

研 究 報 告 書

「リプログラミングによるがん細胞エピジェネティック異常の起源解明とその臨床応用」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研 究 者：山田 泰広

1. 研究のねらい

細胞初期化過程にはダイナミックなエピゲノム制御機構の改変を伴う。本研究では、細胞初期化技術を、エピゲノム制御状態を改変させるツールと捉え、がん細胞に応用することで、がん細胞のエピゲノム制御状態に変化を誘導し、がん細胞のエピゲノム制御機構の意義解明を目指した。

2. 研究成果

2-1. がん細胞のリプログラミングによるエピゲノム修飾状態のリセットの試み

本研究プロジェクトでは、腫瘍細胞に細胞初期化技術を応用し、腫瘍細胞の分化状態を変化させるとともに、腫瘍細胞のエピゲノム状態を積極的に改変することで、腫瘍細胞におけるエピジェネティック修飾の可塑性を明らかにし、腫瘍細胞の性質にどのような変化がもたらされるかを検討した。

2-1-1. Apc Min マウス大腸腫瘍細胞の初期化の試み

発がんモデルとして、まずは、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである Apc Min マウスの大腸発がんモデルを用いた。大腸腫瘍細胞を初代培養後、山中 4 因子を導入することで、形態が ES/iPS 細胞に類似した細胞株 (iPSC 様細胞) を複数得ることが出来た。腫瘍細胞由来と考えられる Apc 遺伝子の loss of heterozygosity (LOH) を持つ細胞株は、3/200 株であり、腫瘍細胞の初期化効率は非常に低いことが示唆された。得られた腫瘍細胞では、大腸腫瘍に見られる Hoxa5 の異常メチル化は確認されず、少なくとも一部の腫瘍特異的な DNA メチル化は修飾可能であることが示唆された。大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞では、Nanog の発現は確認されなかったものの、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞に分化を誘導することで、trophoblast lineage への分化に重要な Cdx2 や Eomes などの転写因子の発現が亢進することが明らかとなった。さらに大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞をマウス初期胚にインジェクションすることで、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞の一部は生体内胎盤組織へと分化することが分かった。胎盤組織へ分化した大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞には明らかな growth advantage は確認されず、細胞種特異的な発がんを示す結果と考えられた。また、Apc null ES 細胞でも Cdx2 や Eomes の発現亢進が確認されたことから、大腸腫瘍由来 iPSC 様細胞の trophoblast lineage への分化には Apc 遺伝子の loss が関与していることが示唆された。

2-1-2. 明細胞肉腫細胞の初期化

腫瘍細胞の完全初期化が困難であることが示唆されている。特に oncogene addiction に関わるような遺伝子変異の存在が細胞初期化の障壁になっている可能性を疑った。この可能性を検

証するために、oncogene addictionに関わるがん遺伝子の発現調節が可能な腫瘍モデルの作製を試みた。明細胞肉腫の原因遺伝子であると考えられているEWS/ATF1をドキシサイクリン存在下に誘導できるマウスモデルを作製した。作製したマウスにドキシサイクリンを投与すると、明細胞肉腫に類似した腫瘍形成が誘導され、その腫瘍から細胞株を樹立した。このEWS/ATF1関連腫瘍細胞株を用いて、細胞初期化を試みた。ドキシサイクリン非存在下において山中4因子を誘導することで、iPS/ES細胞に類似した細胞株を得ることが出来た。それらの腫瘍由来細胞株ではNanog遺伝子の発現も確認され、奇形腫を形成できることが確認された。腫瘍細胞の初期化が成功した可能性が示唆された。今後、樹立された腫瘍由来iPS細胞株の性質解明を行うとともに、腫瘍の再現を試み、腫瘍モデルの構築を目指す。腫瘍細胞におけるエピゲノム異常解析に有用なツールとなることが期待される。

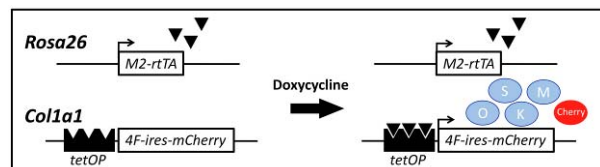
2-2. 細胞リプログラミングに関連する発がんメカニズムの解明

iPS細胞における発がんリスクは、再生医療応用への障壁となることが示唆されている。しかしながら、その腫瘍形成メカニズムについては不明な点が多い。本研究では、山中4因子全てを成体マウスに発現させることで、初期化因子発現により体細胞がどのような変化を来すのかを、特に細胞増殖の観点から個体レベルでの検討を行った。

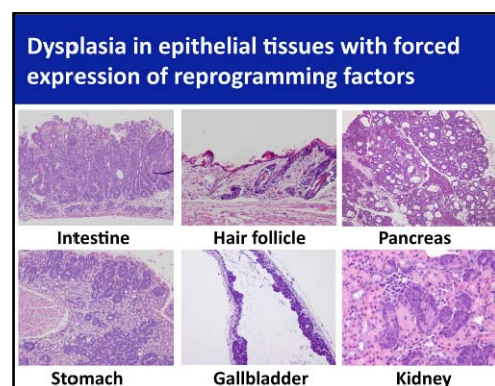
2-2-1. 初期化因子発現によるがん類似病変の形成とその可逆性

Knut Woltjen 研究室との共同研究により、薬剤誘導性の山中4因子を有するES細胞を作製した。得られた山中4因子誘導可能ES細胞を用いてキメラマウスの作製を行った。作製した“reprogrammable マウス”を用いて、以下

の実験を行った。まず、成体マウスにおける山中4因子発現の影響を検討するために、山中4因子誘導可能ES細胞から作製された4週齢キメラマウスにドキシサイクリン



を投与(飲水投与)した。成体マウスに初期化因子を誘導すると、わずか数日後には、胃、小腸、大腸、毛包などに異型細胞の増生が観察された。異型細胞の増生は、膵組織や腎組織、胆嚢上皮組織など、生理的条件下では細胞増殖活性が低い臓器にも確認された。細胞増殖活性の誘導が、初期化因子発現による早期変化の一つであることが示唆された。ドキシサイクリン投与開始後7日目頃より、異型細胞は間質組織への浸潤を来し、がん細胞と同様の増殖形態を示すことが分かった。初期化因子の発現と発がんとの関連を強く示唆する結果と考えられる。



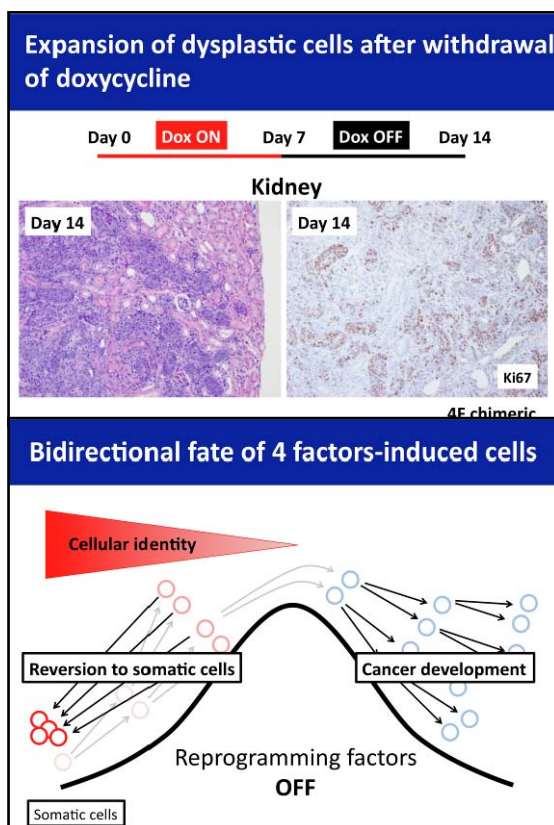
次に、初期化因子発現により誘導された異型増殖細胞において、初期化因子の発現を停止させ、その後の変化を検討した。ドキシサイクリンを4-7日間投与した後、ドキシサイクリン投与を中止し、4-7日後に解剖し、組織学的解析を行った。その結果、ドキシサイクリン投与により広範に見られた異型細胞の増生は、ドキシサイクリン投与中止により、ほとんど消失し、組織像は正

常な状態に戻ることを示唆された。実際に、pulse and chase 実験により、少なくとも一部の増殖細胞は、正常組織に組み込まれていることが明らかとなった。初期化因子発現により異型増殖細胞が誘導され、がん類似病変を形成するものの、初期化因子発現停止により、非腫瘍性組織に組み込まれることが示唆された。

2-2-2. 一過性初期化因子発現による初期化因子非依存性異常増殖病変の形成

興味深いことに、ドキシサイクリン投与中止後も一部の細胞は増殖し続けることが分かった。ドキシサイクリン非依存性の異型細胞増生は、単調な異型細胞の増生からなり、奇形腫とは異なる組織像であった。異型細胞の増生は周囲組織への浸潤性増生を伴い、がん細胞と同様の増殖像を呈するとともに、外来遺伝子発現が消失しているにもかかわらず、高い細胞増殖活性を持つことが確認された。このようなドキシサイクリン非依存性の自律性細胞増生は、ドキシサイクリン投与約 7 日間を境にして出現することが分かった。また、ドキシサイクリン非依存性異型細胞増生は、小児がんの組織像に酷似していることが分かった。小児がん発生と細胞リプログラミングとの関連が示唆された。

以上の結果より、一過性初期化因子発現細胞には“二方向性の運命”が存在することが示唆される。この二方向性を規定する分子機構を明らかにし、細胞のアイデンティティ維持メカニズムを理解することは、細胞初期化と発がんとの関連を明らかにするのみならず、効率的な細胞初期化技術や、ダイレクトリプログラミング法の開発に有用であると考えられる。



3. 今後の展開

明細胞肉腫細胞から得られた iPS 細胞を用いて、発がんにおけるエピゲノム制御機構の重要性を明らかにし、エピゲノム修飾異常の意義解明を目指す。

Reprogrammable マウスを用いて、細胞のアイデンティティ維持メカニズムを理解し、細胞初期化と発がんとの関連を明らかにすることで iPS 細胞の安全な再生医療への応用を目指すとともに、効率的な細胞初期化技術や、ダイレクトリプログラミング法の開発への応用を試みる。

4. 自己評価

本研究では、がん細胞のリプログラミングにより、がん細胞のエピジェネティック修飾異常の起源や意義解明を目指した。当初は腫瘍細胞からの完全な初期化が誘導できず、研究期間前半は十分な研究の発展は得られなかった。その後、初期化因子発現誘導マウスを作製し、その解

析から興味深い phenotype が得られたため、研究期間の後半は主に細胞初期化因子と発がんに関する研究を行った。細胞初期化因子と発がんに関する研究は当初目的とは異なるテーマとして開始したものの、現在では iPS 細胞作製技術を用いたがん細胞のエピジェネティクス研究に展開することができたと考えている。さらに、研究期間終了間際となってしまったが、がん細胞の初期化誘導も達成することが出来た。さきがけ研究は終了したものの、樹立したがん細胞由来 iPS 細胞を用いて、研究を発展させ、がん細胞のエピジェネティック修飾異常の起源および意義の解明を目指したい。

5. 研究総括の見解

採択時点で、この分野での経験を有しており、さきがけのメンバーとして研究を進める上での準備が出来ていると期待した研究者であった。その点では期待通り、がんのエピジェネティクスについて焦点を当てた研究をしっかりと進めて来たと評価している。発表論文としては、がんのエピジェネティクスというより、Rest 分子の機能についての仕事を中心であるが、本来の目的に関する研究成果は今後発表されるものと期待している。研究スタート時には、がんのエピジェネティクスの重要性はそれほど認識されていなかったが、現在は当たり前になっている。その意味で、当初の計画とは異なる新しい方向性の模索が必要になると思う。これまでの仕事をしっかりと纏めるとともに、今後はがんのエピジェネティクスへ切り込む独自の展開を期待する。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and **Yamada Y***. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*, in press, 2012
2. Hatano Y, **Yamada Y***, Hata K, Phutthaphadoong S, Aoki H and Hara A. Genetic ablation of a candidate tumor suppressor gene, *Rest*, does not promote mouse colon carcinogenesis. *Cancer Sci*, 102: 1659-1664, 2011.
3. **Yamada Y***, Aoki H, Kunisada T and Hara A. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell Stem Cell*, 6: 10-15, 2010.
4. **Yamada Y***, Watanabe A. Epigenetic codes in stem cells and cancer stem cells. *Adv Genet*. 70:177-99. Review, 2010.
5. Tomita H, Hirata A, **Yamada Y***, Hata K, Oyama T, Mori H, Yamashita S, Ushijima T, Hara A. Suppressive effect of global DNA hypomethylation on gastric carcinogenesis. *Carcinogenesis*. (9):1627-33, 2010

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

＜主要な学会発表(招待講演)＞

- ・**Yamada Y**, Role of epigenetic modifications in multistage colon carcinogenesis, 27th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Jeju, Republic of Korea, Nov. 2011.
- ・**Yamada Y**, Role of DNA methylation in colon tumorigenesis, The 41st international

Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund, Tokyo, Nov. 2010