

分担研究報告書

分担研究課題 「モデル細胞の分化増殖過程におけるエピジェネティクス解析」

研究分担者 仁科 博史 東京医科歯科大学 難治疾患研究所
未来生命科学研究部門 発生再生生物学分野

研究要旨

本分担研究では、これまでに食経験のない、若しくはこれまでとは違った方法により摂取されるような新規食品を安全の視点から研究する。特に遺伝子変異やエピジェネティクス変化による解析等を検討し、細胞の分化増殖過程におけるハザード解析を検討する。

初期胚発生に観察される原始線条 (PrS) は中胚葉を生成し、その後の中胚葉以外の内胚葉や外胚葉由来のほぼすべての器官形成にも影響を及ぼす。それゆえ、PrS 形成の理解は正常器官形成の理解に重要である。しかしながら、PrS は微小で一過性の組織であるため、その形成機構の解明は困難である。研究分担者らは、まず PrS 形成に必須な遺伝子を同定する目的に、PrS の形成不全が致死的事であることに基づき、2 種類のノックアウトマウスデータベースを用いて包括的なスクリーニングを実施した。その結果、PrS 形成に必須な様々な細胞機能や反応に関わる 812 遺伝子を同定し、最も多いカテゴリは「代謝」であることを見出した。本研究では、スフィンゴ脂質代謝の遺伝子に着目し、*in vitro* のマウス ES 細胞分化系を用いて PrS 形成におけるその役割を検討した。その結果、細胞内セラミドの上昇が PrS 形成に必須な遺伝子発現をネガティブに制御し、代わりに神経細胞分化を誘導することを明らかにした。また、スフィンゴシン-1-リン酸 (セラミド誘導体) は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝が PrS の形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した (*Stem Cells* 2023)。

加えて、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。その結果、YAP の活性化の強さが閾値を超えると、肝がんが生じること、この時にゲノム DNA のメチル化変化 (エピジェネティック変化) が生じることを見出した。

A. 研究目的

初期胚発生において、個々の細胞は様々なシグナルを受け取り、互いに影響し合いながら複雑な事象を引き起こしている。これらの事象に関わる制御機構を解明することは、発生生物学のみならず、再生医療などの関連分野の進歩につながると考えられる。脊椎動物の初期胚では、すべての器官は外胚葉、中胚葉、内胚葉という3つの胚葉から形成される。中胚葉と内胚葉はともに中胚葉から発生し、上胚葉に原始線条 (PrS) と呼ばれる細胞溝を形成させる必要がある。しかし、PrS は微細かつ一過性の組織であるため、その形成の分子機構を完全に解明することは困難である。

胚性幹 (ES) 細胞の分化系は、エピブラストからの基本的な発生を駆動するプロセスを研究するための強力な *in vitro* ツールである。ES 細胞を懸濁培養すると、胚様体 (EB) と呼ばれる多細胞の集合体を形成し、生体内のエピブラストと同様の性質を持つ。マウスおよびヒトでは、EB を *in vitro* で3つの胚葉に分化させることができる。この方法は、マウス ES 細胞を心筋細胞、神経細胞、肝細胞など様々な細胞種に分化させるために頻繁に使用されており、その基礎的なメカニズムを解析することが可能である。最近では、マウス ES 細胞からの卵形成の全過程を *in vitro* で再現し、この *in vitro* で作製した卵から出産に成功した。また、ヒトにおいても、胚盤胞の形態、大きさ、細胞数、細胞系列構成の点で類似した構造物がヒト ES 細胞から *in vitro* で作成されている。

研究分担者らは、以前、ターゲットが既知の 1,600 種類の化合物ライブラリーをスクリーニングすることにより、PrS 形成に必須ないくつかの因子を同定した。我々の実験系では、マウス ES 細胞は EB 形成後、エピブラスト様状態に移行する。その後、3 日目から 4 日目にかけてブラキリー T や Wnt3 などの PRS マーカーを発現させ、PrS 形成を模倣する。EB 形成後 10 日目には、Bmp2 などの中胚葉マーカーの発現を伴い、細胞の拍動 (心筋細胞への分化) が観察される。我々は、この EB ベースのシステムを用いて、様々な代謝阻

害剤が PrS 形成を阻害することを示し、PrS 形成に重要な因子の同定にケミカルスクリーニングが有用であることを実証した。興味深いことに、いずれの場合も PrS 形成を阻害すると、エピブラストが神経外胚葉系にコミットし、中胚葉からの心筋細胞分化が低下することが確認された。これらの結果は、PrS の形成が神経分化に影響を与えることを示唆するものであり、遺伝子変異やエピジェネティクス変化による細胞分化増殖過程に影響を与える因子の同定の着想となった。

標的がわかっている化合物のライブラリーをスクリーニングすると、関連する遺伝子をすぐに特定できるという利点があるが、酵素や受容体の中にはライブラリー中の薬剤と対応しないものがあり、その検証ができないという欠点がある。この難点を回避するために、PrS 形成に必須な Brachyury T や HMGCR などの遺伝子の機能を欠損させたノックアウト (KO) マウスが、心臓などの臓器の発達不全により E10 までに致死することを利用した。この致死的な表現型を利用することで、より幅広い遺伝子を調べ、PrS 形成のメカニズムのより完全な姿を明らかにすることを目指した。そこで、2つの KO マウスデータベースを用いて、機能喪失によってマウス胚の E10 致死を引き起こす遺伝子を同定すること、そして、*in vitro* のマウス ES 細胞分化システムを用いて、PrS 形成に関与する新規因子の同定することを研究目的とした。

加えて、培養細胞の大量化の利用が期待され、他方で、調査において懸念されたハザードの一つである転写共役因子 YAP 遺伝子に着目し、この活性化の強弱の効果を解析する目的で、複数種類の活性化型 YAP をマウス肝に発現誘導した実験系を用いて検討した。

B. 研究方法

データベーススクリーニング

候補遺伝子は、本文に記載したように MGI データベース (Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org/>) および IMPC データベース (International Mouse Phenotyping Consortium) 33,34 をスクリー

ニングすることにより選定した。本研究で使用したデータは、2021年5月時点のものである。MGIデータベースにおいて、表現型用語「embryonic lethality between implantation and placentation」(ID: MP:0009850)は、E4.5~E9の間に胚死が起こったことを意味し、この基準で候補遺伝子を選択した。また、E14以前に胚死滅したことを意味する“embryonic lethality, complete penetrance”は補助的な基準として使用した。IMPCデータベースでは、K0マウス系統のアノテーションを行い、その致死表現型を報告している。K0マウスがE9以前に死亡する遺伝子を本研究の候補として選択した。ネットワーク解析には、NetworkAnalyst 3.0 (<https://www.networkanalyst.ca>)を使用した。

ES細胞の培養と分化

マウスES (mES) 細胞は、先に述べたようにLIFの存在下で培養することにより未分化状態に維持した。簡単に説明すると、フィーダー細胞非依存性のE14K mES細胞は、15%ウシ仔牛血清 (SFBM30-2362; Equitech-bio, Texas, USA) を補充したダルベッコ改変イーグル培地 (26400044; Gibco, Massachusetts, USA) および 0.1 mM 2-mercaptoethanol (M3148; Sigma, Burlington, USA)、LIFを入れたゼラチンコート皿で保持しました。LIFは、当研究所で以下のように自家生産した。簡単に説明すると、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO) 細胞に、LIF-ジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) を発現するベクターをトランスフェクションさせた。ベクターの増幅を誘導するために、メトトレキサート (MTX) (M8407; Sigma, Burlington, USA) を0.1 μ MでトランスフェクトしたCHO細胞に添加した。MTX処理を1週間行った後、CHO-LIF細胞をMTXフリー培地に移し、LIF産生を行った。24時間後、LIF含有培養上清を回収し、E14K mES細胞で試験し、多能性維持能力およびmES細胞の心筋細胞またはニューロンへの分化効率を確認した。

