

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450460

研究課題名(和文) マウス ES 細胞の酸化ストレス応答における ABC トランスポーター・Bcrp1 の役割

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of ABC transporter, Bcrp1, in the oxidative stress response 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・教授

研究者番号：10322265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円

研究成果の概要(和文)：幹細胞の指標の一つである side population (SP) 細胞をつくり出す責任分子 ABC トランスポーター・Bcrp1 (ABCG2) が ES 細胞における酸化ストレス応答で果たす役割について検討した。その結果、(1) ES 細胞特異的な Bcrp1 mRNA アイソフォームの転写活性化因子、(2) ES 細胞での Bcrp1 発現による SP 細胞亜集団の生成、(3) 酸化ストレスに対する Bcrp1 の発現誘導と未分化維持、(4) 3D-FISH による初期胚と ES 細胞における核内クロマチン構造の視覚化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)：ABC transporter, Bcrp1, defines the side population (SP) cell phenotype and seems presumptive functional regulator of stem cells. This study examined the function of Bcrp1 on the oxidative stress response of mouse ES cells. The results are summarized as follows: (1) transcriptional activator of Bcrp1 mRNA isoform specific to ES cells, (2) generation of SP cell subpopulation induced by Bcrp1 expression in ES cells, (3) induction of Bcrp1 expression and maintenance of pluripotent status by the oxidative stress response, and (4) visualization of the spatial arrangement of nuclear organization using 3D-FISH in early mouse embryos and ES cells.

研究分野：農学

キーワード：ES細胞 ABCトランスポーター 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

ES細胞は、iPS細胞が出現した現在でも、幹細胞の中心的モデルとして遺伝子の機能解析、疾患の発症メカニズムの解明と治療法の開発、再生医療への展開などの強力なツールとなっている。しかしながら、ES細胞を良好な状態に保つための生理的な調節機構についての理解は未だに乏しい。Side Population細胞(SP細胞)(Goodell *et al.*, 1996)は、蛍光色素 Hoechst 33342 の排出により識別され、種を超え、また組織を超えて組織幹細胞中に保持されている幹細胞としてユニークな特徴をもった細胞である。さらに、ES細胞においてもSP細胞亜集団が存在し、非SP細胞亜集団と比較してキメラマウスへの寄与率が高い(70~80% vs 1~5%)(Zhou *et al.*, 2001)などの特徴を示す。このSP細胞におけるHoechst 33342 排出の責任分子がABCトランスポーターファミリーに属する *Bcrp1* (Breast cancer resistance protein 1) (ABCG2)である(Zhou *et al.*, 2001)。ES細胞では、他のABCトランスポーターとしてMDR1a/1bなども発現しているが、SP細胞の生成は *Bcrp1* に依存する(Zhou *et al.*, 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多様な基質を排出しており、様々な疾病やガンの多剤耐性とも密接に関与している。その中でも、*Bcrp1* は抗がん剤の排出を担う分子のひとつである一方で、SP細胞を特徴づける分子でもある。そして、急性骨髄性白血病では *Bcrp1* の発現が亢進していることや、造血幹細胞における *Bcrp1* の過剰発現は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などの事実は、*Bcrp1* ががん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。細胞表面で基質を排出するトランスポーターが、未分化状態の維持という極めて重要な細胞特性にどのように関与しているのかについてはほとんど明らかにされていない。しかし、最近、*Bcrp1* が酸化ストレスによって生じる活性酸素種(ROS)に対する抗酸化応答により細胞内のレドックスバランスに関与していることが明らかになってきた(Singh *et al.*, 2010)。

