

[0022]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2007年

<https://doi.org/10.15017/10326>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 22, 2008-05. 九州大学生体防御医学研究所
バージョン :
権利関係 :

次世代研究スーパースター養成プログラム

The Kyushu University Research Superstar Program (SSP)

細胞統御システム分野

Division of Cell Regulation Systems

細胞統御システム分野では、個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の機能と制御の解明を目指して研究を行っている。「一つの細胞から私たちの体が形成される過程（個体の形成）」や「成体における恒常性の維持や感染防御（個体の維持）」は、適切な遺伝子が適切な時空間において発現し、その遺伝子産物が適切に機能することによって達成される。このような遺伝子機能の時空間的制御のコントロールは、細胞内あるいは細胞間のシグナル伝達経路によってなされる。このシグナル伝達経路の破綻は、器官の形成不全などの遺伝子疾患や癌などの疾病の発症を引き起こす。シグナル伝達経路の機能と制御の解明は、将来的な新たな疾病の治療法や創薬の開発において非常に重要であると考えられている。当分野では「遺伝学的解析及び細胞生物学的解析に適した脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを用いた細胞レベル個体レベルの研究」と「Co-IP や ChIP assay、in vitro kinase assay などの生化学的研究」そして「DNA マイクロアレイやプロテオミクスなどの網羅的研究手法」を組み合わせ、体の形成や維持、感染防御に関わるシグナル伝達経路群の機能と制御の解明を目指している。特に以下のテーマに注目して研究を進めている。

- (A) シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼ NLK の機能と制御の解明
- (B) 幹細胞の増殖と細胞の癌化に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明
- (C) 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

当分野のメンバーは、昨年までは石谷太特任准教授の一名のみであったが、本年度より博士研究員として押森（旧姓谷口）幸子、テクニカルスタッフとして兼行（旧姓伊藤）紋子、大学院生として石谷閑（総研大からの受け入れ）が加わり、計4名の体制となった。また、押森幸子は2008年3月に結婚のため退職した。

A. シグナル伝達経路の活性を制御するプロテインキナーゼNLKの機能と制御の解明

Nemo-like kinase (NLK)はMAPKに類似したキナーゼである。ヒトNLKは酵素ドメイン（キナーゼドメイン）においてヒトMAPK1と47%の相同性を有し、アミノ末端側にヒスチジンに富んだ（His-rich）領域を持つ。私たちはこれまでに、NLKが様々な細胞内シグナル経路の転写因子をリン酸化してその活性を変化させることにより、シグナル伝

達をファインチューンする機能をもつことを明らかにしてきた。例えば NLK は、① TCF/LEF (Wnt シグナルの転写因子) をリン酸化することによりその DNA 結合能を低下させて Wnt シグナル活性を変化させたり、② c-Myb (原がん遺伝子産物) をリン酸化することによりそのタンパク質安定性を低下させたり、③ 転写因子 STAT3 をリン酸化して IL-6 や Activin のシグナルを促進したりする。しかし、これらのリン酸化の個体における生理学的意義はあまり明らかになっていない。

私たちは現在、NLK の制御と分子・細胞・個体レベルにおける機能の全貌解明を目指し、「NLK の新規基質の探索」「個体形成における NLK の機能の解明」に取り組んでいる。

a. NLK の新規基質の探索とその機能と制御の解明

昨年までに生化学的手法を用いて 4 種類の新規 NLK 基質を発見している。現在、培養細胞を用い、NLK が新規基質をリン酸化して新規基質の活性にどのような影響を及ぼすのかを検討している。また、実際に個体レベルで新規基質が NLK と共に機能しているかを検討するために、ゼブラフィッシュ胚において新規基質及び NLK の機能欠損/機能獲得の表現型の解析と比較を行っている。

b. 個体形成における NLK の機能の解明

NLK は他の MAPK 同様に種を越えて保存されており、これまでに *C. elegans*, *Drosophila*, *Xenopus*, ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)、哺乳動物などにおいて各々 1 つずつの NLK 遺伝子がクローニングされている。私たちは最近、ゼブラフィッシュから新たにもう一つの NLK をクローニングし、これを N1k2 と名付け、以前にクローニングされたものを N1k1 とした。すでに報告されているゼブラフィッシュ N1k1 は *Xenopus* NLK とアミノ酸配列相同性が高いが、N1k2 は哺乳類 NLK に相同性が高かった。また、N1k1 が胚発生初期から継続的に胚全体に渡って発現するのに対し、N1k2 は初期のパターン形成の時期には発現せず、分化/成熟期の脳や神経系に発現する。興味深いことに、哺乳動物 NLK はゼブラフィッシュ N1k2 同様に脳組織に強く発現することが分かっているが、NLK の脳神経系における機能は不明である。そこで、私たちはゼブラフィッシュ N1k2 の脳神経発生における機能解析を行っている。現在までに、N1k2 の機能を阻害したゼブラフィッシュでは、筋肉に投射する運動神経軸索の伸展に異常が起こることが分かっている。しかし、NLK がどのような分子メカニズムでこれらの現象を制御するのかは未知である。現在、PC12 細胞などのモデルニューロンを用いて、NLK がどのような分子メカニズムで脳神経形成を制御するのかを詳細に調べている。

B. 幹細胞の増殖と細胞の癌化に関わるシグナル伝達経路である Wnt シグナル伝達経路の機能と制御の解明

Wnt シグナル伝達系は、「体の形成」、「幹細胞の増殖」、「癌の発症」に関わる重要なシグナル伝達経路である。Wnt シグナルの機能と制御の解明は、将来的な新たな医療技術の開発や創薬につながると期待されており、世界的に最もホットな研究課題の一つである。Wnt シグナル伝達系は、細胞が細胞間情報伝達分子 Wnt を受容することにより活性化する。Wnt シグナルが活性化した細胞では、転写因子 Tcf/Lef が標的遺伝子の転写を誘導する。私たちはこれまで、「Tcf/Lef の分子レベルでの制御」に注目して研究を行い、「Tcf/Lef がリン酸化されること」と「Tcf/Lef がユビキチン-プロテアソーム系によって破壊されること」を世界で初めて発見した。

a. Tcf/Lef のユビキチン-プロテアソーム系による破壊

私たちはこれまでに、「①Tcf/Lef ファミリーの転写因子 Lef1 がユビキチン-プロテアソーム系によって分解されていること」、「②シグナルタンパク質 Nrarp が Lef1 の分解を阻害し、Lef1 を安定化すること」、そして「③Nrarp による Lef1 分解の回避が神経堤細胞の発生に関わること」を見出している。この発見は、Wnt シグナルの新たな制御機構の発見であり、非常に興味深い。しかし、Lef1 の分解の制御機構は分子・個体いずれのレベルにおいても未だに理解が不十分であり、Lef1 にユビキチンを付与するユビキチンリガーゼさえも不明である。現在、私たちは、Lef1 タンパク質の安定性の制御とその意義を分子・細胞・個体の各レベルにおいて解明することを目標とし、研究を進めている。

b. Tcf/Lef のリン酸化

私たちは NLK が Tcf/Lef をリン酸化することを 8 年前に同定したが、このリン酸化の生理学的意義は未だに十分に解析されていない。そこで、私は遺伝学的解析及び細胞生物学的解析に適したモデル動物であるゼブラフィッシュを用い、NLK による Tcf/Lef リン酸化の細胞レベル及び個体レベルの機能解析を行っている。

C. 個体の形成と維持に関わるシグナル伝達経路の生個体における可視化

癌・感染防御・脳神経系形成に関わるシグナル伝達経路が脊椎動物の卵から幼体に至る発生/成長過程において「いつ」「どこで」「どの程度の強さで」活性化して働いているかを解明することは、私たちの体の形成と維持の分子メカニズムを理解する上で非常に重要である。これを解明するためには、個体レベルにおけるシグナル伝達の可視化が