mES細胞 (3×10^3) をLIFを含まない培地で25 μ lの吊り下げ滴下で培養し、角皿 (栄研化学、東京、日本) 内でEBsを形成させた。2日後、EBをノンコート細菌シャーレ (IWAKI、東京、日本) に移し、懸濁培養を行った。6日目に、EBをゼラチンコーティングされた組織培養皿 (Corning, New York, USA) に移して、自発的な「心拍」を示す組織の領域が顕微鏡で検出できるようになる10日目まで付着培養を行った。EBは、特に断りのない限り、培養の3~6日目に阻害剤で処理した。

メタボローム解析

メタボローム解析は、株式会社ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT、山形県) に委託した。LC-TOF-MS分析前に酵素を不活性化するため、EBを10 mlの5%マンニトール溶液で洗浄し、内部標準物質を含む1 mlのエタノールで処理した。サンプルを氷上で5分間ウルトラソニケーションによりホモジナイズし、その後4,400 \times g、4°Cで5分間遠心分離を行った。上清を乾燥させ、200 μ lの50%2-プロパノールに溶解させた。LC-TOF-MSは、Agilent 1200 シリーズ RRLC システム SL を用いて実施された。化合物は、正および負のイオン極性モードの両方で分析された。検出されたピークは、Master Hands ver. 2.17.1.11. ピーク面積を評価し、内部標準物質の面積に正規化した。HMT代謝物ライブラリは、m/z値とリテンションタイムに基づいてピークに注釈を付けるために使用した。

RNAseq解析

RNA配列解析は、タカラバイオ株式会社 (日本、滋賀) に委託した。RNeasy Mini Kits (74104; QIAGEN, Hilden, German) を用いて、製造者の指示に従ってtotal RNAを抽出した。抽出したRNAをDNase I (2270B; Takara, Shiga, Japan) とインキュベートし、ゲノムを分解させた。RNAの品質は、まず1.5%アガロースゲルでの電気泳動で評価し、その後、吸光光度計で評価した。遺伝子は、fold-changeが2より大きいとき、差次的に発現し

ているとみなされた。GO解析は、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool (<https://david.ncifcrf.gov/>) を用いて行った。

プラスミド

Flag タグおよび Myc タグ×5 (5つの Myc がタンデムになっている) を付加した Full-length human YAP cDNA を pLIVE プラスミド (Mirus Bio) の Xba I サイトに挿入した発現ベクターを用いた。IRES 型プラスミドも同様に Flag-Myc-YAP (2SA)-IRES-NLS-Cre cDNA を pLIVE プラスミドの Xba I サイトに挿入した発現プラスミドを用いた。YAP (1SA), YAP (2SA), YAP (5SA) は PCR を用いてサイト特異的に変異を導入したものを用いた⁷。発現プラスミドに挿入されたそれぞれの cDNA はマウス AFP エンハンサーおよびマウス Albumin プロモーターによって発現が誘導される。

Hydrodynamic tail vein injection (HTVi) 発現プラスミド (20 μ g) をマウス体重の約 10% 量の TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (Mirus Bio) に希釈した (20-23g のマウスに対して 2 ml)。実験に使用するマウスの尻尾を 42-50°C のお湯に 20-30 秒浸し、2.5ml シリンジと 27G の注射針を用いて発現プラスミドを希釈した溶液を尾静脈から約 7-8 秒で導入した。

HE 染色

マウス肝臓を 4% paraformaldehyde (PFA) 中で 4°C で一晩振盪し、固定した。PFA 固定後 70% EtOH 中で一晩固定した。EtOH 固定後の肝臓は分葉し、Thermo Excelsior ES を用いてパラフィン置換した。パラフィン置換した肝臓を用いてパラフィンブロックを作製した。MICROM HM335E を用いてパラフィンブロックを 5 μ m の厚みに薄切し、切片を作製した。薄切切片の脱パラフィンは、Xylene で 15 分間×2 回、100% EtOH で 10 分間×2 回、90% EtOH で 5 分間×1 回、70% EtOH で 5 分間×1 回、流水で軽く洗浄後、Milli-Q で軽く洗浄する手順で行った。脱パラフィン後の切片を Mayer's Hematoxylin で 10 分間染色し、42-45°C のお湯で 10 分間処理した後に、Eosin で 5 分間染色した。染色後の切片は 70% EtOH で 1 分間×1 回、100% EtOH で 3 分間×2 回、100% EtOH で 5

