

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22501017

研究課題名（和文）がん治療法確立に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

研究課題名（英文）Analyzing the common mechanism underlying the maintenance of tumorigenicity in cancer stem and embryonic stem cells

研究代表者

西本 正純（NISHIMOTO MASAZUMI）

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：00265406

研究成果の概要（和文）：

UTF1 は、胚性幹細胞や、腫瘍組織例えば germ cell tumor などでも発現していることが知られている。また私は以前、UTF1 が胚性幹細胞の腫瘍性維持に寄与している可能性について間接的な手法ではあるが示した。このことより、将来がん幹細胞を標的とした治療法を確立する方法として、UTF1 をターゲットとしたものを考えている。そこでまず、UTF1 と腫瘍性維持との関係を明らかとするために、より直接的な方法として、胚性幹細胞において UTF1 をノックアウトすることとした。しかし残念ながら、UTF1 をノックアウトしても胚性幹細胞の腫瘍性は維持されたままであり、それ以外の遺伝子の効果もあることが示された。

研究成果の概要（英文）：

UTF1 is expressed not only in embryonic stem cells (ESCs) but also in tumor cells as germ cell tumors. To treat the cancer, it is critical to clarify the mechanism maintaining the tumorigenicity. I previously demonstrated that UTF1 plays an important role to maintain the tumor character in ESCs. Because I hypothesize that the loss of function of UTF1 in ESCs may result in the loss of tumorigenicity, I generated the UTF1 knockout ESCs. Unfortunately, the UTF1 knockout ESCs still maintained the tumorigenicity. This result indicates that the genes in addition to UTF1 may contribute to the tumorigenicity of ESCs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：幹細胞、UTF1、ジーンターゲットニング

1. 研究開始当初の背景

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

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この可能性が考えられ始めている。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）を挙げる事が出来る。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事により、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。この腫瘍性には、転写因子 Oct-4 (Oct-3, Oct-3/4とも呼ばれる)の強い関与が示唆されている。Oct-4 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、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Oct-4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なくなり、結果分化することが既に示されている。しかし近年、このOct-4がある種の体細胞がんが発現していること、さらにある種の体細胞がん由来の細胞株が発現していること、不死化した細胞にOct-4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、トランスジェニックマウスを用いた系で異所的にOct-4を発現させることで、皮膚の異形成が認められたこと等より、Oct-4と腫瘍性の強い相関が示されることとなった。

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。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、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、Bmi1, ベータ-catenine 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する、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Oct-4の場合とは大きく異なっている。即ちOct-4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Oct-4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Oct-4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Oct-4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、Oct-4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、Oct-4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、Oct-4によるES細胞とある種のがん幹細胞での自己複製と腫瘍性維持における重要性が示されている。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景の項で述べたように、Oct-4によるES細胞とある種のがん幹細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Oct-4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。このような状況下私は、転写因子Oct-4の多能性と腫瘍性が分離かのではないかという可能性を示すとともに、そのターゲット遺伝子であり、またES細胞に特異的に発現している転写補助因子UTF1が、腫瘍性に重要な寄与をしていることを示すような結果を得た[Nishimoto et al. Mol. Cell. Biol. 24, 5084-5094 (2005)]。即ち変異型Oct-4を野性型に変わりES細胞で発現させた所、多能性を、即ち自己複製能を維持したまま明らかな腫瘍形成能の低下を示すことが出来た。ここで重要な点は変異型Oct-4の発現によりUTF1の発現の顕著な低下が認められ、さらにこの腫瘍性が低下した細胞に対しUTF1を同時に強制発現させたところ、その腫瘍性の顕著な回復が認められたことにある。以上の結果より、UTF1がOct-4のターゲット遺伝子の中で、ES細胞固有の性質である腫瘍性を規定する上で重要な遺伝子ではないかということが示された。従って今回の計画ではOct-4のターゲット遺伝子であるUTF1に焦点を絞り、先に述べた「ES細胞とある種のがん幹細胞、即ちOct-4の発現が関与するがん幹細胞の腫瘍性を規定する共通の分子機構解明への取組み」への手懸かりとして「ES細胞が持つ腫瘍性は、Oct-4のターゲットであるUTF1が規定しているのではないか」という仮説を証明するためにUTF1ノックアウトES細胞を樹立し、その性質について解析を行うこととする。

がん幹細胞の性質維持の分子機構解明は、現在がん治療を考える上で極めて重要であると考えられるが、これまで幹細胞としての性質のうち自己複製能に研究の中心はおかれていた。しかしここで述べたように、ある

種のがん幹細胞と ES 細胞の性質の類似性、即ち Oct-4 による腫瘍性維持機構も解明すべき重要な点と考えられる。なかでも Oct-4 による UTF1 の発現制御に基づく腫瘍性維持機構を明らかとしたことは、世界で初めての知見とも言える。さらに、UTF1 の下流遺伝子として酵素活性を持つような物が同定された場合、それらの特異的阻害剤を探索するという次なる段階へと展開させる可能性もある。即ち、この特異的阻害剤を投与することで、ある種の、即ち Oct-4 が関与するような腫瘍の場合、極めて有効な治療法となりうる可能性を秘めていると考えている。

3. 研究の方法

(1) ES 細胞の培養

ES 細胞の培養は、Niwa et al. Nat. Genetics 24, 372-376 (2000)による。

(2) UTF1 ノックアウト ES 細胞の樹立

UTF1 ノックアウト ES 細胞の樹立には、UTF1 をノックアウトすることで、ES 細胞の自己複製能を失う可能性を考慮し、Tet-OFF 系を用いることとする(Gossen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5547-5551 1994)。具体的なターゲティングの方法は図 1 に示す。

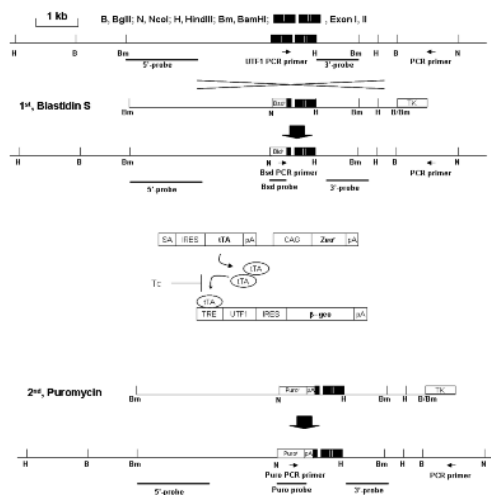


図 1 UTF1 ノックアウト ES 細胞樹立のストラテジー

(3) teratoma 形成実験

teratoma の形成実験は、BALB/cA-nu/nu マウス皮下に 1×10^7 細胞を接種し、10mg/ml Tc を含む水を飲ませ、1 ヶ月後に腫瘍形成を見る。

(4) RNase Protection Assay

RNase Protection Assay は、Nishimoto et al. Mol. Cell. Biol. 24, 5084-5094 (2005)による。

4. 研究成果

(1) UTF1 ノックアウト細胞の未分化マーカーの発現

研究方法の図 1 に示すようなストラテジ

ーにより Tc 添加により UTF1 の発現が OFF となるような、UTF1 ノックアウト細胞の樹立は、サザンハイブリダイゼーション、PCR により確認を行い、正しく UTF1 遺伝子座がターゲティングされていることを確認した。また UTF1 の発現が、Tc 添加により OFF となることは、図 2 に示すように RNase Protection Assay により確認された。そこで、Tc 添加により UTF1 の発現が OFF としたときの、未分化マーカーの発現レベルについて RNase Protection Assay により確認を行った所、UTF1 の発現を OFF にしても、未分化マーカーの発現レベルには変動は見られなかった(図 2)。

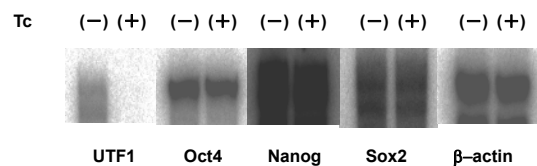


図 2 UTF1 ノックアウト ES 細胞における未分化マーカーの発現レベルの RNA での確認。

このことより UTF1 をノックアウトしても、ES 細胞の未分化状態が維持されていると考えられる。

(2) UTF1 ノックアウトによる増殖速度への影響

以前私は、UTF1 と ES 細胞の増殖速度との関連について報告をした(Nishimoto et al. Mol. Cell. Biol. 25, 5084-5094 2005)。そこで、UTF1 ノックアウト ES 細胞の増殖速度について観測を行った。図 3 に示すように、UTF1 をノックアウトすることにより、若干増殖速度が低下しているようにも見えるが、以前報告したような劇的な差は見出せなかった。

細胞数 (\log_{10})

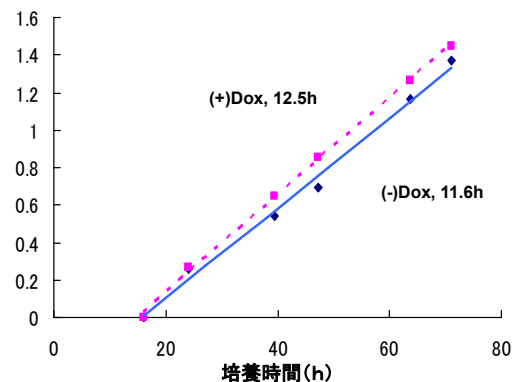


図 3 UTF1 ノックアウト ES 細胞の増殖速度 doubling time: WT, 11.6h; UTF1 KO, 12.5h

以上 2 つの結果、(1) 未分化マーカーの発現 (2) 増殖速度、から UTF1 をノックアウ

トすることによっても、ES細胞の自己複製能にほとんど影響を与えないことが示された。

(3) UTF1 ノックアウトによるES細胞が本来持つ腫瘍性への影響

研究目的の項で述べたように、本研究の最終的な目的は、「ES細胞が本来持つ腫瘍性の分子機構を明らかとすることにより、将来的にはUTF1の発現が認められる腫瘍の治療法を確立する。」ことにある。その手がかりとして「UTF1のES細胞での発現を消失させることにより、ES細胞が本来持っている腫瘍性が無くなるのではないか」という点を示すことに、この研究の目的がある。まず研究成果

(1)(2)で述べたように、UTF1の発現をES細胞で消失させても、ES細胞の自己複製能は維持されており、この点でまず、UTF1の発現を消失させても、ES細胞としての性質は維持していることが示された。そこで次に最も重要な「UTF1 ノックアウトES細胞の腫瘍性は消失しているのか否か。」について検討することとした。そこでUTF1 ノックアウトES細胞を、ヌードマウス皮下に接種し、テラトーム形成能について調べたところ、表1に示すように、UTF1 ノックアウトES細胞は腫瘍性を維持していることが示された。

| | Tc(-) | Tc(+) |
|------|-------|-------|
| マウス1 | 1.63g | 2.11g |
| マウス2 | 1.53g | 2.34g |

表1 UTF1の発現の有無によるテラトーム形成能について(できた腫瘍の重さを(g)で表す)

(4) 考察

ES細胞はあらゆる組織・細胞に分化する能力、多能性を有することより、将来再生医療の切り札として期待されている。しかしES細胞には、本質的に腫瘍形成能を有していることから、たとえば分化させた細胞の中にこのような腫瘍性を維持した細胞が残存していたならば、移植後この細胞から腫瘍が形成される恐れがあることより、再生医療に応用するうえで一つの大きな障害となっている。したがって、ES細胞における腫瘍性維持の分子機構を明らかとすることは、移植する前にこれらの細胞を排除するための方法を確立するうえで、欠かせぬテーマと考えられる。さらにある種の腫瘍細胞において、本来発現していないES細胞に特異的に発現している遺伝子が発現していることが知られており、これらの腫瘍細胞ではES細胞と同じ分子機構が、腫瘍性維持に関与している可能性が予想される。したがってES細胞における腫瘍性維持の分子機構の解明はこれら腫瘍の治療法確立のうえで重要なテーマであると考えられる。以前私はこのES細胞の腫瘍性維持にかかわる遺伝子の候補としてUTF1を同定した(Nishimoto et al. Mol. Cell.

Biol. 24, 5084-5094 (2005) しかしこの時の証明は間接的な手法に基づくものであり、今回、より直接的な方法として、UTF1 ノックアウトES細胞を樹立し、その性質の解析を試みた。その結果UTF1 ノックアウトES細胞は自己増殖能を維持していた。そこで今回の研究で最も重要な腫瘍形成能について解析を行ったところ、UTF1 ノックアウトES細胞の腫瘍性は維持されていた。このことは、以前自身が報告した結果に反するものであるが、ひとつの可能性として、UTF1のみではなく、UTF1以外の遺伝子も腫瘍性維持に関与しており、以前の間接的な方法では、これらいずれもの遺伝子の発現が低下することにより腫瘍性が消失したのに対し、今回の研究ではUTF1のみの発現を消失しただけであり、そのほかの腫瘍性に関与する遺伝子の発現は消失しておらず、結果としてES細胞の腫瘍性が残ったと考えられる。したがって今後は、UTF1以外の腫瘍性に関与するであろう遺伝子を探索し、最終的なゴールとして、これらUTF1を含めた腫瘍性にかかわるすべての遺伝子の発現を消失させたようなES細胞を樹立することで、より安全な、すなわち再生医療に利用可能なES細胞が得ることができればと期待している。またこれらの遺伝子が同定できたならば、今後UTF1の発現がみられるような腫瘍細胞に対する有効な治療法が確立できるものと思われる。

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2件)

- ① Hishida T. Nozaki Y. Nakachi Y. Mizuno Y. Iseki H. Katano M. Kamon M. Hirasaki M. Nishimoto M. Okazaki Y. Okuda A. Sirt1, p53, and p38 (MAPK) are crucial regulators of detrimental phenotypes of embryonic stem cells with Max expression ablation. Stem Cells. 査読有 30: (2012) 1634-44,
- ② Hishida T. Nozaki Y. Nakachi Y. Mizuno Y. Okazaki Y. Ema M. Takahashi S. Nishimoto M. Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. Cell Stem Cell. 査読有 9: (2011) 37-49,

[学会発表] (計10件)

- ① 西本正純、真獣類特異的遺伝子UTF1は胎盤の増殖を促進する、第35回日本分子生物学会、2012年12月13日、福岡市
- ② 加門正義、西本正純、他5名、

partial iPS 細胞から真の iPS 細胞への変換に関与する因子としての Cnot2 の同定、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 13 日、福岡市

- ③ 西本正純、他 11 名、Eutheria-specific UTF1 gene is critical for the placental growth. 第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜市
- ④ 大西芳秋、奥田晶彦、西本正純、Epigenetic regulation of clock gene during the differentiation of embryonic stem cells. 第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜市
- ⑤ 菱田友昭、西本正純、他 7 名、Context-dependent requirement of Myc/Max complexes for the maintenance of the indefinite self-renewal of ES cells. 第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜市
- ⑥ 加門正義、西本正純、他 5 名、Partial iPS 細胞を真の iPS 細胞へと変換させる能力を持つ遺伝子のゲノムワイドスクリーニングによる同定、第 34 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 13 日、横浜市
- ⑦ 西本正純、他 2 名、胚性幹細胞における時計遺伝子の転写とクロマチンの状態との関連について、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7 日、神戸市
- ⑧ 西本正純、他 8 名、胎盤を持つ哺乳類に特異的な遺伝子な一つである UTF1 遺伝子の胎盤形成における寄与、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 10 日、神戸市
- ⑨ 菱田友昭、西本正純、他 3 名 cMyc/Max 複合体は ES 細胞の LIF を介した自己複製および分化多能性維持に必須である、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 10 日、神戸市
- ⑩ 加門正義、西本正純、他 5 名、Establishment of partial iPS cells representing a novel intermediate state which are more advanced than those previously reported. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 10 日、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 正純 (NISHIMOTO MASAZUMI)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：00265406