

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号： 2020B-15

課題名： iPS 細胞誘導による DNA メチル化変化に基づくエピゲノム医療基盤

主任研究者 (所属施設) 国立成育医療研究センター

(所属 氏名) システム発生・再生医学研究部 組織工学研究室 室長 岡村 浩司

制御領域の DNA メチル化は遺伝子発現抑制に深く関わるとされてきたが、近年の実験結果は必ずしも明確な相関を示していない。細胞のリプログラミングによる iPS 細胞の樹立では、元の体細胞とは明確なメチル化パターンの違いが見られ、かつそのクローン性はリプログラミング前後における遺伝的および培養による細胞分布の両面における均一性を保証する。本研究ではこれらの特徴を活用し、ヒト子宮内膜由来の細胞株、およびその iPS 細胞株について、遺伝子発現、DNA メチル化、ヒストン修飾の違いを調べ、比較検討を行った。リプログラミングによる高メチル化で発現量が 10 分の 1 以下となる遺伝子座は 12 で、その中にはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)をコードする *MMP1*、*MMP3*、および *MMP12* が含まれていた。これらに加え、*MMP2* も発現量が大きく減少していたが、メチル化の変化は gene body に見られ、プロモータ領域では H3K4me3 修飾が減少していることが確認された。*MMP1*、*MMP3*、*MMP12* を含む MMP ファミリー9 遺伝子は 11q22 でクラスターを形成しており、位置に依存した発現制御の違いがあり、クロマチン境界の存在と制御機構への関与が示唆された。さらに機械学習を利用し、未だに理解されていないメチル化および脱メチル化に関与するゲノム塩基配列の特徴抽出を試みた。得られた結果は、がん抑制遺伝子などを制御するエピゲノム療法、また人為的な発現制御を必要とする再生医療などに対し有用な基礎データとなる。

1. 研究目的

DNA メチル化は遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが長く知られてきたが、今では CRISPR/Cas9 ゲノム編集を応用したエピゲノム編集技術により、標的領域のメチル化状態を *in vivo* でさえ制御することが可能となった。しかしながらプロモータ領域のメチル化状態が発現と関わる遺伝子はむしろ少数であることが知られつつあり、任意の遺伝子に対してエピゲノム操作を行うことができる状況に至っていない。本研究ではヒト iPS 細胞とその親株という isogenic サンプル対を用い、塩基配列に依存する効果と細胞不均一性を排除した上で、細胞のリプログラミング前後における発現

とメチル化状態を比較し、プロモータ、エンハンサ、サイレンサ、インスレータ等に存在する遺伝子発現に関わる DNA メチル化サイトを同定する。また、それに伴うヒストンのメチル化修飾などクロマチンの変化についても必要な考察を行う。さらにディープリンング等、最新の機械学習を利用し、未だに理解されていないメチル化および脱メチル化に関与するゲノム塩基配列の特徴抽出を試みる。得られる結果は、がん抑制遺伝子などを制御するエピゲノム療法、また人為的な発現制御を必要とする再生医療などに対し有用な基礎データとなる。

2. 研究組織

研究者	所属施設
岡村 浩司	国立成育医療研究センター
片桐 沙紀	基礎生物学研究所
西野 光一郎	宮崎大学

3. 研究成果

個体にはいくつもの器官および組織があり、さらにさまざまな細胞が存在し、それぞれにおいて異なる遺伝子セットの発現制御がなされている。本研究課題の目標はできるだけ多くのヒト遺伝子について、それぞれの発現に深く関わるDNAメチル化サイトを同定することであり、そのためには多くの細胞種でiPS細胞株を樹立し、そのサンプル対に対してDNAメチル化の比較解析を行う必要がある。本年度は子宮内膜由来細胞およびそのiPS細胞株との比較解析から、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)遺伝子群について具体的な結果が得られた。

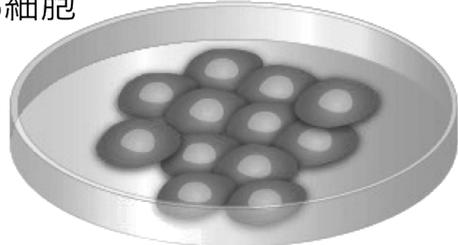
MMPはコラーゲンなど細胞外マトリックスを分解する酵素で、月経における剥離、脱落にも関与し、子宮内膜間質細胞においては*MMP1*や*MMP2*の高発現が見られる。この細胞を親株としてリプログラミングによりiPS細胞株を樹立させると、幹細胞においては不要であるためか上記2遺伝子のmRNA発現量は1/10以下に抑制される。メチル化アレイによるデータから、*MMP1*についてはプロモータ領域の1サイト、*MMP2*についてはgene bodyの離散的な数ヶ所の高メチル化が観察され、発現抑制に強く関わっている可能性がある。特に*MMP2*該当箇所にはエンハンサの存在が示唆されていた。*MMP20*については子宮における機能と関わりがないためか発現しておらず、iPS細胞でもオフのままであるが顕著な高メチル化を受けていた。*MMP20*に関する制御情報を得るためには、子宮内膜とは別の*MMP20*が発現している細胞をリプログラミングする必要がある。本研究では重要な役

体細胞



細胞のリプログラミングによる遺伝子発現、およびエピゲノム変化

iPS細胞



割を担うサイトを1塩基解像度で調べるため、メチル化アレイでなく、全ゲノムにわたって詳細なデータを取得することができるPBAT法を採用し、個々の遺伝子に対して同様の解析を行なっている。解析対象とする遺伝子が発現する細胞が見つからない場合は、iPS細胞を分化誘導することで発現を促し、その際のメチル化変化をiPS細胞と比較する必要がある。

本研究では、これまで独自に樹立させたiPS細胞株のデータに加え、一般に公開されているiPS細胞、ES細胞、その他多くの種類の体細胞のDNAメチル化データを取得して、ヒトiPS細胞特性判別システムを開発し、一般に公開した。

このシステムでは合計374ヒト由来サンプルのDNAメチル化データを、線形分類および勾配ブースティング決定木による機械学習にける訓練データ、テストデータとして利用し、判別モデルを完成させた。体細胞と多能性幹細胞の判別はもちろんであるが、意外なことにiPS細胞とES細胞の判別も可能であることが分かった。ニュ



ーラルネットワークに基づくディープラーニングとは異なり、線形分類や勾配ブースティング決定木によるアルゴリズムでは、分類に寄与した説明変数を重要度のランキングとともに取り出すことが可能である。この結果から、ES細胞と比べたiPS細胞の特徴を整理し、論文として発表することができた。得られた結果は、がん抑制遺伝子などを制御するエピゲノム療法、また人為的な発現制御を必要とする再生医療などに対し有用な基礎データとなる。

ヒトiPS細胞の特性を非破壊的に、廃棄する培養液に含まれる糖鎖から調べる方法についても研究を進めており論文として、また国内および米国における特許申請という形で成果が出つつあり、メチル化と関連させ発展させたいと考えている。

本研究はCpGメチル化を主なターゲットとしているが、ヒトとアカゲザルのゲノム配列を比較することでそ

の分子進化について考察した研究を論文発表することができた。本研究課題から得られる結果は、アカゲザルにおける対応するCpGサイトとも比較しながら発現制御における重要性について検討することが可能であると考えている。

DNAメチル化の培養条件による変化、RNAメチル化による発現の変化、その他次世代シーケンサを用いた発現制御の共同研究が今年度発表の論文になっており、また本研究課題でいずれ重要になるディープラーニングの技術に関する報告を責任著者としてプレプリント公開した。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究はヒト由来の組織サンプルを用い、細胞培養、iPS細胞樹立、遺伝子発現解析、DNAメチル化解析を主とするが、全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを行うため、個人のゲノム塩基配列決定を伴う研究である。すでに所属機関の倫理審査

委員会で承認を得ているが、社会的コンセンサスを理解した上で、ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針をはじめとする関連法令、特に「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」をよく理解した上で作業を行う。サンプル提供者に対して事後にさらなるサンプル提供や情報提供を求める必要

がないため、細胞サンプルは代表者が扱う段階ですでに匿名化されているもののみを収集対象とする。匿名化されているとはいえ、最終的にはゲノム塩基配列の一部を公開することになるためその扱いには最大限の注意を払う。