

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15604

研究課題名(和文)遊離c-MYC依存性のアポトーシスに対するNANOGの抑制因子としての役割

研究課題名(英文)Function of NANOG as an inhibition for free c-MYC-dependent apoptosis

研究代表者

平崎 正孝(Hirasaki, Masataka)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：10522154

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): Max欠失ES細胞に存在するMAX非結合型c-MYCが、この細胞が呈するアポトーシスの責任分子であり、NANOGは遊離c-MYCと結合する事で、アポトーシス誘導に対する抑制因子として機能している事を見出した。NANOGは、NuRD複合体を活性化する機能を持ち、NuRDの構成因子であるMBD3はc-MYCと結合することが報告されている。そこで、MBD3の強制発現によってもMax欠失ES細胞が示すアポトーシスが抑圧されるかを調べた結果、この細胞が呈するアポトーシスは抑圧された。さらに、DNAマイクロアレイ解析を行い、強制発現されたMBD3がどのような遺伝子群の発現に関与しているかを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MYCタンパク質は、腫瘍化の要因として考えられている一方、古くからMycの強制発現は、アポトーシスを引き起こすと言う、相反する現象にも関与している事が知られていた。本研究はES細胞における、MYCタンパク質によるアポトーシス誘導という、今までにあまり着目されてこなかった研究項目を中心課題に据えた研究ではあったが、c-MYCに関して全く新しい分子指標を見出すことに繋がったと考えている。この得られた知見はES・iPS細胞の特性の根幹をなす『分化多能性・自己増殖性』の理解につながり、しいてはES・iPS細胞を用いた再生医療の安全性の向上につながる事を期待する。

研究成果の概要(英文): In 2011, our lab reported that extinction of Max gene expression in ES cells provoke cell death. Further studies revealed that the MAX-unbound c-MYC in Max-deficient ES cells is responsible factor for the apoptosis exhibited by these cells, and that NANOG functions as a suppressor of apoptosis induction by binding to free c-MYC. NANOG functions to activate the NuRD complex, and MBD3, a component of NuRD, has been reported to bind to c-MYC. Therefore, we examined whether forced expression of MBD3 suppressed the apoptosis exhibited by Max-deficient ES cells and found that apoptosis was suppressed by forced expression of MBD3. In addition, DNA microarray analysis was performed to determine what kind of gene groups are expressed by the forced expression of MBD3.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、多様な種類の細胞に分化する能力である「分化多能性」と、その分化多能性を維持しつつ増殖することができる「自己増殖性」を持った細胞として定義される。そして、発生初期の胚から樹立される ES 細胞も幹細胞の一つとして分類される。しかし、ES 細胞が持つこれら幹細胞を定義する 2 つの特徴は特筆すべきものであり、事実、ES 細胞は、体を構成するあらゆる種類の細胞へと分化することができ、かつ、半永久的に自己増殖できる。これらの特徴が、ES 細胞に対して細胞移植の為の無尽蔵な細胞の供給源として極めて大きな期待が注がれてきた所以である。また、免疫拒絶と倫理的な問題という大きな 2 つの懸念材料が ES 細胞を用いた再生医療の実現を強く阻むであろうと考えられていたが、iPS 細胞という生物学的性質においては ES 細胞と全く同じと言える細胞の登場により、細胞移植治療の実現・普及が極めて現実味を帯びたものになった。但し、iPS 細胞を、移植すべき細胞を得る為の出発材料として用いることを前提とするならば、分化の誘導方法の開発は重要ではあるが、ES 細胞及び iPS 細胞が共通に持つ特筆すべき 2 つの性質『分化多能性・自己増殖性』を分子レベルで正確に理解することも極めて重要なことであると考えた。

申請者の所属する研究室は、Myc のパートナー因子である Max の機能を欠損させた ES 細胞を樹立し、ES 細胞における Myc の役割について検討・報告して来た。その結果、Max 欠損 ES 株ではアポトーシスを示すことを報告した。さらに研究を進めたところ、MAX 非存在下では全く機能しないであろうと想定していた遊離状態にある c-MYC タンパク質が、アポトーシスを起こしている責任分子である事が示された。但し、現状においては、MAX と相互作用していない遊離 c-MYC が起こすアポトーシスのメカニズムは全くわかっておらず、それ故、それを解明することを本研究課題の目的とした。

2. 研究の目的

ES 細胞および iPS 細胞は、未分化の状態では生体に移植されると奇形腫(テラトーマ)を形成するという性質を有し、この性質が再生医療への応用を阻む大きな障壁となっている。当研究室は、c-Myc のパートナー因子である Max を欠損させた ES 細胞がアポトーシスを起こし、この表現型は Nanog の強発現によって抑制される事を報告してきた。更なる解析の結果、c-Myc と Nanog は直接相互作用する事を、また、Max 欠損 ES 細胞の示すアポトーシスは、Max 非結合型 c-Myc が原因である事を見出して来た。また、NANOG や c-MYC と相互作用を示す MBD3 の強制発現によっても Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスは抑圧される事を見出した。この現象を規定している分子メカニズムを解明する事で、c-Myc に関して全く新しい分子指標を見出すことに繋がるのではないかと期待した。ES 細胞におけるアポトーシスの解明は、未分化状態の細胞の優先的に死滅させるシステムの構築に繋がると考えた。

3. 研究の方法

本申請の目的は、ES 細胞における Max 非結合型 c-Myc によるアポトーシスの分子メカニズムを解明する事である。Max 欠損 ES 細胞に存在する MAX 非結合型 c-MYC が、この細胞が呈するアポトーシスの責任分子であり、NANOG は遊離 c-MYC と結合する事で、アポトーシス誘導に対する抑制因子として機能している事を強く示唆するデータを得た。そこで、研究結果をさらに確固たるものにする為に以下を検討する。①Max/c-Myc/N-Myc 遺伝子トリプルホモ欠損 ES 細胞を作製する事で、Max 欠損 ES 細胞における MYC の機能を明らかにする。②ChIP シーケンスによる MAX 非結合型 c-MYC タンパク質のゲノムへの結合部位についての網羅的な解析をする。③NANOG や c-MYC と相互作用を示す MBD3 の強制発現によっても Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスは抑圧された。そこで、Mbd3 を強制発現させた Max 欠損 ES 細胞のマイクロアレイ解析を行う。以上の計画を立てた。

4. 研究成果

Max/c-Myc/N-Myc 遺伝子トリプルホモ欠損 ES 細胞を作製する事で、Max 欠損 ES 細胞における MYC の機能を明らかにする計画を立てた。Max の発現は Dox によって、そして c-Myc は 4-OHT によって制御していたが、発現消失をシンクロさせる事が困難であった。しかし、Max 欠損 ES 細胞において c-MYC を sh-RAN を用いノックダウンする事で、アポトーシスが抑圧される事を見出した。

ChIP シーケンスによる MAX 非結合型 c-MYC タンパク質のゲノムへの結合部位についての網羅的な解析を計画した。元来、c-Myc 抗体を用いた ChIP-seq を計画していたが、突如製造中止となり、計画の変更を余儀なくされた。しかし、Myc-tag を融合する事で、Max 非結合型 c-Myc の染色体上への結合部位が同定できた。

NANOG や c-MYC と相互作用を示す MBD3 の強制発現によっても Max 欠損 ES 細胞が示すアポトーシスは抑圧された。そこで、Mbd3 を強制発現させた Max 欠損 ES 細胞のマイクロ

アレイ解析を行う計画を立てた。アポトーシス関連の遺伝子発現が著しく抑制されていることが見出された。また、*Nanog* 強制発現 *Max* 欠失 ES 細胞のマイクロアレイ解析のデータは既已取得しているたので、そのデータと比較したところ、発現に変化が見られた遺伝子には、多数の相関性があることが見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoneda R, Ueda N, Uranishi K, Hirasaki M, Kurokawa R.	4. 巻 -
2. 論文標題 Long noncoding RNA pncRNA-D reduces cyclin D1 gene expression and arrests cell cycle through RNA m6A modification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Biol Chem.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.011556	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moro Y, Kogashiwa Y, Sakurai H, Takahashi R, Kimura T, Hirasaki M, Matsumoto Y, Sugawara M, Kohno N.	4. 巻 39(11)
2. 論文標題 In Vitro Study of the Anti-cancer Effect of Alternate-day 5-Fluorouracil in Head and Neck Cancer Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6041-6047
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimoto M, Uranishi K, Asaka MN, Suzuki A, Mizuno Y, Hirasaki M, Okuda A.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transformation of normal cells by aberrant activation of YAP via cMyc with TEAD.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-47301-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirasaki M, Mizuno Y, Ida Y, Murakoshi T, Okuda A, Kotani N.	4. 巻 61(4)
2. 論文標題 Identification and characterization of splenic adherent cells forming densely-packed colonies.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 283-293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12605	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirasaki M, Ueda A, Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Kohda M, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Sharif J, Koseki H, Okuda A.	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of the Coiled-Coil Domain as an Essential Methyl-CpG-Binding Domain Protein 3 Element for Preserving Lineage Commitment Potential of Embryonic Stem Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells.	6. 最初と最後の頁 1355
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2849.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Hirasaki M, Nishimoto M, Okuda A	4. 巻 59
2. 論文標題 Link between embryonic stem cell pluripotency and homologous allelic pairing of Oct4 loci.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 639-647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12403.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Masataka Hirasaki, Kousuke Uranishi, Yuka Kitamura, Ayumu Suzuki, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda.
2. 発表標題 MBD3 contributes to the differentiation competence of ESCs into EpiLCs via the recruitment of PRC2 complex.
3. 学会等名 ISSCR Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平崎 正孝、浦西洸介、北村友佳、鈴木歩、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 MBD3はPRC2複合体をリクルートすることでESCsからEpiLCsへの分化を賦与する
3. 学会等名 第17回 RCGMフロンティアシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Hirasaki, Kousuke Uranishi, Yuka Kitamura, Ayumu Suzuki, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda.
2. 発表標題 MBD3 contributes to the differentiation competence of ESCs into EpiLCs via the recruitment of PRC2 complex
3. 学会等名 第17回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masataka Hirasaki, Masamitsu N. Asaka, Kousuke Uranishi, Ayumu Suzuki, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda
2. 発表標題 Phenotypic differences associated with the loss of Mbd3 between ESCs and EpiSCs
3. 学会等名 第16回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田 晶彦、平崎 正孝、鈴木 歩
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第41回 分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北村 友佳、浦西 洸介、鈴木 歩、平崎 正孝、西本 正純、奥田 晶彦
2. 発表標題 Mga遺伝子の新規スプライシングバリエントによる減数分裂制御機構の解明
3. 学会等名 第41回 分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 歩、平崎 正孝、浦西 洸介、北村 友佳、西本 正純、奥田 晶彦
2. 発表標題 Maxによるマウス生殖細胞の減数分裂開始制御
3. 学会等名 第41回 分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦西 洸介、北村 友佳、鈴木 歩、平崎 正孝、西本 正純、奥田 晶彦
2. 発表標題 ES細胞におけるMgaの下流因子の探索
3. 学会等名 第41回 分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masataka Hirasaki, Ayumu Suzuki, Kousuke Uranishi, Masamitsu N. Asaka, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda
2. 発表標題 「Mbd3 variant lacking methyl-CpG binding domain exerts equivalent function to canonical Mbd3 for preserving ESC pluripotency.」
3. 学会等名 第15回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平崎正孝、鈴木歩、浦西洸介、浅賀正充、西本正純、奥田晶彦
2. 発表標題 「MBDドメインが欠失したMbd3バリエントによるES細胞の分化多能性賦与機構の解明」
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 「頭頸部扁平上皮癌に対する放射線療法の有効性を予測する方法」	発明者 小柏 靖直、平崎 正孝、菅澤 正、奥 田 晶彦、井上 準	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018- 038978 2018/3/5	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----