

127. アストロサイトへの直接分化誘導機構の解明

神山 淳

慶應義塾大学 医学部 生理学教室

Key words : 直接誘導, アストロサイト, 神経変性疾患

緒言

従来、神経変性疾患や精神神経疾患に関する研究は神経細胞を中心に行われてきた。しかし、近年中枢神経系を構成する細胞群で神経細胞よりも多く存在するグリア細胞が特定の疾患の発症機転において重要な役割をすることが明らかとなっている。すなわち、神経細胞に対する異常アストロサイトの細胞非自律的な作用が中枢神経変性疾患の病態の一翼を担うと考えられ、疾患概念が変わりつつある¹⁾。一方、iPS細胞技術の確立により、ヒト由来の疾患感受性細胞の利用が可能となっており、特により簡便な手法として線維芽細胞から直接的に特定の細胞へと分化転換を促す手法の確立が盛んに試みられている。現在までに神経細胞、肝細胞、心筋細胞、造血系細胞などへの直接分化誘導法が確立されており、新規治療法や新規疾患モデル作製が期待される²⁾。しかし、直接分化誘導の分子メカニズムは未だ明らかではなく、また直接分化誘導技術の開発が期待される細胞群も存在する。

本研究ではグリア細胞の中でもアストロサイトと呼ばれる細胞集団に着目し、アストロサイト誘導性の転写因子群の同定を試みた。その結果、ヒト線維芽細胞をアストロサイト様細胞へと直接分化誘導可能な3つの転写因子 (AIF1-3: Astrocyte Inducing Factor1, 2, 3) を同定した。さらに、この分子メカニズムを明らかとするためにこれら3つの因子に対する抗体を用いたChIP-seqを行った。その結果、これら3つの因子のうち、少なくともAIF1、AIF2に関しては協調的に作用していることが明らかとなった。さらに、また、線維芽細胞に3つの因子を導入後に、1細胞RNA-seqを実施した。その結果、線維芽細胞からアストロサイトへと分化転換する過程は4つに分類することが可能であり、全ての細胞がアストロサイト様の遺伝子発現を示すわけではなく、遷移状態にある細胞集団が存在し、AIFsに対して抵抗性を有する細胞集団が存在することが明らかとなった。従ってアストロサイトへの直接誘導に対するバリア機構が線維芽細胞に存在し、その制御が効率的なアストロサイトへの直接誘導を可能とすることが示唆された。

方法および結果

アストロサイト様細胞への直接誘導を実施するにあたり、ヒト線維芽細胞に対してレンチウイルスまたはレトロウイルスにより、候補因子を導入した。遺伝子発現パターンや既知の報告等から絞り込んだ7つの因子を線維芽細胞に同時に導入することによりアストロサイト選択的マーカーGFAPの発現が見出された。GFAPの発現を指標として7つの因子から一つずつ因子を除外し、GFAPの発現が誘導できなくなった因子を3つ絞り込みAstrocyte Inducing Factors (AIFs) とした (図1)。

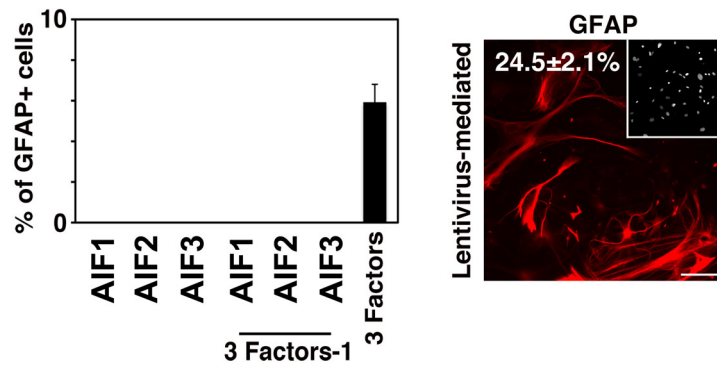


図1. AIFsによる線維芽細胞からアストロサイトへの直接誘導

(左) AIF 単独では直接誘導できず、3 因子の共存下でのみ直接誘導が可能であった。(右) レンチウイルスによる AIFs 導入により得られたアストロサイト様細胞。スケールバー=100 μ m。

次にこれら3つの因子の標的遺伝子を見出すために、3つの因子に異なるタグを付加し、このタグに対する抗体を利用したクロマチン免疫沈降法シーケンス (ChIP-seq) を実施した。ChIP-seq で得られたデータを MACS2 のプログラムを利用し、ピークの数解析したところ AIF1 から3でそれぞれ5万から10万近くのピークが存在することが明らかとなった。次に、これらのピークの存在場所を全遺伝子の転写開始部位からの距離で計算し、解析したところ図2のような結果となった。

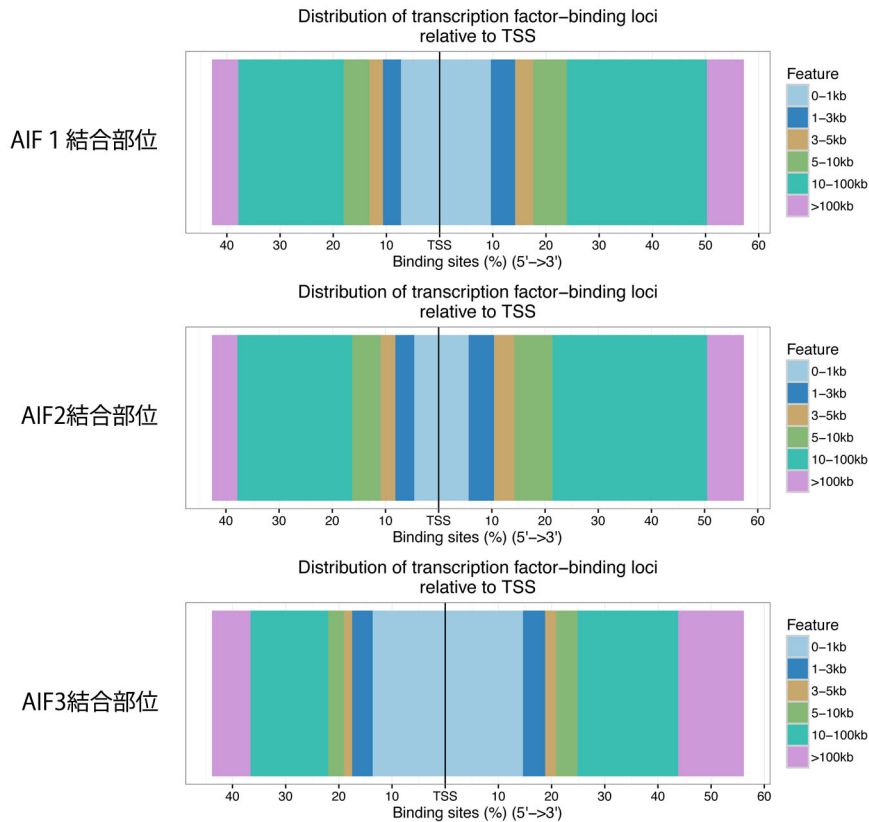


図2. AIFs のゲノム上の結合部位

AIF 1、2、3 のゲノム上の結合部位を模式的に示した。

その結果これら3つの因子は比較的類似したゲノム上の分布を示すことが明らかとなった。次に3つの因子の結合配列をモチーフ解析したところ AIF2 のモチーフ解析の結果が AIF1 のモチーフと同様であることが明らかとなった。AIF2 の既知の標的配列と本研究で実施した ChIP-seq の解析結果が異なったことから、線維芽細胞に AIF を単独で導入した試料と3つを同時に導入した試料を利用し、それぞれの因子の標的配列を調べると興味深いことに、3因子が同時に存在する場合において AIF2 が AIF1 と同様の場所に存在する例が多く見られた (図3)。

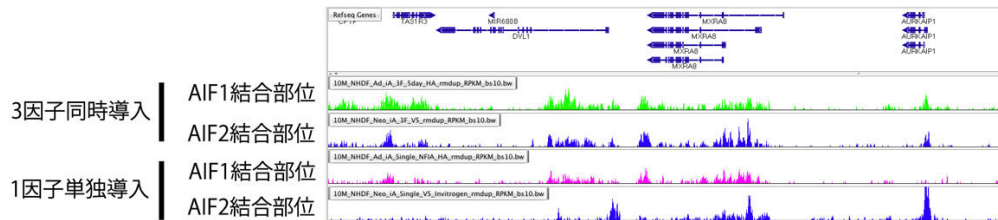


図3. AIFs の結合様式の協調的作用

AIF1、2 の結合様式の一例。AIF1 と AIF2 を単独で導入した場合と3因子同時導入時における AIF1 と AIF2 の結合部位の変化。AIF1 の結合場所は変化しないが、AIF2 の結合部位は3因子存在下では AIF1 と類似した結合様式を示した。

このことから少なくとも AIF1 は AIF2 と協調的に作用することが示唆された。近年、直接分化誘導において pioneer factor の存在が想定されており³⁾、アストロサイトへの直接分化誘導においては AIF1 がこれに相当する役割を果たしていることが示唆された。

また、線維芽細胞からアストロサイト様細胞への直接分化誘導過程における詳細を明らかにするために、AIFs を導入した線維芽細胞を用いた1細胞 RNA-seq を実施した。

公共データベースを利用可能とするために、国際的に利用されている Lonza より購入した線維芽細胞、Sciencell から購入したヒトアストロサイトを利用した。線維芽細胞に対しては AIF を導入し、2週間後に試料を回収することとした。これら3群の細胞を用いて1細胞分取を行ったのち、Quartz-seq⁴⁾ を施行した。合計300細胞弱の RNA-seq データを現在解析中である。PCA 解析 (*) を行うと図4のように、線維芽細胞とアストロサイトはまず大きく離れた集団となり、iA (アストロ様細胞) に関しては線維芽細胞とアストロサイトの亜集団と近傍にある集団および線維芽細胞ともアストロサイトとも離れた集団に分かれた。

*PCA 解析：主成分解析。高次元のデータを低次元に圧縮するための手法であり、遺伝子発現の違いから細胞の類似性や差異を描出するための手法。

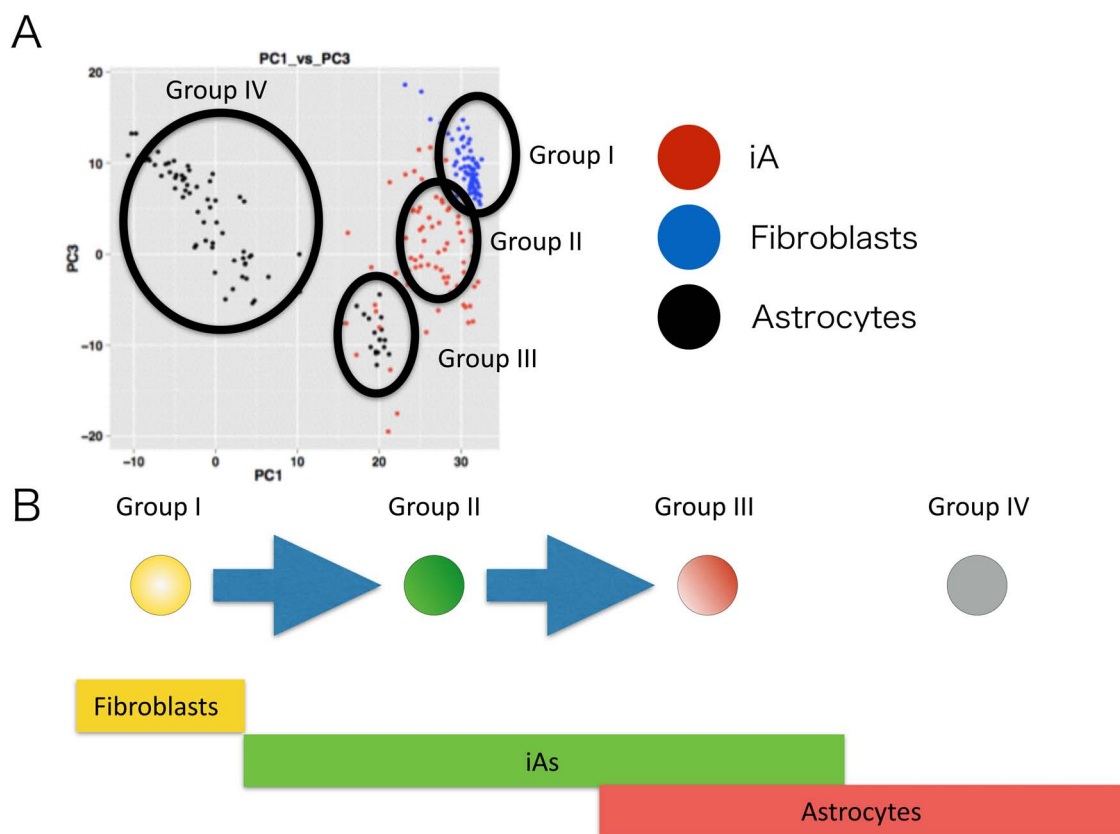


図4. 1細胞 RNA-seq による直接分化誘導の記載

(A) 線維芽細胞、アストロサイト様細胞 (iA)、アストロサイトを用いた1細胞 RNA-seq の結果をもとに作成した PCA 解析後の図。GroupI から IV に分類可能であった。(B) 線維芽細胞からアストロサイトへ直接分化誘導過程の模式図。

Single cell RNA-seq のデータより①iA 誘導により線維芽細胞としての形質の消去②アストロサイトとしての形質獲得の二つの機構が示唆されたが、アストロサイトの形質獲得に関してはアストロサイト内における細胞の heterogeneity があり、アストロサイト内においても細胞の階層の存在が示唆された。現在 GroupII から GroupIII を制御する因子の同定を試みている。

考 察

本研究ではヒト線維芽細胞からアストロサイトへの直接誘導をモデルとして ChIP-seq による直接誘導関連因子の標的領域の探索および1細胞 RNA-seq を用いた直接分化誘導過程の記載を実施した。ChIP-seq の解析より、直接誘導関連因子同士の相互作用による直接分化誘導の促進が示唆された、今後詳細な標的遺伝子の解析をすることにより細胞の形質変換に関与する分子機構が明らかとなることが期待される。また、1細胞 RNA-seq では直接分化誘導過程の記載を実施したが、ヒト線維芽細胞からアストロサイトへの直接誘導過程においては複数の段階があることが明らかとなった。今後は、これら各階層における特徴的な遺伝子発現パターンを明らかとすることにより直接誘導の効率化が実現されると期待される。

共同研究者

本研究の共同研究者は慶応義塾大学医学部生理学教室、佐野坂司博士、周智博士である。また理化学研究所バイオインフォマティクス研究開発ユニット二階堂愛博士には多大なるご協力とご支援をいただきました。最後に本研究にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, Richardson WD, Barres BA, Rowitch DH. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev.* 2012 ;26(9):891-907. Pubmed PMID: 22549954
- 2) Vierbuchen T, Wernig M. Direct lineage conversions: unnatural but useful? *Nat Biotechnol.* 2011 29(10): 892-907. Pubmed PMID:21997635
- 3) Zaret KS, Mango SE. Pioneer transcription factors, chromatin dynamics, and cell fate control. *Curr Opin Genet Dev.* 2016 37:76-81
- 4) Sasagawa Y, Nikaido I, Hayashi T, Danno H, Uno KD, Imai T, Ueda HR. Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol.* 2013 14(4):R31. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r31