

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：15101
 研究種目：特定領域研究
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19057011
 研究課題名（和文）発生過程における細胞増殖の停止機構および細胞分化との相互作用の解析
 研究課題名（英文） Mechanisms of cell cycle arrest and its interaction with cell differentiation during development

研究代表者
 竹内 隆 (TAKEUCHI TAKASHI)
 鳥取大学・医学部・教授
 研究者番号：70197268

研究成果の概要（和文）：

個体の発生過程で細胞の増殖がどのようにして停止するのか、また、増殖は分化とどのような関係があるのかを解析した。その結果、細胞周期の調節因子の一つ、サイクリン D1 の発現を抑制し、その状態を保つことが心筋細胞の増殖停止維持に必須であること、また、このサイクリン D1 が心筋細胞の分化を抑制することとその詳細な分子機構を解明した。これらの成果は、組織の形成、恒常性の維持、そしてがんの発症の理解に重要な知見を与えた。

研究成果の概要（英文）：

We have analyzed how cell cycle arrests and how cell proliferation interacts with cell differentiation during development. We showed that silencing of cycin D1 expression is required for maintenance of the cardiomyocyte cell cycle arrest, and that cycin D1 represses cardiomyocyte differentiation. These results are important for understanding tissue morphogenesis, homeostasis, and oncogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	23,100,000	0	23,100,000
2008年度	23,100,000	0	23,100,000
2009年度	30,072,000	0	30,072,000
2010年度	22,600,000	0	22,600,000
2011年度	22,600,000	0	22,600,000
総計	121,472,000	0	121,472,000

研究分野：発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞周期、増殖停止、細胞分化、発生、再生、マウス、イモリ、分子遺伝学

1. 研究開始当初の背景

個体の発生と組織機能の維持が正常に行なわれるためには、細胞の増殖の進行や停止が適切に制御される必要がある。このような細胞増殖の制御に対し、基本的な細胞周期の機

構は明らかになったが、その細胞周期が個体の中でどのように制御されるかの多くが不明であった。本研究では、個体発生の中で細胞周期が停止し、維持される機構、およびその分化との相関に焦点をあて、これらの分子

機構を解明した。

2. 研究の目的

発生過程の進行に伴い、細胞の増殖は抑制され、停止する。同時に分化が進行する。この増殖の抑制・停止の機構および分化との相互作用の解明を目的とした。

3. 研究の方法

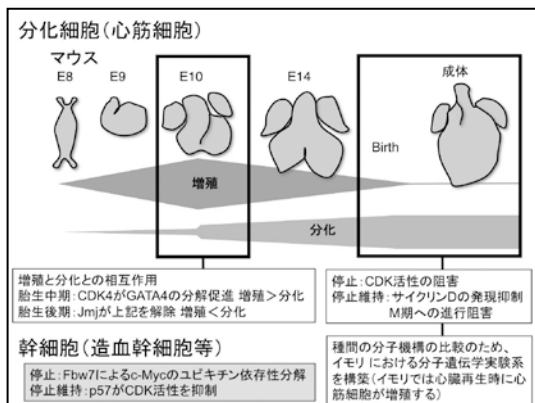
心臓の心筋細胞および造血幹細胞などの組織幹細胞を対象に、ノックアウトやトランスジェニック技術による個体内遺伝子操作などを用いて解析した。

4. 研究成果

発生過程で活発に増殖していた細胞のほとんどは、発生終了後、増殖を停止し、その状態が維持される。一方、組織幹細胞も長期の増殖停止状態を示すことが知られていて細胞の補充時に増殖を再開する。これら細胞の増殖停止、その維持、また、増殖の再開は、組織の形態形成と恒常性維持に必須であるが、それぞれがどのような機構で行われているかについては、多くが未解明である。

この増殖は分化との相互作用、特に二律背反的な関係が示唆されてきた。増殖と分化がどのようなやり取りをしながら互いの活性を調節し、組織の形成や維持に寄与するのかが増殖制御の発生的、生理的意義を知るにおいて極めて重要である。しかし、その分子実体についてもほとんど知見がない。

本計画研究では、これらの未解明な分子機構を明らかにすることをめざし、以下の成果を得た (図)。



(1) 分化細胞の増殖停止機構 (竹内隆)

心筋細胞は胎生期に活発に増殖するが、生後増殖停止し、哺乳類では二度と分裂しない。この心筋細胞に注目し、以下の研究を行った。マウス胎生後期から成体にかけて細胞周期進行分子の動態と細胞周期パターンの変化を詳しく調べた結果、細胞周期進行を促す主要CDKが生後一過性に活性化し、心筋細胞の多くが二核化することが判明した。さらに、これらCDKの活性が低下した後主要CDKサ

イクリンの発現低下が始まり、生後14日では極度に低下、成体までその状態が維持された (Dev. Growth Differ., 2012)。これらの細胞周期進行分子の発現低下の維持機構が心筋細胞の生涯にわたる増殖停止機構の一つと考え、G1期の進行を促すサイクリンD1を成体心筋細胞で発現させたところ、40-60%の心筋細胞が再び、細胞周期に進入することを見いだした。しかしながら、そのほぼ全ての細胞がM期の前に停止するか、M期をスキップして多倍化した。このことは、サイクリンD1など細胞周期進行分子の発現低下状態の維持が心筋細胞の増殖停止の維持を担っていること、さらにそれに加えて新たな停止機構としてM期への進行阻害機構があることを示している (論文投稿準備中)。

一方、哺乳類と異なり、成体心筋細胞の増殖再開が心臓再生時に起こるイモリがマウスと何が異なるかを知るために決定的に欠けていたイモリでの分子遺伝学実験系の構築に成功した (Dev. Growth Differ., 2013)。

(2) 組織幹細胞の増殖制御機構 (中山敬一)

① 組織幹細胞の増殖停止を促すメカニズムと、② 増殖停止を維持するメカニズムを解析した結果、①はユビキチンリガーゼ Fbw7によるc-Mycのユビキチン依存性分解が大きなキープファクターとなっており、②はCDKインヒビターp57がCDK活性を抑制することがその中心となっていることをコンディショナルノックアウトマウスによる実験で突きとめた (Nature, 2011; Cell Stem Cell, 2011等)。さらに白血病がん幹細胞の増殖停止維持にもFbw7が必要であり、その抑制が有効な治療戦略になることを明らかにした。

(3) 増殖と分化との相互作用の分子機構 (竹内隆)

発生期の心筋細胞は、増殖と分化を同時に進行させ、心臓のサイズの増大と心機能の維持を行う。このような心筋細胞で増殖と分化との相互作用があるのか否か、また、あるとすればどのような分子機構なのかを解析した。その結果、胎生中期では、サイクリンD1-CDK4活性が増殖を亢進するとともに心筋細胞の分化調節因子、GATA4をリン酸化し分解を亢進することによって分化の進行を抑制すること、そして、胎生後期では、サイクリンD1の転写抑制因子であるJmjの発現がこの状態を逆転させ、増殖にブレーキをかけ、分化を進行させることを明らかにした (Development, 2011)。

以上、本研究により、分化細胞と幹細胞の増殖制御機構および増殖と分化との相互作用を国内外で初めて解明することに成功した。これらの成果は、組織の形成、恒常性の

維持、そしてがんの発症や治療戦略の理解や発展に重要な寄与をなしたと考えている。また、哺乳類には見られない成体心筋細胞の増殖再開により心臓再生を可能とするイモリで分子遺伝学実験系を構築できた。この成果によりマウスとイモリとを同等に比較でき、両動物の違いの解明により大きな発展が期待される。

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 71 件) 全て査読あり

- ① Hayashi, T., Yokotani, N., Tane, S., Matsumoto, A., Myoga, A., Okamoto, M., and Takeuchi, T. (2013) Molecular genetic system for regenerative studies using newts. *Dev. Growth. Differ.* 55: 229-236. doi: 10.1111/dgd.12019. Epub 2013 Jan 11.
- ② Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Yoshitome, S., Tane, S., Nakamura, K., Obayashi, T., Hayashi, T., and Takeuchi, T. (2012) Cell cycle regulation in mouse heart during embryonic and postnatal stages. *Dev. Growth. Differ.* 54: 731-738. doi: 10.1111/j.1440-169X.2012.01373.x. Epub 2012 Sep 7.
- ③ Takahashi, A., Imai, Y., Yamakoshi, K., Kuninaka, S., Ohtani, N., Yoshimoto, S., Hori, S., Tachibana, M., Anderton, E., Takeuchi, T., Shinkai, Y., Peters, G., Saya, H., and Hara, E. (2012) DNA damage signaling triggers degradation of histone methyltransferases through APC/C^{Cdh1} in senescent cells. *Mol. Cell* 45: 123-131. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.018. Epub 2011 Dec 15.
- ④ Nakajima, K., Inagawa, M., Uchida, C., Okada, K., Tane, S., Kojima, M., Kubota, M., Noda, M., Ogawa, S., Shirato, H., Sato, M., Suzuki-Migishima, R., Hino, T., Satoh, Y., Kitagawa, M., and Takeuchi, T. (2011) Coordinated regulation of differentiation and proliferation of embryonic cardiomyocytes by a Jumonji (Jarid2)-cyclin D1 pathway. *Development* 138: 1771-1782. doi: 10.1242/dev.059295. Epub 2011 Mar 29.
- ⑤ Matsumoto A, Takeishi S, Kanie T, Susaki E, Onoyama I, Tateishi Y, Nakayama K, Nakayama KI. (2011) p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 9:262-71. doi: 10.1016/j.stem.2011.06.014.
- ⑥ Wang H., Bauzon F., Ji P., Xu X., Sun D., Locker J., Sellers R.S., Nakayama K, Nakayama KI., Cobrinik D., and Zhu L. (2010) Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1+/- mice. *Nat Genet.* 42:83-88. doi: 10.1038/ng.498. Epub 2009 Dec 6.
- ⑦ Shirato, H., Ogawa, S., Nakajima, K., Inagawa, M., Kojima, M., Tachibana, M., Shinkai, Y., and Takeuchi, T. (2009) A Jumonji (Jarid2) protein complex represses *cyclin D1* expression by methylation of histone H3-K9. *J. Biol. Chem.* 284: 733-739. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.12.007. Epub 2008 Dec 16.
- ⑧ Kusunoki, H., Takeuchi, T., and Kohno, T. (2009) Solution structure of the AT-rich interaction domain of Jumonji/JARID2. *Proteins* 76: 1023-1028. doi: 10.1002/prot.22449.
- ⑨ Kaneko, S., Takeuchi, T., and Itaya, M. (2009) Genetic connection of two contiguous Bacterial Artificial Chromosomes in the BGM vector. *J. Biotech.* 139: 211-213. doi: 10.1016/j.jbiotec.2008.12.007. Epub 2008 Dec 16.
- ⑩ Susaki E, Nakayama K, Yamasaki L, Nakayama KI. (2009) Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:5192-7. doi: 10.1073/pnas.0811712106. Epub 2009 Mar 10.
- ⑪ Sakae N., Yamasaki N., Kitaichi K., Fukuda T., Yamada M., Yoshikawa H., Hiranita T., Tatsumi Y., Kira J., Yamamoto T., Miyakawa T., and Nakayama KI. (2008) Mice lacking the schizophrenia-associated protein FEZ1 manifest hyper-activity and enhanced responsiveness to psychostimulants. *Hum Mol Genet.* 17:3191-203. doi: 10.1093/hmg/ddn215. Epub 2008 Jul 22.
- ⑫ Takahashi, M., Kojima, M., Nakajima, K., Suzuki-Migishima, R.,

and Takeuchi, T. (2007) Functions of a *jumonji-cyclin D1* pathway in the coordination of cell cycle exit and migration during neurogenesis in the mouse hindbrain. *Dev. Biol.* 303: 549-560.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160606013868>

〔学会発表〕(計約 60 件)

- ① 竹内 隆 なぜ、哺乳類は心臓を再生できず、イモリはできるのか? 日本再生医療学会 2013年3月22日 横浜市(招待講演)
- ② 竹内 隆 心筋細胞の増殖制御機構と心臓再生: マウスとイモリとを比較する 日本動物学会 2012年9月14日 豊中市(招待講演)
- ③ 竹内 隆 心筋細胞の増殖制御機構と心臓再生: なぜ、イモリは心臓再生が可能で哺乳類は不可能なのか? 分子病理学研究会 特別講演 2012年7月22日 恵那市(招待講演)
- ④ Takeuchi, T. How is the cell cycle arrest of cardiomyocytes regulated in mammals and newts? The 5th International Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, 2011年10月25日 沖縄 うるま市(招待講演)
- ⑤ Takeuchi, T. Cell proliferation of mammalian cardiomyocytes and cardiac regeneration. RIKEN CDB Meeting "From Regeneration Biology to Regenerative Medicine" 2011年11月24日 神戸市(招待講演)
- ⑥ Takeuchi, T. Regulation of proliferation and differentiation of cardiomyocytes during development. 国際シンポジウム“形態形成とシグナリング” 2010年11月10日 兵庫県赤穂郡(招待講演)
- ⑦ Takeuchi, T. Regulation of proliferation and differentiation in cardiac development. International Symposium on "Cell Cycle and Development" 2010年3月15日 京都市(このシンポジウムを主催)
- ⑧ Takeuchi, T. Regulation of cardiomyocyte proliferation and differentiation, Workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, 2009年11月30日 沖縄 恩納村(招待講演)
- ⑨ Takeuchi, T. A *Jumonji-cyclin D1* pathway, its roles in the neural development 日本神経科学学会 2009

年9月16日 横浜市(招待講演)

- ⑩ Takeuchi, T. Roles of *Jumonji* in transcriptional control and development. Naito Conference, 2008年6月25日 北杜市(招待講演)

〔図書〕(計8件)

- ① 竹内 隆、岸本健雄(2010) 細胞周期フロンティア~細胞周期制御と発生現象、細胞周期フロンティア、(岸本健雄その他編集) 共立出版、pp 1-5
- ② 竹内 隆(2010) 発生・再生過程における細胞増殖の制御機構、細胞周期フロンティア、(岸本健雄その他編集) 共立出版、pp 207-211
- ③ 竹内 隆(2010) 細胞増殖と形態形成、“生物の事典”(石原勝敏その他編集) 朝倉書店、pp 204-207
- ④ 竹内 隆(2008) 遺伝子ターゲティング法と遺伝子トラップ法、ベーシックマスター発生生物学、(東中川徹その他編集) オーム社、pp 244-260

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)
なし

○取得状況(計0件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://toridaimedseitai.web.fc2.com/index.html>

報道発表

雑誌論文④について2011年3月31日日本海新聞、4月1日毎日新聞、4月5日読売新聞、4月7日山陰中央新報

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 隆 (TAKEUCHI TAKASHI)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号: 70197268

(2) 研究分担者

中山 敬一 (NAKAYAMA KEIICHI)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号: 80291508

(3) 連携研究者

なし