

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

胚性幹細胞特異的遺伝子の異所性発現による形質転換の分子機構解明

研究代表者 西本 正純 (ゲノム医学研究センター)

諸 言

胚性幹細胞 (ES細胞) は、正常な胎児である胚盤胞の内部細胞塊に由来した細胞株であり、多能性幹細胞として知られている。しかし、他の特徴として腫瘍細胞としての性質を持っている。すなわちES細胞は、正常なゲノム構造を持っており、例えばマウスES細胞の場合、キメラマウスの作製ができるにもかかわらず、一方ES細胞をヌードマウスの皮下に接種すると奇形種と呼ばれる腫瘍を形成する能力をも持っている。このことは、ES細胞で特異的に発現している遺伝子の中には、多能性に寄与しているのみならず、腫瘍性へ寄与しているものがある可能性を示唆している。腫瘍性への寄与が考えられている遺伝子として、多能性維持に必須な転写因子として知られているOct4 (POU5f1 と呼ばれる) やNanogがあげられる。このことは、germ cell tumorなどで、Oct4、Nanogの遺伝子が発現していることが報告されており¹⁾、さらに直接的な証明として、Oct4をSwiss3T3細胞に、またNanogをNIH3T3細胞に異所的に発現させたところ、形質転換が生じたことで示されている^{3,4)}。しかしいずれの遺伝子も転写因子であり、どのような遺伝子の発現を制御することで、腫瘍性へ寄与しているかの分子機構は明らかとされていない。そこで私は、自身によりES細胞より核タンパク質としてクローン化し、Oct4の制御下にあることを示した遺伝子UTF1に着目した^{4,5)}。その理由は、間接的な方法ではあるが、UTF1の発現レベルに応じてES細胞の腫瘍性に変化が生じることを私自身示したことによる⁶⁾。さらに近年UTF1がgerm cell tumorや子宮頸部癌に発現していることが報告され、UTF1が腫瘍マーカーとして考えられるようになってきた。しかしこれらの報告では、実際にUTF1が形質転換に関与しているのか示されておらず、また上記の自分自身の報告も間接的な証明であり、UTF1と腫瘍性との関係についての直接的な証明が必要であると考えた。そこでまずUTF1ノックアウトES細胞を樹立したが、腫瘍性は維持されたままであり、ES細胞では他の遺伝子も寄与していることが示唆された⁷⁾。

そこで今回の報告では、不死化はされているが、本来腫瘍形成能を持たないNIH3T3細胞株を材料とし

て、ここにUTF1を過剰発現させ、即ちUTF1のgain of functionの状態において、UTF1が形質転換をさせる機能を持つかどうかについて検討を行ったところ、実際にUTF1には形質転換を引き起こす機能があることが示された。さらにその分子メカニズム解明についての足掛かりとして、形質転換の一つの重要な指標である、細胞接触増殖阻害の解除の分子メカニズムの解明を試みた。その際miRNA29aがYapによるAktの活性化に重要であることが報告されておりこの点について詳細に検討を加えた⁸⁾。その結果この系においてはYapからmiRNA29aを介したAktの活性化は認められず、腫瘍の種類により細胞接触阻害の解除における分子メカニズムには違いが存在することが明らかとなった。

方法・材料

プラスミド構築

pMCsベクターをベースにし、ここにGateway cassette およびIRES-puro耐性遺伝子を連結したベクターに (pMCs-Gateway-IRES-Puro^r)、cDNAを挿入した pENTR1AからL-R反応により (Invitrogen) それぞれのcDNAを挿入した。

レトロウイルスの作製およびNIH3T3への感染

pMCs-cDNA-IRES-Puro^rをFugene (Roche) により、PlatEにトランスフェクションし、ウイルスを作製する。このウイルスをNIH3T3に感染させ、puromycinにより選択し、stable株をえる。

miRNAの定量

miRNAは、miRNeasy (Qiagen) により調整した。RT反応は、Taq-Man MicroRNA Reverse Transcriptase set (Life Technologies) により行った。qPCRは、TaqMan MicroRNA assay (has-miR-29a) を用いStepOnePlus Real Time PCR System (Life Technologies) により行った。

腫瘍形成実験

BALB/cA-nu/nuマウス皮下に、 1×10^6 細胞を接種し、1か月後に腫瘍形成を観察する。なお動物実験に関しては、埼玉医科大学動物実験規定において決められた倫理指針に従って行った。

結 果

UTF1 過剰発現NIH3T3 細胞の増殖速度は、コントロール NIH3T3 細胞と差は見いだされなかった。一方ポジティブコントロールとしたERas過剰発現NIH3T3 細胞では、すでに報告があるように増殖速度の亢進が認められた⁹⁾。そこでUTF1 過剰発現NIH3T3 が実際に形質転換を起こしているか否かについて直接証明するためにヌードマウスに接種したところ顕著な腫瘍形成を認めた。なおコントロール NIH3T3 細胞では腫瘍形成は認められなかった。そこでUTF1 による形質転換の分子機構を探る手がかりとして、Hippo経路に着目し、なかでも proto-oncogene であるYapに着目した。Yapは細胞分裂を促進する転写因子として知られている。正常な状況では、細胞接触時にHippo経路が活性化されることで112番目のセリンが(ヒトでは129番目)がリン酸化されることで、Yapタンパク質の分解が促進され、結果細胞分裂が停止する。しかし、このセリンがアラニンに変異することで、Yapタンパク質の分解が阻害され、結果細胞接触阻害が生じなくなることで、継続して細胞分裂が生じ形質転換が生じることが知られている。一方、Aktも形質転換を考えるうえで重要な遺伝子であることが知られている。Aktがリン酸化され活性化することで細胞分裂が促進されるが、その一方で例えば、細胞接触により細胞分裂が停止する場合には、Aktの脱リン酸化酵素であるPTENが機能することで、Aktの活性が抑制される。ERasはES細胞特異的に発現するRasであり、ES細胞においてERasによりAktが恒常的に活性化されることが、ES細胞の腫瘍化の一因と考えられている。さらにNIH3T3 細胞にERasを異所性に発現させることで、形質転換が生じることも報告されている⁹⁾。しかし転写因子であるYapがいかなる遺伝子の発現を亢進することで細胞分裂が促進されるのかはこれまで明らかとなっていなかった。近年YapがmiRNA-29aの発現を亢進させ、このmiRNA-29aがPTENの翻訳阻害を起こすことで、結果Aktの活性化が維持され、結果細胞分裂が維持されているという報告がなされた⁸⁾。NIH3T3 でのUTF1 の過剰発現により形質転換が生じることは上に記したが、この分子メカニズムの解明にあたり、まずNIH3T3 細胞においても先に述べたmiRNA-29aを介した、YapとAktとの直接的な関連が見られるのかについて検討を加えることとした。そこで安定型Yap、即ち112番セリンをアラニンに変異させたYapを、NIH3T3 に強制発現させた。細胞がconfluentになった状態において、抗Yap抗体により免疫染色で確認したところ、この変異Yapを導入したNIH3T3 細胞において、コントロールNIH3T3 に比べ、Yapタンパク質の顕著な貯留が認められた。そこでこれら2種のNIH3T3 細胞におけるmiRNA-29aの定量を行ったところ、変異Yapを導入した細胞においてもその存在量の増加は認められなかった。さらにPTENのタンパク量、リン酸化AktのレベルについてWestern blotにより定量を行った

が、やはり変異Yapを導入した細胞においてもその存在量の変化は認められなかった。以上のことより既に報告されているYapとAktとのmiRNA-29aを介した関連は、NIH3T3 細胞においては認められず、NIH3T3 の形質転換を考えるうえで、YapとAktの活性化とは別の事象として考える必要があると考えられた。

考 察

形質転換の指標として、(1)細胞接触阻害の解除(2)低栄養条件下での細胞増殖(3)足場非依存的増殖が挙げられる¹⁰⁾。今回の研究では、NIH3T3 細胞を材料として形質転換が生じるうえで、特に細胞接触阻害の解除について着目し分子メカニズムの解明を試みた。その際Hippo経路の下流に位置するYapと、Rasの下流に位置するAktについて、特に注目した。すでに報告にあるようにある種の細胞において、YapとAktの間にはmiRNA-29aを介した関連がある⁸⁾。しかし今回の報告においてNIH3T3 においては、この関連は存在していないにも関わらず形質転換が生じることから、細胞により形質転換が生じる分子メカニズムには差異があることが示された。今後はこのことを手がかりとしてUTF1 による形質転換の分子メカニズムの解明へと進んでいきたいと考えている。

謝 辞

本研究において多大なる御支援、御協力を頂いた奥田晶彦教授を始めとしたゲノム医学研究センター発生・分化・再生部門の先生方に深謝いたします。

参考文献

- 1) Liu A, Cheng L, Du J, Peng Y, Allan RW, Wei L, et al. Diagnostic utility of novel stem cell markers Sall4, Oct4, Nanog, Sox2, UTF1, and Tcf1 in primary mediastinal germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2010;34:697-706.
- 2) Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, and Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* 2003;4:361-70.
- 3) Piestun D, Kochupurakkal BS, Jacob-Hirsch J, Zeligson S, Koudritsky M, Domany E, et al. Nanog transforms NIH3T3 cells and targets cell-type restricted genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:279-85.
- 4) Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, et al. UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J* 1998;17:2019-32.
- 5) Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, and Muramatsu M. The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol Cell Biol* 1999;19:5453-65.

- 6) Nishimoto M, Miyagi S, Yamagishi T, Sakaguchi T, Niwa H, Muramatsu M, et al. Oct-3/4 maintains the proliferative embryonic stem cell state via specific binding to a variant octamer sequence in the regulatory region of the UTF1 locus. *Mol Cell Biol* 2005;25:5084-94.
- 7) Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, et al. In vivo function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1. *PLoS One* 2013;8:e68119.
- 8) Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russel RC, Yimlamai D, Basnet H, Mahadevan N, et al. Yap mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol* 2012;14:1322-9.
- 9) Takahashi K, Mitsui K, and Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2003;423:541-5.
- 10) Guerrero S, Casanova I, Farre L, Mazo A, Capelia G, and Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res* 2000;60:6750-6.

研究成果

- 1) Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishido T, Nakachi Y, Nishimoto M, et al. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent cells. *Stem Cell Dev* 2014;23:2170-9.
- 2) Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Katano M, Okazaki Y, Nishimoto M, et al. Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2015;33:713-25.