

学内グラント 終了時報告書

平成20-21年度 学内グラント報告書

がん治療法確立へむけたがん幹細胞と胚性幹細胞に共通する 腫瘍性維持の分子機構解明

研究代表者 西本 正純(埼玉医科大学 ゲノム医学研究センター)

研究分担者 山岸 敏之*

緒言

発がんの分子機構としてこれまで、遺伝子の変異あるいは染色体の再編成といった塩基配列の変異に基づく遺伝情報の異常が主たる要因と考えられてきた。しかし現在、塩基配列の変異に基づかぬ、即ちエピジェネティックな理由により、本来発現すべきではない遺伝子の発現上昇が見られたり、逆に発現すべきものの発現が減少したりすることが、発がんの要因になり得るのではないかという可能性が考えられ始めている¹⁾。この点を支持する最も代表的な例として、胎児胚盤胞の内部細胞塊から株化した胚性幹細胞(ES細胞)を挙げることが出来る。この細胞株は塩基配列には全く変異が認められない。即ちこの細胞株より例えばマウスであれば正常な個体を生じる事が出来るにもかかわらず、この細胞株をSCIDマウスの皮下に移植した場合テラトーマが生じることより、この細胞そのものは腫瘍性を持っていることが知られている²⁾。この腫瘍性には、転写因子Oct4(Oct3, Oct3/4とも呼ばれる)の強い関与が示唆されている³⁾。Oct4は本来、多能性を持つ内部細胞塊あるいはそれに由来するES細胞や胚性外胚葉の細胞に発現は局限しており^{4,5)}、これら細胞の多能性維持に必須な遺伝子であることが知られている。即ちOct4を欠失させたこれら細胞では、自己複製能を失い幹細胞として機能しえなくなり、結果分化することが既に示されている^{7,8)}。しかし近年、このOct4が、ある種の体細胞がんで発現していること^{9,10)}、不死化した細胞にOct4を強制発現させることで、トランスフォーメーションが認められたこと¹¹⁾、トランスジェニックマウスを用いた系で異所的にOct4を発現させることで、皮膚の異形成が認められたこと³⁾等より、Oct4と腫瘍性の強い相関が示されることとなった。

*埼玉医科大学 医学部 解剖学

一方腫瘍を考える上で、近年cancer stem cell(がん幹細胞)の存在が注目されつつある¹²⁾。即ち腫瘍組織の中には、ごく少数のがん幹細胞が存在しており、この細胞が自律的に自己複製し増殖するとともに、非対称分裂の過程で分裂能の低下した細胞を生じ、結果これら2種類の細胞集団から腫瘍組織が形成されることが、腫瘍形成の機構と考えられるようになった。従ってこのがん幹細胞を同定し、これを取り除くことががん治療の上で極めて重要であると考えられている。がん幹細胞は、その名の通り「幹細胞」であり、他の正常な「幹細胞」との類似性、即ち自己複製能があり、従ってこの自己複製能を規定している分子機構には共通な部分があるのではないかと考えられている。事実これまで、Bmi1¹³⁾、 β -catenin¹⁴⁾といった遺伝子が自己複製能を規定する上での重要な候補として知られているが、しかしいずれの場合もがん幹細胞では、これら遺伝子に変異が生じ、タンパク質が恒常的に活性化される、あるいは機能低下することでがん幹細胞としての性質を獲得することが示されている。このことは上で述べたOct4の場合とは大きく異なっている。即ちOct4の場合、野生型タンパク質の異所的な発現ががん化の要因であり、即ちOct4の機能そのものには異常が認められていない。このようにOct4による腫瘍性維持と言う観点から見ると、がん幹細胞とES細胞の極めて高い類似性を見いだすことも可能であると考えられる。事実、ES細胞によるテラトーマ形成では、ES細胞自身はOct4に依存しながら自己複製し、その一方で非対称分裂に伴い分化した細胞を生じさせることにより腫瘍形成がなされており、まさにES細胞そのものが、Oct4に依存しながら、がん幹細胞として機能しているとも考えられる。一方、Oct4の発現が認められる体細胞がんでは、その発現が組織幹細胞に由来した細胞に局限していることが知られている。以上のことより、Oct4によるES細胞とある種のがん幹細胞

胞での自己複製と腫瘍性維持における重要性は示されたと考えられるが、それでは、これら二つの現象はそもそも分離できるか、即ちOct4の下流遺伝子の内(1)自己複製に関与(2)腫瘍形成に関与の2つのグループに分離出来るか否かはこれまで明らかとされていなかった。さらに、転写因子であるOct4が、いかなる遺伝子の発現を制御することで自己複製能あるいは腫瘍形成能をES細胞に付与しているのかが不明である。そこで私は、Oct4の変異体を野生型Oct4の代わりにES細胞に導入することで、自己複製能と腫瘍形成能にいかなる影響を及ぼすかを検討することとした。その結果ある種のOct4変異体を導入した場合、腫瘍形成能と自己複製能を分離することに成功し、またその腫瘍形成能の付与には、Oct4の下流遺伝子として私が同定した¹⁵⁾転写補助因子UTF1が¹⁶⁾重要な寄与をしている可能性を見出したので、ここに報告する。

材料と方法

ES細胞 (ZHBTc 4株) の培養

Tet-off系によりOct4の発現が制御可能なZHBTc4株の培養は丹羽らの方法による⁸⁾。なおこの細胞株はOct4の遺伝子座にZeocinおよびBlasticidin耐性遺伝子が挿入してあり、通常の培養では、これら薬剤を含む培地にて培養している。

レスキュー実験

丹羽らにより開発された方法による¹⁷⁾。簡単に述べると、Oct4の変異体 (Oct4とOct6のキメラタンパク質) をコードするcDNAにIRESの配列をはさみ puromycin 耐性遺伝子を繋ぎ、これら遺伝子をCAGプロモーターのコントロール下におくようにプラスミドを設計する。変異体の構造は図2参照。なお黒部分がOct6に由来し、白部分がOct4に由来している。このOct4変異体を発現させるプラスミドをZHBTc4株に電気穿孔法により導入するとともに、tetracyclinを添加し内在性のOct4の遺伝子発現を消失させる。その後 puromycin 存在下で培養し、未分化性を維持した細胞のコロニーの産生状況により、Oct4変異体のレスキュー効果を評価する(図1)。なお一部キメラタンパク質によりレスキューされた細胞は、継代培養し、RNAの解析に用いる。また下記のUTF1の過剰発現の実験に用いる。

UTF 1 の過剰発現

CAGプロモーター下にUTF1のcDNAならびにIRESをはさむようにHistidinol耐性遺伝子を置いたプラスミドを作製する。またコントロールプラスミドとして上記プラスミドからUTF1のcDNAを除いたプラスミドを作製する。Oct4の変異体によりレスキューされた細胞に、上記2種類のどちらかを導入し、Histidinol耐性コロニーを得た後、継代培養する。

テラトーマ形成実験

ヌードマウス (BALB/cA-nu/nu 株)を2週間、10 ug/mlの tetracyclin を含む水にて飲料水として与え全処理した後、Oct4変異体によりレスキューされた細胞に、コントロールプラスミドあるいはUTF1過剰発現プラスミドを導入した細胞を接種し、10 ug/mlの tetracyclin を含む水にて飲料水として与えながら、一ヶ月生育させテラトーマ形成について観察する。なおコントロールとしてZHBTc4株を接種し、tetracyclin 未処理で飼育しテラトーマ形成を観察する。

RNase protection assay

方法は既報による¹⁵⁾。プローブの設計はcDNAの翻訳開始コドンATGのAを+1として；UTF1, +226 to +544; FGF4, +2588 to 2784; Sox2, +480 to 905; Rex1, +75 to 351; β -actin, +903 to 1023を検出するように設計した。

結果と考察

レスキュー可能なOct-4とOct-6キメラタンパク質

Oct4はPOUドメインを持つ転写因子のファミリーに属している。これらファミリーに属し、かつES細胞で発現することが知られているものとして、Oct-1とOct-6の2つが知られている。しかし、これら2つの転写因子いずれにおいても、Oct4の機能を代償することは不可能であることは丹羽らの報告によりすでに知られている¹⁷⁾。しかしなぜ同じPOUドメインに属する転写因子にもかかわらず、Oct4のみがES細胞の自己複製能および腫瘍性を維持することが可能なのか、すなわちそのOct4のどのタンパク質領域が、ES細胞の性質維持に必須であるのかを同定することにより、その過程で自己複製能と腫瘍性の分離が可能になるのではないかと考え、Oct4とレスキューできないOct6とのキメラタンパク質を tetracyclin 処理したZHBTc4に

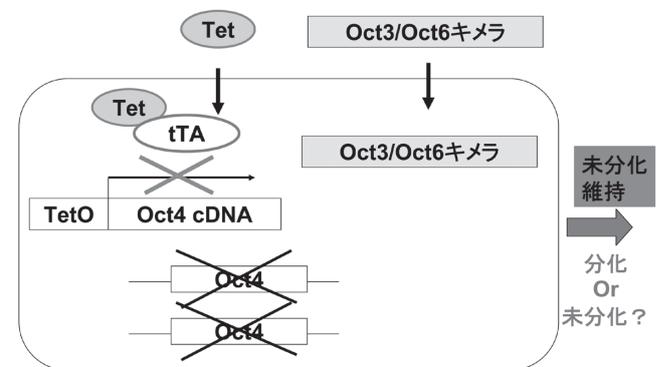


図 1. レスキュー実験の概要。ZHBTc4株にTetracyclin 処理を開始し内在性 Oct4の発現を消失させると同時に、キメラタンパク質発現プラスミドを導入し、 puromycin による薬剤選択の後、コロニーの形成をもってレスキューされたと判定する。

導入することで、レスキュー実験を行うこととした。その結果図2に示すようなキメラにおいてレスキュー可能であることが確認された。すなわち、POUドメインのうち、linker portionと呼ばれる部分と、POU-specificドメインの中の22番目のスレオニンの両方が必須であることが明らかとなった。

レスキューされた細胞でのOct-4の下流遺伝子UTF1の発現レベル

なおこのレスキュー実験では自己複製能が可能であるか否かを判定することしかできないので、レスキューされた細胞におけるOct-4の下流遺伝子として報告された遺伝子についてその発現を確認した。その結果FGF4, Sox2, Rex1といった遺伝子ではその発現レベルで、いずれのキメラタンパク質でレスキューされた細胞において変化は見られなかった。しかし同じOct-4の下流遺伝子として同定されたUTF1では、ある種のキメラタンパク質 (Mt K22T) によりレスキューされた細胞において、顕著な発現の低下が認められた(図2)。

UTF1の発現量に依存したES細胞の腫瘍性の違い

以上の結果より、ある種のOct-4とOct-6のキメラでレスキューされた細胞では、同じOct-4の下流遺伝子として知られているもののなかで、少なくともUTF1において発現の減少が認められた。しかしUTF1以外の未知なるOct-4の下流遺伝子も同様に発現が低下し

ている可能性も考えられるため、ここでUTF1のみに焦点を合わせることを目的として、Mt K22Tのキメラでレスキューされた細胞に再度UTF1を強制発現させることとした。なおここでコントロールプラスミドを導入した細胞も用意し、UTF1の発現量およびUTF1の下流に位置する遺伝子のみが異なる2種類の細胞株を樹立することとした。このことはもしこれら2種類の細胞間で細胞の性質に差が生じたならば、それはUTF1の発現量の差に起因すると考えられることによる。そこでこれら2種類の細胞株について、特に腫瘍性について検討を加えるために、teratoma assayを行った。その結果、図3に示すように、UTF1の発現が減少しているコントロールプラスミドを導入した細胞では、ほとんど腫瘍の形成が認められなかったのに対し、UTF1を再度強制発現させた細胞では、正常なES細胞と同程度の腫瘍形成を認めた。

結論

ES細胞は、多能性を持つことならびに無限の増殖能を持つことから、今後再生医療において有効な材料になることが期待されている。しかしES細胞には腫瘍形成能という性質があり、再生医療実現化の上でひとつの大きな障害となっている。すなわち、もし移植に必要な組織に分化させた細胞の中に、分化しきれずに腫瘍性を維持したままの細胞が混入していたならば、移植後の腫瘍形成が生ずることが予測されるからである。したがってES細胞の腫瘍性維持の分子機

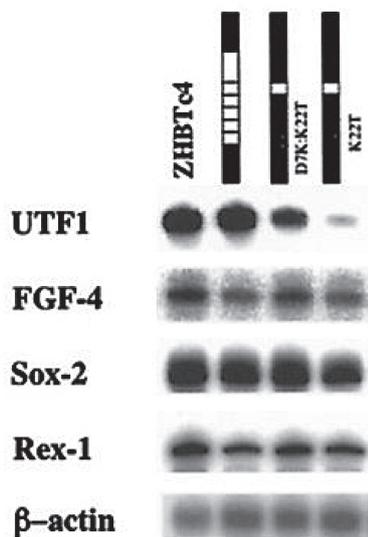


図2. 様々なキメラタンパク質によりレスキューされた細胞でのOct-4の下流遺伝子の発現。キメラタンパク質によりレスキューされた細胞において、Oct-4により発現が制御されていることが知られている遺伝子について、RNase protection assayにより発現レベルを確認した。

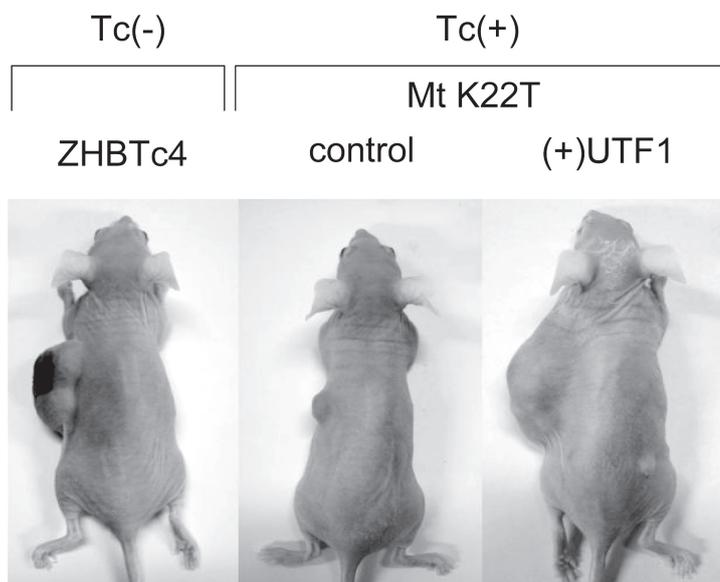


図3. UTF1の発現レベルの差によるteratoma形成能について。Mt K22Tキメラタンパク質に、コントロールプラスミドあるいはUTF1強制発現プラスミドを導入した細胞を、tetracyclineを飲料水として飲ませたヌードマウスに接種し、その腫瘍形成能の差について調べた。なおZHBTC4株をES細胞のteratoma形成能のポジティブコントロールとした。

構解明は、ES細胞を利用した再生医療実現化には欠かせぬテーマだと考えられる。そのような中私は今回の研究において、ES細胞の持つ自己複製能と腫瘍性という2つの固有の性質を分離することに成功した。さらにその腫瘍性維持にはUTF1遺伝子が重要な寄与をしていることを示すようなデータを得た。このことは今後のES細胞を利用した再生医療の実現への一歩になると期待している。今後はUTF1ノックアウトES細胞を樹立することで、ES細胞の腫瘍形成能とUTF1の関連について直接的な証拠が得られればと考えている。

参考文献

- 1) Jones, P.A. and Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genetics* 2002;3:415-28.
- 2) Freed, C.R. Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002;99:1755-7.
- 3) Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., and Jaenisch, R. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 2005;121:465-77.
- 4) Scoler, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 1990;344:435-9.
- 5) Rosner, M.H., Vignano, M.A., Ozato, K., Timmons, P.M., Poirier, F., Rigby, P.W., and Staudt, L.M. A POU-domain transcriptional factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo. *Nature* 1990;345:686-92.
- 6) Okamoto, K., Okazawa, A., Okuda, A., Sakai, M., Muramatsu, M., and Hamada, H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 1990;60:461-72.
- 7) Nichols, J., Zebnic, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. Cell formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor. *Cell* 1998;95:379-91.
- 8) Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 2000;24:372-6.
- 9) Jin, T., Branch, D.R., Zhang, X., Qi, S., Youngson, B., and Goss, P.E. Examination of POU homeobox gene expression in human breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 1999;81:104-12.
- 10) Wang, P., Branch, D.R., Bali, M., Schultz, G.A., Goss, P.E. The POU homeodomain protein Oct3 as a potential transcriptional activator for fibroblast growth factor-4 in human breast cancer. *Biochemical J.* 2003;375:199-205.
- 11) 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.
- 12) Skinner, M. Stem cells: Insights into breast cancer heterogeneity. *Nature Review Cancer* 10:163
- 13) Lessard, J. and Sauvageau, G. Bmi1 determines the proliferative capacity of normal and leukemic stem cells. *Nature* 2003;423:255-60.
- 14) Barker, N., Ridgway, R.A., van Es, J.H., van de Wetering, M., Begthel, H., Van den Born, M. et al. Crypt stem cells as the cells-of origin of intestinal cancer. *Nature* 2009;457:608-11.
- 15) Nishimoto M. Fukushima A. Okuda A. 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. *Molecular & Cellular Biology.* 1999;19:5453-65.
- 16) 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 Journal.* 1998;17:2019-32.
- 17) Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A., and Miyazaki, J-I. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU-domain and generic transactivation function of Oct-3/4 in embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 2002;22:1526-36.

研究成果リスト

論文

1. Miyagi S. Masui S. Niwa H. Saito T. Shimazaki T. Okano H. Nishimoto M. Muramatsu M. Iwama A. Okuda A. Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Letters.* 2008;582(18):2811-5.
2. Matsui H, Sakabe M, Sakata H, Yanagawa N, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. Induction of initial heart α -actin, smooth muscle α -actin, in chick pregastrula epiblast: the role of hypoblast and fibroblast growth factor-8. *Dev Growth Differ* 2008;50:143-57.
3. Sakabe M, Sakata H, Matsui H, Ikeda K, Yamagishi T, Nakajima Y. ROCK1 expression is regulated by TGF β 3 and ALK2 during valvuloseptal endocardial cushion formation. *Anat Rec* 2008;291:845-57.

4. Suzuki K, Mitsui K, Aizawa E, Hasegawa K, Kawase E, Yamagishi T, Shimizu Y, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:13781-6.
5. Zhang J, Nomura J, Maruyama M, Nishimoto M, Muramatsu M, Okuda A. Identification of an ES cell pluripotent state-specific DUSP6 enhancer. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 2009;378(2):319-23.
6. Nomura J, Maruyama M, Katano M, Kato H, Zhang J, Masui S, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Okuda A. Differential requirement for nucleostemin in embryonic stem cell and neural stem cell viability. *Stem Cells*. 2009;27(5):1066-76.

総説

1. Roles of TGFbeta and BMP during valvulo-septal endocardial cushion formation. Yamagishi T, Ando K, Nakamura H. *Anat Sci Int*. 2009;84(3):77-87.

学会発表

1. Expression pattern of sox9 gene during chick heart development. Yamagishi T, Nakajima Y, Ando K, Sakabe M, Nakamura H Society for Developmental Biology 67th Annual Meeting July 28, 2008, Philadelphia.
2. Inhibition of Nodal signaling affects epiblast cell movement in the pre-streak chick blastoderm. Yanagawa N, Sakata H, Yamagishi T, Nakajima Y Society for Developmental Biology 68th Annual Meeting July 23, 2009, San Francisco.
3. Tenascin C regulates recruitment of smooth muscle cells during coronary arterial development. Ando K, Yamagishi T, Miyagawa-Tomita S, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Nakajima Y 49th American Society for Cell Biology Annual Meeting December 8, 2009, San Diego.
4. UTF1は胎児の成長速度に関与している 西本正純, 山岸敏之, 野村淳, 丸山昌良, 鍋島曜子, 鍋島陽一, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
5. ES細胞と神経幹細胞における nucleostemin の役割 丸山昌良, 野村淳, 升井伸治, 西本正純, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
6. マウスおよびヒトES細胞におけるDUSP6遺伝子の未分化状態特異的な発現をサポートする発現調節領域の同定 張佳星, 野村淳, 丸山昌良, 西本正純, 奥田晶彦 第31回日本分子生物学会 2008年12月9日-12日 神戸市.
7. 心内膜床形成過程でおこる上皮-間葉形質転換でのsox9の役割 山岸敏之, 中島裕司, 安藤克己, 米山克美, 中村裕昭 第114回 解剖学会全国学術総会 2009年3月30日.
8. 心内膜床形成でのsox9の役割: 心臓弁・中隔原基形成の分子機構 山岸敏之, 柳川成章, 寺迫優美, 中村裕昭, 中島裕司 第85回日本解剖学会近畿支部学術集会 2009年11月28日.
9. UTF1は胎盤の成長に寄与している 西本正純, 片野幸, 山岸敏之, 菱田友昭, 野村淳, 丸山昌良, 鍋島曜子, 鍋島陽一, 加藤英政, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
10. マウスES細胞におけるp53活性制御因子としてのNucleosteminの役割 片野幸, 野村淳, 西本正純, 加藤英政, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
11. Myc/Max複合体はES細胞のviability維持に必須である 菱田友昭, 野崎友里子, 加藤英政, 西本正純, 奥田晶彦 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日-12日 横浜市.
12. 全体換気システムに局所排気システムを接続したホルムアルデヒド低減化対策 高橋真樹子, 安部みき子, 山岸敏之, 仲谷和記, 岡出朋子, 小川登紀子, 小西博之, 桐生寿美子, 木山博資, 中島裕司 第115回 解剖学会全国学術総会 2010年3月28日.