

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 研究成果報告書

平成21年6月30日

公立大学法人横浜市立大学
理事長 様

平成20年度 研究戦略プロジェクト事業 (W20004) で行った研究成果等は下記のとおりです。

記

1 研究者情報	研究代表者氏名 (所属・職位)	上野 康晴 (臓器再生医学・助教)			
2 事業情報	新規・継続の分け				
	研究費の区分	若手人材育成推進費 (自然科学)			
	研究課題名	肝幹細胞におけるポリーム群蛋白質を介した自己複製機構の解析			
	研究実施期間	平成20年7月1日 ~ 平成21年3月31日			
	研究ユニットの構成 <small>※研究代表者も含む ※研究計画書と相違のないようにご注意ください。</small>	所属名・企業名等	役職名	氏名	役割
	医学部 臓器再生医学	助教	上野 康晴	研究全般	
3 研究概要					
<p>肝幹細胞をはじめとする組織幹細胞の自己複製においては、未分化性維持と細胞分化に関わる複数の遺伝子群が長期間、統合的に発現制御を受けることが重要と考えられている。これら遺伝子の発現制御に関わる因子として、ポリーム群タンパク質複合体が同定されている。ポリーム群タンパク質複合体はショウジョウバエの遺伝学から細胞記憶に関わる分子として同定され、その後、<i>Hox</i> 遺伝子群など発生・分化に関わる様々な遺伝子の発現を長期間抑制状態に置くことで、幹細胞の自己複製制御に関与することが明らかにされつつあるが、その詳細は未解明である。</p> <p>我々は、先行研究において、① ポリーム群タンパク質 <i>Bmi1</i> が肝幹細胞の自己複製を「正」に制御し腫瘍形成に関わること、② <i>Bmi1</i> を過剰発現する肝幹細胞は、幹細胞の細胞増殖の阻害に関わるサイクリン依存性キナーゼインヒビター2A (<i>Cdkn2a</i>) の発現が強く抑制されることを見いだしている。</p> <p>本研究では、ポリーム群蛋白質のなかでも、<i>Bmi1</i> と結合しながら標的遺伝子群の発現抑制に直接に寄与すると考えられている <i>Ring1B</i> に着目し、肝幹細胞における機能解析を試みた。</p>					

4 研究成果

※研究成果については、2,000 字程度で記入して下さい。(絵、図入りも可)

※地域貢献促進費の方は課題提案者に提出する報告書(必須)をご提出頂きますので、この欄は記載しないで結構です。その他の方は別紙を用意せず、この枠の中に記入するようにして下さい。(枚数は問いません)

肝幹細胞におけるポリコム群タンパク質 Ring1B の機能を明らかにするため、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明彦博士と共同研究を展開し、Ring1B コンディショナルノックアウトマウスの表現型解析を行った。その結果、Ring1B 欠損個体では肝幹細胞の自己複製が大きく関与している肝発生の初期ステップが阻害されることが明らかになった(Fig.1 上)。対照的に、肝発生の中期以降においては、Ring1B 欠損の影響はそれほど強くなく、肝発生の中期以降では Ring1B が器官形成に及ぼす影響は少ないことが明らかとなった(Fig.1 下)。

次に、FACS (fluorescence-activated cell sorting)を用い、このマウスから肝幹細胞を選択的に分離しクローン性コロニー形成能を検討した。その結果、Ring1B 欠損マウス肝臓中においては、“H-CFU-C(hepatic colony-forming unit in culture)”に由来し、かつ、アルブミンとサイトケラチン 19(CK19)陽性細胞を含むコロニーの存在頻度が著しく減少していることが明らかとなった。すなわち、Ring1B を欠損した個体では高い増殖能と多分化能を兼ね備えた肝幹細胞の自己複製が阻害されているものと考えられた(Fig.2)。

ポリコム群タンパク質 Ring1B は、様々な下流標的遺伝子群の発現を抑制することで、肝幹細胞の自己複製に寄与しているものと考えられることから、Ring1B 欠損肝幹細胞で発現抑制が解除される遺伝子群の探索を試み、Ring1B の制御下に置かれている自己複製制御遺伝子群の包括的な抽出を試みた。胎生 8.5 日目から胎生 13.5 日目までタモキシフェンを投与し、肝発生の初期ステップにおいて Ring1B の欠損を誘導した後、胎生 13.5 日目の胎仔肝臓中の CD45⁺ Ter119⁺細胞画分について、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。また、コントロールサンプルとして、CreER(T2)遺伝子を持たないマウスの肝臓を用い、CD45⁺ Ter119⁺細胞画分において、Ring1B 遺伝子の有無と遺伝子発現の差異を検討した。

その結果、コントロールと比べて Ring1B 欠損個体では、805 プローブに相当する数の遺伝子において 2 倍

Fig.1 Early stage hepatogenesis is impaired in Ring1B KO embryos.

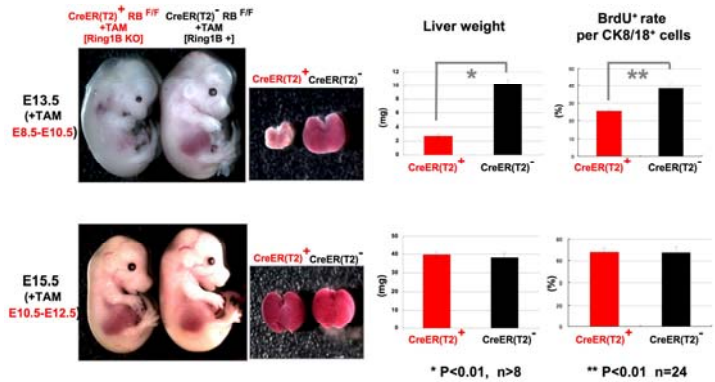


Fig.2 Reduction of H-CFU-C in Ring1B KO mice.

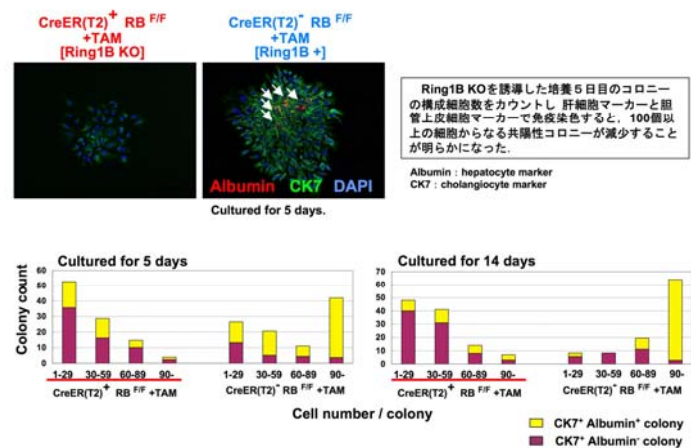
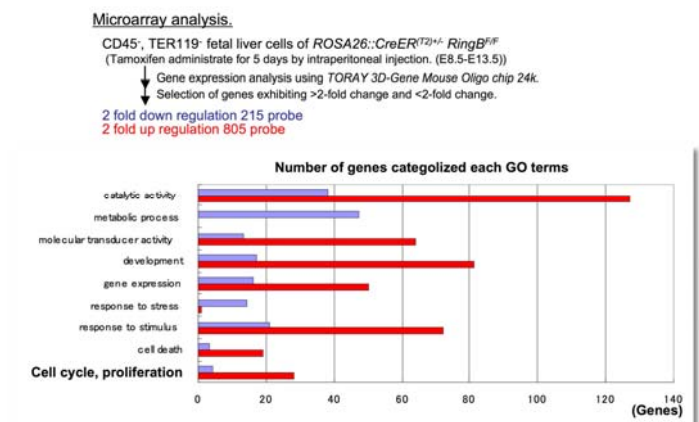


Fig.3. Gene chip analysis of parenchymal cells in Ring1B KO mice.



以上の発現増加が認められることが明らかとなった(Fig.3)。Ring1B 欠損個体で特異的に発現が変化する遺伝子群について、Gene Ontology データベースに基づく遺伝子の機能分類を試みたところ、Cdkn2a を含む細胞周期関連遺伝子群の発現が著しく上昇することが明らかとなった。また、一方で、代謝機能に関わる遺伝子群の発現が顕著に抑制されることが明らかとなった。

これまで、組織幹細胞の自己複製は、細胞増殖と細胞分化が統合的に制御されることで成立していると考えられてきたが、その実体は明らかにされていない。本研究において、ポリコーム群タンパク質 Ring1B は肝幹細胞において複数の下流標的遺伝子群を持つことが強く示唆され、その中には細胞周期を負に制御する Cdkn2a が含まれると考えられた。今後、Ring1B タンパク質の下流標的遺伝子群の個々の機能を検証し、肝幹細胞の自己複製に及ぼす影響を解析することで、肝幹細胞の自己複製の実体解明につなげたいと考えている。組織幹細胞の自己複製制御機構の理解は、幹細胞形質の再獲得と深い接点を持つとされる発癌過程の理解においても極めて重要である。本研究によって得られつつある肝幹細胞の自己複製関連遺伝子群のうち、癌化等に関わるものを明らかにすることで、幹細胞生物学のみならず、発癌研究においても重要な知見が得られる可能性がある。

5 研究成果の活用（予定）

例) 平成 22 年度 科学研究費補助金（基盤 S）に申請予定

例) 第〇会 〇〇学会に論文発表予定

例) 研究成果が横浜市〇〇事業に活用され、当該事業の PR イベントが開催された際に広報チラシ等に「横浜市立大学 研究戦略プロジェクト事業」との関連を記載した。

1. 本研究で明らかにした肝幹細胞におけるポリコーム群タンパク質Ring1Bの機能を元に、平成 21 年度さきがけ (西川伸一研究総括)「iPS細胞と生命機能」研究領域に申請を行った。

2. 7th International Society for Stem Cell Research (2009 年 7 月、スペインにて開催)学会で研究成果を発表予定。

※ページ数は増えても構いません。

以上