

【要約】

修士課程優秀論文

マウス胚性幹細胞におけるGliの機能解析

Functional analysis of Gli in mouse embryonic stem cells

金沢大学大学院医学系研究科再生分子医学 (分子病態医学)

上 田 篤

はじめに

胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)は、発生過程における胚盤胞の内部細胞塊より樹立された細胞株であり、多くの細胞系列に分化できる能力(多能性)と未分化状態で自己と同じ細胞を複製する能力(自己複製能)を併せ持つ。この多能性のおかげで、マウスES細胞は以前からノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作製に用いられ、発生学などの基礎研究における重要なツールの一つであった。さらにヒトのES細胞が樹立され、失われた組織や臓器を再生、修復するといった再生医療へのES細胞の利用が期待されている。しかし、実際にヒトのES細胞を再生医療の材料として用いるためにはES細胞を未分化状態のまま維持し、大量に培養することが必要となる。そのためES細胞の未分化性を維持するメカニズムの解明が望まれている。

これまでの研究から、マウスES細胞の場合は、培地にLIF(leukemia inhibitory factor)と呼ばれるサイトカインを添加することによって未分化状態が維持され、コンパクトなコロニーを形成することがわかっている。また、転写因子であるSTAT3, Oct3/4, Sox2などがES細胞の未分化状態維持において重要な役割を果たしていることも知られている¹⁾。私たちの研究室では以前に、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-HT)の添加によって人為的にSTAT3の活性化を誘導できるマウスES細胞株を樹立した²⁾。これを用いて、4-HT添加によりSTAT3経路が活性化されたマウスES細胞と4-HTを添加せずにSTAT3経路が不活性化状態のES細胞の間で発現量に差がある遺伝子をマイクロアレイ法によって探索した。その結果、STAT3下流遺伝子の候補として78個の遺伝子を同定した。本研究では、この候補遺伝子群の中からGliに着目して解析を行った。

Gliはグリオーマ(神経膠腫)で異常な増幅が見られる遺伝子として発見された。脊椎動物においては三種類のGli(Gli1, Gli2, Gli3)が存在し、そのいずれもがジンクフィンガー型の転写因子で、標的遺伝子の転写調節を行っている(図1)。このうちGli1はC端に転写活性化ドメインをもっており、標的遺伝子の転写を活性化させる。Gli2もGli1と同様にC端に転写活性化ドメイン

を持っているが、N端には転写抑制ドメインも持っており、転写活性化と転写抑制の両方に働く。Gli3はN端に転写抑制ドメインを有し、主に標的遺伝子の転写抑制に働くが、コアクチベータであるCBPの結合配列も持っており、転写活性化にも関与することが知られている。これらGli転写因子は、多くの細胞種において細胞の運命決定、増殖、パターン形成に関与することが知られている。したがってES細胞の未分化/分化状態の制御においても何らかの形で働いていると思われる。そこで本研究では、ES細胞におけるGliの役割を調べる目的で、Gliの活性を抑制した時のES細胞に与える影響を解析した。

結 果

ES細胞におけるGliの発現

ES細胞の未分化状態及び分化状態におけるGliファミリーのmRNA発現量をRT-PCR法により観察した。いずれのGli転写因子も未分化状態のES細胞で発現していることが明らかとなったが、Gli1及びGli2は細胞が分化するとともに発現量が減少していく傾向が見られた。一方、Gli3に関しては細胞の分化誘導とともに発現量が増加するという傾向が観察された。

dnGli2変異体発現誘導ES細胞の作製

C端側の転写活性化ドメインを欠損させたGli2の変異体(1~641アミノ酸)は、Gli1やGli2による標的遺伝子の発現誘導を阻害するドミナントネガティブ変異体として働くことが知られている(図2)。そこでこのdnGli2変異体を人為的に発現制御できるES細胞株を樹立した。dnGli2の発現誘導にはTet offシステムを用いた。このシステムにおいては、テトラサイクリン(Tet)がない状態ではCAGプロモーターによって発現が誘導されたtTA2がTREプロモーターに作用し、mycタグを付加したdnGli2変異体が発現される。逆にTetがある状態では、tTA2のTREプロモーターへの結合がTetによって阻害され、dnGli2変異体の発現が誘導されない。まず発現制御系が機能していることを確認するために、得られた細胞株をTet存在下、非存在下で3日間培養した後、細胞に発現しているdnGli2変異体をmycタグに対する抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて検出した。その結果、TetによってdnGli2変異体の発現が制御できることが明らかとな

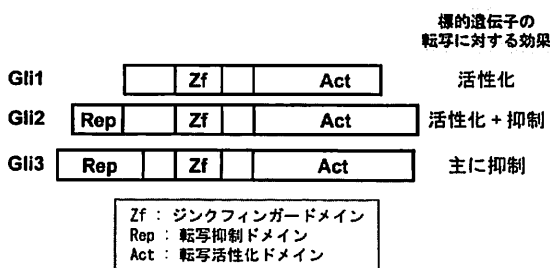


図1. Gliの三つのアイソフォーム

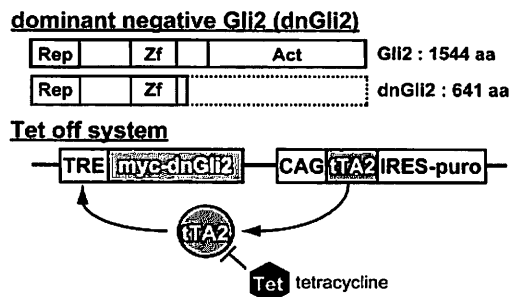


図2. dnGli2変異体の誘導発現系

表1. dnGli2変異体がES細胞に与える影響

	- dnGli2	+ dnGli2
Oct3/4 (自己複製)	++	++
Nanog (自己複製)	++	++
Sox2 (自己複製)	++	+
Gata4 (内胚葉)	-	+
Cdx2 (栄養外胚葉)	-	+
T (中胚葉)	-	-
Fgf5 (外胚葉)	-	-
コンパクトコロニー形成	有	無
細胞の増殖速度	早い	遅い
死細胞	無	有

った。次に、この細胞株でdnGli2変異体がGliの転写活性化能を抑制しているかどうかを調べた。Gli結合配列を持つレポーターベクターを細胞に導入し、Tet存在下、非存在下で3日間培養した後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、dnGli2を発現している状態では、発現していない状態に比べルシフェラーゼ活性が3割程度に抑えられていた。さらに、Gliの転写活性化能が実際に抑制されていることを、既知のGli下流遺伝子の発現量を調べることで確認した。Tet非存在下で培養して、dnGli2変異体を発現させると、Gli下流遺伝子であるGli1やPtc1, Ptc2の発現が低下していた。以上の結果より、dnGli2変異体を発現している状態では、Gliの転写活性化能は抑制されていることが示唆され、この細胞株が有用であると判断した。

dnGli2変異体がES細胞に与える影響

dnGli2変異体によってGliの転写活性化能を抑えることで、ES細胞の未分化状態にどのような変化が起きるかを観察した。細胞の形態を観察したところ、Tetを除去してdnGli2変異体が発現しているものではコンパクトコロニーの形成が崩れていた。次に、さまざまな未分化マーカー遺伝子、分化マーカー遺伝子の発現量の変化をRT-PCR法で観察した。未分化マーカーであるSox2は、dnGli2の発現によって若干減少した。しかしその他の未分化マーカー(Oct3/4, Nanog)については変化が見られなかった。分化マーカーについては中胚葉系マーカーのT, 外胚葉系マーカーのFgf5に変化はなかったが、内胚葉系マーカーのGata4, 栄養外胚葉系マーカーのCdx2はdnGli2変異体の発現により発現量が増加した。また、dnGli2変異体の発現によって、ES細胞の増殖能に変化があるかどうかを、細胞数を計測することで確認した。その結果、dnGli2を発現しているものでは、そうでないものに比べ細胞の増殖が有意に減少していた。また、死んで浮いている細胞も観察された(表1)。

考 察

マウスES細胞におけるGliファミリーの発現については、Gli1, Gli2が未分化状態で多く発現し、Gli3は分化状態で多く発現するという結果が得られた。標的遺伝子の転写活性化を担うGli1, Gli2が未分化状態で多く発現しているということは、Gliの転写活性化能がES細胞の未分化状態維持に貢献しているかと推測することができる。

dnGli2変異体の発現によってGliの転写活性化能を抑制すると、未分化状態のES細胞に特有に見られるコンパクトコロニーの形成が阻害されることや、分化マーカーであるGata4やCdx2の発現が上昇したことから、Gliによる転写活性化能がES細胞の未分化状態維持に関与していることが示唆された。しかし、いくつかの未分化マーカーの発現量は変化せず、dnGli2変異体を発現している状態でも一か月以上もの長期間に渡って培養が可能であった。これらのことから、Gli活性を抑制されたES細胞は完全な分化状態になるわけではなく、未分化状態と

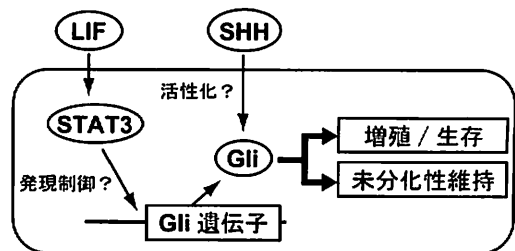


図3. 未分化状態のES細胞におけるGliの役割(モデル図)

分化状態の中間状態にあると考えられる。この表現型はEed欠損ES細胞の表現型と似ている⁹⁾。そのためGliの下流にEedが存在している可能性が示唆されたが、dnGli2変異体を発現させてもEedの発現量には変化が見られなかった。今後は、GliとEedの関係を明らかにするためにEed欠損細胞におけるGliの発現量も解析する必要がある。併せて、Gliファミリーの発現をSTAT3が直接制御しているのかどうか、さらにはES細胞の未分化状態維持に重要とされる別の転写因子(Oct3/4, Sox2など)による制御を受けているかどうかを、Gliのプロモーター解析などによって検討していく必要がある。

dnGli2変異体の発現によってES細胞の増殖能が低下し、死細胞が目立ったことから、Gliの転写活性化能がES細胞の増殖に関与していることが示唆された。これはShhがGli1の活性化を通してES細胞の増殖を刺激するという報告⁴⁾に合致している。また、抗アポトーシス因子の中でも重要な役割を担うBcl2の発現をGli2が活性化するという報告⁵⁾もあり、Gliが細胞の生存に関与している可能性も考えられる。今後はdnGli2変異体の発現によってもたらされる細胞増殖の低下の原因が何であるかも検討する必要がある。

結 語

ES細胞においては分化時よりも未分化状態の方がGli1, Gli2の発現量が多く、逆にGli3の発現量は分化時の方が多いことが明らかとなった。Gli2のドミナントネガティブ変異体を発現させてGliの転写活性化能を抑制することにより、未分化状態のES細胞に特有のコンパクトコロニーの形成が損なわれることが観察された。また、内胚葉及び栄養外胚葉の分化マーカー遺伝子の発現が誘導されることが認められた。さらに、細胞の増殖が低下することを見出した。以上のことから、GliがES細胞において未分化状態の維持、及び細胞増殖の促進に働くという可能性が示唆された(図3)。

参 考 文 献

- 1) Niwa H. : Development, 134, 635-646, 2007
- 2) Matsuda T. et al. : EMBO J., 18, 4261-4269, 1999
- 3) Ura H. et al. : J. Biol. Chem., 283, 9713-9723, 2008
- 4) Heo J. S. et al. : Stem Cells, 25, 3069-3080, 2007
- 5) Regl G. et al. : Cancer Res., 64, 7724-7731, 2004

Profile



- 2007年3月 富山大学工学部物質生命システム工学科卒業
- 2008年9月 金沢大学大学院医学系研究科修士課程修了
- 2009年 金沢大学大学院医学系研究科博士課程在学中