

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08626

研究課題名(和文) がん遺伝子を介した幹細胞性制御機構の新たな分子基盤の解明

研究課題名(英文) Novel mechanism(s) of stemness regulation mediated by oncogenes

研究代表者

赤木 紀之 (Akagi, Tadayuki)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70532183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞である胚性幹細胞(ES細胞)は、自己複製能と多分化能を保持した細胞株である。マウスES細胞はサイトカインLIF刺激により、転写因子STAT3が活性化され自己複製が維持される。我々を含め世界中の研究者が、STAT3やそれに関連する転写因子を手掛かりに、自己複製機構の分子基盤の解明に取り組んできた。興味深いことに、ES細胞にはがん細胞と類似点があることが指摘されている。また最近の研究から、ヒトがん組織においてさまざまな変異型STAT3が報告されている。そこで本研究は、がん細胞で認められた変異型STAT3に着目し、がん遺伝子を介した新たな自己複製制御機構の解明を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変異型STAT3をES細胞に過剰発現させると、LIF非依存的な自己複製が観察された。これらの細胞はLIF非存在下でアルカリフォスファターゼ陽性で、未分化マーカー遺伝子の発現も認められた。変異型STAT3の機能は、STAT3遺伝子破壊ES細胞でも観察できた。さらに興味深いことに、変異型STAT3はLIF非存在下でES細胞の増殖能を促進する機能があることを見出した。このことから、変異型STAT3はLIFに依存することなく、ES細胞の自己複製を維持する機能が示された。これは、がん細胞で認められる遺伝子発現制御機構をES細胞内で再構築することで、ES細胞の幹細胞性を模倣できている可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Pluripotent stem cells, including mouse embryonic stem cells (ES cells) have self-renewal ability and pluripotency. The self-renewal ability of mouse ES cells is maintained by stimulation with the cytokine LIF followed by activation of the transcription factor STAT3. Several investigators, including us, have been working to elucidate the molecular basis of the self-renewal mechanism using STAT3 and its related transcription factors. Interestingly, it has been pointed out that ES cells have similarities with cancer cells. Recent studies have also reported various mutant STAT3 in human cancer tissues. In this study, we focus on the mutant STAT3 which is found in cancer cells and aims to elucidate a novel mechanism(s) of self-renewal regulation mediated by oncogenes.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：多能性幹細胞 がん遺伝子 転写因子 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) ES細胞とがん細胞の類似性に関して、2008年に2報の興味深い論文が発表されている。スタンフォード大学のWongらは、ES細胞、組織幹細胞およびがん細胞の遺伝子発現解析の比較から、ES細胞と組織幹細胞で特徴的な遺伝子発現様式として、ES細胞様モジュールと組織幹細胞モジュールを見出した。具体的には、神経幹細胞、胎児肝造血幹細胞、網膜幹細胞、胚性幹細胞で共通して発現が上昇しているgene setをES細胞様モジュールと呼び、毛根幹細胞、乳腺幹細胞、骨髄造血幹細胞、神経冠細胞、神経幹細胞で共通して発現が上昇しているgene setを組織幹細胞モジュールと名付けた。神経幹細胞には、ES細胞様モジュールをもつものと、組織幹細胞モジュールをもつものがあった。ES細胞様モジュールには、様々な転写因子が含まれ、Sox2, cMyc, HDAC1, Dnmt1, Cbx3, Yy1などがあった。なお、Oct3/4やNanogはES細胞にのみ発現し、神経幹細胞や胎児造血幹細胞には発現していないので、今回提案されたES細胞様モジュールの中には含まれていなかった。注目すべきは、いくつかのがん細胞でもES細胞様モジュールが活性化されており、それは予後の悪さと関連していた。特に乳がん細胞のがん幹細胞画分でES細胞様モジュールが活性化傾向にあったことを報告している。ES細胞様モジュールの中でもc-Mycが中心的な役割を果たしており、乳がん細胞が幹細胞性を得るのにc-Mycが重要な役割を担っていることが明らかにされた(Cell Stem Cell. 2008;2:333-44.)
- (2) MITのWeinbergらの研究グループもまた、低分化型の悪性腫瘍ではES細胞様の遺伝子発現様式を示す知見を報告している。すなわち、ES細胞で発現している遺伝子群が低分化型のがん細胞でも発現し、ES細胞でポリコム群によって抑制されている遺伝子群はがん細胞でも抑制されていた。特にNanogやOct3/4といったES細胞特異的転写因子の標的遺伝子群が、低分化型腫瘍で活性化していることを見出した。具体的には、ER陰性の乳がんや低分化型のグリオブラストーマ、膀胱がんでES細胞様の発現様式を示し、予後も悪いことが報告されている(Nat Genet. 2008;40:499-507.)
- (3) そのような背景のもと、我々はがん細胞とES細胞の両方で特異的に強く発現する遺伝子をデータベース探索した。その結果、乳がんや卵巣がん組織で過剰発現している転写因子ETV4とETV5が、ES細胞でも非常に強く発現していることを見出した。ETV4/5のダブルノックアウト(dKO)ES細胞の解析から、ETV4/5はES細胞では増殖能と多分化能を制御していることを明らかにした(Akagi et al., JBC 2015) この知見は、がん細胞で機能している遺伝子が、ES細胞では幹細胞性制御に関与している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

- (1) 胚性幹細胞(ES細胞)は、初期胚に由来する細胞株で「自己複製能」と「多分化能」という「幹細胞性」を保持した細胞株である。マウスES細胞は培地にサイトカインLIFを添加することで、多分化能を維持したまま自己複製することが可能である。すなわち、LIF刺激により活性化する転写因子STAT3と、ES細胞に発現する転写因子Oct3/4が幹細胞性を制御している。また、ES細胞は、より未分化な状態であるナイーブ型と、やや分化の進んだプラリム型の2つの状態をとることが示され、GSK3とERKの阻害剤(2 inhibitors; 2i)を培地に添加することで、ナイーブ型のマウスES細胞を維持できる。最近、ナイーブ型ヒトES細胞が樹立された。ナイーブ型を規定する種を超えた原理を解明する必要がある。
- (2) 我々を含め世界中の研究者が、STAT3やOct3/4を手掛かりに、その下流遺伝子や相互作用因子の解明を進め、これらが転写因子ネットワークを形成することで幹細胞性を制御していることを明らかにした(Uranishi et al., MCB 2013; Fujii et al, BBRC 2013; Ura et al., EMBO J 2011 他多数)。中心的な転写因子群が解明された時点で、幹細胞性を制御する分子基盤の解明は一定のマイルストーンには達しているように見える。
- (3) 本研究課題では「がん細胞とES細胞の類似性」に着目した。がん細胞とES細胞では、「両者とも未分化状態で増殖する」や「ES細胞をヌードマウスに移植すると奇形腫を作る」といった知見に加え、「低分化型の悪性腫瘍ではES細胞様の遺伝子発現様式を示す」や「乳がん幹細胞画分では、ES細胞様の遺伝子発現が認められる」などの報告がなされている。このような両者の類似性に注目することで、今まで見えてこなかった幹細胞性の根幹に迫ることが出来ると考えられる。そこで本研究では、幹細胞性を制御する新たな分子基盤の解明を目的とし、がん細胞で機能する遺伝子の中で、ES細胞の幹細胞性を制御する遺伝子の同定と機能の解析を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養とアルカリフォスファターゼ染色

マウスE14 ES細胞は、0.1%ゼラチン・コート培養皿でES細胞用培地(DMEM、15%FBS、2 mM グルタミン、1 x 非必須アミノ酸、1 x ヌクレオシド、150 μM 1-thioglycerol、マウスLIF)で培養した。STAT3 KO ES細胞は、2i培地を利用して樹立・培養した。分化誘導には、培地からLIFを除去した。細胞のアルカリフォスファターゼの活性は、vector blue substrate kitを利用し、染色後に観察した。

(2) RT-PCR 解析とウエスタン解析

細胞の total RNA を Sepasol-RNA I Super G を利用して調整した。そして Oligo(dT) primer と逆転写酵素 ReverTraAce を用いて cDNA を合成した。作成した cDNA を鋳型とし、目的の遺伝子に対するプライマーを用いて real-time PCR 法によって定量した。

タンパク質レベルでの遺伝子発現検討には、ウエスタン解析を行った。細胞抽出液をサンプルバッファーに懸濁し、SDS-PAGE 後フィルターに転写した。フィルターは目的の抗体を用いて反応し、ECL システムを用いてシグナルを検出した。

(3) 遺伝子導入とレポーターアッセイ

プラスミド発現ベクターは、lipofectamin 2000 を用いて、ES 細胞に導入した。ピューロマイシン処理し、コロニーを顕微鏡下でピックした。ピックした細胞を十分に増やし、ウエスタンプロット解析で検討することで安定発現細胞株を樹立した。

STAT3 の転写活性化能の評価には、レポータープラスミドとして pAPRE plasmid を利用した。各種 STAT3 とレポータープラスミドを co-transfection し、LIF 刺激の有無によりレポーター活性を比較した。

4. 研究成果

(1) 変異型 STAT3 の構築

転写因子 STAT3 は、いくつかのがん細胞で遺伝子変異が報告されている。大顆粒リンパ球性白血病 (LGL; NK 細胞や細胞障害性 T 細胞が腫瘍化したもの) の 40% で STAT3 の遺伝子変異が報告されている。他の報告からも NK-LGL や T-LGL では共に約 30% のサンプルで STAT3 変異が認められている。そこで我々は、ヒト腫瘍で報告されているいくつかの変異型 STAT3 に着目し、変異型 STAT3 の発現ベクターを構築した。

(2) 変異型 STAT3 の ES 細胞での転写活性化能

変異型 STAT3 の転写活性化能をルシフェラーゼアッセイで解析した。マウス ES 細胞株で検討した結果、野生型 STAT3 は LIF 刺激によってその転写活性化能が上昇するのに対し、変異型 STAT3 は LIF 刺激がない状態でも、高い転写活性化能が認められた。変異型 STAT3 の転写活性化能は、LIF 刺激によりさらに増強された。このことから、変異型 STAT3 は外部からの刺激がない状態でも、ES 細胞の中で恒常的に活性化していることが分かった。

(3) 変異型 STAT3 による ES 細胞の未分化状態の維持

野生型 ES 細胞に変異型 STAT3 を遺伝子導入し、変異型 STAT3 安定発現 ES 細胞株を樹立した。野生型 ES 細胞は、培養する際にサイトカイン LIF が必要で、LIF を除去すると細胞は分化する。ところが変異型 STAT3 安定発現 ES 細胞株は、培地から LIF を除去してもコンパクトなコロニーを形成したまま増殖を続けた。未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を観察したところ、LIF 非存在下でも陽性を示した。ウエスタンプロット解析から遺伝子発現の状態を確認したところ、変異型 STAT3 安定発現 ES 細胞株は LIF の有無にかかわらず、未分化マーカーである Dax1 や Esrrb が発現していた。このことから、がん細胞で報告された変異型 STAT3 は、ES 細胞内でもサイトカイン非依存的に強い転写活性化能を示し、未分化状態を促進する機能があることが示唆された。

(4) STAT3 KO ES 細胞における変異型 STAT3 の効果

以上の知見は、野生型 ES 細胞を利用して得られた結果である。野生型 ES 細胞には内在性 STAT3 があるため、変異型 STAT3 がなんらかの機序で内在性 STAT3 を活性化してしまっている可能性を否定できない。そこで次に STAT3 KO ES 細胞を樹立し、STAT3 KO ES 細胞を利用して変異型 STAT3 の機能を評価した。

レポーター解析の結果、変異型 STAT3 の転写活性化能は、STAT3 KO ES 細胞でも強く観察され、LIF 刺激によりさらに亢進した。変異型 STAT3 安定発現 STAT3 KO ES 細胞は、2i/LIF 非存在下でもコンパクトなコロニーを形成し、アルカリフォスファターゼ陽性であった。遺伝子発現解析からも、Dax1 や Esrrb の発現が 2i/LIF 非存在下で確認された。このことから、がん細胞で報告された変異型 STAT3 は、STAT3 KO ES 細胞の未分化状態維持を維持する機能が示された。

(5) 変異型 STAT3 発現 ES 細胞の増殖能

変異型 STAT3 安定発現 ES 細胞の増殖能を LIF の有無により比較すると、LIF 刺激があると増殖能が低下し、一方、LIF 刺激がないと増殖能が亢進することが認められた。このことから LIF 刺激により変異型 STAT3 の機能が促進し、ES 細胞の増殖能が抑制されることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhu Bo, Ueda Atsushi, Song Xiaohong, Horike Shin-ichi, Yokota Takashi, Akagi Tadayuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Baf53a is involved in survival of mouse ES cells, which can be compensated by Baf53b	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-14362-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Atsushi, Akagi Tadayuki, Yokota Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 GA-Binding Protein Alpha Is Involved in the Survival of Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 2229 ~ 2238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xie Jianjun, Lin Dechen, Lee Dhong Hyun Tony, Akunowicz Jennifer, Hansen Marc, Miller Carl, Sanada Masashi, Kato Motohiro, Akagi Tadayuki, Kawamata Norihiko, Ogawa Seishi, Koeffler H. Phillip	4. 巻 50
2. 論文標題 Copy number analysis identifies tumor suppressive lncRNAs in human osteosarcoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 863 ~ 872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2017.3864	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 赤木紀之、上田篤、手塚聡、増田涼香、下崎琳、堀家慎一、渡会浩志、横田崇。
2. 発表標題 がん細胞で認められた変異型STAT3を介した多能性幹細胞の自己複製制御機構。
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田篤、赤木紀之、堀家慎一、渡会浩志、横田崇 .
2. 発表標題 マウスES細胞におけるEtsファミリー転写因子GABPの各構成因子の役割 .
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田篤、赤木紀之、横田崇 .
2. 発表標題 マウスES細胞における転写因子GABPの機能解析 .
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤木紀之
2. 発表標題 がん遺伝子を介した胚性幹細胞（ES細胞）の自己複製制御機構の解析
3. 学会等名 北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 手塚聡
2. 発表標題 STAT3 S727 リン酸化の未分化ES 細胞における役割の解析
3. 学会等名 生化学会若手の会 第58回 生命科学夏の学校
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 増田涼香、下崎琳。
2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質を利用した転写因子STAT3の細胞内局在の検討
3. 学会等名 平成30年度 関東研究医養成コンソーシアム 第9回夏のリトリート
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Ueda, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota.
2. 発表標題 Ets-related transcription factor GABP is involved in the survival of mouse embryonic stem cells.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadayuki Akagi, Taizo Wada, Masahiro Muraoka, Tomoko Toma, Kenzo Kaji, Kazunaga Agematsu, H. Phillip Koeffler, Akihiro Yachie, Takashi Yokota
2. 発表標題 Functional analysis of 2 amino acids deleted transcription factor C/EBP epsilon found in neutrophil-specific granule deficiency.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bo Zhu, Ueda Ueda, Xiaohong Song, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota.
2. 発表標題 Loss of function of Baf53a (a subunit of chromatin remodeling complex) results in cell death and Baf53b, as well as Baf53a, rescue the phenotype in mouse ES cells.
3. 学会等名 The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bo Zhu, Atsushi Ueda, Xiaohong Song, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota.
2. 発表標題 Baf53a is involved in proliferation of ES cells by regulating p53-p21 pathway and Baf53b compensates for Baf53a function.
3. 学会等名 ISSCR 2017 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Bo Zhu, Atsushi Ueda, Xiaohong Song, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota
2. 発表標題 Baf53a deficiency inhibits cell proliferation and Baf53b substitutes for functions of Baf53a in mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 第15回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 赤木紀之、村岡正裕、和田泰三、東馬智子、加治賢三、上松一永、H. Phillip Koeffler、谷内江昭宏、横田崇.
2. 発表標題 好中球二次顆粒球欠損症における2アミノ酸欠損型C/EBP の機能解析.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	横田 崇 (Yokota Takashi) (50134622)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	上田 篤 (Ueda Atsushi) (90728560)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	