

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32612
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22310121
 研究課題名（和文） IVV法を用いたiPS細胞における潜在的腫瘍形成能に関する分子機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanisms on potentiality of tumorigenesis in iPS cells by IVV method
 研究代表者
 柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)
 慶應義塾大学・理工学部・訪問教授
 研究者番号：40327672

研究成果の概要（和文）：

本研究では、人工多能性幹細胞（iPSC）の初期化因子であるLin28、Nanog、Klf4の新たな機能を明らかにするために、それぞれに関して我々が開発した独自技術の*in vitro* virus (IVV) 法を用いてタンパク質間相互作用の解析を行った。その結果、Lin28の相互作用因子としてTnp2が、Nanogの相互作用因子としてNap1が、Klf4の相互作用因子としてegfr mRNAがそれぞれ同定された。Tnp2とLin28は、Msi1を強制発現させたmESCにおいて共局在し、相互作用することが明らかになった。Nap1をノックダウンすると、Nanog、Oct4、Sox2の発現量が減少し、過剰発現させるとこれらの初期化因子のmRNAの量が増加した。その結果、Nap1はNanogと相互作用し、その転写活性を促進していることがわかった。細胞増殖およびアポトーシス抑制に関わるegfr mRNAのCDS領域断片が配列特異的にKlf4と結合することが示された。さらに、ヒト前立腺癌細胞PC-3にKlf4を一過性発現させた結果、EGFRタンパク質の大幅な発現量上昇が確認できた。マウス線維芽細胞からiPS細胞誘導までのEGFRおよびKlf4の発現量推移を経時的に観察した結果、双方の発現量上昇が同じ段階で起きていることから、iPS細胞誘導時においてもKlf4がEGFRの発現量を上昇させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We comprehensively investigated protein-protein interactions (PPIs) of Lin28, Nanog, and Klf4 by mRNA display using the *in vitro* virus (IVV) method. As a result, we identified Trp2 as a new Lin28-associated factor, Nap1 as a new Nanog-associated factor, and egfr mRNA as a new Klf4-associate factor, respectively. We confirmed co-localization and interaction of Tnp2 and Lin28 in mESC with forced expression of Msi1. Knockdown of Nap1 decreased expression of Oct4, Sox2, and Nanog in mESCs, while overexpression of Nap1 elevated the mRNA levels of Sox2 and Nanog. Nap1 and Nanog were co-immunoprecipitated with p300 in mESC lysate. Klf4 showed sequence-specific binding to the CDS region of egfr mRNA which is a well-known regulator of cell proliferation and apoptosis. The overexpression of Klf4 in PC-3 cells resulted in an increase in EGFR protein without affecting its mRNA expression level. These data suggest Klf4 regulates EGFR expression post-transcriptionally. A temporal observation of EGFR and Klf4 expression during induction of iPS cells from fibroblasts showed simultaneous up-regulation of EGFR and Klf4. These data strongly suggest that Klf4 regulates EGFR expression during reprogramming process of iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：ゲノム医科学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：In vitro virus Klf4 Lin28 Nanog iPS細胞 mRNA ディスプレイ
 分子機構 複合体

1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹 (induced Pluripotent Stem : iPS) 細胞は生物の各組織を構成する様々な細胞に分化する能力 (分化多能性) および半永久的に増殖し続ける能力 (未分化能) を併せ持っている。それゆえiPS細胞に関する研究は発生・分化や疾患のメカニズムの解明にとどまらず、より安全な薬剤の開発や再生医療につながるものとして期待されている。マウスiPS細胞の分化誘導により作製された体細胞の移植例が報告されているが、移植したときに腫瘍がかなり高効率に形成される。iPS細胞の分化多能性および未分化能を維持するために必要ないくつかの因子のうち、Klf4, Lin28, およびc-Myc (以下、鍵因子と称する) は他の細胞においては細胞増殖および (あるいは) 腫瘍形成に関わる因子でもある。これら鍵因子群の分子機構についてはある程度解明はされているものの、既存の手法の制約の理由によりまだ不明な点も多い。これまで我々は、*in vitro*にて表現型であるタンパク質とその遺伝子型であるmRNAをピューロマイシンを介して共有結合により連結させる我が国独自の技術である*in vitro virus* (IVV)法を用いて、タンパク質相互作用解析を行い、既存の手法では得られなかった新規なタンパク質間相互作用を数多く見出すことに成功した。

2. 研究の目的

iPS細胞の分化多能性および未分化能の維持に必須かつ腫瘍形成に関わる可能性のある鍵因子群 Lin28, Nanog, Klf4 と相互作用する因子を IVV 法によって探索し、これら鍵因子群の分子機構の全容を明らかにすることにより、iPS細胞内における腫瘍形成に関わる因子の分子機構の解明を目指す。具体的

には、鍵因子群と相互作用する因子 (タンパク質) の IVV スクリーニングを行い、選択された相互作用候補について様々な相互作用の検証実験を行い、鍵因子と相互作用因子の複合体の実態および機能 (標的 DNA 配列など) を解明し、同時に腫瘍マーカーとなりうる因子に関する知見を得ていく。

3. 研究の方法

本研究は以下 ①~⑥のプロセスにより構成される。①:IVV ライブラリーの構築、②:各鍵因子と相互作用する因子のスクリーニング、③:スクリーニングされた相互作用候補因子の検証実験、④:鍵因子と相互作用因子の複合体の標的シス DNA エLEMENTの探索、⑤:鍵因子と相互作用因子の複合体と相互作用する因子の探索、⑥:鍵因子と相互作用因子の複合体のセルベースアッセイ等による機能検証

初年度は①-③を行い、各鍵因子に相互作用しうる因子の同定および検証を目指す。次年度以降は前年度で得られた「鍵因子-相互作用因子」複合体の機能についての検証を目指し、④および⑤の実験を行い、⑥セルベースアッセイ等による機能検証を行う。

4. 研究成果

人工多能性幹細胞 (iPSC) は、Nanog、Oct4、Sox2、Lin28 およびGlis1 などの初期化因子を強制発現させることで、体細胞から人工的に誘導される多能性幹細胞である。iPSC はその性質から医学への応用が期待されている。本研究ではLin28、Nanog、Klf4の新たな機能を明らかにするために、それぞれに関してタンパク質間相互作用の解析を行った。この成果はiPSCの形成過程および挙動の制御を達成するための手がかりとなる。

Lin28 は初期化因子の一つであり、RNA 結合因子として知られる。一方で、タンパク質間相互作用に関しては研究が初期段階にある。そこで我々はIVV法によるLin28 タンパク質間相互作用解析を行った。Lin28 ベイトタンパク質およびマウス胚性幹細胞 (mESC) 由来のcDNA ライブラリーを用いてIVV セレクションを行い、Lin28 相互作用因子としてTnp2を同定した。実験の結果から、Tnp2 とLin28 は、Msi1 を強制発現させたmESC において共局在し、相互作用することが明らかになった。この結果は、Msi1 を発現する精原細胞においてTnp2とLin28 が相互作用することを示唆している。また、精子形成過程におけるLin28 の役割を示唆し、iPSCを介した体細胞からの精子の誘導並びにそれを利用した生殖補助医療に寄与しうる。

Nanog は細胞の初期化の根幹をなす転写因子であり、様々な因子と相互作用し、初期化やESCおよびiPSC の多能性維持に寄与することがわかっている。細胞初期化におけるNanog の新たな働きを明らかにするために、IVV 法によってNanog 相互作用因子の探索が行われ、Nap1 が同定された。Nap1 には全長のものとはN末端を欠いた形態(Nap1ΔN)が存在する。mESC の分化誘導アッセイを行った結果、全長のNap1 は分化の程度によらずに発現していた。一方で、Nap1ΔN は未分化な状態でのみ発現していた。このことは、Nap1ΔN が未分化な細胞でのみ機能を持つことを示唆している。続いて、293T 細胞内でNap1ΔN がNanog と結合し、全長のNap1 はNanog との結合が見られないことを示した。しかし、mESC では全長のNap1 とNap1ΔN の両方がNanog と結合していることがわかった。次に、mESC でのNap1 のノックダウンおよび過剰発現の影響を評価した。Nap1 をノックダウンすると、

Nanog、Oct4、Sox2 の発現量は減少した。Nap1 を過剰発現させるとこれらの初期化因子のmRNA の量は増加した。以上の結果から、Nap1 がNanog と相互作用し、その転写活性を促進しているといえる。この現象は、Nap1 がNanog を含む転写因子複合体にp300 をリクルートすることでNanog 標的遺伝子を開いた構造に変えることで生じると考えられる。

iPS細胞誘導因子の1つであるKlf4は、未分化維持および自己増殖に関わることが知られているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。IVV法を用いてKlf4と相互作用するタンパク質を探索したところ、予想外にKlf4のC末端にあるジンクフィンガードメインにegfrのmRNA等が結合することが示された。RNA結合タンパク質の中にはジンクフィンガーを介してRNAと結合し、翻訳を制御している例がいくつか知られており、Klf4が同様の制御をしている可能性が考えられた。そこで、更にGenomic SELEX法によりKlf4と結合するmRNAを網羅的に探索・同定し、機能解析することを試みた。

マウスES細胞由来のcDNAライブラリーを用いてGenomic SELEX法によるセレクションを行った結果、複数のKlf4結合候補mRNAを得た。それらのmRNAについて*in vitro*での結合検証を行った結果、細胞増殖およびアポトーシス抑制に関わるegfr mRNAのCDS領域断片が配列特異的にKlf4と結合することが示された。さらに、ヒト前立腺癌細胞PC-3にKlf4を一過性発現させた結果、EGFRタンパク質の大幅な発現量上昇が確認できた。その際、egfr mRNAの発現量に変化はなかったことから、Klf4がEGFRの発現量を転写後の段階で上昇させている可能性が高いことが示唆された。加

えて、マウス線維芽細胞から iPS 細胞誘導までの EGFR および Klf4 の発現量推移を経時的に観察した結果、双方の発現量上昇が同じ段階で起きていることから、iPS 細胞誘導時においても Klf4 が EGFR の発現量を上昇させている可能性が示唆された。今後は、Klf4 が EGFR の発現を転写後レベルで上昇させる機構の解明および既知誘導因子に加えて EGFR を導入することで iPS 細胞の作製効率が上昇するか否かを検証する必要がある。もし、EGFR を導入することで iPS 細胞の作製効率が上昇すれば、iPS 細胞の医学研究および臨床応用に貢献できると思われる。

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 13 件)

1. Tateyama, S., Yanagawa, H. Application of mRNA display for *in vitro* selection of DNA-binding transcription factor complexes, *Methods Mol. Biol.*, 977, 2013, 95-109, 査読有, DOI: 10.1007/978-1-62703-284-1
2. Shiheido, H., Terada, F., Tabata, N., Hayakawa, I., Matsumura, N., Takashima, H., Ogawa, Y., Du, W., Yamada, T., Shoji, M., Sugai, T., Doi, N., Iijima, S., Hattori, Y., Yanagawa, H. A phthalimide derivative that inhibits centrosomal clustering is effective on multiple myeloma, *PLoS ONE*, 7, 2012, e38878, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0038878
3. Shiheido, H., Naito, Y., Kimura, H., Genma, H., Takashima, H., Tokunaga, M., Ono, T., Hirano, T., Du, W., Yamada, T., Doi, N., Iijima, S., Hattori, Y., Yanagawa, H. An anilino-quinazoline derivative inhibits tumor growth through interaction with hCAP-G2, a subunit, of condensin II, *PLoS ONE*, 7, 2012, e44889, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0044889
4. Sumida, T., Yanagawa, H., Doi, N. In vitro selection of Fab fragments by mRNA display and gene-linking emulsion PCR, *J. Nucleic Acids*, 2012, 2012, 371379, 査読有, DOI: 10.1155/2012/371379
5. Shiheido, H., Takashima, H., Doi, N., Yanagawa, H. mRNA display selection of an optimized MDM2-binding peptide that potently inhibits MDM2-p53 interaction, *PLoS ONE*, 6, 2011, e17898, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0017898
6. Doi, N., Yamakawa, N., Matsumoto, H., Yamamoto, Y., Nagano, T., Matsumura, N., Horisawa, K., Yanagawa, H. DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells, *PLoS ONE*, 7, 2011, e30084, 査読有, DOI: 10.1371/journal.pone.0030084
7. Yanagawa, H., Development of IVV method into drug discovery, *Drug Delivery System*, 26, 2011, 571-583, 査読有, URL: <http://square.umin.ac.jp/>
8. Ozawa, Y., Saito, R., Fujimori, S., Kashima, H., Ishizaka, M., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M. Protein complex prediction via verifying and reconstructing the topology of domain-domain interactions, *BMC Bioinformatics*, 11, 2010, 350-361, 査読有, DOI: 10.1186/1471-2105-11-350
9. Chiku, M., Horisawa, K., Doi, N., Yanagawa, H., Einaga, Y. Electrochemical detection of tyrosine derivatives and protein tyrosine kinase activity using boron-doped diamond electrode, *Biosensors and Bioelectronics*, 9, 2010, 235-240, 査読有, DOI: 10.1016/j.bios.2010.06.027
10. Nakagawa, Y., Yugi, K., Tuge, K., Itaya, M., Yanagawa, H., Sakakibara, Y. Operon structure optimization by random self-assembly, *Natural Computing*, 9, 2010, 173-181, 査読有, DOI: 10.1007/s11047-009-9141-0
11. Naruse, M., Suetomo, H., Matsubara, T., Sato, T., Yanagawa, H., Hoshi, M., Matsumoto, M. Acrosome reaction-related steroidal saponin, Co-ARIS, from the starfish induces structural changes in microdomains, *Developmental Biology*, 347, 2010, 47-153, 査読有, DOI: 10.1016/j.ydbio.2010.08.019
12. Tanaka, J., Doi, N., Takashima, H., Yanagawa, H. Comparative characterization of random-sequence proteins consisting of 5, 12, and 20 kinds of

- amino acids, *Protein Sci.*, 19, 2010, 235-240, 査読有, DOI: 10.1002/pro.358
13. Horisawa, K., Imai, T., Okano, H., Yanagawa, H. The Musashi family RNA-binding proteins in stem cells, *Biomolecular Concepts*, 1, 2010, 59-66, 査読有, DOI: 10.1515/BMC.2010.005
- [学会発表] (計 18 件)
1. Shiheido, H., Terada, F., Naito, Y., Tabata, N., Kimura, H., Hayakawa, I., Genma, H., Matsumura, N., Takashima, H., Tokunaga, M., Ogawa, Y., Ono, T., Hirano, T., Du, W., Yamada, T., Shoji, M., Sugai, T., Doi, N., Iijima, S., Hattori, Y., Yanagawa, H. Target identification of antitumor drugs against intractable tumors by mRNA display, 35th MBSJ 2012, Dec. 13, 2012, Fukuoka
 2. Tokunaga, M., Shiheido, H., Tabata, N., Sakuma, Y., Takashima, H., Horisawa, K., Doi, N., Yanagawa, H. An anilinoquinazoline derivative Q15 induces apoptosis through interacting with MIP-2A, 35th MBSJ 2012, Dec. 13, 2012, Fukuoka
 3. Suzuki, H., Tabata, N., Sakuma, Y., Yoshimura, Y., Tsuji, T., Shoji, M., Sugai, T., Shimizu, T., Saya, H., Doi, N., Yanagawa, H. Screening of natural products against induced cancer stem cells, 35th MBSJ 2012, Dec. 13, 2012, Fukuoka
 4. Ota, K., Tateyama, S., Horisawa, K., Doi, N., Yanagawa, H. Exploration and characterization of a novel target gene for an iPS cell inducible factor, KLF4, 35th MBSJ 2012, Dec. 13, 2012, Fukuoka
 5. 柳川 弘志, タンパク質の相互作用からゲノム創薬への展開、慶應義塾大学工学部生命情報学科 10 周年記念シンポジウム、2012 年 4 月 28 日、横浜 (招待講演)
 6. Sato, R., Doi, N., Mitsui, S., Shoji, S., Matsushima, K., Yokochi, S., Yanagawa, H. *In vitro* evolution of high-affinity anti-CCR5 single chain Fv via neutral drift libraries, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama
 7. Tokunaga, M., Shiheido, H., Hayakawa, I., Takashima, H., Yanagawa, H. FK506 inhibits the function of hereditary spastic paraplegia protein spartin, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama
 8. Umezawa, H., Tabata, N., Sakuma, Y., Takenaka, Y., Matsumoto, Y., Doi, N., Nagano, O., Saya, H., Yanagawa, H. *In vitro* selection of anti-CD44vsc Fv inhibiting CD44v-xCT interaction, 34th MBSJ 2011, Dec. 13, 2011, Yokohama
 9. Tabata, N., Sakuma, Y., Shimizu, T., Saya, H., Ogawa, Y., Shoji, M., Sugai, T., Doi, N., Yanagawa, H. Screening of anilinoquinazoline derivatives inhibiting migration and invasion of induced cancer stem cells and their action mechanism, 34th MBSJ 2011, Dec. 14, 2011, Yokohama
 10. Tateyama, S., Nagano, O., Tamada, M., Saya, H., Doi, N., Yanagawa, H. *In vitro* virus (IVV) method revealed an interaction between CD44 and pyruvate kinase M2 (PKM2), 34th MBSJ 2011, Dec. 14, 2011, Yokohama
 11. Tokunaga, M., Shiheido, H., Hayakawa, I., Utsumi, A., Takashima, H., Doi, N., Horisawa, K., Yanagawa, H. *In vitro* selection of a novel FK506-binding protein by using mRNA display, EMBO Molecular Medicine Conference: Molecular Insights for Innovative Therapies, Dec. 2, 2011, Heidelberg, Germany
 12. 舘山誠司、永野修、佐谷秀行、柳川弘志、*In vitro* virus (IVV)法を用いた CD44 を介した遺伝子発現制御機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 12 日、神戸
 13. 下門大祐、舘山誠司、土居信英、柳川弘志、*In vitro* virus 法による Lin28 相互作用因子の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、2010 年 12 月 12 日、神戸
 14. Tateyama, S., Kodama, T., Ohta, K., Yanagawa, H. Molecular interaction network of KLF4 using mRNA display, 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec., 18, 2010, Honolulu, U.S.A.
 15. 鈴木裕也、寺田 露子、内藤悠平、柳川弘志、杜ぶん林、山田健人、土居信英、飯島史朗、松下麻衣子、田原佳代子、服部豊、ハイリスク骨髄腫克服のためのスクリーニングシステムの構築、第 54 回日本薬学会関東支部大会、2010 年 10 月 2 日、八王子
 16. 始平堂弘和、土居信英、柳川弘志、mRNA ディスプレイ法により選択された MDM2 結合ペプチドは MDM2-p53 相互

- 作用を強力に阻害する、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 25 日、大阪
17. 内藤悠平、鈴木裕也、尾崎由枝、柳川弘志、杜ぶん林、山田健人、土居信英、飯島史朗、松下麻衣子、田原佳代子、服部豊、新規アニリノキナゾリン誘導体を用いた *in vivo* におけるハイリスク多発性骨髄腫の治療効果、第 69 回日本癌学会学術総会、2010 年 9 月 25 日、大阪
 18. 柳川弘志, *In vitro virus(IVV)*法を用いた次世代タンパク質機能解析システム、第 10 回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「蛋白質研究法：先進計測・解析技術の新展開」, 2010 年 6 月 16 日, 札幌(招待講演)

[図書] (計 5 件)

1. Tanaka, J., Yanagawa, H., Doi, N. InTech, Evolutionary Engineering of Artificial Proteins with Limited Sets of Primitive Amino Acids. IN: Protein Engineering, 2012, pp.59-74
2. Tateyama S, Yanagawa H. Useful method to search for DNA-binding transcription factor complexes using mRNA. In “Methods in Molecular Biology”, ed. T.Ogawa, in press, InTech, 2012, pp.
3. Horisawa, K., Yanagawa, H. InTech, The Musashi proteins in neural stem cell/progenitor cells, IN: Neural Stem Cells and Therapy, 2011, pp. 205-222
4. Doi, N., Kakukawa, K., Oishi, Y., Yanagawa, H. John Wiley & Sons Ltd, Chemical Synthetic Biology, 2011, pp.121-138
5. 柳川弘志、土居信英、岩波書店、生体高分子の進化学、現代生物科学入門第 9 巻：合成生物学、2010、34 (1 - 34)
6. 柳川弘志、教育社、Newton(ニュートン): 無生物から生物ができる-生命誕生の不思議、2010、No.11, pp.22-53

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳川 弘志 (YANAGAWA HIROSHI)
慶應義塾大学・理工学部・訪問教授
研究者番号：40327672

(2) 研究分担者

舘山 誠司 (TATEYAMA SEIJI)
慶應義塾大学・理工学部・特別研究講師