非常に有効な手段であると考えられる。当分野では、ゼブラフィッシュを用いて「生きた脊椎動物個体におけるシグナル伝達経路の時空間的動態の可視化」に取り組んでいる。ゼブラフィッシュは以下にあげるような優れた特性を持っており、脊椎動物におけるシグナル伝達の可視化に最も適したモデル動物である。ゼブラフィッシュの特性：(1) 胚体が透明／(2) 体外で胚発生が起こること（ヒトやマウスなどの哺乳動物では、発生が母体内でおこることから、発生初期での重要な生物学的現象を経時的に観察することは技術的に困難）／(3) 多産／(4) ヒトと同様に脳神経系や消化器系などの器官をもち、それらがヒトのものと同様の発生機序を辿って形成され、そして維持されていること（シヨウジョウバエや線虫といった無脊椎動物モデルにおいて形成される器官やその発生機序は我々脊椎動物のそれとは大きく異なるため、シグナル伝達経路の個体レベルにおける機能はヒトと大きく異なる）。今後、本研究により、「シグナル伝達経路がどのように機能することによって私たち脊椎動物の体が形成され、そして維持されるのか」を把握したい。そして、将来的にはこれを「各シグナル伝達経路の新規因子の探索と機能解析」や「病態とシグナル伝達の関連」を研究するための強力なツールとしたい。

現在、Wnt シグナル、Notch シグナル、NF- κ B シグナルの可視化を進めている。これらのシグナルは全て発生だけでなく疾病の発症に関わっており、この可視化システムは「発生及び疾病の発症のメカニズムの解明」だけでなく「ドラッグスクリーニング」などの応用研究にも利用できる可能性がある。

業績目録

学会発表

1. Tohru Ishitani, Tomoko Hirao, Maho Suzuki, Miho Isoda, Kunihiro Matsumoto, & Motoyuki Itoh (ワークショップ)
Nemo-like kinase promotes neurogenesis by blocking Notch-signaling.
第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会 合同大会
2007 年 5 月 福岡国際会議場
2. 石谷 太、石谷 閑、松本 邦弘、伊藤 素行 (ポスター)
NGF の制御する神経軸索形成における Nemo-like kinase の機能
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会
2007 年 12 月 パシフィコ横浜

3. 尾形光津子, 吉澤明生, 穂積俊矢, 石谷太, 堤真紀子, 黒岩厚, 伊藤素行, 菊池裕 (ポスター)

腸管上皮形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体 *legato* の解析
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会
2007 年 12 月 パシフィコ横浜

4. 穂積俊矢, 尾形光津子, 吉澤明生, 石谷太, 堤真紀子, 黒岩厚, 伊藤素行, 菊池裕 (ポスター)

ゼブラフィッシュの腸絨毛形成に異常を示す *morendo* 変異体の解析
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会
2007 年 12 月 パシフィコ横浜

蛋白質化学分野

Division of Protein Chemistry

当研究室では、細胞の中で蛋白質ジスルフィド結合が形成される仕組み及びジスルフィド結合の形成解離を介した細胞における蛋白質品質管理の機構について、分子構造レベルで深く理解することを目指している。蛋白質品質管理の戦略には、大きく言って、(i) 転写レベルでの調節、(ii) productive folding の促進、(iii) ミスフォールド蛋白質の分解除去の三つが挙げられるが、いずれにおいても、システインのチオール基をベースとしたレドックス反応が重要な役割を担っていることが近年判明している。その中でも、当研究室では、大腸菌における蛋白質ジスルフィド結合導入システム (DsbA-DsbB)、動物細胞の小胞体においてミスフォールド蛋白質のジスルフィド結合を還元し、小胞体関連分解を促進するためのシステム (EDEEM-ERdj5-Bip) に焦点をあて、研究を進めている。これらに加え、大腸菌における細胞表層ストレス応答に関わる膜プロテアーゼ (RseP) の構造機能解析も、共同研究として進めている。

平成18年11月に当研究室が発足して以来、一連の細胞培養・タンパク質発現精製・生化学実験・構造生物学実験を遂行するための研究環境を早急に整備し、平成19年度には実際に幾つかの研究成果が得られつつある。現在、ポスドク1名、テクニカルスタッフ3名、技能補佐員1名を雇用しており、今後もポスドクまたは学生のリクルートを積極的に行い、研究室の規模を適度に拡大する予定である。

A. 大腸菌膜酸化酵素 DsbB による巧妙な DsbA 酸化機構の解明

大腸菌中では、フォールディング途上の蛋白質に効率よくジスルフィド結合を導入するため DsbA-DsbB-ユビキノン酸化システムが存在する。このシステムにおいて、膜酸化酵素 DsbB はユビキノン分子の強い酸化力をジスルフィド結合という形に変換し、ここで創り出されたジスルフィド結合は DsbA を介して多くの基質蛋白質に受け渡される。我々は2006年に DsbA-DsbB-ユビキノン三者複合体の結晶構造を解くことに成功し (Inaba et al, *Cell*, 2006)、その結晶構造を基に新たな研究を展開した。

DsbA 再酸化因子として機能する DsbB は四回膜貫通型の膜タンパク質であるが、4本の膜貫通ヘリックスに加え、ペリプラズム側ループ中に膜に水平に結合した特徴的な α ヘリックスをもつ。この膜水平ヘリックスは両親媒性の性質をもち、膜側には幾つかの疎水性アミノ酸が集中している。そこで、これら疎水性領域に系統的な変異導入を行い、その機能的影響を詳細に解析した。その結果、膜水平ヘリックスと膜間の結合性が、DsbB の DsbA 酸化機能と深く関連していること

が判明した。さらに解析をすすめ、これら置換体において、ユビキノンによる酸化は正常に起こっている一方で、DsbAからDsbBへの電子移動反応が大きく阻害されていることが判明した。以上の結果から我々は、膜水平ヘリックスが膜とペリフェラルに結合することで、DsbBの機能に必要なシステインの動きがコントロールされ、DsbAからDsbBへの一方向の電子移動反応が促進されるための巧妙な分子機構（Cysteine Relocation Modelと命名）を提唱した。

B. 小胞体におけるジスルフィド結合還元酵素ERdj5の構造機能解析

真核細胞では、主に小胞体において、蛋白質ジスルフィド結合は形成される。通常ジスルフィド結合は、蛋白質の高次構造形成を促進する役割があるが、ときには分子内または分子間で誤ったジスルフィド結合が形成され、ミスフォールドを誘起することもある。そのようなジスルフィド結合はジスルフィド異性化酵素により正しいものへ組換えられるが、それでも修復不能の場合は還元され、小胞体関連分解が誘導される。最近永田和宏教授（京大再生研）らにより、酸化的な環境である小胞体においてミスフォールド蛋白質のジスルフィド結合を特異的に還元する酵素（ERdj5）が発見された。我々は、ERdj5の細胞品質管理における機能的重要性に着目し、その構造機能解析を進めた。ERdj5は小胞体における代表的な分子シャペロンBiPとの結合能を有するJドメインと、レドックス活性を有するチオレドキシンドメインが4つタンデムにつながったユニークな構造を持つ。さらにERdj5は、小胞体関連分解の過程において、BiP及びレクチン様タンパク質EDEMと結合することが判明している。我々はすでに、J-domain及び還元活性を担うチオレドキシンドメインの結晶構造解析に成功しており、それら構造情報から機能発現メカニズムの考察を現在行っているところである。さらにERdj5全長、およびERdj5-BIP-EDEM三者複合体の結晶構造解析も果敢に進めている。

C. 大腸菌における膜内切断プロテアーゼRsePの構造機能解析

大腸菌由来 RseP は4回膜貫通型の細胞質膜内在性蛋白質であり、膜貫通部位と予想される領域にプロテアーゼ活性部位をもつ。RsePは大腸菌表層ストレス応答において、ペリプラズム側からサイトゾル側への膜を越えるシグナル伝達に働いている。大腸菌が細胞表層における異常蛋白蓄積などのストレスにさらされると、まず DegS と呼ばれるペリプラズム局在プロテアーゼが活性化され、膜結合型 anti- σ_E 蛋白質 (RseA) のペリプラズム側ドメインが切断される（1段階目）。この切断が引き金となり、RseP は RseA の膜貫通領域を切断する（2段階目）。その結果、転写因子 σ_E が膜から遊離し、最終的にストレスを緩和するための遺伝子群が転写誘導される。興味深いことに、RseP はペリプラズム側で起こる RseA の1段階目の切断をセンスする領域として二つのPDZドメインをもつ。我々はこの二つのPDZドメインによるセンス機構を解明するため、秋

山芳展教授（京大ウイルス研）との共同で、それぞれのドメインの結晶構造解析を行った。その結果、N 末側の PDZ ドメインについては 1.4Å分解能、C 末側の PDZ ドメインについては 0.98 Å分解能と、共に非常に高分解能で構造を解くことに成功した。得られた構造情報と生化学および細胞生物学データとを統合し、RseP の PDZ ドメインを介した機能発現制御機構について現在考察を行っている。

業績目録

原著論文

1. Kenji Inaba

Protein disulfide bond generation in *Escherichia coli* DsbB-DsbA

J. Synchr. Rad. in press

総説

1. Koreaki Ito and Kenji Inaba

The disulfide bond formation (Dsb) system

Curr. Opin. Struct. Biol. in press

2. Kenji Inaba and Koreaki Ito, 2008

Structure and mechanisms of the DsbB-DsbA disulfide bond generation machine

Biochem. Biophys. Acta. Mol. Cell Res. 1783, 520-529

3. 稲葉 謙次、伊藤 維昭. 2007

構造が明らかにしたジスルフィド結合の形成機構

蛋白質核酸酵素 52, 853-861

4. 稲葉 謙次. 2007

タンパク質ジスルフィド結合の形成に関わる酵素群—構造が明らかにしたそのメカニズム

酵素工学ニュース 57, 17-23

5. 伊藤 維昭、稲葉 謙次. 2007

ジスルフィド結合の形成メカニズム

Medical Bio 4, 58-65

学会発表

国際学会

1. Kenji Inaba (2008, March 11-13)

Structural and chemical basis for disulfide bond formation in the cell (invited lecture)

G-COE International Symposium on Frontier of Organelle Dynamics and Protein Function, Nagoya, Japan

2. Kenji Inaba (2007, Sept. 10-13)

Crystal structure of the DsbB-DsbA complex reveals a mechanism of protein disulfide bond generation in *E. coli*. (invited lecture)

2nd International Symposium on Diffraction structural Biology 2007, Tokyo, Japan

3. Kenji Inaba (2007, July 29 – August 2)

Structural basis of the DsbA-DsbB-UQ oxidative system in *E. coli*. (invited lecture)

Boden Conference on disulfide bonds and their role in protein folding and function

Queensland, Australia

国内学会

1. 稲葉 謙次 (2007, 12/21-23)

細胞におけるタンパク質ジスルフィド結合形成の仕組みを考える (招待講演)

第45回日本生物物理学会年会 横浜

2. 稲葉 謙次, 伊藤 維昭 (2007, 5/28-30)

Structural basis for protein disulfide bond formation in the cell (招待講演)

第40回日本発生生物学会、第59回日本細胞生物学会合同大会 福岡

3. 稲葉 謙次 (2007, 5/24-26) (兼オーガナイザー)

蛋白質ジスルフィド結合形成に関わる細胞システムの構造と機能

第7回日本蛋白質科学会 仙台

器官発生再生学分野

Division of Organogenesis and Regeneration

器官発生再生学分野では、哺乳動物の「発生」や「再生」、「疾患」について、幹細胞の性状理解と機能制御を中心に研究を展開している。特に、肝臓や膵臓、腸、食道などの一般的に内臓と呼ばれる消化器系器官の発生メカニズムや損傷後の再生メカニズム、幹細胞の機能破綻による疾患の発症メカニズムの解明に向け、遺伝子、細胞、組織、器官、個体レベルの実験を通じて多角的に研究を進めている。

当研究室（平成 19 年 10 月発足）は、鈴木淳史（SSP 学術研究員、特任准教授）と関谷明香（テクニカルスタッフ）で構成され、平成 20 年度より技能補佐員 1 名が研究に参加する。

A. マウス胎仔肝幹細胞の分離・回収と機能解析

肝臓の発生は、心臓に近接した前腸内胚葉が心臓や間質組織からの刺激によって肝臓に特化することで始まる。肝臓を構成する細胞には肝上皮細胞（肝細胞と胆管上皮細胞）や血液細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など複数あるが、そのうちの肝細胞と胆管上皮細胞だけが前腸内胚葉由来であり、それらの起源は同一の細胞であると考えられている。この細胞は、数十年前から肝芽細胞（hepatoblast）と呼ばれ、肝芽細胞こそ肝臓の幹細胞（肝幹細胞）であると考えられてきた。ところが、肝芽細胞が肝幹細胞の性質を満たす細胞か否かを実験的に証明するには、従来の実験技術では不十分であった。それは、肝臓が肝上皮細胞以外にも多くの種類の細胞を含む複雑な構造体であるがために、数が少なく、形態的に他の細胞と見分けがつかない肝芽細胞だけを肝芽細胞以外の細胞から完全に切り離して解析することが難しかったためである。そこで我々は、肝芽細胞を他の細胞から選別する手法として、細胞表面抗原を抗体で染色した細胞を生きたまま回収可能な装置であるフローサイトメトリー（fluorescence activated cell sorting: FACS）を利用した。そして、回収された細胞の性状をクローナルな解析系（1 つ 1 つの細胞を個別に解析する手法）にて調べ、結果として、高い増殖能、多分化能、自己複製能、肝組織再構築能といった肝幹細胞の特性をすべて満たし、マウス胎仔肝臓細胞の 10 万個にわずか 6 個しか存在しない肝芽細胞が $c\text{-Met}^+ \text{CD49f}^{+/low} c\text{-Kit}^- \text{CD45}^- \text{TER119}^-$ 細胞画分に極めて限定して含まれることを突き止め、その同定と特異的分離・回収に成功した（Suzuki et al., 2000, 2002 ; 特許取得）。

このように、独自の手法を確立してマウス胎仔肝臓から肝芽細胞（＝肝幹細胞）を分離できることから、肝発生において肝芽細胞の増殖や分化を司る分子メカニズムにアプローチすることが可能になった。実際に、これまで行った研究によって、肝芽細胞の自己複製や肝細胞分化は、肝細胞増殖因子（HGF）やオンコスタチン M（OSM）などの液性因子、C/EBP α などの転写因子、コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックスによって制御されていることが判明した（Suzuki et al., 2003a）。そこで次に、肝発生における T-box 転写因子の役割を解析した。T-box ファミリーに属する転写因子は、多くの器官や組織の発生において重要な役割を担っているが、肝発生における役割についてはこれまで不明であった。我々はまず、マウス胎仔肝臓における T-box 転写因子の発現を網羅的に調べてみた。すると、17 個ある T-box 転写因子の中で 7 個の T-box 転写因子の発現がマウス胎仔肝臓で確認された。次に、マウス胎仔肝臓の細胞をフローサイトメトリーにて画分化し、それぞれの細胞集団を分離・回収して 7 個の T-box 転写因子の発現について調べた。その結果、7 個の T-box 転写因子のうち *Tbx3* だけが c-Kit⁻ CD45⁻ Ter119⁻ 細胞画分の肝上皮細胞集団に発現が認められた。さらに、*Tbx3* は c-Met⁺ c-Kit⁻ CD45⁻ Ter119⁻ 細胞画分の肝芽細胞集団において極めて強く発現していた。そこで、肝発生における *Tbx3* の機能解析を行う目的で、*Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓を用いて研究を行った。驚くことに、*Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓はとて小小さく、肝上皮細胞の増殖が強く抑制されていた。また、肝上皮細胞集団のうち、肝細胞の数は激減していたが、胆管上皮細胞の数は増加していた。これらの表現型が肝芽細胞の機能異常によるものか否かを調べるべく、フローサイトメトリーを用いて *Tbx3*^{-/-}マウスの胎仔肝臓から肝芽細胞を分離・回収し、*in vitro* における単一細胞培養法によってその増殖能と分化能を解析した。その結果、*Tbx3*^{-/-}肝芽細胞のコロニー形成能は著しく低下しており、また、肝細胞へはほとんど分化せず、胆管上皮細胞へ優位に分化した。続いて肝芽細胞における *Tbx3* の作用機序を調べた結果、*Tbx3* は *p19*^{Arf} の発現を抑制することで肝芽細胞の増殖と肝細胞への分化を促進しており、逆に *Tbx3* による *p19*^{Arf} の抑制が減少もしくは停止すると肝芽細胞は増殖を止め胆管上皮細胞に分化することが判明した。これらの結果から、*Tbx3* は *p19*^{Arf} の抑制を介して肝芽細胞の増殖と分化を制御することにより、肝臓の発生を進める上で必須の役割を担っていることが明らかとなった（Suzuki et al., 2008）。

以上のように、マウス胎仔肝臓からの肝芽細胞分離技術と分離した肝芽細胞のクローナルな解析系を組み合わせることで、肝芽細胞の性状解析を迅速かつ極めて正確に遂行できることが証明された。よって、今後もこれら独自の解析系を駆使し、引き続き肝芽細胞の性状解析を行っていく。

B. 肝再生メカニズムの解明と成体マウス肝幹細胞の分離・回収

アポドーロスが著わしたギリシャ神話にも登場するように、肝臓は我々哺乳類で唯一の「再生する器官」であり、その再生の様子は小さい頃に見たトカゲ尾の再生を彷彿とさせるエレガントでダイナミックなものである。一般的な肝再生は、幹細胞や前駆細胞の増殖を伴わない成熟肝細胞の増殖再活性化による代償性肥大であるが、そのメカニズムには未だ謎の部分が多い。そこで我々は、肝細胞の増殖再活性化や再生終了時の増殖停止など、肝再生を司る重要なステップを制御する分子メカニズムを明らかにすべく研究を推進している。

一方、成熟肝細胞の増殖が阻害された特殊な状況では、幹細胞や前駆細胞の増殖が活性化して肝臓を再生すると考えられており、我々は肝臓の幹細胞システムの全体像を理解する目的で、これら成体マウス肝臓に存在する肝幹細胞の分離・回収とその機能解析の実現に向けて研究を行っている。また、これら特殊状況下で出現する肝幹細胞の形態的特徴は、人の肝炎や肝癌などで観察される細胞に似ていることから、成体マウスの肝幹細胞研究は、人の肝再生や肝癌に対する肝幹細胞の役割を詳細に検証するための基盤科学になることが期待される。

C. 腸幹細胞の性状解析と腫瘍形成メカニズムの解明

腸上皮組織は 3-4 日でターンオーバーしているため、常に幹細胞から腸上皮細胞が供給され続けていることが分かる。このように、腸管には明確な幹細胞システムが存在するが、生体内では活発に増殖する腸幹細胞を生体外で培養しても増殖はせず、腸幹細胞を生体外で維持することは不可能であった。そこでまず、我々は腸幹細胞の増殖を活性化する分子を探索し、最終的に上皮成長因子 (EGF) を同定した。そして、培養液に EGF を添加することで、マウス胎仔、成体マウス、成人の腸幹細胞を生体外でそれぞれ培養・維持することに成功した (論文執筆中; 特許取得)。現在では、腸幹細胞の機能制御メカニズムとその破綻がもたらす腫瘍形成メカニズムの解明を念頭に、腸幹細胞の培養実験系に遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の解析系を組み合わせる研究を行っている。

D. 腸幹細胞からの膵β細胞分化誘導

2025 年、全世界の糖尿病患者は 3 億人にまで達すると予想されており、その根本的

治療技術の確立が急務である。膵臓のインスリン産生細胞（膵β細胞）が破壊される1型糖尿病の発病は多くが急激で重症になり易い特徴があり、インスリンもしくは膵β細胞を恒常的に補う必要がある。近年、糖尿病治療技術として、生体もしくは死体から採取された膵島（膵β細胞を含む細胞凝集体）の移植が行われるようになってきた。しかしながら、1人の患者を治療するために成人2名分の膵島が必要であり、膵島の絶対的不足に陥っているのが現状である。また、胚性幹細胞（ES細胞）や組織幹/前駆細胞から膵β細胞を分化誘導する試みが活発化しているが、未だ糖尿病治療に利用できるまでの細胞は得られていない。我々はこれまで、マウス胎仔腸幹/前駆細胞にglucagon-like peptide (GLP)-1 (1-37) という膵臓由来のペプチドを作用させることで膵β細胞特異的なインスリンを発現させることに成功した（Suzuki et al., 2003b；特許取得）。現在では、臨床応用に向けた次の段階として、前述したヒト腸幹細胞培養系を活用して培養腸幹細胞から大量の膵β細胞を分化誘導し、糖尿病に対する治療効果を検証すべく研究を進めている。使用するヒト腸幹細胞は、将来的には生検により採取された小腸小片からも培養できると考えられ、倫理的にも問題の少ない糖尿病治療技術へと発展することが期待される。

E. 食道幹細胞の性状解析と腫瘍形成メカニズムの解明

食物の通り道である食道は、外界から受ける刺激のため常に新しい細胞を生み出す必要がある。そのため、皮膚や毛髪、腸上皮などと同じく、新たな細胞の「もと」となる幹細胞の存在が強く示唆される。しかしながら、これまで食道における幹細胞研究はほとんど進展しておらず、幹細胞の位置情報やその分化・増殖のメカニズム、さらに幹細胞と発癌の関連性などに関する知見は乏しい。我々は、食道の連続的な新生や損傷後の再生に欠かすことのできない幹細胞（食道幹細胞）の位置を特定し、幹細胞と分化した扁平上皮細胞の遺伝子発現プロファイリングを比較解析することで、幹細胞の増殖過程や幹細胞から扁平上皮細胞が分化・成熟する過程で重要な遺伝子群を網羅的に探索し、その機能解析を行っている。また、食道癌では扁平上皮癌の発生が最も多いことから、得られた解析結果と食道癌組織/細胞や食道癌由来細胞株の遺伝子発現プロファイリングを比較解析することにより、食道幹細胞と食道癌細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを明確にし、食道幹細胞の分化・増殖メカニズムと食道癌形成メカニズムの相互関係を明らかにしたい。

業績目録

原著論文

1. Suzuki, A.*, Sekiya, S., Buscher, D., Izpisua Belmonte, J.C., Taniguchi, H. 2008. (* corresponding author)
Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing *p19^{ARF}* expression.
Development, in press.

学会発表

1. Suzuki, A., Sekiya, S., Taniguchi, H. (2007, 6/22)
In vitro propagation of multipotent intestinal stem cells. (Invited speaker)
12th US-Japan GI & Liver meeting in 21st Century, Kyoto, Japan
2. 鈴木淳史、関谷明香、谷口英樹 (2007, 12/11)
フローサイトメトリーと単一細胞解析法を用いた成体マウス肝前駆細胞の分離と同定
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会、横浜
3. Suzuki, A. (2008, 2/2)
Prospective isolation and clonal identification of hepatic stem cells. (Invited speaker)
The Joint Symposium of the 3rd International Symposium of Institutes Network and Hot Spring Harbor-Global COE Symposium, Beppu, Ohita, Japan