

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790946

研究課題名(和文) 肝発癌を制御するポリコーム群タンパク質の機能解析

研究課題名(英文) The roles of polycomb-group proteins in hepatic stem cell self-renewal and carcinogenesis.

研究代表者

上野 康晴 (UENO YASUHARU)

横浜市立大学・医学研究科・助教

研究者番号：60375235

研究成果の概要：

肝幹細胞の自己複製制御機構の破綻によって生じる発癌過程の理解を目的とし、マウス肝幹細胞におけるポリコーム群遺伝子 Ring1B の機能解析を行った。Ring1B コンディショナルノックアウトマウスを用い、胎生 8.5 日目から胎生 13.5 日目にかけて Ring1B 遺伝子の欠損を誘導したところ、肝発生の初期ステップが著しく阻害されることが明らかとなった。このとき、Ring1B を欠損した肝幹細胞では自己複製能が著しく低下するとともに、負の細胞増殖制御因子である Cdkn2a の脱抑制が観察された。本研究より、肝幹細胞の自己複製において Ring1B が必須であることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：発癌

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は生体の恒常性維持や組織修復において必須であるが、これら幹細胞の制御が破綻した場合、癌をはじめとする様々な疾患に至ることが明らかにされはじめている。幹細胞の自己複製は細胞分化や細胞増殖に関わる複数の遺伝子の発現が協調して制御されることで成立すると考えられるが、これら複数の遺伝子の発現制御に関わる分子と

してポリコーム群(PcG)タンパク質複合体が同定されている。

ポリコーム群(PcG)タンパク質はショウジョウバエの遺伝学より、「細胞記憶」に関与する分子として同定され、その後、PcG タンパク質は細胞核内で複合体を形成し発生・増殖に重要な複数の遺伝子の制御領域と結合することで、i) RNA ポリメラーゼ II のリクルートを妨げて転写を抑制する、ii) DNMTs

の活性を亢進させ DNA のメチル化を誘導することが明らかにされている。

我々はこれまでに肝幹細胞において PcG タンパク質の一つである Bmi1 の機能解析を行い、① Bmi1 を過剰発現させた肝幹細胞では自己複製が過剰に亢進し腫瘍形成に至ること、② Bmi1 を過剰発現させた肝幹細胞では細胞増殖を負に制御するサイクリン依存性キナーゼ 2A(Cdkn2a)の発現が有意に増加することを見だし、Bmi1 が肝幹細胞において自己複製制御因子として機能していることを見だしている (Chiba T, Taniguchi H et al., *Cancer Res.* 1;68(19), 7742-9, 2008.)。また最近、PcG タンパク質複合体を介した遺伝子発現抑制においては、他の PcG タンパク質 Ring1B の重要性が報告されつつあり、Bmi1 と Ring1B との機能的関係に関心が寄せられている。PcG タンパク質複合体を介した幹細胞の自己複製制御機構を理解する上では個々の構成因子の機能を明確にするとともに、PcG タンパク質の下流標的や上流制御因子群を明らかにすることが重要と考えられている。

## 2. 研究の目的

ポリコーム群(PcG)タンパク質複合体を介した肝幹細胞の自己複製制御機構を明らかにするため、PcG タンパク質複合体の構成因子として Bmi1 と直接結合し遺伝子発現制御に深く関わるとされる Ring1B に着目し、肝幹細胞における機能、およびその発現様式を明らかにする。また、Ring1B の標的遺伝子群や上流制御機構解析を試みることで、肝幹細胞の自己複製制御機構の理解を試みる。これにより、幹細胞形質の再獲得に基づくとされる肝発癌過程の分子基盤の本態理解を試みる。

## 3. 研究の方法

当初、ヒト肝癌組織における包括的なポリコーム群タンパク質の発現解析を計画したが、実験開始直前に海外の他グループから報告がなされたため、本研究では Ring1B のコンディショナルノックアウトマウスを用いて、肝幹細胞における Ring1B の詳細な機能解析を実施した。

### (1) Ring1Bコンディショナルノックアウトマウスの作製

理化学研究所 免疫・アレルギー科学 総合研究センターの古関博士らによって作製された Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>マウス、および Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウスを交配し、Ring1B コンディショナルノックアウトマウス(Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウス)を得た。また、

成熟肝細胞における Ring1B の機能を検討するため、Albumin::Cre<sup>+/+</sup>マウスと Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウスと交配し、Albumin::Cre<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウスを得た。これらマウスにおける Cre リコンビナーゼによる Lox-P 配列の特異的切り出し効率を確認するため、Albumin::Cre<sup>+/+</sup>マウスと Rosa26-LoxP-LacZ<sup>+/+</sup>レポーターマウスを交配し、Albumin::Cre<sup>+/+</sup>;Rosa26-LacZ<sup>+/+</sup>マウスを得た。得られたマウスの遺伝型は特異的プライマーを用いたゲノム PCR 法により確認した。

### (2) Ring1Bコンディショナルノックアウトマウスにおける遺伝子欠損誘導

Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>の雄マウス、および Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>の雌マウスを交配した後、プラグが確認された雌マウスの腹腔内に妊娠 8.5 日目、妊娠 10.5 日目、あるいは妊娠 12.5 日目より 5 日間連続してタモキシフェン (TAM) を 1mg/body/day で投与し、胎仔マウスの Ring1B 遺伝子を欠損させた。欠損誘導後、胎生 13.5、胎生 15.5、胎生 17.5 日目において胎仔を回収し、ゲノム PCR 法および Western blot 法で遺伝型を確認した後、肝重量の測定および組織解析を行った。また、5 週齢の Albumin::Cre<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウスより肝臓を回収し遺伝型を確認した後、肝重量の測定および組織解析を行った。

### (3) フローサイトメトリーによるRing1Bコンディショナルノックアウトマウスからの肝幹細胞の選択的単離と培養

妊娠 13.5 日目の Rosa26::CreER(T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup>マウスから胎仔肝臓を回収し、0.1%トリプシン溶液中で 4°C・30 分間インキュベートした。その後、37°C・10 分間の浸透混和処理を行い、さらに、ピペッティング操作により細胞を分散した。得られた細胞を遠心操作により洗浄し、さらに径 40um のナイロンメッシュに通過させることで、単一細胞に分散された細胞浮遊液を調製した。その後、抗マウス CD16/32 抗体(PharMingen)を添加し、氷上で 5 分間反応させた。次に、fluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗マウス CD29 抗体(PharMingen)、phycoerythrin(PE)標識抗マウス CD49f 抗体(PharMingen)、allophycocyanin (APC)標識抗マウス c-Kit 抗体(PharMingen)、biotin 標識抗マウス TER119 抗体(PharMingen)、biotin 標識抗マウス CD45 抗体(PharMingen)を順に添加し、氷上・遮光下で 30 分間反応させた。反応後、遠心操作 (1800rpm、55 秒、4°C) を行い、3%FCS を含む PBS 溶液で 3 回洗浄した。さらに、Streptavidin-APC-Cy7 を添加し、氷上・遮光下で 20 分間反応させた。反応後、遠心操作により細胞を 2 回洗浄した。最後に、0.3ug/ml

propidium iodido (PI)溶液で染色し、MoFlo (Dako cytometry) を用いて画分化を行った。各分化における解析では Summit V4.0 (DakoCytometry)を用いた。細胞画分化にあたり、各ゲートの設定には、蛍光標識抗体と反応させていない細胞をネガティブコントロールとして用いた。

得られた各細胞画分はマウス type IV collagen 細胞培養ディッシュ (BD)上で 250 cells/cm<sup>2</sup> の密度で培養した。培地は 50ng/ml Human recombinant HGF, 20ng/ml recombinant Epidermal growth factor(EGF), 1ug/ml Insulin, 1×10<sup>-7</sup> M Dexamethone, 10mM nicotinamide, 2 mM L-glutamin, 50mM β -mercaptoethanol, 5mM HEPES, 10% fetal bovine serum を含む DMEM/F12 を用いた。培養 5 日後、Dish 上で形成されたコロニーをカウントするとともに、肝細胞および胆管上皮細胞の分化マーカーの発現を検討した。

#### (4) 遺伝子発現解析

AGPC 法により細胞から Total RNA を調製した後、SuperScript<sup>TM</sup>III 逆転写酵素 (invitrogen)と Oligo dT primer を用いて cDNA 溶液を調製した。cDNA 溶液をテンプレートとして、目的遺伝子を特異的に認識するプライマーを用いて半定量 PCR を行った。他方、定量 PCR では TaqMan 試薬 (Applied Biosystems)と ABI PRISM 7700 を用いた。定量解析は、比較 CT 法を用いた。それぞれのサンプルの GAPDH 遺伝子の測定値によって、反応に用いた cDNA 量の補正を行うことで相対定量を行った。

### 4. 研究成果

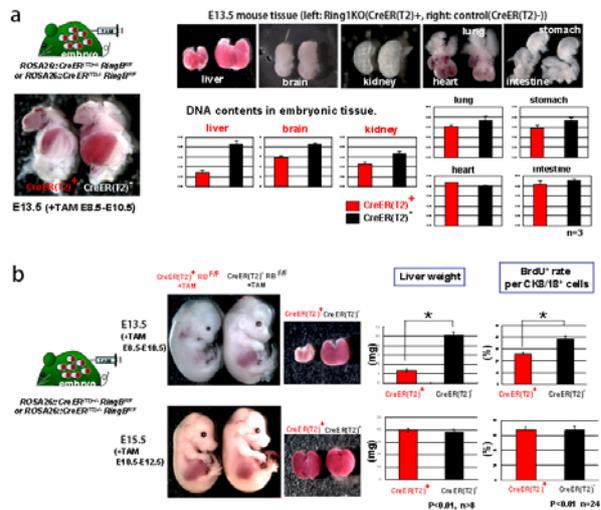
#### 肝発生過程における Ring1B の機能解析

胎生 8.5 日から TAM を 5 日間暴露させた胎生 13.5 日目の Rosa26::CreER (T2)<sup>+/+</sup>; Ring1B<sup>fllox/fllox</sup> 胎仔マウス(Ring1B コンディショナル KO マウス)および、Rosa26::CreER (T2)<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup> 胎仔マウス(Control マウス)から脳・心臓・肺・胃・肝臓・腸・腎臓を回収し顕微鏡下で観察したところ、Ring1B KO マウスでは脳、肝臓、腎臓のサイズが有意に減少していた(図 1a)。これら臓器のなかでも肝臓サイズの減少が顕著であった。

次に、Ring1B KO マウスの肝臓における細胞増殖について検討を行うため、胎生 8.5 日目から TAM を投与し、Ring1B 遺伝子を欠損させた胎生 13.5 日目のマウスについて、BrdU を 1 時間パルスラベルし組織解析を行ったところ、Ring1B を欠損した胎仔肝臓ではサイトケラチン 8/18 陽性を示す上皮細胞において BrdU 陽性細胞数が有意に減少していることが確認された。このことから、Ring1B は肝発生初期において細胞増殖に強く関与

していることが明らかとなった。一方で、胎生 10.5 日目から 5 日間 TAM 投与を行った胎仔マウス、あるいは、胎生 12.5 日目から 5 日間 TAM を投与した胎仔マウスについて、肝臓サイズ、肝臓重量、およびサイトケラチン 8/18 陽性細胞中における BrdU 陽性細胞数を計測したところ、いずれにおいても Ring1B コンディショナル KO マウスと Control マウスの間に差異は認められなかった(図 1b)。また、5 週齢の Albumin::Cre<sup>+/+</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup> 成体マウスおよび Albumin::Cre<sup>-/-</sup>;Ring1B<sup>fllox/fllox</sup> 成体マウスの肝臓を観察しても、両者の間に違いは認められなかった。このことから、Ring1B は肝発生の初期ステップにおいて特に重要な機能を担っていることが明らかとなった。

図1. Ring1B欠損マウスにおける肝発生異常

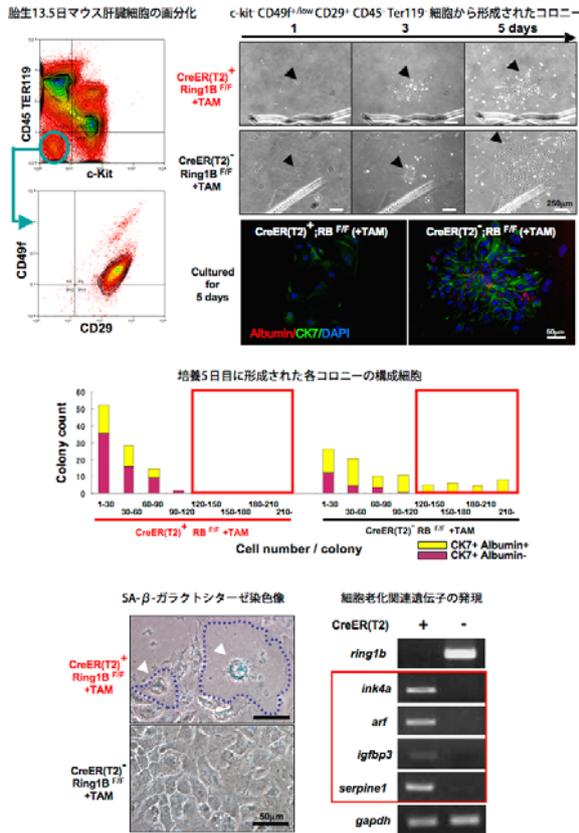


#### 肝幹細胞における Ring1B の機能解析

肝発生の初期ステップにおいては肝幹細胞の自己複製が大きく関与していると考えられている。そこでフローサイトメトリーを用いて Ring1B コンディショナル KO マウスの肝臓から肝幹細胞を選択的に回収し、クローナルな培養系におけるコロニー形成過程を *in vitro* コロニーアッセイ法により解析した。胎生 13.5 日目の Ring1B コンディショナル KO マウスおよび Control マウスの肝臓よりフローサイトメトリーと蛍光モノクローナル抗体を用いて c-kit<sup>+</sup> CD49<sup>hi/low</sup> CD29<sup>+</sup> CD45<sup>-</sup> Ter119<sup>-</sup>細胞を選択的に分離し、タモキシフェン存在下で培養したところ、Ring1B コンディショナル KO マウスでは 100 以上の細胞から構成され、かつ、Albumin 陽性の肝細胞とサイトケラチン 7(CK7)陽性の胆管上皮細胞を含むコロニー数が顕著に減少することが確認された(図 2 上段)。すなわち、Ring1B 欠損により、高い増殖能と多分化能を兼ね備えた肝幹細胞の存在頻度が著しく減少することが明らかとなった。また、Ring1B 欠損肝

幹細胞では SA-βガラクトシターゼ陽性染色像が確認され、細胞老化に関連した遺伝子発現が増加していることが確認された(図 2 下段)。このことから、ポリコム群タンパク質 Ring1B は肝幹細胞の自己複製に必須であると考えられた。

図2. 胎仔マウス肝幹細胞の分離および特性解析

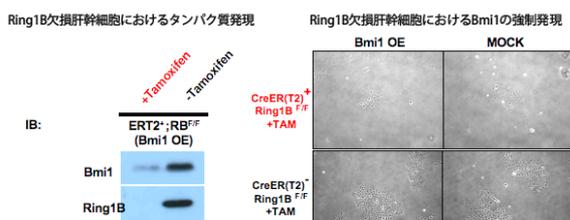


### Ring1BとBmi1の相互作用解析

過去の生化学的解析より、Ring1BはBmi1と直接的に相互作用し、タンパク質の安定化などに寄与する可能性が報告されているが、幹細胞におけるRing1BとBmi1の機能的接点の実際については未解明である。そこで、TAM添加によりRing1Bを欠損させた肝幹細胞とTAMを含まない培地で培養した肝幹細胞におけるBmi1タンパク質の発現量を検討した。その結果、Ring1Bを欠損させた肝幹細胞では、Bmi1タンパク質の発現量が低下していることが明らかとなった(図3左)。

さらに、Ring1BとBmi1の機能的接点を検討するため、Ring1Bを欠損させた肝幹細胞においてBmi1遺伝子をレトロウイルス遺伝子導入系を用いて強制発現させ、肝幹細胞の表現型に及ぼす影響を検討したところ、Ring1B欠損による細胞増殖能の低下はBmi1によって解除されないことが明らかとなった(図3右)。

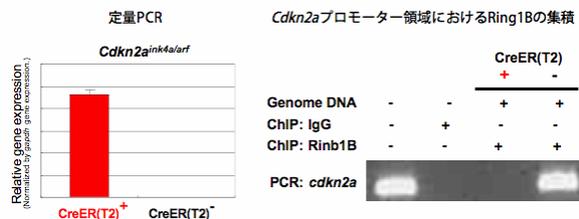
図3. Ring1BとBmi1の相互作用



### Ring1B標的遺伝子の解析

過去の知見から、PcGタンパク質は幹細胞で細胞周期の負の因子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKNs)の発現を抑制し続けることで、幹細胞の増殖活性に寄与していることが考えられている。造血幹細胞におけるBmi1を対象とした解析より、Bmi1は発癌と関連するCdkn2aの発現抑制に深く寄与しており、Bmi1の過剰発現は造血幹細胞の自己複製を過剰に亢進させ白血病幹細胞を誘導することが示されている。そこで、本研究では、肝幹細胞においてRing1BがCdkn2aの発現抑制に寄与しているか否かを検証した。定量PCR法により、Ring1B欠損群および非欠損群におけるCdkn2aの発現解析を行ったところ、Ring1B欠損群では有意にCdkn2aの発現増加(脱抑制)が確認された(図4左)。さらに、野生型肝幹細胞においてCdkn2aのプロモーター領域でRing1Bの集積が認められるか否かをクロマチン免疫沈降法とPCR法を組み合わせた(ChIP-PCR)により検証したところ、Ring1Bの集積がCdkn2aのプロモーター領域で観察された(図4右)。このことから、Ring1Bは肝幹細胞においてCdkn2aの発現抑制に寄与していることが明らかとなった。

図4. Ring1BによるCdkn2a遺伝子の発現抑制



### 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)

Expression and localization of Regenerating gene I in a rat liver regeneration model, Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, Koizumi Y, Okamoto H, Sugiyama T., *Biochem Biophys Res Commun.* 13;380(3):472-7, 2009, 査読あり.

Acute effects on the lung and the liver of oral administration of cerium chloride on adult, neonatal and fetal mice, Kawagoe M, Ishikawa K, Wang SC, Yoshikawa K, Arany S, Zhou XP, Wang JS, Ueno Y, Koizumi Y, Kameda T, Koyota S, Sugiyama T., *J Trace Elem Med Biol.* 22(1):59-65, 2008, 査読あり.

〔学会発表〕(計 8 件)

「肝幹細胞の自己複製におけるポリコム群遺伝子Ring1Bの機能」、内藤貴子、上野康晴、宮部陽介、磯野協一、古関明彦、谷口英樹、第 8 回日本再生医療学会、2009 年 3 月 5 日・6 日、東京.

「BMI1 過剰発現によるヒト肝幹細胞から肝細胞への分化」李斌、鄭允文、宮部陽介、上野康晴、谷口英樹、第 8 回日本再生医療学会、2009 年 3 月 5 日・6 日、東京.

「フローサイトメトリーを用いたヒト肝幹細胞の分離・同定」、鄭允文、李斌、上野康晴、谷口英樹、第 8 回日本再生医療学会、2009 年 3 月 5 日・6 日、東京.

「*in vivo*における血管ネットワーク構造を有するヒト高次肝臓組織の再構築」、仲野晶、藤原綾二、小池直人、千葉豊生、網谷猛、岡村愛、FUKUMURA DAI, JAIN RAKESH K、上野康晴、鄭允文、谷口英樹、第 8 回日本再生医療学会、2009 年 3 月 5 日・6 日、東京.

「肝幹細胞の自己複製機構にポリコム群遺伝子Ring1A/Bが関与する」、内藤貴子、上野康晴、宮部陽介、磯野協一、古関明彦、谷口英樹、第 2 回日本エピジェネティクス研究会、2008 年 5 月 9 日・10 日、静岡.

「肝幹細胞の自己複製におけるポリコム群遺伝子Ring1Bの機能解析」内藤貴子、上野康晴、宮部陽介、磯野協一、古関明彦、谷口英樹、第 6 回幹細胞シンポジウム、2008 年 5 月 16 日・17 日、東京.

「可視化した幹細胞を用いた非対称分裂解析系の確立」石川桃太郎、須崎敦大、川下金明、大島祐二、上野康晴、鄭允文、谷口英樹、第 6 回幹細胞シンポジウム、2008 年 5 月 16 日・17 日、東京.

「肝幹細胞におけるpolycomb群遺伝子 Ring-1B の機能解析」、内藤貴子、上野康晴、宮部陽介、磯野協一、古関明彦、谷口英樹、第 7 回日本再生医療学会、2008 年 3 月 13 日、名古屋.

〔図書〕(計 6 件)

「肝幹細胞の自己複製機構」、谷口英樹、内藤貴子、上野康晴、肝胆膵別冊、57(3): 355-361、2008.

「肝臓における組織幹細胞」、谷口英樹、上野康晴、日本臨牀、66(5): 932-938、2008.

「肝幹細胞の自己複製制御と肝発癌(Stem cell self-renew in hepatocarcinogenesis)」、内藤貴子、上野康晴、谷口英樹、細胞The Cell 3 月号、40(3): 20-23、2008.

「再生医療におけるiPS細胞開発の意義」、上野康晴、谷口英樹、日本再生医療学会雑誌再生医療 2 月号、17(1): 11-12、2008.

「肝臓の幹細胞システムはどのようになっているのか?」、谷口英樹、上野康晴、分子消化器病、14(4): 6-13、2007.

「上皮-間葉相互作用」、上野康晴、谷口英樹、ティッシュエンジニアリング2007、第1章 7、p43-48、2007.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

上野 康晴 (UENO YASUHARU)  
横浜市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号：60375235

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

