

## 学内グラント 報告書

## 平成26年度 学内グラント終了時報告書

**Nucleostemin による幹細胞の未分化性維持と  
エネルギー代謝制御の解析**

研究代表者 片野 幸 (ゲノム医学研究センター)

## 緒言

一般的に、幹細胞は同系譜の分化した細胞とは異なるエネルギー代謝の特徴を有し、それにより細胞の「未分化性」を担保している<sup>1)</sup>。例えば、ES細胞やiPS細胞は好気的な条件で培養しているにもかかわらず主に解糖を用いてATPを産生し、心筋などの分化細胞はTCA回路を用いている。このエネルギー代謝の違いを利用して、ES細胞から分化誘導した心筋細胞を純化する報告もなされた<sup>2)</sup>。主に解糖を用いるグルコース代謝は、ガン細胞におけるWarburg効果として観察され臨床検査に利用されており、ES細胞とガン細胞にはエネルギー産生という側面での共通点が伺える<sup>3)</sup>。さらに、乳ガン幹細胞や悪性度の高い様々なガンでは、ES細胞と共通性の高い遺伝子発現プロファイルを示すことが報告されている<sup>4)</sup>。これらの報告から、ES細胞の特徴的な遺伝子発現やエネルギー代謝について、ガン細胞と共通する部分があると想定される。

我々は、様々な種類の幹細胞やガン細胞で高い発現を示す核小体タンパク質であるNucleostemin (以下NS)のES細胞における機能を明らかにすることを目的に研究を進めてきた。リボソーム生合成の場である核小体は、細胞のエネルギー状態を感知し、様々な細胞内反応のトリガーとなっていることが報告されている<sup>5)</sup>。本研究では、NSのES細胞、またES細胞よりも分化の進んだ多能性幹細胞であるエピプラスト幹細胞 (Epiblast Stem Cell, EpiSC) において、その未分化性にNSがどのように関与しているのか明らかにした。本研究を元に、今後はES細胞のエネルギー代謝におけるNSの役割を解析していきたい。

## 材料と方法

NSのES細胞での未分化性に対する機能を明らかにするために、本研究室ではテトラサイクリン (Tet) の誘導体であるドキシサイクリン (Dox) を培養液に添加することによりNSをノックアウトできるNS-Tet-off マウスES細胞を樹立した<sup>6)</sup>。また、このNS Tet-off ES細胞を桑実胚にインジェクションし仮親の子宮に戻して胎生 6.5 日まで発生させ、胚性外胚葉を解剖にて取り出し、NS Tet-offエ

ピラスト幹細胞 (EpiSC) を樹立した。

NS Tet-off ES細胞、NS Tet-off EpiSCにDoxを添加することで、NSをノックアウトし、未分化性に関する表現型を様々な種類のマーカー因子のreal-time PCR、ウエスタンブロットティング、細胞免疫染色、またアルカリホスファターゼ染色を行い評価した。

またNS Tet-off ES細胞に関しては、NSノックアウトによる表現型を打ち消す因子を探索し、その因子を強制発現させた株からRNAを回収し、マイクロアレイ解析を行った評価した。

NSは神経幹細胞において、DNA修復因子Rad51と結合してDNA損傷部位にリクルートし、ゲノム修復を促進させるという報告があった<sup>7)</sup>。このNSの機能について、ES細胞でも同様に見られるか否か、ハイドロキシウレアを添加しDNA損傷を起こした際に見られる $\gamma$ -H2A.Xのfociを計数することにより評価した。

## 結果

## ①NSはES細胞の未分化性維持のために必要である

NS Tet-off ES細胞にDoxを加えると、Nanog, Oct3/4, Esrrbなど多く未分化マーカーが減少することが明らかとなった。また、NSをノックアウトしたES細胞は、未分化な状態を保てず死滅することも、アルカリホスファターゼ染色で示された。

## ②NanogもしくはEsrrbを強制発現することによりNSノックアウトES細胞の表現型を回避できる

強制発現することによってNSノックアウトES細胞の表現型を回避できる因子を探索した。候補としては、NSノックアウトにより発現量が減少する様々な未分化マーカー、ES細胞の未分化性を維持するために必要な細胞内シグナル因子を考え、それぞれ強制発現株を作製し、NSをノックアウトしてアルカリホスファターゼ染色を行った。その結果、NanogとEsrrbを強制発現させた細胞株では顕著な表現型の回避が見られ、ほぼ完全に未分化を保ったまま継代維持が可能であった。マイクロアレイ解析を用いて検討したところ、NSノックアウトにより発現変動する遺伝子のほとんどが、NanogもしくはEsrrb強制

発現によって変動しなくなった。

### ③核小体におけるNSがES細胞の未分化性維持に関与する

NSは主に核小体に局在するが、核質にも存在し、核小体と核質の間をシャトリングしていることが報告されている。またDNA修復促進の機能は、核質におけるNSによるとの報告があったが、核小体に局在できなくしたNS変異体を強制発現させてもNSロックアウトによる表現型を回避できなかった。このことから、ES細胞においては核小体に局在するNSが未分化性維持のために必要であると考えられる。また、ES細胞においてもNSにはDNA修復促進機能があることを明らかにした。

### ④EpiSCにおいてもNSは細胞生存と未分化性維持のために必要である

NS Tet-off EpiSCを用いてNSをロックアウトしたところ、EpiSCの主要な未分化マーカーであるOct3/4 タンパク質の顕著な減少と細胞死が見られた。このことから、NSはEpiSCにおいても細胞生存と未分化性維持のために必要であることが明らかとなった。しかし、ES細胞とは異なり、NanogやEsrrbを強制発現させてもその表現型が回避されなかった。

## 考 察

本研究により、NSはマウスES細胞の未分化性維持のために必須のタンパク質であることが明らかとなった。また、未分化マーカーの中でも中心的な役割を果たすNanog, Esrrbの強制発現により、NSロックアウトによる表現型が回避できたことから、NSがこれらの因子を介して未分化性維持に中心的な役割を果たしていることが示唆された。更に、NSロックアウトにより、通常のES細胞の分化では見られない栄養外胚葉マーカーの上昇が明らかとなった。この結果より、NSはES細胞の未分化性維持のみならず、分化過程においても重要な役割を担うのではないかと予想し、現在解析を進めている。

核小体に局在しないNS変異体ではNSロックアウトの表現型を回避できなかったことから、ES細胞においては核小体に局在するNSが未分化性維持に寄与していると考えられる。

EpiSCにおいてもNSは細胞生存と未分化性維持に必須であることが明らかとなった。ES細胞との相違点として、NanogやEsrrbの強制発現によってレスキュー出来ないことが挙げられるが、これはEpiSCにおいては両因子の発現量が少なく、未分化性維持への寄与が低いためと考えられる。

## 参考文献

1) Rafalski VA and Brunet A. Energy metabolism in adult neural stem cell fate. *Prog Neurobiol* 2011 Feb;93(2):182-203.

- 2) Tohyama S, Hattori F, Sano M, Hishiki T, Nagahata Y, Matsuura T, Hashimoto H, Suzuki T, Yamashita H, Satoh Y, Egashira T, Seki T, Muraoka N, Yamakawa H, Ohgino Y, Tanaka T, Yoichi M, Yuasa S, Murata M, Suematsu M, and Fukuda K. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 2013 Jan;12(1):127-37.
- 3) Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 Mar;144(5):646-74.
- 4) Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, and Weinberg RA. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 2008 May;40(5):499-507.
- 5) Nishimura K, Kumazawa T, Kuroda T, Katagiri N, Tsuchiya M, Goto N, Furumai R, Murayama A, Yanagisawa J, and Kimura K. Perturbation of ribosome biogenesis drives cells into senescence through 5S RNP-mediated p53 activation. *Cell Rep* 2015;10(8):1310-23.
- 6) Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, and Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells* 2009 May;27(5):1066-76.
- 7) Meng L, Lin T, Peng G, Hsu JK, Lee S, Lin SY, and Tsai RYL. Nucleostemin deletion reveals an essential mechanism that maintains the genomic stability of stem and progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013 Jul;110(28):11415-20.

## 研究成果リスト

### 原著論文

- 1) Katano M, Ema M, Nakachi Y, Mizuno Y, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Takahashi S, Okazaki Y, and Okuda A. Forced expression of Nanog or Esrrb preserves the ESC status in the absence of nucleostemin expression. *Stem Cells* 2015 Apr;33(4):1089-101.

### 学会発表

- 1) 片野 幸, 水野 洋介, 仲地 豊, 平崎 正孝, 鈴木 歩, 西本正純, 岡崎康司, 奥田晶彦. 「マウスES細胞においてNucleosteminロックアウトによる未分化性の消失はNanogもしくはEsrrbタンパク質強制発現により回避される」, 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, 横浜市, ポスター発表