

(平成 26 年度 研究実施報告)

# 国際科学技術共同研究推進事業 (戦略的国際共同研究プログラム)

(研究領域「幹細胞のエピジェネティクス」)

研究課題名「細胞移植治療の実現に向けた細胞アイデンティティ制御」

平成26年度実施報告書

代表者氏名 山田 泰広  
(京都大学 iPS 細胞研究所・教授)

## 1. 研究実施内容

### 1-1. 研究実施の概要

平成 26 年度は、細胞初期化過程に出現する準安定的細胞の形成に関わるエピジェネティック修飾状態の同定を試みた。平成 25 年度に引き続き、生体内細胞初期化システムの解析を行った。生体内で細胞初期化因子を誘導すると、がんに類似した異型細胞の増生が確認された。それら異型細胞の増生は、生理的条件下では細胞増殖が盛んでない膵臓や腎臓等にも確認された。一方で細胞初期化因子の発現を短期間（4-6 日間）で停止させると、異型細胞は速やかに消失することが分かった。少なくとも一部は正常な形態を示す非腫瘍性細胞へと変化した。体細胞のエピジェネティックなメモリーの存在が示唆された。しかしながら、細胞初期化因子を 7 日間誘導することで、複数の臓器に未分化な異型細胞の自立性増生からなる腫瘍を形成することを示した。それらの腫瘍は Wilms 腫瘍に代表されるような小児がんに類似していることを明らかにした。発生したがん細胞は完全初期化により多能性幹細胞へと変換し、非腫瘍性の腎臓細胞に分化可能であることを示した。これらの成果から、細胞アイデンティティの消失に関与するエピゲノムの改変ががん細胞に類似した状態を引き起こすことが明らかとなった (Cell 156(4):663-77, 2014)。実際に DNA メチル化解析により、初期化失敗に伴って増生するがん細胞では、部分的に多能性幹細胞に類似した DNA メチル化修飾状態を示すことを確認した。

一方でカナダ側 Nagy グループは、初期化過程に形態が通常が多能性幹細胞とは異なる F-Class 細胞が出現することを報告した。F-Class 細胞は多能性を有するにも関わらず、外来遺伝子の発現依存的に維持されることを明らかにし、F-Class 細胞の網羅的エピゲノム状態を明らかにした (Nature. 2014 Dec 11;516(7530):198-206. Nature. 2014 Dec 11;516(7530):192-7. Nat Commun. 2014 Dec 10;5:5613. Nat Commun. 2014 Dec 10;5:5522. Nat Commun. 2014 Dec 10;5:5619.)。

さらにウォルツェングループは Klf4 のアイソフォームが Klf4 の相対的なタンパク発現に変化をもたらし、初期化過程に影響を及ぼすことを明らかにした (Stem Cell Reports. 2015)。Klf4 の発現が低い場合は初期化早期が促進されるのに対して、後期過程は抑制されることが分かった。Klf4 の発現が低い場合に形成されるコロニーは外来性初期化因子の発現に依存しており、F-Class 細胞との類似性が認められた。日本側チームが報告した小児がん類似細胞、低 Klf4 発現による部分初期化細胞と、カナダ側 F-Class 細胞はいずれも細胞初期化過程で出現する細胞であるものの、異なる性質を有する。例えば F-Class 細胞は多能性を有する点で日本側小児がん類似細胞と異なる。また F-Class 細胞や低 Klf4 発現による部分初期化細胞が外来性初期化因子発現に依存的であるのに対して、小児がん類似細胞では外来性初期化因子の発現が認められない等の違いもある。今後、日本、カナダそれぞれのグループが見いだした細胞初期化過程で出現する異なる性質を持つ細胞を比較解析することで、細胞運命の維持やその改変におけるエピゲノム制御機構の解明につながることを期待される。

H26 年度には、カナダ、バンクーバーにおいて両国の研究者が集い、研究の進捗状況を確認するとともに、今後の方針についての議論を行った。

## 1-2. 研究実施内容

### 生体内での体細胞初期化システムを使った準安定的細胞の形成過程に関わるエピジェネティック修飾状態の同定 (計画【1】【2】【3】【4】に関連)

山田グループは生体内細胞初期化システムの解析を行った。生体内で細胞初期化因子を誘導すると、がん類似した異型細胞の増殖が確認された。それら異型細胞の増殖は、生理的条件下では細胞増殖が盛んでない膵臓や腎臓等にも確認された。一方で細胞初期化因子の発現を短期間(4-6日間)で停止させると、異型細胞は速やかに消失することが分かった。少なくとも一部は正常な形態を示す非腫瘍性細胞へと変化した。体細胞のエピジェネティックなメモリーの存在が示唆された。しかしながら、細胞初期化因子を7日間誘導することで、複数の臓器に未分化な異型細胞の増殖からなる腫瘍を形成することを示した。それらの腫瘍はWilms腫瘍に代表されるような小児がん類似していることを明らかにした。細胞アイデンティティの消失に関与するエピゲノム制御が小児がんの発生と関連していることが示唆された。発生したがん細胞は完全初期化により多能性幹細胞へと変換し、非腫瘍性の腎臓細胞に分化可能であることを示した。これらの成果から、不完全な細胞初期化によるエピゲノムの改変ががん細胞に類似した状態を引き起こすことが明らかとなった(Cell 156(4):663-77, 2014)。実際にDNAメチル化解析により、小児がん類似したがん細胞では、部分的に多能性幹細胞に類似したDNAメチル化修飾状態を示すことを確認した。特にがん細胞では多能性幹細胞特異的なDNAメチル化の獲得は認められるものの、元来の体細胞に特異的なDNAメチル化が維持されていることが分かった(図)。一方でカナダ側Nagyグループは、

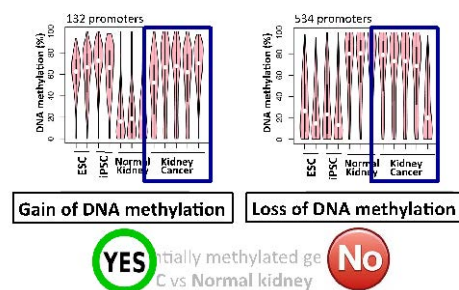
不完全な細胞初期化によるF-Class細胞の作製を報告し、F-Class細胞の網羅的エピゲノム状態(DNAメチル化、ヒストン修飾状態など)を明らかにした(Nature, 2014 Dec 11;516(7530):198-206. Nature, 2014 Dec 11;516(7530):192-7. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5613. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5522. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5619.)。日本側チームが報告した小児がん類似細胞と、カナダ側F-Class細胞はいずれも不完全な細胞初期化に関連した細胞であるものの、F-Class細胞は多能性を有する点で日本側小児がん類似細胞と異なる。またF-Class細胞が初期化因子発現に依存的であるのに対して、小児がん類似細胞では初期化因子の発現が認められない等の違いもある。これらの細胞初期化過程で出現する異なる細胞を理解することで、細胞運命の維持やその改変におけるエピゲノム制御機構の解明につながることを期待される。

不完全な細胞初期化によるF-Class細胞の作製を報告し、F-Class細胞の網羅的エピゲノム状態(DNAメチル化、ヒストン修飾状態など)を明らかにした(Nature, 2014 Dec 11;516(7530):198-206. Nature, 2014 Dec 11;516(7530):192-7. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5613. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5522. Nat Commun, 2014 Dec 10;5:5619.)。日本側チームが報告した小児がん類似細胞と、カナダ側F-Class細胞はいずれも不完全な細胞初期化に関連した細胞であるものの、F-Class細胞は多能性を有する点で日本側小児がん類似細胞と異なる。またF-Class細胞が初期化因子発現に依存的であるのに対して、小児がん類似細胞では初期化因子の発現が認められない等の違いもある。これらの細胞初期化過程で出現する異なる細胞を理解することで、細胞運命の維持やその改変におけるエピゲノム制御機構の解明につながることを期待される。

### 少数細胞を用いたChIP-seq解析系の確立 (計画【1】【2】【3】に関連)

マウス個体を用いたin vivoでのリプログラミング解析系を用いる場合、いろいろな種類および異なる分化ステージの細胞のエピゲノム情報を解析することが可能で、様々な状態の細胞におけるリプログラミング現象を解析するには有効である。しかし個体組織を用いる場合、解析に使用できる細胞数が非常に限られることがある。眞貝グループでは、ごく少数の細胞を用いたChIP-seq解析を行うために、これまでどこまで細胞数を少なくできるかの検討を行った。Illumina HiSeq用のライブラリーを作製する場合、最低100-500bpサイズのChIPed DNAがおおよそ100pg必要となる。通常スケールの $8 \times 10^5$ 個細

#### 網羅的DNAメチル化解析



胞(マウス ES 細胞)を用いたヒストン H3K9me3 の Native ChIP からは、約 80ng のそのレンジサイズの DNA が得られる。よって  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  個にスケールダウンした場合、0.5ng, 10ng の収量が見積られる。実際に  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^5$  細胞で ChIP を行った結果、それぞれ約 1.2ng, 12ng の DNA が得られた。 $1 \times 10^5$  細胞を用いたときの ChIPed DNA のサイズ分布を Bionanalyzer を用いて調べたところ、全体の約 25%が 100-500bp に分布していた。よって、100pg の DNA を得るには、最低 2,000 個の細胞が必要、つまりこの細胞数が微量細胞 ChIP の限界であると推測された。また H3K27me3 の場合、通常の  $8 \times 10^5$  個の細胞から約 20ng の DNA が得られるため、5,000 細胞数が少数限界と考えられた。

そこで、平成 26 年度は、微量細胞からスタートした ChIPed DNA によるライブラリー作製と ChIP のクオリティの評価を行った。その結果、 $5 \times 10^3$  個、 $1 \times 10^5$  個のマウス ES 細胞を用いて抗ヒストン H3K9me3 の抗体で ChIP を行った後 illumina HiSeq 用のライブラリーを作製し、H3K9me3 の enrichment がみられる領域 IAP とネガティブな領域 Gapdh を比較したところ、 $5 \times 10^3$  細胞でも IAP での H3K9me3 の enrichment が確認できた。ただし、 $5 \times 10^3$  細胞にすると、 $1 \times 10^5$  個サンプルに比べて S/N 比が低下する傾向がみられた。現在、この問題を改善する検討を行い、完全が見られたら、 $5 \times 10^3$  個の細胞での目的とするサンプルの ChIP-seq 解析を進める予定である。

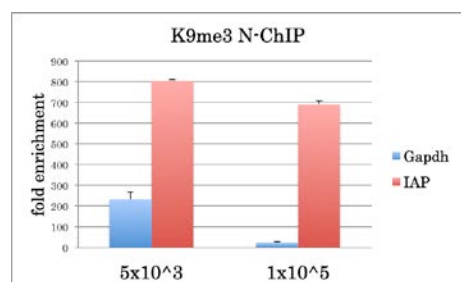


Fig. 少数細胞を用いて作製した ChIP-seq 用ライブラリーの qPCR による validation

### 細胞初期化過程における Klf4 の役割解明 (計画【1】【3】に関連)

#### 1) ポリシストロニック・カセットによる初期化の評価

マウスにおける初期化の研究には、様々なポリシストロニック発現カセットが開発されてきた。ウォルツェングループは、これらの因子の順序による影響を調べるため、ドキシサイクリン応答型のカセットをもつピギーバック (PB)・トランスポゾンベクターを用いて統一的に検証を行った。初期化は、開始・成熟・安定化の3段階に分けて考えられているが、このシステムでは、初期化の開始・成熟は、AP 染色陽性コロニー数で、多能性の安定化は導入遺伝子の活性化で表れる mCherry のサイレンシングおよび Nanog 遺伝子の活性化による GFP の発現で示される。

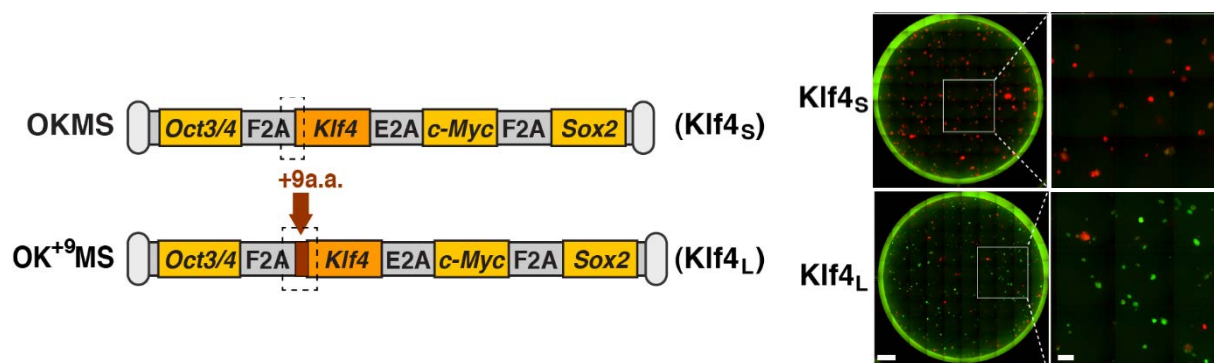
まず初めに、10日目のコロニーの AP 染色により、既に公表されているポリシストロニック・カセットである OSKM (Carey et al., 2009) と今回作製した OKMS を比較した。すると、遺伝子の導入効率は同じであるにも関わらず、OKMS では明らかに AP 染色されたコロニーが多く見られ、OKMS は OSKM より体細胞の初期化の開始がより多く起こっていることが分かった。さらに、多能性の安定化を調べるため、誘導 18日目のマーカーの発現を調べると、OKMS では mCherry の発現が続くのに対して、OSKM では mCherry の発現は抑えられ、Nonog-GFP の発現が確認された。この結果は、OKMS の多くが部分的に初期化された状態であるのに対し、OSKM はより安定化された初期化に達することを示した。

#### 2) ポリシストロニック・カセット中の KLF4 アイソフォームによる初期化の違い

OSKM と OKMS によって、表現型が異なった原因を見つけるため、各初期化因子の DNA 塩基配列を検証した。すると面白いことに、KLF4 には N 末端長さが 9 アミノ酸異なる 2 つのアイソフォーム (短いタイプを KLF4<sub>s</sub>、長いタイプを KLF4<sub>l</sub> とする。)があり、OSKM には KLF4<sub>s</sub>、OKMS には KLF4<sub>l</sub> が使用されている

ことが判明した。そこで、KLF4 アイソフォームの初期化における影響を調べるため、KLF4<sub>s</sub> が使われている OKMS の KLF4 配列に 9 アミノ酸加え (OK<sup>+</sup>MS とする。) 初期化を誘導した。すると、OK<sup>+</sup>MS による初期化は OKMS とは表現型が異なり、KLF4<sub>L</sub> が使われている OSKM と同様に、mCherry の発現を抑え、Nanog-GFP の活性化が見られた (Fig. 1)。この結果より、KLF4<sub>s</sub> を KLF4<sub>L</sub> に伸長した OK<sup>+</sup>MS では、初期化の開始段階は抑えられるものの、多能性の安定化を促進することが分かった。

また、OMS に KLF4<sub>s</sub> と KLF4<sub>L</sub> をそれぞれ単体で発現するよう (モノシストロニック) に加えてもマーカーの発現に差が見られなかったことから、KLF4<sub>s</sub> と KLF4<sub>L</sub> による違いはポリシストロニック・カセットでのみ起こる現象であることが分かった。



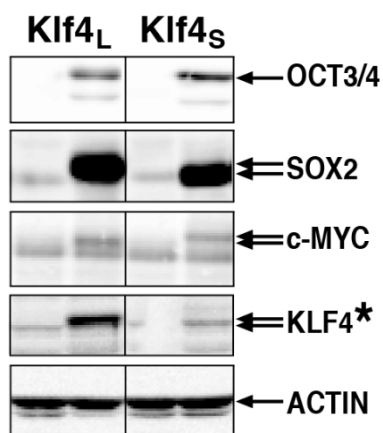
**Fig.1 ポリシストロニック・カセット中の KLF4 アイソフォームによる細胞の初期化状態の比較**  
(左)短いタイプの KLF4(KLF4<sub>s</sub>)が使用されている OKMS カセットの KLF4 の N 末端に 9 アミノ酸を付加し、長いタイプの KLF4(KLF4<sub>L</sub>)と同じ長さにした。

(右) KLF4<sub>s</sub> を含むカセットで誘導すると初期化の開始段階にある細胞が多く見られたのに対し、KLF4<sub>L</sub> を含むカセットでは、完全に初期化された細胞が見られた。

赤 : mCherry (部分的に初期化された状態) 緑 : Nanog-GFP (完全に初期された状態)

次に、ポリシストロニック・カセット中の導入遺伝子の発現を転写・翻訳レベルで評価した。mRNA の定量では OSKM と OKMS で同様の発現レベルを示したが、ウエスタンブロッティングでタンパク発現を解析すると、誘導 2 日目において、OCT3/4、SOX2、および c-MYC の発現は同等であったのに対して、驚くことに、KLF4 の発現が OKMS と比較して OSKM で高かった (Fig. 2)。この結果は、KLF4 タンパクの N 末端アミノ酸配列が、ポリシストロニック・カセットの KLF4 タンパク相対発現量に影響することを示唆している。

また、KLF4<sub>s</sub> を含む OKMS に、KLF4<sub>s</sub> と KLF4<sub>L</sub> をそれぞれモノシストロニックで加えると、OSKM や OK<sup>+</sup>MS で見られたのと同様に、コロニー数が減少し、また、mCherry の発現が抑えられ、Nanog-GFP が活性化された。OKMS に他の因子 (OCT3/4、SOX2、または c-MYC) を加えても、これらのマーカーの発現は OKMS と変化が無かった。よって、KLF4 タンパク発現量の閾値によって初期化の感度が左右される可能性を示している。



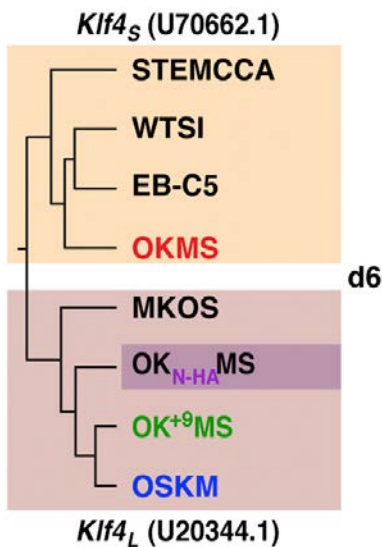
**Fig.2 ポリシストロニック・カセット中の KLF4 アイソフォームによる  
初期化因子のタンパク発現の比較**

KLF4<sub>L</sub>を含むカセットで誘導すると KLF4 の発現が高い。

3) KLF4 アイソフォームによるポリシストロニック・カセットの分類

誘導 6 日目の mCherry を発現している細胞を用いて、初期化開始時の遺伝子発現をマイクロアレイにより網羅的に解析した。OKMS と OSKM (または OK<sup>+</sup>MS) で比較すると、OKMS では、初期化の途中段階を示すマーカーが多く、OSKM (または OK<sup>+</sup>MS) では上皮に関するマーカーが多く見られた。

また、8つのポリシストロニック・カセット (PB-TAC-OSKM, -OKMS, -OK<sup>+</sup>MS, -OK<sub>N-HA</sub>MS, -MKOS, -STEMCCA, -EB-C5, -WTSI) について、同様に誘導 6 日目の遺伝子発現を調べ、系統樹を作成した (Fig. 3)。上記のポリシストロニック・カセットについて DNA 塩基配列を調べると、KLF4<sub>S</sub> と KLF4<sub>L</sub> が様々に使われていたが、作成された系統樹を見ると、KLF4 の長短によって、発現パターンの近いものとして分類されていた。面白いことに、N 末端に HA タグを付加した OK<sub>N-HA</sub>MS も KLF4<sub>L</sub> と同じクラスターに分類された。このように、ポリシストロニック・カセットの統一的な比較によって、KLF4 のアイソフォームが KLF4 の相対的な発現に変化をもたらし、初期化過程に影響を及ぼすことが判明した。



**Fig.3 初期化開始段階での発現パターンにより作成した  
シストロニック・カセットの系統樹**  
用いられた KLF4 アイソフォームによって明確に分類されている。

ミーティング

2014 年 6 月 16 日にカナダ、バンクーバーにおいて両国の研究者が集い、研究の進捗状況を確認するとともに、今後の方針についての議論を行った。日本側からは山田、眞貝、ウォルツェン、山田研究室 蟬、眞貝研究室 加藤が参加し、カナダ側からは Nagy, Ellis, Trembrey, Ema, Nagy 研究室 postdoc 2 名、Nagy 研究室 lab manager 1 名が参加した。

## 2. 研究実施体制

### 2-1. 日本側の研究実施体制

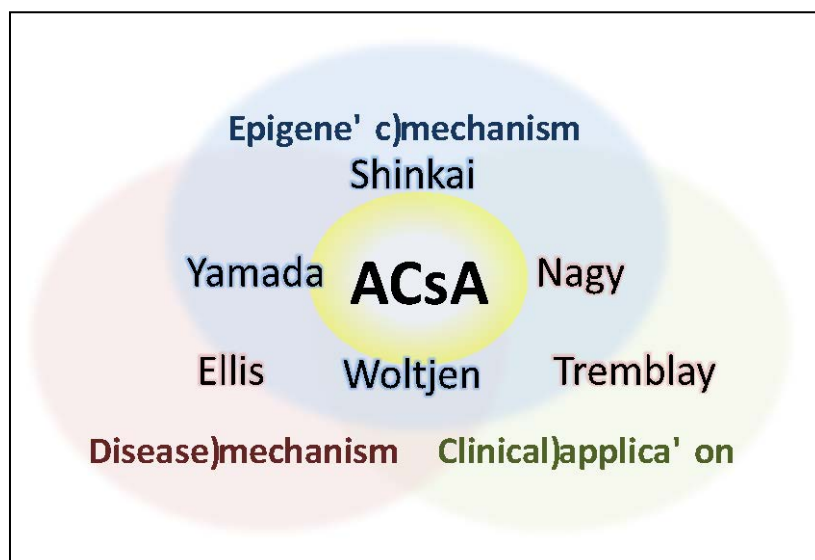
研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	山田 泰広	京都大学	iPS 細胞研究所	教授
主な共同研究者	眞貝 洋一	理化学研究所	眞貝細胞記憶研究室	主任研究員
主な共同研究者	クヌート ウォルツ エン	京都大学	iPS 細胞研究所	准教授

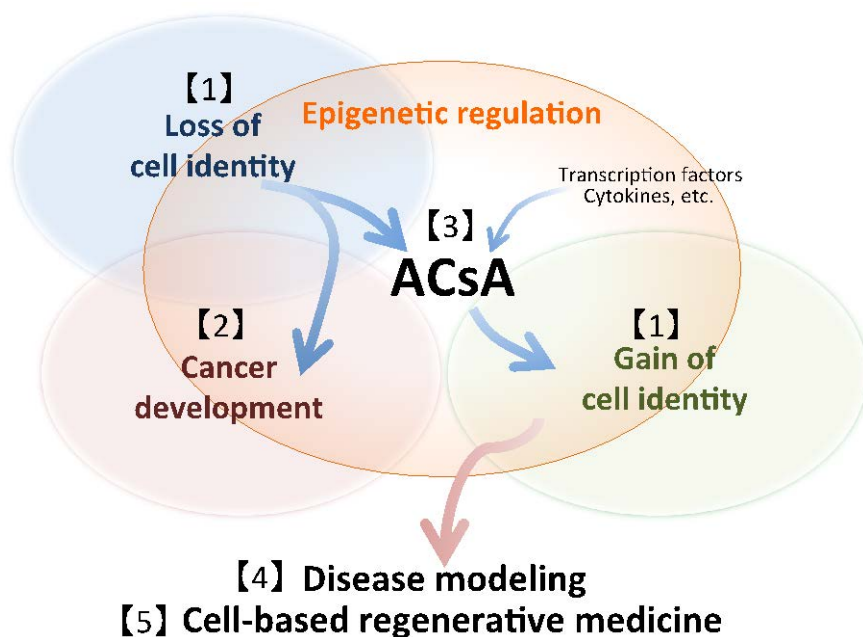
### 2-2. 相手側の研究実施体制

研究代表者/ 主な共同研究者	氏名	所属	所属部署	役職
研究代表者	アンドラス ナギ ー	マウント・サイナイ病院	サミュエル ルネ ンフェルド研究所	上席研究員
主な共同研究者	ジェームス エリス	トロント小児病院	発生・幹細胞部 門	上席研究員
主な共同研究者	ジャック トレンベ リー	ラバル大学	分子医学講座	教授

### 2-3. 両国の研究実施体制

## ACsA; Assisted Cell-state Alteration





- 【1】 初期化因子発現による iPS 細胞を含む準安定的細胞の形成過程に関わるエピジェネティック修飾状態の同定（細胞アイデンティティの消失、獲得に関わるエピジェネティクス制御の同定）  
山田、ウォルツェン、眞貝、Nagy、Ellis グループ
- 【2】 がん化に関わる準安定的細胞のエピジェネティック修飾状態の同定  
山田、眞貝グループ
- 【3】 エピジェネティクス制御による効果的な細胞運命制御方法 ACsA の開発  
眞貝、Nagy、ウォルツェン、Ellis グループ
- 【4】 細胞運命制御方法 ACsA を活用した疾患発症メカニズムの解明  
山田、ウォルツェン、Ellis グループ
- 【5】 細胞運命制御方法 ACsA を活用した細胞移植治療用分化細胞の誘導  
Tremblay、Nagy、ウォルツェングループ



### 3. 原著論文発表

#### 3-1. 原著論文発表

##### ① 発行済論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	( 0 件)
国際誌 5 件	( 0 件)
計 0 件	( 0 件)

※本共同研究の相手側チーム研究者との共著に限る

- \* Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, **Woltjen K, Yamada Y**. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014 156(4):663-77.

生体内体細胞初期化マウスモデルを作製し、体細胞アイデンティティ消失過程を検討した。その結果、不完全な細胞初期化により、細胞アイデンティティの消失を伴うがん細胞が出現することを示した。

Yamada Y, Haga H, **Yamada Y**. Concise Review: Dedifferentiation Meets Cancer Development: Proof of Concept for Epigenetic Cancer. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Oct;3(10):1182-7.

Matsuda Y, Semi K, **Yamada Y**. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor. *Pathol Int*. 2014 Jul;64(7):299-308.

Ohnishi K, Semi K, **Yamada Y**. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 5;455(1-2):10-15.

- \* Kim SI, Ocegüera-Yanez F, Hirohata R, Linker S, Okita K, **Yamada Y**, Yamamoto T, Yamanaka S, **Woltjen K**. KLF4 N-Terminal Variance Modulates Induced Reprogramming to Pluripotency.

Klf4 には 2 種類のアイソフォームが存在することを見だし、アイソフォームの違いがタンパクレベルの違いを引き起こし、細胞初期化中途過程に影響を及ぼすことを見いだした。

##### ② 未発行論文数

	うち、相手側チームとの共著 (※)
国内誌 0 件	( 0 件)
国際誌 0 件	( 0 件)
計 0 件	( 0 件)

※本共同研究の相手国チーム研究者との共著に限る

以上