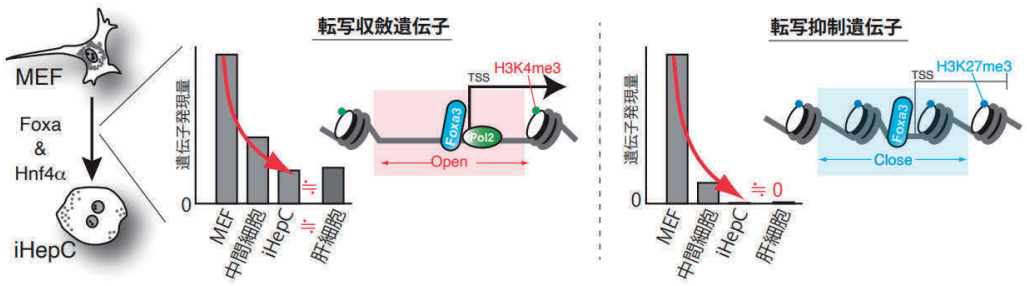
42　ダイレクトリプログラミングの転写収斂メカニズム解析	堀澤　健一

【目的】本研究では、人為的な細胞分化誘導技術である「ダイレクトリプログラミング」において、特定の遺伝子群の転写がリプログラミングの標的細胞における発現量と同等レベルに収束する現象の分子機序を明らかにすることを目的とした。近年、iPS 細胞を用いた再生医療技術の開発が進められているが、細胞の質・量・作製コストなどの点でまだ多くの課題が残る。一方ダイレクトリプログラミングは、初期化を経ずに特定の細胞を別の系譜の体細胞から直接分化誘導できる技術である。著者所属の研究室では、世界に先駆けてマウス誘導肝細胞様細胞（iHepC）を創出することに成功し、肝臓移植以外に抜本的な解決方法の無い重篤な肝疾患に対する治療法として非常に大きな期待を集めている。iHepC の臨床応用のためには、そのリプログラミング過程における分子メカニズムの理解が必須であり、著者らは iHepC 誘導転写因子（Foxa および Hnf4α）の核内挙動・転写制御機能に着目して研究を進めてきた。その過程において、RNA ポリメラーゼⅡなどの状態が転写活性化のまま発現量のみ抑制される遺伝子が存在することを発見した。それら遺伝子のほとんどは、リプログラミング終了時に生体の肝細胞における発現レベルに非常に近い状態にまで転写が収束することから、著者はこの現象を「転写収斂」と名付け、ダイレクトリプログラミングにおける中心的な分子メカニズムであると考えた（下図）。本研究ではその仮説を検証するために、種々のクロマチン解析技術を応用して iHepC を解析することで得たマルチオミクスデータを用い、ゲノムワイドな情報解析による検証を行った。

【方法】マウス胎仔線維芽細胞（MEF）から iHepC へのダイレクトリプログラミング系をモデルとして、これまでの研究で蓄積した次世代シークエンス（NGS）による遺伝子発現情報やクロマチン情報を活用した解析を行うと共に、新たなクロマチン解析技術を導入し、異なる階層の新規 NGS データの取得を行った。まず、筆者らがこれまでの研究において取得した、iHepC および MEF の遺伝子発現、転写因子結合、ヒストン修飾（H3K4me3、H3K27me3）などの NGS データを用い、時系列に沿ったマルチオミクス解析を行うことで iHepC 誘導転写因子の結合によって転写収斂を起こす遺伝子セットをゲノムワイドに同定した。続いて、iHepC 誘導転写因子の結合と Enhancer/Promoter の活性、および転写制御を正確に紐付けた解析を行うために、H3K4me3 HiChIP 解析を行い Promoter-Enhancer（P-E）ループを網羅的に同定した。また、iHepC 誘導転写因子の転写収斂における役割をより詳細に解析するために、degron tag を融合したコンストラクトを作製し、iHepC 誘導転写因子の発現を正確に制御する実験系の構築を行った。

【結果】MEF から iHepC へのダイレクトリプログラミング過程の遺伝子発現解析データを用いてクラスタリングを行い、さらにダイレクトリプログラミング時に先導的な働きをする iHepC 誘導転写因子 Foxa3 のクロマチン結合データによるサブクラスタリングを行った。その結果、ダイレクトリプログラミング過程において Foxa3 によって発現抑制される遺伝子群を、ヘテロクロマチン化が進行して発現がほぼ完全に抑制される「転写抑制」遺伝子と、活性型のクロマチンを維持しながら標的細胞における発現状態に近づく「転写収斂」遺伝子に大別することができた（下図）。またこれまでの研究から Foxa3 とは異なる様式で同じ遺伝子セットを制御することが分かっていた Foxa2 は、Enhancer 上から P-E ループを介して Foxa3 と同様の転写制御を行なうことが、今回新規に取得した H3K4me3 HiChIP データより明らかになった。以上の解析からダイレクトリプログラミング過程において、Foxa は 2 つの異なる分子機構を並行して制御し、遺伝子発現状態を標的の状態に誘導していることが明らかになった。

ダイレクトリプログラミングにおける「転写収斂」と「転写抑制」



42. ダイレクトリプログラミングの転写収斂メカニズム解析

堀澤　健一

九州大学 生体防御医学研究所 器官発生再生学分野

Key words：ダイレクトリプログラミング，転写因子，クロマチン，誘導肝細胞様細胞（iHepC），再生医療

緒　言

再生医療研究は世界中で推進されており、現在は多能性幹細胞（PSC）がその中核技術である。本邦では特に誘導多能性幹細胞（iPSC）を用いた再生医療技術が幅広く研究され、複数のプロジェクトが臨床試験段階にまで進んでいる。iPSC による再生医療が、まず細胞を初期化した後に標的とする細胞へと再分化させる技術であるのに対し、ダイレクトリプログラミングは体細胞を別の系譜の体細胞に直接的に分化誘導する技術である。残存した初期化細胞による発癌リスクが無いことや、移植に必要な細胞数を得るまでの工程・コスト・時間などの点で iPSC に対する優位性がある他、*in vivo* において生体内の細胞を直接的に分化誘導することができるといった技術的特徴もあり、PSC を補完する新たな再生医療ツールとして注目を集め、研究報告数も年々増加傾向にある［1］。著者が所属する研究室においても、誘導肝細胞様細胞（iHepC）［2］、誘導肝前駆細胞（iHepPC）［3］、誘導腸前駆細胞（iISC）［4］などの様々な内胚葉系の細胞を人工的に作り出すことに成功しており、臨床医療への応用に向けて精力的に研究が進められている。

ダイレクトリプログラミングの多くは特定の転写因子セットを強制発現させることで細胞の運命を人為的に転換する。用いられる転写因子のほとんどはリプログラミングの標的とする細胞の分化やホメオスタシスに関与する因子であり、導入転写因子の機能が標的細胞特異的な遺伝子群の発現を直接的に誘導していることは想像に難くない。実際に筆者らを含めた複数の研究によって、強制発現した転写因子の協調的な働きが標的特異的遺伝子群の発現を直接誘導することが示されている［5，6］。一方で、ホスト体細胞特異的に高発現する遺伝子群は標的細胞では不要となるため、ダイレクトリプログラミングの過程では、前述した標的特異的遺伝子の転写活性化と並行して、それら遺伝子の転写抑制が進行する。しかし、ダイレクトリプログラミングに伴う能動的な転写抑制に対する研究はほとんど行われておらず、そのメカニズムは不明であった。これまでに筆者らが行なってきた iHepC の誘導実験においても、リプログラミングにより肝細胞マーカー遺伝子の発現が上昇したとしても、MEF 特異的な遺伝子発現が残存してリプログラミングが不完全に終わるケースもある程度の頻度で見られ（未発表データ）、臨床応用に耐えうる高品質な細胞を安定的に生産するためには、ダイレクトリプログラミング過程の転写抑制制御を理解することが非常に重要であることを示唆している。

