

機関番号： 34419
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20580316
 研究課題名（和文） マウス胚性幹細胞の分化制御におけるABCトランスポーター、
 Bcrp1の役割の解明
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms of ABC transporter, Bcrp1, on the regulation
 of differentiation in mouse embryonic stem cells
 研究代表者
 三谷 匡 (MITANI TASUKU)
 近畿大学・先端技術総合研究所・准教授
 研究者番号： 10322265

研究成果の概要（和文）：

幹細胞の分離・同定の指標の一つである side population 細胞（SP 細胞）をつくり出す ABC トランスポーターファミリー・Bcrp1 が ES 細胞の分化制御に果たす役割について検討した。その結果、(1) Bcrp1 mRNA アイソフォームの選択的発現とその発現制御、(2) Bcrp1 の過剰発現による Oct3/4 の発現亢進と内胚葉への分化誘導、(3) 癌抑制遺伝子産物との相互作用などについて新たな知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

This study examined the function of ABC transporter, Bcrp1, on the differentiation of mouse ES cells. Bcrp1 defines the side population cell phenotype, which indicates the presumptive functional regulator of stem cells. The results may be summarized as follows: (1) the alternative transcription of *Bcrp1* mRNA isoforms and analysis of the cis-element, (2) the upregulation of *Oct3/4* gene by *Bcrp1* overexpression and its induction of ES cells into endodermal cells, and (3) the possibility of Bcrp1 associating with the products of tumor suppressor gene with Bcrp1 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 農学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード： 発生工学、ES細胞、ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生命科学研究において、胚性幹細胞（ES細胞）を用いた遺伝子ターゲティング法や疾患モデルマウスからのES細胞の樹立は、標的遺伝子の機能解析や治療法の開発、発症メカニズムの解明において強力なツールとなっている。しかしながら、良好な状態のES細胞を評

価、選別する客観的指標は乏しく、ES細胞をより汎用性の高いツールとするためには、その分化制御メカニズムの全容を明らかにしていくことが重要である。その出発点ともいえる幹細胞の同定・分離法については、抗体を用いたフローサイトメトリー（FCM）による純化法が標準であるが、ユニークな方法として

DNA結合型蛍光色素Hoechst33342を用いたものがある (Goodell *et al.*, 1996)。この方法により分離される細胞集団は、FCM解析パターンからSide Population Cells (SP細胞) と称され、その性質は種や組織の枠を超えて、組織幹細胞としての特性を保持している。そして、ES細胞においてもSP細胞分画が存在し、SP細胞亜集団はnon-SP細胞亜集団と比較してキメラ個体への寄与率が著しく高い (Zhou *et al.*, 2001)。

このSP細胞におけるHoechst33342の排出を担う遺伝子として、ABCトランスポーターファミリーのひとつである*Bcrp1* (Breast cancer resistance protein 1) が同定された (Zhou *et al.*, 2001, 2002)。ABCトランスポーターファミリーは、膜タンパク質として様々な基質の排出を担っており、疾病やガンの多剤耐性とも密接に関係している。*Bcrp1*も抗ガン剤の細胞外への排出を担う分子のひとつであるが、造血幹細胞における*Bcrp1*の強制発現は、SP細胞の増加を促す一方で、分化に対しては抑制的に働くことや、急性骨髄性白血病では*Bcrp1*の発現が亢進していることなどの事実は、*Bcrp1*がガン細胞や幹細胞の未分化状態の維持機構や細胞分化において何らかの役割を果たしていることを示唆している。しかしながら、細胞膜上で基質を排出するトランスポーターが、どのようにして未分化状態の維持とのかについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

幹細胞の同定・分離と未分化性の維持機構は、これまで独立した研究として進められてきた。前者においては、造血幹細胞に代表される細胞表面抗原を指標とするフローサイトメトリーを駆使した分離と移植実験等による実証が中心であり、後者ではマウス ES細胞をモデルに転写因子群の探索とそれらの制御機構について研究されてきた。後者の転写因子群の研究では *Oct3/4* を中心とする *Nanog* (Mitsui *et al.*, 2003) 等との転写因子ネットワークについての解析が進んでいる。しかし、これらの転写因子群は未分化状態の維持に重要な役割を果たしているが、一方で多分化能を規定するものではないことは、*Oct3/4* の発現の増強、抑制ともに ES細胞を特定方向に分化させることから推察される (Niwa *et al.*, 2000)。この点に関して、前頁で述べたように、ES細胞集団中にはSP細胞集団が存在し、この細胞集団では高い分化能力が獲得されていることは注目される。そこで本研究では、SP細胞を特徴づける *Bcrp1* に着目した。*Bcrp1* は、細胞表面分子であることから、生細胞の状態で解析・細胞操作することが可能であり、さらに、幹細胞の同定・分離と未分化性の維持の評価を同時

に実行できる極めて有効なターゲット分子となりうることから、*Bcrp1* の未分化維持・分化制御機構における役割と関連分子の探索を行い、未分化細胞での *Bcrp1* の関与する分子ネットワークを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

最近、*Bcrp1*には3種類の第1エクソン (E1A, E1B, E1C) があり、組織によりスプライスバリエーションの発現パターンが異なることが報告されている (Zong *et al.*, 2006)。そして、申請者らはES細胞の体外分化誘導過程においてスプライスバリエーションの発現パターンが異なることも新たに見いだしている (基盤研究 (C) #18580283, 未発表)。そこで本研究では、*Bcrp1*過剰発現ES細胞、*Bcrp1*スプライスバリエーションノックダウンES細胞、さらにはGFP融合 *Bcrp1*タンパク質やタグを付加した *Bcrp1*タンパク質を発現させたES細胞を用いて、体外分化誘導、キメラ形成、プロモーター解析、Yeast-Two-Hybrid法、プロテオーム解析などを駆使し、*Bcrp1*の未分化維持・分化制御機構における役割と関連分子の探索を行い、未分化細胞での *Bcrp1* の関与する分子ネットワークを明らかにする。

(1) ES細胞における*Bcrp1*アイソフォームの発現解析

*Bcrp1*については当初ES細胞特異的な *Bcrp1* バリエーションの可能性についても想定していたが、近年、*Bcrp1*には3種類の第1エクソン (E1A, E1B, E1C) があり、組織によりスプライスバリエーションの発現パターンが異なることが報告された (Zong *et al.*, 2006)。これに基づき、申請者らはES細胞の体外分化誘導過程においてスプライスバリエーションの発現パターンが異なることを見出した。そこで、定量的PCRによる詳細な解析を行った。さらに、*Bcrp1*の転写制御領域についてはES細胞で特異的なスプライスバリエーションの第1エクソン (E1A) 上流領域について、レポーターアッセイによる解析を行うとともに、ES細胞の未分化環境、分化誘導環境で反応する転写調節について検討した。

(2) ES細胞の分化過程における*Bcrp1*過剰発現の影響

Bcrp1 過剰発現ES細胞ならびに各スプライスバリエーションに対する shRNA 発現ベクターを導入したノックダウンした ES細胞を作製し、これらの *Bcrp1* 発現制御 ES細胞レポーターを用いて体外で分化誘導を行い、未分化状態や分化段階の指標となるマーカー遺伝子の動態について解析した。ES細胞の体外分化誘導は、レチノイン酸添加培地中でハンギングドロップ法による分化誘導後、平面培養を継続し、経時的にサンプリングを行い、RT-PCR、qRT-PCR、ウエスタンブロット解析を行

った。

(3) ES細胞におけるBcrp1と相互作用する分子の探索

ES細胞に発現するBcrp1の細胞内局在や活性は、幹細胞の未分化状態の維持に関係する何らかの制御を受けていると考えられる。そこで、酵母ツーハイブリット法を用いて、マウスES細胞においてBcrp1と結合し、直接その制御に関わるタンパク質について探索した。また、Bcrp1は細胞外ループ領域が極めて小さいため、細胞外領域認識抗体を作製することが困難であった。そこで、生細胞でのBcrp1の動態について解析するため、Bcrp1/GFP融合タンパク質発現ES細胞の作製を行った。

(4) ES細胞の分化過程における遺伝子座の核内配置の動態の解析

本研究において、Bcrp1の過剰発現が*Oct3/4*の発現を亢進することを見出した。近年、ES細胞や初期胚においては、細胞核内高次構造のダイナミックな変化がゲノムワイドな転写制御に大きく関わるということが明らかにされてきたことから、細胞核内染色体テリトリーと遺伝子座の動態について3D-FISH法による解析を行った。ES細胞の分化誘導には、肝様細胞への分化誘導系(Teratani *et al.*, 2005)を適用し、分化過程に伴う未分化特異的転写因子*Oct3/4*と肝細胞特異的遺伝子*Tdo2*およびそれぞれの遺伝子が存在する染色体(第17番および第3番染色体)が形成する染色体テリトリーの核内動態を3D-FISH法を用いて解析した。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) ES細胞におけるBcrp1アイソフォームの発現解析

基盤研究(C) #18580283で明らかにしたES細胞におけるBcrp1 mRNAアイソフォーム(A, B, C)の発現プロファイルについて、さらにリアルタイムPCR解析により解析した結果、アイソフォームAの発現が最も高く、続いてアイソフォームBの発現がみられ、一方、アイソフォームCについてはほとんど発現がみられないことが明らかとなった。そこで、ES細胞におけるBcrp1 mRNAアイソフォームAについて、発現制御領域の解析を行った。Bcrp1 mRNAアイソフォームAの上流領域を用いてルシフェラーゼ活性によるレポーターアッセイを行った結果、アイソフォームAの上流約1.5kbの転写活性は、胎子線維芽細胞に比べES細胞で著しく高く、さらに1kb以内に発現を大きく促進・抑制する領域を数カ所見出した。その中で、転写促進に関わると推測されるいくつかの転写因子結合モチーフに対し部位特異的突然変異導入により解析した結果、未分化ES細胞での同アイソフォー

ムの発現に強く関わる転写因子を同定した。一例として、c-MycならびにRFX2結合モチーフ領域が同アイソフォームの転写を大きく促進する可能性が示された。

(2) ES細胞の分化過程におけるBcrp1過剰発現の影響

Bcrp1過剰発現ES細胞を作製し、体外分化誘導過程における分化関連遺伝子の発現の変動を解析した。Bcrp1タンパク質が、約3倍、約2.5倍過剰発現する株が得られ、それぞれにおいて、Oct3/4タンパク質も約3倍増加していた。これらの細胞株を用いて分化誘導を行ったところ、形態的に野生型より分化の進行が早く、Oct3/4過剰発現ES細胞においてみられる内胚葉系譜への分化促進と同様の現象がみられた。さらに、分化誘導過程における分化関連因子およびBcrp1アイソフォームの発現を検討した結果、RT-PCRでは*Oct3/4*、*Nanog*などの未分化維持に関わる因子の発現が持続する一方で、いくつかの分化関連因子の発現が遅延し、特に中胚葉、内胚葉系の分化マーカー遺伝子の発現が大きく遅れるとともに、発現が著しく低下する傾向がみられた。qRT-PCRによりさらに詳細な解析を行った結果、*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2*など未分化関連遺伝子の発現が高く、分化誘導過程後半においても減少しながらも維持される傾向があった。また、内胚葉系譜分化関連遺伝子、特にAFPの発現が野生型よりも強い傾向がみられた。これらのことから、外来Bcrp1の過剰発現により、内在性のBcrp1の発現自身も亢進されることが示された。さらに*Oct3/4*の発現が亢進され、その結果、内胚葉細胞系譜で特徴的なAFPの発現が誘導されるとともに形態的にもES細胞が内胚葉系の細胞へと分化する可能性が示された。

これらの結果は、これまで組織幹細胞においては、Bcrp1を過剰に発現させることで分化抑制の傾向が報告されてきたが、ES細胞においてはBcrp1を過剰発現することでOct3/4のup regulationが生じ、その結果、ある一定の発現レベルを超えると間接的に分化を誘導する可能性を示している。

(3) ES細胞におけるBcrp1と相互作用する分子の探索

ES細胞に発現するBcrp1の細胞内局在や活性は、幹細胞の未分化状態の維持に関係する何らかの制御を受けていると考えた。そこで、酵母ツーハイブリット法を用いて、マウスES細胞においてBcrp1と結合し、直接その制御に関わるタンパク質について探索した。その結果、ガン抑制遺伝子産物であるセリン・スレオニンキナーゼLkb1がBcrp1と結合していることが示唆された。また、Lkb1は未分化状態のマウスES細胞において強く発現している一方で、ES細胞を分化誘導すると発現が急速に消失することを明らかにした。

(4) ES細胞の分化過程における遺伝子座の核内配置の動態の解析

分化に伴う両遺伝子と染色体テリトリーとの位置関係について、分化に伴い *Oct3/4* 遺伝子座については染色体テリトリーの内側に局在する傾向を示したのに対し、*Tdo2* では、分化に伴い染色体テリトリーの辺縁部に移動し、一部では大きくループアウトするなどの傾向が認められ、転写活性との関連性が考えられた。その中で、細胞核高次構造の機能に着目し、染色体テリトリー内において未分化マーカーである *Oct3/4* 遺伝子座の移動はほとんどなく、一方で肝分化マーカーである *Tdo2* 遺伝子座では、分化に伴うループアウト現象が観察させるなど、クロマチン・染色体レベルでの遺伝子発現制御に関する解析モデルを確立した。

今後、ES細胞の分化制御機構における *Bcrp1* の機能を明らかにしていくことにより、

(1) *Bcrp1* を指標とすることにより多分化能の高いES細胞の獲得手法が確立されれば、遺伝子改変マウスの作製や特定の系統からのES細胞株の樹立において大きく貢献する波及効果の高い研究となるものと期待される。(2) ABCトランスポーターが未分化性の維持あるいは多分化能の獲得においてどのように関与しているのかを明らかにすることは、細胞の分化制御機構でこれまで考えられなかった新しい経路を提示する可能性があり、再生医学やガン研究の分野において新たな局面をもたらすことが期待される。(3) 現時点で遺伝子改変動物が汎用ツールとして利用しうるのは未だマウスのみであるが、*Bcrp1* による幹細胞の未分化性や多分化能に関する機能評価が種や組織を超えて適用可能となれば、マウス以外の動物種への様々な応用展開も期待される。

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6件)

- ① Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Human Gene Therapy* 22, 27-34, 2011. (査読有)
- ② Onodera Y, Teramura T, Ozawa M, Takehara T, Mitani T, Anzai M, Sagawa N, Hamanishi C, Hosoi Y, Fukuda K. Differentiation diversity of mouse parthenogenetic embryonic stem cells in chimeric mice. *Theriogenology* 74, 135-145, 2010. (査読有)
- ③ Teramura T, Onodera Y, Murakami H, Ito

S, Mihara T, Takehara T, Kato H, Mitani T, Anzai M, Matsumoto K, Saeki K, Fukuda K, Sagawa N, Hosoi Y. Mouse androgenetic embryonic stem cells differentiated to multiple cell lineages in three embryonic germ layers in vitro. *J. Reprod Dev.* 55 : 283-92, 2009. (査読有)

- ④ Kawasumi M, Unno Y, Matsuoka T, Nishiwaki M, Anzai M, Amano T, Mitani T, Kato H, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Kishigami S, Matsumoto K. Abnormal DNA methylation of the Oct-4 enhancer region in cloned mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 76, 342-350, 2009. (査読有)
- ⑤ 小野寺勇太, 寺村岳士, 竹原俊幸, 村上秀樹, 小澤まどか, 武内大輝, 安齋政幸, 加藤博己, 三谷匡, 松本和也, 佐伯和弘, 入谷明, 佐川典正, 細井美彦. 単為発生胚・雄性発生胚由来胚性幹細胞からの機能的な細胞の分化誘導と解析. *Mem. Inst. Adv. Technol., Kinki Univ.* 13, 9-19, 2008. (査読無)
- ⑥ 川村紘子, 網本直記, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 入谷明, 三谷匡. マウス胚性幹細胞における *Bcrp1* mRNAアイソフォームの発現. *Mem. Inst. Adv. Technol., Kinki Univ.* 13, 29-40, 2008. (査読無)

[学会発表] (計16件)

- ① 西山有依, 川口翔, 平野大起, 森木甲子郎, 藤本佑希, 細井美彦, 田辺秀之, 三谷匡. マウス胚性幹細胞の分化誘導過程における細胞核染色体テリトリーと遺伝子座の動態. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月7-10日.
- ② 平野大起, 川村紘子, 西村友位, 佐伯慧太, 安齋政幸, 加藤博己, 田口善智, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. マウス胚性幹細胞におけるABCトランスポーター・*Bcrp1* mRNAアイソフォームAの転写調節領域の解析. 第33回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010年12月7-10日.
- ③ 野老美紀子, 川澄みゆり, 永井宏平, 池上春香, 申承旭, 西川慧, 畑中勇輝, 西原卓志, 天野朋子, 三谷匡, 加藤博己, 安齋政幸, 岸上哲士, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明, 松本和也. マウス初期胚における発生制御タンパク質の解析. 第103回日本繁殖生物学会大会, 十和田, 2010年9月2-4日.
- ④ 西山有依, 森木甲子郎, 藤本佑希, 安齋政幸, 加藤博己, 松本和也, 佐伯和弘, 入谷明, 細井美彦, 田辺秀之, 三谷匡. マウス胚性幹細胞の分化過程における細胞核染色体テリトリーと遺伝子座の動態.

- 第28回日本受精着床学会総会, 横浜, 2010年7月27-29日.
- ⑤ 西山有依, 森木甲子郎, 森田真裕, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 原田昌彦, 三谷匡. Expression of the components of chromatin remodeling factor SWR1 complex in mouse somatic nuclear transfer eggs. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
- ⑥ 森木甲子郎, 西山有依, 川村紘子, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 原田昌彦, 入谷明, 三谷匡. Dynamics of Arp family proteins and components of chromatin remodeling complexes in in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
- ⑦ 川村紘子, 川合智子, 森木甲子郎, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. Effects of ABC transporter, *Bcrp1*, on in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月9日-12日.
- ⑧ 川村紘子, 川合智子, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 三谷匡, 入谷明. マウスES細胞の未分化維持機構においてABCトランスポーター*Bcrp1*が与える影響. 第102回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 2009年9月10日-12日.
- ⑨ 野老美紀子, 川澄みゆり, 永井宏平, 池上春香, 申承旭, 西川慧, 李香欣, 畑中勇輝, 天野朋子, 三谷匡, 加藤博己, 安齋政幸, 岸上哲士, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明, 松本和也. プロテオミクスを用いたマウス初期胚における発生関連タンパク質の解析. 第102回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 2009年9月10日-12日.
- ⑩ 川村紘子, 川合智子, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 三谷匡, 入谷明. マウスES細胞の未分化維持機構においてABCトランスポーター*Bcrp1*が与える影響. 第27回日本受精着床学会総会, 京都, 2009年8月6-7日.
- ⑪ 川村紘子, 網本直記, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. マウスES細胞分化誘導過程におけるABCトランスポーター *Bcrp1* アイソフォームの発現様式およびRNAiによるアイソフォームAノックダウンES細胞樹立の試み. 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008年12月9-12日.
- ⑫ 野老美紀子, 川澄みゆり, 永井宏平, 池上春香, 佐藤学, 申承旭, 西川慧, 清水なつみ, 天野朋子, 三谷匡, 加藤博己, 安齋政幸, 岸上哲士, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明, 松本和也. マウス着床前期胚における大規模プロテオーム解析. 第31回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008年12月9-12日.
- ⑬ 野老美紀子, 川澄みゆり, 永井宏平, 池上春香, 佐藤学, 申承旭, 西川慧, 清水なつみ, 天野朋子, 三谷匡, 加藤博己, 安齋政幸, 岸上哲士, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明, 松本和也. マウス着床前期胚における大規模プロテオーム解析. 第101回日本繁殖生物学会大会, 福岡, 2008年9月18-20日.
- ⑭ 川村紘子, 網本直記, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. マウスES細胞の分化誘導過程におけるABCトランスポーター *Bcrp1* アイソフォームの発現様式. 第26回日本受精着床学会総会, 福岡, 2008年8月28-29日.
- ⑮ Mitani T. Differentiation of mouse ES cells to hepatocytes and its application. Recent Advance of Embryonic and Somatic Stem Cells in Biomedical Science Workshop. July 28-29, 2008, Bangkok, Thailand (Invited Speaker)
- ⑯ Kawamura H, Amimoto N, Moriki K, Morita M, Anzai M, Kato H, Hosoi Y, Iritani A, Mitani T. Expression of *Bcrp1* mRNA isoforms during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28 - 30, 2008, Tokushima, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://rais.itp.kindai.ac.jp/researchdb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 匡 (MITANI TASUKU)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：10322265

(2) 研究分担者

佐伯 和弘 (SAEKI KAZUHIRO)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：10298937

松本 和也 (MATSUMOTO KAZUYA)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：20298938

田口 善智 (TAGUCHI YOSHITOMO)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：70309269