

平成 21 年 3 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790210

研究課題名 (和文) PSF1 および SLD5 の幹細胞分裂における機能解析

研究課題名 (英文) Functional Analysis of PSF1 and SLD5 in Stem Cell Division

研究代表者

上野 将也 (UENO MASAYA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20334766

研究成果の概要：

細胞が分裂するには、DNA が精緻に複製され、これが均等に分配される必要がある。本研究では DNA 複製因子である PSF1 および SLD5 が、染色体分配を制御し、個体の初期発生に必須であることを明らかとした。また、*SLD5* 遺伝子が未分化細胞に発現することを利用し、癌組織中に存在する細胞分裂活性の高い特殊な癌細胞 (癌幹細胞) の可視化を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：幹細胞、DNA 複製、DNA 分配、遺伝子欠損マウス、バイオイメージング

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な組織に幹細胞が存在し、永続的に分化細胞を生み出していることが証明されている (Nature, 414: 105 (2001))。一生涯にわたり分化細胞を供給し続ける幹細胞では、その染色体が極めて安定に維持され、分裂期では染色体が持つ遺伝情報が極めて精緻に複製され、かつ、分配されていると考えられるが、幹細胞におけるこれらの過程を制御する分子基盤は詳細にはされていない。

染色体分配には、姉妹染色体の対合と凝縮、動原体、セントロソーム、およびスピンドルの形成、スピンドルチェックポイントなどの過程があるが、これらの制御に関わる遺伝子

の異常により、染色体が不等分配され、これが発癌につながることを知られており (Nat Genet, 20: 189 (1998), Nature, 392: 300 (1998))、幹細胞を含めた正常細胞の癌化メカニズムを理解するには、染色体分配の分子機構を明らかにすることが重要である。

一方、正常組織のみならず、癌組織からも癌幹細胞が同定されている (Nature, 414: 105 (2001))。この癌幹細胞はいくつかの点で組織幹細胞との類似点があり、正常な幹細胞を起源としている可能性が示唆されているが、幹細胞が癌化する分子基盤はほとんど解っていない。したがって、幹細胞における染色体分配の分子基盤を詳細にすることは、

幹細胞の癌化プロセスの理解に重要である。

これまでに研究代表者らはマウス造血幹細胞特異的 cDNA ライブラリーを作製し、幹細胞や未分化細胞に特異的に発現する新規遺伝子 *PSF1* とその結合因子の *SLD5* を同定し報告した (Mol Cell Biol, 25: 10528(2005), Biochem Biophys Res Commun, 339: 1204(2005))。この二つの分子は他に PSF2 と PSF3 の 4 者複合体 (GINS コンプレックス) を形成し、この複合体は DNA 複製の開始を制御する事が酵母とカエルの卵抽出液を用いた無細胞系で報告されたが (Genes Dev, 17: 1141(2003), Genes Dev, 17: 1153(2003))、哺乳類を含む高等真核動物での機能は全く解っていなかった。そこで、これまでに研究代表者らはマウスにおける PSF1 および SLD5 の機能解析を行い、(1) PSF1 と SLD5 は未熟な細胞で特異的に発現すること、(2) PSF1 は初期発生に出現する幹細胞集団の分裂に必須であること、(3) *PSF1* 欠損胚では高頻度に染色体分配の異常が観察されること、(4) 癌細胞では PSF1 と SLD5 の発現が亢進していること、(5) *SLD5* ホモ欠損マウスは *PSF1* 欠損マウスに類似した表現型を示すことなどを予備的実験等により明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では PSF1 および SLD5 の幹細胞分裂、および癌化における機能解析を目的として、主に以下の目的で研究を行った。

(1) 幹細胞の染色体分配における PSF1 の機能解析

PSF1 遺伝子のホモ欠損あるいはノックダウンによりスピンドルの異常形成と染色体の異常な分配が誘導されることが予備的実験により示唆されていたので、*PSF1* 遺伝子ホモ欠損マウスの幹細胞分裂における既存の染色体分配や、スピンドルチェックポイント関連分子の挙動を解析した。

