

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293082

研究課題名(和文) Max及びNucleostemin遺伝子の発現制御による癌細胞の根絶

研究課題名(英文) Eradication of cancer cells by controlling Max and/or nucleostemin expression

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ES細胞とがん細胞両方で重要な働きをするMycとNucleostemin遺伝子を手掛かりにこれらの細胞の類似性を規定している分子基盤の解明を目指した。まず、Nucleostemin遺伝子のES細胞での欠失に伴って起こる細胞死がNanog及びEsrrbの強制発現によってキャンセルされることを示した。また、正常細胞にMycを過剰発現させた場合に起こる細胞死は、内在性のMaxとの量的不均衡によって生じた遊離Mycタンパク質の機能を反映していることを明らかにした。かつ、Mycが高発現しているES細胞及びがん細胞では遊離Mycの細胞死誘導活性を抑制する因子が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we explored the molecular bases defining the similarities between ES cells and cancer cells through the analyses of Myc and nucleostemin which are both known as important regulators in both cell types. First, we demonstrated that apoptotic phenotype of nucleostemin-null ES cells was erased by the forced expression of Nanog or Esrrb. As to the Myc studies, we demonstrated that apoptotic phenotype overexpressed with Myc in normal somatic cells reflect the intrinsic activity of Myc free from Max association which becomes evident because the amount of Myc protein exceeds much more than that of the endogenous Max due the forced expression. Furthermore, our data demonstrated that ES cells and cancer cells, but not normal somatic cells, bear proteins which suppress the intrinsic apoptotic inducing activity of Myc which is liberated from the regulation by Max.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ES細胞 がん細胞 細胞増殖 アポトーシス c-Myc Nucleostemin

1. 研究開始当初の背景

古くから ES 細胞とがん細胞は、無限の自己増殖性など、様々な点での類似性が指摘されているが、この ES 細胞とがん細胞の類似性を規定している分子基盤に関してはほとんど分かっていない。しかしながらそれを明らかにすることができれば、今までにない原理に基づいたがん治療法の開発であるとか、ES・iPS 細胞を用いた細胞移植の最大の問題点である移植細胞の中に残存する未分化状態を保った ES・iPS 細胞からの腫瘍形成の問題に対する解決策を見出すことが可能になることが期待される。それ故、本研究はその分子基盤の実態を明らかにすることを目標として研究を始めた。

2. 研究の目的

本研究では ES 細胞及びがん細胞の両方において細胞のホメオスタシスに大いに貢献していることが分かっている c-Myc 及び Nucleostemin 遺伝子を手掛かりにこれら 2 つの遺伝子の ES 細胞とがん細胞における役割を明らかにすることから、上記に記載した目的を達成することを目標として研究を行った。

3. 研究の方法

c-Myc はそのアミノ酸配列において c-Myc と極めて類似した N-Myc と L-MYC の計 3 つの Myc タンパク質によって 1 つのファミリーを形成しており、かつ、これら 3 種類の Myc 遺伝子は ES 細胞において全て発現しているため、ES 細胞において c-Myc 遺伝子をホモ欠失させても機能的余剰の観点から ES 細胞における c-Myc の機能を解明することはできないことは容易に想像ができる。但し、これら 3 種類の Myc タンパク質は、転写因子として機能発揮する為にはパートナー因子である Max を必要とする。それ故、私たちは、以前、Max をコードする遺伝子をホモでノックアウトすることにより、3 種類全ての Myc タンパク質に対して機能的にノックアウトすることができると考え、実際、Max ホモ欠失 ES 細胞を樹立した。なお、この Max ホモ欠失 ES 細胞には、この遺伝子のノックアウトが ES 細胞に対して致死性を示す可能性が考えられたので、ROSA26 遺伝子座に tetracycline(Tet)-off のシステムと共に Max cDNA が導入しており、それ故、この Max ホモ欠失 ES 細胞は、培地への Doxycycline (Dox) の添加の有無によって Max 遺伝子の発現を完全にコントロールできる。また、全く同じシステムを用いて Nucleostemin ホモ欠失 ES 細胞も以前に樹立しており、本研究課題ではこれら 2 つの遺伝子のそれぞれについて Dox 添加により発現をノックアウトできる ES 細胞を用いて解析を行った。

4. 研究成果

まず、Nucleostemin の ES 細胞における役割について解析を行った。私たちは以前既に Nucleostemin 遺伝子のノックアウトが細胞死をもたらすことを報告している (Nomura et al., 27, 1066-1076, 2009)が、その論文ではこの ES 細胞が細胞死のフェノタイプを呈する理由については解明できていないので、それを明らかにすべく、様々な ES 細胞マーカー遺伝子を導入し、その効果を見た。その結果、Nanog 及び Esrrb 遺伝子の強制発現によってのみ、Nucleostemin ホモ欠失 ES 細胞が呈する細胞死のフェノタイプを打ち

消すことができることが明らかになった (図 1) (雑誌論文 No.

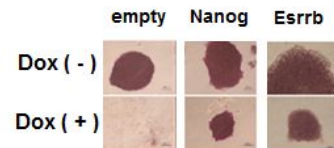


図1 Nucleosteminホモ欠失ES細胞のNanog及びEsrrbによるレスキュー

10)。但し、ES 細胞と同様な胚葉を超えた分化多能性を示す、発生における着床直後の胚の細胞由来のエピプラスト幹細胞では Nanog 及び Esrrb のいずれも Nucleostemin 遺伝子の発現消失に伴う致死的なフェノタイプに対してレスキュー効果を発揮することができないことがわかった。なお、Nucleostemin 遺伝子は ES 細胞やがん細胞のみならず神経幹細胞など、様々な種類の組織幹細胞でも高い発現を示すことが知られているが、それらの組織幹細胞における Nucleostemin の役割はゲノムの安定性維持の為にゲノム修復に関わる Rad51 タンパク質を損傷したゲノムの部分にリクルートすることであると証明されている。そこで、私たちはその Nucleostemin が本来持つ機能は ES 細胞及びエピプラスト幹細胞の両方においても発揮されているかを検討したところ、確かにこれらの細胞においてもその機能が確認できた。しかしながら、同時に、これら胚葉を超えた分化多能性を示す幹細胞では、この機能以外に、これらの細胞の viability を保つ為の別の機能も有していることを示す証拠も得ることができた。但し、その ES 細胞及びエピプラスト幹細胞特異的な Nucleostemin の機能の分子の実態については明らかにすることができていない。また、Nucleostemin のがん細胞の研究に関しては、私たちが主体となって行った研究ではないが、Nucleostemin 遺伝子の発現レベルと精巢腫瘍の悪性化には明確な正の相関関係があることを明らかにすることができた(雑誌論文 No. 10)。

一方、c-Myc の機能についての研究に関しては Max ホモ ES 細胞を用いて研究を進めていたが、この Max ホモ ES 細胞は、Nucleostemin ホモ欠失 ES 細胞以上に激しい細胞死のフェノタイプを示す。そして、その細胞死の原因を解析している過程で、Myc のパートナー因子としてのみ認知され

ており、それ自身は何ら機能を持たないであろうと想定されていた Max タンパク質が Myc とは無関係に細胞の減数分裂を抑制するという全く想定していなかった新規機能を見出した(雑誌論文 No. 14)。この論文では、生殖細胞のみならず生殖細胞ではない ES 細胞も減数分裂を起こす潜在能力は有しており、前者では生理的に減数分裂を起こすべき時期に Max タンパク質を減少させることで減数分裂を開始しているのに対して、ES 細胞では Max タンパク質の量が生理的に変動することはないので、減数分裂は起こらないことを明らかにした。但し、Max ホモ欠失 ES 細胞では強制的に Max 遺伝子の発現を消失させているので、それに伴って Max 依存的な減数分裂抑制機構が破綻し、実際、減数分裂の初期段階が誘導されており、この際、ES 細胞が呈する細胞死のフェノタイプは、このような本来起こらない筈の異所性の減数分裂という異常な現象に対する応答の一つであることが分かった。

但し、Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する細胞死のフェノタイプは、異所性の減数分裂のみでは説明不可能で、その他の原因も関わっていることが考えられた。なお、Max ホモ欠失 ES 細胞では c-Myc、N-Myc、L-Myc という3種類の Myc はタンパク質としては全て存在するが、これら Myc タンパク質が Max 非存在下では全く無機能であるという想定が間違っており、これら遊離 Myc タンパク質は実際には全く無機能ではなくて Max ホモ欠失 ES 細胞が呈する細胞死に多少なりとも関わっているのではないかと考えた。このような発想に至った背景は、遺伝子の変異の為、機能的な Max タンパク質を持たないラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞に c-Myc 遺伝子を過剰発現させると細胞死が惹起されることが知られていたからである。そこで、まず私たちは、Max ホモ欠失 ES 細胞に c-Myc 等と過剰発現させると細胞のダメージは増強されるか否かを検討した。その結果、ゲノム DNA の 2 本鎖切断の極めて優れた指標である H2AX のレベルが c-Myc 及び N-Myc の過剰発現によってより上昇することがわかった。かつ、c-Myc や N-Myc と比べて転写促進活性がほとんどない L-Myc ではこの H2AX のレベルの変化はほとんど見られなかった。逆に、タモキシフェンの投与により c-Myc/N-Myc ダブルノックアウトが可能なコンディショナルノックアウト ES 細胞を用いて、

c-Myc/N-Myc 遺伝子の存在下及び非存在下で、Max 遺伝子の発現の減少に伴って上

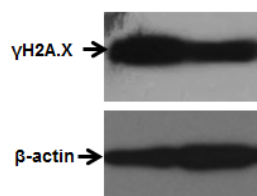


図2 CRE-ERを発現するc-Myc/N-Myc ダブルコンディショナルノックアウト ES細胞での Max 発現ノックダウンにより誘導される細胞死のタモキシフェン処理の影響

昇する H2AX のレベルに変化が見られるか否かを検討したところ、期待通り、c-Myc/N-Myc 遺伝子のダブルノックアウトに伴って、Max 遺伝子の発現によって誘導される細胞のダメージのレベルが減弱することが明らかになった(図2)。

なお、c-Myc は ES 細胞やがん細胞ではこれらの細胞の活発な細胞増殖に大きく貢献していることが知られているが、マウス胎児線維芽細胞などの正常細胞において、強制発現により c-Myc の発現レベルを ES 細胞やがん細胞のレベルまで上昇させると細胞増殖よりもむしろ細胞死のフェノタイプが顕著に現れてしまう。この細胞死の原因は、内在性の Max では過剰発現された c-Myc の全てと相互作用することができなくなり、それに伴って生じた遊離 c-Myc の機能を反映した結果であることは容易に想像できるが、だとすると何故、やはり c-Myc と Max の間で量的な不均衡が存在する ES 細胞やがん細胞では細胞死が起こらないのであろうという素朴な疑問が生ずる。そして、この理由を説明する一つの可能性は、ES 細胞やがん細胞では内在性の Max タンパク質では賄いきれなくなった為に生ずる遊離 c-Myc が持つ細胞死を誘導する機能を中和する因子が存在するのではないかと考えた。そして実際、この発現のもと、マウス胎児線維芽細胞に c-Myc と ES 細胞とがん細胞の両方で共通に発現することが知られている遺伝子を共導入したところ、いくつかの遺伝子によって、過剰発現された c-Myc によって惹起される細胞死のフェノタイプがキャンセルされることがわかった。

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 14 件)

1. Suzuki A, Hirasaki M, Hishida T, Okamura D, Wu J, Ueda A, Nishimoto M, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Matsui Y, Izpisua Belmonte JC, Okuda A. Loss of MAX results in meiotic entry in embryonic and germline stem cells. *Nat Commun* 7: 11056, 2016 査読有り
2. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y, Nyuzuki H, Moriyama Y, Mizuno Y, Hirata T, Yatsuka Y, Yamashita-Sugahara Y, Nakachi Y, Kato H, Okuda A, Tamaru S, Nyuzuki H, Borna NN, Banshoya K, Aigaki T, Sato-Miyata Y, Ohnuma K, Suzuki T, Nagao A, Maehata H, Matsuda F, Higasa K, Nagasaki M, Yasuda J, Yamamoto M, Fushimi T, Shimura M, Kaiho-Ichimoto K, Harashima H, Yamazaki T, Mori M, Murayama K, Ohtake A, Okazaki Y. A comprehensive genomic analysis reveals the genetic landscape of mitochondrial

- respiratory chain deficiency. *PLoS Genetics*: e1005679, 2016 査読有り
3. Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Yamashita-Sugawara Y, Hirasaki M, Ueda A, Tanimoto Y, Iijima S, Yagami K, Takahashi S, Okuda A, Okazaki Y. Combined overexpression of Jarid2, Prdm14, Esrrb, and Sall4A dramatically improves efficiency and kinetics of reprogramming to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 34: 322-333, 2016 査読有り
 4. Inoue D, Aihara H, Sato T, Mizusaki H, Doiguchi M, Higashi M, Imamura Y, Yoneda M, Miyanishi T, Fujii S, Okuda A, Nakagawa T, Ito T. Dzip3 regulates developmental genes in mouse embryonic stem cells by reorganizing 3D chromatin conformation. *5*: 16567, 2015 査読有り
 5. Katano M, Uma M, Nakachi Y, Mizuno Y, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Takahashi S, Okazaki Y, Okuda A. Forced expression of Nanog or Esrrb preserves the ESC status in the absence of *nucleostemin* expression. *Stem Cells* 33:1089-1101, 2015 査読有り
 6. Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Katano M, Okazaki Y, Uma M, Takahashi S, Hirasaki M, Suzuki A, Ueda A, Nishimoto M, Hishida-Nozaki Y, Vazquez-Ferrer E, Sancho-Martinez I, Izipisua Belmonte JC Okuda A. Functional compensation between Myc and PI3K signaling supports self-renewal of embryonic stem cells. *Stem Cells* 33:713-725, 2015 査読有り
 7. Kamon M, Katano M, Hiraki K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-Not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 23: 2170-2179, 2014 査読有り
 8. Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, and Katagiri T. Establishment of a novel model for chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying mutant ALK2 associated with fibrodysplasia ossificans progressive. *Biochem Biophys Res Commun* 455: 347-352, 2014 査読有り
 9. Muramatsu M, Okuda A, and Okazaki Y. Genomic Aspects of Common Diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452: 211-212, 2014 査読なし
 10. 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* 4: 1754, 2013 査読有り
 11. 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* 110: 6412-6417, 2013 査読有り
 12. Uema N, Ooshio T, Harada K, Naito M, Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MA, Katano M, Soga T, Nakanuma Y, Okuda A, Hirao A. Abundant nucleostemin expression supports the malignant properties of germ cell tumors *Am J Pathol* 183: 592-603, 2013 査読有り
 13. Nishimoto M, Katano M, Yamagishi T, Hishida T, Kamon M, Suzuki A, Hirasaki M, NabeshimaYok, Nabeshima Yo-i, Katsura Y, Satta Y, Deakin JE, Graves JA, Kuroki Y, Ono R, Ishino F, Uma M, Takahashi S, Kato H, Okuda A. *In vivo* function and evolution of the eutherian-specific pluripotency marker UTF1 *PLoS One* 8, e68119, 2013 査読有り
 14. Hirasaki M, Hiraki-Kamon K, Kamon M, Suzuki A, Katano M, Nishimoto M, Okuda A. Striking similarity in the gene expression levels of individual Myc module members among ESCs, EpiSCs, and partial iPSCs. *PLoS One* e83769, 2013 査読有り
- [学会発表](計11件)
1. Okuda A, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A. Max known as a Myc indispensable partner protein functions as a molecular blockade of meiotic entry. 第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1~4日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
 2. 鈴木 歩、平崎正孝、上田 篤、松居靖久、奥田晶彦 マウス ES 細胞における減数分裂抑制機構の発見 第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1~4日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
 3. 西本正純、奥田晶彦、大西芳秋 Casein kinase と Jmjd3 の真獣類発生過程における細胞での概日リズム形成における役割 第38回日本分子生物学会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1~4日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)

4. 片野 幸、水野洋介、仲地 豊、平崎正孝、鈴木 歩、西本正純、岡崎康司、奥田晶彦 マウス ES 細胞において Nucleostemin ノックアウトによる未分化性の消失は Nanog もしくは Esrrb タンパク質強制発現により回避される。第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 ~ 27 日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
5. 木下善仁、徳澤佳美、神田将和、森山陽介、水野洋介、菅原(山下)泉、田丸俊輔、栃木秀乃、上原奈津美、仲地 豊、八塚由紀子、入月浩美、鈴木聡美、Nurun Nahar Borna、平田智子、的場奈々、加藤英政、奥田晶彦、森 雅人、安嶋まさみ、原嶋宏子、山崎太郎、村山 圭、大竹 明、岡崎康司 ミトコンドリア呼吸鎖異常症の原因遺伝子の包括的大規模解析。第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 ~ 27 日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
6. Okuda, A. The underlying molecular bases of cell death phenotype of Max-null embryonic stem cells. Small RNAs to Stem Cells & Epigenetic Reprogramming. Asia-2013 Meeting 2013 年 11 月 25 ~ 26 日(東京都文京区東京大学・山上会館)
7. 平崎正孝、片野 幸、鈴木 歩、西本正純、奥田晶彦 Myc モジュール遺伝子メンバーのほとんどが、ES 細胞と Epiblast 幹細胞の両者で同レベルの発現を示す。第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 ~ 6 日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
8. 鈴木 歩、菱田友昭、平崎正孝、曾我朋義、奥田晶彦 Max ノックアウト ES 細胞の激しい細胞死はヌクレオチド欠乏に伴う複製ストレスにより引き起こされる。第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 ~ 6 日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
9. 加藤英政、平木啓子、栄徳勝光、清澤秀孔、奥田晶彦 ヒト分化多能性細胞の分化の改善。第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 ~ 6 日(兵庫県神戸市 神戸ポートアイランド)
10. 西本正純、奥田晶彦、大西芳秋 真獣類の発生過程における Per2 と CKIε の発現は概日リズム形成に重要である。第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日 ~ 27 日(神奈川県横浜市 パシフィコ横浜)
11. Iseki H, Nakachi Y, Hishida T, Tanimoto Y, Sugiyama F, Yagami K, Okuda A, Okazaki Y. Jarid2 improves the kinetics and efficiency of transcription-based reprogramming. 11th ISSCR annual meeting. 2013 年 6

月 12 ~ 15 日 (Boston, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 3 件)

名称:人工多能性幹細胞製造用組成物、及び人工多能性幹細胞の製造方法
発明者:岡崎康司、伊関大敬、奥田晶彦
権利者:同上
種類:特許
番号:PCT/JP2014/061378
出願年月日:2014年4月23日
国内外の別:国際

名称:分化多能性幹細胞の製造方法
発明者:加藤英政、森山陽介、平木啓子、奥田晶彦
権利者:同上
種類:特許
番号:PCT/JP2013/79311
出願年月日:2013年10月29日
国内外の別:国際

名称:人工多能性幹細胞製造用組成物、及び人工多能性幹細胞の製造方法
発明者:岡崎康司、伊関大敬、奥田晶彦
権利者:同上
種類:特許
番号:特許願 2013-100311
出願年月日:2013年5月10日
国内外の別:国内

取得状況(計 1 件)

名称:人工多能性幹細胞の製造方法
発明者:菱田友昭、奥田晶彦、加藤英政
権利者:同上
種類:特許
番号:特許第 5843111 号
取得年月日:2015年11月27日
国内外の別:国内

〔その他〕

ホームページ

http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div03_DB/index.html

共同通信プレスリリース

<http://prw.kyodonews.jp/opn/release/201603299300/>

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

平崎 正孝(HIRASAKI MASATAKA)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：10522154

依馬 正次(EMA MASATSUGU)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授
研究者番号：60359578

(3)連携研究者
なし