分間×1 回、Xylene で 5 分間×2 回洗浄する手順で透徹し、MOUNT-QUICK (DAIDO) とカバーガラスを用いて封入した。組織像の観察及び撮影は、BZ-X710 (KEYENCE) で行った。

(倫理面への配慮)

本研究においては組換え DNA 実験を含むが、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」、およびこれに基づく政省令・告示に示される基準に適合し、かつ所属機関の承認を得ている。また、動物実験の承認も得ている。

C. 研究結果及び考察

C-1 致死率に基づくスクリーニングにより、器官形成に必須な遺伝子を発見

PrS 形成に関わる遺伝子を網羅的に同定するため、MGI データベース (15,211 遺伝子) と IMPC データベース (7,590 系統の K0 マウス) の 2 つの K0 マウス データベース をスクリーニングし、その欠損が E10 までに胚性致死につながる遺伝子を探した。MGI データベースの遺伝子のうち、463 遺伝子のいずれかが欠損すると、E4.5 から E9 の間に胚性致死となることがわかった。同様に、IMPC データベースの遺伝子のうち、417 遺伝子のいずれかを欠損すると、E9.5 以前の胚性致死が認められた。合計で 812 個の注目遺伝子が同定され、予想通り PrS 制御遺伝子 Brachyury T が含まれていた。812 個の候補遺伝子のエンリッチメント解析により、65 の注目すべき細胞機能パスウェイが同定された。これらの機能パスウェイは、DNA 複製、RNA 代謝、エネルギー代謝、シグナル伝達に必要な遺伝子や、細胞周期や細胞接着などの多様な細胞応答に関わるネットワークを形成していた。最も多くの遺伝子 (103 個) が含まれるカテゴリーは「代謝パスウェイ」(24 位) であった。そこで、この 103 個の遺伝子を DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) を用いて分類し、グルコース、ミトコンドリア、核酸、脂質の代謝に関わる遺伝子を同定しました。これらの代謝経路は、エネルギー

供給に必要なだけでなく、細胞成分の合成や遺伝子発現のエピジェネティックな制御など、適切な生命活動に欠かせないプロセスとして重要であることがわかりました。これらの結果から、初期胚の発生には、代謝を中心とした様々な細胞機能のインタクトが必要であることが示された。

C-2 スフィンゴ脂質代謝経路の阻害によるマウスES細胞の心筋分化の抑制と神経分化の促進

我々は以前、メバロン酸代謝阻害によるPrS形成不全時に、EB中のスフィンゴミエリンとスフィンゴシンが増加することを確認した。今回、これらの変化の生物学的意義を明らかにするため、スフィンゴ脂質の代謝に着目した。スフィンゴ脂質代謝には3つの遺伝子 (Serine Palmitoyltransferase Long Chain Base Subunit 2 (Sptlc2), UDP-Glucose Ceramide Glucosyltransferase (Ugcg), N-Acylsphingosine Amidohydrolase 1 (Asa1)) が寄与することがわかっている。PrS形成におけるSPTLC2、UGCG、ASAHIタンパク質の役割を調べるため、これらの酵素の特異的阻害剤 (SPTLC2はMyriocin16、UGCGはNB-DNJ17、ASAHIはD-NMAPPD18) のマウスES細胞分化への影響を調べた。阻害剤は培養3-6日目に適用し、10日目にES細胞の分化を光学顕微鏡で心筋細胞拍動を、 β -チューブリンIII免疫染色で神経突起形成を検出することで解析した。その結果、ミリオシンは心筋細胞の拍動と β -チューブリンIII陽性の神経突起の形成をともに阻害し、PRS形成前に細胞死を起こすことがわかった。一方、NB-DNJおよびD-NMAPPDは、EBの拍動を阻害する一方で、これらの薬剤は用量依存的に β -チューブリンIII陽性神経突起の形成を促進した。これらのデータは、UGCGとASAHIが正常なPRS形成に重要であることを示唆している。

NB-DNJによるUGCGの阻害やD-NMAPPDによるASAHIの阻害が、どの時点で細胞拍動を阻害するかを明らかにするため、各阻害剤で細胞を6期間 (1-2日、3-4日、5-6日、7-10日、

1-4、3-6) 処理し、10日目の細胞拍動や神経突起伸長を解析した。1-4日目、3-4日目、3-6日目にNB-DNJを投与すると、細胞拍動は効率的に低下し、神経突起の伸長が促進された。D-NMAPPDを用いてASAHIを阻害した場合も、同様の結果が得られた。このように、EBの発生3-6日目は、特にスフィンゴ脂質代謝に依存していることが示唆された。

UGCG阻害によるPRS形成の時空間的影響を明らかにするため、PRSマーカーであるブラキリーTの発現をin situ hybridizationで検出した。EBをNB-DNJで3-4日または3-6日処理し、ブラキリーTレベルを3、4、5および6の組み合わせで4パターンで調べた。コントロールの無処理EBでは、3日目にはBrachyury Tの発現は見られなかったが、4日目にピークを迎え、5日目から6日目にかけて徐々に減少した。一方、3日目から6日目にかけてNB-DNJを処理すると、Brachyury Tの発現はほぼ抑制された。興味深いことに、3-4日目からNB-DNJのみを適用した場合、ブラキリーTの発現は4日目に抑制されたが、NB-DNJを除去した5日目には回復した。このように、EB発生3-4日目にASAHIまたはUGCGを阻害すると、PRS形成が阻害され、心筋細胞分化が抑制される一方で、神経分化が誘導されることがわかった。この他、メタボローム解析やRNAseq解析から、セラミド代謝がPrS形成に必須の役割を果たすことが明らかとなった。スフィンゴシン-1-リン酸 (セラミド誘導體) は、神経細胞の成熟をポジティブに制御することを明らかにした。これらの結果は、セラミド代謝がPrSの形成と神経細胞分化の誘導の両方を制御していることを示す。以上のように、細胞分化に影響を与える因子の一つとして、セラミド代謝を新たに同定した。スフィンゴシン-1-リン酸などのセラミド代謝関連生理活性物質を潜在的なハザード因子として見出した。

C-3 YAP活性化の強弱とエピジェネティック変化、肝細胞がん発症誘導の相関

リン酸化されるアミノ酸残基SerをAlaに置換した3種類のYAP変異体 (1SA, 2SA, 5SA)

は、タンパク質の安定性や核への移行能力に違いがあり5SA>2SA>1SAの順番の強弱を示す。我々のマウス肝細胞にYAP(1SA)を発現誘導する実験系では、肝細胞がんは発症しなかった。一方、YAP(2SA)やYAP(5SA)では4ヶ月経過すると肝細胞がんが発症した。発症した肝細胞がんのゲノムのメチル化解析を行った結果、正常組織とは異なり、メチル化の低下や亢進が観察された。以上の結果は、YAP活性化の閾値を超え、ゲノムDNAのメチル化変化(エピジェネティック変化)が生じると、肝がんが発症することを示唆する。

D. 結論

令和4年度は、器官形成に必須の役割を果たすPrS組織の正常分化に必須である複数の候補遺伝子を同定することに成功した。また、この一部であるセラミド代謝が実際にPrS形成に必須であることをマウスES分化誘導系を用いて実証し、原著論文として報告した(*Stem Cells* 2023)。また、培養細胞の大量化への利用が期待されている転写共役因子YAP遺伝子の長所とリスクに関する基盤的知見を得た。それゆえ、研究は順調に進展していると考える。

来年度(令和6年度)は今年度の結果を受け、更なる進展を予定している。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirotooshi Soyama, Miki Nishio, Junji Otani, Toshiko Sakuma, Shintaro Takao, Shigeo Hara, Takaaki Masuda, Koshi Mimori, Shinya Toyokuni, John P Lydon, Kazuwa Nakao, Hiroshi Nishina, Takumi Fukumoto, Tomohiko Maehama and Akira Suzuki, Hippo-TAZ signaling is the master regulator of the onset of triple negative basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 119 (29) e2123134119, 2022.

Caleb Kwame Sinclear, Junichi Maruyama, Shunta Nagashima, Kyoko Arimoto-

Matsuzaki, Joshua Agbemefa Kuleape, Hiroaki Iwasa, Hiroshi Nishina, Hata, Yutaka, Protein kinase C α activation switches YAP1 from TEAD-mediated signaling to p73-mediated signaling. *Cancer Science* 113, 1305-1320, 2022.

Takeaki Shibata, Hiroki Kawana, Yuri Nishino, Yoshiko Ito, Hiroyasu Sato, Hirofumi Onishi, Kuniyuki Kano, Asuka Inoue, Yoshitaka Taketomi, Makoto Murakami, Satoshi Kofuji, Hiroshi Nishina, Atsuo Miyazawa, Nozomu Konol and Junken Aoki, Abnormal male reproduction and embryonic development induced by downregulation of a phospholipid fatty acid-introducing enzyme Lpgat1 in zebrafish. *Scientific Reports* 12, 7312, 2022.

Chiyumi Oda, Kenya Kamimura, Osamu Shibata, Shinichi Morita, Yuto Tanaka, Toru Setsu, Hiroyuki Abe, Takeshi Yokoo, Akira Sakamaki, Hiroteru Kamimura, Satoshi Kofuji, Toshifumi Wakai, Hiroshi Nishina, Shuji Terai, HBx and YAP Expression Could Promote Tumor Development and Progression in HBV-related Hepatocellular Carcinoma. *Biochem. Biophys. Rep.* 32, 101352, 2022.

Sakurako Kobayashi, Nobuhiko Ogasawara, Satoshi Watanabe, Yosuke Yoneyama, Sakura Kirino, Yui Hiraguri, Masami Inoue, Sayaka Nagata, Yoshimi Okamoto-Uchida, Satoshi Kofuji, Hiromichi Shimizu, Go Ito, Tomohiro Mizutani, Shinichi Yamauchi, Yusuke Kinugasa, Yoshihito Kano, Yasuhiro Nemoto, Mamoru Watanabe, Kiichiro Tsuchiya, Hiroshi Nishina, Ryuichi Okamoto, Shiro Yui (2022) Collagen Type I mediated mechnotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation. *Inflammation and Regeneration* 42, 49, 2022.

Hiroshi Nishina (2022) [review] Physiological and pathological roles of the Hippo-YAP/TAZ signaling pathway

in liver formation, homeostasis and tumorigenesis. Cancer Science 113, 1900-1908, 2022.

仁科博史：動物における臓器サイズ制御機構 再生医療 Vol 21 No 2 p74-79 (2022)

2. 学会発表

仁科博史、肝臓の形成と恒常性維持、第 24 回 長崎大学細胞制御セミナー (2022. 10. 21.) 長崎

仁科博史、肝臓の形成と恒常性維持、第 1 回 旭川医科大学大学院セミナー (2023. 1. 27.) 旭川

仁科博史、肝臓の発生と再生、新潟大学消化器内科サイエンスセミナー(2023. 3. 16.)新潟

仁科博史、生物の大きさと再生医療、第 22 回 日本再生医療学会 (2023. 3. 24.) 京都

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

プレスリリース「新たな眼の難治疾患を発見」
東京医科歯科大学、国立成育医療研究センター、東京工業大学(2023. 3. 27.)

<https://www.tmd.ac.jp/press-release/202303>