

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770242

研究課題名(和文)

多能性幹細胞および組織幹細胞における nucleostemin の機能解析

研究課題名(英文)

Functional analysis of nucleostemin in pluripotent stem and tissue stem cells

研究代表者

永松 剛 (NAGAMATSU GO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70453545

研究成果の概要(和文): 二回の連続したターゲティングによってコンディショナルノックアウト ES 細胞の作製に成功した。この細胞を用いて Nucleostemin を ES 細胞で欠損させることにより増殖の停止と細胞死が誘導されることを見出した。また、ES 細胞の未分化性の維持に重要な働きをしている Oct3/4, Nanog, Sox2 といった遺伝子の発現が Nucleostemin 欠損に伴い減少することを明らかにした。このことから Nucleostemin が上記の未分化性維持にかかわる因子の発現を誘導あるいは維持している可能性が示唆される。このことに関して強制発現系をもちいて検証したところ、Nucleostemin に未分化性に関わる遺伝子の発現を誘導する活性があることを示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文): We succeeded in making the conditional Nucleostemin deficient embryonic stem cells by a consecutive targeting of two times. Upon deletion of Nucleostemin allele, stop of proliferation and cell death had found. Moreover, it was clarified that the genes that did an important working to the maintenance of the undifferentiation of the embryonic stem cell, such as Oct3/4, Nanog, and Sox2 decreased along with the Nucleostemin loss. The possibility of the inducement or maintaining of the factors that Nucleostemin is related to the above mentioned undifferentiated maintenance is suggested from this. On the other hand when Nucleostemin was over expressed, the up-regulation of pluripotency associated genes was observed.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：幹細胞・自己複製

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに雄生殖幹細胞の未分化性の維持にかかわる分子機構の同定を試み

てきた(Nagamatsu G et.al. Mol Cell Biol 2006)。その一連の試みの中で新生児期精巣における幹細胞活性の高い細胞集団で

nucleostemin が強く発現していることを見出した(Ohmura M et.al.Arch Histol Cytol 2004)。nucleostemin は 2002 年に McKay らによってラットの神経幹細胞で同定された分子であり、幹細胞と腫瘍化した細胞で強い発現の見られることが知られている。当研究室に在籍していた平尾敦 (現金沢大学教授)らにより作成された nucleostemin 発現制御下に GFP を発現するトランスジェニックマウスの解析から、生体内のさまざまな組織において幹細胞で GFP の発現が確認でき、nucleostemin がひろく組織幹細胞で発現する共通の分子であることが明らかとなった。さらに多能性幹細胞である ES 細胞でも nucleostemin の発現が認められる。また、その機能について、nucleostemin は核小体の内外を行き来し、p53 と結合してその機能を抑制することで細胞周期やアポトーシスを制御していると考えられている。2006 年には二つのグループから同時にノックアウトマウスの報告がなされた。その報告によると nucleostemin を欠損した個体は胎生 3.5 日という初期の発生段階で桑実胚から胚盤胞の形成が不全となり胎生致死となる。この原因も細胞増殖の障害にあると考えられている。このように nucleostemin はユニークな発現パターンを示すこと、細胞増殖やアポトーシスに密接にかかわること、から幹細胞において重要な働きをしていることが推測される。しかし、ノックアウトマウスは早期の胎生致死であり、成体の組織幹細胞における解析および分子メカニズムの解明には至っていない。そこで申請者はコンディショナルノックアウトマウスを作成し生体組織幹細胞における nucleostemin の機能解析を行う。また、nucleostemin は核小体にも局在する分子であることから核小体の機能との関係を解析する。核小体の機能と幹細胞とのかわ

りを解析した報告としては、近年 trophoblast stem cell において Hand1 が核小体に局在することが未分化性の維持に働き、リン酸化により核小体から放出されると giant cell に分化していくことが報告された<sup>4)</sup>。従来核小体はリボソーム合成の場としての機能が明らかになってきたが、この報告のように分子の極在により働きを変化させる場としても働いていることが示唆されてきている。nucleostemin も核小体内外をシャトルすることが知られており、細胞の分化と極在、さらにはそれぞれの場における機能を明らかにしていく。

## 2. 研究の目的

生体内ではさまざまな組織に幹細胞が存在し、新たな細胞を供給し続けることによって恒常性の維持が行われている。幹細胞は自己複製と未分化性の維持といった共通の特徴を持っていることから、各組織幹細胞間で共通の分子メカニズムの存在が示唆されている。そこで、様々な組織幹細胞で強い発現の見られる nucleostemin(NS)に着目し、その機能の解析を通して組織幹細胞間で共通の分子基盤を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ES 細胞とマウスを用いて幹細胞における nucleostemin の機能を明らかにする。そのために nucleostemin コンディショナルノックアウト ES 細胞およびマウスを使用する。ES 細胞において分子基盤の理解を進め、その知見を雄生殖幹細胞に対比させることで生体内組織幹細胞における役割を明らかにする。そして造血幹細胞での機能を解析することで組織幹細胞間での共通のメカニズムの存在を明らかにする。ES 細胞、雄生殖幹細胞、造血幹細胞の 3 者を用いることで

nucleostemin の作用の分子機構、生体内での機能、そして組織幹細胞間における共通性、の3点を明らかにする。

#### (1) マウスを用いた解析

nucleostemin flox のヘテロマウスはES細胞でターゲティング時にセレクションで用いた薬剤耐性遺伝子を残す3loxマウスである。そこで、薬剤耐性遺伝子の部分を欠損させた2loxのマウスを得るため、胎生初期に一過性にCreを発現するEIIa-Creマウスと掛け合わせる。そしてNS3loxとEIIa-Creの交配により得られるF1マウスと野生型マウスの交配からNS2loxヘテロマウスを得る。このヘテロマウスとNgn3-Cre, Mx-Cre, それぞれのマウスと交配し、特異的に発現するCre遺伝子を導入する。

#### (2) ES細胞を用いた解析

Nucleostemin を ES 細胞で欠損させることにより増殖の停止と細胞死が誘導されることを確認しており、その作用がどのようなメカニズムによるものかを p57 や p21 といった CDK inhibitor の発現や、Bax や puma といったアポトーシス関連遺伝子の発現の変化から解析する。また、他の細胞種では p53 の影響が示唆されており、ES細胞においてP53のノックダウンにより細胞死がレスキューされないか検討する。一方で、ES細胞の未分化性の維持に重要な働きをしているOct3/4, nanog, sox2 といった遺伝子や、三胚葉のマーカー遺伝子についても nucleostemin の欠損による発現の変化を調べES細胞の未分化性や分化とのかかわりを明らかにする。

#### 4. 研究成果

Nucleostemin遺伝子を誘導性に欠損させるこ

とのできるNucleosteminコンディショナルノックアウトマウス、およびコンディショナルノックアウトES細胞を作成して、その機能解析を行った。

二回の連続したターゲティングによってコンディショナルノックアウトES細胞の作製に成功した。この細胞を用いてNucleosteminをES細胞で欠損させることにより増殖の停止と細胞死が誘導されることを見出した。また、ES細胞の未分化性の維持に重要な働きをしているOct3/4, Nanog, Sox2といった遺伝子の発現がNucleostemin欠損に伴い減少することを明らかにした。このことからNucleosteminが上記の未分化性維持にかかわる因子の発現を誘導あるいは維持している可能性が示唆される。このことに関して強制発現系をもちいて検証したところ、Nucleosteminに未分化性に関わる遺伝子の発現を誘導する活性があることを示唆する結果を得た。

#### 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2件)

(1) A germ cell specific gene, Prmt5 works as somatic cell reprogramming  
Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T.  
J Biol Chem.  
2011, 286(12), 10641-8  
査読有

(2) Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) deficiency decreases reprogramming efficiency and leads to genomic instability in iPS cells.  
Kinoshita T, Nagamatsu G, Kosaka T, Takubo K, Hotta A, Ellis J, Suda T.  
Biochem Biophys Res Commun.  
2011, 407(2), 321-6  
査読有

[学会発表](計1件)

始原生殖細胞からの多能性幹細胞分化  
永松剛・小坂威雄・田久保圭誉・大家基嗣・

須田年生  
第10回 日本再生医療学会総会  
2011年3月2日  
京王プラザホテル(新宿)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永松 剛 (NAGAMATSU GO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 70453545

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし