

令和元年6月13日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05143

研究課題名(和文) ES細胞とがん細胞に共通したc-MYC依存的なアポトーシスに対する回避メカニズム

研究課題名(英文) Molecular bases for masking c-MYC dependent apoptosis common in embryonic stem cells and cancer cells

研究代表者

奥田 晶彦 (OKUDA, AKIHIKO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：60201993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：c-MYCタンパク質は、典型的ながん遺伝子産物であり、細胞増殖を促進することはよく知られた事実であるが、細胞に対してアポトーシスを誘導する機能も有する。本研究は、c-MYCの後者の活性についての研究であるが、私たちは、正常細胞へのc-MYCの強制発現により誘導されるアポトーシスがNANOGの発現により抑制されること、そのNANOGとc-MYCの相互作用がc-MYCとc-MYCに対するパートナー因子であるMAXとの相対的な量によって影響されることを明らかにした。更には、c-MYC依存的なアポトーシスは、c-MYCにより惹起されたDNA複製ストレスの結果であることを示唆するデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

c-MYCは細胞増殖促進とアポトーシス誘導という諸刃の剣とも称すべき生物学的に相反する活性を有するが、c-MYCのアポトーシス誘導活性を規定している分子基盤については全くといってよいほどわかっていない。本研究ではその一部を明らかにしたが、その研究成果は、がん細胞の中では専ら細胞増殖促進が発揮されているc-MYCに対して、その細胞増殖促進活性を抑制し、その代わりにアポトーシス活性を発揮させるという今までにはない全く新しいがん治療薬の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：c-MYC, one of typical proto-oncogenes, is well-known to promote cell cycle progression by functioning as a transcription factor together with its obligated partner protein, MAX. c-MYC also bears apoptosis inducing activity as well. However, the molecular bases of c-MYC dependent apoptosis remains totally obscure. In this study, we focused on the latter activity of c-MYC. We firstly demonstrated that apoptosis induced by forced expression of c-MYC in mouse embryonic fibroblasts was significantly attenuated by simultaneous expression of NANOG. Secondly, physical interaction between c-MYC and NANOG was affected by relative amounts between c-MYC and MAX in which NANOG binds to c-MYC most strongly in the absence of MAX expression. Finally, we demonstrated that c-MYC has a potential to inhibit DNA replication, suggesting that apoptosis inducing activity of c-MYC reflects the result of replication stress induced by c-MYC.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：c-Myc Max 細胞増殖 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

c-MYC 転写因子は典型的ながん遺伝子産物の一つであり、*Cyclin D* 遺伝子等の細胞増殖を司る遺伝子からの転写を正に制御する因子である¹。但し、この c-MYC タンパク質による細胞増殖促進活性はがん細胞や ES 細胞等では顕著であるが、マウス線維芽細胞等、限られた自己増殖能しか有さない正常細胞で過剰発現させても、c-MYC タンパク質による細胞増殖促進活性は顕著には見られず、むしろ、c-MYC タンパク質が有するもう一つの活性であるアポトーシス誘導活性が顕著にみられ、その結果細胞はほとんど死滅してしまう。なお、この c-MYC タンパク質が細胞の増殖を高めるべく転写因子として機能する為には MAX というパートナー因子が必要であるとか、その活性を司っている作用機序についての分子レベルでの理解がかなり進んでいるが、一方で、c-MYC タンパク質依存的なアポトーシスについての分子レベルでの理解は全くと言っていいほどできていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、一つには、c-MYC タンパク質依存的なアポトーシスを規定している基盤を分子レベルで明らかにすることを大きな目標の一つとして研究を始めた。同時に、がん細胞・ES 細胞では細胞増殖促進、通常の体細胞ではアポトーシス誘導というように、c-MYC が諸刃の剣とでも称すべき生物学的に相反する 2 つの活性を細胞種によってどのようにして使い分けしているか、そのメカニズムの解明についても本研究課題における大きな目標の一つに設定した。なお、これらの研究は、c-MYC タンパク質を、がん細胞の中で、細胞増殖促進因子としてではなくて、アポトーシス誘導因子として機能させることによりがん細胞を死滅させるという新しいがんの治療法が開発できないかという考えを念頭においた研究である。

3. 研究の方法

本研究は、Myc タンパク質が細胞増殖促進因子として作用する上で必須なパートナー因子である Max タンパク質をコードする遺伝子のホモ欠失 ES 細胞が、c-Myc 及び N-Myc の両方の遺伝子についてホモ欠失させた ES 細胞とは異なり、激しいアポトーシスのフェノタイプを示した現象に遭遇したことがきっかけとなって、そのアポトーシスの原因の一部が、Max タンパク質との相互作用がなくなって遊離状態にある c-Myc や N-Myc などの Myc タンパク質による作用であることを見出したことに端を発して生まれた研究であり、また、Myc タンパク質が物理的に ES 細胞における代表的なマーカータンパク質である Nanog と相互作用でき、それ故、Nanog タンパク質の存在の有無が細胞増殖促進とアポトーシス誘導という 2 つの活性の使い分けに関係しているのではないかという仮説に立脚して始めた研究であったが、本研究では、正常細胞である MEF 細胞に対して c-Myc を過剰発現させることで起こるアポトーシスが、c-Myc と同時に Nanog も過剰発現させればアポトーシスのレベルは減弱するかについて検討した。なお、アポトーシスについては、インビトロゲン社の CellEvent Caspase-3/7 Green Detection Reagent を用いて検出した。また、Max ホモ欠失 ES 細胞を用いて、c-Myc と Nanog の相互作用のレベルが Max タンパク質の存在の有無によって影響されるかについて検討した。また、同細胞を用いて、遊離 c-Myc タンパク質依存的なアポトーシスが起こるのは、遊離 c-Myc タンパク質によって引き起こされる複製ストレスの結果ではないかという可能性について合成チミンアナログである EdU の取り込み及び DNA 複製フォーク移動速度を測定することにより検討を行った。

4. 研究成果

(1) 正常細胞での c-Myc 過剰発現に伴って起こるアポトーシスの Nanog 過剰発現による緩和

c-Myc は細胞増殖促進とアポトーシス誘導という 2 つの相反する機能を有しており、そのいずれが発揮されるかは細胞種によって異なるが、私たちは、本研究を開始する以前に見つけていた c-Myc タンパク質と Nanog タンパク質が物理的に結合するというデータから、Nanog の発現の有無が c-Myc が発揮する機能を決定している分子ではないかという仮説をもっていた。すなわち、Nanog を発現していない MEF 細胞ではアポトーシスが誘導されるが、一方、Nanog を発現している ES 細胞やがん細胞では、Nanog が c-Myc が持つアポトーシス誘導活性を抑え

込み、それ故、c-Myc は、これらの細胞では、専ら細胞増殖促進因子として機能するという仮説である。そして、この仮説を検証する最初の実験として、MEF細胞への c-Myc の過剰発現によって惹起されるアポトーシスが Nanog を c-Myc と共に過剰発現させることで抑制できるかをアネキシン V 染色により検討した。その結果、100%までには至らないまでも、c-Myc を単独で過剰発現させた場合と比べて、c-Myc と Nanog の両方を過剰発現させた細胞の方が、アネキシン V 染色陽性の細胞が顕著に少ないことが確認された (図 1)。

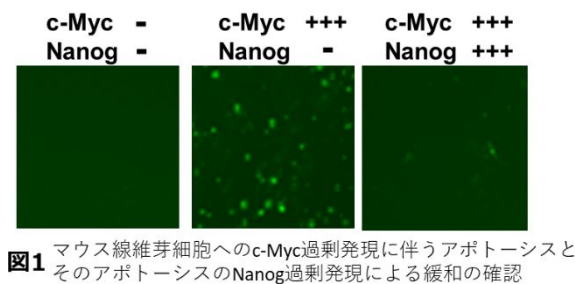


図1 マウス線維芽細胞へのc-Myc過剰発現に伴うアポトーシスとそのアポトーシスのNanog過剰発現による緩和の確認

(2) ES 細胞における c-Myc と Nanog との相互作用の検出

293 細胞への過剰発現による実験系により c-Myc と Nanog が結合することは既に証明できていたが、ES 細胞においてこれら 2 つの因子が生理的に発現している状態で相互作用が検出できるか否かについて検討した。それについて、まず、通常の ES 細胞を用いて検討したが、その細胞を用いた解析では、c-Myc と Nanog 間での相互作用を検出することができなかった。その結果を説明する一つの可能性として、c-Myc の本来の

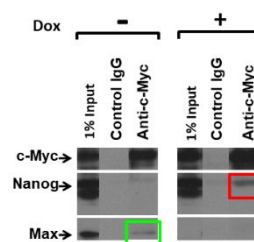


図2 マウスES細胞におけるMaxの発現のc-Mycタンパク質とNanogとの相互作用に及ぼす影響
Dox- : Max発現有り; Dox+ : Max発現なし

パートナー因子である Max の存在が、c-Myc の Nanog との相互作用に対してネガティブに作用しているのではないかと考え、それ故、Max ホモ欠失 ES 細胞を用いて c-Myc/Nanog 間の相互作用について検討した。この Max ホモ欠失 ES 細胞は、Max 遺伝子についてのホモ欠失 ES 細胞ではなくて、この ES 細胞では、それに加えて tetracycline-off システムと共に Max cDNA が導入されており、従って、この ES 細胞はテトラサイクリンやその誘導体であるドキシサイクリン(Dox)を加えると Max 遺伝子の発現は 0 にすることができるが、これらの薬剤非存在下では、内在性の Max の発現はないものの、外来性の高いレベルの Max の発現が保たれる²⁾。免疫沈降解析の結果、Dox 非存在下、すなわち、Max の発現がある状態では、c-Myc の Max との相互作用は検出できたものの、野生型の ES 細胞を用いた場合と同様に Nanog との相互作用は検出できなかった。しかし、Dox を添加することで外来性の Max の発現を遮断させると、c-Myc と Nanog との相互作用が検出できた (図 2)。従って、c-Myc は Max と複合体を形成している状況では Nanog と結合できないが、c-Myc が遊離状態にあるときは Nanog と相互作用できることが示唆された。

(3) c-Myc 依存的なアポトーシスが DNA 複製ストレスの結果である可能性の検討

様々な研究から c-Myc が転写因子として機能する上で Max との相互作用が必須であることが証明されているので、Max とは結合していない遊離 c-Myc 依存的なアポトーシスが c-Myc の転写因子としての機能に関係するとは考えにくい。c-Myc は転写因子として機能することに加え、DNA 複製促進因子としての機能も有するので、遊離 c-Myc と DNA 複製との関係を検討することにした。すなわち、c-Myc が DNA 複製を促進するためにも Max は必要で、Max との相互作用を失った遊離 c-Myc は DNA 複製を促進できなくなるだけではなく、ドミナン

トネガティブ体としてDNA複製を抑制し、その結果、複製ストレスが惹起され、その結果がアポトーシスという表現型として表れているという仮説である。その仮説を検証する第一歩として、まず、Max ホモ欠失 ES 細胞に対してチミンアナログである EdU を取り込ませた。その結果、Dox 非添加の為、外来性の Max の発現が

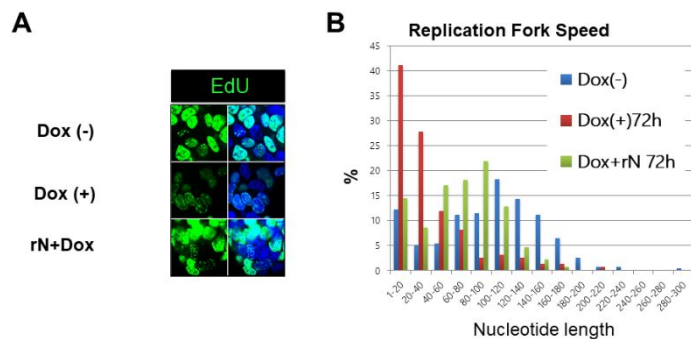


図3 マウスES細胞におけるMax発現消失に伴うDNA複製に及ぼす影響とヌクレオシド添加による回復
A EdU取り込み実験; rN: ヌクレオシド B DNA複製フォーク速度の測定

ある状態と比べ、Dox 添加により Max の発現が全くない状態では EdU の取り込みが顕著に低下していることが確認された。更には、Dox を添加した状態でも、培地にヌクレオシド (rN) を加えると、EdU 取り込み低下はかなり解消された (図 3a)。次に同じセットの細胞について DNA 複製フォーク移動速度について検討した。その結果、外来性の Max の発現を消失させると、その速度はかなり低下し、EdU の取り込み実験の場合ほどではないが、ヌクレオシドの添加により、その速度の低下がある程度解消されることが分かった。

以上、大きく分類して 3 つの研究から、ES 細胞やがん細胞では、c-Myc が持つアポトーシス誘導活性が顕著に発揮されないのは、その理由の少なくとも一部には、これらの細胞で発現している Nanog が関係していることが強く示唆された。また、Max と相互作用していない c-Myc がアポトーシスを誘導する分子メカニズムとして DNA 複製ストレスが関係しているという仮説を立て、Max の発現がない、すなわち c-Myc タンパク質が遊離状態で存在することが想定される ES 細胞において EdU の取り組みの低下や DNA 複製フォーク移動速度の低下がヌクレオシドの添加によりある程度回復できるという結果を得られたことでその仮説がある程度サポートされたが、DNA 複製ストレスが、遊離状態にある c-Myc タンパク質の直接的な作用であると結論するだけの十分な結果であるとは考えられず今後の更なる解析が必要であると思われる。

<引用文献>

1. Dang, C.V. MYC on the path to cancer. *Cell* **149**, 22-35 (2012).
2. Suzuki, A. *et al.* Loss of MAX results in meiotic entry in mouse embryonic and germline stem cells. *Nat Commun* **7**, 11056 (2016).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Hirasaki M, Mizuno Y, Ida Y, Murakoshi T, Okuda A, Kotani N. Identification and characterization of splenic adherent cells forming densely-packed colonies. *Dev Growth Differ* 2019 in press
Doi:10.1111/dgd.12605 査読あり

Hirasaki M, Ueda A, Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Kohda M, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Sharif J, Koseki H, Okuda A. Identification of the coiled-coil domain as an essential Mbd3 element for preserving lineage commitment potential of embryonic stem cells. *Stem Cells* **36**, 1355-1367, 2018. Doi: 10.1002/stem.2849 査読あり

Fukuda K, Okuda A, Yusa K, Shinkai Y. A CRISPR knockout screen identified SETDB1-target retroelement silencing factors in embryonic stem cells. *Genome Res* **28**, 846-858, 2018. Doi: 10.1101/gr.227280.117 査読あり

Tatsumi D, Hayashi Y, Endo M, Kobayashi H, Yoshioka T, Kiso K, Kanno S, Nakai Y, Maeda I, Mochizuki K, Tachibana M, Koseki H, Okuda A, Yasui A, Kono T, Matsui Y. DNMTs and

SETDB1 function as co-repressors in MAX-mediated repression of germ cell-related genes in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE* 13, e0205969, 2018. Doi: 10.1371/journal.pone.0205969 査読あり

Endoh M, Endo TA, Hayashi K, Sharif J, Shinga J, Endoh T, Nakayama M, Ishikura T, Farcas A, Ohara O, Okuda A, Klose R, Koseki H. PGC6-PRC1 suppresses premature differentiation of embryonic stem cells by silencing meiosis-related genes. *Elife* 6, e21064, 2017. Doi: 10.7554/eLife.27970 査読あり

Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Hirasaki M, Nishimoto M, Okuda A. Link between embryonic stem cell pluripotency and homologous allelic pairing of *Oct4* loci. *Dev Growth Differ* 59, 501-514, 2017. Doi: 10.1111/dgd.12403 査読あり

Okuda A, Uranishi K, Suzuki A. Discovery of a new role for the p53 family in the onset of mesendodermal differentiation of embryonic stem cell. *Stem Cell Investig* 4, 24, 2017. Doi: 10.21037/sci.2017.03.07 査読なし

Suzuki A, Hirasaki M, Okuda A. Does MAX open up a new avenue for meiotic research? *Dev Growth Differ* 59, 61-69, 2017. Doi:10.1111/dgd.12344 査読あり

Okuda A, and Suzuki A. Unexpected link between MAX and meiotic onset. *Cell Cycle* 15, 2235-2236, 2016. Doi:10.1080/15384101.2016.1194137 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

奥田晶彦 Max タンパク質依存的な減数分裂抑制とその抑制解除の為の分子メカニズム
新学術領域(生殖細胞とエピゲノムダイナミクスとその制御)成果とりまとめ公開シン
ポジウム 口頭発表 2018年12月4日~5日(京都府京都市、京都教育文化セン
ター)

奥田晶彦、平崎正孝、鈴木 歩 体細胞分裂からの減数分裂への切り替えのための
MYC-MAX-MGA ネットワーク 第41回日本分子生物学会 ワークショップ がん遺伝
子 MYC の新たな展開 口頭発表 2018年11月28日~30日(神奈川県横浜市、パシ
フィコ横浜)

鈴木 歩、平崎正孝、浦西洸介、北村友佳、西本正純、奥田晶彦 Max によるマウス生
殖細胞の減数分裂開始制御 第41回日本分子生物学会 ポスター発表 2018年11月
28日~30日(神奈川県横浜市、パシフィコ横浜)

浦西洸介、北村友佳、鈴木 歩、平崎正孝、西本正純、奥田晶彦 ES 細胞における Mga
の下流因子の探索 第41回日本分子生物学会 ポスター発表 2018年11月28日~30
日(神奈川県横浜市、パシフィコ横浜)

北村友佳、浦西洸介、鈴木歩、平崎正孝、西本正純、奥田晶彦 Mga 遺伝子の新規スプラ
イシングバリエーションによる減数分裂制御機構の解明 第41回日本分子生物学会 ポス
ター発表 2018年11月28日~30日(神奈川県横浜市、パシフィコ横浜)

鈴木 歩、平崎正孝、浅賀正充、浦西洸介、西本正純、奥田晶彦 MAX は体細胞分裂か
ら減数分裂への切り替えを制御するか 第40回日本分子生物学会 ポスター発表 2017
年12月6日~9日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)

平崎正孝、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、西本正純、奥田晶彦 MBD ドメインが欠失
した Mbd3 バリエーションによる ES 細胞の分化多能性賦与機構の解明 第40回日本分子生物
学会 ポスター発表 2017年12月6日~9日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)

浅賀正充、平崎正孝、西本正純、鈴木 歩、浦西洸介、奥田晶彦 Nucleostemin 欠損 ES
細胞における Oct3/4 転写因子の DNA 結合特性の変化 第40回日本分子生物学会 ポス
ター発表 2017年12月6日~9日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)

鈴木 歩、平崎正孝、浅賀正充、浦西洸介、西本正純、奥田晶彦 体細胞分裂から減数分
裂への切り替えを制御する Myc/Max/Mga ネットワーク 第39回日本分子生物学会 ポ
スター発表 2016年11月30日~12月2日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)

平崎正孝、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、西本正純、奥田晶彦 Mbd3/NuRD 転写抑制
複合体による ES 細胞への分化多能性賦与機構の解明 第39回日本分子生物学会 ポス
ター発表 2016年11月30日~12月2日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)

西本正純、鈴木 歩、浦西洸介、浅賀正充、平崎正孝、奥田晶彦 Yap による細胞の形質
転換における miR129 を介さない経路の重要性 第39回日本分子生物学会 ポスター発
表 2016年11月30日~12月2日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)

〔図書〕(計 2 件)

奥田晶彦 最近の MYC 研究の世界の動向を踏まえて 実験医学 36 巻 4 号 488-493, 2018

鈴木 歩、奥田晶彦 ES 細胞と生殖細胞における MYC-MAX-MGA ネットワーク実験医
学 36 巻 4 号 528-533, 2018

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saitama-med.ac.jp/genome/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平崎 正孝

ローマ字氏名：(HIRASAKI, masataka)

所属研究機関名：埼玉医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10522154

研究分担者氏名：依馬 正次

ローマ字氏名：(EMA, masatsugu)

所属研究機関名：滋賀医科大学

部局名：動物生命科学研究センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：60359578

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。