

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2007～2009

課題番号：19689011

研究課題名 (和文)

体細胞における未分化性維持機構解明とその発癌メカニズム解明への応用

研究課題名 (英文)

Uncovering the mechanisms underlying maintenance of undifferentiated states in somatic cells and its application for cancer research

研究代表者

山田 泰広 (YAMADA YASUHIRO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70313872

研究成果の概要 (和文)：

REST はエピジェネティック機構を介し、細胞分化、発がんのいずれにも関与し、未分化性維持機構と発がんメカニズムの共通性を説明しうる可能性を持つ遺伝子である。現在までの報告により、Rest は神経分化において重要な役割を果たす転写抑制因子であることが示され、がん抑制遺伝子としての機能を有することが示唆されている。近年、Rest が ES 細胞の未分化性維持に必須であることが報告された (Nature 2008)。我々は本研究において、Rest コンディショナルノックアウト ES 細胞、REST 発現誘導可能 ES 細胞を作製し、ES 細胞の未分化性維持機構、初期分化における Rest の機能的役割を検討した。Rest ノックアウト (KO) ES 細胞が存在可能であり、Oct3/4, Nanog, Sox2 などの ES 細胞未分化性維持に重要な遺伝子の発現も保たれていることが明らかとなった。Rest KO ES 細胞を胚盤胞に注入しキメラマウスを作製すると、Rest KO ES 細胞は異なる三胚葉系の細胞に分化することが確認され、Rest は ES 細胞の未分化性維持には必ずしも必要ないことが明らかとなった。一方で、分化培養条件下において Rest KO ES 細胞では、Gata4/Gata6 の発現が抑制され、原始内胚葉への分化が抑制されることが示唆された。反対に REST の強制発現により、ES 細胞の速やかな分化誘導が観察された。以上より、Rest は ES 細胞未分化性維持に必要なことが示されたのみならず、Rest が ES 細胞の初期分化を促進することが明らかとなった。今後、Rest の分化調節機構とその発がんメカニズムの接点について解析する予定である。

研究成果の概要 (英文)：

The pluripotency of ES cells is maintained by the coordinated expression of genes in the core regulatory circuitry that includes *Oct3/4*, *Sox2* and *Nanog*. *Rest* (also called *Nrsf*) is abundantly expressed in ES cells and it is a target of the Oct3/4-Sox2-Nanog regulatory network core circuitry. However, the functional significance of Rest in the maintenance of pluripotency in ES cells remains controversial. We herein generated *Rest* conditional knock-out and REST-inducible ES cell lines. The conditional ablation of *Rest* showed that *Rest* is not indispensable for the maintenance of pluripotency, however, it is involved in the suppression of self-renewal genes upon the early differentiation of ES cells. Consistently, the forced expression of REST results in the rapid differentiation of ES cells. Our results indicate that *Rest* is not necessary for the maintenance of ES cells, while further suggest that the Rest transcriptional repressor is an external factor connecting to the Oct3/4-Sox2-Nanog core regulatory circuitry to induce the early differentiation of ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2008年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Rest, ES細胞, Pluripotency, 大腸発がん

### 1. 研究開始当初の背景

REST はエピジェネティック機構を介し、細胞分化、発がんのいずれにも関与し、未分化性維持機構と発がんメカニズムの共通性を説明しうる可能性を持つ遺伝子である。現在までの報告により、Rest はES細胞で発現が高く、神経幹細胞で発現が低下し、分化した神経細胞ではその発現がほとんど消失することが知られる。Rest の標的遺伝子には多くの神経関連遺伝子が含まれ、従って、Rest が神経関連遺伝子の発現を抑制することにより、神経幹細胞は未分化状態を維持していると考えられている。このように Rest は神経分化において重要な役割を果たす転写抑制因子であることが示されてきたが、近年 Rest は、がん抑制遺伝子としての機能も有することが明らかとなった。さらには、Rest が ES 細胞の未分化性維持に必須であることが報告された (Nature 2008)。

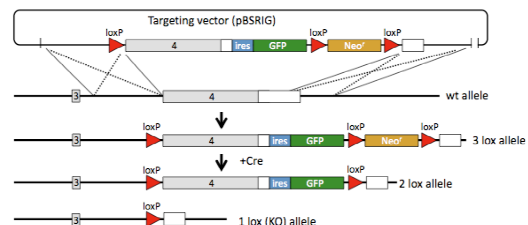
以上のように、Rest には神経分化制御、発がん抑制、ES 細胞未分化性維持など、様々な機能があることが示唆されているものの、ジェネティックなアプローチでの解析は、ほとんどなされていなかった。

### 2. 研究の目的

条件的 Rest 遺伝子改変マウスおよび ES 細胞を作製し、神経分化制御、発がん抑制、ES 細胞未分化性維持における Rest の各種機能をジェネティックなアプローチで明らかにする。

### 3. 研究の方法

Rest ノックアウトマウスは胎生致死であることが知られている。そのため、cre-loxP システムを用いたコンディショナルノックアウトマウスおよび ES 細胞を作製した (下図)。ドキシサイクリン誘導可能 cre

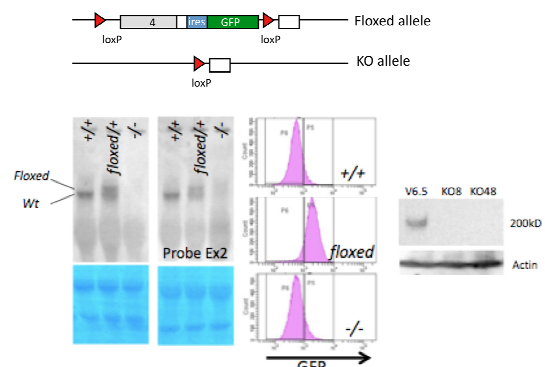


recombinase を有する Rest コンディショナルノックアウトマウスおよび ES 細胞を作製した。さらに、ドキシサイクリン誘導可能 Rest を持つ ES 細胞を樹立した。本研究では、まず Rest の ES 細胞未分化性維持における役割を明らかにするために、未分化培養条件および分化培養条件での各種遺伝子発現量の変化や、分化状態を、Rest 遺伝子の有無の比較検討を行った。

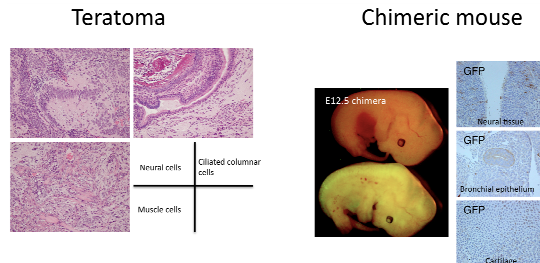
### 4. 研究成果

Rest ノックアウト (KO) ES 細胞が存在可能であり (下図)、Oct3/4, Nanog, Sox2 などの ES 細胞未分化性維持に重要な遺伝子の発現も保たれていることが明らかとなった。

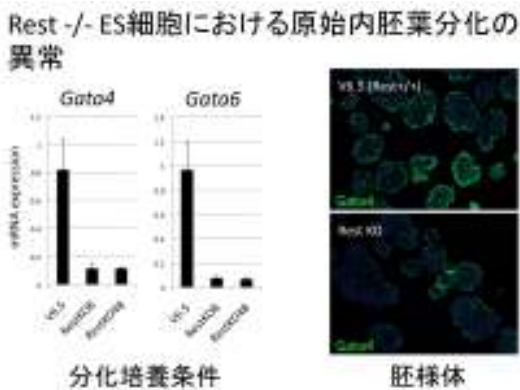
#### Rest -/- ES 細胞



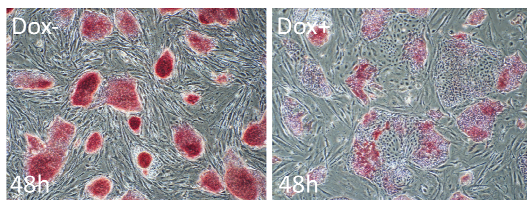
Rest KO ES 細胞を胚盤胞に注入しキメラマウスを作製すると、Rest KO ES 細胞は異なる三胚葉系の細胞に分化することが確認され、Rest は ES 細胞の未分化性維持には必ずしも必要ないことが明らかとなった（下図）。



一方で、分化培養条件下において Rest KO ES 細胞では、Gata4/Gata6 の発現が抑制され、原始内胚葉への分化が抑制されることが示唆された（下図）。



反対に REST の強制発現により、ES 細胞の速やかな分化誘導が観察された（下図）。



以上より、Rest は ES 細胞未分化性維持に必要なことが示されたのみならず、Rest が ES 細胞の初期分化を促進することが明らかとなった。

##### 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 14 件）

1. Yamada Y, Aoki H, Kunisada T, Hara A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell Stem Cell*. 6 10-15, 2010, 査読・有

2. Sakai H, Yamada Y, Shimizu M, Saito K, Moriwaki H, Hara A. Genetic ablation of Tnf alpha demonstrates no detectable suppressive effect on inflammation-related mouse colon tumorigenesis. *Chemico-Biological Interactions*. in press, 査読・有

3. Phutthaphadoong S, Yamada Y, Hirata A, Tomita H, Hara A, Limtrakul P, Iwasaki T, Kobayashi H, Mori H. Chemopreventive effect of fermented brown rice and rice bran (FBRA) on the inflammation-related colorectal carcinogenesis in ApcMin/+ mice. *Oncol Rep*. 2010 Jan;23(1):53-9, 査読・有

4. Aoki H, Yamada Y, Hara A, Kunisada T. Two distinct types of mouse melanocyte: differential signaling requirement for the maintenance of non-cutaneous and dermal versus epidermal melanocytes. *Development*. Aug;136(15):2511-21. 2009, 査読・有

5. Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, Hara A. Global DNA hypomethylation suppresses squamous carcinogenesis in the tongue and esophagus. *Cancer Sci*, 2009, 100(7):1186-91, 査読・有

6. Aoki H, Hara A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T. In vitro and in vivo differentiation of human embryonic stem cells into retina-like organs and comparison with that from mouse pluripotent epiblast stem cells. *Dev Dyn*. 2009 Sep;238(9):2266-79, 査読・有

7. Phutthaphadoong S, Yamada Y, Hirata A, Tomita H, Taguchi A, Hara A, Limtrakul PN, Iwasaki T, Kobayashi H, Mori H. Chemopreventive effects of fermented brown rice and rice bran against 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis in female A/J mice. *Oncol Rep*. 2009 Feb;21(2):321-7, 査読・有

8. Oyama T, Yamada Y, Hata K, Tomita H, Hirata A, Sheng HQ, Hara A, Aoki H, Kunisada T, Yamashita S, Mori H. Further upregulation of  $\beta$ -catenin/Tcf transcription is involved in the development of macroscopic tumors in the colon of Apc Min/+ mice. *Carcinogenesis* 29:666-672, 2008, 査読・有

9. Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, Mori H. Neuron-like Differentiation and Selective Ablation of Undifferentiated Embryonic Stem Cells Containing Suicide Gene with Oct-4 Promoter. *Stem Cells Dev*, 2008 Aug;17(4):619-27, 査読・有

10. Tomita H, Kuno T, Yamada Y, Oyama T, Asano N, Miyazaki Y, Baba S, Taguchi A, Hara A, Iwasaki T, Kobayashi H, Mori H. Preventive effect of fermented brown rice and rice bran on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced gastric carcinogenesis in rats. *Oncol Rep* 19:11-15, 2008, 査読・有

11. Miyazaki Y, Hara A, Kato K, Oyama T, Yamada Y, Mori H, Shibata T. The effect of hypoxic microenvironment on matrix metalloproteinase expression in xenografts of human oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 32:145-151, 2008, 査読・有

12. Linhart HG, Lin H, Yamada Y, Moran E, Steine EJ, Gokhale S, Lo G, Cantu E, Ehrich M, He T, Meissner A, Jaenisch R. Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev* 21:3110-3122, 2007, 査読・有

13. Tomita H, Yamada Y, Oyama T, Hata K, Hirose Y, Hara A, Kunisada T, Sugiyama Y, Adachi Y, Linhart H, Mori H. Development of gastric tumors in Apc Min/+ mice by the activation of the  $\beta$ -catenin/Tcf signaling pathway. *Cancer Res* 67:4079-87, 2007, 査読・有

14. Yamada Y, Mori H. Multistep carcinogenesis in the colon of Apc Min/+ mouse. *Cancer Sci*, 98:6-10, 2007, 査読・有

[学会発表] (計 9 件)

1. 山田泰広 大腸多段階発がんにおけるエピジェネティクス制御機構の役割. 第26回日本毒性病理学会特別講演. 金沢 2010.2.4

2. Yamada, Y, Aoki, H, Kunisada, T, Hara, A: Tumor suppressor Rest promotes the early differentiation of embryonic stem cell, The 14th Korea-Japan Cancer Research Workshop, - Translational cancer research and progress in colorectal cancer -. Kanazawa, December 18, 2009.

3. 山田泰広, 波多野裕一郎, 平田暁大, 原明. Role of epigenetic modifications in colon tumorigenesis. 第68回日本癌学会学術総会シンポジウム. 横浜 2009.10.2

4. 山田泰広, 波多野裕一郎, 廣瀬善信, 原明. 発がんにおけるエピジェネティック異常の意義-iPS細胞作製技術を用いたエピジェネティックがん治療の試み- 第98回日本病理学会総会ワークショップ. 京都 2009.5.3

5. Yamada, Y: Role of DNA methylation in multistage colon carcinogenesis. Northeastern Asian Symposium on "Cancer Epigenetics", Jeju, Korea, November, 2008.11.6

6. 山田泰広, 平田暁大, 富田弘之, 山下聡, 森秀樹, 牛島俊和, 原明. The role of DNA methylation in carcinogenesis of the digestive tract. 第67回日本癌学会学術総会シンポジウム. 名古屋 2008.10.29

7. 山田泰広, 原明, 平田暁大, 廣瀬善信, ルドルフ イェーニッシュ, 森秀樹 未分化性の維持と発がん. 第97回日本病理学会総会シンポジウム. 金沢 2008.5.16

8. Yamada, Y, Hara, A, Jaenisch, R, Mori, H: Multistep carcinogenesis of the colon in Apc/Min+ mouse. 38th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund. Tokyo, November, 2007.11.27

9. 山田泰広, 平田暁大, 原明, 山下聡, 牛島俊和, 森秀樹. 未分化性維持機構の大腸発がん過程解明への応用. 第66回日本癌学会学術総会シンポジウム. 横浜

2007.10.3

〔図書〕（計 3 件）

1. 山田泰広、青木仁美、國貞隆弘、原 明  
iPS 細胞が与えた衝撃 iPS 細胞と疾患解析  
iPS 細胞作製技術の発癌研究への応用. **細胞工学** 28(3): 228-32, 2009
2. 波多野裕一郎、山田泰広、原 明 大腸  
多段階発癌と DNA メチル化の関連を探る  
—疾患モデル動物を用いたエピジェネティ  
クス研究の最新知見. **GI.Research** 17(4):  
298-304, 2009.
3. 山田泰広、原 明、森 秀樹 疾患モデ  
ル動物を用いたエピジェネティクス研究:  
大腸多段階発がんにおけるDNAメチル化  
異常の意義. **最新医学** 63(4): 772-777, 2008

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）  
該当無し。

○取得状況（計 0 件）  
該当無し。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yamada.cira.kyoto-u.ac.jp/HomeYamada.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 泰広 (YAMADA YASUHIRO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70313872