

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 5 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390195

研究課題名（和文）iPS 細胞を用いた造血幹細胞の誘導法の開発とその分子基盤の解析

研究課題名（英文）Induction of hematopoietic stem cells from iPS cells and the molecular basis in the induction

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）：

Geminin が造血幹細胞の自己複製と分化の誘導を掛け分ける中核因子として機能していることが推測された。そこで、蛍光タンパク質 EYFP を用いて Geminin を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するとともに、同マウスの胎仔線維芽細胞から iPS 細胞を作製した。また、Geminin の発現を自在に操作できる実験系の開発を行い、Geminin 量を操作することによって、造血幹細胞の活性を操作できることを明らかにした。今後、自己複製における Geminin の役割をさらに明らかにし、iPS 細胞から造血幹細胞を誘導するための新技術の開発を目指したい。

研究成果の概要（英文）：

Geminin is presumed to regulate cell fate decision whether the hematopoietic stem cells (HSCs) self-renew or differentiate to produce mature blood cells. We then generated Geminin-EYFP knockin mice to visualize Geminin and iPS cells from the murine knockin fibroblasts. And we also generated vector systems to overexpress or knock-down Geminin expression by using the shRNA. We here showed that Geminin induces quiescence and undifferentiated states in hematopoietic stem cells but that Geminin is down-regulated in the progeny subpopulations to induce differentiation and proliferation, resulting in production of large amount of mature blood cells. We further analyze expression profile and a role for Geminin in self-renewing hematopoietic stem cells, and aim to generate a new technology for inducing HSCs from iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2011 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2012 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：造血幹細胞移植学、iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景

| ES/iPS 細胞から造血幹細胞を誘導したり、ex

vivo で造血幹細胞を増幅可能な新技術の開発が待たれている。研究室では造血幹細胞の活性を支持する2大内的因子であるポリコム複合体1やHoxb4に関する解析結果から、Gemininが造血幹細胞の自己複製と分化の誘導を掛け分ける中核因子として機能しているのではないかと考え、本研究を企画した。

2. 研究の目的

造血幹細胞制御や白血病発症におけるGemininの役割を明らかにし、その発現制御動態を明らかにするとともに、Gemininに注目して造血幹細胞の誘導法の開発を目指した。

3. 研究の方法

Scmh1のノックアウトマウスとGeminin-EYFPノックインマウスは大阪府立病院機構成人病センター研究所・分子生物学部門(三好淳部長)との共同研究で作製した。造血細胞への遺伝子導入はレトロウイルスベクターを使用し、複合体はバキュロウイルスベクターを用いて昆虫細胞中で作製し、抽出後、その活性をin vitroで生化学的に検討した。

4. 研究成果

自己複製能を含めた造血幹細胞の活性を誘導する機能をもつHoxb4だけでなく、白血病発症との関連が知られているHoxa9もGemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして機能することを明らかにした(図.1)。そしてさらにポリコム複合体1のメンバーでGemininとの結合ドメインを提供するScmh1のノックアウトマウスを作製し、ポリコム複合体1及びHoxba9やHoxb4によってGemininが一定の恒常性を保ちながら発現制御されていることを明らかにした。次に、Geminin遺伝子に黄色蛍光タンパク質遺伝子EYFPをノックインすることによって、Geminin-EYFP融合タンパク質が発現するようにし、Gemininをin vivoで可視化したGeminin-EYFPノックインマウスを作製した。そして、さらにホモ接合型Geminin-EYFPノックインマウスの胎仔線維芽細胞からiPS細胞を作製した(東京大学医科学研究所・小林俊寛博士との共同研究)。また、レトロウイルスベクターやGemininに対するshRNAを用いてGemininの発現を自在に操作できる実験系の開発を行い、Geminin量を操作することによって、造血幹細胞の活性を操作できることを明らかにした。しかし、Gemininの発現量を操作することによってES/iPS細胞からex vivoで造血幹細胞を誘導できるにまでは至っていない。最近、Aurora kinase Aがリン酸化を介して細胞周期のM期後期におけ

るGemininの安定性を制御し、次の細胞周期のDNA複製を保証していることを見つけており(徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・工藤保誠博士との共同研究)(図.1)、幹細胞制御との関連が興味深い。今後、自己複製におけるGemininの役割をさらに明らかにし、造血幹細胞を増幅可能な新技術の開発に貢献することを目指したい。

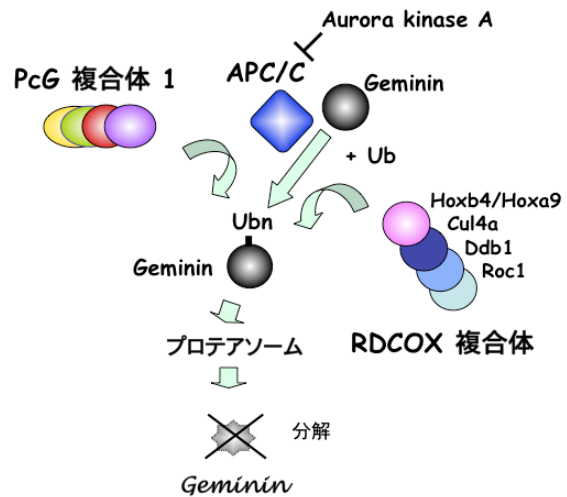


図.1 PcG複合体1やHoxがE3ユビキチンリガーゼのコア複合体として知られるCul4a-Ddb1-Roc1と結合して出来たRDCOX複合体がGemininに対するE3ユビキチンリガーゼとして機能している。APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome、Ub:ユビキチン、Ubn:ポリユビキチン

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計18件)

1) Hirata, O., Okada, S., Tsumura, M., Kagawa, R., Miki, M., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.-L., Takiyama, Y., Kobayashi, M. (2013) Heterozygosity for the Y701C STAT1 mutation in a multiplex kindred with multifocal osteomyelitis. *Haematologica, in press.* 査読有

2) Tsunematsu, T., Takiyama, 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

3) Ohno, Y., Yasunaga, S., Janmohamed, S., Ohtsubo, M., Mihara, K., Iscove, N., Takihara, 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

4) Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Ohno, Y., Tanaka-Okamoto, M., Ishizaki, H., Shirai, M., Mihara, K., Brock, W. H., Miyoshi, J., Takihara, 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

5) Prickaerts, P., Niessen, H., Mouchel-Vielh, E., Dahlmans, V., Geijselaers, C., Adriaens, M., Spaapen, F., Takihara, Y., Rapp, U., Peronnet, F., Voncken, J.W. (2012) MK3 controls Polycomb-target gene expression via negative feedback on ERK. Epigenetics Chromatin 5, 12. 査読有

6) Bhattacharyya, J., Mihara, K., Kitanaka, A., Yanagihara, K., Kubo, T., Takei, Y., Kuroda, T., Kimura, A., Takihara, Y. (2012) T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eradicating refractory B-lymphoma cells overexpressing survivin induced by BMI-1. Blood Cancer J. 2, e75. 査読有

7) Mihara, K., Bhattacharyya, J., Kitanaka, A., Yanagihara, K., Kubo, T., Takei, Y., Sakai, A., Asaoku, H., Takihara, Y., Kimura, A. (2012) T-cell immunotherapy with a chimeric receptor against CD38 is effective in eliminating myeloma cells. Leukemia 26, 365-367. 査読有

8) Tsumura, M., Okada, S., Sakai, H., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Murata, T.,

Obata, H., Yasumi, T., Kong, X., Abhyankar, A., Heike, T., Nakahata, T., Nishikomori, R., Al-Muhsen, S., Boisson-Dupuis, S., Casanova, J.-L., AlSherhri, M., ElGhazali, G., Takihara, Y., Kobayashi, M. (2012) Dominant-negative STAT1 mutations in the SH2 domain predispose to mycobacterial diseases. Hum. Mutat. 33, 1377-1387. 査読有

9) Ozaki, Y., Matsui, H., Asou, H., Nagamachi, A., Aki, D., Honda, H., Yasunaga, S., Takihara, Y., Yamamoto, T., Izumi, S., Ohsugi, M., Inaba, T. (2012) Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. Mol. Cell 47, 694-706. 査読有

10) 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

11) Takihara, Y. (2011) Role for Geminin in sustaining the activity of hematopoietic stem cells. Cell Cycle 10, 561-562. 査読有

12) 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

13) Ohno, Y., Yasunaga, S., Ohtsubo, M., Mori, S., Tsumura, M., Okada, S., Ohta, T., Ohtani, K., Kobayashi, M., Takihara, Y. (2010) HOXB4 transduction down-regulates Geminin protein, providing hematopoietic stem and progenitor cells with growth potential. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107, 21529-21534. 査読有

14) Mihara, K., Yanagihara, K., Takigahira, M., Kitanaka, A., Imai, C., Bhattachayya, J., Kubo, T., Takei, Y., Yasunaga, S., Takihara, Y., Kimura, A. (2010) Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Br. J. Haematol. 151, 37-46. 査読有

15) 瀧原義宏 (2010)「細胞周期のフロンティア」細胞分化と増殖制御-造血幹細胞の活性支持におけるポリコーム複合体の機能蛋白質 核酸 酵素 (共立出版) pp. 230-235. 査読無

[学会発表]

国際学会 (計 26 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. Role for Geminin in sustaining hematopoietic stem cell activity. The 13th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference: Systems Biology in Cell Cycle Regulation, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, February 25, 2010

国内の学会 (計 37 件)

1) 瀧原義宏 ポリコーム複合体 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) その他

2) 瀧原義宏 造血幹細胞制御における DNA 複製ライセンス化制御因子の役割 第 9 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 13「造血幹細胞」(広島) 平成 22 年 3 月 19 日

[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

大野芳典 (Ohno Yoshinori)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号 : 10548986

辻浩一郎 (Tsuji Kohichiro)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号 : 50179991

(3) 連携研究者

大坪 素秋 (Ohtsubo Motoaki)

別府大学・食物栄養科学部・教授

研究者番号 : 10211799

(H22:研究分担者)