

[032]九州大学生体防御医学研究所年報 : 2017年

<https://hdl.handle.net/2324/2195867>

出版情報 : 九州大学生体防御医学研究所年報. 32, pp.1-, 2018. Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

バージョン :

権利関係 :

細胞機能制御学部門
Department of Molecular and Cellular Biology

分子医科学分野

Division of Cell Biology

教授：中山 敬一

Professor : Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

分子医科学分野（旧分子発現制御学分野）では、細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを、遺伝学的・生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている。つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し、最終的にはその遺伝子を破壊したマウス（ノックアウトマウス）を人工的に作製し、その異常を調べることによって、その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである。同時に最新のプロテオミクス技術を駆使して、これらの変異マウスにおけるタンパク質の異常を網羅的に解析している。つまり遺伝学と生化学の両面から生物現象に迫るという手法を用いて、細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御因子の量的制御機構を、選択的タンパク質分解の視点から取り組んでいる。またこれらの異常がどのように発癌に関与するかという分子メカニズムの解明から、癌に対する根本的治療法の確立を目指している。

分子医科学分野は、中山敬一教授（主幹教授）、松本有樹修准教授、弓本佳苗助教の教員を中心に、学術研究員 6 名（うち 1 名は特任准教授称号付与）、大学院生 12 名（博士課程 10 名、修士課程 2 名）、テクニカルスタッフ 6 名、共同研究員 2 名の体制で研究を進めている（2018 年 3 月 31 日現在）。

人事異動について、2017 年 5 月より西山正章助教が准教授に昇任し、2017 年 7 月より弓本佳苗学術研究員（特任助教）を助教に採用した。2017 年 10 月より松本有樹修（ハーバード大）を准教授として採用した。また 2017 年 4 月より中山省悟（修士課程より進学）、木藤有紀（徳島大学大学院医科学教養部博士課程中退）が大学院博士課程に、市原知哉（九州大学工学部エネルギー科学科・卒）、杉山成明（京都大学医学部人間健康科学科・卒）が同修士課程に入学した。さらに、2017 年 7 月にテクニカルスタッフとして岡部由紀を、2017 年 11 月に見世慎太郎を雇用した。

次いで退職者として、2017 年 4 月末に白根道子准教授が名古屋市立大学薬学部教授として転出した。また 2017 年 9 月末に西山正章准教授が金沢大学医学部教授として転出し、2018 年 3 月末に弓本佳苗助教が退職した（引き続き、学術研究員（特任助教称号付与）として雇用）。さらに 2017 年 4 月末に喜多泰之学術研究員が名古屋市立大学薬学部特任助教として、2018 年 3 月末に中津海洋一学術研究員が名古屋市立大学薬学部助教として、武藤義治学術研究員が米国ワシントン大学ポスドクとして転出した。また 2017 年 3 月末に大学院生博士課程の比嘉綱己と清水秀幸が単位取得退学し、武藤（旧

姓：松本) 結香が中退した。

A. 造血幹細胞の機能維持におけるユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御の重要性の研究

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有し、個体の一生を通じて血球細胞を供給し続ける。幹細胞性の維持には、低酸素環境による酸化ストレスの抑制が重要であることが知られているが、活性酸素の発生源である細胞内の 2 価鉄イオンが、造血幹細胞の機能に与える影響についてはほとんど未知である。また、骨髓異形成症候群や再生不良性貧血などの造血障害において、鉄過剰が増悪因子であることが近年報告されているが、その機序はまだ十分明らかではない。

われわれは現在までに、哺乳類細胞内の 2 価鉄イオン濃度がユビキチンリガーゼ FBXL5 と鉄代謝制御因子 IRP2 によって厳密に調節されていることを示してきた。IRP2 は mRNA 結合タンパク質として働き、多くの鉄代謝関連因子群の発現量を統合的に制御している。即ち、細胞内の 2 価鉄イオンが過剰にあるときには FBXL5 が自身の鉄結合ドメインへの鉄の配位によって安定化し、IRP2 をユビキチン化し分解する。一方、2 価鉄イオンが不足したときには、鉄結合ドメインに鉄が結合できないために FBXL5 はユビキチン化され分解される。これによって IRP2 が蓄積し、その下流にある鉄代謝関連因子群の mRNA の安定性や翻訳効率を調節し、細胞内の利用可能な鉄量を増加させる。

われわれは造血幹細胞における鉄代謝の重要性を調べるため、成体血球細胞系譜において特異的に FBXL5 を欠損したマウスを作出した。このマウスの血球細胞は 2 価鉄イオンの蓄積をきたし、造血幹細胞の減少と、骨髓再構築能の障害が認められた。FBXL5 を欠損した造血幹細胞の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、酸化ストレス応答系の活性化と、造血幹細胞特異的な遺伝子群の発現低下が認められた。以上より FBXL5 による鉄代謝制御は、造血幹細胞の機能維持に重要な働きをしていると考えられた。さらに公共データベースの解析により、骨髓異形成症候群の一部の症例において、造血幹細胞の FBXL5 の発現低下が判明したことから、FBXL5 の量的異常がヒトの造血障害の病態にも関与している可能性が示唆された。

B. 転写因子 FOXK1 による mTORC1 活性化依存的な CCL2 の発現制御に関する研究

「栄養があれば細胞のタンパク質合成は活性化し、なければそれが抑制される」という栄養への細胞応答は一見して受動的に見える。しかしながら実際は栄養によって一連の細胞内シグナル経路が刺激され、細胞はその応答機構を能動的に制御することが知られている。栄養応答のマスター制御因子である mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) は栄養を受けて活性化し、様々な下流分子をリン酸化して活性を変化させる。そして活性化した下流分子群は各々の機能に応じた栄養応答を引き起

こす. すなわち mTORC1 下流分子の同定はすなわち, 細胞の栄養応答機構の解明に直結する.

われわれは大規模なリン酸化プロテオミクス解析の結果, mTORC1 の下流分子として転写因子である FOXK1 を同定した. さらに mTORC1-FOXK1 経路の下流で転写される遺伝子を探索したところ, 炎症性ケモカインの 1 つである CCL2 が同定された. CCL2 はマクロファージを誘引し, 炎症を惹起する. つまり我々は栄養に応じて炎症が誘導されるという新たな栄養応答機構を同定した. 一見矛盾を含むこの栄養応答機構は, 糖尿病・動脈硬化・がんといった現代病の視点から眺めると重要な意味を持つ. これらの疾患はいずれも患部に mTORC1 の異常活性化が観察され, 同時に CCL2 の高発現に伴う慢性的な炎症状態にあることが知られる. 慢性炎症は各疾患の治療ターゲットとして期待されているものの, その発症メカニズムはこれまで未解明であった. 今回我々は mTORC1 の異常活性化による FOXK1 の活性化が慢性炎症の原因であるという仮説を立てた. この仮説についてがんを例に検証したところ, mTORC1, FOXK1, CCL2 のそれぞれを抑制したがん移植モデルにおいて, M2 タイプに分類される腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の浸潤が共通して抑制された. 同時に腫瘍重量も共通して抑制されたことから, 栄養シグナルを起点とした mTORC1-FOXK1-CCL2 経路の活性化は, がんの慢性炎症とがん進展に関わることが示された.

業績目録

原著論文

1. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Kawamura, A., Nakayama, K. I. 2017.
FBXL5 inactivation in mouse brain induces aberrant proliferation of neural stem progenitor cells.
Mol. Cell. Biol., in press.
2. Yachie, N., Robotic Biology Consortium (incl. Nakayama, K. I.), Natsume, T. 2017.
Robotic crowd biology with Maholo LabDroids.
Nature Biotechnol., 35, 310-312.
3. Zhang, S., Chen, Q., Liu, Q., Li, Y., Sun, X., Hong, L., Ji, S., Liu, C., Geng, J., Zhang, W., Lu, Z., Yin, Z. Y., Zeng, Y., Lin, K. H., Wu, Q., Li, Q., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Deng, X., Johnson, R. L., Zhu, L., Gao, D., Chen, L., Zhou, D. 2017.
Hippo signaling suppresses cell ploidy and tumorigenesis through Skp2.
Cancer Cell, 31, 669-684.
4. Muto, Y., Nishiyama, M., Nita, A., Moroishi, T., Nakayama, K. I. 2017.
Essential role of FBXL5-mediated cellular iron homeostasis in maintenance of hematopoietic stem cells.
Nature Commun., 8, 16114.

