

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659096

研究課題名（和文）心臓幹細胞の新たな同定法の開発と機能解析

研究課題名（英文）Detection and functional analysis of cardiac stem cells

研究代表者

瀧原 義宏 (Yoshihiro Takihara)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：60226967

研究成果の概要（和文）：

本研究ではRae28/Phc1を含むポリコーム複合体1の分子機能を詳しく明らかにするとともに、その直接的標的であるGemininの発現動態に注目し、心臓内に存在する心臓幹細胞を同定することを目指した。心臓発生においてはPcgf5を含んだ新たなポリコーム複合体が機能していることを示すと同時に、心筋においてGemininが高発現している細胞群が存在することを見つけた。これらの細胞群は心室や中隔にも散見されるが、他の研究室から心臓幹細胞が存在すると報告されている心房に最も多く存在することが解った。心筋は成体では分裂しないと考えられているが、S期の細胞ではGemininの発現が高いことから細胞周期に入っている細胞の可能性もあり、興味深い。

研究成果の概要（英文）：

In this study we further analyzed a molecular role for the Polycomb-group (PcG) complex 1 including Rae28/Phc1 and attempted to identify cardiac stem cells focusing on the expression level of Geminin. PcG complex 1 regulates protein stability through the ubiquitin-proteasome system as well as transcription through the chromatin regulation. We here identified a novel PcG complex with Pcgf5 in the heart and Geminin<sup>high</sup> cellular subpopulations in the heart. Since Geminin<sup>high</sup> cells reside in the cardiac atrium, in which there previously shown was the presence of cardiac stem cells, these are presumed to be candidates for cardiac stem cells. On the other hand, expression of Geminin is high in S-phase cells, suggesting an intriguing possibility that Geminin<sup>high</sup> cells are proliferating cells in the adult heart.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化・組織形成、心臓幹細胞

1. 研究開始当初の背景  
マウスポリコーム遺伝子群の一つRae28/Phc1のノックアウトマウスを作製することによって高等哺乳動物においては、ポ

リコーム遺伝子群がエピジェネティックな転写調節機能を介して発生を制御するだけでなく、細胞の増殖と分化を同時に制御しているGemininに対するE3ユビキチンリガー

ぜとして機能することを見つけた。さらに、造血幹細胞等の幹細胞では Geminin の発現が高く、その活性制御に Geminin が重要な役割を果たしていることをはじめて明らかにした。興味深いことに Rae28 を心筋特異的に高発現させると時間の経過とともに、心筋にアポトーシスが生じ、心筋が脱落していくことを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究ではポリコーム複合体の分子機能をさらに詳しく明らかにするとともに、Geminin の発現動態に注目し、心臓内に存在する心臓幹細胞を同定することを目指した。

## 3. 研究の方法

ウイルスベクターを用いて昆虫細胞中で作製し、抽出単離後、その Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼ活性について生化学的に検討した。また心筋から抽出した新たな PcG 複合体について生化学的に検討した。また、マウス心臓を組織解剖学的に調べ、Geminin の発現動態について検討を進めた。そして、さらに詳しい解析を進めることを目的として Geminin 遺伝子に黄色蛍光色素である enhanced yellow fluorescence protein (EYFP) の遺伝子を挿入した Geminin-EYFP ノックインを作製した。

## 4. 研究成果

ポリコーム複合体が転写制御とプロテアソームを介した直接的なタンパク質の安定性制御を介して、Geminin の発現を一定の恒常性を保ちつつ調節していることを明らかにした (図. 1)。そして、心臓発生においては Pcgf5 を含んだ新たなポリコーム複合体が機能していることを示すと同時に、心筋において Geminin が高発現している細胞群が存在することを見つけた (図. 2)。これらの細胞群は心室や中隔にも散見されるが、他の研究室から心臓幹細胞が存在すると報告されている心房に最も多く存在することが解った。また、心筋は成体では分裂しないと考えられているが、S 期の細胞では Geminin の発現が高いことから細胞周期に入った細胞の可能性もある。従って、同定した Geminin を高発現した細胞の正体については今後さらに解析が必要と考えられた。そこで、EYFP を融合させることによって Geminin を in vivo で可視化することを目的として、Geminin-EYFP ノックインマウスを作製し、詳しい解析を続けて行く計画である。一方、生化学的解析により、Aurora kinase A がリン酸化を介して、Geminin タンパク質の M 期後期における安定

性を制御していることが解り、幹細胞制御における役割が興味深い。

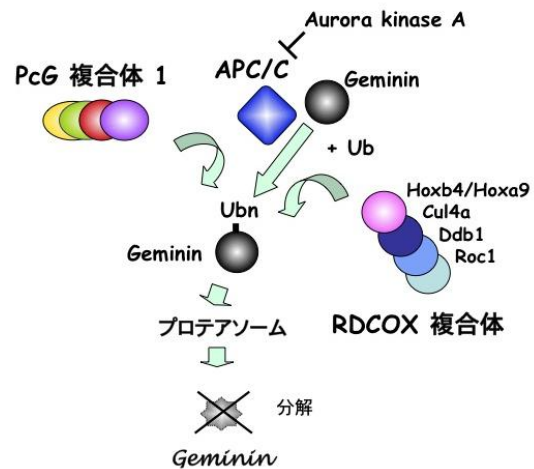


図.1 PcG 複合体 1 や Hox が E3 ユビキチンリガーゼのコア複合体として知られる Cul4a-Ddb1-Roc1 と結合して出来た RDCOX 複合体が Geminin に対する E3 ユビキチンリガーゼとして機能している。APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome、Ub:ユビキチン、Ubn:ポリユビキチン

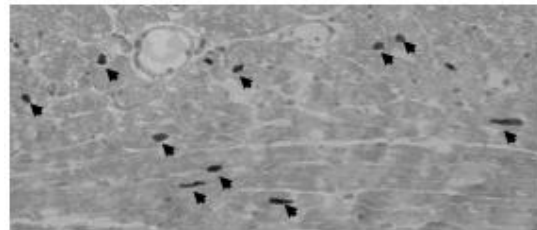


図.2 心筋の組織解剖学的解析。免疫染色により、Geminin<sup>high</sup>の細胞が検出された。

## 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 7 件)

1) Tsunematsu, T., Takahara, Y., Ishimura, N., Pagano, M., Takata, T., Kudo, Y. (2013) Aurora-A controls pre-replicative complex formation and DNA replication by promoting the stabilization of geminin in mitosis. Nature Commun. 4:1885. doi: 10.1038/ncomms2859. 査読有

2) Ohno, Y., Yasunaga, S., Janmohamed, S., Ohtsubo, M., Mihara, K., Iscove, N., Takahara, Y. (2013) Hoxa9 transduction induces mouse hematopoietic stem and progenitor cell activity through direct down-regulation of Geminin.

PLoS ONE 8(1): e53161.  
doi:10.1371/journal.pone.0053161. 査読有

3) Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Shirai, M., Mihara, K., Brock, W. H., Miyoshi, J., Takahara, Y. (2013) Scmh1 has E3 ubiquitin ligase activity for Geminin and histone H2A and regulates Geminin stability directly or indirectly via transcriptional repression of Hoxa9 and Hoxb4.

Mol. Cell. Biol. 33, 644-660. 査読有

4) Prickaerts, P., Niessen, H., Mouchel-Vielh, E., Dahlmans, V., Geijselaers, C., Adriaens, M., Spaepen, F., Takahara, Y., Rapp, U., Peronnet, F., Voncken, J.W. (2012) MK3 controls Polycomb-target gene expression via negative feedback on ERK.

Epigenetics Chromatin 5(1):12. doi: 10.1186/1756-8935-5-12 査読有

5) 瀧原義宏、安永晋一郎、大野芳典、大坪素秋 (2012) 幹細胞における細胞周期制御特集：がん幹細胞研究の新たな展開 血液フロンティア (医薬ジャーナル社) 22、33-43. 査読無

6) Takahara, Y. (2011) Role for Geminin in sustaining the activity of hematopoietic stem cells.

Cell Cycle 10, 561-562. 査読有

7) 瀧原義宏 (2011) 造血幹細胞の守護神 Geminin 原医研ニュース 2、6-7. 査読無

[学会発表]

国際学会 (計 2 件)

1) Takahara, Y., Yasunaga, S., Ohno, Y.,

Saeki, K., Nakashima, Y., Ohtsubo, M. Novel molecular regulatory network governing Geminin maintains hematopoietic homeostasis. 41st annual scientific meeting of the international society for hematology and stem cells, Amsterdam, Netherlands, August 23-26, 2012.

2) Takahara, Y., Ohno, Y., Yasunaga, S., Saeki, K., Kurogi, T., Nakashima, Y., Ohtsubo, M. Scmh1, a member of Polycomb-complex 1, maintains hematopoietic homeostasis through the regulation of Geminin protein stability. International symposium: Genetic and Epigenetic Control of Cell Fate, Kyoto, November 6-7, 2012.

国内の学会 (計 7 件)

1) Shirai, M., Takahara, Y., Morisaki, T. Functional analysis of Pcgf5 (Polycomb Ring Finger 5) gene during Cardiogenesis. 第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年 12 月 11-14 日 (福岡)

2) Ohno, Y., Yasunaga, S., Saeki, K., Ohtsubo, M., Kurogi, T., Nakashima, Y., Takahara, Y. Scmh1 is required for maintaining hematopoietic homeostasis through the molecular network governing Geminin expression. 第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年 12 月 11-14 日 (福岡)

3) Saeki, K., Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Kurogi, T., Nakashima, Y., Takahara, Y. Molecular role for Geminin in E2F-mediated transcriptional regulation. 第 35 回日本分子生物学会年会 平成 24 年 12 月 11-14 日 (福岡)

4) 白井 学、瀧原義宏、森崎隆幸 心臓発生における、ポリコム遺伝子群の発現及び機能解析 日本心臓血管発生研究会 平成 24 年 10 月 19-20 日 (熱海)

5) 瀧原義宏 ポリコム複合体 1 と Hoxb4 による Geminin 制御と造血幹細胞活性 特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポジウム 平成 24 年 8 月 29 日-8 月 31 日 (東京)

6) 白井 学、瀧原義宏、森崎隆幸 ポリコ

ーム遺伝子群の心臓形態形成に対する発現・機能解析 心臓血管発生研究会 平成 23 年 10 月 6-7 日 (郡山)

7) Shirai, M., Takihara, Y., Morisaki, T. Distribution of Polycomb-group proteins in the developing heart.  
第 34 回日本分子生物学会年会 平成 23 年 12 月 13-16 日 (横浜)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/dscb/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀧原 義宏 (Takahara Yoshihiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号：60226967

### (2) 研究分担者

安永 晋一郎 (Yasunaga Shin' ichiro)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授  
研究者番号：50336111

白井 学 (Shirai Manabu)

独立行政法人国立循環器病研究センター・分子生物部・室長  
研究者番号：70294121

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：