



Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas

Nukaya, Daiki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-04-15

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3282号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003282>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas

マウス脾臓由来 iPS 細胞における遺伝子発現と

エピジェネティックメモリー

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻寺島俊雄教授)

糠谷 大樹

【はじめに】 Induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) は様々な体細胞へ分化できる多能性を示す一方、元の体細胞へ分化しやすいという特性を持つことが近年報告された。元の体細胞と iPS 細胞では DNA メチル化やヒストン修飾といったクロマチン修飾が類似していることから、iPS 細胞は体細胞の記憶をエピジェネティックな記憶として保持することが示唆されている。また、クロマチン修飾は遺伝子発現に影響を与えるため、iPS 細胞の持つこのような記憶は元の体細胞へ分化しやすいという iPS 紡の特性に寄与することが示唆されている。しかしながら、エピジェネティックな記憶がどのように維持され iPS 紡の分化に影響を与えるか、詳細については未だ不明な点が多い。

脾臓では、しばしば異所性の肝細胞がみとめられるなど可塑性を持つ細胞が存在することが知られている。実際、我々を含む複数の研究グループにより脾外分泌細胞はその運命を変え、インスリン分泌細胞あるいは肝細胞へ分化転換できることが証明されている。このため、脾外分泌細胞由来 iPS 紡は元の体細胞の記憶によりインスリン分泌細胞や肝細胞へ分化しやすい特性を持つ可能性がある。仮に脾外分泌細胞由来 iPS 紡がこのような細胞へ分化しやすい特性を持つ場合、分化誘導が比較的難しい内胚葉組織を効率よく分化できる有用な細胞になりうる。

本研究では、尾縫維芽細胞 (TTF) および脾外分泌細胞画分 (Panc) からそれぞれ iPS 紡 (TTF-iPSC, Panc-iPSC) を樹立し、どのような特性の違いがあるか明らかにすることを目的に検討を行った。

【結果と考察】 多能性幹細胞の維持に重要な役割を果たす Nanog 遺伝子の遺伝子座に GFP をノックインしたマウスを用いて TTF-iPSC および Panc-iPSC の樹立を試みた。初代培養細胞 TTF は表皮を除いたマウス尾組織

を細断し、ゲラチン培養皿で培養することにより調製した。初代培養細胞 Panc はコラゲナーゼで消化した脾臓の細胞をフィコール密度勾配遠心分離で分画し、デチゾンで染色される脾島を実体顕微鏡下で注意深く除去した後ゲラチン培養皿にて接着細胞を除去することにより調製した。iPS 細胞の誘導には Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc を発現するレトロウイルスを用いた。その結果、いずれの初代培養細胞からも ES 細胞様コロニーが誘導できた。Nanog 遺伝子の発現を示す GFP 陽性コロニーから樹立したそれぞれ 3 細胞株について解析を行った結果、全てが 3 胚葉全ての組織へ分化できる多能性幹細胞、即ち iPS 細胞であることが分かった。以降は ES 細胞の他、樹立した TTF-iPSC および Panc-iPSC をそれぞれ 3 株用いて解析を行った。

はじめに細胞の網羅的な可溶性代謝物プロファイルを高感度に同定できるキャピラリー電気泳動－質量分析装置を用いてメタボローム解析を行った。その結果、TTF-iPSC と Panc-iPSC で ATP などヌクレオシド 3 リン酸をはじめ複数の代謝物について明らかな差がみとめられた。代謝物は細胞の活性を反映していると考えられることから、Panc-iPSC は TTF-iPSC と比べ明らかに異なる特性を持つことが示された。

次に TTF-iPSC と Panc-iPSC の分化能の違いについて検討を行った。胚様体 (EB ; Embryoid body) と呼ばれる多能性幹細胞由来の細胞凝集塊は自然に分化し、発生過程を模倣すると言われていることから iPS 紹の分化能を反映すると考えられる。このため、定量 RT-PCR 法により EB の遺伝子発現解析を行うことで TTF-iPSC と Panc-iPSC の分化能の違いについて検討を行った。その結果、EB 形成に伴い間葉系細胞 (Pdgfra)、中胚葉 (Tbx6)、未成熟ニューロン (Dcx)、神経幹細胞 (Nes) 特異的遺伝子の発現上昇がみとめられた。両 iPS 紹で遺伝子発現レベルに差がみとめられなかつたことから中胚葉、外胚葉への分化能には差がないことが示唆された。また、形成し

た EB の辺縁部には既報と同様に臍側内胚葉 (VE ; visceral endoderm) 由来と考えられている卵黄嚢様構造がみとめられた。VE 特異的遺伝子 (Sox7) および VE と脾臓や肝臓、小腸など内胚葉組織の前駆組織である胚体内胚葉 (DE ; definitive endoderm) で共通に発現し、重要な役割を果たす典型的な転写因子群 (Foxa1, Foxa2, Sox17, Hnf1b, Hnf6, Hnf4a, Hnf1a, Foxa3, Sox9) は、両 iPS 紹で遺伝子発現レベルに差がみとめられなかつた。小腸特異的遺伝子 (Fabp2) でも同様の傾向を示し、両 iPS 紹で VE、DE、小腸への分化能に差はないことが示唆された。

Panc-iPSC が体細胞の記憶を保持することで脾臓の細胞へ分化しやすい可能性を考慮し、脾臓発生のマスターレギュレーターとして知られる転写因子 (Pdx1) について解析を行った。その結果、期待に反して両 iPS 紹で遺伝子発現レベルに差はみとめられなかつた。また、脾臓発生に重要な役割を果たす別の転写因子 (Ptfla) や脾内分泌細胞または臍外分泌細胞で発現する遺伝子 (Ins1, Ins2, Gcg, Amy2) については、はっきりとした遺伝子発現上昇がみとめられなかつた。ところが興味深いことに、Panc-iPSC では TTF-iPSC に比べ肝臓で発現する遺伝子 (Alb, Afp) が有意に発現上昇することが明らかとなった。また、肝臓マーカー遺伝子 (Aat2, Cyp7A1) も同様の傾向を示した。さらに免疫染色の結果、Panc-iPSC 由来 EB では TTF-iPSC 由来 EB に比べより多くの細胞がアルブミンおよび Cyp7A1 陽性であった。以上から、Panc-iPSC は TTF-iPSC に比べ EB 形成に伴い脾臓ではなく肝臓特異的遺伝子を発現しやすい特性を持つことが示された。

Panc-iPSC のこのような特性が体細胞のエピジェネティックな記憶によるものかどうか検討するため、Alb、Afp、Pdx1 遺伝子の転写開始点 (TSS ; transcription start site) 近傍のクロマチン修飾について解析を行った。重亜硫酸ナトリウム - シーケンス法により DNA メチル化解析を行った結果、初

代培養細胞 Panc の Alb、Afp 遺伝子 TSS 近傍の CpG ジヌクレオチドは相対的に低メチル化状態を示し、遺伝子発現しやすい状態であることが示された。しかしながら、これらの差は iPS 細胞の誘導に伴い消失し、Panc-iPSC の特性と相関を示さなかった。Pdx1 遺伝子 TSS 近傍は初代培養細胞 TTF、初代培養細胞 Panc いずれにおいても低メチル化状態を示し、iPSC へ誘導した後もはつきりした差はみとめられなかった。一方、クロマチン免疫沈降-PCR 法によりヒストン修飾について解析を行った結果、初代培養細胞 Panc における Alb、Afp 遺伝子 TSS 近傍は遺伝子発現を活性化する H3K9ac および H3K4me3 修飾が相対的に高レベルであった。また、同様のヒストン修飾が Panc-iPSC でも保持されることが示された。この状態はクロマチン構造がより“オープン”な状態であり、転写因子が結合しやすいことを示している。ヒストン修飾の状態と Panc-iPSC の特性に相関がみとめられたため、DNA メチル化というよりはむしろ保持された体細胞のヒストン修飾が Panc-iPSC の Alb、Afp 遺伝子を発現しやすい特性に寄与することが示唆された。一方、初代培養細胞 Panc における Pdx1 遺伝子 TSS 近傍は、H3K9ac および H3K4me3 修飾が相対的に高レベルであると同時に、遺伝子発現を抑制する H3K27me3 修飾は低レベルであった。このため、初代培養細胞 Panc は相対的に Pdx1 遺伝子を発現しやすいことが示された。しかしながら、このような修飾は iPS 細胞の誘導に伴いほとんど消失し、遺伝子発現しやすい状態は失われてしまった。Pdx1 のように発生分化において重要な遺伝子と Alb、Afp のようなその他の遺伝子では、ヒストン修飾による遺伝子発現活性化メカニズムが異なると考えられている。iPS 細胞のエピジェネティックな記憶に由来する遺伝子発現についてもこのような遺伝子の種類の違いによって差がみとめられることが報告されていたが、詳細は不明のままであった。本研究から、Panc-iPSC が保持する体細胞由来のヒストン修飾は遺伝子の種類によつ

て安定度が異なり、その結果分化能へ影響を与えた可能性が示された。

【結語】 本研究によりはじめて樹立された Panc-iPSC は TTF-iPSC と比べ明らかに異なる特性を持ち、肝臓特異的遺伝子を発現しやすいことが明らかとなった。また、Panc-iPSC でみとめられた分化能の違いの少なくとも一部はエピジェネティックな記憶により説明できることが分かった。さらに、Panc-iPSC で保持される体細胞の記憶、即ちヒストン修飾は遺伝子の種類によって安定度が異なり、その結果 Panc-iPSC の特性に影響を与えたことが示唆された。本研究により Panc-iPSC の特性が明らかにされただけでなく、エピジェネティックな記憶がどのように Panc-iPSC の特性に影響を与えたのか、その可能性を示す興味深い現象がみとめられた。今後は Panc-iPSC の有用性を確認するためにヒト肺外分泌細胞由来 iPS 細胞を樹立し、肝臓および肺臓への分化誘導プロトコールを用いてその特性の詳細を検討することが必要である。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|----------------------------------|--|----|-------|
| 受付番号 | 乙 第 2140号 | 氏名 | 糠谷 大樹 |
| 論文題目 Title of Dissertation | <p>Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas</p> <p>(マウス脾臓由来 iPS 細胞における遺伝子発現とエピジェネティックメモリー)</p> | | |
| 審査委員 Examiner | <p>主 査 青井 貴之 Chief Examiner</p> <p>副 査 東 健 Vice-examiner</p> <p>副 査 南 康博 Vice-examiner</p> | | |
| (要旨は1,000字～2,000字程度) | | | |

【はじめに】

Induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) は体細胞由来のクロマチン修飾を保持し、元の体細胞へ分化しやすい特性を持つことが報告されている。しかしながら、このようなエピジェネティックな記憶がどのように維持されるか詳細については明らかにされていない。また、脾外分泌細胞はインスリン分泌細胞または肝細胞へ分化転換するため、脾外分泌細胞由来 iPS 細胞は元の体細胞の記憶によりこのような細胞へ分化しやすい可能性がある。本研究では、尾線維芽細胞 (TTF) および脾外分泌細胞画分 (Panc) からそれぞれ iPS 細胞を樹立し (TTF-iPSC, Panc-iPSC) 、その特性を明らかにすることを目的に検討を行った。

【方法と結果】

Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc を発現するレトロウィルスを用いて TTF-iPSC および Panc-iPSC を樹立した。キャピラリー電気泳動-質量分析装置を用いたメタボローム解析の結果、複数の代謝物で明らかな差がみとめられたことから TTF-iPSC と Panc-iPSC は異なる特性を持つことが示唆された。iPS 細胞から胚葉体 (EB) を形成させ、定量 RT-PCR 法により遺伝子発現解析を行うことで分化能の違いについて検討を行った。その結果、両 iPS 細胞で組織特異的遺伝子の発現レベルに差がみとめられなかったことから、中胚葉、外胚葉、臓側内胚葉、胚体内胚葉、小腸への分化能に差がないことが示唆された。Pdx1 遺伝子をはじめとした脾臓特異的遺伝子についても両 iPS 細胞で遺伝子発現レベルに差がみとめられなかった一方、Alb, Afp, Aat2, Cyp7A1 といった肝臓で発現する遺伝子は TTF-iPSC に比べ Panc-iPSC で発現上昇する傾向を示した。免疫染色の結果についても同様の傾向を示したことから、Panc-iPSC は EB 形成に伴い脾臓ではなく肝臓特異的遺伝子を発現しやすい特性を持つことが示唆された。Panc-iPSC の特性が体細胞のエピジェネティックな記憶によるものかどうか検討するため Alb, Afp, Pdx1 遺伝子の転写開始点 (TSS ; transcription start site) 近傍のクロマチンについて重亜硫酸ナトリウム - シーケンス法による DNA メチル化解析およびクロマチン免疫沈降-PCR 法によるヒストン修飾解析を行った。その結果、初代培養細胞 Panc の Alb, Afp 遺伝子 TSS 近傍は、DNA メチル化、ヒストン修飾のいずれもが初代培養細胞 TTF に比べ遺伝子発現しやすい状態を示した。また、DNA メチル化と異なり主に初代培養細胞 Panc のヒストン修飾の特徴のみが Panc-iPSC でも保持され、肝臓特異的遺伝子を発現しやすい特性と相関を示した。このため、DNA メチル化というより体細胞由来のヒストン修飾が Panc-iPSC の特性に寄与することが示唆された。一方、初代培養細胞 Panc における Pdx1 遺伝子 TSS 近傍のヒストン修飾は遺伝子発現しやすい状態を示したが、このような修飾は Alb, Afp 遺伝子と異なり iPS 細胞の誘導と共にほとんど消失してしまった。iPS 細胞のエピジェネティックな記憶に由来する遺伝子発現は、Pdx1 のように発生分化において重要な遺伝子と Alb, Afp のようなその他の遺伝子で差がみとめられることがこれまでにも報告されていたが、

詳細については不明であった。本研究から、Panc-iPSC が保持する体細胞由来のヒストン修飾は遺伝子の種類によって安定度が異なり、その結果遺伝子発現に影響を与えた可能性が示された。

【結語】

本研究によりはじめて樹立された Panc-iPSC は TTF-iPSC と比べ異なる特性を持ち、肝臓特異的遺伝子を発現しやすいことが明らかとなった。また、Panc-iPSC でみとめられた遺伝子発現の違いの少なくとも一部はエピジェネティックな記憶により説明できることが分かった。さらに、Panc-iPSC で保持されるヒストン修飾の安定度は遺伝子の種類によって異なり、遺伝子発現に影響を与えることが示唆された。本研究により Panc-iPSC の特性が明らかにされただけではなく、iPS 細胞におけるエピジェネティックな記憶がどのように維持されるかについて興味深い現象が示された。

本研究は膵臓の外分泌細胞から樹立された iPS 細胞株が、エピジェネティックな記憶を保持しているか否かを、尾線維芽細胞由来の iPS 細胞株と比較して検討したものである。本研究の結果、膵臓の外分泌細胞由来の iPS 細胞は、肝臓特異的な遺伝子を発現しやすい傾向があることを明らかにした。このような傾向が生じる原因について、少なくともその一部はエピジェネティックな記憶、とくにヒストン修飾の保持により説明できることが証明された。本研究の成果は、iPS 細胞の臨床応用に向けて価値ある業績と認める。よって本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。