5. Nakatsumi, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. 2017.
Noncanonical pathway for regulation of CCL2 expression by an mTORC1-FOXK1 axis promotes recruitment of tumor-associated macrophages.
Cell Rep., 21, 2471-2486.
6. Yonehara, R., Nada, S., Nakai, T., Nakai, M., Kitamura, A., Ogawa, A., Nakatsumi, H., Nakayama, K. I., Li, S., Standley, D. M., Yamashita, E., Nakagawa, A., Okada, M. 2017.
Structural basis for the assembly of the Ragulator-Rag GTPase complex.
Nature Commun., 8, 1625.
7. Fukushima, H., Shimizu, K., Watahiki, A., Hoshikawa, S., Kosho, T., Oba, D., Sakano, S., Arakaki, M., Yamada, A., Nagashima, K., Okabe, K., Fukumoto, S., Jimi, E., Bigas, A., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Aoki, Y., Wei, W., Inuzuka, H. 2017.
NOTCH2 Hajdu-Cheney mutations escape SCF^{FBW7}-dependent proteolysis to promote osteoporosis.
Mol. Cell, 68, 645-658.e645.
8. Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Watanabe, M., Nomura, T., Kano, T., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Watanabe, M., Hatakeyama, S. 2017.
Sez6l2 regulates phosphorylation of ADD and neuritogenesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 494, 234-241.
9. Sakai, E., Nakayama, M., Oshima, H., Kouyama, Y., Niida, A., Fujii, S., Ochiai, A., Nakayama, K. I., Mimori, K., Suzuki, Y., Hong, C. P., Ock, C. Y., Kim, S. J., Oshima, M. 2017.
Combined mutation of Apc, Kras and Tgfr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer.
Cancer Res., in press.
10. Hagihara, H., Catts, V. S., Katayama, Y., Shoji, H., Takagi, T., Huang, F. L., Nakao, A., Mori, Y., Huang, K. P., Ishii, S., Graef, I. A., Nakayama, K. I., Shannon Weickert, C., Miyakawa, T. 2018.
Decreased brain pH as a shared endophenotype of psychiatric disorders.
Neuropsychopharmacology, 43, 459-468.
11. Mikamo, M., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Ohhata, T., Nishimoto, K., Niida, H., Suzuki, S., Nakayama, K. I., Inui, N., Suda, T., Kitagawa, M. 2018.
Inhibiting Skp2 E3 ligase suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis.
Int. J. Mol. Sci., in press.
12. Morita, M., Sato, T., Nomura, M., Sakamoto, Y., Inoue, Y., Tanaka, R., Ito, S., Kurosawa, K., Yamaguchi, K., Sugiura, Y., Takizaki, H., Yamashita, Y., Katakura, R., Sato, I., Kawai, M., Okada, Y., Watanabe, H., Kondoh, G., Matsumoto, S., Kishimoto, A., Obata, M., Matsumoto, M., Fukuhara, T., Motohashi, H., Suematsu, M., Komatsu, M., Nakayama, K. I., Watanabe, T., Soga, T., Shima, H., Maemondo, M., Tanuma, N. 2018.
PKM1 confers metabolic advantages and promotes cell-autonomous tumor cell growth.

Cancer Cell, 33, 355-367.

13. Hashimoto, Y., Shirane, M., Nakayama, K. I. 2018.
TMEM55B contributes to lysosomal homeostasis and amino acid-induced mTORC1 activation.
Genes Cells, in press.
14. Nakayama, S., Yumimoto, K., Kawamura, A., Nakayama, K. I. 2018.
Degradation of the endoplasmic reticulum-anchored transcription factor MyRF by the ubiquitin
ligase SCF^{Fbxw7} in a manner dependent on the kinase GSK-3.
J. Biol. Chem., in press.

総説

1. Matsumoto, M., Nakayama, K. I. 2018.
The promise of targeted proteomics for quantitative network biology.
Curr. Opin. Biotechnol., 54, 88-97.
2. 松本雅記, 中山敬一. 2017.
次世代プロテオミクスによるがんの代謝解析.
実験医学 (増刊) 「がん代謝: ワールブルグを超えて全容解明に挑む」, 1773-1780.
3. 木藤有紀, 中山敬一. 2017.
がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法.
日本口腔科学会雑誌, 66, 259-263.
4. 木藤有紀, 杉山成明, 中山敬一. 2018.
c-Myc のユビキチン化制御機構とがん幹細胞における役割.
実験医学, 36, 508-513.

学会発表

1. Nakayama, K. I. (2017, 5/28).
Fbxw7 is essential for quiescence and drug resistance in cancer stem cell. (Symposium)
Cullin RING ligases and Protein Neddylation: Biology and Therapeutics, Hangzhou, China.
2. Nakayama, K. I. (2017, 11/22).
Next-generation proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism. (Symposium)
The 1st International Symposium for Trans-Omics, Tokyo.
3. 片山雄太, 西山正章, 昌子浩孝, 大川恭行, 川村淳生, 佐藤哲也, 須山幹太, 中山敬一.
(2017, 12/6).
クロマチンリモデリングの異常によって発症する ASD の分子病態. (ワークショップ)
第40回日本分子生物学会年会, 神戸.
4. 比嘉綱己, 沖田康孝, 松本有樹修, 武石昭一郎, 中津海洋一, 中山敬一. (2017, 12/6).
p57 陽性細胞の追跡により明らかとなった、消化管+4 ポジション細胞の幹細胞性の差異.

(シンポジウム)

第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.

5. 藤沼駿, 中津海洋一, 中山敬一. (2017, 12/6).
肝臓特異的な転写因子 FOXK1 の欠失は過栄養による脂肪肝を抑制する. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
6. 中井昌弘, 岡田雅人, 名田茂之, 小川輝, 北村絢香, 中井友和, 中川敦史, 山下栄樹, 米原涼, 中山敬一, 中津海洋一. (2017, 12/6).
Regulator-Rag GTPase 複合体形成の構造基盤. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
7. 川尻愛子, 喜多泰之, 中山敬一, 白根道子. (2017, 12/6).
小胞体ネットワーク制御によるモノアミン分泌機構. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
8. 小玉学, 押川清孝, 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/6).
グルタミン代謝リモデリングはがんの悪性進展に必須である. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
9. 押川清孝, 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/6).
情報基盤多重モニタリング法 (iMPAQT) を用いた細胞老化代謝ネットワークの解析. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
10. 舟崎慎太郎, 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/6).
定量的リン酸化プロテオミクスによる胸腺細胞の運命決定機構の解明. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
11. 仁田暁大, 西山正章, 武藤義治, 片山雄太, 中山敬一. (2017, 12/7).
クロマチンリモデリング因子 CHD8 による幹細胞老化の防止機構の解明. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
12. 中山敬一. (2017, 12/8).
次世代プロテオミクスによる「第二のワールブルグ効果」の発見. (シンポジウム)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
13. 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一. (2017, 12/8).
ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御と肝がん抑制. (一般口頭発表)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
14. 中山省悟, 弓本佳苗, 中山敬一. (2017, 12/8).
ER 膜アンカー型転写因子 MyRF はユビキチンリガーゼ SCFFbxw7 の新規基質である. (シンポジウム)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
15. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/8).

- 転写因子 FOXK1 の mTORC1 依存的な脱リン酸化メカニズムの解析. (一般口頭発表)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
16. 松本結香, 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/8).
精密定量プロテオミクスが明らかにした培養条件依存的なタンパク質の発現変動. (ポスター)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
17. 松本有樹修, Pandolfi, P. P., 中山敬一. (2017, 12/8).
長鎖ノンコーディング RNA から翻訳される機能的ポリペプチド群の同定. (ワークショップ)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
18. 喜多泰之, 西山正章, 片山雄太, 白根道子, 中山敬一. (2017, 12/8).
自閉症関連因子 CHD8 は C/EBP β と協調して脂肪分化を制御する. (一般口頭発表)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
19. 清水秀幸, 中津海洋一, 中山敬一. (2017, 12/9).
固形がんにおける Fbxw7 を標的とした静止期追い出し療法. (一般口頭発表)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
20. 松本雅記, 中山敬一. (2017, 12/9).
次世代定量プロテオミクスによる生命システム理解への挑戦. (シンポジウム)
第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸.
21. 中山敬一. (2017, 12/16).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 11 回アドバンス研究会, 東京.

器官発生再生学分野

Division of Organogenesis and Regeneration

教授：鈴木 淳史

Professor : Atsushi Suzuki, Ph.D.

器官発生再生学分野では、哺乳動物の「発生」や「再生」と「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、代謝や解毒の中核器官である肝臓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行っている。そして、得られる知見から「肝臓」という器官を統合的に理解し、肝疾患に対する革新的な治療法の開発へとつなげていく。

2017年度においては、鈴木淳史（教授）、川又理樹（助教）、堀澤健一（助教）、鶴殿美弥子（学術研究員）、松田花菜江（同）、三浦静（大学院医学系学府・博士）、山本純平（同・博士）、合谷孟（同・博士）、稲田浩気（同・博士）、植村優実（同・修士）、後藤那奈子（同・修士）、谷口奈保（同・修士）、中山貴博（同・修士）、無敵美帆（同・修士）、従野雅義（同・修士）、青木美帆（同・修士）、井上和也（同・修士）、宮田朋典（同・修士）、木村亮太（医学部生命科学科・学部生）、津田真（同・学部生）、海江田千晶（テクニカルスタッフ）、本田結城（同）の総勢22名で研究を開始した。山本純平は2017年10月1日より学術研究員として研究に参画した。三浦静は2018年3月に博士号（医学）を取得し、同年4月1日より本研究室の特任助教に就任することが内定した。山本純平、植村優実、谷口奈保は、2018年4月1日よりそれぞれアニコム損害保険株式会社、WDB エウレカ株式会社、Meiji Seika ファルマ株式会社に就職することが内定した。後藤那奈子と従野雅義は、2018年4月1日よりそれぞれ博士課程に進学することが決定した。木村亮太は、2018年4月1日より修士課程に進学することが決定した。

A. ダイレクトリプログラミングによる肝細胞の直接誘導

肝細胞は多くの転写因子の働きによって胎生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが、まれに、障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある。また、骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し、肝細胞として肝臓組織を構築することもある。これらの事象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を示唆しており、ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる。したがって、もし、このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って皮膚の線維芽細胞を直接肝細胞へ変化させることが可能になるかもしれない。そこで我々は、

肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、マウスの線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。その結果、線維芽細胞に Hnf4 α と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれかひとつ) という肝細胞分化に関連した 2 種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞 (iHep 細胞) へと直接変化させることに成功し、肝細胞の運命決定因子を同定した (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011)。作製した iHep 細胞は肝細胞の形態的特徴や遺伝子・タンパク質発現を有し、肝細胞特有の機能をもったまま培養下での増殖や維持、凍結保存が可能であった。また、iHep 細胞は肝細胞と同様に中性脂肪の合成や蓄積と分泌が可能であり、既知の脂肪酸合成阻害薬にも反応することができた (Miura and Suzuki, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2014)。さらに、肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ iHep 細胞を移植すると、肝細胞として障害を受けた肝臓組織を機能的に再構築し、マウスの致死率を大幅に減少させることが可能であった。本法では、わずか 2 種類の転写因子を線維芽細胞に発現させるだけで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を経由することなく、線維芽細胞から直接、肝細胞を作製可能なことから、移植医療や創薬研究、バイオ人工肝臓の開発などへの応用が期待される (Suzuki, *Inflamm. Regen.*, 2014; Horisawa and Suzuki, *Innovative Medicine: Basic Research and Development*, Springer Japan, 2015; Kawamata and Suzuki *J. Biochem.*, 2017)。さらに、線維芽細胞に iHep 誘導因子を導入後、わずか 48 時間で iHep 細胞が出現し、増殖を開始すること (Miura and Suzuki, *Inflamm. Regen.*, 2014) は、実際の医療応用において、iHep 細胞を短期間のうちに準備し、治療や検査に利用できる可能性を示唆している。

B. ダイレクトリプログラミングによる腸前駆細胞の直接誘導

食物の消化や吸収を担う小腸や大腸は、胎児期の腸管を形成する腸前駆細胞が成体型の腸幹細胞へと成長することによって形成される。これら胎児性の腸前駆細胞や成体型の腸幹細胞は、三次元培養下において生体内の腸上皮組織を模倣した三次元組織構造体 (オルガノイド) を形成する。腸上皮オルガノイドは、生体外で腸上皮組織を維持・培養できることから、基礎研究だけでなく、移植医療や創薬研究での利用も期待されている。しかしながら、材料となる腸組織を生体から生きたまま取り出すことは患者への負担が大きく、また、多能性幹細胞から分化誘導する場合には複雑な方法が必要になるため、腸上皮オルガノイドを医療や創薬に応用するためには、腸上皮オルガノイドの新たな供給源の確保が望まれる。そこで我々は、細胞の運命を人為的に変化させる「ダイレクトリプログラミング」の手法を用いて、胎児性の腸前駆細胞や成体型の腸幹細胞、並びにそれらが作る腸上皮オルガノイドを別の細胞から作製できないかと考えた。上述した iHep 細胞の作製法を基盤として研究を進めた結果、マウスの皮膚やヒトの血管の細胞に 4 つの転写因子 (Hnf4 α 、Foxa3、Gata6、Cdx2) を導入

することで、これらの細胞を直接、腸前駆細胞（iFIP 細胞）へ変化させることに成功した（Miura and Suzuki, *Cell Stem Cell*, 2017）。作製した iFIP 細胞は、三次元培養下で腸上皮オルガノイドを形成して増殖し、成体型の腸幹細胞（iIS 細胞）が作る腸上皮オルガノイドへと成長した。得られた iIS 細胞は、腸上皮組織を構成するすべての細胞へ分化する能力（多分化能）と長期間自己と同じ細胞を作り続ける能力（自己複製能）を有していた。また、誘導した iFIP 細胞や iIS 細胞が作る腸上皮オルガノイドを大腸炎モデルマウスに移植すると、長期間、腸上皮組織を再構築することが可能であった。ダイレクトリプログラミングの手法によって作製される iFIP 細胞や iIS 細胞を用いることで、既存の方法に対し、より簡便かつ効率的に腸上皮オルガノイドを取得できることから、今後、作製した腸上皮オルガノイドを用いた腸疾患の病態解析や再生医療、創薬研究への展開が期待される。

C. 肝臓における「疾患関連リプログラミング」

我々は、生体内における細胞の運命転換と肝臓病の関係に着目し、慢性的な肝障害によって門脈周囲に出現する偽胆管（細胆管反応）の由来を明らかにすべく、誘導型 Cre/loxP システムを用いた細胞系譜追跡実験を行った。その結果、偽胆管を形成する細胞は、胆管上皮細胞の特徴をもつにも関わらず、Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換によって、肝細胞から生じることが判明した（Sekiya and Suzuki, *Am. J. Pathol.*, 2014）。また、慢性肝炎に加え、発症原因が不明で予後の悪い肝内胆管がんについても同様の解析を行った結果、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管がんが、実は Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換から生じる腫瘍であることが判明した（Sekiya and Suzuki, *J. Clin. Invest.*, 2012）。肝内胆管がんにおける肝細胞の運命転換では、肝臓中に存在するマクロファージであるクッパー細胞が障害部位に集積し、肝細胞を刺激して Notch シグナルの活性化を促していることも明らかとなった（Terada et al., *Sci. Rep.*, 2016）。以上の結果は、慢性的な障害に対して再生を繰り返し行う肝臓では、正常な再生応答から逸脱した特殊な状況に陥ることによって肝細胞の分化状態が破綻し、肝細胞が胆管上皮細胞の特徴を有する細胞に変化することを示している。我々は、このような現象を「疾患関連リプログラミング」と呼び、がんなどの難治性疾患との関係に注目している（Suzuki, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2013; Suzuki, *Genes Cells*, 2015; Suzuki, *Curr Opin Gastroenterol*, 2015）。

D. 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ルナルな解析系 (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 $c\text{-Met}^+$ $\text{CD49f}^{+/low}$ $c\text{-Kit}^-$ CD45^- TER119^- 細胞画分中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., *Hepatology*, 2000; Suzuki et al., *J. Cell Biol.*, 2002; 特許登録済み)。

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、これまでに行った研究では、肝芽細胞の自己複製や肝細胞分化が、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 や Tbx3 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を明らかにした (Suzuki et al., *Development*, 2003; Suzuki et al., *Development*, 2008; Takashima and Suzuki, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013)。また、マイクロ RNA 制御タンパク質として知られる Lin28b が、マイクロ RNA の let-7b 並びに miR-125a/b の成熟化を阻害し、相互抑制的フィードバック作用を介して Lin28b 自身の発現を維持するとともに、肝芽細胞の幹細胞性 (増殖能や分化能) の維持において重要な役割を果たしていることも判明した (Takashima et al., *Hepatology*, 2016)。

E. 成体マウス肝幹細胞の分離・回収と機能解析

成熟肝細胞の増殖が阻害された特殊な状況では幹/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も行っている。これまでの研究では、慢性肝炎を誘導した成体マウスの肝臓から CD133^+ CD45^- TER119^-

細胞を分離し、クローナルな解析系を用いて機能解析を行った結果、それらが高い増殖能、肝細胞と胆管上皮細胞への二分化能、自己複製能といった肝幹細胞の特性を有することを明らかにした。また、高チロシン血症モデルマウスである *Fah* 欠損マウスの肝臓に CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を移植したところ、ドナー細胞は肝臓内に生着して増殖し、2 ヶ月後には肝臓の大部分を再構築していた。以上から、マウス胎仔肝臓と同様に、成体マウス肝臓からも肝幹細胞を分離することが可能になった (Suzuki et al., *Hepatology*, 2008)。

慢性肝炎という特殊状況下で出現する肝幹細胞の形態的特徴は、人の肝炎や肝がん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、肝炎や肝がんに対する肝幹細胞の役割を検証する上での基盤科学にもなりうる。そこで、人の肝がんにおいて高頻度に変異が認められる *p53* 遺伝子に着目し、慢性肝炎を誘導した *p53* 欠損マウスから肝幹細胞を分離して腫瘍形成能の解析を行った。その結果、*p53* を欠損した肝幹細胞は免疫不全マウスの皮下で腫瘍を形成し、腫瘍の内部には肝細胞がんと胆管上皮細胞がんの両者が混在していた (Suzuki et al., *Hepatology*, 2008)。このことから、慢性肝炎で出現する肝幹細胞は、肝がんに含まれる「がん幹細胞」の起源細胞である可能性が示唆された。さらに、クローナルな培養系を用いた解析により、成体マウス肝幹細胞が、肝細胞や胆管上皮細胞だけでなく、筋線維芽細胞にも分化できることを見出した (Sekiya et al., *Stem Cell Reports*, 2016)。通常、培養下における筋線維芽細胞への分化頻度はとても低いが、上述した *p53* 欠損肝幹細胞から形成される腫瘍では、ドナー細胞由来の筋線維芽細胞が数多く観察され、上皮系腫瘍組織を取り囲む間質組織として「腫瘍微小環境」の様態を呈していた (Sekiya et al., *Stem Cell Reports*, 2016)。したがって、*p53* を欠損した肝幹細胞は、自らが腫瘍を形成するだけでなく、腫瘍形成をサポートする微小環境をも自ら作り出していることが判明した。

業績目録

原著論文

1. Semba, Y., Harada, A., Maehara, K., Oki, S., Meno, C., Ueda, J., Yamagata, K., Suzuki, A., Onimaru, M., Nogami, J., Okada, S., Akashi, K., Ohkawa, Y. 2017.
Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells.
Nucleic Acids Res 45, 8758–8772.
2. Miura, S., Suzuki, A. 2017.

Generation of mouse and human organoid-forming intestinal progenitor cells by direct lineage reprogramming.

Cell Stem Cell 21, 456–471.

総説等

1. 鈴木淳史. 2017
肝再生医療への応用に向けた人工肝細胞の作製
小児外科、Vol. 49, No. 5.
2. Kawamata, M., Suzuki A. 2017.
Cell fate modification toward the hepatic lineage by extrinsic factors.
J Biochem 162, 11–16.
3. 三浦静、鈴木淳史. 2017
ダイレクトリプログラミング法によるオルガノイドの形成能をもつマウスおよびヒトの腸前駆細胞の作製
ライフサイエンス新着論文レビュー、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/17253>
4. 鈴木淳史. 2017
Notch シグナルを介した肝細胞の分化転換による肝内胆管癌の発生
The Liver Cancer Journal, Vol.9, No.2.

学会発表等

1. Suzuki, A. (2017, 10/31)
Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages (Invited Speaker)
The 27th Hot Spring Harbor International Symposium “*Frontiers in Stem Cell Research and Reprogramming*”, Fukuoka, Japan
2. 三浦静、鈴木淳史 (2018, 2/3)
ダイレクトリプログラミングによるオルガノイド形成能を有するマウスおよびヒト腸前駆細胞の作製 (一般口演、選抜あり)
新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」、静岡
3. 鈴木淳史 (2018, 2/9)
ダイレクトリプログラミングによる腸前駆細胞の作製 (招待講演)
第7回Hepato-Diabetology Conference、東京
4. 三浦静、鈴木淳史 (2018, 3/22)
ダイレクトリプログラミングによるオルガノイド形成能を有するマウスおよびヒト腸前駆細胞の作製 (一般口演、選抜あり)
第17回日本再生医療学会総会、横浜