

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390096

研究課題名(和文)細胞分化維持機構の破綻による発癌メカニズムの解明

研究課題名(英文)Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation

研究代表者

山田 泰広 (Yamada, Yasuhiro)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：70313872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：生体内で細胞初期化を誘導可能な4つの転写因子、Oct3/4, Sox2, Klf4, Mycを強制発現可能なマウスを作製した。生体内で体細胞が初期化できるマウスに不完全な細胞初期を誘導すると、小児芽腫に類似した癌が発生することを見いだした。発生した腎臓腫瘍細胞をFACSにて回収後、再度初期化因子を誘導することで腫瘍細胞からiPS細胞が樹立可能であった。腎臓腫瘍細胞由来iPS細胞で作製したキメラマウスでは、非腫瘍性の腎臓に寄与していることが確認された。iPS細胞の樹立、再分化には遺伝子配列の変化は必要としないことから、エピゲノム制御の変化が本発がん過程に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer is believed to arise primarily through accumulation of genetic mutations. Although induced pluripotent stem cell (iPSC) generation does not require changes in genomic sequence, iPSCs acquire unlimited growth potential, a characteristic shared with cancer cells. Here, we describe a murine system in which reprogramming factor expression in vivo can be controlled temporally with doxycycline (Dox). Notably, transient expression of reprogramming factors in vivo results in tumor development in various tissues consisting of undifferentiated dysplastic cells exhibiting global changes in DNA methylation patterns. We demonstrate that iPSCs derived from Dox-withdrawn kidney tumor cells give rise to nonneoplastic kidney cells in mice, proving that they have not undergone irreversible genetic transformation. These findings suggest that epigenetic regulation associated with iPSC derivation may drive development of particular types of cancer.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：iPS細胞 エピジェネティクス リプログラミング がん

## 1. 研究開始当初の背景

iPS/ES細胞は、遺伝子配列異常を持たないにも関わらず、自己複製能を有し、癌細胞に類似した特徴を持つ。このことは、細胞の分化状態制御により、体細胞に無限の増殖能を付与しうることを示唆している。細胞リプログラミング技術を用いて、細胞の分化状態の維持機構の破綻に続発する発癌モデルを構築し、その発癌メカニズムを解析することで、リプログラミングに関連した発癌やiPS細胞からの発癌を理解する。

## 2. 研究の目的

以下の2点を本研究の目的とした。

- 1) 細胞分化維持機構の破綻による発癌を示し、その発癌メカニズムを解明することにより、細胞リプログラミングによる発癌という疾患原理を確立し、新たな癌治療法開発に応用する。
- 2) リプログラミングによる発癌を解析することで、細胞分化異常の観点から iPS 細胞からの腫瘍形成メカニズム明らかにする。

## 3. 研究の方法

**【1】** 細胞初期化誘導マウスを用いた細胞分化 “point of no return” の同定と発癌モデルの作製および解析

ドキシサイクリン存在下で全身に初期化因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc) を発現誘導可能なマウスの解析を行う。様々な細胞種における細胞分化状態の可逆性を失う瞬間、つまり細胞分化状態維持の point of no return を決定する。アイデンティティを消失した細胞の、分化状態、増殖状態を病理組織学的に検討する。Rosa locus に M2rTA 遺伝子を、Colla1 locus に TetO-山中4因子をノックインしたES細胞を樹立し、ドキシサイクリン投与により全身で山中4因子を発現誘導可能なマウスを作製する。

**【2】** 細胞アイデンティティ消失過程、続発する腫瘍性病変のエピゲノム解析

上記**【1】**で作製した山中4因子一過性発現による発癌モデルを用いて、細胞アイデンティティ消失過程、続発する腫瘍性病変のエピゲノム解析を行う。分化細胞がアイデンテ

ィティを消失する過程でのエピジェネティック修飾変化、転写ネットワークの変化の同定を目指す。エピジェネティック修飾状態を転写状態と比較検討し、エピゲノム制御機構による細胞分化状態維持機構および腫瘍性増殖状態を規定するエピゲノム制御状態を明らかにする。

**【3】** ヒト小児癌におけるエピゲノム解析と細胞アイデンティティ消失による発癌モデルとの比較

一過性初期化因子発現後に出現する異型細胞増生は、病理組織学的に小児腎腫瘍 (ウィルムス腫瘍) や神経芽細胞腫などの小児癌に類似することが明らかとなった。小児癌臨床検体を用いて、一過性初期化因子発現後に出現する異型細胞増生との比較検討を行い、小児癌発生メカニズムの解明を試みる。マウスモデルから得られた新たな知見を、臨床検体を用いて確認する。

**【4】** iPS 細胞からの発癌におけるエピゲノム解析と細胞アイデンティティ消失による発癌モデルとの比較

iPS 細胞由来キメラマウスには、頻繁に腫瘍が発生することが知られる。腫瘍の組織像は、小児癌および一過性初期化因子発現による異型細胞増生に類似することが明らかとなった。iPS 細胞由来腫瘍と一過性初期化因子発現により生じる腫瘍とのエピゲノム状態の類似性を同定し、iPS 細胞からの発癌メカニズムの解明を試みる。また、それぞれの腫瘍で共通に関与しているエピジェネティック因子の同定を目指す。

**【5】** 腫瘍細胞からの iPS 細胞作製、およびその再分化誘導

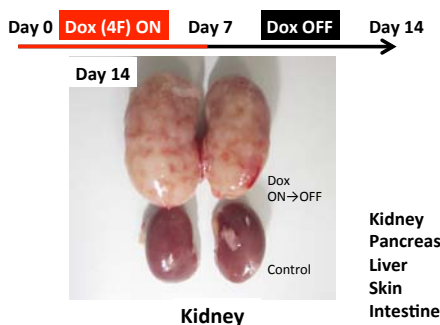
不完全な初期化に関連する発癌にはエピゲノム異常が関与していることが予想される。一過性初期化因子発現後に出現する異型細胞から iPS 細胞を作製することで、エピゲノム制御状態をリセットし、さらに再分化させることで、異型細胞の性質変化を検討する。

## 4. 研究成果

**【1】** 細胞初期化誘導マウスを用いた細胞分化 “point of no return” の同定と発癌モデルの作製および解析

マウスに初期化因子を誘導すると、数日で癌に類似した異型細胞が出現することが分かった。しかしながら、早期の異型細胞は初期化因子発現停止により速やかに消失し、少なくとも一部は正常に見える体細胞へと戻ること（リバージョン）が確認された。初期化因子を約7日間以上発現させると、異型細胞は初期化因子非依存性に自律的に増殖することが分かった。この“point of no return”は、腎臓をはじめ、肝臓、膵臓などに高頻度に認められた。自律性増生を示す異型細胞は、周囲脂肪組織に浸潤性増生を示し、一部ではリンパ節への転移を疑わせる所見も認め、癌細胞と類似した増殖形態を示すことが分かった。また、大部分のマウスが実験開始後3週間以内に腫瘍により死亡すること、ヌードマウスへの移植実験により腫瘍形成能を持つから、悪性細胞としての性格を有することが示唆された。不完全な細胞初期化に関連した発癌モデルが作製できた。

### Continuous dysplastic cell expansion after withdrawal of 4F expression



### 【2】細胞アイデンティティ消失過程、続発する腫瘍性病変のエピゲノム解析

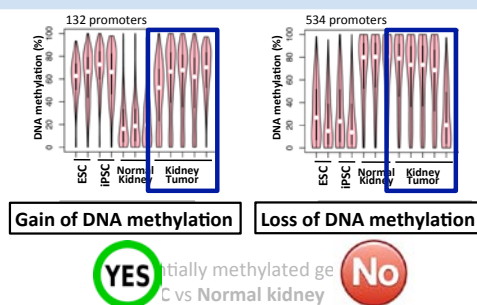
一過性初期化因子誘導により発生した腫瘍における遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、多能性幹細胞で活性化している Core モジュールおよび Myc モジュール（2010年 Orkin らが提唱）が、既に活性化していることが分かった。一方で、多能性幹細胞で抑制されている PRC モジュールが不完全な細胞初期化で発生した腫瘍細胞では脱抑制されていることを明らかにした。ポリコームによる遺伝子抑制が不十分であることが示唆された。

同様に腫瘍における DNA メチル化を Reduced Representation Bisulfate Sequencing

(RRBS 法)により解析した。腫瘍では多能性幹細胞特異的な DNA メチル化を既に獲得している一方で、腎臓細胞に見られる DNA メチル化をしばしば維持していることが分かった。iPS 細胞に向かう不完全な DNA メチル化状態の改変が生じていることが確認された。

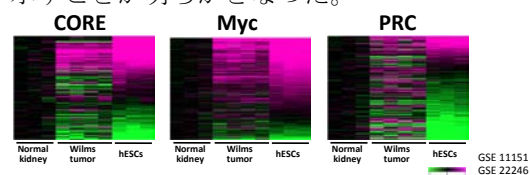
以上のことから、腫瘍細胞ではポリコームによる遺伝子抑制と、DNA 脱メチル化が不十分であることが示された。これらはいずれもエピゲノム制御機構であり、初期化に向かう不十分なエピゲノム改変が発がんに関与していることが明らかとなった。

### DNA methylation analysis of Dox-withdrawn tumors



### 【3】ヒト小児癌におけるエピゲノム解析と細胞アイデンティティ消失による発癌モデルとの比較

我々のマウス腎臓腫瘍は組織学的にウィルムス腫瘍に類似していた。遺伝子発現についても検討すると、マウス腫瘍で発現が亢進している遺伝子群は頻りにヒトウィルムス腫瘍でも発現亢進しており、類似性が確認された。さらにウィルムス腫瘍では、多能性幹細胞で活性化している Core モジュールおよび Myc モジュールがヒト胚性幹細胞と類似して活性化していた。さらに PRC モジュールの抑制不全も確認され、我々のマウス腎臓腫瘍と全く同様のモジュール活性化パターンを示すことが明らかとなった。



ウィルムス腫瘍ではインプリント遺伝子の一つである *Igf2* の両アレルからの発現が見られ、インプリント遺伝子の発現異常が高頻度

に観察される。我々のマウスモデルにおいてもインプリント遺伝子のメチル化異常を伴う発現変化が確認されており、エピジェネティック修飾異常にも類似性が見られた。

不完全な細胞初期化に関連して発生した腫瘍はヒトウィルムス腫瘍と様々な点において類似性を有していることが確認された。

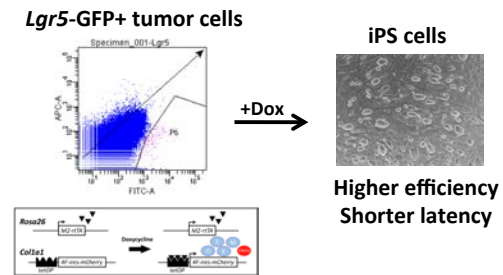
**【4】iPS細胞からの発癌におけるエピゲノム解析と細胞アイデンティティ消失による発癌モデルとの比較**

本研究計画の発案当初は iPS 細胞の作製にレトロウイルスやレンチウイルスが用いられ、外来遺伝子のゲノムへの挿入を伴っていた。その後、マウス iPS 細胞からの発癌の多くは、外来遺伝子の再活性化が関与していることが示唆されている。本研究結果を考慮すれば、外来遺伝子の再活性化による不完全な細胞初期化が発癌の原因となっていたことが予想される。一方で、現在の iPS 細胞は外来遺伝子の挿入が無い方法での樹立法が確立されており、外来遺伝子再活性化による発癌のリスクは解消されていると判断される。今後は、iPS 細胞から生じうるあらゆる発癌リスクを検討することで、さらなる安全性の向上につながる事が予想される。

**【5】腫瘍細胞からの iPS 細胞作製、およびその再分化誘導**

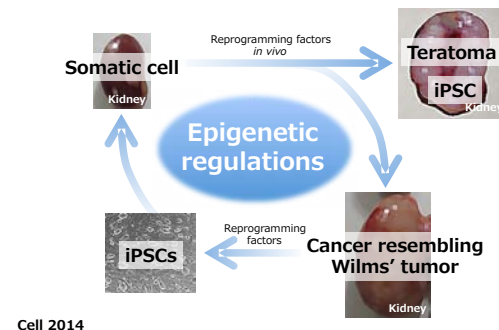
一過性初期化因子誘導により発生した腫瘍細胞の完全初期化を行うために、はじめに腫瘍細胞特異的のマーカ遺伝子の同定を行った。その結果、*Lgr5* が腎臓腫瘍細胞に特異的に発現していることを見出した。*Lgr5* はポリコム標的遺伝子の一つであり、腫瘍においてポリコムによる遺伝子抑制不全が認められることに矛盾しない。*Lgr5* 発現が可視化できるレポーター遺伝子を用いて、本モデルマウスにおける腎臓腫瘍細胞のみを FACS にて単離後、再度初期化因子を誘導して iPS 細胞樹立を試みた。その結果、高頻度、短時間で iPS 細胞が樹立できることが確認された。

## Reprogramming of tumor cells



腫瘍細胞が部分的に初期化された細胞であることが示唆された。樹立した腎臓腫瘍由来 iPS 細胞を用いてキメラマウスを作製すると、マウスには全く正常に見える非腫瘍性の腎臓組織が形成されていた。本発癌モデルにおいては、エピゲノムの完全リセットにより癌細胞の性質を失うことが示された。これらの結果より、少なくとも小児癌などの一部の発癌はエピゲノムの制御異常に依存している可能性が示唆された。エピゲノムを標的とした癌治療の可能性が示された。

## Modeling cancer with iPSC technology



Cell 2014

### 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 12 件)

Ohnishi K†, Semi K†, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, Okita K, Osafune K, Arioka Y, Maeda T, Soejima H, Moriwaki H, Yamanaka S, Woltjen K, \*Yamada Y.

Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 2014 Feb 13;156(4):663-77. †These authors are equally contributed to this work.

Yamada Y, Haga H, \*Yamada Y. Concise

review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Oct;3(10):1182-7.

Ohnishi K, Semi K, \*Yamada Y. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 5;455(1-2):10-5.

Matsuda Y, Semi K, Yamada Y\*. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: Uncovering the mechanism of cell status conversion for drug resistance in tumor. *Pathol Int.* 2014 Jul;64(7):299-308.

Yamada K, \*Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A, \*Yamada Y. EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J Clin Invest.* 2013 Feb 1;123(2):600-10.

Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K, \*Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. *Int J Cancer.* 2013 Mar 15;132(6):1240-8.

Hirata A, Utikal J, Yamashita S, Aoki H, Watanabe A, Yamamoto T, Okano H, Bardeesy N, Kunisada T, Ushijima T, Hara A, Jaenisch R, Hochedlinger K, \*Yamada Y. Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development.* 2013 Jan 1;140(1):66-75.

Yamaji M, Ueda J, Hayashi K, Ohta H, Yabuta Y, Kurimoto K, Nakato R, Yamada Y, Shirahige K, \*Saitou M. PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 12(3):368-82, 2013.

Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, Okita K, Noma H, Sawamura Y, Teramoto I, Narita M, Sato Y, Ichisaka T, Amano N, Watanabe A, Morizane A, Yamada Y, Sato T, Takahashi J, \*Yamanaka S. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110(51):20569-74, 2013.

Arioka Y, Watanabe A, Saito K, \*Yamada Y. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. *PLOS One.* 2012 7(9):e45031.

Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and \*Yamada Y. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes

during neurogenesis. *Development.* 139(4):667-77, 2012

Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, Adachi F, Kondo T, Okita K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Yamada Y, Morizane A, Takahashi J, Ayaki T, Ito H, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Watanabe D, Hioki H, Kaneko T, Makioka K, Okamoto K, Takuma H, Tamaoka A, Hasegawa K, Nonaka T, Hasegawa M, Kawata A, Yoshida M, Nakahata T, Takahashi R, Marchetto MC, Gage FH, Yamanaka S, \*Inoue H. Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med.* Aug 1;4(145):145ra104, 2012.

[学会発表] (計 5 件)

Yamada Y. Nature Conference, Nuclear Reprogramming and the Cancer Genome 2014, Guangzhou, China, October 31-November 2, 2014

Yamada Y. ADVANCES IN NEUROBLASTOMA RESEARCH, Cologne, Germany, May 13-16, 2014

Yamada Y. 8<sup>th</sup> International Cell Therapy Conference, Seoul, Korea, October 23, 2014.

Yamada Y. Gordon Research Conference, Galveston, USA, March 2-7, 2014.

Yamada Y. Application of reprogramming technology to cancer research, International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, February, 2013, Kagoshima, Japan

[図書] (計 2 件)

河村真吾、山田一成、大野貴敏、大西紘太郎、松田穰、山田泰広 遺伝子発現調節システムを使用した発がんモデルマウス 細胞工学 Vol.32 No.7 808-11 2013

山田洋介、山田泰広 細胞分化状態維持機構の破綻と発がん 病理と臨床 Vol.31 No.5 578-9 2013

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 泰広 (YAMADA Yasuhiro)

京都大学 iPS 細胞研究所 教授

研究者番号：70313872