

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

c-Mycによるアポトーシス誘導とそれに対する抑制因子としてのNanogの役割

研究代表者 奥田 晶彦 (ゲノム医学研究センター)

緒言

c-Myc転写因子は、cyclin Dなどの細胞増殖に関わる遺伝子からの転写を促進していることを介して細胞増殖を促進する。また、c-Myc遺伝子は、がんにおける機能獲得型の変異を示す遺伝子の中で最も高頻度に変異が存在する遺伝子である。しかしながら、c-Mycをマウス線維芽細胞な正常細胞に過剰発現させると細胞は、顕著なアポトーシスのフェノタイプを示す。但し、このc-Mycによるアポトーシス誘導の分子メカニズムに関しては全くわかっていない。但し、c-Mycの転写因子としての機能にはそのc-Mycに対するパートナー因子であるMaxとの相互作用が必須なのに対して、c-Mycによるアポトーシス誘導活性はMaxタンパク質とは無関係に起こることが証明されている。それは、遺伝子の変異により、機能的なMaxタンパク質を発現していない褐色細胞腫にc-Mycタンパク質を過剰発現させても、アポトーシスが起ることが示されているからである¹⁾。なお、興味深いことには、c-Mycは上記に記載したように、正常細胞に過剰発現させると顕著な細胞死のフェノタイプを呈するが、がん細胞やES細胞では過剰発現させてもほとんどアポトーシスのフェノタイプは見られない。私は、以前、Maxホモ欠失ES細胞が激しいアポトーシスを示し、また、典型的なES細胞マーカーの一つであるNanogの過剰発現により、その細胞死のフェノタイプが消失していることを報告している²⁾。但し、その論文では、Nanogによるc-Myc依存的なアポトーシスに対する抑制活性の分子メカニズムに関しては解明できていない。但し、その後、Nanogタンパク質がc-Mycと物理的に結合するという発見をすることができた。このような状況から、私はMaxタンパク質はc-Mycに対する転写補助因子として機能するのみならず、c-Mycタンパク質が本質的に持つアポトーシス誘導活性を抑える機能を有しており、それ故、Maxホモ欠失ES細胞では、c-Mycタンパク質がそのMaxからの制御から解放された為に激しいアポトーシス活性を呈しており、一方、Nanogは、Maxのようにc-Mycに対する転写補助因子としての機能は持たないが、c-Mycと結合することで、Maxと同様に、c-Mycのアポトーシス促進活性は抑制することができるので、

Maxホモ欠失ES細胞のviabilityを保っているのではないかという仮説を持った。本学内グラント研究は、その仮説について分子レベルでの裏付けができるか否かを検討することを主な目的として研究をおこなった。

材料

本研究で用いたES細胞、及びマウス線維芽細胞(MEF)は、私が所属している研究室で以前樹立したものを用いた²⁾。また、レトロウイルスの作製は、Moritaらの方法を用いて行った³⁾。

結果

私たちは以前、Max遺伝子ホモ欠失ES細胞が激しいアポトーシスを呈することを発表しているが、その論文では、アポトーシスの原因については明らかにすることはできていない。その後、このアポトーシスは、当初は、Maxタンパク質非存在下ではなんら生化学的・生物学的機能を有さないと考えていた遊離c-Myc、N-Mycタンパク質は転写に対しては機能を持たないものの、アポトーシス活性に関してはむしろ、Maxタンパク質と結合したものよりも遊離の状態が存在する方が、むしろ、高い活性を持っており、それ故、Maxホモ欠失ES細胞は激しいアポトーシスのフェノタイプを呈するのではないかという仮説を持った。その仮説を検討する為、まずDoxycycline (Dox) 誘導型Max knockout (KO) ES細胞(このES細胞は、本来のMax遺伝子はノックアウトされており、かつ、Rosa26遺伝子座にはtetracycline offシステムと共に、Max cDNAが導入されており、それ故、この細胞は、Dox非存在下ではRosa26遺伝子座からの発現により十分な量のMaxの発現を確保できるが、培地にDoxを加えることで、ほぼ完全にMax遺伝子の発現を消失させることができる)にc-, N-, L-の3種類のMyc発現ベクターを別々に導入し、その後、Doxを加えることにより、Maxの発現をシャットオフさせた。その結果、以前の報告通り、空ベクターを導入したコントロールでもゲノムDNAの2本鎖切断のマーカーであるヒストンH2A.Xの顕著なリン酸化の上昇が見られたが、c-MycもしくはN-Myc発現ベクターを導入することで、遊離Mycタンパ

