

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830094

研究課題名(和文) ヒストン修飾リーダー因子による正常及びがん幹細胞の分化多能性の維持機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of histone reader proteins in maintenance of pluripotency of normal and cancer stem cells

研究代表者

服部 奈緒子 (Hattori, Naoko)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30611090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分化多能性に関わるヒストン修飾リーダーを同定する目的で、クロモドメインタンパク質Cdy12の幹細胞における機能を解析した。ノックダウンES細胞および過剰発現ES細胞の解析から、Cdy12は、マウスES細胞の未分化状態の維持に重要であることが示された。また、ChIP assayから、Cdy12は分化関連遺伝子の転写開始点近傍に結合することがわかった。さらに、Cdy12はEZH2と結合すること、H3K27me3を認識することが示された。よって、Cdy12は、EZH2によりメチル化された分化関連遺伝子に結合し、それらの発現を抑制することでES細胞の未分化性を保っていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, to identify histone reader proteins involved in the maintenance of pluripotency of normal and cancer stem cells, we analyzed the function of chromodomain protein, Cdy12. Mouse embryonic stem cells (ESC) with Cdy12 reduction by knock down system and with increase expression of exogenous Cdy12 showed that the differentiation ability of ESC was perturbed by the change of Cdy12 expression level. ChIP assay revealed that Cdy12 was enriched at the promoter regions of differentiation-associated genes. Furthermore, immunoprecipitation-western blotting showed that Cdy12 co-localized with EZH2, and recognized H3K27me3. These findings demonstrate that Cdy12 is involved in the maintenance of pluripotency in ESC, and suggest that Cdy12 represses development-associated genes to keep an undifferentiated state.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾は、遺伝子発現を制御するエピジェネティック機構の一つである。ヒストン修飾に関わる因子は、修飾を付ける酵素「ライター」、修飾を外す酵素「イレーサー」、修飾を認識する因子「リーダー」に分けられる。「リーダー」は、ヒストン修飾の認識の後に、クロマチン構造変換を誘導して遺伝子の発現を調節し、最終的には細胞の表現系へ作用する重要な因子である。また、アセチル化ヒストンのリーダーには標的遺伝子領域の特異性があること (Nature 2011)、その阻害剤が、がんの治療薬となりうる可能性 (Nature 2010, Nature 2011) が報告されている。一方、ヒストン修飾に対するリーダー決定の大規模な研究に関しては、Hela 細胞のみの生化学的解析しか行われていない (Cell 2010)。そのため、多くのリーダーの生体内での機能及び細胞種特異的な役割は、未だ明らかになっていない。

申請者は既に、細胞の分化多能性の維持に重要なリーダーを同定する目的で、メチル化ヒストンリジンを認識するクロモドメイン遺伝子全 34 個の発現をマウス ES 細胞とマウス繊維芽細胞を用いて解析し、*Cdyl2* (Chromodomain protein, Y-like 2) が ES 細胞で高く発現していることを見いだしていた。さらに、*Cdyl2* をノックダウンすると、マウス ES 細胞の未分化状態が維持できなくなるという予備的結果を得ていた。また、ヒト *CDYL2* は一部の乳がん細胞株で異常な発現を示すことを見いだしており、*Cdyl2* が正常細胞だけでなく、がん幹細胞においても、細胞の分化多能性に関与していると予想していた。

2. 研究の目的

ヒストン修飾リーダー「*Cdyl2*」の正常細胞及びがん幹細胞での分化多能性維持の分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Cdyl2* によるマウス ES 細胞の分化方向性への影響と発現変動遺伝子の同定

Cdyl2 ノックダウン及びコントロール ES 細胞を、胚葉体形成や薬剤 (レチノイン酸・BMP2 等) 添加により分化誘導させ、形態変化の観察や未分化・分化マーカーの発現解析を行い、*Cdyl2* 欠損による分化方向性への影響を明らかにする。また、RNA シークエンスにより、*Cdyl2* 欠損で発現が変動する下流遺伝子を同定する。それらの遺伝子領域での ChIP-PCR を行い、ヒストン修飾の変化を解析する。

(2) がん幹細胞における *CDYL2* の発現解析

CDYL2 の発現をがん検体及びセルソーターで単離したがん幹細胞分画を用いて、

RT-PCR で解析する。がん幹細胞分画で発現が高かった場合、がん幹細胞マーカーと *CDYL2* の二重免疫染色を行い、幹細胞一細胞レベルでの *CDYL2* タンパクの発現を確認する。

(3) *Cdyl2* の認識ヒストン修飾の決定と標的ゲノム領域の同定

Cdyl2 の認識するメチル化リジンを決定する目的で、*Cdyl2* 抗体と様々なヒストン修飾抗体を用いた相互作用の検出を申請者独自の可視化法を用いて行う。さらに、*Cdyl2* 抗体での ChIP シークエンスにより、標的領域を同定する。このデータと他のヒストン修飾制御因子の結合配列 (既存のデータベースを用いる) との比較を行い、*CDYL2* と他のヒストン修飾制御因子との関係を考察する。

(4) がん幹細胞における *CDYL2* のリーダー機能の確認

上述の実験で同定したマウス *Cdyl2* の認識ヒストン修飾について、ヒト *CDYL2* ががん幹細胞でも同修飾を認識しているかを、申請者独自の可視化法を用いて確認する。

(5) がん幹細胞における *CDYL2* の機能解析

ノックダウン及び強制発現がん細胞株を複製し、FACS によるがん幹細胞の割合の変化、スフェア形成能の変化等を調べる。ヌードマウスでの腫瘍形成能・転移能も解析する。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞の未分化性維持への関与

Cdyl2 欠損マウス ES 細胞は、未分化培養条件下においても、未分化コロニーを維持できない、未分化マーカー *Nanog* の発現が低下する、分化マーカー *Fgf5*, *Gata4* の発現が上昇する、という表現系を呈し、外胚葉系への分化が誘導されていると考えられた (図 1)。*Cdyl2* の下流遺伝子を同定する目的で、発現アレイを行ったところ、欠損 ES 細胞 2 株で共通して発現上昇している遺伝子が 9 遺伝子同定され、幹細胞性に関連する *Igfbp3*、細胞増殖抑制に働く *Sfrp1* などが含まれていた。

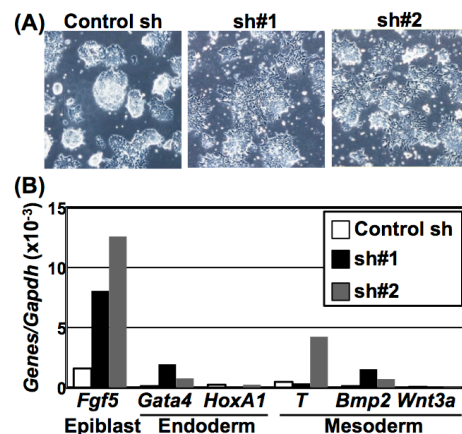


図 1 *Cdyl2* 欠損 ES 細胞の形態(A)と分化マーカーの発現(B)

また、FLAG タグ付の *Cdyl2* を発現させたマウス ES 細胞を作製し、未分化マーカー *Sox2* が高く発現していること、レチノイン酸による分化誘導後も未分化マーカー *Oct-4*, *Nanog* の発現が検出されることを見いだした (図 2)。テラトーマ形成能試験から、コントロール細胞からのテラトーマは三胚葉由来の組織から成っていたが、*Cdyl2*-FLAG 発現細胞を用いた場合は、ほとんど全てが外胚葉由来の組織であることがわかった。結果の確認の為に、テトラサイクリン誘導型 *Cdyl2* 発現マウス ES 細胞も作製したので、詳細な解析を遂行中である。

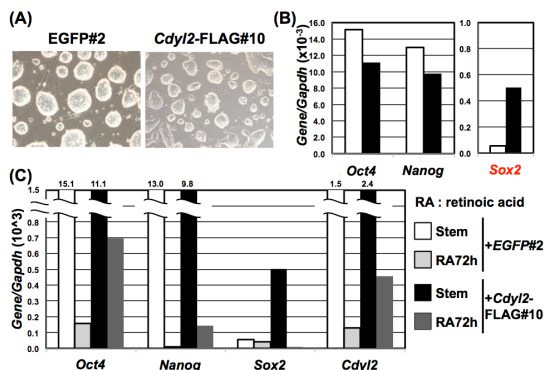


図 2 *Cdyl2*-FLAG 発現 ES 細胞の形態(A)、未分化条件下での未分化マーカーの発現(B)、レチノイン酸で分化誘導後の未分化マーカーの発現(C)

これらの結果から、*Cdyl2* はマウス ES 細胞の未分化状態の維持に重要であり、過剰発現により分化能を攪乱することを見いだした。

(2) *Cdyl2* の標的ゲノム領域の同定・結合因子の同定・認識ヒストン修飾の決定

ChIP assay を行ったところ、分化関連遺伝子の転写開始点近傍に *Cdyl2* が結合することがわかった。免疫沈降-ウェスタンブロットにより、*Cdyl2* はヒストン修飾酵素 *EZH2* と結合すること (図 3)、*H3K27me3* を認識することが示された。

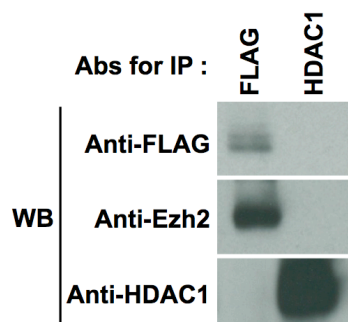


図 3 *Cdyl2*-FLAG 発現 ES 細胞を用いた FLAG-免疫沈降後の *Ezh2* 抗体によるウェスタンブロッティング

(3) がん幹細胞における *CDYL2* の機能解析
ヒトがん幹細胞における *CDYL2* の機能を明らかにする目的で、*CDYL2* ノックダウン細胞を樹立した。ノックダウンにより細胞増殖が若干抑制される傾向が観察されたが、がん幹細胞への影響は明らかではなかった。過剰発現細胞の樹立も行ったので、その詳細な解析が必要である。

(4) まとめ

本研究から、*Cdyl2* は、*EZH2* によってメチル化された分化関連遺伝子のクロマチンに結合し、それらの発現を抑制することで、ES 細胞の未分化性を保っている可能性が示された (図 4)。

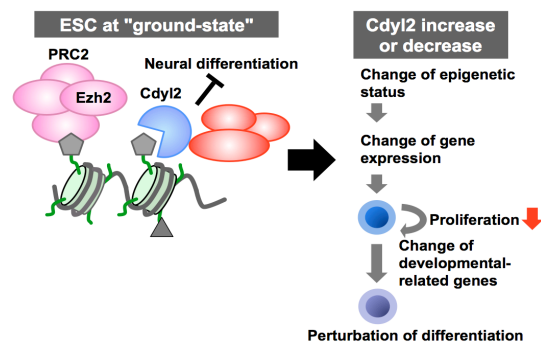


図 4 *Cdyl2* の ES 細胞の分化多能性維持機構への関与

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 1 件)

(査読あり)

Hattori N and Ushijima T. Compendium of aberrant DNA methylation and histone modifications in cancer. **Biochem biophys Res Commun**, 455: 3-9, 2014. DOI: 10.1016

[学会発表] (計 1 件)

(発表予定)

Hattori N, *Cdyl2* is a chromodomain protein involved in maintenance of pluripotency in embryonic stem cells. 40th Naito Conference, 2015 年 9 月 16-17 日, シャトラーゼ ガトーキングダム サッポロ (北海道・札幌市)

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 奈緒子 (HATTORI, Naoko)
独立行政法人国立がん研究センター・研究
所・研究員
研究者番号：30611090

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：