

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成23年4月7日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間：2010年4月8日～2011年3月31日

研究題目：分子イメージングによる組織幹細胞可視化法の開発

研究代表者：財団法人癌研究会癌研究所 部長 原 英二

研究成果の概要：

幹細胞性の維持に重要な役割を果たしていることが知られている Bmi-1 とその標的分子である p16^{INK4a} との関係解明を目指した。p16^{INK4a} 遺伝子発現イメージングマウスと Bmi-1 ノックアウトマウスとを交配させることにより、Bmi-1 遺伝子を欠失させた場合に p16^{INK4a} 遺伝子の発現動態がどのように変動するかを調べた。その結果、Bmi-1 遺伝子が欠失したマウスにおいては生後間もない時期から体の殆ど全ての組織において p16^{INK4a} の発現が著しく上昇することを見出し、様々な組織において p16^{INK4a} の発現が Bmi-1 によって抑制されていることが明らかとなった。また、p16^{INK4a} 遺伝子及び p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子の両遺伝子を欠失したダブルノックアウトマウスにおいては未分化性の維持に重要な Oct3/4 遺伝子の発現が高い皮膚癌が発生し安くなることを見出し、p16^{INK4a}/p21^{Waf1/Cip1} 経路の下流に Oct3/4 が存在している可能性が示唆された。そこで、Oct3/4 遺伝子の発癌及び老化における役割を明らかにするために Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスの作成を試み、成功した。

研究分野：がん生物学

キーワード：p16^{INK4a}, Bmi-1, 可視化、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の正常な細胞に発癌の危険性のある異常が生じると、p16^{INK4a} 遺伝子や p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子の発現レベルが上昇し、細胞老化が誘導される。細胞老化は異常細胞の増殖を防ぐ重要な癌抑制機構として働いている一方で、組織幹細胞において細胞老化が起こると生体機能の衰え、即ち個体老化を起こすことが明らかになりつつある。これまで主に培養細胞を用いた研究から p16^{INK4a} 遺伝子の発現はポリコム・グループ転写因子の一つである Bmi-1 により精密に制御されていることが示されてきた。しかし、発癌や個体老化の過程において Bmi-1 が生体内のどこで、いつ、どのように p16^{INK4a} 遺伝子の発現を制御しているのかについては殆ど明らかにされていない。

これらの問題を解決するために我々は一昨年度から金沢大学がん研究所の平尾 敦教授との共同研究を進めてきた。p16^{INK4a} 遺伝子の発現をインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスを作成し、更に Bmi-1 遺伝子ノックアウトマウスと交配させることで生体内における Bmi-1 による p16^{INK4a} 遺伝子発現調節様式を解析するためのシステムの構築が完了しつつある状況で

あった。

また、幹細胞性の維持に重要な役割を果たしている Oct3/4 遺伝子の発現を蛍光及び発光の両方で可視化出来るマウスの必要性も生じていた。

2. 研究の目的

発癌や個体老化の過程において Bmi-1 が生体内のどこで、いつ、どのように p16^{INK4a} 遺伝子の発現を制御しているのかを明らかにするために Bmi-1 遺伝子の発現と p16^{INK4a} 遺伝子の発現をマウスの生体内でリアルタイムに測定できるイメージングマウスの開発を行ってきた。本年度はこれらのマウスに加えて幹細胞性の維持に重要な働きをしていることが知られている Oct3/4 遺伝子の発現を発光および蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るマウスモデルの開発を行い、それらのマウスモデルを組み合わせることで様々な組織幹細胞又はがん幹細胞における幹細胞性の獲得、維持又は喪失がどのような関係で起こるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 昨年度までに作成した p16^{INK4a} 可視化マウスと Bmi-1 ノックアウトマウスを交配させることで、Bmi-1 を欠損した p16^{INK4a} 可視化マウスを作成した。このマウスにおける p16^{INK4a} の発現動態を発癌過程や加齢の過程で解析することにより、生体内での Bmi-1 による p16^{INK4a} の発現調節様式を解析した。
- (2) 上記の Bmi-1 を欠損した p16^{INK4a} 可視化マウスを用いた解析により Bmi-1 が生体内のどの組織で、いつ、p16^{INK4a} の発現を制御しているかを調べ、次に Bmi-1 と p16^{INK4a} の両方を欠損したマウスを用いた解析と組み合わせることで Bmi-1 による p16^{INK4a} 遺伝子発現制御の役割を解析した。
- (3) Oct3/4 遺伝子プロモーターの下流に GFP と luciferase の融合タンパクをコードする遺伝子を導入したマウスを作製し、Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るマウスの作製を試みた。

4. 研究成果

p16^{INK4a} 遺伝子発現イメージングマウスと Bmi-1 ノックアウトマウスを交配させ、Bmi-1 遺伝子を欠失した状態で p16^{INK4a} 遺伝子の発現をイメージング出来るマウスの作製に成功した。更にそのマウスを用いて生体内のどの臓器において p16^{INK4a} の発現が Bmi-1 によって制御されているのかを解析した結果、興味深いことに、生後間もない状態から殆ど全ての臓器や組織において p16^{INK4a} 遺伝子の発現が著しく上昇していることを見出した。また、一部の組織においては加齢とともに p16^{INK4a} 遺伝子の発現が更に上昇することを見出した。これらの結果から、Bmi-1 は生体内の殆ど全ての臓器や組織において p16^{INK4a} 遺伝子の発現を負に調節しているが、加齢の過程では Bmi-1 非依存的なメカニズムによっても p16^{INK4a} 遺伝子の発現が正に調節されていることを示唆する結果も得られた。

また、興味深いことに、p16^{INK4a} 遺伝子及び p21^{Waf1/Cip1} 遺伝子の両方を欠失したダブルノックアウトマウスにおいては未分化性の高い皮膚癌が発生しやすくなり、その皮膚癌においては Oct3/4 遺伝子の発現が著しく高くなることを見出した。

更に、Oct3/4 遺伝子の発癌及び老化における役割を明らかにするために Oct3/4 遺伝子の発現を発光及び蛍光の両方でインビボ・イメージング出来るトランスジェニックマウスの作成を試み、成功した。

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 2 件)

1. Kitajima, S., Miki, T., Takegami, Y., Kido, Y., Noda, M., Hara, E., Shamma, A. & Takahashi, C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interferes with epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. *Oncogene* 30, 737-750 (2011)

2. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Hirao, A., Yanagi, S., Fukami, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16^{INK4a} and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. *Cancer Res.* 70, 9381-9390 (2010)

[学会発表] (計 7 件)

1. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Imai, Y., Ohtani, N. & Hara, E.

DNA damage dependent degradation of histone methyltransferase in cellular senescence. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.) 2010 年 9 月 28 日-10 月 2 日

2. Takeuchi, S., Takahashi, A., Motoi, N., Yoshimoto, S., Tajima, T., Yamakoshi, K., Ishikawa, Y., Sone, S., Hara, E. & Ohtani, N. Intrinsic cooperation between p16^{INK4a} and p21^{Waf1/Cip1} in the onset of cellular senescence and tumor suppression in vivo. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Molecular Genetics of Aging (New York, U.S.A.) 2010 年 9 月 28 日-10 月 2 日

3. 田島丈子、杉田千鶴、近江谷克祐、中尾和貴、柳茂、深見希代子、原 英二、大谷直子 蛍光・発光融合プローブを用いた Oct4 遺伝子イメージングシステムの開発 日本分子生物学会・日本生化学会合同年会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日

4. Takahashi, A., Yamakoshi, K., Ohtani, N., & Hara, E.

Backup tumor suppressor role for p16^{INK4a} in the event of p53 inactivation 日本分子生物学会・日本生化学会合同年会 (神戸) 2010 年 12 月 7 日~10 日

5. 今井良紀、高橋暁子、八尾良司、大谷直子、広田 亨、田原栄俊、井出利憲、野田哲生、原 英二

細胞老化において発癌を促進する因子の探索
日本癌学会（大阪）2010年9月22日～24日

6. Eiji Hara

Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging

Asian aging core for longevity research (Jeju, Korea) 2010年8月22日～24日

7. 原 英二

細胞老化の分子メカニズムとその役割

日本炎症・再生医学会（東京）

2010年8月5日～6日

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

財団法人癌研究会癌研究所・部長 原 英二

(2) 研究分担者

財団法人癌研究会癌研究所・主任研究員

大谷直子

財団法人癌研究会癌研究所・研究員

高橋暁子

財団法人癌研究会癌研究所・嘱託研究員

山越貴水

財団法人癌研究会癌研究所・嘱託研究員

吉本 真

(3) 本研究所担当者

遺伝子・染色体構築・教授 平尾 敦