ク質の量を強制的に増加させるとそれに伴って γ H2AXのリン酸化の更なる上昇が確認された。一方、c-MycやN-Mycと比べて、転写促進活性及び形質転換の活性が極めて低いことが知られているL-Mycの過剰発現では、コントロールと比べH2A.Xのリン酸化レベルに変化は見られなかった(図1)。次の実験として、Stephen Daltonらが樹立したc-Myc/N-Myc double conditional ノックアウトマウスES細胞(c-MycとN-Mycの両方の遺伝子についてホモで遺伝子がコンディショナルにノックアウトできるようにそれぞれの遺伝子がloxP配列で挟まれており、Creリコンビナーゼの発現によりc-MycとN-Mycの両方についてホモでノックアウトすることが可能なES細胞)⁴⁾にCreリコンビナーゼとエストロゲンレセプターのホルモン結合領域の融合タンパク質(CreER)発現ベクターを導入し、タモキシフェンの添加によりc-Myc/N-Myc double ノックアウトを行うと同時にMax遺伝子の発現をノックダウンした。その結果、タモキシフェンを加えていないコントロールと比べ、タモキシフェンを加えることにより、c-Myc/N-Myc double KOを誘導した場合にはリン酸化ヒストンH2A.Xのレベルが顕著に低くなることがわかった(図2)。この結果は、図1に示した結果と同様に、c-Myc及びN-Mycの

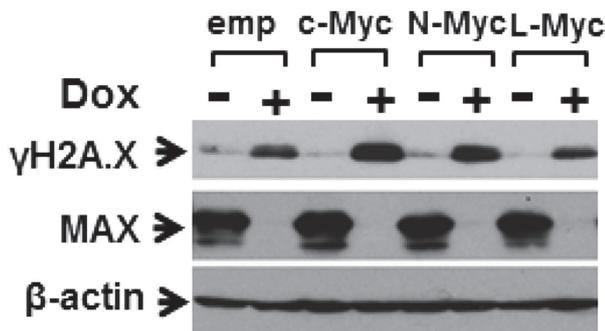


図1. Maxホモ欠失ES細胞が呈するアポトーシスレベルのMyc過剰発現による影響。Emp: empty; Dox: doxycycline.

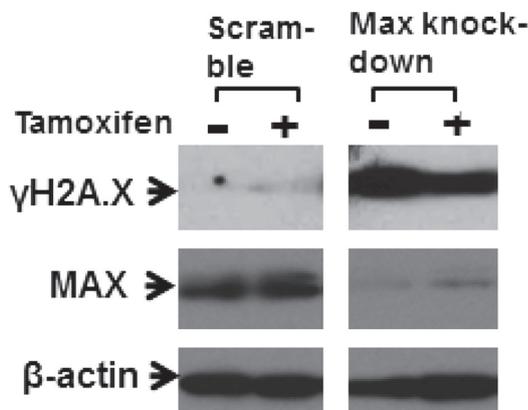


図2. CRE-ERを発現するc-Myc/N-Myc double conditional KO ES細胞でのMyc遺伝子の有無のMaxノックダウンにより誘導されるアポトーシスのレベルに対する影響。

アポトーシスに対する活性は、Maxタンパク質非存在下でより顕著であり、Maxタンパク質は、これらMycタンパク質を中和する能力を有することを示唆する結果である。次にES細胞以外でも同様な法則が成り立つかを検討する為、マウス線維芽細胞(MEF)を用いた実験を行った。また、MEF細胞にはNanogが発現しないので、Nanogの発現のc-Mycが持つアポトーシス誘導活性に対する抑制効果についても検討した。その目的を達成する為、Dox添加により、発現が誘導可能なレトロウイルスベクター(pMXs DsRed T4 TRE)に2Aペプチド⁵⁾をコードする配列でc-MycとNanog(c-Myc/2A-Nanog)もしくはc-MycとNeomycin耐性遺伝子(c-Myc/2A-Neo)を繋いだものをサブクローニングし、常法に従ってレトロウイルスを作製した。なお、その際に、tTA応答配列プロモーターを活性化させる為のrtTAを発現するレトロウイルスも並行して作製し、それらのウイルスをmixし、MEF細胞に感染させた。そして、48時間後に、アポトーシスのレベルをCellEvent Caspase-3/7 Green Detection 試薬を用いて検討した。その結果、Doxを加えていない場合は、アポトーシスを起こしている細胞はほとんど見当たらなかった(図3A)が、Doxを加えた場合は、アポトーシスを示唆するシグナルが顕著に見られた(図3B)。なお、上記2つのパネルは、いずれもNeomycin耐性遺伝子を持つウイルスについてのデータであるが、Neomycin耐性遺伝子の代わりにNanog遺伝子を初発現するウイルスでは、Dox存在下においても、Nanog遺伝子を発現していない場合と比べてアポトーシスを示唆するシグナルが顕著に低いという結果がえられた。

考察

c-Myc転写因子のがん細胞のホメオスタシスの為の重要性は、バーキットリンパ腫の場合を筆頭に多くの種類のがん細胞で証明されている⁶⁾。そのc-Mycのがん原遺伝子としての機能を根底から刺させているのは同タンパク質の細胞増殖促進活性である。但し、c-Mycタンパク質は、単に、Maxと共に転写複合体を形成し、細胞増殖に関わる遺伝子からの転写を促進することで、細胞の増殖速度を早めるのみならず、過剰に発現すると、細胞に対してアポトーシ

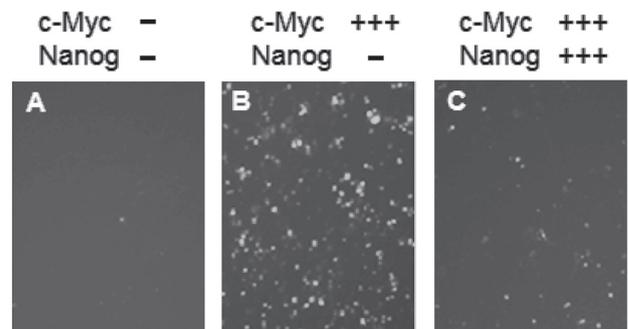


図3. MEF細胞へのc-Mycの過剰発現によるアポトーシス誘導とそのアポトーシスに対するNanogによる抑制効果。

スを惹起する。そのc-Myc依存的なアポトーシスを規定している分子メカニズムに関しては全くわかっていないが、このc-Myc依存的なアポトーシスのフェノタイプは、正常細胞に発現した場合に顕著に現れるものの、がん細胞やES細胞ではその活性はほとんど現れない。換言すれば、c-Mycはがん細胞とES細胞では、アポトーシス活性をほとんど発揮することがなく、専ら、細胞増殖促進因子として機能することで、無限の増殖能等のこれらの細胞が持つ重要な特質を根底から支えていると言える。このことは、がん細胞やES細胞にとって明らかに都合の良いことではあるが、私は、長年、どのようにしてこれらの細胞が、c-Mycのアポトーシス活性を排除し、細胞増殖促進因子としての機能のみを活用できるかを知りたいと考えていた。

そして、それについての解明の糸口は、図らずも、Maxホモ欠失ES細胞の樹立から得られた。もともと、このMaxホモ欠失ES細胞は、ES細胞における全ての機能を奪うことを目的として樹立した。この細胞の樹立を試み始めたのは、2008年頃であるが、その当時は、c-Mycはあらゆる機能発揮においてパートナー因子であるMaxを必要とすると信じられていたからである。しかしながら、私たちが樹立したMaxホモ欠失ES細胞とはほぼ同時期に米国のStephen Daltonらによって樹立されたc-Myc/N-Myc double KO ES細胞では、c-Mycの転写因子の活性を失ったことに伴うフェノタイプに関しては十分な共通点はみられたものの、アポトーシスに関しては真逆な結果が得られたことから、Maxと結合していないc-Mycタンパク質は全くの無機能タンパク質ではなくて、アポトーシス活性に関してはむしろMaxタンパク質と相互作用していない方がむしろ強い活性を示すのではないかという仮説を持つようになった。そして、その仮説の是非を検討することが本研究の主な目的であった。

本研究では、まず、誘導型Maxホモ欠失ES細胞にDoxを添加することでMaxの発現を消失させる際に、c-MycもしくはN-Mycを過剰発現させるとアポトーシスのレベルが更に顕著になることや、逆にc-Myc/N-Myc doubleノックアウトのバックグラウンドでは、Max遺伝子の低下に伴ったアポトーシスのレベルが減弱することを示すことで、Maxとは結合していない遊離c-Myc及びN-Mycにはアポトーシスを引き起こす活性を持つことを証明した。また、マウス線維芽細胞を用いた実験でも、遊離c-Mycタンパク質がアポトーシス誘導活性を発揮できることを証明した。かつ、その遊離c-Mycタンパク質依存的なアポトーシスは、Nanogを同時に発現させることにより、かなり緩和されることもしめした。

本研究により、遊離c-Mycタンパク質がMaxホモ欠失ES細胞が呈するアポトーシスの主な原因であり、また、Nanogがその遊離c-Mycタンパク質によるアポトーシスを直接抑制することがわかった。この発見は、がん細胞とES細胞ではc-Mycが高発現することで、量比において

Maxタンパク質を大きく上回ったとしても、アポトーシスを引き起こさない理由が解明できたのではないかと考えている。そしてこの発見が、ES/iPS細胞を用いた場合の最も大きな問題点となっている、分化誘導シグナルに応答せず、分化誘導後においても未分化な状態で残ってしまっているES/iPS細胞を移植細胞から除去する方法の確立であるとか、いままでになかった全く新しい角度からのがん治療法の確立へとつなげていきたいと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、同部門の平崎正孝助教及び鈴木歩助教からの多大なご協力に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Wert M, Kennedy S, Palfrey HC, Hay N. Myc drives apoptosis in PC12 cells in the absence of Max. *Oncogene* 2001; 20: 3746-50.
- 2) Hishida T, et al. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 37-49.
- 3) Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* 2000; 7: 1063-6.
- 4) Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 343-54.
- 5) Szymczak-Workman AL, Vignali KM, Vignali DA. Design and construction of 2A peptide-linked multicistronic vectors. *Cold Spring Harb Protoc* 2012; 2012: 199-204.
- 6) Sander S, et al. Synergy between PI3K signaling and MYC in Burkitt lymphomagenesis. *Cancer Cell* 2012; 22: 167-79.

研究成果リスト

本研究における研究成果の学会・出版物への発表はまだなされていない。

論文

なし

学会発表

- 1) Okuda A, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A. Max known as a Myc indispensable partner protein functions as a molecular blockade of meiotic entry, 第38回日本分子生物学会/第88回日本生化学会大会, 合同大会ワークショップ口頭発表, 2015年12月1日, 兵庫県神戸市

特許出願

なし