

2022年11月29日

東海大学

## 【研究発表】

### 女性由来多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の試験管産物特有の異常を回避 女性細胞の恒常性維持に重要なX染色体不活化の再獲得化に成功 ～女性特有のがんや自己免疫疾患のメカニズム解明に光明～

東海大学[伊勢原校舎](所在地:神奈川県伊勢原市下糟屋143、学長:山田 清志〔やまだ きよし〕) 医学部医学科基礎医学系の福田篤講師らの研究グループは、国立成育医療研究センター研究所 再生医療センターとの共同研究で、女性由来多能性幹細胞(ES細胞:胚性幹細胞/iPS細胞:人工多能性幹細胞)において不可逆的に失われたX染色体不活化の再獲得化に成功しました。また、X染色体不活化を再獲得化した患者由来のiPS細胞(疾患特異的iPS細胞<sup>1)</sup>)では神経分化が確認され、正確な病態モデリング<sup>2)</sup>研究が可能であることも示しました。この研究成果は日本時間2022年11月30日(水)午前1時(米国東部時間2022年11月29日(火)午前11時)公開の生命科学誌『Cell Reports Methods』オンライン版に掲載されます。

#### 研究のポイント

- ・女性由来多能性幹細胞(ES/iPS細胞)の試験管産物<sup>3)</sup>特有のX染色体異常を回避
- ・DNA切断(ゲノム編集技術)の新たな側面から、X染色体不活化の再獲得化に成功
- ・女性由来疾患特異的iPS細胞を用いた正確な病態モデリングが実施可能に

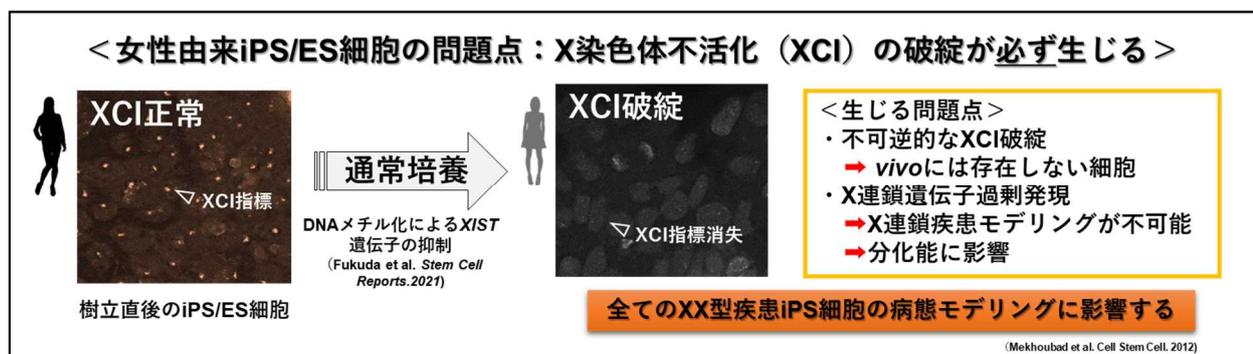
#### ■研究の背景

ヒト多能性幹細胞(ES/iPS細胞)は、体を構成するほぼすべての細胞へと分化できる万能細胞です。多能性幹細胞は、再生医学や薬剤応答試験など、ヒトの持つ遺伝的多様性を考慮した先端医療科学の中心的な存在でもあります。しかし、多能性幹細胞は体に実在しないことから、試験管産物特有の異常を示すことも報告されています。その代表的な例として、女性由来多能性幹細胞の特異的な性染色体であるX染色体の異常があり、“X染色体不活化の不可逆的破綻”と呼ばれています。

ヒトを含め、XX型(女性)の哺乳動物は、XY型(男性)と比べ、性染色体であるX染色体遺伝子の数が物理的に異なります。女性には2つのX染色体があるため、遺伝子数は2倍になりますが、体を構成するほとんどの女性細胞では、X染色体遺伝子が遺伝子数に比例して働かないようにする機能が元来備わっています。このメカニズムは“X染色体の不活化”と呼ばれ、男性の遺伝子量との補正の役割を担っています。X染色体の不活化を維持することは、女性細胞の恒常性の維持に極めて重要であり、近年では、女性特有のがんや自己免疫疾患との関連も報告されています。

一方、女性由来多能性幹細胞は、通常の培養条件ではX染色体の不活化が破綻し、多くのX染色体遺伝子が過剰に働きだします。その結果、生体内の細胞とは異なる状態となってしまう、その活用には大きな制限が懸念されてきました。特に、疾患特異的iPS細胞を用いた研究では、得られた実験結

果が個人の遺伝的に有する遺伝子の変異に起因する異常なのか、試験管特有の X 染色体不活化破綻により引き起こされたものなのか結論付けられないといった問題が指摘されてきました。そのため、多くの女性特有の病態モデリングは、男性の多能性幹細胞株を用いて行われており、女性の疾患 iPS 細胞の活用に大きな制限があるのが現実でした（下図参照）。



## ■研究成果の概要

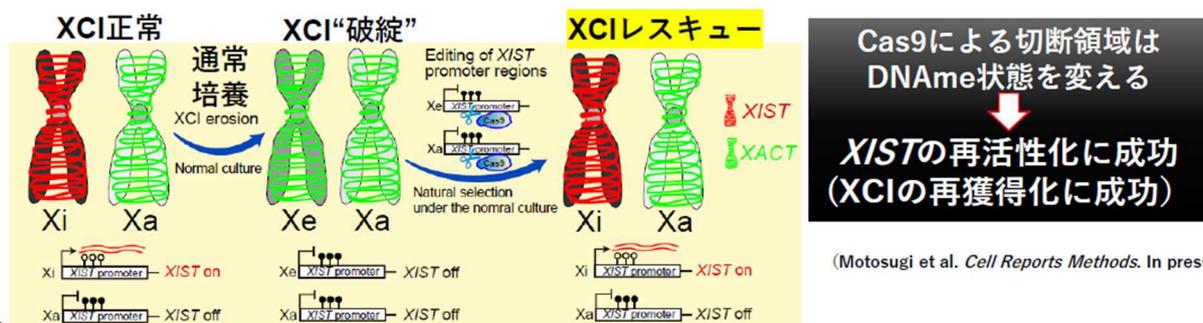
X 染色体の不活化は、large non-coding RNA<sup>4)</sup> の XIST 遺伝子<sup>5)</sup> によって制御されています。本研究グループではこれまでに、女性由来多能性幹細胞における XIST 遺伝子の発現が不可逆的に抑制されることで、X 染色体不活化の破綻が始まることを見出しました。特に、XIST 遺伝子の発現を制御する領域（プロモーター領域<sup>6)</sup>）において、DNA のメチル化<sup>7)</sup> が生じることで、XIST 遺伝子の発現抑制が引き起こされることを明らかにしています。

今回の研究では、この XIST 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化状態を元に戻すことが XIST 遺伝子の再活性化につながり、最終的に X 染色体不活化を再獲得できるのではないかと仮説を立てました。近年、Cas9 ヌクレアーゼ<sup>8)</sup> によって DNA を切断するゲノム編集において、切断領域に DNA メチル化が蓄積することがあるとの報告があります。これに対し本研究グループは全く逆の現象を予測し、XIST 遺伝子領域の異常な DNA メチル化が DNA 切断により、脱メチル化される可能性を探りました。その結果、XIST 遺伝子のプロモーター領域で DNA 切断を引き起こさせると、DNA の脱メチル化が生じ、XIST 遺伝子が再活性化することがわかりました。具体的には Cas9 ヌクレアーゼによる DNA 切断を行うことで、切断領域の DNA メチル化状態が変化し、遺伝子の再活性化が可能であることを明らかにしました（下図参照）。さらに、XIST 遺伝子が再活性化した女性由来多能性幹細胞では、最終的に X 染色体不活化が復活することも明らかにしています。この現象は、検証したすべての女性由来 ES/iPS 細胞で確認され、再現性の高さが実証されました（特許出願済）。

また、X 染色体不活化の再獲得化技術をレット症候群<sup>9)</sup> 患者由来の iPS 細胞 (X 染色体上の MECP2 遺伝子<sup>10)</sup> が原因の神経発達異常などを示す) に応用しました。その結果、X 染色体不活化が破綻したレット iPS 細胞では神経発生が乏しいのに対し、X 染色体不活化が復活した細胞では正常な神経分化が行われることを明らかにしました。これらの結果から、レット症候群由来 iPS 細胞の神経分化は、X 染色体不活化状態を正常化させることで、本来の原因である MECP2 遺伝子による影響を解析することが初めて可能になり、X 染色体不活化状態が正常な疾患 iPS 細胞を用いた病態モデリングの根幹技術の開発につながりました。

## 女性ES/iPS細胞での不可逆的な異常をレスキュー

ゲノム編集の新たな側面から女性ES/iPS細胞でのX染色体不活化の再獲得化に成功



### ■本研究の意義と今後の展望

ヒトは多様性に富んだ生き物であり、疾患の発症や薬効などでも「性差」は大きな要因となっています。iPS細胞技術、ゲノム編集技術は生命医学研究において強力なツールであることは確かですが、試験管培養における女性由来多能性幹細胞特有のX染色体不活化破綻の影響は、生体内での現象とは異なる結果をもたらすことが今回の研究で実証されました。本研究成果が女性由来多能性幹細胞の活用の幅を飛躍的に広げるとともに、女性特有の疾患メカニズムの解明につながることを期待されます。

### ■特記事項

本研究は以下の支援をもとに行われました。

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED)

- 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム)  
代表：福田篤「ヒト多能性幹細胞を用いた転写/エピゲノム多様性・性差に基づく神経細胞分化能の制御機構解明と予測モデルの構築」(19bm0704038h0001)
- 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (疾患特異的iPS細胞の利活用促進・難病研究加速プログラム) 代表：福田篤「革新的遺伝子量補正法による性特異的X連鎖難治疾患iPS細胞を用いた脳神経病態モデリングに関する研究開発」(21bm0804030h0001)

## ■掲載論文

- 掲載誌 : Cell Reports Methods. (オンライン版)
- タイトル : De-erosion of X-chromosome dosage compensation by editing of XIST regulatory regions restores differentiation potential in hPSCs.
- 掲載日 : 日本時間2022年11月30日 (水) 午前1時 [米国東部時間2022年11月29日 (火) 午前11時]
- 著者 : 本杉奈美<sup>1</sup>、杉山晶子<sup>1</sup>、岡田千沙<sup>4</sup>、大友麻子<sup>1,2,3</sup>、梅澤明弘<sup>5</sup>、阿久津英憲<sup>5</sup>、秦野伸二<sup>1,2,3</sup>、福田篤<sup>1,2,3,5</sup> (#) (#Corresponding Author)
- 所属情報
1. 東海大学医学部医学科基礎医学系分子生命科学
  2. 東海大学総合医学研究所
  3. 東海大学マイクロナノテクノロジーセンター
  4. 東海大学生命科学統合支援センター
  5. 国立成育医療研究センター研究所 再生医療センター
- D O I : doi.org/10.1016/j.crmeth.2022.100352

## ■用語解説

- 1) **疾患特異的 iPS 細胞** : 遺伝性変異などをもつ患者から樹立された iPS 細胞。疾患の病態を試験管で、遺伝的背景を考慮し、解析可能である。患者特有の病態モデリングや薬剤応答解析などに役立つ。
- 2) **病態モデリング** : ES/iPS 細胞を用いて、培養容器の中で病気を再現させる医学研究。疾患発症のメカニズム解明や効果的な薬剤選抜に大いに役立つ。
- 3) **試験管産物** : 培養容器の中で作製された細胞や現象。本来、生体には存在しない細胞や現象を示す。
- 4) **large non-coding RNA** : RNA の一種であり、タンパク質を作らない遺伝子 (“非コード RNA” と呼ぶ)。RNA 分子の中でも大きな分子を示す。具体的な定義はないが、数 Kb~数百 Kb まであるものもある。タンパク質を作らないが、RNA 分子として DNA や他の RNA に作用することで、遺伝子発現を制御することがある。
- 5) **XIST 遺伝子** : Large non-coding RNA の代表的な遺伝子。X 染色体に存在し、X 染色体不活化の開始、維持に必須であり、女性細胞においてのみ確認される。XIST RNA 分子は、発現した染色体全体の機能を抑制することが出来る。ヒトを含む哺乳動物では、1 つの遺伝子で染色体全体を制御する遺伝子は、XIST 以外報告がない。
- 6) **プロモーター領域** : 遺伝子の発現 (働き) を制御する DNA 領域。遺伝子本体やその上流に位置することが多く、DNA メチル化修飾を介して、遺伝子の発現制御が行われることが多い。
- 7) **DNA メチル化** : DNA にメチル基が修飾されることで、タンパク質の結合などが変化し、遺伝子発現に影響を及ぼすエピジェネティックな機構の一種。

8) **Cas9ヌクレアーゼ** : Cas9 と呼ばれるタンパク質であり、DNA を切断する機能をもつ。ゲノム編集における“はさみ”のような役割を担っており、DNA を切断する。通常のゲノム編集では、DNA 切断後に、細胞が持つ“自己修復機能”によって、切断 DNA は修復される。今回の研究では、Cas9ヌクレアーゼによる DNA の修復後に、DNA メチル化状態までは、完全に回復出来ないことを発見した。この“不完全な修復”を利用し、XIST 遺伝子の再獲得化（DNA の脱メチル化→XIST 遺伝子の活性化）に成功した。

9) **レット症候群** : 女児特異的に発症する神経疾患であり、難病指定されている。精神発達遅滞やてんかんなど様々な神経症状が生じるが、根本的な治療法が確立されていない

10) **MECP2 遺伝子** : X 染色体上に存在する DNA 結合性タンパク質で多くの遺伝子の発現を制御する。多くのレット症候群患者では、MECP2 遺伝子のヘテロ変異（2 対ある遺伝子のうち、1 つが変異を持つ状態）が確認される。男性の場合は、X 染色体が 1 つしかないため、MECP2 に変異を持つ場合、生体まで至らず胚性で致死となると考えられている。

<研究に関するお問い合わせ>

東海大学医学部医学部医学科基礎医学系 福田篤  
TEL. 0463-93-1121（代表） Email : fa972942@tsc.u-tokai.ac.jp

東海大学 ビーワンオフィス 担当：喜友名、林  
TEL.0463-63-4670（直通） E-mail : pr@tsc.u-tokai.ac.jp