

【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ケンス (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」

