

# ヒト iPSC 株間における品質格差の分子メカニズムの解明： ZNF208 ドメイン境界の消失と間葉系への変質

学籍番号:5401069z

氏名:徳丸都子

生体構造医学講座/加藤英政 准教授 朱鵬翔 助教

## 責任指導教員による確認

本レポートの作成は、提出者本人が行い、研究不正に該当する剽窃、偽造、捏造を行っていないことを確認しました。

本レポートは学生西岡真天と共同して行った研究で、同じ研究成果の報告ですが、要約・緒言・考察については各自で作成したレポートであることを確認しました。

指導教員自署

---

## 謝辞

本研究遂行にあたりご指導いただきました、加藤先生、朱先生に感謝申し上げます。

## 要旨

ヒト iPS 細胞は再生医療への応用が期待される一方、樹立された細胞株間で分化能や増殖性に予期せぬ不均一性が生じる問題が未解決のままである。本研究は、この品質差の分子の実体を解明するため、14 サンプルのヒト iPS 細胞株を対象としたトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) および統合エピゲノム解析を行った。全遺伝子発現データを用いた主成分分析の結果、品質低下を起こした細胞株 (Drift 株) を特徴づける最大の要因として、第 19 染色体上の *ZNF208* を含むジンクフィンガー遺伝子クラスターの異常活性化を特定した。詳細な解析の結果、Drift 株では同領域における CTCF 結合部位が特異的に高メチル化されており、クロマチン境界 (インスレーター) 機能の崩壊が遺伝子発現制御の破綻を引き起こしていることが強く示唆された。さらに、これらの細胞では「Mesenchymal Drift」(間葉系漂流) と呼ばれる老化様の間葉系形質転換が確認された。以上の結果は、品質の悪い iPS 細胞が、単なる分化不全ではなく、インスレーター崩壊による「癌化類似のゲノム不安定性」と、Mesenchymal Drift による「細胞老化」という二重のリスクを抱えていることを示している。本研究は、Drift した iPS 細胞がヒトの老化および癌化メカニズムを解明するための新たな高精度疾患モデルとなり得る可能性を提示するものである。

## 緒言

無限の増殖能と多様な細胞への分化能を持つとされる人工多能性幹細胞(iPS細胞)は<sup>1</sup>、近年、再生医療や創薬の分野での活躍が期待されている。現在ではその樹立方法は標準化され<sup>2</sup>、誰でも容易にiPS細胞を作製できるようになったと一般には認識されている。しかし、この「標準化」という言葉の裏には、重大な落とし穴が潜んでいる。

iPS細胞の樹立過程である、山中因子を導入する初期化のステップに、依然として「ブラックボックス」性を抱えている。本研究で用いたヒトiPS細胞株の作製方法である非組込み型手法(エピゾーマル法)は、染色体を傷つけない利点がある一方で、細胞がどの時点でどの程度外来因子を発現していたかを、細胞作成後に判断することができない。すなわち、リプログラミングとは極めて確率的(Stochastic)な事象であり、この工程に内在する「不確定性」が、樹立された細胞株ごとの品質に予測不能な差を生じさせる根本原因となっている。

この「株間の不均一性」は、実用化における最大の障壁である。実際、研究現場では同一患者由来のiPS細胞でありながら、株によって異なる分化能を示す事例が発生している。<sup>3</sup>これは、再生医療における移植細胞の癌化(未分化細胞の残存)リスクという安全上の懸念や、分化誘導効率の著しいばらつきによる創薬研究の信頼性低下といった深刻な課題も抱えている。

本研究では、こうした見えざる「不確定性」の実体を、バイオインフォマティクス解析によって可視化し、その制御機構に迫ることを目的とする。

## 研究方法および材料

### 1. 解析対象データセット

本研究では、加藤研究室において加藤英政教授により取得済みのヒト iPS 細胞由来 RNA-seq データ(リードカウントおよび transcript per million; TPM 値)を使用した。

原データの由来となる細胞は、ヒト皮膚線維芽細胞からエピソーマルベクターを用いて樹立されたものである。解析対象として、以下の 2 群計 14 サンプルを用いた。

- T-iPSC 群(計 11 サンプル): 樹立時に山中 4 因子<sup>1</sup>に加えて DNA 脱メチル化活性を有する *TET1* 遺伝子<sup>4</sup>を導入した株(1T47 株、6T9 株、6T20 株、6T43 株)。
- C-iPSC 群(計 3 サンプル): 従来法(山中 4 因子のみ)で樹立した株(6C6 株のみ)。

なお、1T47 株のみ男性由来、その他の株は全て女性由来である。これらの細胞は、維持培養(ビトロネクチンコートおよび標準的な KFA 培地使用)を経て、高品質な RNA 抽出およびシーケンシング(生物学的トリPLICATEを含む)が行われたものである。

### 2. データ前処理および正規化

提供された遺伝子発現データ(TPM 値)に対し、以下のフィルタリングおよび正規化処理を行った。

1. 低発現遺伝子の除去: 発現ノイズを排除するため、全サンプルで  $TPM < 1$  の遺伝子を解析対象から除外した。

2. 対数変換: データの分散を安定化させるため、全ての遺伝子発現値に対して擬似カウントとして「1」を加えた後、底を 2 とする対数変換 ( $\log_2(\text{TPM}+1)$ ) を行った。

### 3. 主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA)

正規化後のデータを用い、Python 環境 (Google Colaboratory) にて主成分分析 (PCA) を実施した。算出された第 1 主成分 (PC1) および第 2 主成分 (PC2) を二次元プロット上に展開し、各サンプルの分布を可視化した。

また、PC1 軸の形成に寄与する因子を特定するため、PC1 の固有ベクトル (Loading scores) が正および負に大きい上位 100 遺伝子をそれぞれ抽出した。

### 4. 遺伝子機能解析 (Functional Enrichment Analysis)

抽出された PC1 寄与遺伝子群の生物学的機能を明らかにするため、Metascape (<https://metascape.org/>)<sup>5</sup> を用いた Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を実施した。統計学的有意水準は  $p < 0.05$  とした。

### 5. エピゲノムデータの統合可視化とデータの出典について

PCA 解析で同定された特定遺伝子座 (ZNF208 領域) の制御機構を解明するために、全ゲノムバイサルファイトシーケンス (WGBS) データを用いた DNA メチル化状態の解析、および ENCODE データベース (cCRE)<sup>6</sup> を用いたクロマチン構造情報の参照を行った。

なお、本研究は限られた期間内でのバイオインフォマティクス解析および考察力の習得を主眼としている。そのため、ここで使用した WGBS データ(1T47 株および 6C6 株)については、本人が新たに実験を行って取得したものではなく、加藤研究室において加藤英政教授により先行して取得・解析済みであった高品質なデータセットの提供を受けたものである。

私は、この提供されたエピゲノムデータ(BigWig 形式)と、自ら解析した RNA-seq データ、および公共データベース上の CTCF 結合領域情報を、統合ゲノムビューワー(IGV: Integrative Genomics Viewer)<sup>7</sup>上で同一ゲノム座標上に並列配置し、各レイヤー間の空間的相関を視覚的に評価・解析した。

## 実験結果

### 1. 全遺伝子発現データを用いた iPS 細胞株間の不均一性解析

本研究では、C-iPSC と T-iPSC のラベル(群分け)に依存せず、株間の不均一性を客観的に評価するため、全遺伝子発現データ(TPM)を用いた主成分分析(PCA)を行った。

初期解析(全遺伝子対象)の結果、第1主成分(PC1)は全変動の38.72%を説明した(図1)。PC1スコアの分布を確認すると、T-iPSCである1T47株(男性株)のみが正の領域にクラスターを形成する一方、他の全ての株(C-iPSC および一部の T-iPSC、全て女性株)は負の領域に広く分散していた。

このPC1軸の構成因子(ローディングスコア)を確認したところ(表1)、上位には *XIST* 等の性染色体関連遺伝子や、機能を持たない多数の偽遺伝子(Pseudogenes)、および機能が未確定な遺伝子(AC00...等)が含まれていた。

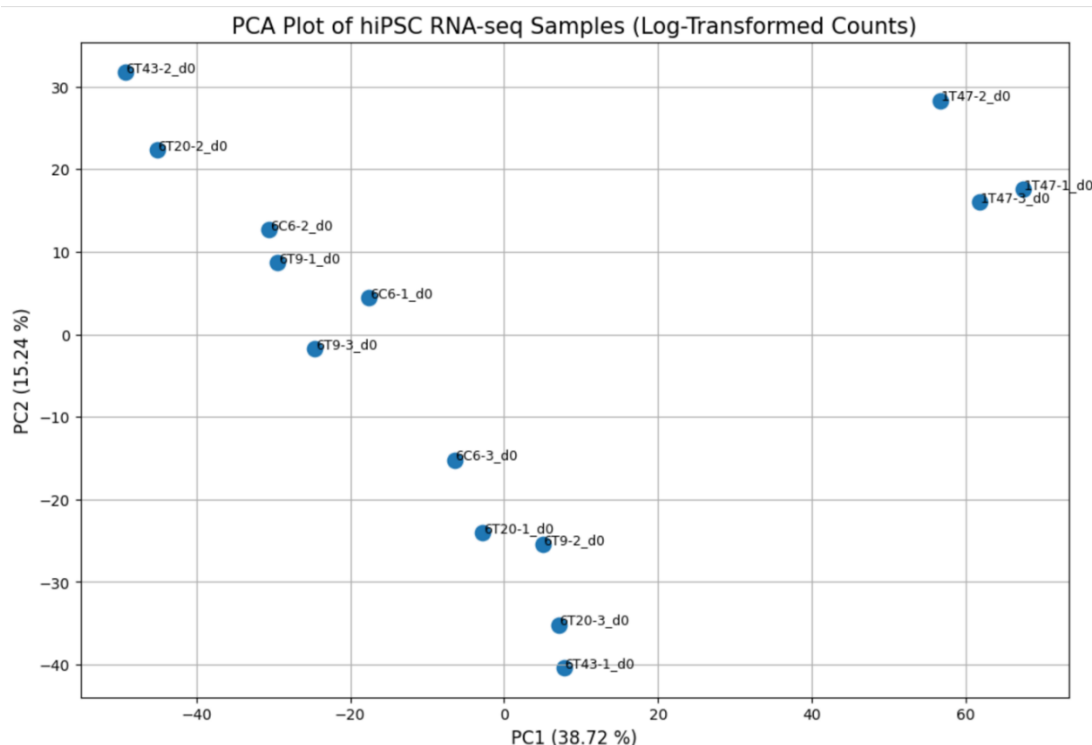


図1 ローディングプロット結果



## 2. ノイズ除去(フィルタリング)による品質関連因子の抽出

細胞のアイデンティティに関わる本質的な変動を抽出するため、以下のフィルタリング基準を設けて再解析を行った。

1. 性染色体遺伝子の除外(男女差の排除)
2. 偽遺伝子および機能未詳遺伝子の除外(生物学的機能を持つ遺伝子への絞り込み)

フィルタリング後のデータを用いた PCA の結果、PC1 軸上のサンプル分布は維持されつつも、1T47 株とその他の株群の分離がより明瞭となった(図 3)。

この純化された PC1 軸に寄与する遺伝子群(ネガティブ寄与上位 100 遺伝子)を抽出したところ(表 2)、*COL22A1*, *TWIST1*, *MMP1* といった間葉系細胞への分化や細胞遊走に関連する遺伝子群が新たに上位に検出された<sup>8</sup>。

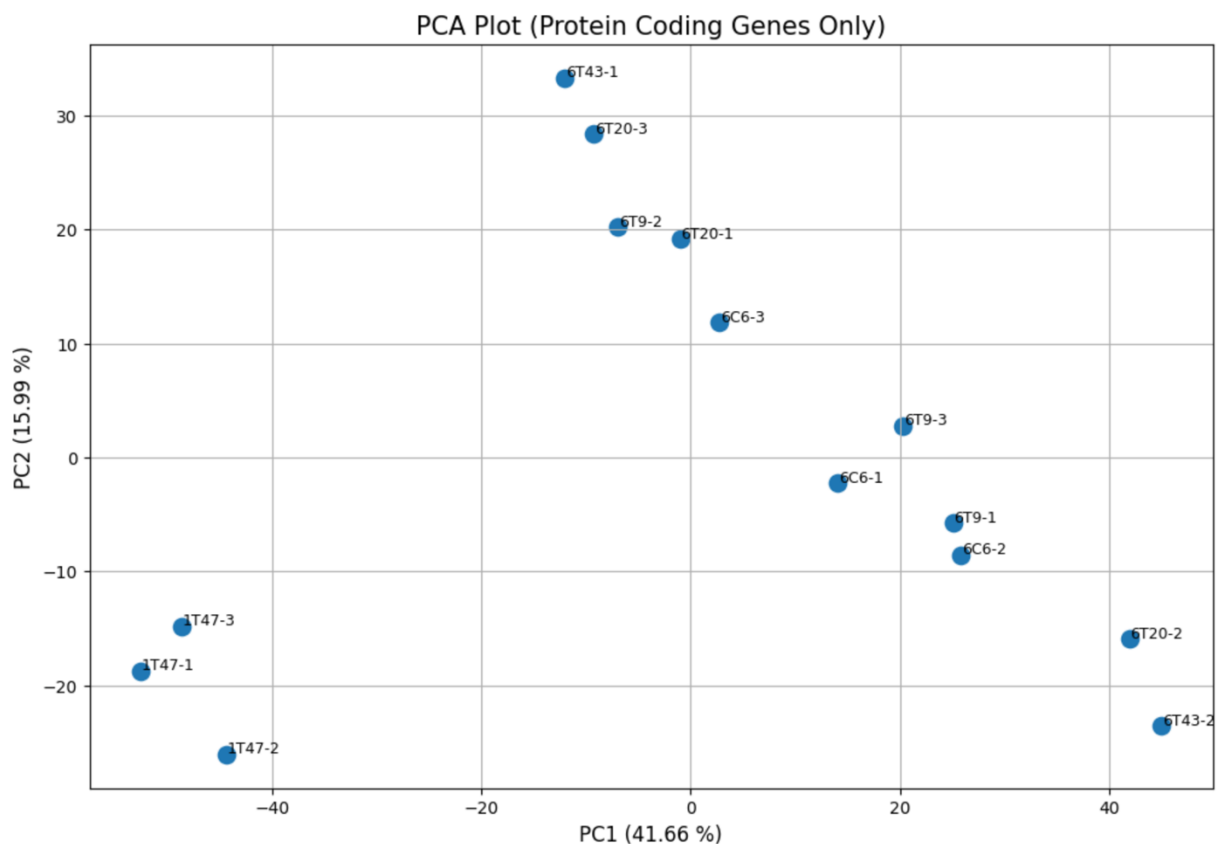


図 3 ローディングプロット結果(再解析)

Gene	PC1>Loading							
15301	ZNF208	0.065310	9483	AHNAK2	0.043158	10939	ALPK2	0.036641
15152	LY6K	0.058973	16255	CGB8	0.042932	12551	GREM1	0.036593
16487	TCERG1L	0.058848	15206	HRNR	0.042382	16246	NT5E	0.036432
15907	FLG	0.057324	11957	GLIPR1	0.042372	15898	CPA4	0.036343
10765	LCP1	0.056216	16493	TRIM49	0.042107	16069	GLIPR1L1	0.036267
15613	S100A3	0.056129	15622	IL24	0.041827	16069	LY96	0.036127
14708	TWIST1	0.055674	12915	THSD7A	0.041713	16292	MMP1	0.036021
14383	COL22A1	0.055514	15821	WNT10B	0.041536	16032	CIDEA	0.036007
14201	NPPB	0.054368	11551	IGFBP7	0.041510	16009	MMP7	0.035804
13746	ANKRD1	0.053818	13357	C7orf57	0.041312	15679	ZSCAN4	0.035630
12645	ACTA1	0.052962	12071	NNMT	0.041008	14726	CLRN1	0.035310
15300	MYL7	0.051999	14458	EBI3	0.040496	10924	AADACL3	0.035201
12327	ACTG2	0.051125	14381	MFAP5	0.040189	14442	TRIM43	0.034896
14607	WNT7A	0.051013	16167	VIT	0.039737	14442	TRIM43	0.034896
13542	COL8A1	0.050910	16173	TAF11L1	0.039388	16232	CNTN6	0.034858
16308	PSG4	0.049665	15786	MYPN	0.039062	16249	TAF5	0.034687
14047	ZNF736	0.048704	14538	PTHLH	0.038831	8428	CYP26A1	0.034641
16243	ZNF492	0.048425	12753	MAGEB17	0.038828	4945	ANXA1	0.034512
16253	NOX3	0.048064	8700	COL12A1	0.038697	2066	SPP1	0.034379
15984	ODAPH	0.047697	12429	IL32	0.038596	2066	SPP1	0.034379
14453	FOXD1	0.047402	15825	GJB2	0.038141	16073	ANXA8L1	0.034340
14796	CDKN2A	0.047401	15416	CXCR5	0.038090	10736	BHLHE40	0.034320
15605	TMEM40	0.046864	16235	WNT10A	0.038003	16517	MBD3L3	0.034226
16042	FOXC2	0.046308	15430	KRT80	0.037922	16039	CCN4	0.034166
14520	MYH14	0.044956	13464	WNT9A	0.037907	15038	OLR1	0.034085
15595	MAB21L4	0.044662	14314	GBP2	0.037842	11842	EDN1	0.034014
15274	UCN2	0.044373	14807	KCNMB1	0.037770	11842	EDN1	0.034014
14200	CDKN2B	0.043566	16419	TNFRSF6B	0.037769	9134	PRSS23	0.033979
15677	H3Y1	0.043396	10558	MYOF	0.037438	16478	KDM4F	0.033978
14202	KRT17	0.043159	15187	RBM20	0.037390	16470	PRAMEF8	0.033933
			15147	CALHM4	0.037235	16469	TRIM51	0.033861
			14709	RTL1	0.037213	4803	AHNAK	0.033817
			7791	ACTC1	0.037196	10122	CHCHD2	0.033783
			16345	PSG9	0.037146	13465	FOXL1	0.033751
						16482	TAF11L12	0.033719
						15608	ULBP2	0.033641
						16497	PRAMEF12	0.033440
						15406	TRIM49D1	0.033438

表 2 PC1 寄与遺伝子上位 100 個

### 3. GO 解析による PC1 軸の生物学的意味の同定

PC1 軸が反映する生物学的機能を特定するため、寄与遺伝子群を用いた GO エンリッチメント解析を行った。

その結果、フィルタリング前(図 2)と比較して、フィルタリング後(図 4)では統計学的有意性(P 値)が顕著に向上した。特に、"Mesenchyme morphogenesis"(間葉系形態形成)や "Mesenchyme migration"(間葉系細胞の遊走)といった、間葉系形質への転換を示すタームが高い有意水準で濃縮された。

また、"Regulation of DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator" (p53 を介した DNA 損傷応答)などのストレス応答に関連する項目も検出された。

これらの結果から、PC1 軸が示す「ばらつき」は、iPS 細胞から間葉系細胞への意図しない形質転換 (Mesenchymal Drift)<sup>9</sup>、およびそれに伴うゲノムストレスであると考えられる。

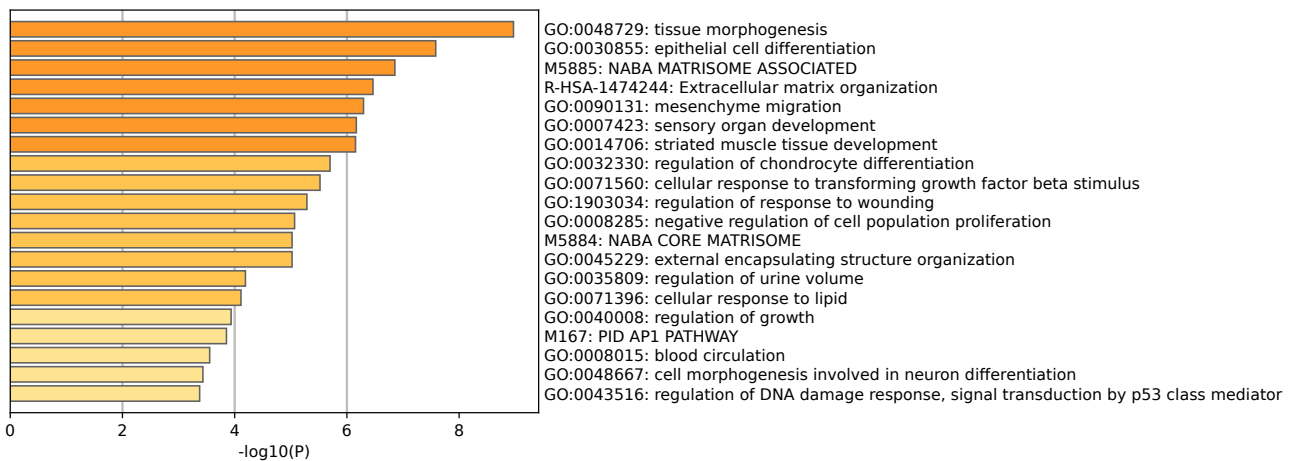


図 4 性染色体、偽遺伝子、機能未詳遺伝子を除いた GO 解析の結果

#### 4. 第 19 染色体 ZNF 遺伝子クラスターにおけるエピジェネティック制御の破綻

PCA の結果、PC1 軸 (Drift 方向) に対して最も強い寄与を示した因子は、ジンクフィンガータンパク質をコードする ZNF208 であった (表 2)。

この領域の遺伝子発現の挙動を個別に詳細に観察したところ、興味深い「局在性」が判明した (表 3)。領域上流の ZNF429 は両株で発現に変化がなく、その直後の ZNF100 や ZNF43 は、株の品質 (Drift) に関わらず恒常的に高発現していた。その一方で、本研究で着目した ZNF208 および周辺の ZNF100、ZNF43 や ZNF257 は、高品質な 1T47 株においては発現がほぼ完全に消失 (カウント値が 0 または 1 桁) しており、通常は厳密なサイレンシングを受けていることが確認さ

れた。これに対し、Drift 株である 6C6 株では、恒常発現遺伝子のレベルは維持されたまま、ZNF208 や ZNF257 などの抑制が解除されていた。この結果は、Drift 現象が領域全体の無秩序な活性化ではなく、本来抑制されているべき特定の遺伝子座の抑制機構の破綻であることを示している。そこで、この局所的な発現異常の分子メカニズムに迫るため、本研究では代表的な「高品質株(1T47)」と「Drift 株(6C6)」の 2 株に絞り込み、すでに当研究室で取得済みの全ゲノムバイサルファイトシーケンス(WGBS)データの比較再解析を行った。

その結果、ZNF429 と ZNF100 の遺伝子間に位置する特定の領域において、6C6 株特異的な局所的高メチル化領域(Hyper-DMR)が検出された(図 5 中段;緑色ボックス)。さらに、この DMR の位置を ENCODE データベース(cCRE)と照合した結果<sup>5</sup>、この領域はインスレータータンパク質である CTCF の結合配列(CTCF binding site;水色矢印)と合致していた(「用語の補足説明」参照)。

以上の結果は、6C6 株において、特定の CTCF 結合サイトが異常メチル化によって機能を失い、それが周辺遺伝子群の連鎖的な活性化を引き起こした可能性を強く示唆している<sup>9</sup>。

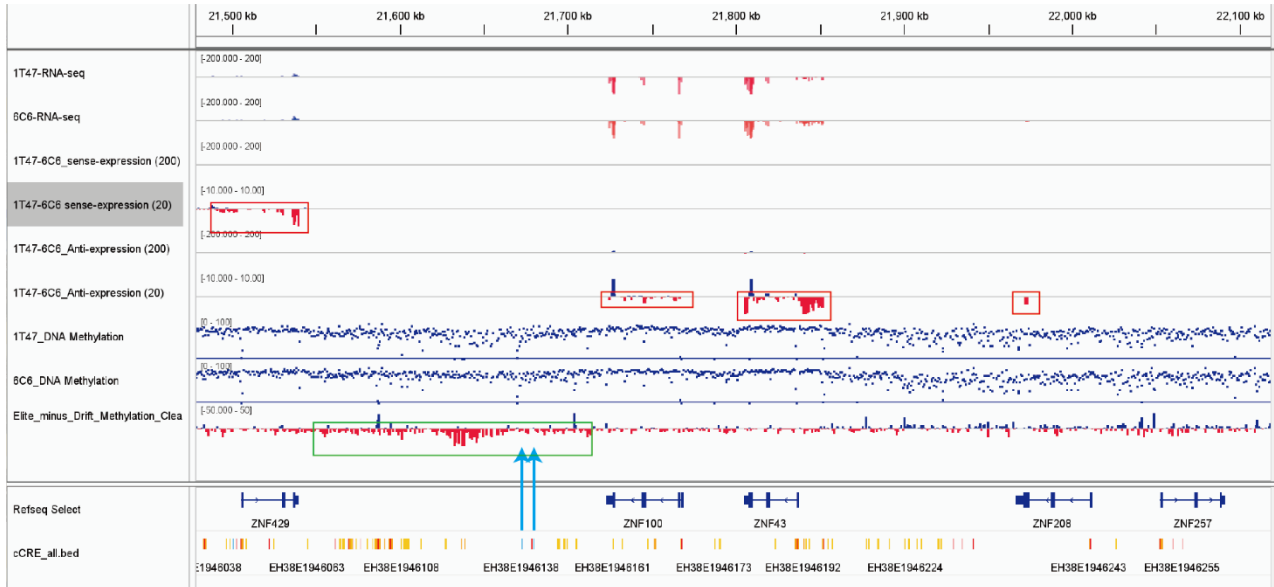


図 5 統合ゲノムビューワー(IGV)を用いた高品質株(1T47)と Drift 株(6C6)における転写および DNA メチル化状態の比較解析(第 19 染色体 ZNF208 領域)

上段(RNA-seq 解析): トラック 1-2 は、各細胞株におけるストランド特異的 RNA 発現量を示す(青: Sense 鎖、赤: Antisense 鎖)。トラック 3-6 は、2 株間の発現差分([1T47] - [6C6])を可視化したものである。6C6 株において特異的な高発現(脱抑制)が認められ、差分トラックに明確な波形が検出された領域を赤色のボックスで示した。IGV 上では、ZNF208 をはじめ、ZNF429、ZNF100、ZNF43 の発現上昇が確認された(なお、ZNF257 は発現量が低く、本表示条件では明確な波形として描出されていない)。

中段(WGBS 解析): トラック 7-8 は、全ゲノムバイサルファイトシーケンスによる CpG サイトごとの DNA メチル化率(0.0~1.0)をドットプロットで示す。トラック 9 は、2 株間のメチル化率の差分(Range  $\pm 0.5$ )を示す。中央付近に検出された、6C6 株特異的な局所的な高メチル化領域(Hyper-DMR)を緑色のボックスで強調した。

下段(アノテーション): トラック 11 は、ENCODE データベース(v3)によるシス調節領域(cCRE)を示し、青色のラインは CTCF 結合配列(CTCF-bound insulator)を表す。水色の矢印で示した通り、この CTCF 結合サイトの位置は、中段の Hyper-DMR(緑色のボックス)と正確に一致している。これは、インスレーター領域の異常メチル化による CTCF 結合不全が、近傍遺伝子群のドミノ倒し的な活性化を引き起こしたことを強く示唆している。

遺伝子名	1T47株 (高品質)	6C6株 (Drift)	発現変動 (Fold Change)	判定
ZNF429	85	92	1.1倍 (不変)	インスレーター上流 (Control)
<境界>	(CTCF 結合)	(メチル 化崩壊)		← Hyper-DMRの位置
ZNF100	12	145	12.1倍 (↑)	脱抑制 (Derepression)
ZNF43	25	382	15.3倍 (↑)	脱抑制 (Derepression)
ZNF208	0	215	検出限界以下→高発現	完全なサイレンシン グの破綻
ZNF257	2	88	44.0倍 (↑)	完全なサイレンシン グの破綻

表3 第19染色体 ZNF クラスター領域(ZNF429-ZNF257)における遺伝子発現プロファイル

表は、インスレーター上流(ZNF429)からクラスター内部(ZNF257)に至る5つの遺伝子について、RNA-seqのリードカウントを比較したものである。ZNF100およびZNF43は、1T47株・6C6株の双方で高く発現しており(Stable)、Driftの影響を受けていない。対照的に、通常は厳密に抑制されているZNF208およびZNF257は、6C6株において特異的かつ劇的な発現上昇(Derepression)を示した。これは、DMR(境界)におけるインスレーター機能の崩壊が、領域全ての遺伝子ではなく、本来サイレンシングされるべき遺伝子群に対して選択的に影響を与えていることを示唆する。

## 考察

### 1. iPS 細胞の不均一性の分子の実体: ZNF208 クラスターの異常活性化

本研究では、iPS 細胞株間に存在する品質のばらつきを、全遺伝子発現データの主成分分析 (PCA) によって客観的に評価した。その結果、品質低下 (Drift) を起こした細胞株 (6C6 株等) を最も強く特徴づける因子として、第 19 染色体上の ZNF208 を含むジンクフィンガー遺伝子クラスターの異常な高発現を特定した。

興味深いことに、Koyanagi-Aoi ら (2013) も、大規模なヒト多能性幹細胞の解析において、ZNF208 の高発現が神経分化能の低い「分化抵抗性株 (Defective line)」を見分けるための指標となることを報告している<sup>11</sup>。しかし、なぜ特定の株でのみ、これらの遺伝子群が一斉に活性化してしまうのか、その分子の実体は長らく未解明であった。

本研究で提示した WGBS 解析は、この謎に対する明確な解答を与えた。すなわち、ZNF208 近傍の特定の領域において、DNA メチル化レベルが異常に上昇しており、その位置がインスレータータンパク質である CTCF の結合配列と正確に一致していたのである。これは、既知の現象 (ZNF208 の発現上昇) の裏に、未知のエピジェネティックな破綻 (インスレーター崩壊) が隠されていたことを強く示唆している。

### 2. インスレーター機能の崩壊と「癌化」メカニズムとの類似性

この「CTCF 結合部位の高メチル化」は、細胞にとって致命的な意味を持つ。

ゲノム DNA は核内で TAD (Topologically Associating Domain) と呼ばれる構造単位に折り畳まれており、TAD の境界には「インスレーター (絶縁壁)」が存在して、エンハンサー等の活性化シグナルが隣接領域へ波及するのを防いでいる。この境界維持には、CTCF の結合と、結合サイトの低メチル化状態が必須である。

今回、6C6 株で観察された事象は、「クロマチンの境界壁(インスレーター)の崩壊」であると解釈できる<sup>10</sup>。メチル化によって CTCF が結合できずに壁が失われた結果、抑制されるべき遺伝子群 (ZNF クラスター) に対し、外部からの活性化シグナルが雪崩れ込み、連鎖的な異常発現を引き起こしたと考えられる。

### 3. Mesenchymal Drift の本質:細胞老化と発生運命の逸脱

本解析で同定された Drift 株(6C6 等)では、細胞外マトリックスや細胞遊走に関わる遺伝子群の発現上昇に伴う「間葉系様状態」への形質転換が確認された。この現象は、二つの重要な生物学的意味を含んでいる。

第一に、これは「細胞老化(cell senescence)」の現れである。Lu ら(2025)は、組織が加齢に伴ってアイデンティティを喪失し、間葉系へと変質する現象を「Mesenchymal Drift」と定義した<sup>9</sup>。本来、iPS 細胞は若々しい「上皮性(Epithelial)」を維持すべきであるが、Drift 株ではこの維持機構が破綻している。すなわち、これらの細胞は培養皿の中で、上皮性を保てずに老化へと変化している状態である。

第二に、この Drift の行き着く先は、単なる老化細胞ではなく「胚体外組織(Extraembryonic tissues)」への逸脱である。発生学的に、iPS 細胞のモデルである「エピブラスト(胚体)」は、将来の体を作る細胞集団である。しかし、今回 Drift 株で高発現していた遺伝子群には、卵黄嚢などの「胚体外組織」に特徴的なマーカーが含まれていた(表1、表2)。つまり、インスレーター崩壊等のエピゲノム異常を起こした細胞は、老化して上皮性を失うだけでなく、体(胚体)を作るという本来の役割から「胚体外組織」への分化に逸脱していることになる。

結論として、品質の悪い iPS 細胞とは、「老化(Mesenchymal Drift)」によって若さを失い、かつ「胚体外への逸脱」によって発生過程に問題が生じている、二重の意味で不適格な細胞であると定義できる。

#### 4. 老化・癌化研究の次世代モデルとしての iPS 細胞

以上の考察から、本研究は iPS 細胞の品質管理に対し、新たな視座を提供するに至った。

これまで「実験の失敗作」として廃棄されがちであった品質の悪い iPS 細胞は、実は「インスレーター崩壊(癌化)」と「Mesenchymal Drift(老化)」との双方を試験管内で再現している貴重なサンプルでもあったのである。

私は結論として、iPS 細胞の品質評価を厳格化することの重要性を訴えけるとともに、逆にこの Drift 現象を利用して、癌化および個体老化のメカニズムの解明に役立ち得る、高精度なヒト疾患モデルとして、iPS 細胞を再活用することを提唱したい。

#### 【用語の補足説明】

本レポートでは、著者自身の備忘録・勉強のため、馴染みの無かった用語について補足の説明を付記した。なお、このセクションの作成には、Gemini のサポートを一部受けた。

##### ◆ バイオインフォマティクス

生命科学(Biology)と情報科学(Informatics)が融合した学際的な研究分野のこと。近年の次世代シーケンサー(NGS)技術の進歩により、生命科学が生み出すデータ量は爆発的に増大しており、ヒトゲノムの30億塩基対や数万種類の遺伝子発現量といった「ビッグデータ」を、人間の手作業だけで解析することは不可能となっている。バイオインフォマティクスは、統計学やアルゴリズム、プログラミング技術を駆使して、この膨大なデータの海から生物学的に意味のある知見(シグナル)を抽出する技術である。

本研究において、この技術は「データのための顕微鏡」としての役割を果たした。具体的には、2万以上の遺伝子発現データの中から、主成分分析(PCA)という統計手法を用いて細胞間の微細

な差異(Drift)を可視化し、さらに数千箇所メチル化変動領域の中から、CTCF 結合サイトの崩壊という決定的な分子メカニズムを特定するために用いられた。実験室でのウェットな実験(Wet Lab)と、計算機上でのドライな解析(Dry Lab)の両輪があって初めて、現代の医科学研究は成立する。

#### ◆ 間葉系細胞(Mesenchymal Cells)

発生初期の結合組織(Mesenchyme)を構成する細胞群のこと。iPS 細胞などのエピブラスト同等細胞は「上皮細胞(Epithelial Cells)」の組織型を呈する。これらが細胞同士が接着してシート状の構造を作り、その場に留まる性質を持つのにに対し、間葉系細胞は、接着を失って個別に遊離し、組織内を自由に動き回る(遊走する)という対照的な特徴を持つ。本研究で着目した「Mesenchymal Drift」とは、本来「動かない(上皮性)」はずの iPS 細胞が、老化やストレスによって、この「動き回る(間葉系)」性質を帯びてしまう現象を指す。これは、癌細胞が周囲に浸潤・転移する際の変化(EMT)とも共通する、細胞の危険な変質サインである。

#### ◆ ジンクフィンガー遺伝子

タンパク質の中に亜鉛(Zinc)イオンを取り込み、「指(Finger)」のような突出した構造を持つタンパク質群の総称。この「指」の部分が DNA の特定の塩基配列を鍵穴のように認識して結合することで、遺伝子のスイッチをオン・オフする「転写因子」として機能する。ヒトゲノムにおいて最大の遺伝子ファミリーであり、特に本研究で着目した第 19 染色体には、進化の過程で爆発的にコピー数が増えた ZNF 遺伝子の大規模なクラスター(集団)が存在する。

本研究において、この ZNF 遺伝子群(特に ZNF208 等)は、iPS 細胞の品質を測る「炭鉱のカナリア」としての役割を果たしている。これらの遺伝子の多く(KRAB-ZNF ファミリー)は、正常な多能性幹細胞ではヒストン修飾などによって強力に発現抑制(サイレンシング)されているべきものである。したがって、これらが異常に高発現しているという事実は、細胞の抑制システム(エピジェネティ

ックな防御壁)が崩壊していることの直接的な証明となる。なお、本研究の鍵となるインスレータータンパク質「CTCF」も、実はこのジンクフィンガータンパク質の一種であり、11本の「指」を使ってDNA上の境界壁を認識・維持している。

#### ◆ インスレーター/CTCF

インスレーターとは、ゲノムDNA上に存在する「仕切り」のような機能配列のことである。長いDNA鎖は、核内で無秩序に絡み合っているのではなく、「TAD」と呼ばれる機能的な部屋(ドメイン)ごとに折り畳まれて収納されている。インスレーターはこの部屋の境界に位置し、ある部屋の活性化シグナル(エンハンサー等)が、隣の部屋の遺伝子へ勝手に波及しないように遮断する役割を持つ。

CTCF(CCCTC-binding factor)は、このインスレーター配列に結合して、実際に壁を構築するタンパク質である。CTCFの最大の特徴は、結合配列がメチル化されると結合できなくなるという性質(メチル化感受性)を持つ点にある。

本研究の6C6株で観察された現象は、この性質によって見事に説明される。本来、ZNF208遺伝子群はCTCFの壁によって隔離され、抑制されている。しかし、何らかの原因(Drift)で結合サイトがメチル化された結果、CTCFが結合できなくなり、境界の「壁」が消失した。その結果、外部からの活性化シグナルがZNF領域に流入し(インスレーター崩壊)、異常な高発現が引き起こされたと考えられる。

## 参考文献

1. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
2. Kilens, S. *et al.* Parallel derivation of isogenic human primed and naive induced pluripotent stem cells. *Nat. Commun.* **9**, 360 (2018).
3. Kajiwara, M. *et al.* (2012). Variability of phenotypically similar induced pluripotent stem cells revealed by capacity for differentiation to liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(31), 12538-12543 (2012).
4. Tahiliani, M. *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**, 930–935 (2009).
5. Zhou, Y. *et al.* Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat. Commun.* **10**, 1523 (2019).
6. ENCODE Project Consortium *et al.* Expanded encyclopaedias of DNA elements in the human and mouse genomes. *Nature* **583**, 699–710 (2020).
7. Robinson, J. T. *et al.* Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
8. Lu, W. & Kang, Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis. *Dev. Cell* **49**, 361–374 (2019).
9. Lu, J. Y. *et al.* Prevalent mesenchymal drift in aging and disease is reversed by partial reprogramming. *Cell* S0092867425008530 (2025) doi:10.1016/j.cell.2025.07.031.

10. Flavahan, W. A. *et al.* Insulator dysfunction and oncogene activation in IDH mutant gliomas.

*Nature* **529**, 110–114 (2016).

11. Koyanagi-Aoi, M. *et al.* Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of

human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 20569–20574 (2013).