(2) *PSF1* あるいは *SLD5* 遺伝子のヘテロ欠損の発癌への影響

PSF1 や *SLD5* 遺伝子の抑制が染色体の不安定性を引き起こし、これは癌化の要因になると予想されるので、野生型、*PSF1* あるいは *SLD5* ヘテロ欠損マウスを用いて、各々遺伝子型のマウスの癌発症率等を解析した。

(3) 癌組織レベルでの PSF1 あるいは SLD5 発現細胞の可視化と機能解析

正常組織では PSF1 や SLD5 は幹細胞や未分化細胞でその遺伝子発現が亢進していること、癌組織中の一部の細胞で PSF1 や SLD5 が高発現していることを予備的実験により確認しており、この集団が癌幹細胞であると仮説を

たてた。そこで *PSF1* あるいは *SLD5* 遺伝子を高発現する細胞を、組織レベルで可視化し、その集団をセルソーターを用いて純化し、性質を解析した。

(4) 初期発生における SLD5 の機能解析

生体内における SLD5 の機能を解析する目的で *SLD5* 遺伝子欠損マウスを作成し、その表現形を解析した。

3. 研究の方法

(1) 幹細胞の染色体分配における PSF1 の機能解析

① *PSF1* ホモ欠損マウス胚 (プラストシスト) を試験管内で一定期間培養したもの、あるいは RNAi 法により *PSF1* をノックダウンした細胞を固定し、 β -チューブリン、 γ -チューブリン、Aurora kinase A および B、CENP-E、Geminin、INCENP、Survivin、EB1、Polo kinase に対する抗体を用いて免疫染色を行い、それらの細胞内局在を野生型のものと比較して解析した。

② スピンドルの形成過程を解析する目的で、GFP-tubulin 融合蛋白を恒常的に発現する細胞を作製し、その細胞の内因性 *PSF1* を RNAi 法によりノックダウンし、タイムラプス法によりそのスピンドル形成における PSF1 の機能を解析した。

(2) *PSF1* あるいは *SLD5* 遺伝子のヘテロ欠損の発癌への影響

① *PSF1* ヘテロ欠損マウス、*SLD5* ヘテロ欠損マウス、*PSF1* および *SLD5* ダブルヘテロ欠損マウスを長期間飼育し、癌の自然発症率を解析した。

② 上記の *PSF1* や *SLD5* 遺伝子欠損マウスの胎児から線維芽細胞を回収し、これらの長期間継代を続け、不死化するか検討した (Genes Dev, 17: 2396 (2003))。

(3) 癌組織レベルでの PSF1 あるいは SLD5 発現細胞の可視化と機能解析

① ES 細胞の *SLD5* 遺伝子座を β -galactosidase に相同組換えることで、ES 細胞の内因性の SLD5 の発現を β -galactosidase の酵素活性によりモニタリングできる実験系を確立した。

② ES 細胞をヌードマウスに移植してテラトーマを形成させ、テラトーマ組織中での SLD5 の発現を β -galactosidase の酵素活性を利用して解析した。

③ 上記のテラトーマをトリプシンとコラゲナーゼで分散し、 β -galactosidase の酵素活性を指標にして、SLD5 の発現が高い細胞と低い細胞をセルソーターで純化し、それぞれの細胞集団の性質を解析した。

(4) 初期発生における SLD5 の機能解析

- ① *SLD5* 遺伝子の初期胚における発現パターンを、*SLD5* ヘテロ欠損マウスを利用して、X-gal 染色法で解析した。
- ② *SLD5* ヘテロ欠損マウス同士を交配し、胎生 5-6 日の胎児を回収し、組織切片を作成し *SLD5* ホモ欠損マウスの表現型を組織学的に解析した。
- ③ *SLD5* 欠損マウスのプラストシストを培養し、一定期間の BrdU の取込み活性を野生型と比較した。
- ④ TUNEL 法で細胞死について野生型と比較した。

4. 研究成果

(1) 幹細胞の染色体分配における PSF1 の機能解析

PSF1 ホモ欠損胚では高頻度に染色体分配の異常が観察された。また RNAi 法で *PSF1* 遺伝子を阻害すると、細胞周期の M 期から G1 期に移行する過程が遅延することが解った。*PSF1* をノックダウンした細胞では、紡錘体形成が抑制されることがタイムラプス法により明らかとなった。加えて、*PSF1* をノックダウンした細胞では中心体が 3 つ以上あるものや、非対称的な染色体の分配が観察されたが、既存のスピンドル形成に関わる因子の局在等に異常は観察されなかった。

これらのことから、*PSF1* は DNA 複製のみならずスピンドルの形成を制御していることが示唆された。

(2) *PSF1* あるいは *SLD5* 遺伝子のヘテロ欠損の発癌への影響

- ① *PSF1* あるいは *SLD5* ヘテロ欠損マウスを 2 年間飼育して癌の自然発症率を解析したが、野生型と比較して有意な差はみられなかった。また、発癌誘導モデルマウスと交配し、*PSF1* あるいは *SLD5* ヘテロ欠損マウスによる癌の発症率を解析したが、野生型と比較して有意な差はみられなかった。
- ② *PSF1* ヘテロ欠損マウス、あるいは *SLD5* ヘテロ欠損マウス胚から線維芽細胞を回収し、これらを長期間継代したが、不死化の誘導は観察されなかった。

これらのことから、*PSF1* あるいは *SLD5* 遺伝子のヘテロ欠損では癌化を有意に誘導できないことが明らかになった。

(3) 癌組織レベルでの PSF1 あるいは SLD5 発現細胞の可視化と機能解析

SLD5 遺伝子座を β -galactosidase に組換えることで、ES 細胞の *SLD5* の発現を可視化した。この細胞をマウスの皮下に移植して腫瘍を形成させると、腫瘍内には低頻度に *SLD5*

を高発現する細胞集団が存在し、この *SLD5* の発現が高い細胞集団に癌幹細胞様細胞が濃縮されていることが解った。また、腫瘍中の *SLD5* を高発現する細胞では、癌関連遺伝子や、血管新生関連遺伝子の発現が亢進していることが明らかになった。

これらのことから、*SLD5* が癌幹細胞のバイオマーカーとして有用であることが示唆された。

(4) 初期発生における SLD5 の機能解析

- ① *SLD5* 遺伝子の初期胚における発現パターンを、*SLD5* ヘテロ欠損マウスを利用して、X-gal 染色法で解析したところ、プラストシスト胚では内部細胞塊で *SLD5* の高発現が観察された。また、発生するに従い *SLD5* の発現が減少することが示唆された。
- ② *SLD5* ホモ欠損マウスは胎生 5-6 日に致死であり、その表現形は *PSF1* ホモ欠損マウスに類似していた。
- ③ *SLD5* ホモ欠損マウスのプラストシスト胚では BrdU の取込み活性が著しく抑制されていた。
- ④ TUNEL 法により、*SLD5* ホモ欠損マウス胚では、細胞死が誘導されていることが示唆された。
- ④ *SLD5* ホモ欠損マウス胚では *PSF1* 蛋白の不安定性が誘導されていた。

これらのことから *SLD5* は初期胚の DNA 複製に必須であり、*PSF1* の安定性を制御していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

(1) Han Y, Ueno M, Nagahama Y, Takakura N. Identification and characterization of stem cell-specific transcription of PSF1 in spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380: 609-613. 査読有り.

(2) Ueno M, Itoh M, Sugihara K, Asano M, Takakura N. Both alleles of PSF1 are required for maintenance of pool size of immature bone marrow regeneration. *Blood.* 2009; 113: 555-562. 査読有り.

(3) Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 2008; 27: 522-534. 査読有り.

(4) Katoh SY, Ueno M, Takakura N. Involvement of MDR1 function in

proliferation of tumour cells. J Biochem. 2008; 143: 517-524. 査読有り.

(5) Huang X, Yamada Y, Kidoya H, Naito H, Nagahama Y, Kong L, Katoh SY, Li WL, Ueno M, Takakura N. EphB4 overexpression in B16 melanoma cells affects arterial-venous patterning in tumor angiogenesis. Cancer Res. 2007; 67: 9800-9808. 査読有り.

(6) Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte infiltration. Am J Pathol. 2007; 170: 843-854. 査読有り.

〔学会発表〕(計 1件)

Masaya Ueno. PSF1 is essential for bone marrow regeneration. 36th Annual Scientific Meeting of the ISEH - Society for Hematology and Stem Cells, 2007年9月28-30日, ハンブルク(ドイツ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 将也 (UENO MASAYA)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20334766

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし