

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、がん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、片山雄太助教の教員を中心に、助教（特定プロジェクト教員）3名、学術研究員2名、学振特別研究員1名、特別研究員1名、大学院生博士課程8名、同修士課程1名、テクニカルスタッフ5名、共同研究員1名の体制で研究を進めている（2023年3月31日現在）。

人事異動について、2022年4月より鶴田健志（鹿児島大学医歯学総合研究科修士卒）が大学院博士課程へ、平田実奈（京都橋大学健康科学部卒）が大学院修士課程へ入学した。

次いで退職者として、2023年2月末にテクニカルスタッフの崔麗莉、3月末に助教の片山雄太、学術研究員の岡毅寛、藤沼駿（引き続き特別研究員として在籍）特別研究員の和田玲緒名、テクニカルスタッフの恒松加代子、太田茜が退職し、大学院博士課程の杉山成明（引き続き学術研究員として在籍）、須賀原修（引き続き学術研究員として在籍）、古賀大介（引き続き特別研究員として在籍）が卒業した。

A. 人工知能システム LIGHTHOUSE による新たな創薬法の開発

医学研究の成果を臨床医学に還元できるようになるまで時間がかかる大きな原因の一つは、有望な治療標的タンパク質に対する薬をつくるのが現在の技術でも簡単ではないことが挙げられる。分子量 500 以下の小分子化合物に限定しても、 10^{60} もの化合物が存在すると言われており、その中から薬を見つけ出すのは非常に多くの時間・

コスト・労力がかかる。スーパーコンピューターを使ったドッキングシミュレーションなど、コンピューターによる予測法も提案されているが、膨大な計算リソースが必要な上、ドッキングシミュレーションの前提となるタンパク質の立体構造はその多くが未知のままである。近年盛んに研究されている人工知能を使う創薬研究も発表されているものの、それらのほとんどはコンピューターシミュレーションのみの解析であり、実際に新しい薬を見つけ出したわけではない。

そこでわれわれは、化合物はその結合様式も加味した上でグラフとして表現した後、MPNNにて数値ベクトルに変換し、一方タンパク質はアミノ酸配列をそれぞれ特徴が異なる3つの方法 (CNN, AAC, Transformer) で数値ベクトルに変換した。化合物とタンパク質の数値ベクトルを足し合わせ、さらに大規模な国際プロジェクトから得られた STITCH データ (100 万以上の化合物-タンパク質ペアの信頼性データ) および BindingDB データ (100 万以上の化合物-タンパク質ペアの結合力データ) を人工知能の訓練に使用して一連の演算をすることで、最終的にその化合物が「どれくらい薬らしいか」を表す数値が得られるような手法を作製し、Lead Identification with Graph-ensemble network for arbitrary Targets by Harnessing Only Underlying primary Sequence, 省略して LIGHTHOUSE (“灯台”の意) と命名した。

次に、LIGHTHOUSE を用いて実際にがんの悪性化に関わる酵素 PPAT を抑制する化合物を ZINC データセットに登録されている 10 億近い化合物の中から LIGHTHOUSE を用いて探索し、発見した最も有望な化合物を調べることで、世界で初めて PPAT 阻害活性がある化合物を見つけることに成功した。

さらに、われわれは新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の治療に有望な化合物を LIGHTHOUSE で予測し、エトキシゾラミドというすでに緑内障治療薬や利尿薬などとして本邦で承認されている化合物を見出した。ヒト培養細胞を用いた感染実験において、エトキシゾラミドは新型コロナウイルスの感染を抑え、元々の新型コロナウイルスだけでなくデルタ株を含めさまざまな変異ウイルスから細胞を保護する働きがあることを確認した。

このように LIGHTHOUSE はアミノ酸配列さえあれば治療薬候補を見つけることができるため、さまざまな魅力的な治療標的タンパク質に対する創薬を大きく加速させることが期待される。

B. 大腸がんの再発の元となる幹細胞の同定

われわれは実際の大腸がん患者の環境を再現した大腸がんオルガノイドモデルを樹立し、このオルガノイドを移植することによってできた大腸がんを 1 細胞 RNA-seq 法で解析した結果、Lgr5 を強く発現している従来のがん幹細胞の中に、2 つの亜集団が存在していることを明らかにした。一方は増殖の速い集団であるのに対し、もう一方は増殖の遅い (休眠状態) 集団であり、抗がん剤への感受性が異なることが予想され

た。そして後者の休眠状態のがん幹細胞には p57 という遺伝子が特異的に発現していることが判明し、この集団の鋭敏なマーカーとして使えることが判明した。p57 発現細胞は休眠状態にあるため、抗がん剤治療などを受けていない通常の状態だと、がんの成長にはそれほど寄与しないが、ひとたび抗がん剤治療によって増殖の速い細胞が死んでしまうと、休眠状態の p57 発現細胞は治療を生き延び、そのあと休眠から覚めて増殖を開始することが明らかとなった。

そこでわれわれは大腸がんオルガノイドの p57 遺伝子の下流にジフテリア毒素受容体を組み込み、ジフテリア毒素を投与することによって、発生した大腸がんの中の p57 発現細胞を焼灼する実験を行った。抗がん剤治療のみでは再発が起きてしまうが、抗がん剤治療と p57 発現細胞の焼灼を組み合わせると、再発を強力に抑えられることを発見した。この結果は、p57 発現細胞が治療後再発の主要な原因であることを証明する知見である。

業績目録

原著論文

1. Huda N., Khambu B., Liu G., Nakatsumi H., Yan S., Chen X., Ma M., Dong Z., Nakayama K.I., Yin X. M. (Apr 2022)
Senescence connects autophagy deficiency to inflammation and tumor progression in the liver.
Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 14:333-355.
2. Fujimoto M., Takii R., Matsumoto M., Okada M., Nakayama K.I., Nakato R., Fujiki K., Shirahige K., Nakai A. (Jul 2022)
HSF1 phosphorylation establishes an active chromatin state via the TRRAP-TIP60 complex and promotes tumorigenesis.
Nat Commun. 13:4355.
3. Shimizu H., Kodama M., Matsumoto M., Orba Y., Sasaki M., Sato A., Sawa H., Nakayama K.I. (Nov 2022)
LIGHTHOUSE illuminates therapeutics for a variety of diseases including COVID-19.
iScience 25:105314.
4. Lozano-Ureña A., Lázaro-Carot L., Jiménez-Villalba E., Montalbán-Loro R., Mateos-White I., Duart-Abadía P., Martínez-Gurrea I., Nakayama K.I., Fariñas I., Kirstein M., Gil-Sanz C., Ferrón S.R. (Jan 2023)
IGF2 interacts with the imprinted gene Cdkn1c to promote terminal differentiation of neural stem cells.
Development 150:dev200563.

5. Takahashi K., Amano H., Urano T., Li M., Oki M., Aoki K., Amizuka N., Nakayama K.I., Nakayama K., Udagawa N., Higashi N. (Feb 2023)
p57Kip2 is an essential regulator of vitamin D receptor-dependent mechanisms.
PLoS One 18:e0276838.
6. Wada R., Fujinuma S., Nakatsumi H., Matsumoto M., Nakayama K.I. (Feb 2023)
Phosphorylation of PBX2, a novel downstream target of mTORC1, is determined by GSK3 and PP1.
J Biochem. 173:129-138.
7. Oka T., Higa T., Sugahara O., Koga D., Nakayama S., Nakayama K.I. (Mar 2023)
Ablation of p57⁺ quiescent cancer stem cells suppresses recurrence after chemotherapy of intestinal tumors.
Cancer Res. in press.
8. Kito Y., Matsumoto A., Ichihara K., Shiraishi C., Tang R., Hatano A., Matsumoto M., Han P., Iwasaki S., Nakayama K.I. (Mar 2023)
The ASC-1 complex promotes translation initiation by scanning ribosomes.
EMBO J. in press.
9. Shiraishi C., Matsumoto A., Ichihara K., Yamamoto T., Yokoyama T., Mizoo T., Hatano A., Matsumoto M., Tanaka Y., Matsuura-Suzuki E., Iwasaki S., Matsushima S., Tsutsui H., Nakayama K.I. (Mar 2023)
RPL3L-containing ribosomes determine translation elongation dynamics required for cardiac function.
Nat Commun. in press.
10. Yumimoto K., Sugiyama S., Motomura S., Takahashi D., Nakayama K.I. (Mar 2023)
Molecular evolution of Keap1 was essential for adaptation of vertebrates to terrestrial life.
Sci Adv. in press.
11. Fujinuma S., Nakatsumi H., Shimizu H., Sugiyama S., Harada A., Goya T., Tanaka M., Kohjima M., Takahashi M., Izumi Y., Yagi M., Kang D., Kaneko M., Shigeta M., Bamba T., Ohkawa Y., Nakayama K.I. (Mar 2023)
FOXK1 promotes nonalcoholic fatty liver disease by mediating mTORC1-dependent inhibition of hepatic fatty acid oxidation.
Cell Rep. in press.

総説

1. Ichihara K., Nakayama K.I., Matsumoto A. (Aug 2022)
Identification of unannotated coding sequences and their physiological functions.
J Biochem. 173:237-242.

2. 比嘉 綱己, 岡 毅寛, 須賀原 修, 古賀 大介, 中山 敬一. (2022年12月)
時空間リプログラミングは腸管上皮の再生と腫瘍の基盤となる.
消化器病学サイエンス. 6:255-258.

学会発表

1. 中山 敬一. (6/2, 2022)
近未来のライフサイエンス：人工知能によるデータ駆動型サイエンスの時代へ. (シンポジウム)
第95回日本内分泌学会学術総会, 別府.
2. 中山 敬一. (9/18, 2022)
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：100年来のがんの謎を解く. (ロッテ基金特別講演)
第64回歯科基礎医学会学術大会, 徳島.
3. 中山 敬一. (9/27, 2022)
プロテオミクス X AI による創薬革命. (特別講演)
第30回東北生活習慣病研究会, 仙台.
4. 中山 敬一. (10/1, 2022)
人工知能によるがん研究. (モーニングレクチャー)
第81回日本癌学会学術総会, 横浜.
5. 中山 敬一. (11/10, 2022)
細胞周期阻害分子 p57 が織りなす幹細胞科学：がん幹細胞の撲滅に向けて. (シンポジウム)
第95回日本生化学会大会, 名古屋.
6. 古賀 大介, 比嘉 綱己, 中山 省悟, 岡 毅寛, 須賀原 修, 中山 敬一. (11/30, 2022)
マウス ES 細胞における p57 遺伝子発現制御領域の探索.
第45回日本分子生物学会年会, 千葉.
7. 比嘉 綱己, 岡 毅寛, 須賀原 修, 古賀 大介, 中山 敬一. (11/30, 2022)
p57 陽性タフト細胞は胃底腺幹細胞として機能する. (ワークショップ)
第45回日本分子生物学会年会, 千葉.
8. 白石 大智, 片山 雄太, 西山 正章, 浦 聖恵, 昌子 浩孝, 宮川 剛, 中山 敬一. (11/30, 2022)
クロマチンリモデリング因子 CHD8 の機能異常による ASD 発症の分子基盤の解明. (サイエンスピッチ)
第45回日本分子生物学会年会, 千葉.
9. 中山 敬一. (11/30, 2022)
小細胞肺がんの二つのプリン合成経路を標的とする治療法の開発. (ワークショップ)

- 第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
10. 杉山 成明, 弓本 佳苗, 久保田 晋平, 高橋 恵生, 宮園 浩平, 中山 敬一. (12/1, 2022)
原発腫瘍が転移巣の微小環境に及ぼす抑制的作用の解析.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
11. 本村 早麗, 弓本 佳苗, 中山 敬一. (12/1, 2022)
Fbxw7 に非依存的な新規 c-MYC 分解機構の発見.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
12. 溝尾 太佑, 松本 有樹修, 市原 知哉, 鈴木 健夫, 鈴木 勉, 中山 敬一. (12/1, 2022)
進化で獲得した Non-AUG 開始コドンをもたらすタンパク質機能の拡張.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
13. 市原 知哉, 松本 有樹修, 幡野 敦, 松本 雅記, 茶谷 悠平, 田口 英樹, 中山 敬一. (12/1, 2022)
翻訳開始因子 eIF2D は翻訳伸長中の内発的リボソーム不安定化 (IRD) を抑制する.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
14. 湯通堂 紀子, 松崎 芙美子, 宇田 新介, 和泉 自泰, 高橋 政友, 中尾 素直, 油屋 駿介, 馬場 健史, 菊竹 智恵, 須山 幹太, 大川 恭行, 原田 哲仁, 松本 雅記, 中山 敬一, 久保田 浩行. (12/2, 2022)
食餌性肥満によるマウス肝臓変容の時系列トランスオミクス解析.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
15. 須賀原 修, 古賀 大介, 比嘉 綱己, 岡 毅寛, 杉山 成明, 和田 玲緒名, 中山 敬一. (12/2, 2022)
胆道がんオルガノイドの樹立と腫瘍内好中球を標的とする治療.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
16. 和田 玲緒名, 藤沼 駿, 中津海 洋一, 松本 雅記, 中山 敬一. (12/2, 2022)
mTORC1 依存的な転写因子 PBX2 のリン酸化とその生物学的意義の解明.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
17. 小鍛治 俊也, 幡野 敦, 伊藤 有紀, 衛藤 樹, 江上 陸, 柚木 克之, 守田 啓悟, 大野 聡, 藤井 雅史, 廣中 謙一, 寺川 瑛, 土屋 貴穂, 尾崎 遼, 井上 啓, 宇田 新介, 久保田 浩行, 鈴木 穰, 池田 和貴, 有田 誠, 松本 雅記, 中山 敬一, 平山 明由, 曾我 朋義, 黒田 真也. (12/2, 2022)
マウスの肝臓と骨格筋における臓器内および臓器間代謝制御とその肥満による制御異常のトランスオミクス解析.
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
18. 白石 千瑛, 松本 有樹修, 中山 敬一. (12/2, 2022)
Myo-ribosome は心機能に必要な翻訳伸長ダイナミクスを調節する. (ワークショップ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.

19. 松崎 芙美子, 湯通堂 紀子, 山内 幸代, 宇田 新介, 和泉 自泰, 高橋 政友, 中尾 素直, 油屋 駿介, 馬場 健史, 曾我 朋義, 菊竹 智恵, 須山 幹太, 原田 哲仁, 前原 一満, 大川 恭行, 松本 雅記, 中山 敬一, 黒田 真也, 久保田 浩行. (12/2, 2022)
トランスオミックネットワーク作成による分子制御機構の可視化. (ワークショップ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
20. 岡 毅寛, 比嘉 綱己, 中山 敬一. (12/2, 2022)
p57 陽性静止がん幹細胞の除去は大腸がんの治療後再発を抑制する. (サイエンスピッチ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
21. 弓本 佳苗, 高橋 大輔, 中山 敬一. (12/2, 2022)
Keap1 の分子進化は生命の陸上生活への適応に必須である. (サイエンスピッチ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
22. 松本 有樹修, 木藤 有紀, 市原 知哉, 岩崎 信太郎, 中山 敬一. (12/2, 2022)
ASC-1 複合体は走査型リボソームと結合して翻訳開始を調節する. (ワークショップ)
第 45 回日本分子生物学会年会, 千葉.
23. 中山 敬一. (3/17, 2023)
AI 創薬プラットフォーム LIGHTHOUSE による創薬革命. (招待講演)
第 443 回情報計算法学化学生物学会講演会, オンライン.

