

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 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700870

研究課題名（和文）Keap1-Nrf2 を介した酸化ストレスシグナルの幹細胞における役割

研究課題名（英文）Oxidative stress signal function in stem cells via keap1-Nrf2 system

研究代表者

守田 匡伸 (MORITA MASANOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10519094

研究成果の概要（和文）：酸化ストレス応答に関わる遺伝子群Keap1, Nrf2の遺伝子を欠損させたノックアウトES細胞を樹立して、酸化ストレス下での応答性を解析することにより、Keap1-Nrf2を介した酸化ストレスのメカニズムを解明することが本研究の目的である。今年度はKeap1ヘテロマウス同士の掛け合わせ、およびNrf2ヘテロ同士の掛け合わせから得られた胚盤胞からES細胞を樹立し、genotypeの判定によりKeap1ノックアウトES、Nrf2ノックアウトES細胞をそれぞれ樹立した。樹立したES細胞は野生型と同様にES細胞様の形状を維持し、幹細胞としての増殖能を保持していた。現在、胚様体形成によるES細胞分化系を行い、これら変異ES細胞の分化能を調べている。

研究成果の概要（英文）：New ES cells lines are generated from Nrf2, Keap1 null blastocytes. These Nrf2 KO and Keap1 KO ES cells are expected to have phenotypes in oxidative stress responses. Nrf2 and Keap1 null blastocytes are obtained from cross mating heterozygous mutant mice. Genomic PCR are used to determine the genotypes of established ES cells. Nrf2 and Keap1 null ES cells show typical ES-like morphologies. The ES cell lines also show expression pattern of ES cell markers. Embryoid body formation are used as ES differentiation system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：腫瘍学分野

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境

1. 研究開始当初の背景 活性酸素種などの酸化ストレスや外来異物に対する応答系の破綻は、様々な疾患の発症と密接に関わっ

ている。このような疾患を未然に防ぐ目的で細胞はストレスに対して素早い応答で対応し、恒常性を維持している。これまでの研究

から転写因子 Nrf2 が酸化ストレス・異物代謝応答系に関わる酵素遺伝子の一群を統一的に制御していることが明らかになっている。Nrf2 は、非刺激時では Keap1 分子を介してプロテアソーム依存的に分解されている。この Keap1 の Nrf2 分解促進作用は Keap1 と結合している Cullin3 ユビキチン複合体による Nrf2 ユビキチン化の促進による。しかし、酸化ストレスや親電子性物質の投与により、Nrf2 の分解が停止し、Nrf2 は速やかに核に蓄積し、標的遺伝子群を活性化する。

この酸化ストレスを感知し、酸化-抗酸化のバランスを調節するいわゆるレドックスのホメオスタシスにおいて Keap1-Nrf2 は重要な役割を果たしている。最近になって外来からの親電子性物質だけでなく生体内で合成される内在性の活性酸素種などの存在が明らかになったことから Keap1-Nrf2 システムは単に外来からの酸化ストレス応答だけでなく、細胞内のシグナル伝達の役目を担っていることがわかった。また様々ながん組織において Keap1 や Nrf2 への突然変異によって Nrf2 の活性が恒常的に活性化していることが報告されており、がん腫瘍形成にも Keap1-Nrf2 システムが深く関与していることが示唆されている。本研究では特にがん発生の初期段階における酸化ストレスに着目し、幹細胞/がん幹細胞ニッチにおける Keap1-Nrf2 システムを介した酸化ストレスの役割を解明することを目的とする。

がん遺伝子、がん抑制遺伝子の発見により細胞のがん化のメカニズムを分子レベルで語るできるようになりがんの理解は飛躍的に進んできた。とくに癌細胞の異常な増殖能に着目して研究を集中してきた結果、細胞周期のメカニズムと癌細胞がどのようにしてその正常な機構から逸脱しているかという点については様々な試料、角度から研究され、その理解は飛躍的に進んできた。一方、我々の身体の中ではがん細胞は正常細胞に囲まれているという事実は、これまでの研究においてあまり考慮されてこなかった。近年、正常細胞と変異細胞が互いの差異を認識し、両者の細胞内シグナル伝達に相互に影響を与えていることが明らかになってきた。また、癌腫瘍の形成過程において転移や腫瘍増殖はその機序がかなり解析されているが、がんの初期発生の機序は、少数からなる癌細胞を観察する難しさなどもあり、細胞レベル・分子レベルでの理解はまだ不明な点が多い。がん発生の初期段階では突然変異により生じた変異細胞（がん細胞/がん幹細胞）は正常細胞に囲まれた状態で増殖をする。このがん細胞周囲の環境を考慮すると、変異細胞自身の cell-autonomous な現象・シグナル伝達だけでなく変異細胞と正常細胞間の相互作用

用による non-cell-autonomous な現象・シグナル伝達もがん形成に大きく関わっていると考えられる。遺伝子破壊マウスの解析やヒト癌検体からの変異体の検出結果から、がん腫瘍形成に Keap1-Nrf2 システムが深く関与していることが明らかになっている。しかしながら Keap1-Nrf2 ががん形成のどの段階に寄与しているかはほとんど明らかになっていない。ある種の幹細胞やがん幹細胞において ROS レベルが低く保たれており、分化とともに ROS レベルは上昇することから細胞の未分化維持において酸化ストレスが何らかの役割を担っていると考えられる。

2. 研究の目的 *in vivo* でのさまざまな電子伝達反応の間に産生される活性酸素種 (ROS) は、一般的に細胞に対して有害であると考えられている。幹細胞やがん幹細胞では ROS が低く保たれているという観察結果から酸化ストレスが未分化細胞の増殖や分化の制御にも深く関与していることが近年の研究により明らかになってきた。本研究では酸化-抗酸化のバランス調節において中心的な役割を果たしている Keap1-Nrf2 システムが幹細胞やがん幹細胞内での ROS 濃度の調節を介して、未分化細胞の増殖と分化制御に関わっているという仮説から出発し、*in vivo*、*in vitro* の系を組み合わせる幹細胞ニッチにおける Keap1-Nrf2 システムを介した酸化ストレスの役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法 がん幹細胞の存在の証明は近年成功したが、がんの種類によりがん幹細胞マーカーも異なり、未だ同定法・培養法は確立されていない。そこで本研究では細胞同定としてのマーカーや培養法、分化系が確立しており、がん幹細胞とよく似た性質を保持していると考えられている胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いる。ES 細胞の樹立は往來難しいものであり、ES 細胞の樹立が不可能と考えられていたマウス系統もあったが、血清に代わる serum replacement の開発や培養条件の改善によって近年では ES 細胞を比較的簡単に樹立することが可能となった。当研究室で既に作製されている Keap1、Nrf2 の遺伝子破壊マウスを交配することによりホモ接合の胚盤胞を得、これからノックアウト ES 細胞を樹立する (図 1)。

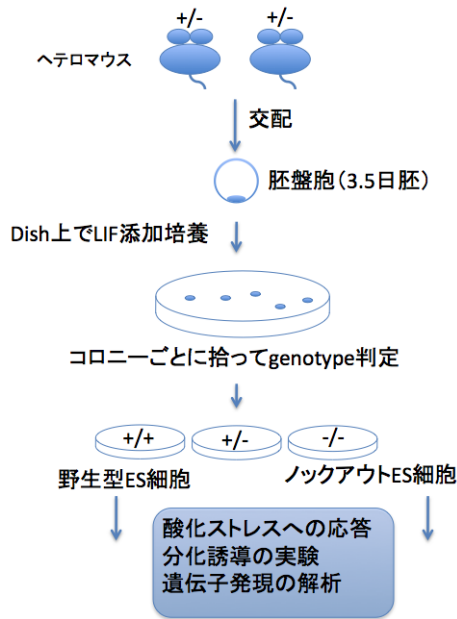


図1 ノックアウトES細胞作製法と解析の手順

新しく樹立したノックアウト ES は酸化ストレス感受性もしくは抵抗性を示すことが予測されるがその程度を酸化剤添加での培養により、幹細胞における Keap1-Nrf2 を介した酸化ストレス応答を解析する。またこれらノックアウト ES 細胞が、自己複製能や分化能といった幹細胞の性質を野生型と同様に保っているか機能解析を行う。具体的にはノックアウト ES 細胞を浮遊培養することにより embryoid body を形成させ、その後改めて付着培養することにより embryoid body を三胚葉系に分化させる。外胚葉、中胚葉、内胚葉それぞれのマーカーで定量的 PCR もしくは免疫染色によりノックアウト ES 細胞の分化能を調べる。この研究計画により幹細胞における酸化ストレスと Keap1-Nrf2 系の役割の解明が期待できるが in vitro の系であるがゆえに実際の生体内での現象と齟齬が起きる可能性がある。その欠点を補うために、本研究ではさらに生体内での酸化ストレス応答領域を決定すべき、以下に述べる酸化ストレス応答モニターマウスを作製し、解析する。DFO 等の蛍光色素を生きた培養細胞やマウス個体に投与することで、比較的簡便に生きた状態での ROS を測定することが既に可能となっているが、一度酸化ストレスを受けてその後正常状態に戻った細胞を検出するのは難しい。そこで Nrf2 の活性制御ドメインである Neh2 ドメインを Cre に融合させた Neh2-Cre トランスジェニックマウスを作製する。このマウスは定常状態において Cre タンパクはそれぞれ Keap1 との相互作用により分解されてしまうが、酸化ス

トレスで Cre タンパクは安定になり、ゲノム上に存在する loxP 配列を認識して loxP 間のゲノム配列を切り出すことができるようになる。このトランスジェニックマウスを ROSA26GFP マウスと掛け合わせることで、一度でも酸化ストレス状態になった細胞は恒常的に GFP を発現するようになり、定常状態に戻った後も GFP 陽性細胞として追跡することができる (図 2)。

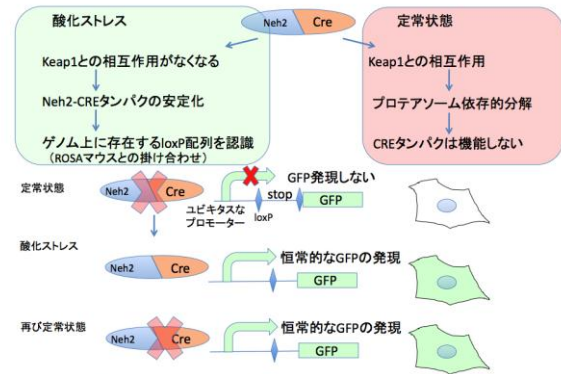


図2 酸化ストレスモニターマウス
安定化したCREタンパクにより恒常的なGFPを発現し始めた細胞はその後、定常状態になってCREタンパクが分解されるようになってGFPを発現し続ける

作製したノックアウト ES 細胞に GFP 発現ベクターを導入して、ノックアウト ES 細胞をあらかじめ GFP 標識しておく。ノックアウト ES 細胞は野生型の ES 細胞集団と共培養させてノックアウト ES 細胞が野生型 ES 細胞にとり囲まれている環境を作る。この混合 ES 細胞集団を用いて幹細胞分化系の実験を行う。ノックアウト ES 細胞は GFP 標識されているので容易に野生型 ES と区別がつくので、野生型 ES 細胞に囲まれた際のノックアウト ES 細胞の挙動および増殖能・分化能について調べる。特に野生型 ES 細胞と接している、境界上のノックアウト ES 細胞/野生型 ES 細胞については E-カドヘリンなどの接着因子や細胞骨格因子の発現様式に着目して解析を行う (図 3)。

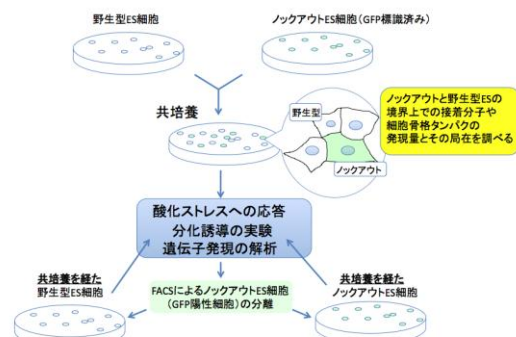


図3 共培養によるnon-cell-autonomousな現象の解析
あらかじめノックアウトESにGFPを導入して野生型ESと区別できるようにする。野生型との共培養により、遺伝子型が異なる細胞間での酸化ストレスに対するnon-cell-autonomousな応答を解析する。さらに共培養後のノックアウトと野生型ES細胞を分離して、前述図4と同様な実験を行い比較し、non-cell-autonomousな現象がcell-autonomousな変化を引き起こすか解析する。

4. 研究成果 Keap1 ヘテロマウス同士の掛け合わせ、および Nrf2 ヘテロ同士の掛け合わせから得られた胚盤胞から ES 細胞を樹立し、genotype の判定により Keap1 ノックアウト ES、Nrf2 ノックアウト ES 細胞をそれぞれ樹立した。樹立した ES 細胞は野生型と同様に ES 細胞様の形状を維持し、幹細胞としての増殖能を保持していた。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1件)

1. Masanobu Morita, Hozumi Motohashi.

(2011) Survival strategy and disease pathogenesis according to the Nrf2-small Maf heterodimer.

Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling. Wiley-Blackwell 63-82

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

守田 匡伸 (MORITA MASANOBU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10519094