

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 5 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590275

研究課題名（和文）c-Myc/Max 転写複合体による ES 細胞の未分化性維持の分子メカニズムの
解明研究課題名（英文）Uncovering the molecular mechanism of c-Myc/Max transcriptional
factor complex-mediated preservation of embryonic stem cell state

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

研究成果の概要（和文）：ES 細胞は、体を構成するあらゆる種類の細胞へと変換できる潜在能力と、その潜在能力を維持したまま、培養細胞株として、無限に維持できることで特徴付けられる細胞である。今までに、c-Myc を含む Myc ファミリータンパク質も、Oct3/4 タンパク質同様、それらの ES 細胞が持つ 2 つの特質を維持する上で必須であることが示唆されていたが、ジーンターゲティングの見地から、その点が確認されたことはなかったため、本研究課題では、Myc タンパク質が機能する上で必須である Max タンパク質をコードする遺伝子のホモ欠失 ES 細胞を樹立し、解析した。

研究成果の概要（英文）：Embryonic stem (ES) cells are defined by their two remarkable properties, i.e., pluripotent and indefinite self-renewal properties. Although some papers had suggested the involvement of Myc family proteins including c-Myc protein for sustaining these prominent properties which ES cells have, this issue has never been addressed from the gene targeting analyses. Therefore, we conducted homozygous knockout of Max gene encoding an indispensable partner protein for all three Myc proteins (c-Myc, N-Myc and L-Myc) to exert their transcriptional activities as well as oncogenesis promoting activities.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：発生医学

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞は、神経、筋肉、内臓等、体を構成するあらゆる種類の細胞へと変換できる潜在能力と、正常細胞であるにも関わらず、不死化という操作を加えなくても、癌細胞と同様、培養細胞として無限に維持培養ができることが知られている。ES 細胞が持つ、これら 2 つの特徴的な性質は、Oct3/4、Sox2、Nanog などの数多くの転写因子によって支えられていることが知られている。癌原遺伝子の一つである c-Myc タンパク質に関しても、エストロゲン受容体との融合タンパク質を用いた実験などから、上記の ES 細胞が持つ特徴的な性質を維持する上で必須な遺伝子であることが示唆されていた。

2. 研究の目的

「背景」の項目に記載したように、本研究を始める前から、c-Myc タンパク質が、ES、細胞が未分化状態を維持する上で大いに貢献していることは示唆されていたが、c-Myc 遺伝子に関しては、Oct3/4 タンパク質などの他の ES 細胞の未分化性維持に関わる遺伝子の場合とは異なり、ジーンターゲットを用いた実験系により確定的に証明されていた訳ではなかった。それ故、本研究プロジェクトで持って、その研究を遂行することにした。但し、c-Myc タンパク質は、極めて配列が類似している N-Myc、及び L-Myc タンパク質と 1 つのファミリーを形成しており、かつ、c-Myc を含めた 3 種類の Myc タンパク質が ES 細胞でかなり高発現しているので、たとえば、c-Myc 遺伝子をホモ欠失させたとしても、functional redundancy の問題に遭遇することは容易に想像された。こういった状況を踏まえ、私たちは、この functional redundancy の問題を回避する方法を考え、Max 遺伝子をホモ欠失 ES 細胞を樹立することにした。Max タンパク質は、ホモダイマーを形成し、DNA に結合することはできるものの、それ自体では少なくとも転写を促進する能力は持たない。一方、3 種類の Myc タンパク質は、いずれもそれら単独では DNA に結合することができず、その為には、Max タンパク質と結合する必要がある、それ故、Max 非存在下では、Myc タンパク質は、タンパク質として細胞に存在したとしても、転写因子として機能できないのはもちろんの事として、DNA に結合することさえできないことが想定される。従って、Max ホモ欠失 ES 細胞は、c-Myc、N-Myc、L-Myc の Myc 遺伝子全てのホモ欠失 ES 細胞と同様なフェノタイプを呈するであろうと考えた。それ故、本研究プロジェクトでは、その仮説の下に、Max ホモ欠失 ES 細胞を樹立し、その ES 細胞でどのようなフェノタイプが生ずるかを解析することにした。

3. 研究の方法

ES 細胞の培養は、サイトカインの一つである Leukemia Inhibitory Factor (LIF) と血清を用いた、いわゆる、マウス ES 細胞の通常の培養条件で行った。Max ホモ欠失 ES 細胞は、tet off システムにより任意の cDNA を Doxycycline (Dox) により、その発現を任意にコントロールできる EBRTcH3 ES 細胞 (Masui S et al., Nucleic Acids Res 33, e43, 2005) を出発材料に用いた。Max 遺伝子ターゲットベクターは、Max 遺伝子のエキソン 3-5 が、beta-geo レポーター遺伝子と置き換わる用に設計されたプラスミドを作製し、制限酵素で 1 cut した後、エレクトロポレーション法により、ES 細胞に導入した。その後、G418 により、ベクターが導入された ES 細胞のコロニーを個別に回収し、Southern blot 法により、期待通り、Max 遺伝子座で相同組換えが起こっているクローンを選択した。その後、Max cDNA が tet off システムの制御で発現できる用にする為の操作 (Cre-loxP の系を用いた方法) を行った。そして、それらの操作を下したクローンに対し、高濃度の G418 (10mg/mL) の条件に曝し、その条件でも viability を示した ES 細胞クローンの中から、野生型の形で残っていた Max 遺伝子座も、beta-geo レポーター遺伝子と置き換わったクローンを Southern blot 解析により同定した。

3. 研究成果

(1) ES 細胞は、Max 遺伝子の発現の消失に伴い、未分化性の消失と細胞死のフェノタイプを呈する

作製した Max ホモ欠失 ES 細胞は、「研究の方法」の項に詳しく書いたように、単純な、Max 遺伝子に関するホモ欠失 ES 細胞ではなくて、ROSA26 遺伝子座に、Max cDNA が、tet off システムと共に導入されており、従って、本 ES 細胞では、Dox 非存在下では、ROSA26 遺伝子座からの十分な Max 遺伝子の発現量が確保されるが、培地に Dox を加えると、Max 遺伝子の発現はほぼ 0 になる。実際、この Max ホモ欠失 ES 細胞を Dox を含む培地で処理すると、Max 遺伝子の発現低下に伴い、ES 細胞としての未分化性が保てなくなることが確認された。その他、この ES 細胞が Max 遺伝子の発現の消失に伴って呈するもう一つ顕著なフェノタイプとして、細胞死があった。実際、Max ホモ欠失 ES 細胞は、Dox 添加後、4 日目くらいからアポトーシスのフェノタイプを示す用になり、8~10 日間で、ほぼ全滅する。

(2) Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する未分化性消失と細胞死

Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する 2 つの主なフェノタイプである、未分化性の消失と、細胞死のそれぞれに関して、それらを緩和できる可能性のある様々な薬剤を試したところ、p38MAPK、Sirt1、p53 に対する阻害剤が、ある程度効果を示すことが明らかになった。また、それら 3 つの薬剤は、未分化性消失と細胞死の 2 つのフェノタイプに対して異なる効果を示し、p38MAPK に対する阻害剤に関しては、未分化性維持に対する効果はなく、細胞死の連べルを下げるのみであったのに対して、Sirt1 に対する阻害剤は、未分化性維持と、viability を保つという両方の効果を発揮することがわかった。p53 に対する阻害剤も、両方のフェノタイプを抑える効果を示したが、未分化性維持に対する効果は、Sirt1 に対する阻害剤よりも遥かに弱い効果しか示さなかった。

(3) Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する未分化性消失と細胞死の順序に関する法則の発見

興味深いことには、活性型 caspase-3 と ES 細胞の未分化マーカーである Oct3/4 の共免疫染色や、ファックス解析から、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する未分化性の消失と細胞死の 2 つのフェノタイプは、決してランダムに起こるのではなくて、ES 細胞の細胞死は、未分化性が既に消失しているものに限定して起こっているということが明らかになった。換言すると、Max ホモ欠失 ES 細胞が細胞死を呈する為には、予め、ES 細胞の未分化性が消失していることが前提であると言える。この Max ホモ欠失 ES 細胞において、細胞死に先んじて ES 細胞としての未分化性があるという法則を、私たちは Compulsory ordered mechanism と命名した。

(4) Max ホモ欠失 ES 細胞は、Nanog の強制発現により完全にレスキューされる

上記の Compulsory ordered mechanism という法則が絶対的なものであるならば、例えば、Nanog 等、強力に ES 細胞の未分化性を維持する機能を持つ遺伝子を強制発現させることで、Max ホモ欠失 ES 細胞は、その未分化状態も保つことができ、かつ、細胞死に関しても回避できるのではないかという仮説を持った。そして、実際、Nanog を強制発現させることで、ES 細胞は、Max 遺伝子の発現が無くても、細胞死のフェノタイプを示さなくなり、かつ、少なくとも、ES 細胞としての無限の自己増殖性は維持できることが確認できた。

(5) グランドステート培養条件下に曝すことによる Max ホモ欠失 ES 細胞のレスキュー

なお、マウス ES 細胞は、「研究の方法」の項に記載したように、LIF と血清を用いた培養条件で培養するのが一般的であるが、2008 年

に、Austin Smith らのグループは、グランドステート培養条件といて、MAPK などの ES 細胞の分化に関わるキナーゼに対する阻害剤の存在下で培養すれば、ES 細胞は、ES 細胞が本来持つ能力でもって、ES 細胞としての未分化性を保つことができることを報告した(Ying et al., Nature 453, 519-523)。なお、その論文では、グランドステート培養条件下にある ES 細胞では、c-Myc タンパク質の量が異常に低いことが示されていた。その論文では、c-Myc タンパク質の量が低いことの意味について議論されていなかったが、私たちは、そのことは、グランドステート培養条件下にある ES 細胞は、c-Myc 非依存的に ES 細胞としての特質を維持していることを示唆しているデータである可能性を考え、実際、試して見て、その通りであることが確認出来た。

(6) 考察

本研究では、上記にあるように、(1)~(5)の 5 つの項目について、新たな発見があったわけであるが、最も意義のある発見は、項目(5)のグランドステートにおいては、Max 遺伝子の発現非依存的に ES 細胞の未分化性が維持できることを証明したことであろう。というのは、この発見が、ES・iPS 細胞を用いた再生医療の実現に対して直接的な貢献があるとは言えないかもしれないが、元来、ES・iPS 細胞は、それら細胞の未分化性の維持の為に c-Myc 癌原遺伝子のような危険な遺伝子に頼らざる負えないような細胞であるので、利用に伴ってのある程度の危険は覚悟しなくてはならないという概念が定着していたが、私たちの研究により、ES 細胞は、Oct3/4 といった遺伝子とは違って、未分化性維持の為に c-Myc 活性を必ずしも必要としないということが明らかにされたので、そのことが、ES・iPS 細胞を用いた再生医療に対する必要以上の恐怖心を少しでも下げることに貢献できれば幸であると考えている。

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 6 件)

1. Maeda I, Okamura D, Tokitake Y, Ikeda M, Kawaguchi H, Mise N, Abe K, Noce T, Okuda A, Matsui Y. Max was identified as a repressor of germ-cell related gene expression in mouse embryonic stem cells. Nat. Commun. 査読有、4 巻、2013、1754
2. Hikichi T, Matoba R, Ikeda T, Watanabe A, Yamamoto T, Yoshitake S, Tamura-Nakano M, Kimura T, Kamon M, Shimura M, Kawakami K, Okuda A, Okochi H, Inoue T,

- Suzuki A, Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 査読有、110 巻、2013、6412-6417
3. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Iseki H, Katano M, Kamon M, Hirasaki M, Nishimoto M, Okazaki Y, Okuda A. Sirt1, p53 and p38MAPK are crucial regulators of detrimental phenotypes of ESCs with *Max* expression ablation. *Stem Cells* 査読有、30 巻、2012、1634-1644
 4. Mariani J, Favaro R, Lancini C, Vaccari G, Ferri ALM, Bertolini J, Tonoli D, Latorre E, Caccia R, Ronchi A, Ottolenghi S, Miyagi S, Okuda A, Zappavigna V, Nicolis SK. Emx2 is a dose-dependent negative regulator of Sox2 telencephalic enhancers. *Nucleic Acids Res.* 査読有、40 巻、2012、6461-6476
 5. Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 査読有、9 巻、2011、37-49
 6. Suzuki K, Ohbayashi F, Nikaido I, Okuda A, Takaki H, Okazaki Y, Mitani K. Integration of exogenous DNA into mouse embryonic stem cell chromosome shows preference into genes and frequent modification at junctions. *Chromosome Res.* 査読有、18 巻 2010、191-201

[学会発表] (計 7 件)

1. Yosuke Moriyama, Hidemasa Kato, Keiko Hiraki, Shizuka Funayama, Yasushi Okazaki, Akihiko Okuda. “Reprogramming human cells into a humanized ground state” 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日) (一般ポスターからの選出、発表者 船山)
2. Tomoaki Hishida, Yuriko Nozaki, Yutaka Nakachi, Yosuke Mizuno, Yasushi Okazaki, Masatsugu Ema, Satoru Takahashi, Masazumi Nishimoto, Akihiko Okuda. “Context-dependent requirement of Myc/Max complexes for the maintenance of the indefinite self-renewal of ES cells” 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日) (一般ポスターからの選出、発表者 菱田)
3. Masazumi Nishimoto, Miyuki Katano, Toshiyuki Yamagishi, Tomoaki

- Hishida, Masayoshi Kamon, Yoko Nabeshima, Yo-ichi Nabeshima, Yoko Kuroki, Ryuichi Ono, Fumitoshi Ishino, Hidemasa Kato, Akihiko Okuda. “Eutherian-specific UTF1 gene is critical for the placental growth” 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日) (一般ポスターからの選出、発表者 西本)
4. 加門正義、菱田友昭、平木啓子、片野 幸、西本正純、加藤英政、奥田晶彦 「Partial iPS 細胞を真の iPS 細胞へと変換する能力を持つ遺伝子のゲノムワイドスクリーニングによる同定」 第 34 回日本分子生物学会年会 (横浜、パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13 日) (一般ポスターからの選出、発表者 加門)
 5. 奥田晶彦 「iPS 細胞誘導過程、及び pluripotency 獲得後における c-Myc/Max 転写複合体の役割」 再生医療実現化プロジェクト 第 4 回夏のワークショップ (大阪市 TKP 大阪梅田ビジネスセンター 2011 年 7 月 8 日)
 6. Tomoaki Hishida, Akihiko Okuda. “Ground state condition renders Myc activity redundant in ES cells for their indefinite self-renewal” 第 9 回幹細胞シンポジウム (東京都港区 泉ガーデンギャラリー 2011 年 5 月 14 日)
 7. Miyuki Katano, Hidemasa Kato, Jun Nomura, Akihiko Okuda “The Nexus between Nucleostemin and Nanog for the maintenance of ES cell pluripotency” 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 (神戸市 神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 10 日) (一般ポスターからの選出、口頭発表者 片野)

[図書] (計 1 件)

1. 片野 幸、加藤英政、奥田晶彦 (2010) 第 8 章 幹細胞と癌細胞で発現する Nucleostemin 遺伝子の役割: 細胞周期フロンティア 佐方功幸・稲垣昌樹・岸本健雄編: 共立出版 pp225-229

[その他]

2011 年 7 月 8 日の Cell Stem Cell への論文発表 (雑誌論文 No. 5) に伴い、産経新聞全国版 (ES 細胞がん遺伝子不要 -高品質 iPS 細胞作製も-) を筆頭に、各種新聞で取り上げられた。

6. 研究組織
 - (1) 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

(2)研究分担者

加藤 英政 (KATO HIDEMASA)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：50292123