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。

2022年度においては、鈴木淳史（教授）、堀澤健一（准教授）、川又理樹（助教）、三浦静（同）、後藤那奈子（大学院医学系学府・博士）、従野雅義（同・博士）、青木美帆（同・博士）、井上和也（同・博士）、辻野智史（同・博士）、唐澤臯月（同・博士）、坂口嘉彬（同・博士）、木稻真利慧（同・修士）、鈴木陵雅（同・修士）、河原真代（同・修士）、甲斐薫（医学部生命科学科・4年生）、何其磊（研究生）、冉婧茹（同）、本田結城（テクニカルスタッフ）、太齊真理子（同）、川和田知世（事務補佐員）の計20名で研究を開始した。また、2022年3月をもって単位修得退学した河野雄紀（九州大学大学院医学研究院小児外科学分野・医員）と村山僚（同臨床放射線科・医員）も共同研究者として研究に参画した。川和田知世は2022年9月30日をもって退職し、同年5月16日から藏田光洋（テクニカルスタッフ）が、同年10月1日から岩崎良美（テクニカルスタッフ）と甲斐巻奈（事務補佐員）が研究室に加わった。木稻真利慧と鈴木陵雅は2023年3月に修士号を取得し、木稻真利慧は同年4月1日より協和キリン株式会社に就職することが内定し、鈴木陵雅は九州大学大学院医学系学府医学専攻（博士）（当研究室所属）に進学することが決定した。何其磊と冉婧茹は、2023年4月1日より九州大学大学院医学系学府医学専攻（博士）（当研究室所属）に進学することが決定した。甲斐薫は2023年3月に九州大学医学部生命科学科を卒業し、同年4月1日より九州大学大学院医学系学府医科学専攻（修士）（当研究室所属）に進学することが決定した。青木美帆と井上和也は在学延長した。後藤那奈子と従野雅義は2023年3月をもって単位修得退学し、同年4月1日よりそれぞれ弁理士法人深見特許事務所並びにエムスリー株式会社に就職することが内定した。本田結城は2023年3月をもって退職し、同年4月1日より株式会社フェリクスに就職することが内定した。

A. ダイレクトリプログラミングによるマウス肝細胞の直接誘導

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有する「誘導肝細胞 (iHepC)」へ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 iHepC 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、iHepC 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 iHepC 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 (iPSC) を経由することなく、直接、線維芽細胞から短時間で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 (Miura and Suzuki, *Inflamm. Regen.*, 2014; Suzuki, *Inflamm. Regen.*, 2014; Horisawa and Suzuki, *Innovative Medicine: Basic Research and Development*, Springer Japan, 2015; Kawamata and Suzuki *J. Biochem.*, 2017; Horisawa and Suzuki, *Proc. Jpn. Acad. Ser. B*, 2020)。

上述したように、iHepC は医療・創薬への応用が強く期待される細胞だが、その機能レベルが生体の肝細胞よりも低いことが問題であった。そこで次に、iHepC をより高機能な肝細胞へと成熟させるために研究を進めた。その結果、細胞凝集塊形成による Hippo シグナルの活性化、並びに *Hnf1 α* を筆頭とする肝細胞分化関連転写因子の活性化が、iHepC の成熟化を強く促進することを見出した (Yamamoto et al., *Cell Rep.*, 2018)。また、iHepC の発展的研究として、肝細胞へのダイレクトリプログラミング技術ががん治療に応用できないかと考え、これまでの研究で重要性が明らかになった肝細胞分化誘導因子セット (*HNF4A*, *FOXA3*, *HNF1A*) をヒトの肝がん細胞に導入した。その結果、肝がん細胞の長期的な増殖阻害やがん形質の消失、並びに肝細胞分化マーカーの発現上昇が認められた (Takashima et al., *Cancer Sci.*, 2018)。このことから、

ダイレクトリプログラミング技術を利用した肝がん細胞の肝細胞化が、肝がんの治療や制御に有効であることが示唆された。

線維芽細胞から iHepC へのダイレクトリプログラミングは、誘導因子の導入後、迅速かつ劇的に進行するが、その分子メカニズムは不明であった。そこで我々は、iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子の挙動を詳しく解析するとともに、線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン状態変化、エピゲノム状態変化などを統合的に解析し、iHepC の誘導メカニズム解明を試みた。その結果、導入した転写因子の DNA 結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明し、さらに Foxa 転写因子ファミリーの作用機序の違いについて興味深いデータを得ることができた (Horisawa et al., *Mol. Cell*, 2020)。iHepC 誘導因子の 1 つである Foxa3 は、同じファミリーに属する Foxa1 や Foxa2 と同じくパイオニア因子として転写開始点遠位に結合しクロマチン構造を開くが、Foxa3 はその後速やかに転写開始点近位に転位して RNA ポリメラーゼ II や Hnf4 α と結合し、それらと一緒に DNA 上を動くことで標的遺伝子の転写を活性化することが判明した。この特徴的な Foxa3 の作用機序は、Hnf4 α と Foxa3 を用いた iHepC 誘導に必須であることも判明した。RNA ポリメラーゼ II と転写因子の機能的な結合は他の転写因子でも起こりうることから、細胞運命制御に関わる転写因子の新しい機能として、今後の研究の発展が期待される。この研究で明らかとなった iHepC の誘導メカニズムは、iHepC の質の向上や安全性の担保など、iHepC の医療応用において重要な知見になるだけでなく、肝細胞の分化機序やその破綻による病気の発症機構の解明にもつながると考えられる。

B. ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の直接誘導

我々は、マウスの線維芽細胞に 2 種類の転写因子を発現させることで、iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導することに成功した (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011)。iHepC の誘導技術は、将来、肝疾患治療への応用が期待されることから、マウス iHepC に続き、ヒト iHepC の作製を試みた。しかし、作製されたヒト iHepC は増殖能が低く、大量の細胞を必要とする細胞移植医療や創薬研究に応用することは難しいと考えられた。この問題に対し、我々は、増殖できない肝細胞ではなく、高い増殖能と分化能を有する肝前駆細胞をダイレクトリプログラミングの手法によって作り出せないか考えた。この考えに基づき転写因子の組み合わせを再検討した結果、最終的に 3 種類の転写因子 (FOXA3, HNF1A, HNF6) をヒトの臍帯静脈や末梢血由来の血管内皮細胞に導入することで、長期培養による安定的な増殖が可能な「誘導肝前駆細胞 (iHepPC)」を作製することに成功した (Inada et al., *Nat. Commun.*, 2020)。作製されたヒト iHepPC は三次元培養下で肝・胆管組織様構造体を形成し、それぞれ機能的な肝細胞と胆管上皮細胞へ分化・成熟する能力をもっていた。また、ヒト iHepPC から

分化した肝細胞を致死率の高い急性肝不全モデルマウス（生存率 2 割）の肝臓へ移植したところ、マウス肝臓内でヒト肝実質組織を再構築して機能し、高い救命効果（生存率 8 割）を発揮することも判明した。ヒト iHepPC から機能的に成熟した肝細胞や胆管上皮細胞を大量に調達できることから、将来、それらを用いた肝疾患患者に対する新しい移植医療の実現や、個人レベルで薬剤の効果や毒性を評価できる医療システムの構築が期待される。

C. ダイレクトリプログラミングによるヒト肝がん形成細胞の直接誘導

予後不良で進行性の肝がんに対する治療法を開発するためには、適切な実験モデルを用いた基礎研究が必要である。近年、ダイレクトリプログラミング技術の進歩によって入手困難な多くの種類の細胞を作製できるようになったことから、ヒト疾患の実験モデルにおける細胞資源としての利用が期待されている。生きた細胞の入手が難しい肝がん研究において、ダイレクトリプログラミングによって肝がん細胞を継続的に供給することができれば、肝がんの治療法開発に向けた実験モデルの確立も夢ではない。そこで本研究では、ゲノム非挿入型エピソーマルベクターを用いたダイレクトリプログラミングによってヒト正常血管内皮細胞から直接、悪性肝腫瘍形成能を有する肝がん細胞を作製できる簡便なワンステップ法の確立を目指して研究を行った。まず、ヒト血管内皮細胞から肝がん形成細胞（liver cancer-forming cell: LCC）へのリプログラミングを誘導可能な因子のスクリーニングを行った。この目的のため、本研究では肝細胞分化や肝細胞のがん化に関わる 9 つの遺伝子とがん抑制遺伝子である *TP53* の発現を抑制するショートヘアピン RNA を選択し、エピソーマルベクターを用いてそれらをヒト血管内皮細胞に発現させる実験系を構築した。この実験系を用いて個々の因子の量を変えたり、除外したりすることで LCC へのリプログラミング誘導因子のスクリーニングを進めつつ、誘導された細胞についてはその増殖能、肝細胞/肝がん細胞関連遺伝子やタンパク質の発現能、形態異常や染色体異常の有無、遺伝子発現プロファイルの変化、生体内における腫瘍形成能などを解析した。その結果、ヒト血管内皮細胞から LCC へのダイレクトリプログラミングを誘導するために必要な因子の組み合わせとして、FOXA3, HNF1A, HNF1B, LIN28B, L-MYC, KLF5 の 6 因子セットを同定した (Goya et al., *Hepato1. Commun.*, 2022)。誘導された細胞 (induced LCC: iLCC) は培養下で高い増殖能をもち、肝細胞/肝がん細胞特異的な遺伝子やタンパク質を発現し、その一部には形態異常や染色体異常が観察された。また、iLCC の遺伝子発現プロファイルはヒト肝がん細胞と類似しており、iLCC を免疫不全マウスへ移植すると肝細胞がんと胆管がんの複合型腫瘍を形成した。以上から、今後肝がん患者や健常者から作製される iLCC は、がん研究の発展や肝がんの診断・治療・予後予測法の開発に有用と考えられる。

D. ダイレクトリプログラミングによるマウス及びヒト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 iHepC 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、胎児性の「誘導腸前駆細胞（iFIPC）」へ変化させることに成功した（Miura and Suzuki, *Cell Stem Cell*, 2017）。作製した iFIPC は、三次元培養下で腸上皮オルガノイドを形成し、増殖することが可能であった。また、マウス iFIPC が作る腸上皮オルガノイドは、培養条件を変えることで、成体型の「誘導腸幹細胞（iISC）」が作る腸上皮オルガノイドへと成長した。得られた iISC 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 iFIPC や iISC 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 iFIPC や iISC 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（Miura and Suzuki, *Develop. Growth Differ.*, 2018; Miura and Suzuki, *Methods Mol. Biol.*, 2020）。

E. 活性調節 gRNA による最適化ゲノム編集誘導法の開発

CRISPR-Cas9 の活性を正確に制御することは、安全かつ効率的なゲノム編集のために重要である。我々は、シンプルなガイド RNA 設計で Cas9 の活性を微調整できる新技術を開発した（Kawamata et al., *Nat. Biomed. Eng.*, in press）。従来の sgRNA の 5' 末端にシトシンを伸長させることで、シトシンの長さ依存的に細胞内の gRNA-Cas9 複合体の存在量が低下し、DNA との親和性、切断活性も同時に抑制されることで、編集効

率の低下が誘導された。活性レベルとゲノム編集効果の相関関係を調べた結果、短いシトシン伸長は両アレル編集能力を維持しつつ、細胞毒性を低減し、相同組換え効率を上昇させた。長い伸長の場合は、オンターゲット活性は低下したが、それ以上にオフターゲットの大幅な抑制効果が得られ、片アレル編集や1塩基置換などの精密編集効率を高めることができた。一方で、活性調節 sgRNA は、Cas12a や CRISPRa/i などの Cas9 以外のゲノム編集プラットフォームに対する調節にも適用できることを見出した。また、1細胞レベルで両アレルの indel 誘導効率を蛍光パターンで測定できる Allele-specific Indel Monitor System (AIMS) から得られたデータをもとに、活性レベルと編集効率の相関関係を導き出す数理モデルの構築にも成功した。これにより、疾患関連の1塩基多型をワンステップの組換えで、最も効率良く導入および修復するための最適な Cas9 活性値を求めることができるようになった。特に活性の抑制は、ヒト多能性幹細胞で顕著にみられる p53 の活性化と細胞毒性を劇的に緩和する効果を持ち、これにより効率的な疾患モデル変異の修復が可能になった。以上より、今回我々は活性調節 sgRNA の開発を通して、最適活性のもとで安全性と効率を最大化できる次世代型のゲノム編集プラットフォームの構築に成功した。将来、様々な遺伝性疾患治療への応用が期待できる。

業績目録

原著論文

1. Kawamata M., Suzuki H.I., Kimura R., Suzuki A.
Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs.
Nature Biomedical Engineering. in press.

受賞

1. 川又 理樹. (6/8, 2022)
日本ゲノム編集学会第7回大会, ポスター賞.
2. 鈴木 陵雅. (7/12, 2022)
第24回生医研リトリート2022, 優秀ポスター賞.
3. 三浦 静. (8/26, 2022)
第29回肝細胞研究会, 優秀演題賞.

学会発表等

1. 河野 雄紀, 三浦 静, 川又 理樹, 堀澤 健一, 吉丸 耕一朗, 松浦 俊治, 田尻 達郎, 鈴木

- 淳史. (5/19, 2022)
 ダイレクトリプログラミングにより作製したヒト肝前駆細胞による肝線維化の抑制. (一般口演)
 第59回日本小児外科学会学術集会, 東京 (現地参加).
2. 川又 理樹, 鈴木 洋, 鈴木 淳史. (6/7, 2022)
 DNA barcodeを介した勾配蛍光誘導による次世代型二重標識Lineage tracing技術の開発.
 (ポスター発表)
 日本ゲノム編集学会第7回大会, オンライン.
3. 堀澤 健一, 三浦 静, 荒木 啓充, 三浦 史仁, 伊藤 隆司, 鈴木 淳史. (6/9, 2022)
 誘導腸幹細胞の線維芽細胞からの直接誘導過程におけるエピジェネティックリモデリングの解析. (ポスター発表)
 第15回日本エピジェネティクス研究会年会, 福岡 (現地参加).
4. 三浦 静, 辻野 智史, 堀澤 健一, 井上 和也, 唐澤 皐月, 鈴木 淳史. (8/25, 2022)
 培養下における肝細胞から腸幹/前駆細胞への運命転換. (一般口演)
 第29回肝細胞研究会, 東京 (現地参加).
5. 唐澤 皐月, 川又 理樹, 三浦 静, 鈴木 淳史. (8/26, 2022)
 転写因子発現による肝線維化治療における最適な標的細胞の同定. (一般口演)
 第29回肝細胞研究会, 東京 (現地参加).
6. 鈴木 淳史. (10/1, 2022)
 若手研究者支援プロジェクト委員会主催ランチョンセミナー「がん治療の種を育てよう〜若手研究者活躍のための支援のあり方を考える」. (パネリスト)
 第81回日本癌学会学術総会, 横浜 (現地参加).
7. Kawamata M., Suzuki H.I., Suzuki A. (11/17, 2022)
 Rational optimization of versatile genome editing applicability by tuning CRISPR-Cas9 activity.
 (Short talk)
 The 31th Hot Spring Harbor International Symposium “Expanding views on Systems biology and Immunology”, Fukuoka, Japan (Online).
8. 川又 理樹, 鈴木 洋, 鈴木 淳史. (11/30, 2022)
 プロモーター編集による新規グラデーションRainbow多細胞追跡技術の開発. (川又: オーガナイザー&講演)
 第45回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞ヘテロ可塑性 / 生体の頑強性と柔軟性を支える細胞不均一性と可塑性の理解に向けて」, 幕張 (現地参加).
9. 鈴木 陵雅, 堀澤 健一, 三浦 静, 大川 恭行, 鈴木 淳史. (11/30, 2022)
 誘導腸前駆細胞におけるリプログラミング機構の解明. (ポスター発表)
 第45回日本分子生物学会年会, 幕張 (現地参加).

10. 三浦 静, 堀澤 健一, 鈴木 淳史. (3/23, 2023)
ダイレクトリプログラミングで作製された腸上皮オルガノイドの単一細胞プロファイリング. (一般口演)
第22回日本再生医療学会総会, 京都 (現地参加).
11. 唐澤 皐月, 川又 理樹, 三浦 静, 鈴木 淳史. (3/23, 2023)
ダイレクトリプログラミング因子を用いた肝線維化治療における最適条件の解明. (ポスター発表)
第22回日本再生医療学会総会, 京都 (現地参加).