

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム (カナダ)

(英語) Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)

研究開発課題名：(日本語) 生体内細胞初期化モデルを用いた細胞アイデンティティの維持機構解明と発がんとの関連性の解明

(英語) Uncovering mechanisms underlying maintenance of cellular identity and its association with cancer development

研究開発担当者 (日本語) iPS細胞研究所 教授 山田泰広

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Professor, Yasuhiro Yamada

実施期間：平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 遺伝子改変技術を応用した細胞運命制御法の開発

開発課題名：(英語) Development of Assisted Cell state Alterations (ACsA) using genome editing technology

研究開発分担者 (日本語) iPS細胞研究所 准教授 ウォルツェン クヌート

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Associate Professor, Knut Woltjen

分担研究 (日本語) エピゲノムの網羅的解析およびその制御による細胞運命維持機構解明

開発課題名：(英語) Comprehensive epigenome analysis and elucidation of the epigenome-mediated mechanism for maintenance of cellular identity

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 主任研究員 眞貝 洋一

所属 役職 氏名：(英語) RIKEN, Chief Scientist, Yoichi Shinkai

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

Aim and goal of the joint research

本研究では、細胞初期化因子発現によって出現するiPS細胞を含む準安定的細胞の樹立、分化に関わるエピジェネティック修飾状態、遺伝子発現状態の変化を解析することにより、細胞アイデンティティの維持、変化に関わるエピジェネティクス制御機構を理解することを目指す。得られた知見は、細胞アイデンティティを積極的に制御する手法ACSA (Assisted Cell-state Alteration)に応用することで、高効率の細胞運命の制御方法の開発を目指す。開発したACSA法を疾患原因細胞に応用し、疾患発症メカニズムの解明やその治療法開発に発展させる。

Outcomes of the research

日本側、カナダ側ともに細胞初期化に関連して出現する準安定的な細胞を同定し、それぞれの特徴を解析した。日本側研究グループは生体内で体細胞が初期化できる生体内細胞初期化モデルを作製した。生体内での一過性の初期化因子の発現により、がん細胞に類似した細胞が出現することを示した(*Cell* 2014)。さらにiPS細胞前駆細胞の完全初期化においてKlf4が重要な役割を持つことを示した(*Stem Cell Reports* 2015)。カナダ側グループは試験管内細胞初期化システムを用いて従来の多能性幹細胞とは異なるF-Class細胞の樹立を報告した(*Nature* 2014, *Nature* 2014, *Nature Comm* 2014, *Nature Comm* 2014)。初期化因子発現レベルの違いが細胞の運命制御に重要な役割を果たすことを示した。

Collaboration between Japanese and Canadian research teams

上述の準安定的細胞の解析において、両国の研究者間での情報交換が重要な役割を果たした。生体内初期化失敗細胞(*Cell* 2014) と iPS細胞前駆細胞(*Stem Cell Reports* 2015) の解析は、Yamada Group と Woltjen Group の共同研究であり、Woltjen Group と Nagy Group は共著論文(*Methods in Molecular Biology* 2016)を出版した。日本、カナダ両研究グループはそれぞれ独立した細胞初期化可能マウスを作製しており、研究サンプルの相互利用を行った。初期化因子発現レベルの違いが与える細胞運命制御への影響について最新の情報交換を行った(Toronto July 24-27, 2016)。若手研究者育成の取り組みとして、日本側の大学院生をカナダ幹細胞学会に参加させ、カナダ側研究者との情報交換を行った(*Till & McCulloch Meetings Whistler, October 24-26, 2016*)。

Future prospect

細胞初期化に関連して出現する3種類の準安定的細胞（生体内初期化失敗細胞(*Cell* 2014)、iPS細胞前駆細胞(*Stem Cell Reports* 2015)およびF-Class細胞(*Nature* 2014, *Nature* 2014))の比較検討を行う。また日本、カナダ両研究グループそれぞれが開発した細胞初期化可能マウスを解析し、細胞アイデンティティの維持、変化に関わる知見をヒト細胞に応用することで、ヒト疾患発症メカニズムの理解や安全で効果的な細胞移植医療開発への応用を目指す。初期化因子発現レベルの違いによる新たな細胞運命制御方法の開発を行う。

英文

The goal of the collaborative research is to characterize the epigenetic states accompanying cell identity changes, or Assisted Cell state Alterations (ACSA) during reprogramming and differentiation. The knowledge gained from this joint effort will hold significant value for improving ACSA techniques and control over cell-state changes to multiple fate destinations, which in turn will result in cell products better suited for disease modeling and translation to regenerative medicine applications. Furthermore, we believe the efforts of this project will better bridge our extensive insights gained from mouse models toward better understanding human conditions, many currently regarded as incurable. The foundation of this proposal lies in the enormous

dataset that has been assembled under “Project Grandiose,” (PG) which is built on use of the *piggyBac* reprogramming transposon developed by the Nagy group to generate transgenic mouse iPSC lines that is now utilized worldwide. Using parallel molecular analyses including genome wide mapping of chromatin modifications, CpG methylation, and small (miRNA) and large transcriptome, and proteome analysis, we characterized the AScA that arise during reprogramming. The data were analyzed to specifically define the molecular differences between two alternative pluripotent states (reprogramming factor expression dependent F-class and factor independent ESC-like iPS cells) (*Nature* 2014, *Nature* 2014, *Nature Comm* 2014, *Nature Comm* 2014). In addition, the *in vivo* reprogrammed mouse model developed by the Yamada lab (*Cell* 2014) provides a tremendous complement to the *in vitro piggyBac* method.

The Yamada and Shinkai groups tried to characterize the epigenetic marks associated with the tendency for some cell-states to gain a cancer cell identity resulting from transient expression of reprogramming factors in the reprogrammable mouse model. The Woltjen group determined how the stoichiometry of Klf4, one of reprogramming factors, drives heterogeneity and alternate reprogramming outcomes (cell states). Variations in Klf4 protein levels can change reprogramming kinetics, success rates, and the identities of “partially” reprogrammed cells (*Stem Cell Reports* 2015). The Nagy, Woltjen and Yamada research teams have completed microarray analyses of their respective cells associated with reprogramming – the Nagy team’s fibroblast-derived F-class cells, the Woltjen group’s intermediate cells during *in vitro* reprogramming from MEFs and Yamada group’s kidney cell-derived cancer-like cells. Progress on reducing the required cell number for CHIP analysis by the Shinkai group now positions us to be able to address the role of specific posttranslational modification of histone tail residues in these cell types as well. Combining the microarray and epigenetic data of respective cells that are associated with reprogramming should contribute to better understanding of epigenetic changes during cell fate alteration. We hope to find commonality within observed epigenetic changes during the respective ACSA processes, as well as epigenetic signatures consistently associated with tumor development.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 8 件）

1. Hashimoto K, Yamada Y, Semi K, Yagi M, Tanaka A, Itakura F, Aoki H, Kunisada T, **Woltjen K**, Haga H, Sakai Y, Yamamoto T, ***Yamada Y**. Cellular context-dependent consequences of Apc mutations on gene regulation and cellular behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jan 24;114(4):758-763.
2. Taguchi J, ***Yamada Y**. Unveiling the role of senescence-induced cellular plasticity. *Cell Stem Cell*. 2017 Mar 2; 20(3):293-294.
3. Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, **Woltjen K**, Yamamoto T, Akiyama H, ***Yamada Y**. *EWS-FLII*-induced osteosarcoma model unveiled a crucial role of impaired osteogenic differentiation on osteosarcoma development. *Stem Cell Reports*. 2016 6(4):592-606.
4. ***Woltjen K**, Ocegüera-Yanez F, Kagawa H and Kim S-I. At the Conflux of Human Genome Engineering and Induced Pluripotency. *Genome Editing*, Springer International Publishing, Cham, 2016, 45–64.
5. Ocegüera-Yanez F, Kim S-I, Matsumoto T, Tan GW, Xiang L, Hatani T, Kondo T, Ikeya M, Yoshida Y, Inoue H and ***Woltjen K**. Engineering the AAVS1 Locus for Consistent and Scalable Transgene

Expression in Human iPSCs and Their Differentiated Derivatives. *Methods (San Diego, Calif)*, 2016 **101**, 43–55.

6. **Woltjen K**, Yamamoto T, Kokubu C and Takeda J. Report on the Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (TGE 2015): Advancing Cutting-Edge Genomics Technology in the Ancient City of Nara. *Genes to cells: 2016 devoted to molecular & cellular mechanisms*.
7. Kim S-I, Ocegüera-Yanez F, Sakurai C, Nakagawa M, Yamanaka S and ***Woltjen K**. Inducible Transgene Expression in Human iPS Cells Using Versatile All-in-One piggyBac Transposons. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2016 **1357**, 111–131.
8. ***Woltjen K**, Kim S-I and Nagy A. The piggyBac Transposon as a Platform Technology for Somatic Cell Reprogramming Studies in Mouse. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*, 2016 **1357**, 1–22.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Yamada Y**, DISSECTING CANCER BIOLOGY WITH iPSC TECHNOLOGY, The 41st NAITO Conference, 2016/7/7, 国内
2. **Yamada Y**, Dissecting the cancer biology with iPS cell technology, The 9th Guangzhou International Conference on Stem Cell and Regenerative Medicine, 2016/12/21, Guangzhou

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞作製技術を用いたがんエピゲノム研究, 山田泰広, 名古屋市立大学オープンカレッジ, 2016/11/18, 国内
2. iPS 細胞を使ってがんを知る, 山田泰広, 日本がん分子標的治療学会学術集会 20 回記念 特別企画 市民公開講座, 2016/6/1, 国内

(4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 戦略的国際共同研究プログラム (カナダ)

(英語) Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)

研究開発課題名：(日本語) 生体内細胞初期化モデルを用いた細胞アイデンティティの維持機構解明と発がんとの関連性の解明

(英語) Uncovering mechanisms underlying maintenance of cellular identity and its association with cancer development

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 教授 山田泰広

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS Cell Research and Application (CiRA), Professor, Yasuhiro Yamada

実施期間：平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) エピゲノムの網羅的解析およびその制御による細胞運命維持機構解明

開発課題名：(英語) Comprehensive epigenome analysis and elucidation of the epigenome-mediated mechanism for maintenance of cellular identity

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 主任研究員 眞貝 洋一

所属 役職 氏名：(英語) RIKEN, Chief Scientist, Yoichi Shinkai

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立大学法人京都大学 iPS 細胞研究所 山田泰広 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 件、国際誌 件)

1. Muramatsu D. Kimura H. Kotoshiba K. Tachibana M. and Shinkai, Y. Pericentric H3K9me3 formation by HP1 interaction-defective histone methyltransferase Suv39h1. Cell Structure and Function., 2016, 41(2):145-152.

2. Koide S, Oshima M, Takubo K, Yamazaki S, Nitta E, Saraya A, Aoyama K, Kato Y, Miyagi S, Nakajima-Takagi Y, Chiba T, Matsui H, Arai F, Suzuki Y, Kimura H, Nakauchi H, Suda T, Shinkai Y, Iwama A. Setdb1 maintains hematopoietic stem and progenitor cells by restricting the ectopic activation of nonhematopoietic genes. *Blood*. 2016 Aug 4;128(5):638-649.
3. Takikita S, Muro R, Takai T, Otsubo T, Kawamura YI, Dohi T, Oda H, Kitajima M, Oshima K, Hattori M, Endo TA, Toyoda T, Weis J, Shinkai Y, Suzuki H. A Histone Methyltransferase ESET Is Critical for T Cell Development. *J. Immunol*. 2016, Sep 15;197(6):2269-2279.

4.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Setdb1-Atf7ip 複合体による内在性レトロウイルス抑制機構の解析、ポスター、加藤雅紀、津坂剛史、眞貝洋一、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/20、国内
2. 体細胞におけるヒストンメチル化酵素 Setdb1 の機能の解析、加藤雅紀、竹本経緯子、眞貝洋一、第39回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内
3. Silencing of endogenous retroviruses (ERVs) mediated by the Setdb1-Atf7ip complex. poster, Masaki Kato, Takeshi Tsusaka, Kei Fukuda, Kosuke Yusa, Yoichi Shinkai, RIKEN Epigenetics in Tsukuba, 2017/2/16-17, Japan
4. The histone methyltransferase Setdb1 represses VL30 retrotransposones to prevent the IFN pathway induction in somatic cells. poster, Masaki Kato, Keiko Takemoto, Yoichi Shinkai, CDB Symposium 2017, 2017/3/27-29, Japan
5. エピゲノムはどこまで操れるようになったか、口頭、眞貝洋一、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、2016/5/20、国内
6. エピジェネティクスによる生命機能制御、口頭、眞貝洋一、理化学研究所-埼玉大学理工学研究科、生命科学系合同シンポジウム、2017/1/26、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

該当なし