

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650614

研究課題名(和文) 胚性腫瘍細胞集団に出現する幹細胞様前駆細胞の非対称分裂による再活性化

研究課題名(英文) Reactivation of the inactive X chromosome through the asymmetric precursor cell division in the embryonal carcinoma cell population

研究代表者

吉田 郁也 (Yoshida, Ikuya)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90240275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：マウス初期胚に由来するES細胞や、胚由来で腫瘍の性質を持つEC細胞などでは、1細胞から増殖させた細胞クローンであっても異質な細胞の出現によって不均一な細胞集団を形成することが知られている。しかし、このような異質な細胞の出現機構はよく判っていない。我々はEC細胞集団中に不活性X染色体(Xi)が再活性化されたHAT耐性(HAT-R)細胞が出現する機構について解析を行い、HAT-R細胞の出現には、(1)幹細胞的な性質を示す前駆細胞の確率的出現と、(2)続いて起きる前駆細胞の非対称分裂が関与していることを明らかにした。非対称分裂後に再活性化能が付与される機構については更に検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：A single-cell derived cell populations of mouse embryonic stem (ES) and embryonal carcinoma (EC) cell are not homogeneous: heterogeneous cells in phenotype and/or function are frequently appeared in these undifferentiated cell populations. However mechanistic detail of their cellular heterogeneity remains unknown. We investigated how inactive X chromosomes (Xi) are reactivated in the undifferentiated EC cell population, and found that (1) stem-cell-like precursor cells are stochastically appeared in the populations, and (2) asymmetric cell divisions of the precursor cell generates a precursor cell and a HAT resistant (= Xi-reactivated) cell. Further analysis will be needed to clarify the underlying mechanisms for the acquisition of stem-cell-like properties, including Xi-reactivation ability, during asymmetric cell divisions.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：幹細胞 不活性X染色体 再活性化 非対称分裂 胚性腫瘍細胞

1. 研究開始当初の背景

ES, EC 細胞や、ある種の腫瘍細胞などでは、たとえ 1 細胞から樹立されたクローン細胞集団であっても均質ではなく、集団中に異質な細胞が出現・維持されていることが知られている。我々は、未分化 EC 細胞株でありながら不活性 X 染色体を保持している MC12 細胞で見られる自然再活性化(細胞集団中に不活性 X 染色体が再活性化した細胞が高頻度で出現する.)を解析する過程で、幹細胞様前駆細胞の確率的な出現と前駆細胞の非対称分裂が自然再活性化に関与していると考えられる予備的な結果を得たため、このメカニズムについて解析を行うこととした

2. 研究の目的

本研究では、(1)MC12 細胞で見られる不活性 X 染色体の再活性化現象が、非対称分裂によるものであることの更なる証明を試みると共に、(2)未分化度の低い MC12 細胞集団中に未分化度の高い幹細胞様前駆細胞が出現する機構や、(3)前駆細胞が非対称分裂する機構の解明、(4)非対称分裂および再活性化に必要なメカニズムとリプログラミングとの関連についての理解を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

MC12 細胞における非対称分裂、リプログラミング、不活性 X 染色体の再活性化の関連とそのメカニズムを探るために以下の実験を行う：

(1) 改変 Fluctuation 法による幹細胞様前駆細胞の出現頻度・様式の解析：MC12 細胞で確率的に出現してくる前駆細胞の性質を更に明らかにするために Fluctuation Test を改変した方法を用いる。通常の Fluctuation Test (P0 法)では、変異細胞があらかじめ含まれないと考えられる少数細胞を一定細胞数まで非選択条件下で培養した後に選択培地へと移して、耐性コロニーが出現しなかった培養皿の数から変異率を算出する。改変法では MC12 細胞を 6TG 選択、非選択条件下で培養したものを比較する。前駆細胞が予想した性質を持つならば(すなわち、6TG 選択下で培養しても死滅も増数もしないのであれば)得られた P0 値(HAT 耐性コロニーが出現しなかった培養皿の数として表される)は両者で等しくなるはずである。一方、各培養皿での HAT 耐性コロニー数は、6TG 非選択実験区では数個から数十個以上までの高い分散を示すことがわかっているが、6TG 選択実験区で

は数個以内にとどまると予想される。

(2) 前駆細胞が休眠細胞でないことの証明：培養を継続しても数が増えないという前駆細胞の性質は、非対称分裂によるものではなく分裂をほとんどしない休眠細胞であると考えても破綻なく説明できる。休眠あるいは低増殖性は腫瘍幹細胞のよく知られた特徴であるため、腫瘍細胞としての性質を持つ MC12 細胞にそのような細胞が存在する可能性がないとは断定できない。このような可能性を除外するために以下の実験を行う：増殖能の低い腫瘍幹細胞を単離するために用いられている CM-H2DCFDA 染色法を用いて MC12 細胞で特に増殖の遅いフラクションを FACS で単離する。 5×10^5 個の親 MC12 細胞(60mm 培養皿 x1)あたり ~ 500 個の前駆細胞が存在することが判っているので、FACS で得られたフラクションあたりの細胞数も判別の手掛かりになるであろう。得られた低増殖性の細胞が前駆細胞であれば HAT 選択培地に播いた大半の細胞から HAT 耐性コロニーが形成されるはずである。同様に TK(チミジンキナーゼ)欠失細胞の単離法を応用して MC12 細胞中に休眠細胞が存在しないことを証明する：この方法では、BrdU 存在下で MC12 細胞を 3 ~ 4 世代培養した後に、生残、HAT 耐性コロニーを形成する細胞があるかどうかを調べる。BrdU は dTTP のアナログとして染色体 DNA 中に取り込まれ、数世代を経て細胞を死滅させる。従って、この培養条件下で生きのびた細胞は S 期に入らない休眠細胞であるといえる。

(3) ショウジョウバエ、線虫、マウス表皮細胞、腫瘍幹細胞などで非対称分裂や幹細胞増殖に関わることが知られている既知因子に関する解析：ショウジョウバエ、線虫とマウス表皮細胞とで共通して非対称分裂に関わることが明らかにされた因子(*LGN/AGS3*, *NuMA*, *Dctn1*, *Par3*, *aPKC* など)に対する RNAi 実験を行い、MC12 細胞での HAT 耐性細胞の出現頻度に影響を及ぼすかどうかを調べる。単一細胞クローニングを経た MC12 細胞に含まれる前駆細胞数は予測できないため、RNAi 解析は shRNA ではなく、細胞クローニングを必要としない siRNA を用いる。MC21 細胞に siRNA を投与した後に、(a)6TG 存在下で数世代培養を経て HAT 培地へ移したものと、(b)同数の細胞を siRNA 処理直後に HAT 選択培地に移したもので生じる HAT 耐性コロニー数が異なれば(a > b)、非対称分裂から対称分裂への移行があったことを知る事が出来る。

LGN/ASG3, NUMA は Notch シグナルを介してマウス表皮細胞の非対称分裂に関与することが明らかにされていることから *Cripto-1* との関連についても調べる必要がある。

(4) 幹細胞様前駆細胞の単離に向けた解析：未分化細胞特異的遺伝子を高発現している MC12 細胞をノックインを用いて選抜する。内在性の未分化細胞特異的遺伝子に薬剤耐性遺伝子をノックインすることで、未分化細胞特異的遺伝子を高発現している細胞を選抜する。薬剤耐性遺伝子はノックインされた遺伝子の内在性のプロモーターによってドライブされる様にデザインし、高濃度の薬剤処理により選抜をおこなう。すでにこの方法で *Klf4* 遺伝子座に薬剤耐性遺伝子 (neomycin 耐性) を導入した MC12 細胞が得られている。トランスフェクション後の選抜には G418 のみを用いて HAT, 6TG 選択は行わなかったため、ノックインによって幹細胞様前駆細胞が選択され、そこから HAT 耐性細胞が産出され続けた可能性がある。前駆細胞自体は通常の培養条件下で数を増やすことはない予想されるので、更に GFP を持つコンストラクトをノックインに用いて、GFP 蛍光を指標として FACS ソーティングをおこない幹細胞の濃縮が可能かどうかを探る。

(5) 幹細胞様前駆細胞の出現機構：前駆細胞の確率的出現に関与すると考えられる因子を以下の方法でスクリーニングした後、強制発現実験をおこなう。MC12 細胞では、*Oct3/4*, *Sox2* など、未分化細胞の基幹を為すと考えられる因子の発現は潤沢にあるものの、*Klf4*, *Nanog*, *Zfp42/Rex1*, *Ecat6* などの発現はほとんど見られないか、あるいは少数の細胞垂集団のみに限局した発現となっている。このように比較的未分化度が低い親 MC12 細胞中に、幹細胞様の未分化度の高い前駆細胞が出現する機構を明らかにするために、親 MC12 細胞で発現がない、あるいは限局されている上記因子の強制発現を試みる。

4. 研究成果

MC12 細胞で見られる非対称分裂とそれに続いて起きる再活性化現象に関して細胞遺伝学的検証をおこなった結果、再活性化に関わる前駆細胞の集団中への出現、非対称分裂、リプログラミング、不活性 X 染色体の再活性化という現象が互いにどのように関連し合うのか、そのメカニズムに関して以下の結果を得た：

(1) 6TG 存在下での Fluctuation 法 (MF

法) による幹細胞様前駆細胞の出現様式の解析を行ったところ、MC12 細胞集団中に 6TG 耐性の前駆細胞が確率的に出現することが明らかになった。6TG 耐性の前駆細胞の出現様式は予想と大きく異なり、培養皿によっては爆発的に増大することも明らかになった。通常の Fluctuation 法で得られていた HAT 耐性コロニーの出現数と、MF 法でのそれとはほとんど同一であったことから、前駆細胞の出現は細胞分裂回数と関連する可能性があると考えられた。

(2) BrdU ラベルした MC12 細胞を HAT 選択して出現してきた耐性コロニーを抗 BrdU 抗体で染色すると、ほぼすべてのコロニーで、BrdU の取り込みが確認された。この結果から前駆細胞は休眠細胞でないことが証明された。一方、6TG 非選択下での HAT 耐性細胞の増殖測定や希釈実験などから前駆細胞は培養条件に関わらず非対称分裂を繰り返して前駆細胞自身と HAT 耐性細胞を生み出していることが明らかになった。

(3) 非対称分裂や幹細胞増殖に関わる因子が既に知られている因子 (*Akt*, *Gpsm2*, *Pard6b*, *TdGF1*) に関して siRNA を用いた発現抑制実験をおこなった。これらのうち *Gpsm2* の抑制によって HAT 耐性細胞の出現数が増加する傾向が観察された。

(4) MC12 細胞集団レベルでは発現が認められないが、HAT 耐性 MC12 細胞では発現が上昇する因子 (多能性の維持やリプログラミングに関連する因子) を MC12 細胞で強制発現したのちに前駆細胞の出現様式を MF 法で計測したところ、前駆細胞の出現を著しく抑制する因子 (1 因子) と、促進する因子 (3 因子) を見出した。

(5) 5-azacytidine 投与によって MC12 細胞の脱メチル化を促進させると HAT 耐性細胞の出現数は劇的に増大したが、その内訳は *Hprt* 座の活性化を起こした細胞 (Locus-specific reactivation) に限られており、前駆細胞を経た再活性化とは異なる事象であると結論した。

(6) *Klf4* ノックイン細胞では、不活性 X 染色体の再活性化、あるいは *Xist* のサイレンシングが起きたと思われるクローンが、少数得られたが、何れのクローンも HAT 耐性ではなかった。この結果の意味するところは現在のところ不明であり、解析を継続している。

以上の結果をまとめると、MC12 細胞集団を構成する細胞 (ordinary cells) から前駆

細胞(6TG 耐性)が確率的に出現する。この前駆細胞は休眠細胞ではなく、培養条件に関わらず非対称分裂を繰り返しかえし前駆細胞自身と HAT 耐性細胞を生み出している。非対称分裂に関わる因子 *Gpsm2* の抑制によって前駆細胞の非対称分裂は破綻する。また、MC12 細胞で強制発現させると前駆細胞の出現様式が大きく変化する因子を、複数、見出した。

2 年間の解析を通じて、おおむね現象の全体像と前駆細胞の出現、非対称分裂に関わるメカニズムについては一定の解釈が可能となったが、残念ながら不活性 X 染色体の再活性化が、何故、たった 1 回の分裂の後に可能になるのか、その機構については不明のまま残された。HAT 耐性細胞でいくつかのリプログラミング関連遺伝子の発現の僅かな上昇が見られたが、その上昇は限定的であり、それらが再活性化の決定的因子とは考えにくい。今後の更なる解析が必要である。

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 2 件)

吉田郁也「*Klf4*強制発現による *Tsix* RNA の転写誘導」

X染色体研究会

2013年03月22日

北海道大学学術交流会館・遠友学舎

吉田郁也「Spontaneous reactivation of the inactive X chromosome through asymmetric precursor-cell division in the mouse embryonal carcinoma cell line」
第 3 5 回日本分子生物学会年会 (Workshop)
2012年12月14日
福岡国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 郁也 (Yoshida Ikuya)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号: 90240275

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: