

ヒトES/iPS細胞を用いたAgingに伴うX染色体破綻が初期胚発生能に及ぼす影響の解明

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学 福田 篤

要約

ヒト多能性幹細胞(胚性幹細胞:Embryonic stem cells, iPS細胞)は、体を構成するほぼ全ての細胞に分化すること可能である。発生学的観点と遺伝子発現状態から、ヒト多能性幹細胞は初期胚エピプラストと類似する点が多いことが明らかとなっている。近年、原因不明の不育症の割合は増加しているが、胚側がどの程度発生能を有するかなどの、胚側に着目した研究は殆ど行われていないのが現状である。近年のヒト初期胚を用いた解析から、広く使用されている実験動物のマウスとヒトでは、根本的な遺伝子発現プログラムが異なることが報告されている。従って、ヒト多能性幹細胞を用いた生殖医療の基礎研究へのアプローチは、原因不明不育症に対する胚側のポテンシャルを解析するうえで重要な知見を提供出来る。近年、女性におけるAgingにおいて、X染色体遺伝子群の異常が報告されている。通常、女性の細胞は、2対あるX染色体のうちランダムに1つを不活化するX染色体不活化機構が備わっているが、ヒト多能性幹細胞においては、X染色体不活化の破綻が頻発する。その結果、がん関連の遺伝子群の発現亢進など他、X染色体遺伝子群の発現異常を引き起こし、Aging細胞と似た特徴を示す(1)。本研究では、女性ヒト多能性幹細胞におけるX染色体不活化の破綻において観察される、X染色体遺伝子群の発現異常が、ヒト初期発生においてどのような影響があるかをin vitroモデルにおいて解析し、胚側の遺伝子発現プログラム異常が及ぼす不育症の可能性を検証する。

緒言

近年、原因不明の不育症の割合が増加しているが、胚側の異常を分子レベルで検証する至適なin vitroモデルは存在しないのが現状である。ヒト初期胚発生研究では、サンプルの希少性や倫理的問題から試験管産物での代替研究が必須である。ヒト多能性幹細胞は、胚性幹細胞(ES細胞)、iPS細胞の2種類があり、体を構成するほぼ全ての細胞に分化することが可能である。ヒト多能性幹細胞は、遺伝子発現状態から、ヒト初期胚細胞におけるエピプラストのカウンターパートとして考えられている(2)。そのため、ヒト多能性幹細胞の特性に着目することは、ヒト初期胚におけるin vitro発生能評価を行ううえで至適なシステムであると考えられる。

ヒト初期胚発生では、時空間的な遺伝子発現とエピゲノムダイナミクスが生じる。とりわけ、胚性遺伝子群の活性化に伴う代表的なエピゲノム変化として、女性のX染色体不活化が知られている。X染色体不活化(X-Chromosome Inactivation)は、女性の2対あるX染色体のうち1つを不活性化することで、男性とのX染色体遺伝子量の補正を行う機構で

ある。X染色体不活化の維持は、女性細胞の生存性に極めて重要な役割を果たしていることが、マウスなどのモデル動物の実験から明らかとなっている。さらに、近年X染色体不活化の異常は、乳がんやAgingなどの関与が示されている(1, 3)。一方、女性のヒト多能性幹細胞では、X染色体不活化状態が不安定であり、その正常性が長期培養によって消失することが報告されている(4)。この状態は、癌関連の遺伝子群の発現亢進を伴い、Agingした細胞のような特徴を示す。しかし、X染色体不活化破綻のヒト多能性幹細胞がどのような分化能や分子生物学的特徴を示すかは不明な点が多く、解明が望まれている。

方法

X染色体不活化破綻のヒト多能性幹細胞(以下、Eroded hPSCs)は、これまでの報告からX染色体関連遺伝子群の破綻が報告されており、Aging細胞の特徴と類似する部分がある。そこで、本研究ではEroded hPSCsをAgingしたヒト初期胚細胞のモデルとして、その特性を解明することを目指した。

私達のグループでは、Eroded hPSCsにおいて顕著に発現亢進が確認され、X染色体から発現されるlarge non-coding RNA XACTに注目した(5)。XACT遺伝子はヒト初期胚で特異的な発現が確認されているが、その機能に関しては全く未知である。XACT遺伝子の発現パターンなどをRNA-Fluorescence in situ hybridization (RNA-FISH)法や蛍光免疫染色法などを用いて詳細に明らかにする。さらに、ゲノム編集技術を駆使し、XACT遺伝子の欠損などを行い、RNA-sequencing解析からその遺伝子機能を推定する。また、公共データベースにあるヒト初期胚細胞との遺伝子発現データなどと比較解析することで、XACT遺伝子欠損がどのように発生能へ影響するのかを考察する。

本研究は、文部科学省ヒトES細胞の使用に関する指針に基づき、東海大学医の倫理委員会での承認された研究計画に基づき実施された。

結果

・女性ヒト多能性幹細胞におけるX染色体不活化破綻の過程におけるXACT遺伝子の発現挙動

複数の女性ヒト多能性幹細胞株について、RNA-FISH解析を通じて、XACT遺伝子の発現状態を1細胞レベルで解析した。その結果、既報とは異なり不活性化X染色体上におけるXACT遺伝子の発現は、解析した全ての株において発現が確認出来なかった。一方、活性化X染色体では、約80%の細胞において発現が確認された。これらの結果では、XACT

遺伝子の不活化アリルからの活性化は、全ての女性多能性幹細胞において確認されるものではなく、培養条件等によって左右されることを示唆している。私達は、これらの結果が、RNA-FISH解析特有のピンポイントのタイムゾーンにおける現象であるかどうかを検証すべく、経時的なRNA-FISH解析を実施した。その結果、培養数日後では、X染色体不活化の破綻が進行しているのに対し、XACT遺伝子が不活化アリルから活性化する細胞は僅か数%であり、殆ど増加しないことが明らかとなった。これらの結果から、XACT遺伝子は女性ヒト多能性幹細胞におけるX染色体不活化の破綻過程においては、必ずしも活性化されないということを証明した。一方、既報と同様に、X染色体不活化のキー分子であるlarge non-coding RNA XIST遺伝子の発現消失は、全ての解析した細胞株で確認された(図1)。

・XACT遺伝子の発現消失におけるX染色体遺伝子群の発現状態

単一細胞レベルでのRNA-FISH解析から、XACT遺伝子はX染色体不活化破綻に関与していないことが明らかとなった。しかし、殆どの女性ヒト多能性幹細胞においては、X染色体不活化の破綻により、XACT遺伝子が両アリル発現する状態となる。そこで、私達はXACT遺伝子の欠損株を作製することで、XACT遺伝子がゲノムワイドにおよぼす影響に関して明らかにすることにした。

XACT遺伝子は、全長が約400Kbと巨大な遺伝

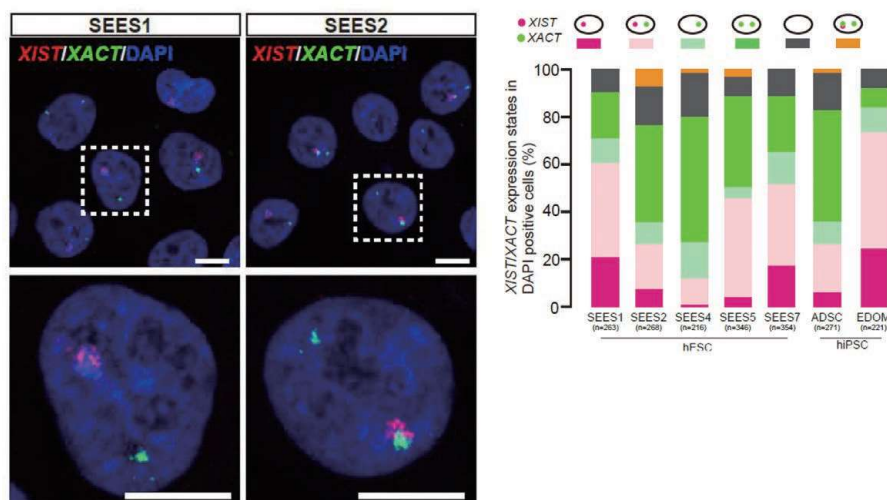


図1. XACT遺伝子の発現挙動

RNA-FISH解析からヒト多能性幹細胞 (hESC : ヒトES細胞, hiPSC : ヒトiPS細胞) におけるXACT/XIST遺伝子の割合を解析。XACT遺伝子がXIST遺伝子と共局在する細胞は極僅かであることを示した。

Motosugi et al. Cell Reports. 2021

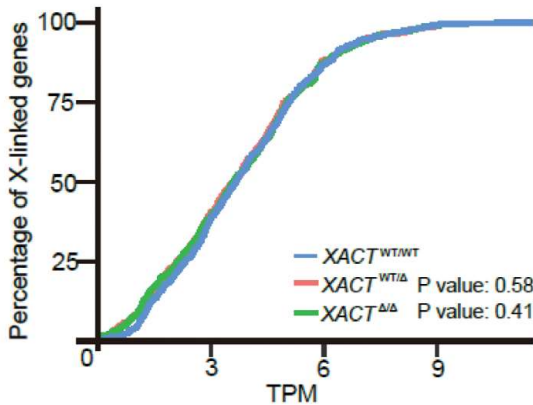


図2. XACT遺伝子欠損ヒトiPS細胞のX染色体遺伝子群発現状態
 XACT^{wt/wt}: XACT正常株, XACT^{wt/Δ}: XACTヘテロ欠損株, XACT^{Δ/Δ}: XACT compound変異株 RNA-sequencing解析から、X染色体遺伝子レベル (TPN) を累積度数分布により示した。統計処理はコルモゴロフ=スミルノフ検定により実施。XACT遺伝子変異株においてX染色体遺伝子群の発現量に有意な変化が無いことを示した。
 Motosugi et al. Cell Reports, 2021

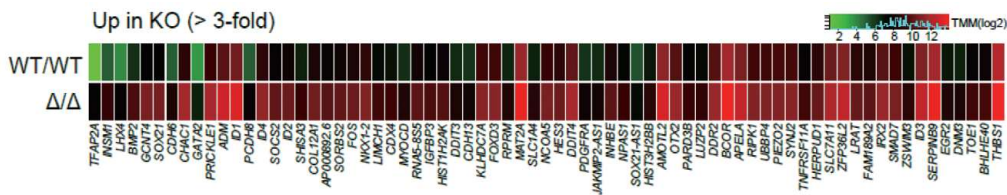


図3. XACT遺伝子欠損ヒトiPS細胞において発現亢進した遺伝子群
 XACT^{wt/wt}: XACT正常株, XACT^{wt/Δ}: XACTヘテロ欠損株, XACT^{Δ/Δ}: XACT compound変異株 RNA-sequencing解析から、XACT^{Δ/Δ}株において発現亢進した遺伝子群を抽出。SOX21, SOCS2などの神経系、TFAP2A, GATA2などの胎盤系細胞で発現する遺伝子群の発現亢進が確認された。
 Motosugi et al. Cell Reports, 2021

子であり、転写産物も約250Kbとlarge non-coding RNAである。そこで、効率的なゲノム編集を誘導するために、XACT遺伝子の末端にgRNAをそれぞれ設計した。さらに、より効率的に遺伝子導入細胞の選抜を可能にするために、CAS9遺伝子を導入する際に、薬剤選抜が可能なベクターを導入した。その結果、XACT遺伝子をHeterogenousに欠損した株を得た。さらにこの株に対し、別のgRNAを設計し、最終的にCompound heterozygous 変異株 (XACT^{Δ/Δ})を得ることが出来た。

網羅的な遺伝子発現状態を調べるために、RNA-sequencing解析を実施した。まず、X染色体遺伝子群への影響を検証するために、X染色体遺伝子における発現量の累積度数分布を作成した。その結果、XACT遺伝子の有無に関わらずX染色体遺伝子群の発現状態に変化はなく、XACT遺伝子がX染色体不活化の破綻の維持には関与しないことが明らかとなった(図2)。

・ XACT遺伝子の発現消失におけるゲノムワイドな発現変動遺伝子群の抽出

近年、large non-coding RNAは、RNA-タンパク質複合体を形成し、様々遺伝子発現を制御することが報告されている(6)。XACT遺伝子はその巨大な

大きさから、何かしらの機能を有すると推測されていたが、機能的な側面での報告は殆どない。そこで、私達はRNA-sequencingデータを詳細に解析し、XACT遺伝子の欠損株で特異的に発現変動する遺伝子群の抽出を行った。その結果、SOX21やSOCS2などの神経系と、GATA2やTFAP2Aなどの胎盤系細胞で発現する遺伝子群が、XACT^{Δ/Δ}株で発現亢進することが明らかとなった(図3挿入)。

考 察

ヒト多能性幹細胞におけるX染色体不活化の破綻は、不可逆的な現象である。X染色体上には約1000もの遺伝子があり、多くの疾患関連遺伝子群が存在する。一般的にX染色体不活化は、父方、母方アリルにおいてランダムに生じる。しかし、近年の研究からどちらか一方のアリルに偏ってX染色体不活化が生じる、Skewed XCIという現象が報告されている。さらに、Aging細胞では、X染色体上に変異が生じる割合は、有意に常染色体よりも多いことが報告されている(7)。また、各種がん細胞においても、不活性化X染色体上のゲノム異常の蓄積率は常染色体よりも高いことが報告されている(8)。マウスモデルの研究からは、X染色体不活化の破綻は胚性致死や、がん化を引き起こすことが報告されている

(9)。これらの知見を考慮すると、X染色体遺伝子群の正常な制御は、細胞の恒常性を維持するうえで極めて重要であると言える。

X染色体遺伝子群の発現変動ダイナミクスは、初期発生胚において顕著に観察される。本研究で着目したXACT遺伝子も、代表的な初期胚特異的発現を示すX連鎖遺伝子である。私達の結果から、XACT遺伝子は神経系と胎盤系遺伝子群の発現に関与することが示された。非常に興味深いことに、ヒト初期胚細胞におけるトランスクリプトーム解析の結果と比較すると、XACT遺伝子は、内胚葉、外胚葉系の細胞と比べ、胎盤系の細胞において有意に発現が低下していることが明らかとなった。これらの知見と、私達の結果を統合的に考えると、XACT遺伝子は初期胚細胞における分化制御において重要な役割を担っていることを示唆している。実際、私達はXACT遺伝子が神経系への発生を制御することを明かにしている(10)。即ち、XACT遺伝子の正常な制御は、ヒト胚が正常な分化能を得るには重要であることが示唆され、原因不明不育症などでは、このような遺伝子群の発現異常が関与しているかもしれない。

一方、ヒト多能性幹細胞を用いた再現性の高い3Dレベルでの初期胚モデリングシステムは構築されていないのが現状である。近年、Blastoid/Gastruloidの作製が報告されており、私達が作製したXACT遺伝子変異株を用いて3D初期胚モデリングを行うことは、生殖医療の発展において極めて重要な知見を提供出来ることが期待され、私達の研究展開としたい。さらに、幹細胞によるヒトモデリングの最大の利点は、倫理的課題が少ない点にある。また、様々な培地等を検討することが可能であり、高品質のヒト胚を培養するための、至適3Dinモデルを構築することも夢ではない。

ヒト多能性幹細胞は誕生から20年以上の歴史があり、近年のヒト生物学的研究の中心的な存在である。また、生殖細胞の作製なども実施されていることから、ヒト多能性幹細胞を用いた生殖医療の可能性はゆっくりではあるが着実に広がりを見せつつある。一方で、ゲノム解析・編集技術の発展は著しいものがある。特に、ゲノム編集は簡易であるが故に、多くの科学者が利用可能である。私達基礎医学者は、これらの技術の応用的側面に先走ることなく、真の目的は不妊・不育で悩める患者さんを救うべく、最

適なin vitroシステムを構築し、創薬開発等につなげていくことが重要であると考ええる。

参考文献

1. Grigoryan A, et al. (2021) Attrition of X Chromosome Inactivation in Aged Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 16(4):708-716.
2. Petropoulos S, et al. (2016) Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. *Cell* 165(4):1012-1026.
3. Chaligne R, et al. (2015) The inactive X chromosome is epigenetically unstable and transcriptionally labile in breast cancer. *Genome Res* 25(4):488-503.
4. Mekhoubad S, et al. (2012) Erosion of dosage compensation impacts human iPSC disease modeling. *Cell Stem Cell* 10(5):595-609.
5. Vallot C, et al. (2015) Erosion of X Chromosome Inactivation in Human Pluripotent Cells Initiates with XACT Coating and Depends on a Specific Heterochromatin Landscape. *Cell Stem Cell* 16(5):533-546.
6. Rinn JL & Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81:145-166.
7. Machiela MJ, et al. (2016) Female chromosome X mosaicism is age-related and preferentially affects the inactivated X chromosome. *Nat Commun* 7:11843.
8. Jager N, et al. (2013) Hypermutation of the inactive X chromosome is a frequent event in cancer. *Cell* 155(3):567-581.
9. Yildirim E, et al. (2013) Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell* 152(4):727-742.
10. Motosugi N, et al. (2021) Deletion of lncRNA XACT does not change expression dosage of X-linked genes, but affects differentiation potential in hPSCs. *Cell Rep* 35(10):109222.

Abstract

Human pluripotent stem cells (hPSCs) have shown great utility in biomedical research in applications ranging from modeling the role that genetic variation plays in disease, to their emerging use in cell replacement therapies. However, it is now widely accepted that female hPSCs (both induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells) gradually lose normal dosage regulation of X-linked genes during their culture. The erosion of dosage compensation results in aberrant X-linked genes expression status, similar to cancer and aging cells. In this study, we dissect the molecular mechanisms underlying the erosion of dosage compensation in female hPSCs. We focused on a novel large non-coding RNA, XACT, biallelically expressed from X-chromosomes and suggested as a key factor to regulate erosion of dosage compensation in female hPSCs. We found that XACT activation during erosion proceeds is not observed in all female hPSC lines analyzed. However, high passaged female hPSCs showed biallelic XACT expression in most of the cells. using genome editing technology, we revealed that XACT dysregulation caused up-regulation of genes associated with neuronal development and trophoblast. Given that XACT expression is limited to pluripotent cells such as preimplantation blastomeres, these results provide a novel insight of large non-coding RNA into developmental regulation in human.