2. 研究の目的

幹細胞の分離・同定の指標の一つであるSP細胞はマウスES細胞においても亜集団として存在し、高いキメラ形成能を発揮する。本申請では、SP細胞を作り出すABCトランスポーター・*Bcrp1* に着目し、幹細胞の維持に果たす役割について検討する。従来の転写因子やシグナル伝達のネットワークは、幹細胞の分化状態を表す指標として有効であるが、幹細胞のクオリティの評価は困難である。*Bcrp1* は酸化ストレス応答に関わることなどが明らかになりつつあり、*Bcrp1* の発現誘導条件と生理的機能は幹細胞の品質管理や分

化制御に関与していることが推測される。本研究は、幹細胞やがん細胞の細胞生理学に大きな知見をもたらし、近年注目される“毒性因子であるとともにシグナル因子でもある活性酸素種(ROS)”の幹細胞での役割について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

幹細胞であるES細胞においても、SP細胞と非SP細胞の亜集団が生成する。そこでまず、ES細胞における *Bcrp1* および *c-Myc* の発現動態ならびに *Bcrp1* の局在制御について基礎的情報を収集する。*Bcrp1* の酸化ストレス応答機構については、ES細胞の H_2O_2 曝露による解析を中心に行う。 H_2O_2 曝露下において、*c-Myc* の応答経路、*Bcrp1* スプライスバリエーションの発現動態、*Bcrp1* タンパク質の生成について検討する。また、ES細胞の分化過程における *Bcrp1* の影響について、体外分化誘導過程における *Bcrp1* と分化関連遺伝子の発現動態について解析を行う。さらに、申請者らはES細胞における *Bcrp1* の過剰発現により *Oct3/4* の発現亢進を認め、また、ES細胞の体外分化誘導過程におけるクロマチンの空間構造配置の変換を3D-FISH解析により見出している(基盤研究(C) #20580316)。そこで、ES細胞とその起源となる未分化細胞である初期胚とのクロマチンの空間構造配置の比較を行う。本研究により、*Bcrp1* による幹細胞の品質管理機構や分化スイッチについての新領域の開拓をめざす。

(1) ES細胞における *Bcrp1* の発現及び局在の制御機構

ES細胞(129/Ola系E14Tg2a株)で特異的に発現する *Bcrp1* mRNA アイソフォームAの発現制御について、申請者らが見出した *c-Myc* について、ES細胞ならびに胎子線維芽細胞を用いて免疫組織化学ならびにChIPアッセイにより検討した。さらに、*c-Myc* siRNAノックダウンによる *Bcrp1* の発現解析を行った。また、*Bcrp1* タンパク質の細胞内局在のAkt/PTEN経路による制御について、PI3K阻害剤であるLY294002およびWartmanninを用いて、免疫組織化学ならびにウェスタンブロット解析による検討を行った。

(2) SP細胞と非SP細胞亜集団における *Bcrp1* および *c-Myc* の発現動態

ES細胞からフローサイトメーターを用いてSP細胞画分と非SP細胞画分を分取し、*Bcrp1* mRNA アイソフォーム及び *c-Myc* の発現をqRT-PCRにより解析した。また、ES細胞におけるSP細胞生成の責任分子について、*Bcrp1* 特異的阻害剤・Fumitremorgin C (FTC)処理による検討を行った。

(3) 野生型ES細胞における H_2O_2 曝露後の *Bcrp1* および *c-Myc* の発現動態

ES細胞を H_2O_2 (100 μ M ~ 1 mM)曝露後、経時的にサンプリングを行った。Total *Bcrp1* mRNA、*Bcrp1* mRNA アイソフォームA/B/C、*c-Myc* についてRT-PCR解析を、

Bcrp1、c-Myc およびリン酸化 c-Myc についてウェスタンブロット解析を行った。さらに、H₂O₂ 曝露後の SP 細胞における Bcrp1 による酸化ストレス応答制御に焦点を当て、FTC ならびに N-acetyl-L-cysteine (NAC) の添加による未分化関連因子の発現への影響について検討した。

(4) ES 細胞の分化過程における Bcrp1 の動態

野生型 ES 細胞および Bcrp1 過剰発現 ES 細胞を用いて体外分化誘導を行い、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、平面培養による継続培養により行い、経時的に回収したサンプルについて RT-PCR、qRT-PCR、ウェスタンブロット解析を行った。

(5) ES 細胞と初期胚における細胞核内クロマチン構造の 3D-FISH 解析

マウス初期胚、ES 細胞及び線維芽細胞を用いて、体細胞ではクロマチンが凝縮しゲノム発現がサイレントなクロモセーターを形成するが、受精卵では胚性ゲノム活性化(Zygotic genome activation; ZGA)の過程でクロマチンが弛緩するセントロメア近傍領域、ZGA 関連遺伝子座(*Zscan4*)、*Zscan4* がマップされる 7 番染色体テリトリー(CT7)について、それぞれの蛍光標識 DNA プロブを作製し、3D-FISH を行った。標本は共焦点レーザー顕微鏡で画像を取得した。画像の重ね合わせは Carl Zeiss Zen lite 2012、3 次元画像の構築は Amira 3.1.1.TGS にて行い、染色体テリトリーの体積の測定は Imaris 7.4.2 software により行った。

4. 研究成果

(1) ES 細胞における Bcrp1 の発現及び局在の制御機構

免疫組織化学的解析により、ES 細胞において c-Myc が強く発現していること、そして核内に局在していることを認めた。さらに、ChIP アッセイにより、ES 細胞における *Bcrp1* E1A 上流領域に位置している c-Myc 結合モチーフにおいて、c-Myc が結合することが示された。また、siRNA による c-Myc のノックダウンを行った結果、アイソフォーム A の発現が低下した。これらのことから、マウス ES 細胞において、*Bcrp1* mRNA アイソフォーム A の転写活性化には c-Myc が関与していることが示された。

Bcrp1 タンパク質の細胞内局在の Akt/PTEEN 経路による制御について、PI3K 阻害剤である LY294002 および Wartmannin 処理による検討を行った。ウェスタンブロット解析の結果、LY294002 処理および Wartmannin 処理により、Akt のリン酸化レベルが低下していることが示された。また、免疫組織化学的解析により、LY294002 処理および Wartmannin 処理した ES 細胞において *Bcrp1* の局在が細胞膜から細胞質内へ移行

すること、LY294002 処理区では、回復培養により可逆的に *Bcrp1* が細胞膜に移行するものの、Wartmannin 処理区では、回復培養後も不可逆的であることが示された。これらの結果により、ES 細胞において Akt/PI3K 経路が *Bcrp1* の細胞膜への局在制御に関わることが示唆された。

(2) SP 細胞と非 SP 細胞亜集団における Bcrp1 および c-Myc の発現動態

ES 細胞を用いて、SP 分画および非 SP 分画から細胞を回収し、qRT-PCR 解析により SP 分画の細胞の特性について評価した。SP 細胞の検出には、Hoechst33342 (5 μ g/ml) で染色後、フローサイトメトリー解析を行った。さらに、Hoechst33342 に加えて *Bcrp1* 特異的阻害剤である FTC (1 μ M) 処理区を設けた。その結果、ES 細胞においても *Bcrp1* を介した SP 分画の生成が示され、SP 細胞では *Bcrp1* の発現量が有意に高いことが示された。次に、*Bcrp1* の各アイソフォームの発現を検討した。その結果、SP 細胞においてアイソフォーム A の発現が有意に高いことが示された。一方で、アイソフォーム B については差がみられなかった。また、アイソフォーム C は発現量としては極めて低いことから SP 細胞との関係は低いと考えられた。そこで、アイソフォーム A に着目し、アイソフォーム A の転写誘導因子として見出した c-Myc について解析を行った。その結果、SP 細胞において c-Myc の発現は有意に高く、アイソフォーム A と正に相関していることが示された。一方、*Nanog* の発現には差がみられなかったことから、SP 細胞の特性は *Nanog* に非依存的なメカニズムで制御されている可能性が示唆された。

また、SP 細胞亜集団は FTC により消失したことから、ES 細胞における SP 細胞亜集団は *Bcrp1* 依存的に生成することが示された。さらに、*Sox2* の発現は SP 細胞亜集団で有意に高かったが、*Oct3/4*、*Nanog* については有意な差は認められなかった。また、SP 細胞の生成には関与しない、異なる ABC トランスポーターである *Mdr1* や *Mrp1* の発現についても高い傾向がみられた。これらの結果から、ES 細胞における SP 細胞亜集団の生成因子が *Bcrp1* であり、その発現を c-Myc が制御していることが示された。

(3) ES 細胞における H₂O₂ 曝露後の Bcrp1 および c-Myc の発現動態

ES 細胞における H₂O₂ 曝露後 1 時間以内の初期応答について検討した結果、*Bcrp1* (total mRNA) の発現量が増加し、すべてのアイソフォームで発現上昇がみられた。一方、c-Myc については発現量に顕著な差はみられなかった。ウェスタンブロット解析の結果、*Bcrp1* タンパク質は H₂O₂ 曝露後 1 時間以内において未処理区に比べて約 2 倍の増加を示した。c-Myc タンパク質も *Bcrp1* タンパク質と同様に約 2 倍以上の増加を示し、リン酸化 c-Myc タンパク質も約 4 倍の発現量の増加が

みられた。これらの結果から、 H_2O_2 に対する *Bcrp1* の応答について、 H_2O_2 曝露後 1 時間以内に *c-Myc* の転写誘導による転写亢進がなされ、*c-Myc* のリン酸化と *Bcrp1* の生成が誘導されていることが示された。

そこで、ES 細胞集団での SP 細胞の特性の獲得における *Bcrp1* の役割について検証するため、*Bcrp1* によるストレス制御に焦点を当て、特に酸化ストレス条件下での幹細胞品質の維持について検討した。 H_2O_2 曝露にともない *Nanog* の発現は低下したが、FTC 処理により *Nanog* の発現はさらに大きく低下した。さらに、酸化還元作用を持つ glutathione (GSH) を生成する N-acetyl-l-cysteine (NAC) の共添加により、FTC 処理下で H_2O_2 曝露により低減する *Nanog* の発現が回復した。これらの結果から、*Bcrp1* の生理学的役割として、酸化ストレス応答を介して、*Nanog* の発現維持に関わっている可能性が示された。

以上の結果から、ES 細胞における H_2O_2 曝露に対する *Bcrp1* の役割について、*c-Myc* の転写亢進、*c-Myc* のリン酸化と *Bcrp1* の生成を介して *Nanog* の発現維持等に関与することで、幹細胞の品質維持・管理の一端を担っている可能性が示された。

(4) ES 細胞の分化過程における *Bcrp1* の動態

Bcrp1 過剰発現 ES 細胞を作製し、体外分化誘導過程における *Bcrp1* mRNA アイソフォームならびに未分化 / 分化関連遺伝子の発現の変動を解析した。これまでに、*Bcrp1* 過剰発現 ES 細胞株では、*Bcrp1* タンパク質が約 3 倍過剰発現しており、*Oct3/4* タンパク質も約 3 倍増加していた。この株を用いて分化誘導を行ったところ、外来 *Bcrp1* の過剰発現により、*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2* の発現が亢進・持続され、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、中・外胚葉系分化マーカー遺伝子の発現は抑制されて、形態的にも ES 細胞が内胚葉系の細胞へと分化する傾向が示されている (基盤研究(C) #20580316 参照)。

そこで、分化誘導過程における *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現を検討した結果、野生型 ES 細胞では、*Oct3/4*、*Nanog*、*Sox2* の発現低下に先立ち、分化誘導後直ちに *Bcrp1* mRNA アイソフォームの発現がいったん低下し、その後再び発現が回復する傾向がみられた。これまでの結果と併せ、これらの結果は、*Bcrp1* の持続的な発現は分化抑制的にはたらき、一方、未分化状態から分化にコミットする際には、*Bcrp1* の一時的な発現低下が関与しており、*Bcrp1* がレドックスバランスによる分子スイッチの機能に関与している可能性を示している。

(5) ES 細胞と初期胚における細胞核内クロマチン構造の 3D-FISH 解析

ゲノム機能は細胞核のダイナミックな構造変換を介して制御されている (基盤研究(C)

#20580316)。3D-FISH は遺伝子座や染色体ドメインや染色体テリトリー(CT)などの細胞核内の空間配置を可視化できる優れた技術であるが、初期胚での適用は困難であった。本研究において、申請者は初期胚の 3D-FISH に適した簡便なチャンバー装置(EASI-FISH chamber)を開発し(Nakaya *et al.*, 2017)、マウス初期胚、ES 細胞および胎子線維芽細胞を用いて、セントロメア近傍領域、ZGA 関連遺伝子座(*Zscan4*)、7 番染色体テリトリー(CT7)を同時に可視化することに世界で初めて成功した。そして、セントロメア近傍領域や染色体テリトリーの形態的变化、*Zscan4* 遺伝子座の染色体テリトリー内での移動が初期胚でダイナミックに起きていることを見出した。さらに、初期胚と ES 細胞では、遺伝子座の空間配置の共通性が高く、体細胞とは大きく異なっていること、CT の体積が分化にともない減少することなどを初めて見出した。

今後、ES 細胞の酸化ストレス応答における *Bcrp1* の機能を明らかにしていくことにより、(1)*Bcrp1* を指標とする高品質の ES 細胞の獲得手法として、ES 細胞株の樹立の新たな基準となる。(2)ABC トランスポーターによるレドックスバランスの制御という幹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、再生医学やがん研究の分野において新基軸をもたらすことが期待される。(3)*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、特に絶滅の危機に瀕する展示動物や野生動物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 3 件)

Nakaya M, Tanabe H, Takamatsu S, Hosokawa M, Mitani T. Visualization of the spatial arrangement of nuclear organization using three-dimensional fluorescence in situ hybridization in early mouse embryos: a new "EASI-FISH chamber glass" for mammalian embryos. *J. Reprod. Dev.* 63: 167-174, 2017. (査読有)

安齋政幸, 井上達也, 西村愛美, 野田義博, 東里香, 梶本みずき, 三谷匡, 細井美彦. β -Nicotinamide mononucleotide を添加したマウス体外成熟培地が未成熟卵子内への活性酸素種 (ROS) に与える影響. *日本受精着床学会雑誌* 33, 21-26, 2016. (査読有)

Shimizu N, Ueno K, Kurita E, Shin SW, Nishihara T, Amano T, Anzai M, Kishigami S, Kato H, Mitani T, Hosoi Y, Matsumoto K. Possible Role of ZPAC,

Zygote-specific proteasome assembly chaperone, during spermatogenesis in the mouse. *J. Reprod. Dev.* 60: 179-186, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

岡迫知弘, 青木隆之介, 梶友里恵, 西垣内佑香, 桑原萌, 坂出祐喜, 甲田美樹, 有田奈央, 吉田誠希, 松井豪志, 奥田宗広, 佐伯和弘, 三谷匡, 田口善智. マウス ES 細胞において抗がん剤排出タンパク質 BCRP1 (ABCG2) と相互作用するタンパク質の探索. 日本農芸化学会 2017 年 2017 年度大会, 3 月 17 日 ~ 20 日, 京都女子大学 (京都府京都市).

中家雅隆, 高松晋吾, 細川美咲, 田辺秀之, 三谷匡. マウス着床前胚における Cyclin と RNA polymerase II のリン酸化の動態. 第 39 回日本分子生物学会年会. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市). 2016 年 12 月 1 日.

中家雅隆, 高松晋吾, 田辺秀之, 三谷匡. マウス初期胚における 3D-FISH 法の構築 - 初期胚用 Chamber glass の考案 -. 一般財団法人染色体学会第 67 回年会. 東京大学 (東京都文京区). 2016 年 11 月 3 日. Mitani T, Nakaya M. Histone H2A.Z: A Janus-faced role in the embryonic development? The 8th Japan-Korea ART Conference. Workpia Yokohama, September 3rd, 2016, Yokohama, Kanagawa, Japan.

中家雅隆, 中前壮一郎, 日下部将之, 原田昌彦, 三谷匡. ヒストン H2A.Z の修飾はマウス受精卵と体細胞核移植胚の前核形成に参与する. 第 68 回日本細胞生物学会大会. 京都テルサ (京都府京都市). 2016 年 6 月 17 日.

Nakaya M, Nakamae S, Kanba T, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. Dynamic changes of nucleosome conformation in the mouse somatic cell nuclear transfer embryo by the treatment of HDAC inhibitors. The International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function. August 23th-26th, 2015, Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan.

Nakaya M, Nakamae S, Kanba T, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. Dynamic changes of histone chaperones, Tip60 and ANP32E, histone H3 modification and histone H2A.Z withdrawal in the mouse somatic cell nuclear transfer embryos by the treatment of HDAC inhibitors. 48th Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction, June 18th-22nd, 2015, San Juan, Puerto Rico.

Nakaya M, Kanba T, Nakamae S, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. HDAC Inhibitors modulate subcellular localization of histone H2A.Z, acetylated H3 and the histone chaperones, Tip60 and ANP32E, in the mouse somatic cell nuclear transfer embryos. IFFS/JSRM International Meeting 2015, April 26th-29th, 2015, PACIFICO Yokohama, Yokohama, Kanagawa, Japan.

内堀翔, 西原卓司, 樋口智香, 守田昂太郎, 塚口智将, 永井宏平, 安齋政幸, 岸上哲士, 三谷匡, 細井美彦, 松本和也. 体外発育培養液へのコエンザイム Q10 の添加におけるマウス胚の発生に及ぼす影響の検討. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

内堀翔, 西原卓司, 樋口智香, 守田昂太郎, 塚口智将, 永井宏平, 安齋政幸, 三谷匡, 細井美彦, 松本和也. 体外発育培養液へのコエンザイム Q10 の添加におけるマウス胚の発生に及ぼす影響の検討. 第 107 回日本繁殖生物学会大会, 2014 年 8 月 21 ~ 24 日, 帯広畜産大学 (北海道帯広市). Nakaya M, Azuma R, Anzai M, Kishigami S, Hosoi Y, Harata M, Mitani T. Dynamics of histone H2A variants in the mouse somatic nuclear transfer embryos by the treatment of HDAC inhibitors. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Co-sponsor: Asia-Pacific Developmental Biology Network, May 27th-30th, 2014, WINC AICHI, Nagoya, Aichi, Japan.

〔図書〕(計 2 件)

田辺秀之, 中家雅隆, 三谷匡. 「3D-FISH 法の新たな展開. マウス初期胚への応用」*生体の科学* 68 (3), 2017. (印刷中)

三谷匡. 「ES 細胞の遺伝子改変」*哺乳動物の発生工学* (佐藤英明, 河野友宏, 内藤邦彦, 小倉淳郎・編), 朝倉書店, pp103-117, 2014.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/sentan/kyoin/mitani.1/index.html>

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・教授

研究者番号: 1 0 3 2 2 2 6 5

(2) 分担研究者

なし

(3)連携研究者

原田 昌彦 (HARATA, Masahiko)
東北大学大学院・農学研究科・准教授
研究者番号：70218642