

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月22日現在

幹細胞維持分子の機能解析と全身の幹細胞の可視化を
目指した総合的研究

Integrative study for functional analyses of stem cell
maintenance factors and visualization of stem cells



課題番号：25221303

中山 敬一 (NAKAYAMA KEIICHI)

九州大学・生体防御医学研究所・主幹教授

研究の概要

組織幹細胞を維持するためには、1) 低増殖、2) 低代謝、3) 低酸化、の三条件が必要であり、われわれはこの三条件を媒介する鍵分子 p57、Fbw7、Fbx15 を同定した。本研究では、種々の幹細胞において p57、Fbw7、Fbx15 の発現を解析し、さらにその機能喪失変異体を作成して、この三分子が真の「幹細胞維持分子」であることを実証し、全身の幹細胞の可視化に挑戦する。

研究分野：医歯薬学

キーワード：細胞増殖・細胞死

1. 研究開始当初の背景

骨髄・神経・腸管等の組織以外では、幹細胞の純化がほとんど進んでおらず、その性質も明らかではない。幹細胞分画の同定は、その性質の解明に必須であるだけでなく、癌幹細胞の研究の基盤となる。われわれは造血幹細胞の研究から、1) 低増殖、2) 低代謝、3) 低酸化（ストレス）、の三条件が幹細胞の機能維持に必須であることが明らかにした（図1）。

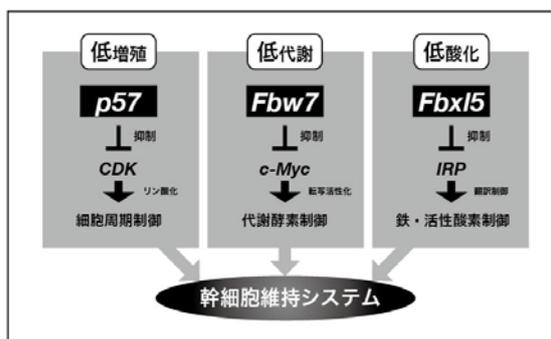


図1 造血幹細胞における3つの必要条件

2. 研究の目的

われわれは造血幹細胞においてこの三条件を媒介する鍵分子 p57、Fbw7、Fbx15 を同定したが、この三分子は全身の組織幹細胞において必須ではないかと推定した。この仮説を証明するために、種々の幹細胞において

p57、Fbw7、Fbx15 の発現を解析し、さらにその機能喪失変異体を作成して、この三分子が真の「幹細胞維持分子」であることを実証する。さらに、三分子の発現状態をモニターして未だ明らかではない全身の組織幹細胞を可視化する技術を開発し、その性質を明らかにする。このようにして同定された各組織の幹細胞の性質の理解は、それぞれの組織の再生医療の実現に向けて有用である。

3. 研究の方法

種々の組織幹細胞における p57、Fbw7、Fbx15 の詳細な発現パターンを検討する。次にこれらのコンディショナルノックアウトマウスにおける組織幹細胞の細胞周期・代謝・酸化状態を調べ、幹細胞機能が維持されているかどうかを調べる。またプロモーター領域内で遺伝子発現調節に必要なシス領域を同定し、そこに結合するトランス因子を決定すると共に幹細胞機能に与える影響を調

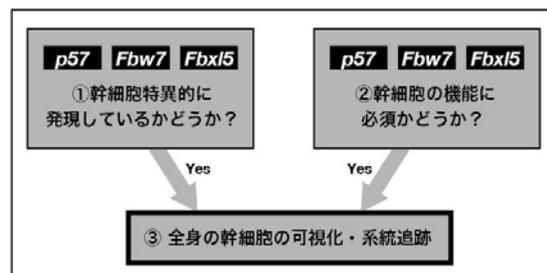


図2 本研究の基本戦略

べる。また p57、Fbw7、Fbx15 の発現をモニターするようなノックインマウスまたはトランスジェニックマウスを作製し、幹細胞を可視化するシステムを開発する。同時に系譜追跡できるマウスも作製し、種々の組織における全ての幹細胞を同定する (図 2)。

4. これまでの成果

本研究の大きな柱は「全ての組織幹細胞は共通した原理で作動している」という仮説 (「幹細胞通則」と呼称) の実証である。具体的には、組織幹細胞はその発生・維持に対して 1) 低増殖、2) 低代謝、3) 低酸化、の三条件を有する必要がある、それを媒介する責任遺伝子 p57、Fbw7、Fbx15 の機能解析を主に骨髄幹細胞、腸管幹細胞、神経幹細胞で行うことにより、「幹細胞通則」を証明しようというものである。既に当初の目標である p57、Fbw7、Fbx15 の組織幹細胞における発現解析と種々の組織幹細胞における p57、Fbw7、Fbx15 遺伝子改変マウスの作製はほぼ終了した。また系統追跡マウスについても p57 系統追跡マウスの作製は完了し、解析は現在進行中である。

p57 については、骨髄・神経・腸管幹細胞において、その発現パターンに強い幹細胞特異性が認められた。また胸腺においても p57 は発生分化に重要な役割を果たしていることが判明した。神経幹細胞でも同様に p57 は幹細胞特異的に発現し、その機能喪失変異体は幹細胞の消失につながることを発見した。また腸管幹細胞に対しても、いわゆる +4 ポジション細胞に p57 は特異的に発現し、その喪失変異体は腸管の 5-FU 投与で引き起こされるダメージに対して回復が傷害されるという表現型を呈する (発表準備中)。

Fbw7 について、われわれは骨分化に必須な転写因子 OASIS や軟骨分化に必須な BBF2H7 の分解制御にも Fbw7 が関わっていることを発見した。骨髄幹細胞や神経幹細胞では Fbw7 が必須であることは既の実証済みである。また精子幹細胞においても Fbw7 は必須の役割を果たすことが明らかとなった。また後述するように、Fbw7 はがん幹細胞においても重要な役割を果たし、その遺伝子破壊はがん治療に有用であることを実証した。

Fbx15 については現在、骨髄幹細胞および神経幹細胞において、特異的に Fbx15 を欠損させたマウスを作製し、解析をほぼ終了した。骨髄幹細胞においては予想通りその機能維持に Fbx15 は重要であり、その機能欠損は幹細胞機能に重大な障害を与えることが明らかとなった。興味深いことに、神経幹細胞において Fbx15 を欠損させると、幹細胞の増殖が高まり、より多くの神経幹細胞/前駆細胞が産生されることが明らかとなった。そのメカニズムとして、Fbx15 の欠損による酸化ストレスの上昇によって、PTEN が不活性化され、

その結果として Akt-mTOR 経路が活性化していることが明らかとなった。これらの成果は現在論文を執筆中である。

5. 今後の計画

今後の研究計画はほぼ当初の計画通りであり、残っている主な実験は「全身の幹細胞の可視化と系統追跡」のみである。一部の実験 (Fbw7/Fbx15 プロモーター下における系統追跡マウス作製とその解析) は科学的必要性が希薄となったため施行を中止し、p57 プロモーター下における系統追跡マウス作製とその解析に集中することとした。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nishiyama, M., et al., Nakayama, K. I. (4 人中 4 番目) : FBXL12-mediated degradation of ALDH3 is essential for trophoblast differentiation during placental development. *Stem Cells* 33: 3327-3340 (2015).
2. Furutachi, S., et al., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. (11 人中 9 番目) : Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nature Neurosci.* 18: 657-665 (2015).
3. Yumimoto, K., et al., Nakayama, K. I. (10 人中 10 番目) : F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner. *J. Clin. Invest.* 125: 621-635 (2015).
4. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Shinohara, T. (4 人中 3 番目) : Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 8826-8831 (2014).
5. Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I. (3 人中 3 番目) : p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling. *Blood* 123: 3429-3439 (2014).

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>