の推定—マウス血球系細胞をモデルとして」日本分子生物学会 第36回(神戸市) 2013年12月
7. 小柳香奈子 「エピジェネティック情報の系統解析による細胞分化過程の推定—マウス血球系細胞をモデルとして」日本進化学会 第15回大会(つくば市) 2013年8月

〔図書〕(計 0件)
なし

〔産業財産権〕
なし

○出願状況(計 0件)
なし

○取得状況(計 0件)
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ist.hokudai.ac.jp/div/bio/intro/genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小柳 香奈子 (KOYANAGI, Kanako)
北海道大学・大学院情報科学研究科・准教授
研究者番号：20362840

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし