

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15016

研究課題名(和文) Oct4陽性体細胞の可塑性を実証する

研究課題名(英文) Cellular plasticity of OCT4 expressing somatic cells

研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA, MITSUKO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50270476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 初期胚未分化全能性細胞やES, iPS細胞の未分化全能性維持に必須であるPOU5f1遺伝子が、出生後の体性組織にも機能している可能性がある。この遺伝子を発現する体細胞の可塑性を探求するために、発現細胞の細胞運命を解析できるシステムの構築を試みた。

さらに、この細胞ががんの発生に関与する可能性を検証した。この細胞の生理的意義や病理的意義を解明することは、体性組織の構築・維持のしくみや、がん・変性症などの疾患の理解につながることを期待できる。様々なヒトがん細胞株で発現するOCT4遺伝子の転写産物と翻訳産物の網羅的同定を実施した。正常組織由来の細胞ではそれらはほとんど発現していないことを確認した。

研究成果の概要(英文)： Oct4A, a POU-family transcription factor, is an indispensable and the preeminent pluripotency factor. However, whether Oct4 function in somatic tissues remains debated. Here we tried some useful systems to correctly understand somatic OCT4 gene function. Our findings open up the possibility again that OCT4 can be normal tissue stem cells and/or tumor initiating cells marker and could play a pivotal role in somatic tissues. In this study, we identified and characterized OCT4 transcripts and their translation products in human carcinoma cell lines.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 体性組織 多分化能 がん

1. 研究開始当初の背景

POU ファミリーに属する OCT4A(OCT3, OCT3/4A)は未分化全能性維持に必須の転写調節因子であり、iPS 細胞作製過程においても唯一不可欠因子として知られている。一方、本遺伝子には複数の transcript variants が存在するがその機能については不明な点が多い。我々は新生仔マウスの眼組織で variantB 型、C 型を発現する幹細胞を同定し報告した。他方、ヒト OCT4 の体細胞における発現の有無は解析上の問題から長年不明であったが、最近我々は特異的検出方法確立して精査した結果、ヒト体細胞での発現と既知および新規の多種類の transcript variants を同定した。

2. 研究の目的

マウスおよびヒトの体性組織で発現する POU5f1(OCT4) 遺伝子の機能解析と発現細胞の機能解明を行う。

3. 研究の方法

1) 様々な正常およびがん細胞での発現様式を明らかにし、コードするタンパク質の同定、機能解析、発現細胞の機能解明を実施する。  
2) 発現体細胞の分化多能性について細胞培養を実施して検討する

4. 研究成果

1) OCT4 発現細胞の系譜追跡用遺伝子コンストラクトの設計および作製：  
OCT4 は出生後も生殖細胞で発現することが知られている。発生後期から体細胞で発現する OCT4B および OCT4C を特異的に追跡（可視化や細胞死滅）するために、Cre-LoxP に加えて Flpe-FRT システムを併用できるコンストラクトを構築した。現在マウス positive control として F9(embryonal carcinoma)細胞に遺伝子導入し遺伝子が作動することを確認した。

2) 眼組織内に存在する OCT4variant 発現細胞の多能性の検証：

pOCT4-EGFP マウスを用いて眼組織内の発現細胞の同定、単離、培養を実施した。虹彩および網膜内に発現細胞が確認し、それらを FACS により分取・濃縮して培養すると、幹細胞の特徴を示すことが分かった。すなわち、自己増殖能と網膜特異的神経細胞への多分化能性を発揮することを確認した。より幅広い多分化能性についても現在検証を進めている。以上の結果から、体細胞での OCT4 variant の発現は細胞の可塑性を維持することに関与する可能性が初めて示唆された。OCT4 発現体細胞の性質を更に詳細に明らかにすることは、体性組織の構築・維持のしくみや様々な疾患発症機構の解明につながる

ことが期待される。

3) ヒトがん細胞株での発現解析：

ヒト体性組織がん由来の細胞株および正常成人体性組織由来細胞株を用いて発現様式について特異的プライマーを用いた RT-PCR 法を用いて解析した。多くのがん細胞株で複数の A 型および B 型 variant が転写されていることを確認した。一方正常組織由来の培養細胞ではほとんど発現は検出されなかった（図 1、学会および論文発表済）。

