

令和元年5月30日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07244

研究課題名(和文) X染色体再活性化の空間的・経時的解析を通じたエピジェネティクス制御開始機構の解析

研究課題名(英文) Spatially and time-dependent analysis of initial phase of epigenetic regulation in X chromosome reactivation

研究代表者

西村 健 (Nishimura, Ken)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80500610

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)：メスの体細胞を初期化してiPS細胞を誘導する際、不活化されていたX染色体からの転写の再開(再活性化)が起きるが、多能性が低いiPS細胞では再活性化が不十分であるという報告がある。そこで我々は、X染色体再活性化開始領域を同定し、それらの情報を元に、多能性が高いiPS細胞の誘導方法を構築することを試みた。その結果、X染色体の活性化状態を定量的に解析できるSNP cDNA typing法の構築に成功し、その方法を用いて、X染色体の再活性化段階の異なるiPS細胞を分離した。そして、それらのiPS細胞におけるRNA転写プロファイルの情報から、X染色体の再活性化開始領域の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果を元に、X染色体の再活性化を引き起こす分子の同定を始めとして、X染色体再活性化の分子機構解析が進むと考えられる。そしてその知見を生かして、iPS細胞誘導時にX染色体再活性化を効率良く引き起こすことが可能になり、最終的に、高い多能性を獲得した高品質iPS細胞を効率良く誘導する方法の確立につながる事が期待される。このような技術は、iPS細胞を用いた再生医療の実用化に大きく貢献すると考えられることから、大きな学術的、社会的意義があると思われる。

研究成果の概要(英文)：When we produce iPS cells, a transcription of RNA from an inactivated X chromosome is induced. And the induction is insufficient in a partially-reprogrammed iPS cells. Thus, we tried to find regions from which the X chromosome reactivation starts and investigate a mechanism to produce well-reprogrammed iPS cells. We succeeded to develop SNP cDNA typing system which can determine the X chromosome reactivation and, by using the system, isolate iPS cells with different reactivation state. A transcriptional profile in the iPS cells made us identify the initiation regions of the X chromosome reactivation.

研究分野：分子細胞生物学、幹細胞工学

キーワード：iPS細胞 X染色体 エピジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティックな遺伝子発現調節は、ガンや細胞分化など、様々な生命現象において重要な役割をしているが、その分子機構については未だに不明な点が多い。例えば、ヘテロクロマチン構造が近隣の遺伝子領域に伝播し、遺伝子発現が抑制される機構については、多くの知見が得られているが、そのきっかけとなる最初のエピジェネティックな変化が、「どこで」「いつ」「どのように」起きるかという分子機構に関しては、あまり詳細に解析されていない。よって、エピジェネティクス制御の開始機構について、空間的・経時的に解析することは、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構を理解するために非常に重要である。

ヒトやマウスのメスの体細胞では、二本ある X 染色体のうち一本の X 染色体で、Xist RNA を中心とした機構により、エピジェネティックに遺伝子発現が抑制(不活性化)されている。メスの受精卵からの発生では、胚盤胞期では二本の X 染色体が活性化されており (XaXa) その後発生が進むと、そのうち一本が不活性化される (XaXi)。そのため、メスのマウス胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたマウス ES 細胞の X 染色体は、XaXa であるのに対し、それより発生が進んだ、着床後のエピプラストから樹立されたマウスエピプラスト幹細胞では XaXi になっている。この二種類の細胞は、共に多能性幹細胞としての性質を有しており、三胚葉全てに分化することが可能であるが、エピプラスト幹細胞は、キメラ形成能が無いなどの点で、ES 細胞よりも多能性が劣ると考えられている。また、マウスのメスの体細胞を初期化して iPS 細胞を誘導する際、その過程で X 染色体の再活性化が起きるが、初期化が完全で高い多能性を有した iPS 細胞では XaXa になっているのに対し、初期化が不完全で多能性が低い iPS 細胞では XaXi になっているという報告がある。よって、エピプラスト幹細胞や iPS 細胞誘導の知見から、X 染色体の再活性化と多能性は大きく相関していることが示唆されている。

iPS 細胞の再生医療への応用のためにも、高い多能性を持った、高品質な iPS 細胞を安定して樹立する必要があるため、X 染色体の再活性化機構を解明することが非常に重要である。しかし、従来の iPS 細胞誘導方法では、多能性が不均質な細胞群しか誘導できないため、そのような細胞群を用いて誘導過程を解析することは困難であった。それに対し我々は、独自の iPS 細胞誘導方法の特長を活かし、Klf4 遺伝子発現量依存的に様々な段階で初期化が停止した、多能性の異なる均質な細胞群 (Paused iPS 細胞) を、再現性良く得ることに成功している (Nishimura K. et al. 2014)。

### 2. 研究の目的

X 染色体の再活性化段階の異なる Paused iPS 細胞を用いて、iPS 細胞誘導において、いつ、どの部位から X 染色体の再活性化が開始されるか、空間的・経時的解析を行う。そして、再活性化開始領域に結合する分子を同定することによって、X 染色体再活性化の開始機構について詳細な解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### 1) 誘導元体細胞の用意

iPS 細胞誘導の元細胞には、X 染色体がランダムに不活性化された細胞ではなく、二本のうちいずれか一本のみが不活性化された細胞を用いる必要がある。そこで、C57BL/6J 由来の Hprt 遺伝子ノックアウトマウスと、野生型の M. spretus を掛け合わせて MEF を作製する。そして、この MEF を HAT 培地で培養することにより、Hprt 発現細胞すなわち M. spretus 由来の X 染色体が活性化されている MEF を選択して、iPS 細胞誘導元細胞として用いる。

#### 2) SNP cDNA typing 法の構築

MEF の二本の X 染色体間の一塩基多型 (SNP) を区別できる TaqMan プローブを作製する。そして、それを用いたリアルタイム PCR により、各 X 染色体からの RNA 転写を定量的に検出する系を構築する。

#### 3) Paused iPS 細胞に対する SNP cDNA typing

Klf4 発現量を調節し、様々な段階で初期化が停止した Paused iPS 細胞を、bXi,sXa の MEF から誘導する。そして、SNP cDNA typing によって各 paused iPS 細胞における X 染色体の再活性化状態を解析できることを確認する。

#### 4) Paused iPS 細胞の X 染色体再活性化に対する空間的解析

X 染色体の再活性化状態が異なる Paused iPS 細胞を用意し、それらについて、RNA-seq 解析を行い、SNP を読み分けることによって、X 染色体の再活性化の早い時期に転写が開始される領域を同定する。

## 4 . 研究成果

### 1 ) 誘導元体細胞の用意

B6由来のHprt 遺伝子ノックアウトマウスとSpを掛け合わせて、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)を作製した。そして、このMEFをHAT培地で培養することにより、Hprt発現細胞、すなわちSp由来のX染色体が活性化されている(bXi,sXa)MEFを選択することに成功した。

### 2 ) SNP cDNA typing法の構築

X染色体にコードされているLamp2遺伝子やMsn遺伝子上のSNPを区別できるTaqManプローブを作製し、それらを用いたリアルタイムPCRによって、各X染色体からのRNA転写を定量的に検出することに成功した。さらにこのSNP cDNA typingで得られた比率がX染色体から転写されたRNAの比率を反映しているか検討するために、転写されているRNAをクローニングして実際に配列を読んでどちらのSNPを持つかが調べることによって比率を検討した。その結果、クローニングで得られたSNPの比率の結果とSNP cDNA typingの結果がほぼ一致したので、SNP cDNA typingで得られた結果は実際のRNA転写比率を反映していることを明らかにした。

### 3 ) Paused iPS細胞に対するSNP cDNA typing

X染色体再活性化を経時的に解析するために、我々独自の3S reprogramming systemを用いて作製した、誘導が途中で停止したiPS細胞に対してSNP cDNA typingを行い、X染色体の再活性化状態の異なるiPS細胞を誘導できるか検討した。その結果、低Klf4発現で誘導されたiPS細胞では再活性化が起きていなかったのに対し、高Klf4発現で誘導された細胞では再活性化が起きていた。このことから、iPS細胞誘導の経時的な進行度とX染色体再活性化を、Klf4発現量を調節することによって対応させることが可能であり、Klf4を変えて誘導したiPS細胞を用いて、経時的なX染色体再活性化の解析が可能であることを明らかにした。

### 4 ) Paused iPS細胞のX染色体再活性化に対する空間的解析

3)で得られた、X染色体の再活性化状態の異なるiPS細胞において、X染色体上のどの領域から転写が起きているかRNA-seqによって明らかにし、その情報を元にX染色体再活性化において転写が開始される領域を同定することを試みた。

まず始めに、二本あるX染色体のいずれからRNAの転写が起きているか区別するためのRNA-seqの条件を決めるために、B6とSpを掛け合わせたマウスの体細胞から抽出したRNAに対してRNA-seqを行い、SNPの読み分けを試みた。その結果、通常のRNA-seqより2倍程度深く読むことによってSNPの区別が可能であることを明らかにした。次に、同様の条件を用いて、X染色体の再活性化状態の異なるiPS細胞についてRNA-seqを行い、各細胞におけるX染色体全体の転写プロファイルの情報を得た。SNPを用いて、各細胞において不活化X染色体からRNAが転写されている領域を探索した結果、X染色体上の二つの領域から、X染色体再活性化初期にRNAが転写されていることを明らかにした。

今後は、この同定した領域に結合する転写因子やヒストン修飾を明らかにすることによって、X染色体再活性化の分子機構を明らかにすることが期待される。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 20 件)

Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K: Live-cell imaging of subcellular structures for quantitative evaluation of pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, Vol. 9, 1777, 2019 (査読有)

doi:10.1038/s41598-018-37779-x

Tsakamoto M, Nishimura T, Yodoe K, Kanegi R, Tsujimoto Y, Alam ME, Kuramochi M, Kuwamura M, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Inaba T, Sugiura K, Hatoya S: Generation of Footprint-Free Canine Induced Pluripotent Stem Cells Using Auto-Erasable SendaiVirus Vector. *Stem Cells Dev.*, Vol.27(22), 1577-1586, 2018 (査読有)

doi.org/10.1089/scd.2018.0084

Nishino K, Arai Y, Takasawa K, Toyoda M, Yamazaki-Inoue M, Sugawara T, Akutsu H, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Umezawa A: Epigenetic-scale comparison of human

iPSCs generated by retrovirus, Sendai virus or episomal vectors. *Regenerative Therapy*, Vol. 9, 71-78, 2018 ( 査読有 )

doi:10.1016/j.reth.2018.08.002.

Tran THY, Fukuda A, Aizawa S, Bui PL, Hayashi Y, Nishimura K, Hisatake K: Live cell imaging of X chromosome reactivation during somatic cell reprogramming. *Biochem. Biophys. Rep.* Vol. 15, 86-92, 2018 ( 査読有 )

doi: 10.1016/j.bbrep.2018.07.007.

Kubara K, Yamazaki K, Ishihara Y, Naruto T, Lin HT, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Ito M, Tsukahara K, Morio T, Takagi M, Otsu M: Status of KRAS in iPS cells impacts upon self-renewal and differentiation propensity. *Stem Cell Rep.*, Vol. 11(2), 380-394, 2018 ( 査読有 )

doi: 10.1016/j.stemcr.2018.06.008.

Saito A, Ooki A, Nakamura T, Onodera S, Hayashi K, Hasegawa D, Okudaira T, Watanabe K, Kato H, Onda T, Watanabe A, Kosaki K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakamoto T, Yamaguchi A, Sueishi K, Azuma T: Targeted reversion of induced pluripotent stem cells from patients with human cleidocranial dysplasia improves bone regeneration in a rat calvarial bone defect model. *Stem Cell Res. Ther.*, Vol. 9(1), 12, 2018 ( 査読有 )

doi: 10.1186/s13287-017-0754-4

西村健、久武幸司 : Tcl1 による代謝リプログラミングが iPS 細胞誘導を促進する、医学のあゆみ、医歯薬出版、Vol. 265(4)、293-294 頁、2018 ( 査読無 )

西村健、Tran NVK、久武幸司 : 新規ベクターシステムを利用した高純度分化細胞単離法、PHARMASTAGE、Vol. 17(10)、11-15 頁、2018 ( 査読無 )

Kuno A, Nishimura K, Takahashi S: Time-course transcriptome analysis of human cellular reprogramming from multiple cell types reveals the drastic change occurs between the mid phase and the late phase. *BMC Genomics*, Vol. 19, 9, 2018 ( 査読有 )

doi:10.1186/s12864-017-4389-8

Hasegawa D, Ochiai-Shino H, Onodera S, Nakamura T, Saito A, Onda T, Watanabe K, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Kosaki K, Yamaguchi A, Shibahara T, Azuma T: Gorlin syndrome-derived induced pluripotent stem cells are hypersensitive to hedgehog-mediated osteogenic induction. *PLoS ONE*, Vol. 12(10), e0186879, 2017 ( 査読有 )

doi: 10.1371/journal.pone.0186879

Nishimura K, Ohtaka M, Takada H, Kurisaki A, Tran NVK, Tran YTH, Hisatake K, Sano M, Nakanishi M: Simple and effective generation of transgene-free induced pluripotent stem cells using an auto-erasable Sendai virus vector responding to microRNA-302. *Stem Cell Res.*, Vol. 23, 13-19, 2017 ( 査読有 )

doi.org/10.1016/j.scr.2017.06.011

Nishimura K, Aizawa S, Nugroho FL, Shiomitsu E, Tran YTH, Bui PL, Borisova E, Sakuragi Y, Takada H, Kurisaki A, Hayashi Y, Fukuda A, Nakanishi M, Hisatake K: A role for KLF4 in promoting the metabolic shift via TCL1 during induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cell Rep.*, Vol. 8(3), 787-801, 2017 ( 査読有 )

doi: 10.1016/j.stemcr.2017.01.026.

Hayashi Y, Hsiao EC, Sami S, Lancero M, Schlieve CR, Nguyen T, Yano K, Nagahashi A, Ikeya M, Matsumoto Y, Nishimura K, Fukuda A, Hisatake K, Tomoda K, Asaka I, Toguchida J, Conklin BR, Yamanaka S: BMP-SMAD-ID promotes reprogramming to pluripotency by inhibiting p16/INK4-dependent senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, Vol. 113(46), 13057-13062, 2016 ( 査読有 )

doi: 10.1073/pnas.1603668113

Yamashita-Sugahara Y, Matsumoto M, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Mitani K, Okazaki Y: An inhibitor of fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR1) promotes late-stage terminal differentiation from NGN3+ pancreatic endocrine progenitors. *Sci. Rep.*, Vol. 6, 35908, 2016 ( 査読有 )

doi:10.1038/srep35908

Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K: Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep.*, Vol. 15(6), 1228-1241, 2016 (査読有)

doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031.

Bueno C, Sardina JL, Di Stefano B, Romero-Moya D, Muñoz-López A, Ariza L, Chillón MC, Balanzategui A, Castaño J, Herreros A, Fraga MF, Fernández A, Granada I, Quintana-Bustamante O, Segovia JC, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Graf T, Menendez P: Reprogramming human B cells into induced pluripotent stem cells and its enhancement by C/EBP. *Leukemia*, Vol. 30(3), 674-682, 2016 (査読有)

doi: 10.1038/leu.2015.294.

Okamura K, Sakaguchi H, Sakamoto-Abutani R, Nakanishi M, Nishimura K, Yamazaki-Inoue M, Ohtaka M, Periasamy VS, Alshatwi AA, Higuchi A, Hanaoka K, Nakabayashi K, Takada S, Hata K, Toyoda M, Umezawa A: Distinctive features of single nucleotide alterations in induced pluripotent stem cells with different types of DNA repair deficiency disorders. *Sci. Rep.*, Vol. 6, 26342, 2016 (査読有)

doi: 10.1038/srep26342

Matsumoto T, Fujimori K, Andoh-Noda T, Ando T, Kuzumaki N, Toyoshima M, Tada H, Imaizumi K, Ishikawa M, Yamaguchi R, Isoda M, Zhou Z, Sato S, Kobayashi T, Ohtaka M, Nishimura K, Kurosawa H, Yoshikawa T, Takahashi T, Nakanishi M, Ohyama M, Hattori N, Akamatsu W, Okano H: Functional neurons generated from T cell-derived iPSCs for neurological disease modeling. *Stem Cell Rep.*, Vol. 6(3), 422-435, 2016 (査読有)

doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.010.

Kyttälä A, Moraghebi R, Valensisi C, Kettunen J, Andrus C, Pasumarthy KK, Nakanishi M, Nishimura K, Ohtaka M, Weltner J, Handel BV, Parkkonen O, Sinisalo J, Jalanko A, Hawkins RD, Woods NB, Otonkoski T, Trokovic R: Genetic variability overrides the impact of parental cell-type and determines iPSCs differentiation potential. *Stem Cell Rep.*, Vol. 6(2), 200-212, 2016 (査読有)

doi: 10.1016/j.stemcr.2015.12.009.

Yamasaki S, Hamada A, Akagi E, Nakatao H, Ohtaka M, Nishimura K, Nakanishi M, Toratani S, Okamoto T: Generation of cleidocranial dysplasia-specific human induced pluripotent stem cells in completely serum-, feeder-, and integration-free culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal*, Vol. 52, 252-264, 2016 (査読有)

doi: 10.1007/s11626-015-9968-x

〔学会発表〕(計 22 件)

西村健: 再生医療や創薬研究を支援する高純度分化細胞選択法の開発、第1回筑波大学産学連携シンポジウム、2019年3月15日(東京)

西村健: 再生医療や創薬研究を支援する高純度分化細胞選択法、革新的医療技術創出拠点プロジェクト平成30年度成果報告会、2019年2月27, 28日(東京)

Chiu CH, Nishimura K, Hisatake K: Isolation of a pure population of differentiated cells using auto-erasable vector、TGSW2018、2018年9月20日(つくば)

Nishimura K, Ishiwata H, Sakuragi Y, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K: Quantitative Assessment of Pluripotent Stem Cells by an Improved RM-DIC Imaging System、2018 TERMIS World Congress、2018年9月6日(京都)

西村健: 安全な再生医療を実現させる高純度分化細胞選択法、イノベーションジャパン2018、2018年8月30, 31日(東京)

石渡裕、西村健、久武幸司: RM-DIC顕微鏡を用いた無染色・非侵襲な多能性幹細胞の評価手法、第43回光学シンポジウム、2018年6月22日(東京)

Nishimura K, Kumar BA, Hayashi Y, Fukuda A, Hisatake K: KLF4-dose dependent metabolic shift through TCL1 during iPSC generation、ISSCR2018、2018年6月22日(Melbourne, Australia)

Bui PL, Nishimura K, Hisatake K: Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors、The Exploring identity: lessons from genomes and

epigenomes meeting、2018年5月31日(Paris, France)

相澤志穂、西村健、Nugroho FL、櫻木佑太、大高真奈美、林洋平、福田綾、中西真人、久武幸司：Klf4による多能性獲得はTcl1を介した代謝変化により起きる、第17回日本再生医療学会総会、2018年3月22日(横浜)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司：X染色体の再活性化をモデルとしたエピジェネティクス転写制御機構の解明、超異分野学会2018、2018年3月2日(東京)

西村健、相澤志穂、櫻木佑太、林洋平、福田綾、久武幸司：Tcl1による代謝リプログラミングはiPS細胞の多能性を向上させる、ConBio2017、2017年12月9日(神戸)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司：iPS細胞誘導におけるX染色体再活性化機構の解析、ConBio2017、2017年12月9日(神戸)

Bui PL、西村健、久武幸司：Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors、ConBio2017、2017年12月6日(神戸)

Bui PL、Nishimura K、Hisatake K：Mechanistic analysis of the initiation of retroviral gene silencing by reprogramming factors、The 6th Human Biology Symposium、2017年9月27日(つくば)

西村健、久武幸司、石渡裕：新規顕微鏡システムを用いた非染色・非侵襲な多能性定量系の開発、第16回日本再生医療学会、2017年3月7日(仙台)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司：iPS細胞誘導機構解明のためのX染色体再活性化状態定量システムの開発、第16回日本再生医療学会、2017年3月6日(仙台)

西村健、相澤志穂、Nugroho FL、櫻木佑太、大高真奈美、福田綾、中西真人、久武幸司：Tcl1-Aktを介したKlf4による代謝リプログラミングはiPS細胞の多能性を向上させる、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日(横浜)

相澤志穂、Bui PL、西村健、久武幸司：iPS細胞誘導におけるX染色体再活性化を定量化する方法の開発、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月1日(横浜)

西村健：再生医療の安全性を向上させる高純度分化組織の単離法、BioJapan 2016、2016年10月14日(横浜)

久武幸司、相澤志穂、Nugroho FL、櫻木佑太、林洋平、大高真奈美、福田綾、中西真人、西村健：iPS細胞誘導時のKLF4によるTCL1を介した代謝リプログラミング、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日(仙台)

⑳ Aizawa S, Bui PL, Nishimura K, Hisatake K : A quantitative method for analysis of X chromosome reactivation in iPSC production、The 5<sup>th</sup> Human Biology Symposium、2016年9月18日(つくば)

㉑ Nguyen TL, Kato T, Nishimura K, Hisatake K : Functional analysis of transcription factors that diminish the efficiency of iPSC production、The 5<sup>th</sup> Human Biology Symposium、2016年9月18日(つくば)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

(1)研究分担者：無し

(2)研究協力者：無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。