

## 論文の内容の要旨

論文題目 Dynamical systems theory of cellular differentiation and reprogramming;  
Interplay between fast gene-expression dynamics and slow epigenetic feedback regulation  
(細胞分化とリプログラミングの力学系理論;  
速い遺伝子発現ダイナミクスとエピジェネティック制御との相互作用)

氏名 松下 優貴

多細胞生物のほとんどは、細胞分化によって性質の異なる様々な細胞タイプを実現させる。細胞分化は、生命の設計図とも呼べる DNA が同一であるにも関わらず多種の安定な細胞タイプを実現させている点で興味深い。また、細胞分化は totipotent な状態から様々な pluripotent な状態へと分化し、pluripotent な状態から様々な multipotent な状態へ、そして最終的には分化能を完全に失った状態へと分化する、というような階層性をもつ。そして、multipotent な状態から pluripotent な状態へ分化するというような階層性を逆に進むということは基本的に起こらない。すなわち、細胞分化はある種の非可逆性をもっているといえる。これらの性質だけでも細胞分化は非常に興味深い現象であるといえるが、このような細胞分化プロセスが非常に安定に進むというプロセス自体の頑健性、そして多細胞生物のほとんどが細胞分化を行うという普遍性という点が細胞分化という現象をより興味深くさせている。

細胞分化について、“基本的には”非可逆である、と述べたのは、特別な操作によって細胞のリプログラミングが起こることが最近ではよく知られているためである。その代表例は山中らによる iPS 細胞への誘導実験だろう。山中らは分化能をもたないとされる体細胞に対して *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の 4 つの遺伝子の強制発現によって様々な細胞へと分化可能な iPS 細胞を作り出した。細胞はその内部に数千もの遺伝子をもつといわれている。それにも関わらず、4 つという非常に少数の遺伝子によってこれまで非可逆だと思われていた細胞分化を巻き戻したことは非常に興味深い。そして、最近の研究では様々な多細胞生物を

用いたリプログラミングの成功例が報告されている。そして、一つの動物種に関する実験でも様々な体細胞、様々な強制発現ペアによる成功例が報告されている。これらは細胞のリプログラミングもまた普遍的な現象であることを示唆している。

さて、ここで細胞分化・リプログラミングがどのように理解されているか、について考えてみよう。まず、細胞分化については Waddington による epigenetic landscape を用いた理解が主流である (図 1)。これは、細胞分化を山を下るボールに例えたものである。山の頂上では谷は一つしか存在せず、ボールはそこにトラップされている。しかし山を下るにしたがって谷が枝分かれしていくことで、ボールが様々な谷へとトラップされていく。このようにして山のふもとの谷でトラップされたボールはもはや山の頂上へと戻ることはない。そして、山のふもとの谷同士の間を行き来することもできない。このように、Waddington は細胞分化のもつ性質を細胞状態がしらがうランドスケープとその変化によって、提案から 60 経った現代でも強く支持されるほど単純明快に、説明してみせた。そして、細胞のリプログラミングについてもしばしば epigenetic landscape を用いて理解される。ただし、これについては明確な答えは未だ存在せず、遺伝子の強制発現によってボールがどのような軌道で山の頂上に戻るのか、様々な強制発現ペアの違いは何をもたらすのか、などについては不明確である (図 1)。そもそも、細胞分化の理解にしても、Waddington landscape はあくまでメタファーであるため、60 年経った今行うべきことは、このような概念をより深く理解し、更新することだろう。

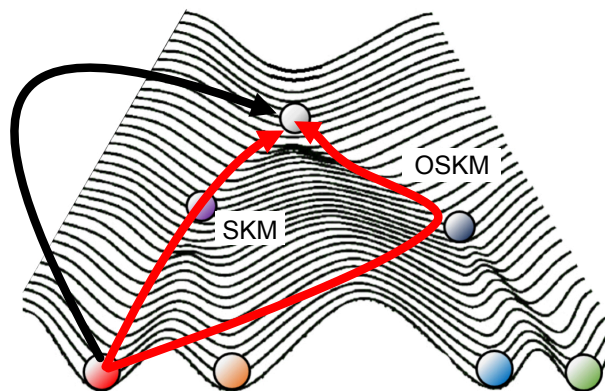


図 1: Waddington による epigenetic landscape の模式図。それぞれの矢印はリプログラミングによって実現していると考えられている軌道の候補を表している。

そのための重要な手がかりとして最有力なのは、エピジェネティクスと呼ばれる一連の分子制御機構である。DNA プロモーターに修飾することで遺伝子がプロモートされづらくする制御(DNA のメチル化)や DNA の高次構造であるクロマチンの状態変化に関係する制御(ヒストン修飾)など様々な分子制御がエピジェネティクスに分類されるが、どれもが DNA の塩基配列はそのままに、遺伝子の使い方自体を変化させるような制御であるといえる。そして、このようなエピジェネティックな修飾状態が細胞分化・リプログラミングに強く関わ

っていることがよく知られており、これらを理解することが細胞分化・リプログラミングの理解に重要だと考えられている。しかし、エピジェネティクスの立場から細胞分化・リプログラミングを考えようとしたときにネックとなるのが、その分野としての広さ・複雑さである。また、エピジェネティクスは今なお新しい制御が発見されているような発展途上の分野であり、統一的な理解とは程遠いのが現状である。

そこで、我々は現象論的な立場から細胞分化とエピジェネティクスとの関係性の理解にアプローチする。遺伝子制御ダイナミクスとエピジェネティック制御の相互作用によっていかにして細胞分化・リプログラミングのもつ性質が実現されるのかを調べた。そのために、遺伝子同士の相互作用について理論的に調べる際によく用いられる遺伝子制御ネットワークにエピジェネティック制御の効果を加えた細胞モデルを導入した。細胞モデルは  $N$  個の遺伝子からなり、その内部状態はそれぞれの遺伝子の発現状態とその遺伝子のエピジェネティックな状態によって表現される。それぞれの遺伝子発現は遺伝子同士の相互作用にしたがって変化していくが、その一方でエピジェネティック制御によって遺伝子の発現のための閾値が変化していく。そして、エピジェネティック変数もまた遺伝子発現によって状態を変化させる。ここでは、実験によって知られている中で最も単純な形であるポジティブフィードバック関係を採用した。つまり、遺伝子は遺伝子同士でお互いに制御し合っている一方で、遺伝子とエピジェネティック変数の相互作用によって発現している（していない）遺伝子はより発現しやすく（しづらく）なっていく。

我々が細胞モデルを用いて最初に行った研究は、Waddington landscape の力学系的な表現である。Waddington landscape という概念が、(1) 階層的な分化プロセス (2) プロセス自体の頑健性（ロバストネス） (3) 分化細胞の比率が安定に制御される性質 という 3 点に集約されていると考え、それらが導入した細胞モデルでどのように実現するかを調べた。具体的には、コンピュータ上で様々なランダム遺伝子制御ネットワークを生成し、分化細胞が実現していくダイナミクスをシミュレーションした。詳細については省くが、シミュレーションから分かったことは、先に述べた 3 つの性質の実現のためにはエピジェネティック制御の変化の時間スケールが遺伝子発現の変化の時間スケールに比べて遅い必要があること、そして、遺伝子発現が振動している必要があることが分かった。Pluripotent な状態として遺伝子発現のグローバルな振動状態が存在し、それがエピジェネティック制御によって階層的に固定化されていくことによって細胞分化の階層性が実現する。その他の 2 つの性質についても、遺伝子発現の振動と遅いエピジェネティック制御から成立することを明らかにした。

次に我々が行ったのは、上で述べた遺伝子発現の振動とエピジェネティックな制御との相互作用から細胞のリプログラミングの力学系理論を構築することである。細胞のリプログラミングが普遍性をもっていると考え、pluripotent な状態自体が、細胞分化でたどるような不安定な次元に加えて、リプログラミングなどによって戻ってくるための別の吸引的な次元を持っている必要がある。これは pluripotent な状態が力学系理論において、不安

定な進行方向と吸引力的な方向をもつ鞍点として表されることを意味する。しかし、細胞のリプログラミングで考えるべき、発生のだ筋へと戻るといふ描像は不安定な進行方向に強く引き込まれるようなダイナミクスを意味しており、それは力学系において安定多様体直上のような極めて限られた領域でしか実現し得ない。細胞のリプログラミングで実際に行われるような少数遺伝子の強制発現によってこのような限られた領域へ細胞の状態をもっていくことは極めて困難だろう。我々はこのような実現が難しいと考えられるようなダイナミクスが速い時間スケールとしての遺伝子発現の振動と遅い時間スケールとしてのエピジェネティック制御との相互作用によって実現するのではないかという仮説をたて、その検証を行った。その結果として、速い遺伝子発現の振動と遅いエピジェネティック制御の相互作用として、エピジェネティック変数空間内の鞍点から伸びる不安定多様体で非線形に遅い緩和が現れることがわかった。つまり、Pluripotent な状態は鞍点として表現されるだけでなく、非線形効果によって周りの状態を不安定多様体へと強く吸引される。このような大域的な吸引の存在だけでなく、不安定多様体自体の分岐による分化機構、そして、これらのメカニズムが遺伝子発現の振動によってもたらされることについても力学系理論に基づいて明らかにした。また、このような大域的な吸引によって実際に細胞のもつ遺伝子の数よりも少ない遺伝子の強制発現によって再び分化能を取り戻すこと、このようなメカニズムが実験データから構成される細胞モデルによって実際に機能することについても調べた。

我々の一連の結果から Waddington 地形は次のように更新される。まず、Waddington が表現した谷にはそれに対応した振動状態がおさまっている。そして、振動状態が階層的に固定化されていくことが Waddington の表現した谷の枝分かれに対応している。そして、Waddington 地形を制御しているワイヤとしてエピジェネティックな制御変数が存在している。それは、山の頂上から山のふもとへと伸びる細胞分化を表す不安定な流れとリプログラミングによって使われる安定な流れを構成される。そして、リプログラミングの軌道は細胞分化とは異なる道筋を通ることで実現される。