

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670384

研究課題名(和文) エピゲノムを制御する新しい液性因子群の同定と治療応用

研究課題名(英文) Novel humoral factors regulating epigenomic status

研究代表者

山下 潤 (Yamashita, Jun)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、エピゲノムを制御する新しい液性因子群を同定し、その機能と意義を解析するとともに種々の新しいエピゲノム制御法を開発することを目的とする。研究期間内においては、1) AMの分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与、2) PKAを介してエピゲノム制御に関与する新規液性因子の探索同定、3) 同定遺伝子の作用機構の解析を行い、種々の生命現象をエピゲノムを通して理解し直すとともに、エピゲノムの新しい制御機構とその応用を可能とすることを目指した。AMがES細胞初期分化速度制御に関与していること。AMに加えて新たに分化速度及びエピゲノムを制御する因子を同定した。またその成体における作用を解析中である。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at identification of novel humoral factors that regulate epigenomic status. Following items were investigated; 1) Involvement of adrenomedullin in differentiation and adult physiology. 2) Investigation of novel factors regulating epigenome through PKA signaling. 3) Significance and functions of the identified factors. We succeeded in showing the involvement of AM in the regulation of differentiation timing from embryonic stem cells. We further identified one novel factor that also regulates differentiation timing and epigenomic status. Currently, we are analyzing functions of the factor in the adult mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：発生分化 分子心臓学

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム制御は、遺伝子の塩基配列をと
もなわず、染色体等の高次構造の制御により
遺伝子発現を制御する機構であり、ヒストン
修飾(メチル化・アセチル化)やDNAメチル
化などによる制御機構が次々と明らかにな
ってきている。また解析方法においても
ChIP-seqやDNA methylome解析など次世代シ
ークエンサーを用いた網羅的アプローチが
発展し、近年著しく研究が盛んになっている。
例えば細胞分化においては、幹細胞・前駆細
胞などが特異的分化誘導シグナルを受けて、
エピゲノム状態を変化させながら主には転
写因子ネットワークを改変・再構築ことによ
り細胞の形質を変化させ、エピゲノムレベル
でその変化を固定することにより細胞の形
質を維持するようになる、というのが生物学
的現象の大きな流れと考えられる。しかし、
この過程において、種々のシグナルからの転
写因子など遺伝子発現変化についてはあま
たの報告があるが、そうしたシグナルがど
のようにエピゲノムに影響し、その状態を制御
しているか、というシグナル-エピゲノム連
関については全く不明である。染色体等の高
次構造により遺伝子発現を制御するエピゲ
ノム制御は、細胞の分化・形質維持・リプロ
グラミングをはじめ、がんや生活習慣病等
種々の慢性疾患などへの関与が知られてい
る。しかしこれまで、種々のシグナル、特に
細胞外シグナルによるエピゲノム制御機構
に関してはほぼ全く報告がない。

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独自の 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 FIK1 陽性の中胚葉細胞を分化誘導
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)。また心筋分化

(FASEB J, 2005)、動静脈リンパ管内皮分化
を含む新しい内皮細胞分化制御機構(Blood,
2009, 2011; J Cell Biol, 2010; Stem Cells,
2012)など種々の心血管分化機構を明らかに
している。iPS 細胞研究にも世界に先駆けて
成功し (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。研究代表
者らは最近、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、三胚葉及び内皮細胞の分化が通常の約
2 倍早まることを見いだした。その分子機構
を解析した結果、PKA の活性化により、ヒス
トン3 リジン9 のジメチル化(H3K9me2)酵素
である G9a の発現が増加し、抑制性ヒストン
メチル化である H3K9me2 が未分化遺伝子
(Oct3/4, Nanog 等)に早く入るため、未分
化遺伝子の発現低下が早まり分化が促進さ
れることを明らかにした (Cell Stem Cell,
2012)。同研究は、分化の時間の制御という
新しい概念を PKA による G9a 発現制御という
新しいシグナル-エピゲノム連関により示
したものである。ここで PKA を手がかりにし
てさらに上流の因子を探索することにより、
エピゲノムを制御する新しい液性因子群を
同定し、液性因子の新しい作用機構を明らか
にするとともに、エピゲノムを制御する新し
い手段、新しいエピゲノム治療法の開発など
が行えると考えられた。実際、アドレノメデ
ュリン(AM)が ES 細胞及び胎生早期において
PKA を活性化して ES 細胞の分化タイミングを
変化させることを見いだしている。