4) ヒト組織内で発現する OCT4 遺伝子の転写産物およびタンパク質の同定：

従来ヒト OCT4 遺伝子の転写産物は、A, B, B1 と 3 種類が論文上報告されている。その他にもデータベース上には複数の転写産物が登録されているが、その詳細は不明である。本研究では、ヒトがん細胞で発現する転写産物を網羅的に解析し、新規 variant を多種類同定した（特許出願済）。さらにそれらがコードするタンパク質について検証を行ったところ、複雑な翻訳制御機構の存在が明らかになった（図 2、論文発表済）。

これまでにヒト OCT4 遺伝子 variant がコードするタンパク質についての情報は非常に限られており不明な点が多く残っている。現在までのところ、ヒト OCT4 遺伝子に酷似した偽遺伝子がタンパク質を産生する可能性が指摘されており、それらを区別しうる特異的抗体はない。従ってこれまでの免疫抗体染色法による検出は不正確といえる。本研究では外来遺伝子を導入して Tag を付加した蛋白質を発現させ Tag に対する特異的抗体を用いることで染色および Western blot 法を実施した。

上記解析から、ヒト OCT4 遺伝子 variant が産生するタンパク質は主に 2 種類であることが判明した（論文発表済）。さらにこれまでに報告されていた CTG 開始コドンからの翻訳産物はみられず、CAP 依存的翻訳機構で 2 種類のアイソフォームタンパク質が産生されることが示唆された。

図 1 ヒト細胞株における OCT4 転写産物の同定

Cell line	clone #			total
	Oct4A	Oct4A1	Oct4A2	
MCF7	-	-	-	-
HeLa	14	1	0	15
Ishikawa	11	0	0	11
HEC265	17	6	0	23
HEC1	16	3	3	22
HEC50B	15	10	0	25
TTA1	-	-	-	-
A549	11	0	1	12
S2	-	-	-	-
PA1	22	0	0	22
HEK293T	16	0	0	16
ARPE-19	-	-	-	-
HFF	-	-	-	-
HUVEC	-	-	-	-
HAoSMC	-	-	-	-

Cell line	clone #					total
	Oct4B	Oct4B1	Oct4B2	Oct4B3	Oct4Bns	
MCF7	0	0	0	2	11	13
HeLa	5	1	2	0	2	10
Ishikawa	0	0	0	0	10	10
HEC265	3	8	0	3	5	19
HEC1	6	11	1	0	1	19
HEC50B	8	3	1	1	4	17
TTA1	0	0	0	0	14	14
A549	7	3	0	0	3	15
S2	0	0	0	0	15	13
PA1	4	4	1	2	9	20
HEK293T	0	0	0	0	12	12
ARPE-19	0	0	0	0	6	6
HFF	1	0	0	0	6	7
HUVEC	0	0	0	0	6	6
HAoSMC	-	-	-	-	-	-

多くのヒトがん細胞株で OCT4A OCT4Bv が発現しており、正常組織由来の細胞ではほとんど発現していないことが明らかとなった。下記の模式図は各バリエーションのエクソンを示す。下線は今回新規に同定されたバリエーションである。

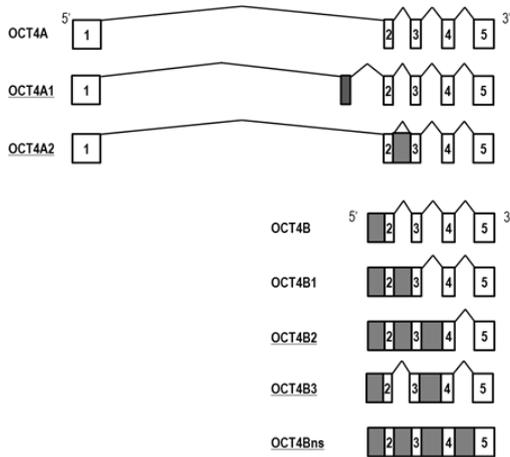
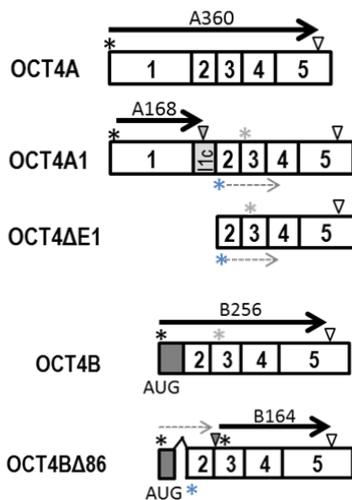


図2 ヒト細胞株における OCT4 翻訳産物の同定



FLAG タグを付加した各種バリエーションを強制発現させウエスタンブロットにて解析した。OCT4A バリエーションからは A360, A168 を、OCT4B バリエーションからは、B256 と B164(C型)の2種類が翻訳される事が示唆された。

### 5) ヒト OCT4 遺伝子がコードする 2 種類の

### アイソフォーム蛋白質の性状解析に向けた遺伝子材料の構築：

複数の Tag を N 末または C 末に付加した cDNA を強制発現させるベクターを各種構築した。またライプイメーキングに用いる EGFP 融合タンパク質を発現させるベクターも作製した。さらに機能解析するために突然変異を導入させた変異体について各種構築した。DNA シーケンスと培養細胞への導入実験から各コンストラクトの確認を完了している。得られた遺伝子材料は、今後体細胞における OCT4 の機能解明に向けて非常に有効に活用できるものである。

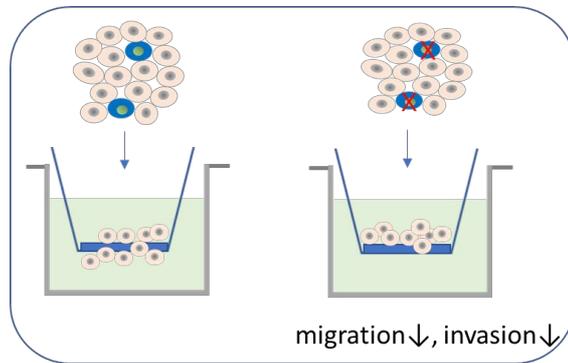
### 6) ヒト OCT4C タンパク質の腫瘍化活性

ヒト OCT4B 型バリエーションから産生される主たるタンパク質である B164(ヒト OCT4C タンパク質と名付けた)は、マウス OCT3/4C タンパク質と同様に、正常線維芽細胞に強制発現させることにより腫瘍化を誘導する活性をもつことを実証した(論文発表済)。また B265 はその腫瘍化活性を持たないことも明らかになった。

### 7) OCT4 発現がん細胞の可視化と機能解析

ヒト OCT4 遺伝子上流 5 kb の領域を用いて、発現細胞の可視化と特異的消滅効果を調査した。悪性度の高い HEC50B 細胞株では発現細胞の頻度は、数%程度存在し、分化度が高く悪性度の低い Ishikawa 細胞株ではほとんど存在しないことが明らかとなった。また悪性度の高い HEC50B 細胞株を用いて OCT4 発現細胞を特異的に死滅させると、がん細胞の移動能・浸潤能が顕著に低下したことから、OCT4 発現細胞はがん幹細胞自体ががん幹細胞の維持に参与する細胞である可能性が得られた(図3、論文発表済)。

図3 OCT4 発現がん細胞の特異的消滅効果



悪性度の高いがん細胞株中に含まれる OCT4 発現細胞を OCT4 発現制御領域を用いてジフテリア毒素を発現させることにより特異的に死滅させると、がん細胞集団の移動能・マトリゲル浸潤能が顕著に低下することが判明した。

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 1 件、掲載予定)

1) Miyamoto T\*, Mizuno N\*, Kosaka M#,

Fujitani Y, Ohno E, Ohtsuka A. 2018

*Stem Cells, in press.* (査読有り)

“Conclusive Evidence for OCT4 Transcription in Human Cancer Cell Lines: Possible Role of a Small OCT4-Positive Cancer Cell Population”

(\*equally contribution、# 責任著者) accepted for publication May 1, 2018; first published online in STEM CELLS EXPRESS 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.2851>

[学会発表](計 3 件)

小阪美津子, 大塚愛二

「体細胞分化と組織幹細胞：虹彩および網膜に存在する組織幹細胞の実態解明」  
第 122 回日本解剖学会総会・学術集会、シンポジウム企画および講演、2017 年 3 月 28 日、長崎大学医学部(長崎市)

上園深希, 戎井孝太, 水野伸彦,  
小阪美津子, 大塚愛二

「ヒト POU5F1 遺伝子 variant がコードする OCT4C タンパク質の特性」  
第 122 回日本解剖学会総会・学術集会、2017 年 3 月 28 日、長崎大学医学部(長崎市)

戎井孝太, 大前凌, 水野伸彦,  
小阪美津子, 大塚愛二

「ヒト Oct4 遺伝子と Oct4 偽遺伝子の機能的差異」  
第 71 回日本解剖学会中国・四国支部学術集会、2015 年 10 月 24 日、愛媛大学城北キャンパス 南加記念ホール(松山市)

[図書](計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小阪 美津子 (KOSAKA MITSUKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50270476

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

水野 伸彦 (MIZUNO NOBUHIKO)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：60462735