

S1-01

再生医療におけるエピジェネティック因子の組織細胞化学

梅澤 明弘

国立成育医療研究センター 再生医療センター

再生医療において、エピジェネティクスを細胞評価に用いてきた例は少ない。一方、ヒト多能性幹細胞は、その作製段階にてエピゲノム改変を生じ、細胞評価に用いられる可能性は高い。実際に、山中博士らは、ヒト iPS 細胞樹立にかかる論文にてエピゲノム解析を細胞評価の試験法として利用している。エピジェネティクスとは DNA の塩基配列を変化させずに遺伝子の発現を調節するメカニズムであり、DNA のメチル化やヒストンの修飾のことである。個々の細胞の持つ固有のエピジェネティクス状態をエピゲノムと呼ぶ。細胞固有のエピゲノムパターンは細胞の組織特異的遺伝子発現パターンを決める記憶装置として働き、各細胞の性質を決定づける基盤となっている。ヒト多能性幹細胞のエピジェネティクス研究は、リプログラミング機構の解明に繋がるだけでなく、細胞の特性、未分化および分化制御機構の解明、さらには再生医療応用における移植細胞の細胞評価や規格化への応用に繋がる重要な領域である。ヒト iPS 細胞のエピジェネティクス研究は、単にリプログラミング機構の解明という生物学的価値にとどまらず、医療応用への期待の道でもある。エピゲノム変化を細胞評価として定量するに当たり、具体的なエピゲノム変化距離という指標を提唱できるのではないかと考えており、その解析方法についての開発をチーム内で行なっている。このエピゲノム変化距離は、進化におけるゲノム変化距離を模倣したものであり、継代毎 (Population doubling 毎) の変化を見ることが、安全性指標としての利用価値について検証している。ゲノム解析同様、ヒト体性細胞及び多能性幹細胞のエピゲノム状態を定量することで細胞評価システムを構築できると考える。

S1-02

DNA メチル化部位検出の形態学への展開

北澤 荘平, 原口 竜摩, 北澤 理子

愛媛大学 大学院 医学系研究科 分子病理学講座

DNA メチル化を中心とするエピジェネティクス制御機構は、個体や組織の発生・再生過程のみならず、腫瘍の発生や進展にも深く関与している。機能や病理形態学的変化に基づいてエピジェネティクス研究を展開するには、*in situ* で特定部位の DNA メチル化を検出する方法の確立が必要である。しかしながら、現時点では、本シンポジウムのオーガナイザー小路先生らの開発した制限酵素による選択的メチル化 DNA 切断による HELMET 法や、マイクロダイセクションで採取した特定の細胞集団から DNA メチル化を塩基特異的に検出する方法など、その検索方法は限られている。私どもは、sodium bisulfite 法と rolling circle amplification (RCA) 法とを組み合わせることにより、塩基配列特異的にメチル化 DNA を検出するという新規の組織化学的手法の開発に取り組んできた。RCA 法では、対象の DNA 塩基配列に結合した後、DNA ligase 処理で塩基配列依存的に環状構造になる特殊な padlock プローブを用いることにより、1 塩基の相違も正確に認識して、増幅・検出することが可能となる。メチル化部位と非メチル化部位は、sodium bisulfite 処理により、それぞれシトシンとウラシルに変換される性質に基づいて、この違いを認識する padlock プローブにより、メチル化シトシンの有無を塩基配列特異的に検出することができる。この一連の反応を組織切片上で行い、最終的な増幅反応の段階で、ビオチンなどで標識したプライマーを用いることにより、*in situ* で特定部位の DNA メチル化の検出が可能であった。本シンポジウムでは、この方法の詳細について報告し、岡本晃充 (東京大学先端科学技術研究センター教授) らが開発した、メチル化シトシンとオスミウム酸により、錯体形成をする bipyridine-adenine 標式 (ICON) プローブを用いた新たな試みについても報告する。