筆者は最近発表した研究のなかで、Foxa が結合する一部の標的遺伝子の発現量が減少することを見出していた［6］。このことから、iHepC リプログラミング過程の発現抑制には導入転写因子、特に Foxa が直接的に関与していると想定された。また、MEF で高発現し、かつ hepatocyte においてもある程度のレベルで発現している遺伝子においても、iHepC 誘導後に Foxa のクロマチン結合が継続しているケースが見られた。以上のことからダイレクトリプログラミングの背後には、標的細胞の遺伝子発現を生理的発現レベルに調節する複数の分子機構が並行して存在し、導入転写因子の挙動がそのメカニズムの一部に組み込まれていると考えられた。しかし、そのような制御を受ける遺伝子を特異的に選択する分子機構や、発現を量的に調節するメカニズムなど、そのほとんどが不明のままであり、ダイレクトリプログラミングを再生医療技術として発展、実用化していくうえでは、それら分子メカニズムの解明は必須であると考えられる。さらに言えば、この現象の理解は「遺伝子は何故、様々な細胞において異なる転写量で発現し、それが維持され、分化により変化するのか」という生命科学の根源的な疑問に対する答えに結びつく可能性もある。そこで本研究では、筆者らがこれまでに蓄積してきた大規模な次世代シークエンス（NGS）データセットに加え、新規の手法による NGS データを追加することで、それら分子機構を明らかにすることを目指した。

方法および結果

本研究では、「ダイレクトリプログラミング時の転写制御が遺伝子によって異なる原因・仕組み」、「標的細胞における生理的レベルに転写が収束する仕組み」といった、転写制御の根源的な分子メカニズムを理解するために、MEF から iHepC へのダイレクトリプログラミング系をモデルとして以下のような解析を行った。①取得済の NGS データを用いたマルチオミクス解析、②HiChIP などの新規 NGS 解析データの取得と解析、③実験的検証系の確立。以下、それぞれの項目別に方法および結果の詳細を記す。

1. 取得済の NGS データを用いたマルチオミクス解析

筆者らはこれまでの研究のなかで、MEF から iHepC を誘導するダイレクトリプログラミングの解析を行い、数多くの NGS データを取得してきた。それらは RNA-seq による遺伝子発現データ、ChIP-seq による導入転写因子の結合、ヒストン修飾データなどである。それらは iHepC 以外にも、元細胞である MEF や、ダイレクトリプログラミングの中間段階の細胞（iMEF）、および標的細胞である hepatocyte などからも取得している。また、iHepC は Foxa ファミリーに属するすべての転写因子（Foxa1、Foxa2 および Foxa3）いずれを用いても同様に誘導することが可能なため、3 種類の iHepC および iMEF からもそれぞれデータを取得している。本研究では、ダイレクトリプログラミングの過程で導入転写因子によって転写「抑制」制御を受ける遺伝子群を解析の対象とするため、Promoter 領域に結合し、標的遺伝子との紐付けが容易な Foxa3 によるダイレクトリプログラミングをモデルとして解析を行った。まず、RNA-seq データを用いて遺伝子発現の時系列変化をクラスタリングし、リプログラミング過程で発現が抑制される遺伝子をすべて同定した。その後、それら全発現抑制遺伝子について、ChIP-seq データによる Foxa3 のクロマチン結合動態に基づくサブクラスタリングを行い、Foxa3 結合動態と転写抑制の関係について詳細に解析した。その結果、ダイレクトリプログラミング過程において Foxa3 結合によって直接的に発現抑制される遺伝子は全発現抑制遺伝子のおよそ半分強であり、発現レベルが大幅に抑制される「転写抑制」遺伝子群と、標的細胞である hepatocyte におけるレベルに近い発現状態に遷移しそれが維持される「転写収斂」遺伝子群に大別できることが分かった。また、前者の転写開始点（TSS）付近のクロマチン状態が MEF と比較してヘテロクロマチン化が進行していたのに対し、後者は活性型のクロマチン状態を維持することも明らかになった（図 1）。このことは、ダイレクトリプログラミングを引き起こす誘導転写因子が、発現を抑制する複数の分子メカニズムを並行して制御している可能性を示唆している。

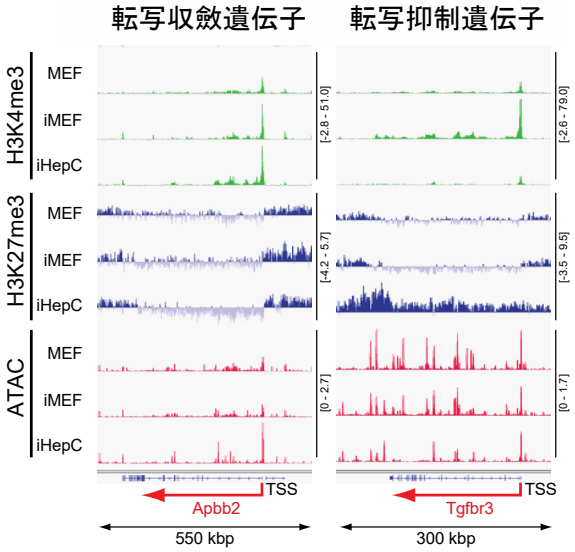


図 1. 代表的な転写収斂および転写抑制遺伝子座におけるエピゲノム変化
左側に代表的な転写収斂遺伝子（Apbb2）、右側に代表的な転写抑制遺伝子（Tgfbr3）のそれぞれの遺伝子座における ChIP-seq および ATAC-seq シグナルを示す。

2. HiChIP などの新規 NGS 解析データの取得と解析

項目 1 の解析で得られた「転写抑制」「転写収斂」遺伝子群の特徴を明らかにするために、ATAC-seq による解析を行った。その結果、「転写抑制」遺伝子群は MEF と比較して Genebody 上のクロマチンが閉じ、「転写収斂」遺伝子群では MEF よりもクロマチン開放状態がむしろ増大していた（図 1）。この結果は、項目 1 で得られたヒストン修飾によるクロマチン状態の解析結果と符合するものである。

これまでに著者らが発見した実験事実として、Foxa3 は主に標的遺伝子の Promoter から Genebody にかけて結合し、Foxa1 および Foxa2 は標的遺伝子から遠位（TSS から約 50〜500 kbp）の領域に主として結合するというものがあった［6］。Foxa3 と Foxa1/2 の結合部位はゲノム配列上は全く異なるが、誘導される iHepC はほぼ同一のトランスクリプトーム状態を示すため、同じ標的遺伝子群を制御していると思われ、Foxa1/2 が結合する領域は肝細胞としての細胞運命を誘導・維持する特異的 Enhancer であると考えられた。また、Promoter に結合する Foxa3 も一旦は Enhancer に結合する必要があることも示されており、Foxa が認識する肝細胞特異的 Enhancer がダイレクトリプログラミングにおける転写制御の鍵であると推定される。しかし、その Foxa 結合部位と標的遺伝子を直接結びつける実験的データは存在していなかった。そこで今回、H3K4me3 HiChIP アッセイ［7］を行い、P-E ループを網羅的に検出することで、Foxa2 が結合する遺伝子遠位の領域がダイレクトリプログラミングに直接関与し、転写抑制にも寄与するのかを検討した。その結果、「転写抑制」遺伝子の TSS にはほとんど P-E ループが存在していなかったのに対し、「転写収斂」遺伝子の多くは P-E ループを有しており、かつその Enhancer 側は高頻度に Foxa2 結合部位と重複することが明らかになった（図 2）。これはダイレクトリプログラミングの過程では、Foxa が特異的 Enhancer に結合し、その標的遺伝子の転写をゲノムワイドに正負両方向に制御するが、「転写収斂」もそのメカニズムの一環であることを示唆している。

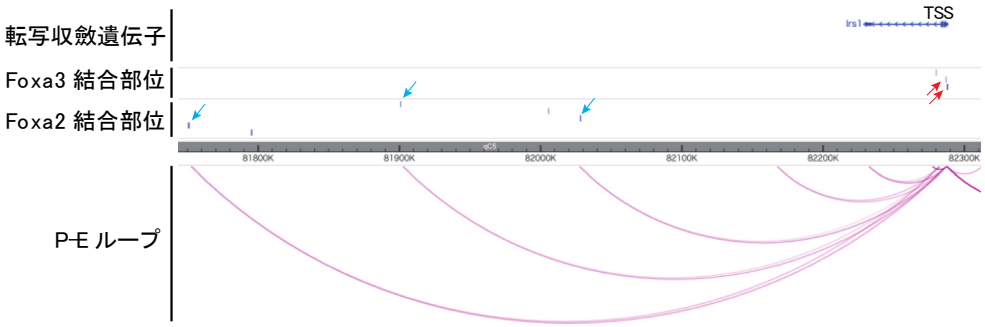


図 2. 代表的な転写収斂遺伝子座における Foxa2 および 3 結合部位と P-E ループ
TSS 周囲で P-E ループと重複する Foxa3 結合部位を赤矢印、TSS 遠位で P-E ループと重複する Foxa2 結合部位を青矢印で示した。

3. 実験的検証系の確立

今回の研究でその普遍性を明らかにした「転写収斂」現象について、高い時間解像度でより詳細な実験的検証を行うためには、従来のように実験毎にレトロウイルスベクターで誘導転写因子を感染させ iHepC を誘導する系を用いると、感染効率やそれによる転写因子発現の誤差が大きく、正確なデータの取得上、問題があると考えられた。そこで、誘導転写因子の発現量を分解誘導低分子化合物の添加量で厳密に制御できる系の構築を試みるため、degron tag 融合転写因子を作製した。この degron tag は FKBP12 タンパク質の一部の配列に変異を加えたものであり、dTAG というリガンド低分子を添加することによりタンパク質レベルで速やかに分解することができる。これにより、容易にノックダウン実験や、転写因子発現量の厳密な制御を行うことができるだけでなく、発現レスキュー実験なども行うことができる。誘導する 4 つの転写因子（Hnf4α、Foxa ファミリータンパク質）についてそれぞれ N 末端、C 末端に degron tag を融合したコンストラクトを作製し、dTAG13 の 24 時間処理によりノックダウンできることを確認している（図 3）。また、Foxa3 に degron tag を融合したコンストラクトと Hnf4α を用いて、野生型 Foxa3 を用いた場合とほぼ同様の表現型を示す iHepC も誘導できており、今後これらを用いて「転写収斂」の詳細な実験的検証を行っていく。

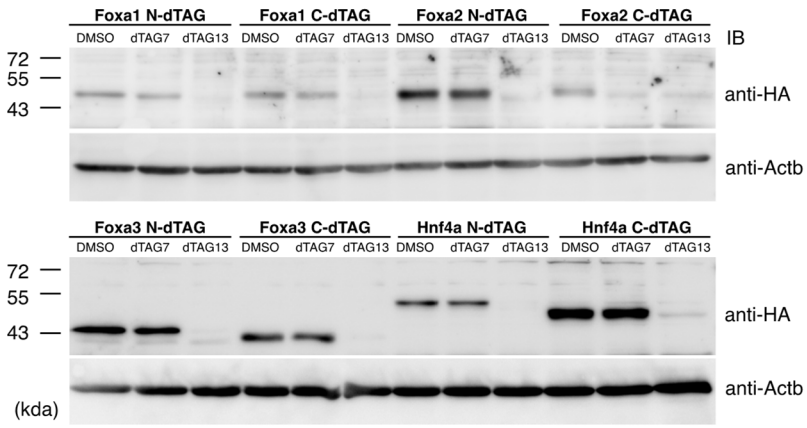


図 3. degron tag 融合転写因子の低分子薬剤（dTAG）添加による発現制御
4 種類の転写因子にそれぞれ N 末端（N-dTAG）、C 末端（C-dTAG）に degron tag を誘導し、MEF で発現した後に、1μM の分解誘導低分子薬剤（dTAG7 および dTAG13）でそれぞれ 24 時間処理しサンプリングした。発現は degron tag に付加された HA-tag を Western blotting により確認した。anti-Actb はローディングコントロール。

考　察

本研究を通して、ダイレクトリプログラミングによる iHepC の誘導過程において、転写の抑制に導入転写因子の Foxa3 が広範に関与しており、また、ヘテロクロマチン化を伴う従来型の「転写抑制」と、活性型のクロマチン状態を維持しつつ標的細胞の発現レベルに近づける「転写収斂」という、2 つの異なる分子メカニズムを通じて転写の下方制御を行っていることが明らかになった。またその「転写収斂」は Enhancer と標的遺伝子の物理的結合（P-E ループ）が制御していることも分かった。これらの知見は今後ダイレクトリプログラミング技術を安全かつ安定したものとして改善していくうえで重要な情報となる。また、Foxa は内胚葉系臓器の発生にとって非常に重要な働きをする転写因子でもあり、発生生物学的な観点からも重要な知見であると言えよう。今回構築した degron tag を用いた誘導転写因子の発現制御系を用いることで、今後より詳細な現象の解明と理解が進むと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学生体防御医学研究所の鈴木淳史教授、大川恭行教授、長﨑正朗教授、唐澤皐月大学院生、国立国際医療センターの植野和子研究員である。

文　献

1） Horisawa K, Suzuki A. Direct cell-fate conversion of somatic cells: Toward regenerative medicine and industries. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2020 96(4):131-158. PMID: 32281550 DOI: 10.2183/pjab.96.012

2） Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. Nature. 2011 Jun 29;475(7356):390-3. PMID: 21716291 DOI: 10.1038/nature10263

3） Inada H, Udono M, Matsuda-Ito K, Horisawa K, Ohkawa Y, Miura S, Goya T, Yamamoto J, Nagasaki M, Ueno K, Saitou D, Suyama M, Maehara Y, Kumamaru W, Ogawa Y, Sekiya S, Suzuki A. Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells Nat Commun. 2020 Oct 21;11(1):5292. PMID: 33087715 DOI: 10.1038/s41467-020-19041-z

4) Miura S, Suzuki A. Generation of Mouse and Human Organoid-Forming Intestinal Progenitor Cells by Direct Lineage Reprogramming. Cell Stem Cell. 2017 Oct 5;21(4):456-471.e5. Epub 2017 Sep 21. PMID: 28943029 DOI: 10.1016/j.stem.2017.08.020

5) Luo C, Lee QY, Wapinski O, Castanon R, Nery JR, Mall M, Kareta MS, Cullen SM, Goodell MA, Chang HY, Wernig M, Ecker JR. Global DNA methylation remodeling during direct reprogramming of fibroblasts to neurons. Elife. 2019 Jan 15;8:e40197. PMID: 30644360 DOI: 10.7554/eLife.40197

6) Horisawa K, Udono M, Ueno K, Ohkawa Y, Nagasaki M, Sekiya S, Suzuki A. The Dynamics of Transcriptional Activation by Hepatic Reprogramming Factors. Mol Cell. 2020 Aug 20;79(4):660-676.e8. Epub 2020 Aug 4. PMID: 32755593 DOI: 10.1016/j.molcel.2020.07.012

7) Mumbach MR, Rubin AJ, Flynn RA, Dai C, Khavari PA, Greenleaf WJ, Chang HY. HiChIP: efficient and sensitive analysis of protein-directed genome architecture. Nat Methods. 2016 Nov;13(11):919-922. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27643841 DOI: 10.1038/nmeth.3999