

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460363

研究課題名(和文)細胞リプログラミングへのシチジンデアミナーゼの関与

研究課題名(英文)Role of cytidine deaminase in cell reprogramming process

研究代表者

長岡 仁(Nagaoka, Hitoshi)

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20270647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：主要なエピジェネティック制御の一つであるDNA脱メチル化関連タンパク質のiPS細胞誘導時の役割について検討した。iPS細胞の誘導では、過去の報告に反しシチジンデアミナーゼのAIDやApobec1の有意な発現は観察されない。一方、Tet1は顕著な発現上昇が認められた。AID, Apobec1の強制発現も、iPS化率やクローンの安定性に影響を与えずシチジンデアミナーゼの役割を否定する結果となった。iPS細胞誘導時のAID遺伝子プロモーター領域のメチル化状態は顕著に低い状態にあることが明らかになった。このことから、適切な転写因子さえ存在すれば遺伝子自体は発現できる状態にある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation is one of the major epigenetic mark for gene regulation. Gene expression for DNA demethylation during iPS induction were evaluated. Consistent with previous reports, we failed to detect substantial expression of cytidine deaminases, AID and Apobec1 whereas Tet1 expression was significantly enhanced. Forced expression of AID or Apobec1 under the control of Nanog promoter exhibited no significant effect on iPS induction efficiency and stability at least until up to 60 days after induction. These results suggest minimum role of cytidine deaminases in iPS. These results suggest minimum role of cytidine deaminases in iPS. Hypomethylation at Aicda promoter region in iPS clones may indicate that leaky AID expression could easily occur under certain conditions in which appropriate transcription factors are available. That may explain apparently ambiguous reports for AID expression in iPS.

研究分野：分子生物学 分子免疫学

キーワード：再生医学 DNA脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

iPS細胞の再生医療への応用には、樹立にかかる時間や品質管理等の諸問題の克服が必須である。iPS細胞の効率的樹立と安定した形質の管理に資する基礎知識の蓄積が望まれた。iPS作製過程で重要なDNA脱メチル化現象を解析し、より効率的且つ迅速なiPS樹立法開発の基盤的知識を得ることが喫緊の課題である。

CpGサイトのDNAメチル化は主要なエピジェネティックな制御の一つである。発生時、胚内で始原生殖細胞 (PGC) のDNAは急速に脱メチル化されそれが細胞のいわゆる初期化に重要であり、その分子機構は5メチルトシン(5mC)への酵素による修飾とそれに引き続く塩基除去修復機構により起こる事が示されていた。その機構の一つとして activation-induced cytidine deaminase(AID)/Apobec ファミリーのシチジン脱アミノ酵素の関与を示唆する報告が複数存在していた(①②)。しかし、AIDノックアウトマウスは幾世代にも渡り何ら問題無く生まれ育つ上に、iPS細胞の作成効率も低下しないことからその生理的意義には疑問の余地も多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究は、iPS作製過程で重要なDNA脱メチル化現象に関与が示唆されているAIDを中心に、その他のデアミナーゼ並びにTETファミリータンパク質の役割も合わせて解明する事で効率的なiPS樹立法の開発に繋がる様なDNAメチル化制御に関する知見を得る事を目的とした。その為、iPS樹立過程でのAID発現を単細胞レベルで解析し、多能生獲得とAID発現の条件を詳細に明らかにするとともに、他の脱メチル化関連経路 (Apobecファミリー及びTETファミリー) との相対的重要度を明らかにし、さらに、それら遺伝子を導入する事でiPS形成率の劇的な変化に繋がるかどうかを検討する。そのため具体的に以下のことを目指した。

- (1) iPS形成過程でのAID発現解析等によりその役割を解明する。
- (2) AID以外のシチンデアミナーゼやTETファミリーの役割の違い・寄与度を解明する。
- (3) シチンデアミナーゼやTETファミリータンパク質の強制発現がiPS形成や安定化に影響するか検討する。
- (4) AID遺伝子 (Aicda) のプロモーター解析やシグナル解析を行ないその活性化機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) AID等、脱メチル化関連酵素のiPS誘導時の役割
DNA脱メチル化関連タンパク質のiPS誘導時のmRNA発現の変化をreal-time PCRで明らかにする。

(2) Aicda-cre/rosa-tdRFPマウスからのiPS樹立実験及び解析

Aicda-cre/rosa-tdRFPマウスは、レポーター分子としてhCD2とcre発現カセットをAicda遺伝子に組み込んだバクテリア人工染色体を持ち、Aicda遺伝子発現に伴い不可逆的にRFP陽性となる。その検出感度は非常に高く、AIDが微量 (胚中心細胞の約1/100-1/50量) にしか発現しない未熟B細胞やT細胞での発現もRFP陽転化として検出できる。このマウスを用いてマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を作成しiPS化を誘導してその過程でのAicdaプロモーターの活性化を解析する。

(3) シチンデアミナーゼの強制発現によるiPS化への影響

AID及びApobec1をNanogプロモーター制御下に強制発現させ、そのiPS細胞形成への影響を明らかにする。

(4) 遺伝子メチル化状態の検討

iPS化の状態をOct4, Nanog遺伝子プロモーター領域のCpGメチル化状態をBisulfite解析で確認した上で、Aicdaプロモーター領域のCpGメチル化状態がiPS形成時にどう変化するかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) DNA脱メチル化関連タンパク質遺伝子のiPS誘導時のmRNA発現

AID以外に同時にリプログラミングに有効な候補として脱メチル化反応を誘導するTETファミリー遺伝子群の発現をRT-PCRで確認しMEFにおいてはTET1, 2が主に発現することを確認した。その上でMEFに山中4因子を導入しiPSクローンを作成した。iPSの樹立はNanogやEsrrb遺伝子の発現と、Oct4プロモーター領域の脱メチル化で確認した。AID, Apobec1, Tet1, Tet2のmRNA発現をRT-PCRで確認すると、MEFに比べTet1, Tet2の発現の上昇が顕著であるが、Apobec1の発現上昇はクローンにより一様ではなくまちまちであり、AIDに関しては発現の有意な増加を認めなかった (図1)。

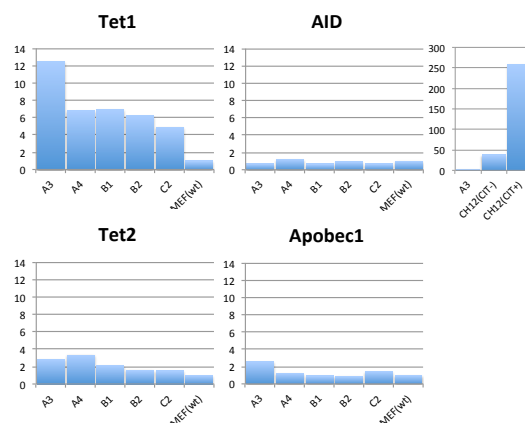


図1

iPSクローンとMEFのmRNA発現比較

(2) Aicda発現レポーターを用いたシングルセルレベルでのAID発現の検討

Aicdaの培養系全体としての解析では発現は顕著でないが、一過性、もしくはごく一部の細胞でのAID遺伝子発現がiPS細胞樹立に関与する可能性が考えられた。そこでAID発現の履歴を単細胞レベルでモニタリングできるトランスジェニックマウスから樹立したMEFを用いてiPSを作成し、AID発現履歴を示すiPSクローンの有無を観察した。iPS化を検定するために、Nanogプロモーター制御下にmAG(アザミグリーン)蛍光タンパク質を発現するレポーターを同時に導入した。その結果、AID発現履歴を示すiPSクローンは極めて少ないことが明らかになった(図2)。以上の結果から、通常のiPS誘導過程において内在性のAID発現が起こり細胞リプログラミングに関与する可能性は極めて低いと結論した。

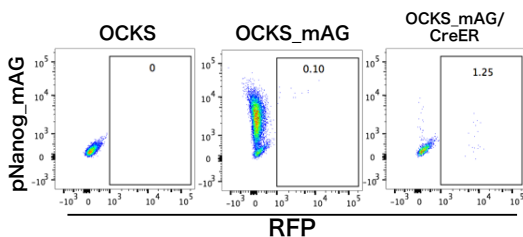


図2

(3) シチジンデアミナーゼの強制発現によるiPS化への影響は低い

シチジンデアミナーゼの過剰発現によるリプログラミング効率や、形質の安定性への影響について検討するために、AID及びApobec1タンパク質をiPS誘導時に過剰発現させ、iPS化効率の比較を行った。AID及びApobec1はmAGとの融合タンパク質として発現させ、蛍光によりその発現レベルを解析し、またiPS出現度を目視でカウントし比較した(表1)。ま

表1 iPS出現頻度 トランスフェクション後14日

	細胞数	コロニー数	頻度
mAG	18,080	91	0.00503
mAID	24,413	98	0.00401
mApobec1	13,370	57	0.00426

た、iPS誘導後4週と8週でのNanogプロモーター制御下のmAG強度をフローサイトメーターで計測し、比較した。その結果、長期培養(8週)にNanogプロモーター活性はAID,

Apobec1ともにコントロール同様で、シチジンデアミナーゼの強い関与は認められなかった(図3)。

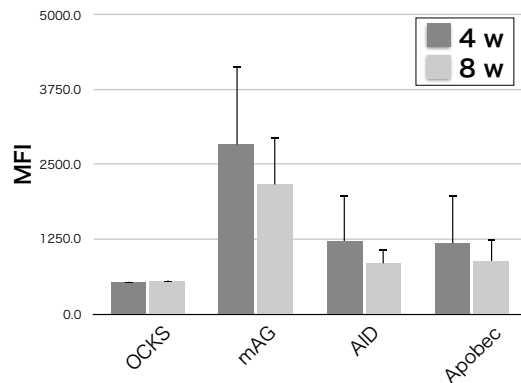


図3

平均蛍光強度(MFI)の比較

(4) Aicdaプロモーター領域のメチル化はiPS化により大きく低下している

AID遺伝子であるAicdaのプロモーター領域のエピジェネティックな変化を調べるため、iPS細胞株、MEF、ナイーブなBリンパ球、胚中心Bリンパ球から調整したDNAを用いてBisulfite処理を行い、Aicdaプロモーター領域のDNAメチル化の程度を解析した(図4)。MEFにおいては55%のCpG部位がメチル化され

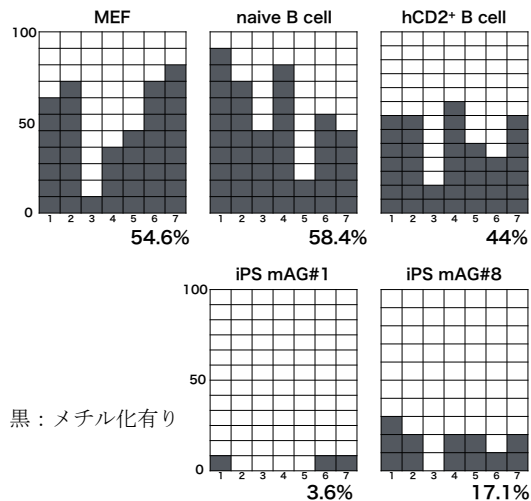


図4 メチル化率の比較

ており、それはナイーブなBリンパ球でも同程度の58%であった。AIDが高発現する胚中心Bリンパ球ではメチル化の割合は低下していたが44%程度であった。それに対して、2系統のiPS細胞におけるメチル化率は、3%および17%であり、胚中心Bリンパ球に比べても顕著に低いことが明らかになった。Oct4プロモーター領域では、メチル化率はMEF79%、

iPS細胞11%-14%であり矛盾ない。AIDプロモーター領域はiPS化に伴うゲノム脱メチル化に沿って高度な脱メチル化状態になるが、それがAIDの高発現にはつながっていないことが示された。そのことから細胞のiPS化時のAID発現の違いは、転写因子の有無の差に起因している可能性が考えられた。

以上の結果は、iPS誘導の過程でAIDが高度に発現したり、その活性がiPS化効率や形質安定化に関与するという可能性が極めて低いことを示唆する。

<引用文献>

①Kumar, R., Dimenna, L., Schrode, N., Liu, T. C., Franck, P., Munoz-Descalzo, S., Hadjantonakis, A. K., Zarrin, A. A., Chaudhuri, J., Elemento, O., and Evans, T. (2013). AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* 500, 89-92.

②Bhutani, N., Decker, M. N., Brady, J. J., Bussat, R. T., Burns, D. M., Corbel, S. Y., and Blau, H. M. (2013). A critical role for AID in the initiation of reprogramming to induced pluripotent stem cells. *FASEB J* 27, 1107-1113.

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 Ohashi, T., Aoki, M., Tomita, H., Akazawa, T., Sato, K., Kuze, B., Mizuta, K., Hara, A., Nagaoka, H., Inoue, N., and Ito, Y. (2017). M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer. *Cancer Sci* in press. DOI:10.1111/cas.13244 査読有り

② Sato, K., Kimura, M., Sugiyama, K., Nishikawa, M., Okano, Y., Nagaoka, H., Nagase, T., Kitade, Y., and Ueda, H. (2016). Four-and-a-half LIM Domains 1 (FHL1) Protein Interacts with the Rho Guanine

Nucleotide Exchange Factor PLEKHG2/FLJ00018 and Regulates Cell Morphogenesis. *J Biol Chem* 291, 25227-25238. DOI:10.1074/jbc.M116.759571, 査読有り

[学会発表] (計2件)

①堀賢一郎、佐藤克哉、金山佳史、安田一、長屋州宣、長岡仁。CRISPR/CAS9を用いた抗体遺伝子改変酵素AIDの発言制御機構の解析 第88回日本生化学会大会 2015年12月3日 神戸市

②Sato, K. and Nagaoka, H. Evaluation of function of transcription factors, Batf and HoxC4, in Aicda gene regulation. 日本免疫学会総会・学術集会 2015年11月20日 札幌市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 仁 (NAGAOKA, Hitoshi)
岐阜大学・医学系研究科・教授
研究者番号：20270647

(2) 研究分担者

佐藤 克哉 (SATO, Katsuya)
岐阜大学・医学系研究科・助教
研究者番号：60733508

木村 正志 (KIMURA, Masashi)
岐阜大学・医学系研究科・講師
研究者番号：40260575