2. 研究の目的

本研究は、エピゲノムを制御する新しい液
性因子群を同定し、その機能と意義を解析す
るとともに種々の新しいエピゲノム制御法
を開発することを目的とする。研究期間内に

においては、1) AM の分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与、2) PKA を介してエ

3. 研究の方法

1) AM の分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与

PKA のエピゲノム制御に関する研究の中で、cAMPを上昇させPKAを活性化する作用があるAM及びその受容体が胎生早期に発現していること、またES細胞の分化途上においてAMを投与することにより、分化タイミングを早める効果があることをすでに見いだしている。すなわち、エピゲノムを制御する液性因子の候補物質をすでに1つ同定している。まずAMに関して、実際にG9aを介してH3K9me2を制御しているのかをES細胞分化モデルを用いて検証・確認する。

AM及び受容体は血管内皮及び平滑筋細胞、心筋細胞等に発現し、血管形成や動脈硬化性病変、心不全の形成等多様な病態に関与していることが知られている。これら胎仔及び成体におけるAMの作用においてエピゲノム制御が関与しているかどうか検討する。具体的には、ヒト臍帯由来内皮細胞や平滑筋細胞、幹細胞由来心筋細胞等において、AMを作用させたときのG9a及びH3K9me2の状態を確認する。さらに可能ならばAMノックアウトマウスや成熟マウスへのAM投与時におけるH3K9me2の状態を検討する。将来的には内皮や平滑筋、心筋特異的G9aノックアウトマウスモデルなどを用いて、病態形成におけるG9a及びH3K9me2の関与と意義を明らかにする。

PKAを介してエピゲノム制御に関与する新規液性因子の探索同定

AMの効果は、constitutive active (CA)-PKAによりPKAを強制的に活性化した場合に比べて強くなく部分的であり、PKAの作用をすべて説明しうるものではなかった。このことは、AM以外にもPKAを介してエピゲノム制御に関与している液性因子群が存在することを示唆する。そこでAM以外の因子をおもに以下の2つのアプローチにより探索同定する。

i) PKAを下流シグナルとすることが報告されている分子を標的とする candidate アッセイ

AMを同定したのと同様に、PKAを下流シグナルとして用いる他の液性因子を候補物質として選択し、組換えタンパクまたはcDNAを用いた機能発現により、エピゲノム制御への作用を検討する。ES細胞分化系における分化タイミングの変化、G9a発現、H3K9me2量を指標にエピゲノム制御活性を有する分子を同定する。

ii) ES細胞の分化タイミングをリードアウトとした液性因子スクリーニング

現在のところエピゲノム解析は、ウェスタンブロットやChIPアッセイ、ChIP-seqなど解析方法が限られており、エピゲノムの変化を直接的にスクリーニングのリードアウトとして用いることは難しい。そこでES細胞の分化タイミングの変化を用いたスクリーニング系を構築し、分化タイミングを変化させる因子として新しい分子の同定を試みる。

中内胚葉マーカーであるbrachyury-Tプロモーター/GFPやFlk1プロモーター/GFPを有するES細胞を用いて、通常はGFPが出現しない分化誘導2日目にGFPを測定し、cDNA導入によりGFPが早期から発現するようになるク

ローンを同定する。複数のプラスミドプールをトランスフェクションし、GFP を認めた細胞を純化して導入 cDNA を回収し、再びライブラリーを構築することを繰り返すことにより、効果を発揮する cDNA プラスミドを濃縮・同定できると考えられる。(組織幹細胞である SP 細胞マーカーの ABCG2 の同定は同様の手法によって成功している (Zhou, Nat Med, 2001).)

3) 3) 同定遺伝子の作用機構の解析

2) において同定した分子に関して、ES 細胞分化タイミングにおける作用と作用機序を確認する。さらに AM の場合と同様に、同定分子が本来有している生物作用に関して、順次 G9a 及び H3K9me2 などエピゲノム制御機構の関与を検討する。それにより、これまでの液性因子の作用をエピゲノムを含めて理解し直すとともに、新しいエピゲノム制御分子として利用できるようにする。

これらの検討により、エピゲノムを制御する新しい液性因子群を同定し、その機能と意義を解析するとともに種々の新しいエピゲノム制御法を開発する。

4. 研究成果

1) AM の分化過程及び成体におけるエピゲノムへの関与

AM をマウス ES 細胞分化初期段階へ投与し、活性型 PKA 発現誘導と同様の効果があるか検討した。その結果、活性型 PKA ほどの強力な効果ではないが、三胚葉分化が有意に速くなっており、PKA 活性により分化速度制御が行われていることを示した。これにより、AM が分化速度制御を行いうる初めての液性因子であること

を示した。

2) PKA を介してエピゲノム制御に関する新規液性因子の探索同定

i) PKA を下流シグナルとすることが報告されている分子を標的とする candidate アッセイ

PKA を活性化しうることが報告されている液性因子を候補物質として ES 細胞分化タイミングに与える影響を検討し、AM に加えて新たに分化速度を制御しうる因子を発見した。同因子が PKA や AM と同様に G9a の発現を誘導すること、H3K9me2 量を増加させることも合わせて確認し、新たなエピゲノム制御液性因子であることを見いだした。

3) 同定遺伝子の作用機構の解析

2) において同定した因子に関して、生体における意義をさらに検討した。その結果、同因子がエピゲノム制御を介して血液・免疫系の制御に関与している可能性を見いだした。現在、同因子の種々の遺伝子改変モデルを用いて同因子とエピゲノム制御の意義を解析中である。

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1件)

Uosaki H*, Magadum A, Seo K, Fukushima H, Takeuchi A, Nakagawa Y, Moyes KW, Narazaki G, Kuwahara K, Laflamme M, Matsuoka S, Nakatsuji N, Nakao K, Kwon C, Kass DA, Engel FB, Yamashita JK*. Identification of chemicals inducing cardiomyocyte proliferation in developmental stage-specific manner with pluripotent stem cells. *Circulation Cardiovascular Genetics*. 査読有、6 巻、2013、624-633

DOI:10.1161/CIRCGENETICS.113.000330

〔学会発表〕(計 10 件)

山下潤、iPS 細胞を用いた種々の心臓細胞の誘導と再生細胞治療及び病態モデル応用、日本科学技術振興機構新技術説明会(招待講演) 2013 年 12 月 2 日、東京

山下潤、多能性幹細胞を用いた心血管分化再生に関する多面的研究、徳島脈管研究会(特別講演)(招待講演) 2013 年 11 月 27 日、徳島

山下潤、多能性幹細胞を用いた多面的心血管再生治療戦略の開発、日本心血管内分泌代謝学会シンポジウム(招待講演) 2013 年 11 月 23 日、大阪

山下潤、ES 細胞・iPS 細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略の開発、奈良県立医科大学祭シンポジウム(招待講演) 2013 年 10 月 26 日、橿原

山下潤、多能性幹細胞を用いた新しい心不全治療実現に向けた多面的アプローチ、福岡心不全研究会(特別講演)(招待講演) 2013 年 9 月 17 日、福岡

Yamashita JK, Multiple and integrative approaches to cardiovascular diseases with stem cell technology. International Conference on Endothelin 2013 (Special Guest Session)(招待講演) 2013 年 9 月 10 日、東京

山下潤、多能性幹細胞を用いて多面的に心臓再生に挑戦する、京都大学附置研究所・品川セミナー(招待講演) 2013 年 7 月 5 日、東京

山下潤、ES 細胞/iPS 細胞を用いた多面的心臓再生治療戦略の開発、岐阜心不全研究会(特別講演)(招待講演) 2013 年 7 月 4 日、岐阜

山下潤、多能性幹細胞分化システムを用いた心臓再生治療薬の探索、日本炎症再生医学会シンポジウム「疾患 iPS 細胞と創薬」(オ

ーガナイザー)(招待講演) 2013 年 7 月 2 日、京都

山下潤、ES 細胞・iPS 細胞を用いた心血管分化再生研究、愛知 Rising Force Meeting(特別講演)(招待講演) 2013 年 5 月 29 日、名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

山下研究室 京都大学 iPS 細胞研究所/再生医科学研究所

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 潤 (YAMASHITA, Jun)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号: 50335288

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし