

機関番号：32409

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009年度 ~ 2010年度

課題番号：21790290

研究課題名 (和文) ES 及び iPS 細胞の腫瘍原性喪失を志向した LATS2 の機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of LATS2 for a conquest of tumorigenic activity of ES and iPS cells

研究代表者

菱田 友昭 (HISHIDA TOMOAKI)

埼玉医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80521062

研究成果の概要 (和文)：

ES 及び iPS 細胞は様々な細胞に分化できる一方でがん化する可能性を有するため、これらの細胞の腫瘍原性克服が急務である。そこで我々はがん抑制遺伝子 LATS2 に注目し、ES 細胞における機能解析と腫瘍原性への関与について検討した。その結果、LATS2 は ES 細胞の増殖能および腫瘍原性を低下させることが明らかとなった。しかし、ES 細胞において LATS2 を発現させると不安定化したことから、ES 細胞では抗がん性因子を除去するシステムが存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

ES and iPS cells have not only pluripotency but also tumorigenic activity, and we therefore must overcome their oncogenic property. We focused on LATS2, a tumor suppressor gene and examined the role and involvement of LATS2 in tumorigenic activity of ES cells. We found that forced LATS2 expression reduced the cell growth and oncogenic property of ES cells. However, several studies indicated that LATS2 protein expression gradually declined as ES cells grew, suggesting that there might exist the protein degradation system for the factors having anti-oncogenic activity in ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：移植・再生医療、癌、再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、発生段階の胚盤胞の内部細胞塊から樹立することが可能である。ES 細胞は半永久的に培養可能であり、あらゆる種類の細胞へと分化する潜在能力を持つ。この性質は治療困難な疾病に対する治療に再生医療といった形で応用が期待される性質であり、他の細胞種とは一線を画す

るこの特性について様々な研究がなされてきた。その結果、ES 細胞の自己複製能、及び多分化能を規定する因子の全体像が次々と明らかになり、最近の特筆すべき出来事として、Oct3/4、Sox2、KLF4 及び Myc の 4 因子により、体細胞の再プログラム化が起り、ES 細胞とほぼ同様の特徴を有する iPS 細胞を創出することができることが明らかになった。

このように、ES 細胞を起点とした再生医学研究は日進月歩で進んでいるのが現状である。しかしながら、ES 細胞や iPS 細胞の応用には、これらの細胞の腫瘍原性という性質が障害となる。すなわち、これらの細胞を目的の細胞に分化させた際に、少しでも未分化状態を保ったままの ES 細胞が残っていると、その未分化 ES 細胞から腫瘍が形成される。そして、そのことが ES・iPS 細胞を用いた再生医療の実現化において最も大きな障害となると考えられている。従って、より安全な再生医療を目指すには、ES もしくは iPS 細胞の分化多能性を維持したまま腫瘍原性を消失させるのが必要不可欠である。また、この点に視点を置いた研究を行うことは、ES 及び iPS 細胞の腫瘍原性が、これらの細胞の多分化能及び自己複製能という ES 細胞特有の性質とどの程度関連しているのかを理解することにつながることを期待される。しかしながら、ES 及び iPS 細胞の腫瘍原性を規定する因子や、腫瘍原性と分化多能性との間にどの程度関連があるのかについてはほとんど明らかにされていない。そこで、申請者は腫瘍原性欠失 ES/iPS 細胞の樹立を試みると同時に、腫瘍原性の分子機序を明らかにするため、がん抑制遺伝子である LATS2 に注目し研究を始めた。

## 2. 研究の目的

LATS2 はセリン・スレオニンキナーゼをコードする癌抑制遺伝子である。LATS2 が ES 細胞の腫瘍原性を減弱させるか否かを検討し、ES 細胞における腫瘍原性メカニズムの解明、及びその克服が本課題の目的である。

## 3. 研究の方法

HA タグをつないだ LATS2 (HA-LATS2) を安定的に発現する細胞を樹立し、LATS2 強制発現細胞における増殖性や腫瘍原性を評価した。この細胞では、普遍的な発現を示す ROSA26 遺伝子座において、LATS2 遺伝子 (cDNA) を tTA と TRE の下流に組み込んであるため、LATS2 の遺伝子発現を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) の有無により制御可能である (図 1)。

腫瘍原性については、LATS2 強制発現細胞をヌードマウスの皮下にインジェクションした後形成されるテラトーマの大きさを評価した。

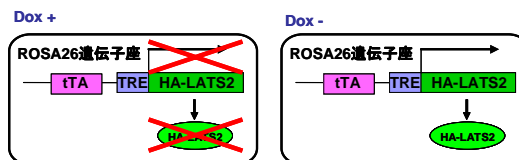


図 1. LATS2 強制発現細胞

この細胞では LATS2 を tet-off システムで制御することが可能である。すなわち、Dox 存在下においては、ROSA26 遺伝子座からの HA-LATS2 の発現は認められない (左図) 一方で、Dox 非存在下においては LATS2 の発現が認められる (右図)。

## 4. 研究成果

LATS2 はセリン・スレオニンキナーゼをコードする癌抑制遺伝子である。LATS2 は p53 を安定化させることや、Aurora キナーゼによりリン酸化の制御を受けることが知られている。

ES 細胞の腫瘍原性に及ぼす LATS2 の影響を検討するため、LATS2 cDNA が ROSA26 遺伝子座に組み込まれた細胞を樹立した。この細胞において LATS2 の発現が Dox により制御可能か否かを検討した結果、予想通り LATS2 の発現が Dox によって制御可能であることが明らかとなった (図 2)。この細胞を用いて以下の検討を行った。

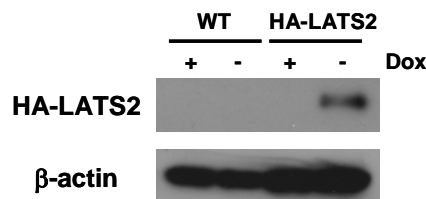
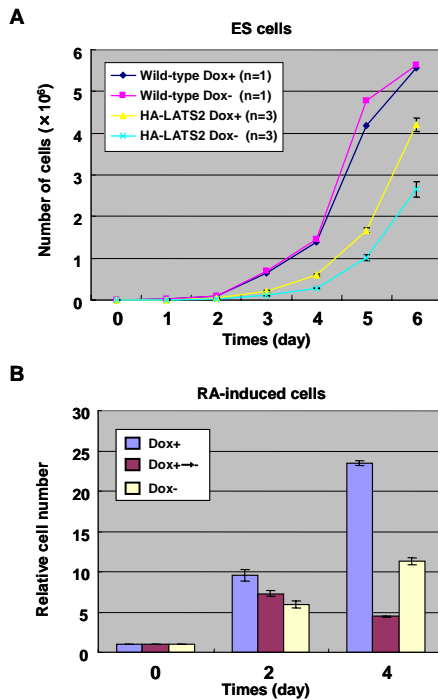


図 2. HA-LATS2 の発現確認

野生型の ES 細胞 (WT) と HA-LATS2 強制発現細胞 (HA-LATS2) を用いたウェスタンブロット解析。Dox 非添加条件下で HA-LATS2 の発現が確認された。

### (1) ES 細胞の自己複製能に及ぼす LATS2 の影響の検討

LATS2 は癌抑制遺伝子として知られている。ES 細胞の増殖能に LATS2 強制発現が影響を及ぼすか否かを検討するため、野生型の ES 細胞と LATS2 強制発現細胞を同じ細胞数で播種し、6 日までの細胞数を計測した。その結果、野生型においては Dox 存在下・非存在下で細胞増殖能における差は認められなかった一方で、LATS2 強制発現細胞においては Dox 添加条件に比べて、Dox 非添加条件で顕著に増殖能の低下が認められた (図 3A)。この効果は ES 細胞を分化させる条件であるレチノイン酸を添加した条件でも認められた (図 3B)。このことから、LATS2 は ES 細胞の増殖能を低下させることが明らかとなった。

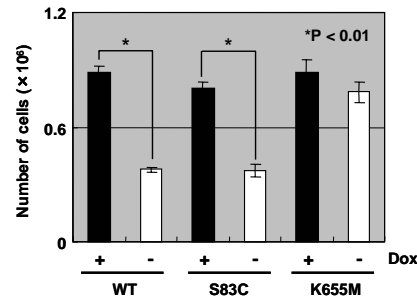


**図 3. ES 細胞の細胞増殖に及ぼす LATS2 強制発現の影響の検討**

(A) Dox 存在下 (Dox+) および Dox 非存在下 (Dox-) で培養した野生型 ES 細胞および LATS2 強制発現細胞を  $1 \times 10^4$  個播種し、翌日 (0 day) より 6 日目までの細胞数を計測した。

(B) Dox 存在下 (Dox+) および Dox 非存在下 (Dox-) で培養した野生型 ES 細胞および LATS2 強制発現細胞を  $1 \times 10^4$  個播種し、翌日 (0 day) より LIF を除いてレチノイン酸を添加 (分化誘導) し 4 日目までの細胞数を計測した。また、誘導性の LATS2 の役割を検討するため、Dox 存在下で培養した後、分化誘導時に Dox を除いた条件においても検討した (Dox+→-)。

LATS2 は様々な基質をリン酸化するキナーゼである一方で、LATS2 自身もリン酸化による修飾を受けることが知られている。LATS2 のセリン 83 番は Aurora キナーゼによりリン酸化されることが知られている。LATS2 の酵素活性や Aurora キナーゼによる影響を検討するため、LATS2 のキナーゼドメインに変異を入れた変異体 (K655M: リジン 655 番をメチオニンに置換) とセリン 83 番をシステインに置換した変異体 (S83C) を構築し、安定的に発現する細胞を樹立し、増殖能の解析を行った (図 4)。その結果、野生型 LATS2 発現細胞では観察された増殖抑制能が K655M 変異体では認められなかったことから、LATS2 の増殖抑制能にはキナーゼ活性が必要であることが明らかとなった。また、S83C については野生型と影響がなかったことから、セリン 83 番のリン酸化は LATS2 の増殖抑制能には関与しないことが示唆された。



**図 4. LATS2 の変異体を用いた検討**

野生型 LATS2 (WT)、S83C および K655M 変異体を発現する細胞を Dox 存在下 (Dox+) および Dox 非存在下 (Dox-) で培養した野生型 ES 細胞および LATS2 強制発現細胞を  $1 \times 10^4$  個播種し、播種後 4 日目の細胞数を計測した。

### (2) 腫瘍原性に及ぼす LATS2 の影響の検討

次にテラトーマ形成能に及ぼす LATS2 の影響について検討するため、Dox 存在下もしくは非存在下で培養した LATS2 強制発現細胞をヌードマウスの皮下にインジェクションした。その結果、Dox 存在下においてはテラトーマが形成された一方で Dox 非存在下においてはテラトーマ形成が認められなかった (図 5)。このことから、LATS2 は ES 細胞の腫瘍原性を減弱させることが明らかとなった。



**図 5. テラトーマ形成能に及ぼす LATS2 強制発現の影響の検討**

Dox 存在下 (Dox+) および非存在下 (Dox-) において培養した HA-LATS2 過剰発現細胞をヌードマウスの皮下に打ち込んだ。インジェクション後 1 ヶ月後にテラトーマを取り出した。形成されたテラトーマについては HE 染色した結果、様々な分化細胞が混在していることを確認した (data not shown)。

### (3) LATS2 の安定性についての解析

これまでの検討により、LATS2 が ES 細胞の増殖能や腫瘍原性を抑制することが明らかとなったものの、ES 細胞の未分化性に及ぼす影響については不明である。そこで、LATS2 の強制発現による ES 細胞の未分化性に及ぼす影響を検討するため、レチノイン酸添加前と添加後のタンパク質を回収し、ウェスタンブロット解析を試みた (図 6A)。その結果、予想外にも、強制発現している LATS2 の発現が減少していることが分かった。また RT-PCR の結果より、mRNA の発現には影響がなかった

ことから LATS2 の発現減少はタンパク質レベルで起こることが明らかとなった (図 6B)。次にこの減少がレチノイン酸による分化刺激によるものか否かを検討した結果、LATS2 の発現減少は未分化状態でも起こることが分かった (図 6C)。

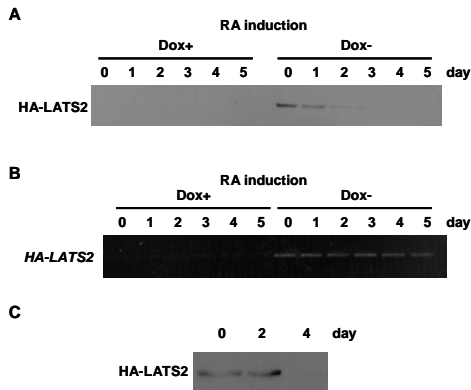


図 6. LATS2 の安定性についての検討

(A and B) Dox 存在下 (Dox+) および Dox 非存在下 (Dox-) で培養した LATS2 強制発現細胞を  $4 \times 10^6$  個播種し、翌日 (0 day) より LIF を除いてレチノイン酸を添加 (分化誘導) し 5 日目までの細胞からタンパク質もしくは RNA を回収し、ウェスタンブロット解析 (A) もしくは RT-PCR (B) を行った。(C) Dox 非添加条件下で培養した LATS2 強制発現細胞を  $4 \times 10^6$  個播種し、4 日目までの細胞を回収した。その後、細胞溶解液を用いてウェスタンブロット解析を行った。

興味深いことに LATS2 の発現は細胞を剥がして撒き直しをすることにより、回復することから (data not shown)、LATS2 タンパク質は細胞接着直後では安定しているものの、細胞増殖が活発化するにつれ減少していく可能性が示唆された。また接着後の LATS2 の不安定化はプロテアソーム阻害剤である MG-132 を添加してもあまり回復しなかったことから、LATS2 の不安定化にはユビキチン-プロテアソーム系が直接関与しない可能性が示唆された (図 7)。

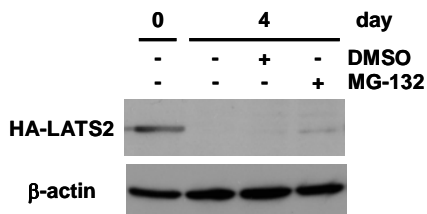


図 7. LATS2 の安定性についての検討

Dox 非添加条件下で培養した LATS2 強制発現細胞を  $4 \times 10^6$  個播種し、4 日間細胞を培養し、その後、MG-132 もしくは MG-132 を溶かした溶媒である DMSO を添加し、4 時間後に細胞を回収した。その後、細胞溶解液を用いてウエ

スタンブロット解析を行った。

以上、本研究により、LATS2 は ES 細胞における自己複製を負に制御することに加え、この効果には酵素活性が必要であることが明らかとなった。また、LATS2 は ES 細胞の腫瘍原性を減弱させることが示唆された。しかしながら、LATS2 タンパク質は細胞接着後に減少することが明らかとなり、ES 細胞には細胞増殖抑制因子を積極的に分解するシステムが存在する可能性が示唆された。実際、LATS2 の細胞増殖能における抑制効果は経時変化に伴い減少していくことからこの仮説は支持される。LATS2 は Aurora キナーゼにリン酸化されることが知られており、様々な因子により翻訳後修飾を受けることが想定される。従って、LATS2 の不安定性メカニズムにはこのような修飾が関与することが考えられる。LATS2 強制発現細胞に Aurora キナーゼを導入すると、空ベクターを導入したコントロール細胞と比較して、LATS2 の発現が部分的に上昇したものの、LATS2 の発現減少を阻止することができなかった (data not shown)。また、MG-132 を処理してもあまり影響が認められなかったことから、未知の不安定性メカニズムの存在が考察される。今後、LATS2 の安定化メカニズムを解明することにより、ES 細胞の自己複製メカニズムや腫瘍形成メカニズムを明らかにすることが期待される。また、このメカニズムが解明されることにより、ES・iPS 細胞の腫瘍原性克服の道が開けるものと期待される。

## 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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

菱田 友昭 (埼玉医科大学・医学部・研究員)

研究者番号 : 80521062

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :