

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 6 月 20 日現在

機関番号：	22701
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23791490
研究課題名（和文）	肝幹細胞における自己複製制御遺伝子群の探索と肝発癌への寄与の検討
研究課題名（英文）	Molecular mechanisms of self-renewal of hepatic stem/progenitor cells during liver development and hepatic tumorigenesis
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）：本研究では、幹細胞の自己複製制御と深い関係にあると考えられる肝発癌過程の分子機構の解明を目的とし、肝幹細胞の自己複製に必須であるポリコム群タンパク質 Ring1B の下流制御遺伝子群の同定を試みた。Ring1B 欠損マウスを用いた遺伝子発現解析およびクロマチン免疫沈降解析より、Ring1B 下流標的として Cdkn2a を含む複数の遺伝子群を抽出した。肝幹細胞の増殖・分化において Cdkn2a の機能を検討したが、Ring1B による肝幹細胞の増殖・分化においては、Cdkn2a 以外の分子が重要な役割を持つものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the molecular mechanism of hepatic tumorigenesis, which is considered to related to the self-renewal of hepatic stem/progenitor cell, we attempted to identify the downstream target genes of Polycomb group protein Ring1 that is essential for self-renewal of hepatic stem cells. By microarray and ChIP-PCR analysis, we extracted Cdkn2a as a Ring1B target gene. We investigated the expansion of hepatic stem/progenitor cell during hepatogenesis in cdkn2a and ring1B deficient mice, the result showed that the rescue is limited. We concluded that Ring1B should have other important downstream targets in addition to Cdkn2a in stem/progenitor cells.

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	3,300,000	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： 組織幹細胞、自己複製、ポリコム群タンパク質

1. 研究開始当初の背景

組織幹細胞は、自己複製を行い自身のプールを維持しながら、発生・再生などの様々な局面で重要な役割を担っている。幹細胞の自己複製では、細胞分裂を介して高い増殖性や分化多能性が維持されることが重要である

が、分子機構について不明な点が多い。我々はこれまでに、ヒストン修飾因子の一つであるポリコム群 (PcG) タンパク質複合体が肝幹細胞の自己複製に必須であるとともに、PcG タンパク質 Bmi1 の過剰発現が肝幹細胞の異常な活性化を惹起し、腫瘍形成を誘導する

ことを明らかにしている。ポリコーム群タンパク質 Bmi1 は Ring1B と相互作用を行うことにより、Ring1B 依存的に様々な標的遺伝子の転写を抑制すると考えられているが、肝幹細胞における PcG タンパク質複合体の下流標的の理解は乏しい。

2. 研究の目的

本研究では、肝幹細胞の自己複製制御機構および肝発癌プロセスの解明を目的として、肝幹細胞の自己複製および肝発癌過程の双方に関わるポリコーム群 (PcG) タンパク質複合体について下流標的遺伝子群の同定を試みる。PcG タンパク質複合体の中でも、特に、標的遺伝子の転写抑制に重要な役割を持つとされる Ring1B について、肝幹細胞における下流標的遺伝子の抽出を試みる。また、抽出された遺伝子と Ring1B との機能的な関係について検討を行い、肝幹細胞の自己複製を担う遺伝子の抽出を試みる。

3. 研究の方法

(1) Ring1B を欠損した肝幹/前駆細胞の表現型解析

理化学研究所 古関明彦博士らにより作製された、Ring1B コンディショナルノックアウト (cKO) マウスを用い、肝幹細胞が顕著に自己複製を行う肝発生初期において Ring1B の欠損を誘導し、肝臓の器官形成に及ぼす影響を検討した。また、Ring1B を欠損した肝幹/前駆細胞をクローナルな培養系で培養し、細胞増殖および細胞分化に及ぼす影響を検討した。

(2) 肝幹細胞における Ring1B 下流遺伝子の抽出

Ring1B cKO マウスおよび、野生型マウスから肝幹/前駆細胞を分離した後、マイクロアレイ解析を行い、Ring1B を欠損した肝幹/前駆細胞において脱抑制を受ける遺伝子群を抽出した。また、Ring1B 抗体によるクロマチン免疫沈降を行い、抽出された遺伝子群のプロモーター領域において Ring1B の集積があるか否かを検討した。

(3) Ring1B 下流候補遺伝子の機能解析

Ring1B の下流標的として抽出された遺伝子群について、Ring1B との二重欠損を誘導し、

機能的関係性を検討した。Ring1B cKO マウスと Cdkn2a 欠損マウスを交配し、得られたマウス、および、Ring1B 単独欠損マウスについて肝幹細胞の表現型を解析した。

4. 研究成果

(1) Ring1B を欠損した肝幹/前駆細胞の表現型解析

肝臓の器官形成過程の初期過程では、肝幹細胞が自身のプールを増加させることが知られている。肝発生初期に Ring1B の欠損を誘導し、肝臓の器官形成における変化を検討したところ、肝臓の形成が顕著に抑制された。このとき、Ring1B を欠損したマウス肝臓では α フェトプロテインを発現しながら細胞増殖に富む、肝幹/前駆細胞が減少していることが明らかになった (図 1a, b)。

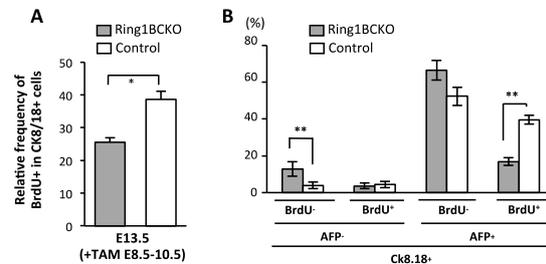


図 1. Ring1B を欠損した肝幹細胞の表現型

肝幹細胞を選択的に分離し、クローナルな培養系で培養したところ、Ring1B を欠損した肝幹/前駆細胞はコロニー形成が顕著に阻害されることが明らかとなった。Ring1B は肝幹細胞の自己複製プロセスにおいて重要な役割も持つものと考えられた。

(2) 肝幹細胞における Ring1B 下流遺伝子の抽出

Ring1B の欠損を誘導した胎生 13.5 日目のマウス肝臓、および Ring1B 欠損を誘導していない胎生 13.5 日目のマウス肝臓より CD45-Ter119-細胞を分離し、マイクロアレイ解析を実施した。Ring1B 欠損時に脱抑制を受ける遺伝子を抽出した後、抽出された遺伝子を対象とした ChIP 解析を行い、プロモーター領域で Ring1B が集積している 342 遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子の中には、サイクリン依存性キナーゼインヒビター Cdkn2a など、細胞増殖制御遺伝子が含まれていた。

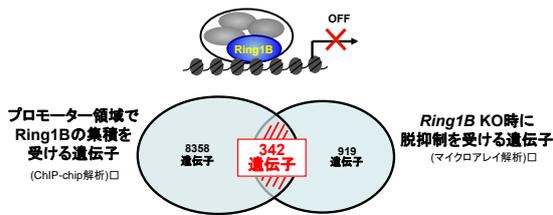


図 2. Ring1B 下流遺伝子群の抽出

(3) Ring1B 下流候補遺伝子の機能解析

造血幹細胞などにおいては、PcG 下流遺伝子の一つがサイクリン依存性キナーゼインヒビター cdkn2a であることが明らかとなっている。肝幹細胞システムにおいても重要な役割を担っている可能性があるため、Ring1B と Cdkn2a の二重欠損マウスを作成し、表現型解析を行った。Ring1B, Cdkn2a の二重欠損マウスおよび Ring1B 単独欠損マウスの表現型解析より、肝幹/前駆細胞の増殖および分化においては、Ring1B の下流に Cdkn2a 以外の標的があるものと考えられた。

従来、組織幹細胞の自己複製に関わるポリコーム群タンパク質の主な下流標的は、Cdkn2a とされていたが、本研究より、肝幹/前駆細胞においては Cdkn2a 以外の分子が重要な役割を持つものと考えられた。今後、Cdkn2a 以外の Ring1B 下流標的分子を特定することにより、ポリコーム群タンパク質を介した肝幹細胞の自己複製制御の全貌解明が期待される。

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 6 件)

1. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, Zhang RR, Ueno Y, Zheng YW, Koike N, Aoyama S, Adachi Y, Taniguchi H., Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, in print. (査読有り)
2. Tanaka H, Tanaka S, Sekine K, Kita S, Okamura A, Takebe T, Zheng YW, Ueno Y, Tanaka J, Taniguchi H., The generation of pancreatic beta-cell spheroids in a simulated microgravity culture system. *Biomaterials*. 34(23):5785-9, 2013 (査読有り)

3. Koike H, Kubota K, Sekine K, Takebe T, Ouchi R, Zheng YW, Ueno Y, Tanigawa N, Taniguchi H., Establishment of automated culture system for murine induced pluripotent stem cells. *BMC biotechnology*, 12(1), 81. 2012 (査読有り)
4. Takebe T, Sekine K, Suzuki Y, Enomura M, Tanaka S, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H., Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro. *Transplant Proc*, 44(4) 1018-1020, 2012. (査読有り)
5. Takebe T, Koike N, Sekine K, Enomura M, Chiba Y, Ueno Y, Zheng YW, Taniguchi H., Generation of human vascular network in vitro. *Transplant Proc*, 44(4) 1130-1133, 2012. (査読有り)
6. 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 arotating wall vessel bioreactor. *J Biosci Bioeng*. 111, 711-718, 2011. (査読有り)

[学会発表] (計 11 件)

1. Ueno Y, Sun L, Ouchi R, Nakata S, Zheng YW, Terasaki T, Kurata M, Yamamoto N, Morinaga S, Miyagi Y, Yokose T, Endo I, Taniguchi H., Quantitative targeted absolute proteomics of transporters in the pancreatic cancer treated with neoadjuvant chemoradiation therapy, **第 71 回日本癌学会学術総会** 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、札幌市教育文化会館(北海道)
2. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Yuta O, Isono K, Koseki H, Taniguchi H, Polycomb

- group protein Ezh2 regulates the expansion of murine hepatic stem/progenitor cells、**第71回日本癌学会学術総会** 2012年09月19日～2012年09月21日、札幌市教育文化会館(北海道)
3. Koike H, Ueno Y, Naito T, Shina T, Ouchi R, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Polycomb group protein Ring1B regulates proliferation and differentiation of mouse hepatic stem/progenitor cell by repressing cyclin-dependent kinase inhibitors. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 4. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Shiina T, Obana Y, Isono K, Koseki H, Taniguchi H: Role of the polycomb group protein EZH2 in the murine hepatic stem/progenitor cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 5. Zheng Y, Li B, Zhang R, Kimura M, Tsuchida T, Takebe T, Ueno Y, Sekine K, Taniguchi H: Self-renewal versus differentiation as well as the liver repopulation capability of human hepatic stem cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 6. Zhang R, Zheng Y, Tsuchida T, Takebe T, Kimura M, Li B, Takiguchi K, Sekine K, Ueno Y, Taniguchi H: Construction of chimeric mice with human immatured hepatocytes. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Yokohama, Japan, Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 7. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Suzuki Y, Koike H, Zhang R, Koike N, Ueno Y, Zheng Y, Taniguchi H: Creation of vascularized human organ from induced pluripotent stem cells. *International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting*. Jun 13-16, 2012, Pacifico Yokohama (KANAGAWA)
 8. 武部貴則、関根圭輔、江野村允宏、小池博之、張冉冉、三橋優澄、上野康晴、鄭允文、谷口英樹: 多能性幹細胞を用いた機能的なヒト臓器の創出 **第11回日本再生医療学会** Jun.12-14, 2012, パシフィコ横浜(神奈川).
 9. Koike H, Ueno Y, Shiina T, Naito T, Ouchi R, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. Ring1B Regulates Proliferation of Hepatic Stem/Progenitor Cells by Repressing Cyclin-dependent Kinase Inhibitors. **第34回日本分子生物学会年会**, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川).
 10. Ouchi R, Ueno Y, Koike H, Obana Y, Isono K, Koseki H, Taniguchi H. The functional analysis of polycomb group protein Ezh2 in the self-renewal of the fetal mouse hepatic stem/progenitor cell. **第34回日本分子生物学会年会**, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川).
 11. 武部貴則、関根圭輔、江野村允宏、上野康晴、鄭允文、谷口英樹、In vitroでの自己組織化肝オルガノイド形成、**第47回日本移植学会総会**、2011年10月5日、仙台国際センター(宮城)
- [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
なし。