

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790268

研究課題名（和文）がん遺伝子を介したES細胞の自己複製機構の解析

研究課題名（英文）Involvement of oncogenes in the self-renewal of ES cells

研究代表者

赤木 紀之（AKAGI TADAYUKI）

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70532183

研究成果の概要（和文）：幹細胞とは、様々な細胞系譜へ分化可能な「多分化能」を持つ細胞で、種々の組織で幹細胞の存在が知られている。中でもマウス胚性幹細胞（ES細胞）は、培地にサイトカインLIFを添加しておくことで、多分化能を維持したまま増殖（自己複製）する幹細胞株である。一方がん細胞とは、様々な正常組織で発生しうる悪性腫瘍であり、未熟な細胞で分化しておらず、増殖を続けることで正常細胞の機能を阻害する。「未分化状態で無限に増殖する」という点では、ES細胞とがん細胞で性質が同じであると言える。この知見は、体細胞でがん遺伝子として機能している因子（群）は、ES細胞内で自己複製に関与している可能性を示唆している。そこで本研究では既知のがん遺伝子に着目し、がん遺伝子を介したES細胞における多分化能制御機構の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Pluripotent mouse embryonic stem (ES) cells proliferate with an undifferentiated status (i.e. self-renewal) in the presence of leukemia inhibitory factor (LIF). Cancer cells are characterized as immature malignant cells with features of aggressive proliferation and metastasis to other tissues. Interestingly, stem cells and cancer cells share similar feature: Proliferation with an undifferentiated status. This finding indicates that oncogenes might be involved in self-renewal of ES cells. In the present study, I focused on oncogenes and investigated its roles and functions in ES cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：胚性幹細胞、がん遺伝子、がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞とは未分化状態を維持して増殖する「自己複製能」と、分化した細胞を作る「多分化能」を併せ持った細胞であり、種々の組織で幹細胞の存在が知られている。中でもマウス初期胚より樹立された胚性幹細胞（ES

細胞）は、培地にサイトカインLIF (leukemia inhibitory factor)を添加しておくことで、多分化能を維持したまま自己複製する幹細胞株である。最近では、ヒトES細胞や人工多能性幹細胞（iPS細胞）が樹立され、幹細胞の多分化能を利用した細胞移植や臓器再生

の可能性が国内外で熱く議論されている。ところが、このような高い注目度とは裏腹に、「多分化能を維持した状態で増殖できる」という自己複製能に関する分子機構については、未だに不明な点が多く残されている。しかしながら最近の研究から、マウス ES 細胞では LIF の下流で機能する転写因子群 STAT3、Oct3/4、そして Sox2 などが、自己複製に必須な役割を果たしていることが明らかにされた。

一方がん細胞とは、様々な正常組織で発生しうる悪性の腫瘍細胞である。一般的には、がん遺伝子の活性化、及びがん抑制遺伝子の不活性化により正常細胞ががん化する。そして、多くのがん細胞は、未熟な細胞で分化しておらず、増殖を続けることで正常細胞の機能を阻害する。「未分化状態で無限に増殖する」という点では、ES 細胞とがん細胞で性質が同じであると言える。興味深いことに、ES 細胞の自己複製に最も重要な役割を担う STAT3 は、いくつかの腫瘍細胞でがん遺伝子として同定されている。具体的には、STAT3 は、チロシンキナーゼである Jak や Src によりリン酸化され、二量体を形成し活性化されるのだが、前立腺がん、肺がん、乳がんや脳腫瘍では、恒常的な STAT3 の活性化が知られ、STAT3 を標的とした分子標的療法の開発が待たれている。また、多くの腫瘍で高発現が認められるがん遺伝子 c-Myc は、STAT3 の下流で機能し、ES 細胞の自己複製への関与が示唆されている。これらの知見は、がん遺伝子として知られている遺伝子（群）が、ES 細胞内では自己複製に関与している可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

ES 細胞は未分化状態では自己複製が可能であるが、分化とともにその自己複製能は失われ、増殖能が低下してゆく。この概念はがん細胞にも当てはまり、ES 細胞の自己複製と、がん細胞の増殖には共通の分子機構が存在すると考えられる。そこで本研究では、ES 細胞の自己複製と、がん細胞の増殖の間での分子機構の類似性に着目し、がん遺伝子に代表されるがん細胞の増殖に関与する遺伝子の中で、ES 細胞にも強く発現している遺伝子を探索する。その上で、がん遺伝子を介した ES 細胞の自己複製制御機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### 候補遺伝子の探索

Wellcome Trust Sanger Institute には、約 4,700 遺伝子のがん遺伝子として報告されている。このうち約 150 遺伝子が、数々の細胞や組織において詳細に機能解析されてい

る。また、様々な遺伝子の各組織での発現パターンは、BioGPS 内でデータベース化されている。そこで約 150 の既知のがん遺伝子に着目し、データベースから ES 細胞に強く発現している遺伝子を検索した。

### RT-PCR 解析

細胞の total RNA を Sepasol-RNA I Super G を用いて精製し、Oligo(dT) primer と逆転写酵素 ReverTraAce を用いて cDNA を合成した。作成した cDNA を鋳型とし、目的の遺伝子に対するプライマーを用いて PCR 法によって増幅した。

### 細胞培養、WST1 アッセイ

PE9、PE15-2 (Dr. Costantini, Columbia University Medical Center より供与して頂いた)、そして ZHBTc4 ES 細胞は、0.1%ゼラチン溶液でコートした培養皿で ES 細胞用培地 (DMEM、15%FBS、2 mM グルタミン、1 x 非必須アミノ酸、1 x スクレオシド、150 μM 1-thioglycerol、マウス LIF) で培養した。分化誘導には、培地から LIF を除去 (PE9 及び PE15-2 ES 細胞)、あるいは Tet 添加により Oct3/4 の発現を人為的に停止 (ZHBTc4 ES 細胞) し、数日間培養した。

細胞の増殖能を測定するために WST1 アッセイを用いた。96-well プレートの 1-well あたりに 500 から 3000 個の細胞を播き、3 日後に WST1 試薬を加え、1 時間後に 450nm の波長で吸光度測定をした。

### (3) ルシフェラーゼアッセイ、EMSA アッセイ

Oct3/4 の ETV5 エンハンサー領域に対する転写活性化能の測定するために、ETV5 遺伝子の +27404 から +27922 の領域を、pGL4-promoter に挿入しレポーターベクターを作成した。レポーターベクターを ES 細胞に導入し、48 時間後にルシフェラーゼ活性を Dual-Luciferase Assay System を用いて測定した。

EMSA アッセイは、ZHBTc4 ES 細胞の核抽出液を用いて行った。RI 標識したプローブと核抽出液を混合後、6%アクリルアミド溶液で展開した。対照実験として、過剰量の RI 非標識プローブ、変異を導入した RI 非標識プローブ、抗 Oct3/4 抗体、抗 Flag 抗体をそれぞれ加えたサンプルも作成し、同時に電気泳動した。ゲルをドライヤーで乾燥させた後、RI シグナルを検出した。

## 4. 研究成果

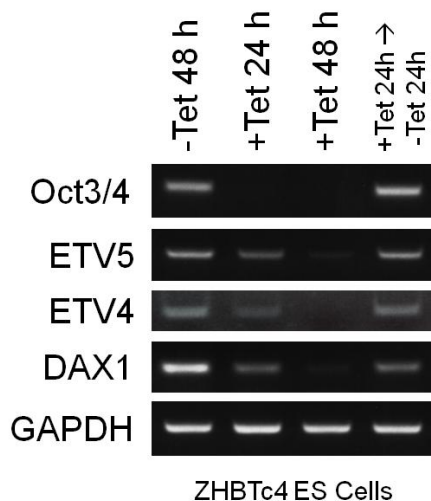
### 候補遺伝子の同定

データベース検索から、ES 細胞に強く発現するがん遺伝子として 25 種類の候補遺伝子を同定した。これらの候補遺伝子の中で、実

際に ES 細胞で発現し、かつ ES 細胞での機能が解析されていない遺伝子を探索したところ、Est ファミリーに属する転写因子 ETV4 と ETV5 が候補遺伝子として得られた。

### ES 細胞における ETV4 と ETV5 の発現

ZHBTc4 ES 細胞を用いて、ETV4/5 の mRNA の発現を検証した。ZHBTc4 ES 細胞とは内在性の Oct3/4 遺伝子が破壊され、Tet 誘導型の Oct3/4 を導入した ES 細胞株であり、Tet 処理によって Oct3/4 の発現が停止する細胞株である。解析の結果、両者は未分化な ES 細胞に発現し、転写因子 Oct3/4 の発現を人為的に停止させ細胞を分化誘導させると、両者の発現も速やかに減少することを見出した。また、Oct3/4 の発現を回復させると、それに伴い ETV4/5 の発現も回復した。このことから、ETV4/5 は Oct3/4 の下流で機能する未分化 ES 細胞特異的な転写因子であることが示された。



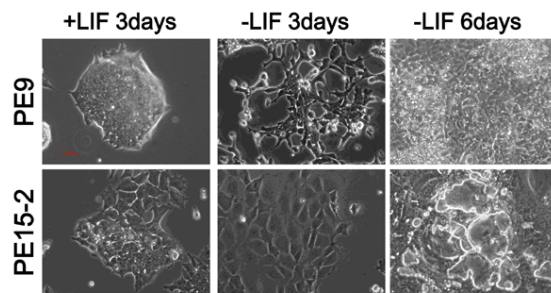
### ES 細胞における ETV5 遺伝子の発現制御機構

上述の結果から、ES 細胞において ETV4/5 は Oct3/4 の標的遺伝子であることが示唆された。そこで、ETV5 遺伝子に Oct3/4 結合配列が含まれているか探索したところ、+27599 から +27606 に Oct3/4 結合配列を見出した。この領域を用いたルシフェラーゼアッセイから、未分化な ZHBTc4 ES 細胞では強い活性が得られ、Oct3/4 の発現を停止させるとその活性も減弱することを明らかにした。

次に、この配列に Oct3/4 が結合しうるか否か EMSA アッセイで解析した。その結果、Oct3/4 が結合していると思われるバンドが検出され、そのバンドは抗 Oct3/4 抗体を添加することでシフトし、一方抗 Flag 抗体を添加した場合には移動度に影響はなかった。以上から、ETV5 遺伝子は ES 細胞において Oct3/4 の直接の標的遺伝子であることが示された。

### ETV4/5 ダブルノックアウト ES 細胞の解析

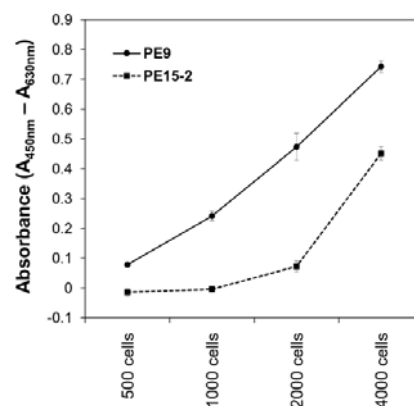
ES 細胞の自己複製における ETV4/5 の役割を解明する目的で、ETV4/5 ダブルノックアウト ES 細胞を解析した。ETV4 と ETV5 は DNA 結合領域が高く保存されており、互いの機能を代替する可能性があることから、ダブルノックアウト ES 細胞の解析を先行した。細胞の形態学的特徴は、野生型 (PE9) ES 細胞はコンパクトなコロニーを形成するのに対し、ダブルノックアウト (PE15-2) ES 細胞は、コロニーを形成せず扁平な形態をとりながら自己複製が維持されていた。また、培地から



LIF を除去し分化誘導した場合には、PE9 ES 細胞は繊維芽細胞様の形態を示す一方、PE15-2 ES 細胞は上皮細胞様の形態を示した。

この細胞における遺伝子発現を確認したところ、分化に伴い PE9 ES 細胞は三胚葉のマーカー遺伝子群が発現するのに対し、PE15-2 ES 細胞では、分化マーカーの発現が抑えられていた。このことから、PE15-2 ES 細胞においては、自己複製は維持されるものの、分化能が欠損していることが明らかとなった。

さらに、両者の細胞増殖能を WST1 アッセイで比較したところ、PE15-2 ES 細胞は PE9 ES 細胞に比べて、有意に増殖能が低下していることを見出した。



以上のことから、ETV4/5 は未分化な ES 細胞の増殖を促進し、ES 細胞の多分化能維持に貢献していることが示唆された。

本研究ではがん遺伝子として知られている ETV4/5 が、ES 細胞では多分化能の増殖能

に重要な役割を持っていることを明らかにした。今後は ETV4/5 の下流で機能する遺伝子群を同定・解析することで ETV4/5 の ES 細胞における機能の全容解明並びに、がん細胞と ES 細胞の相違性の実体に迫ることを目指す。

#### 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 4 件)

1. Akagi T, Thoennissen NH, George A, Crooks G, Song JH, Okamoto R, Nowak D, Gombart AF, and Koeffler HP. In vivo Deficiency of both C/EBP  $\beta$  and C/EBP  $\epsilon$  Results in Highly Defective Myeloid Differentiation and Lack of Cytokine Response. *PLoS ONE*. 2010; **5**: e15419 (査読有)
2. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, Weiss T, Haferlach C, Dugas M, Ruckert C, Haferlach T, and Koeffler HP. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric ALL. *Haematologica*. 2010; **95**:1481-1488. (査読有)
3. Sun C, Nakatake Y, Akagi T, Ura H, Matsuda T, Nishiyama A, Koide H, Ko MS, Niwa H, Yokota T. Dax1 Binds to Oct3/4 and Inhibits Its Transcriptional Activity in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol*. 2009; **29**:4574-4583. (査読有)
4. Akagi T, Ito T, Kato M, Jin Z, Cheng Y, Kan T, Yamamoto G, Oлару A, Kawamata N, Boulton J, Soukiasian HJ, Miller CW, Ogawa S, Meltzer SJ, and Koeffler HP. Chromosomal abnormalities and novel disease-related regions in progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer*. 2009; **125**: 2349-2359. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. 浦西 洸介、赤木 紀之、孫 伝海、小出 寛、横田 崇。未分化な ES 細胞特異的に発現している Dax1 と Esrrb の相互作用。2010 年 12 月 10 日 BMB2010 (兵庫県、神戸ポートアイランド)
2. Tadayuki Akagi, Nils H. Thoennissen, Ann George, Gay Crooks, Jee Hoon Song,

Ryoko Okamoto, Daniel Nowak, Carsten Muller-Tidow, Adrian F. Gombart, H. Phillip Koeffler. In vivo deficiency of both C/EBPbeta and C/EBP epsilon results in highly defective myeloid differentiation and lack of cytokine response. 2010 年 12 月 9 日 BMB2010 (兵庫県、神戸ポートアイランド)

3. 田多 祐喜, 赤木 紀之, 横田 崇, 小出 寛. Nanog is essential for anchorage-independent growth of HT1080 fibrosarcoma cells. 2010 年 12 月 9 日 BMB2010 (兵庫県、神戸ポートアイランド)
4. 赤木 紀之, Nils H. Thoennissen, Ann George, Gay Crooks, Jee Hoon Song, 岡本 涼子, Daniel Nowak, Carsten Muller-Tidow, Adrian F. Gombart, H. Phillip Koeffler. Redundant roles of C/EBP-beta and C/EBP-epsilon during myeloid development. 2009 年 12 月 11 日 第 32 回分子生物学会年会 (神奈川県、パシフィコ横浜)
5. 浦 大樹, 赤木 紀之, 小出 寛, 横田 崇. マウス ES 細胞の生存や分化には、Eed の適切な発現レベルが必要である。2009 年 12 月 9 日 第 32 回分子生物学会年会 (神奈川県、パシフィコ横浜)
6. 田多 祐喜, 赤木 紀之, 横田 崇, 小出 寛. ヒト線維肉腫 HT1080 細胞の足場非依存性増殖は Nanog によって促進される。2009 年 12 月 9 日 第 32 回分子生物学会年会 (神奈川県、パシフィコ横浜)
7. 赤木 紀之, H. Phillip Koeffler. 転写因子 C/EBP  $\beta$  と C/EBP  $\epsilon$  のダブルノックアウトマウスにおける造血器機能の解析 2009 年 10 月 3 日 第 68 回日本癌学会学術総会 (神奈川県、パシフィコ横浜)
8. Tadayuki Akagi, Nils H. Thoennissen, Gay Crooks, Adrian F. Gombart, H. Phillip Koeffler. Analysis of Hematopoietic Cells in C/EBP $\beta$  and C/EBP  $\epsilon$  Double Knockout Mice. The 7th Stem Cell Research Symposium, May 15-16, 2009. (東京都、泉ガーデンギャラリー)
9. Hiroki Ura, Tadayuki Akagi, Hiroshi Koide, Takashi Yokota. Excess amount of Eed induces apoptosis of mouse ES cells. The 7th Stem Cell Research Symposium, May 15-16, 2009. (東京都、泉ガーデンギャラリー)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 紀之 (AKAGI TADAYUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70532183

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし