

平成 23 年 6 月 10 日現在

機関番号： 22701
 研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2009 ~ 2010
 課題番号： 21791258
 研究課題名 (和文) ポリコーム群タンパク質複合体を介する肝幹細胞の自己複製制御機構の解析
 研究課題名 (英文) Functional analysis of polycomb group gene Ring1B in the self-renewal of hepatic stem cells
 研究代表者
 上野 康晴 (UENO YASUHARU)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号： 60375235

研究成果の概要 (和文) : ポリコーム群 (PcG) タンパク質は、ヒストン修飾を介して様々な発生活関連遺伝子群の転写抑制に寄与する。我々はこれまでに、PcG タンパク質 Bmi1 が肝幹細胞の自己複製を正に制御していることを明らかにしているが、その作用機序は未解明である。本研究では PcG タンパク質複合体構成因子のうち、標的遺伝子の転写抑制で重要な役割を持つ Ring1B を対象として肝幹細胞における標的遺伝子の探索を試みた。その結果、肝幹細胞の Ring1B 下流候補遺伝子約 900 遺伝子を同定した。これらの遺伝子には、細胞周期やアポトーシス制御に関わるものが複数含まれていた。肝幹細胞の自己複製において Ring1B は細胞周期やアポトーシス制御を担っているものと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : The polycomb-group (PcG) proteins are critical determinant for the self-renewal capacity of the stem cells by transcriptional repression of developmental regulatory genes. In this study, to investigate the role of PcG protein in maintaining the self-renewal capability function in the hepatic stem cells, we examined the Ring1B target genes in hepatic stem cells by using the Ring1B conditional KO mice and DNA microarrays. We demonstrated that Ring1B repressed approximately 900 genes in hepatic stem cell. Ring1B target gene sets contained multiple genes related to cell cycle and apoptosis. Ring1B may regulate the self-renewal capacity of hepatic stem cells by suppressing cell cycle genes and apoptosis regulatory genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：幹細胞、自己複製、ポリコーム群タンパク質、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は組織の発生や恒常性維持、組

織修復において重要な機能を担う。組織幹細胞が個体の生涯に渡って娘細胞を供給し続

けるためには、幹細胞の最も重要な特性である「自己複製能」が適切に制御される必要がある。幹細胞の自己複製は細胞分化を抑制しながら細胞増殖が亢進している状態と捉えることができ、これまでに ES 細胞や造血幹細胞等の研究から細胞増殖や細胞分化に関わる複数の遺伝子の関与が見いだされている。しかしながらこれら複数の遺伝子群がどのような機構で統合的に発現制御され、幹細胞の自己複製の成立基盤となっているかについては未解明である。我々の研究グループは複数の細胞増殖や細胞分化関連遺伝子群の発現制御を介して「細胞記憶」に関わるとされるポリコム群 (Polycomb group: PcG) タンパク質複合体に着目し、肝幹細胞の自己複製における役割を検討している。これまでに、我々は PcG タンパク質の一つである Bmi1 を肝幹細胞で過剰発現させるとこの細胞の自己複製が異常に亢進するとともに、肝発癌に至ることを見いだしている。肝幹細胞における PcG タンパク質の役割を明らかにすることは、正常組織における肝幹細胞の維持機構の解明に繋がるだけでなく、発癌プロセスの理解にも繋がると考えられ解明が待たれる。

2. 研究の目的

本研究では、PcG タンパク質複合体を介した肝幹/前駆細胞の自己複製制御機構を解明するため、PcG タンパク質複合体の中でも標的遺伝子の転写を直接制御していると考えられる PRC1 (Polycomb repressive complex 1) の構成因子の役割、機能発現様式を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

(1) 肝臓の器官形成における Ring1B の機能解析

タモキシフェン存在下において Ring1B をコンディショナルに欠損させることが可能な ROSA26::CreER(T2)+/-;Ring1B flox/flox マウス (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り作製された Ring1B コンディショナル KO マウス) を交配し、妊娠マウスを得た後、母体の腹腔内にタモキシフェンを投与し Ring1B の欠損を誘導した。その後、胎仔マウスの組織学的変化を観察した。

(2) 肝幹/前駆細胞のクローン性コロニー形成における Ring1B の機能解析

Ring1B コンディショナル KO マウスの交配により得た胎仔マウスより肝臓を分離し、フローサイトメトリーを用いて肝幹/前駆細胞を選択的に分離し、クローナルな培養系でクローン性コロニー形成過程を評価した。単一細胞の肝幹/前駆細胞を播種した後、培養 5 日目に形成されるコロニーの構成細胞数、および分化マーカーの発現について検討した。

(3) Ring1B 下流遺伝子の抽出

タモキシフェン存在下で Ring1 を欠損することが可能な ROSA26::CreER(T2)+/+;Ring1B flox/flox 妊娠マウスあるいはタモキシフェン存在下においても Ring1 が欠損されない ROSA26::CreER(T2)-/-;Ring1B flox/flox 妊娠マウスの腹腔内にタモキシフェンを各々投与し、胎生 13.5 日目の胎仔を回収した。これらのマウスから肝幹細胞を分離し、マイクロアレイ解析および定量的 RT-PCR 解析を行うことで、Ring1B 欠損時に脱抑制が生じる遺伝子を抽出した。また、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて各遺伝子のプロモーター領域における Ring1B タンパク質集積を検討した。

4. 研究成果

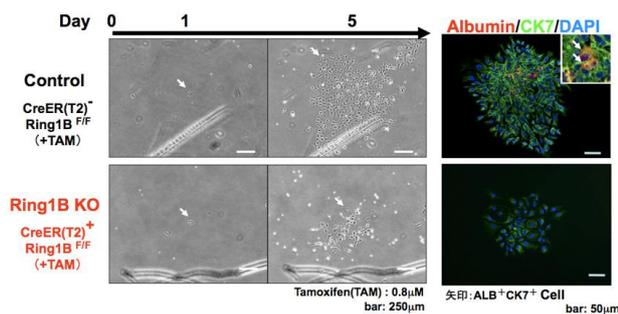
(1) 肝臓の器官形成における Ring1B の機能解析

肝臓形成プロセスの様々な時期で Ring1B の欠損を誘導し組織学的に比較したところ、肝臓発生の初期ステップ (E8.5-10.5) で Ring1B 欠損を誘導した際に、最も顕著な肝臓器官形成阻害が確認された。この時期は肝幹細胞が活発に自己複製を行っているものと考えられている。一方で、成体肝臓において Ring1B を欠損させても、有意な組織学的な変化は認められなかった。



(2) 肝幹/前駆細胞のクローン性コロニー形成における Ring1B の機能解析

肝幹/前駆細胞のクローン性コロニー形成過程における Ring1B の機能を検討したところ、Ring1B を欠損させた肝幹/前駆細胞はクローン性コロニー形成が顕著に阻害された。培養5日目においてアルブミン陽性細胞およびサイトケラチン7陽性細胞の存在を検討したところ、Ring1B 非欠損群ではアルブミンとサイトケラチン7を共に発現する未分化な細胞が確認されるが、Ring1B 欠損群では未分化な細胞の存在頻度が顕著に低下していた。



(3) Ring1B 下流遺伝子の抽出

Ring1B は様々な下流遺伝子の発現を抑制することが知られている。肝幹細胞における Ring1B 下流遺伝子を抽出するため、Ring1B を欠損した肝幹細胞で脱抑制を受ける遺伝子群をマイクロアレイ解析により抽出した。その結果、脱抑制を受ける約 900 遺伝子を同定した。Ring1B 下流候補遺伝子について ChIP-PCR 解析を行ったところ、PcG タンパク質の代表的な下流遺伝子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 Cdkn2a 以外に複数の下流標的遺伝子が抽出された。これらの中には、Cdkn2a とは異なる細胞周期関連遺伝子、また、アポトーシスに関わる遺伝子群が含まれていた。これらの遺伝子群は Ring1B を介した肝幹細胞の自己複製制御に深く関わりと考えられる。

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 3 件)

- ① Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng YW, Ueno Y, Koike N, Tanaka J, Taniguchi H, Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver

cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor, *J Biosci Bioeng.* 2011, 111(6):711-8. 査読有.

- ② Wang J, Koyota S, Zhou X, Ueno Y, Ma L, Kawagoe M, Koizumi Y, Okamoto H, Sugiyama T., Expression and localization of Regenerating gene I in a rat liver regeneration model, *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 13:380(3):472-7. 査読有.
- ③ 上野康晴, 内藤貴子, 谷口英樹, ポリコーン群タンパク質を介した肝幹細胞の自己複製制御, *生物物理化学*, 2009, 53(4): 115-119. 査読有.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 上野康晴, 小池博之, 椎名智也, 内藤貴子, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹 ポリコーン群タンパク質 Ring1B を介したマウス肝幹細胞の自己複製制御, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
- ② 小池博之, 上野康晴, 小花祐太, 椎名智也, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, マウス肝幹/前駆細胞におけるポリコーン群タンパク質 Ezh2 の機能解析, 第 10 回日本再生医療学会総会, 2011 年 3 月, 東京.
- ③ Zheng YW, Li B, Kimura M, Ueno Y, Taniguchi H, Self-renewal versus differentiation in vitro of human hepatic stem cells, BIT's 3rd Annual world Congress of Regenerative Medicine & Stem Cells 2010, Dec.5-7, 2010, Shanghai, China.
- ④ 小池博之, 上野康晴, 内藤貴子, 椎名智也, 小花祐太, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, マウス肝幹細胞の自己複製におけるポリコーン群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.
- ⑤ 小花祐太, 上野康晴, 小池博之, 椎名智也, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコーン群タンパク質 Ezh2 の機能解析, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月, 神戸.
- ⑥ 関根圭輔, 藤原綾二, 小池直人, 千葉豊

- 生, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, 血管ネットワークを有したヒト肝組織の生体内再構築系の確立, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月, 神戸.
- ⑦ Zheng YW, Li B, Miyabe Y, Ueno Y, Taniguchi H, Clonal identification and differentiation of human hepatic stem cells, 8th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June, 2010, San Francisco, USA.
- ⑧ 椎名智也, 上野康晴, 内藤貴子, 小花裕太, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞の自己複製制御におけるポリコム群蛋白質 Ring1B の機能解析, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島.
- ⑨ 嶋尾大樹, 鄭允文, 田中寛康, 滝口和也, 櫻井裕, 上野康晴, 石橋直人, 柳田慎吾, 谷口英樹, 非環式レチノイドによる肝発癌抑制作用の検討, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島.
- ⑩ 藤原綾二, 小池直人, 千葉豊生, Dai Fukumura, Rakesh K. Jain, 関根圭輔, 上野康晴, 鄭允文, 谷口英樹, in vivo における血管ネットワークを有したヒト肝組織再構築系の確立, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島.
- ⑪ 椎名智也, 上野康晴, 内藤貴子, 小花裕太, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, The polycomb group gene Ring1B is regulate the self-renewal of hepatic stem cells, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月, 横浜.
- ⑫ 小花祐太, 上野康晴, 宮部陽介, 内藤貴子, 古関明彦, 谷口英樹, Role of a polycomb group gene Ezh2 in the self-renewal of murine hepatic stem cells, 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月, 横浜.
- ⑬ 谷口英樹, 上野康晴, 内藤貴子, 古関明彦, 肝臓の器官形成におけるポリコム群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月, 神戸.
- ⑭ 上野康晴, 内藤貴子, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコム群タンパク質 Ring1B の機能解析, 第51回日本消化器病学会大会, 2009年10月, 京都.
- ⑮ 上野康晴, 内藤貴子, 鄭允文, 磯野協一, 古関明彦, 谷口英樹, 肝幹細胞におけるポリコム群遺伝子 Ring1B の機能解析, 第68回日本癌学会学術集会, 2009年10月, 横浜.
- ⑯ Ueno Y, Naito T, Zheng Y.W., Isono K, Koseki H, Taniguchi H, The Polycomb gene Ring1B is essential for the expansion of hepatic stem cells in the developing liver, 7th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research (ISSCR), June, 2009, Barcelona, Spain.
- ⑰ Naito T, Ueno Y, Zheng Y.W., Isono K, Koseki H, Taniguchi H, The role of polycomb group gene Ring1B in the proliferation of hepatic stem cells, 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.
- ⑱ Li B, Zheng Y.W., Miyabe Y, Ueno Y, Taniguchi H, The prospective identification and differentiation of human hepatic stem cells, 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.
- ⑲ Takebe T, Kobayashi S, Inui M, Emoto Y, Ueno Y, Zheng Y.W., Maegawa J, Taniguchi H, Identification of human cartilage progenitor cells in the perichondrium of auricular cartilage, 第7回幹細胞シンポジウム, 2009年5月, 東京.

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~sais ei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：