

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）、白根道子准教授、西山正章助教の教員を中心に、学術研究員 5 名（うち 1 名は特任助教称号付与）、非常勤研究員 1 名、大学院生 14 名（博士課程 8 名、修士課程 6 名）、テクニカルスタッフ 4 名の体制で研究を進めている（2015 年 3 月 31 日現在）。

人事異動について、また 2014 年 4 月より、井上一平（修士課程より進学）、比嘉綱己（北海道大学医学部卒）、清水秀幸（東北大学医学部卒）が大学院博士課程に、また仁田暁大（北九州市立大学卒）、小玉学（名古屋大学医学部卒）が大学院修士課程に入学した。

次いで退職者として、2014 年 7 月に准教授の東田裕一が退職した（2014 年 8 月から九州大学稲盛フロンティア研究センター・教授に着任）、またテクニカルスタッフの後藤麻衣子が 2014 年 7 月に退職、三田井千宴が 2014 年 8 月に退職、学術研究員の山内隆好が留学のため退職した。

また 2015 年 3 月に大学院修士課程の渡辺紘己、松本結香（引き続き、博士課程へ進学）、北之園怜往が修士課程を修了した。また大学院生博士課程の井上一平が就職のため退学した。

A. ユビキチンリガーゼ Fbxw7 によるがん転移抑制メカニズムの解明

従来、癌転移のメカニズムは癌細胞自身の特性として研究されてきたが、近年、癌細胞を取り巻く微小環境が癌の進展に影響することが明らかになってきた。特に骨髓由来

細胞が原発巣、転移巣に誘導され、浸潤・転移に関わることが報告されている。Fbxw7 は SCF 型ユビキチンリガーゼの構成因子の 1 つであり、癌遺伝子産物である c-Myc や Notch の分解を誘導する。Fbxw7 の変異は癌細胞株や癌患者で高頻度に見つかっており、有力な癌抑制遺伝子として注目を集めてきた。われわれは乳癌患者の癌部および末梢血において Fbxw7 の mRNA 量を測定したところ、癌部だけでなく末梢血中の Fbxw7 が低い群は有意に予後不良であることを発見した。このメカニズムを調べるため骨髄 Fbxw7 欠損マウスに黒色腫細胞、肺癌細胞、乳がん細胞を移植したところ、Fbxw7 欠損マウスでは肺転移が亢進し早期に死亡した。Fbxw7 欠損骨髄細胞を移植した野生型マウスでも転移の亢進がみられたことから、骨髄由来細胞群における Fbxw7 の欠損が癌転移を促進する原因となると考えられた。骨髄 Fbxw7 欠損マウスの肺では、転移初期に癌細胞の周囲に monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSC) が集積していた。また癌移植後の骨髄 Fbxw7 欠損マウスにおいて CCL2 と CCL12 が上昇しており、これらのレセプターである CCR2 のアンタゴニストの投与により転移巣での癌細胞の増殖および Mo-MDSC の集積が解消された。骨髄由来細胞のうち CCL2 分泌細胞として monocytes/macrophages と mesenchymal stromal cells (MSC) が報告されている。Fbxw7 は monocytes/macrophages の CCL2 分泌には影響しない一方、Fbxw7 欠損 MSC では分解基質 Notch1 の蓄積の結果 CCL2 の分泌が亢進していた。また癌細胞と MSC との共移植実験により、Fbxw7 欠損 MSC は CCL2 依存的に癌転移を亢進させた。つまりヒトでは体質的に Fbxw7 の高低があり、Fbxw7 の低い群では MSC における Notch の分解が不十分なため、その下流遺伝子 CCL2 が活性化され癌周囲に Mo-MDSC の集積を促すために転移巣における腫瘍の増殖が増大すると結論される。

B. プロトルーディンによる ER 形態制御機構の解明

Protrudin はわれわれが発見した膜タンパク質であり、神経細胞内における小胞輸送を制御している。Protrudin の変異は遺伝性痙攣性対麻痺 (HSP) を引き起こし、Protrudin は HSP の原因遺伝子産物 (SPG) の一つ (Protrudin は SPG33) である。その他の SPG として知られている Spastin (SPG4)、Atlastin-1 (SPG3A)、REEP1 (SPG31) は、小胞体 (ER) 膜上で複合体を形成し、膜挿入型の楔形ヘアピンループ構造によって膜曲率を上昇させることにより ER 構造調節に寄与している。この ER の構造調節機構の破綻が HSP の病態メカニズムと深く関わっていると考えられている。

Protrudin も他の SPG 分子と同様に、HSP 関連分子との複合体形成や ER 構造調節への関与が予想されたため、それらの可能性を生化学的方法により検討した。Protrudin が中枢神経系で過剰発現されるトランスジェニックマウスを作製し、その脳抽出物から質量分析によって Protrudin 結合タンパク質を網羅的に同定したところ、Atlastin-1、REEP5 など HSP 関連タンパク質が検出された。次に、Protrudin のトポロジー解析を行ったとこ

ろ, Protrudin はヘアピンループ構造を有することが明らかになった. また Protrudin を過剰発現すると ER の網目構造が細くなることや ER の安定性が上昇することが示された. これらの知見は Protrudin が HSP 関連タンパク質と複合体を形成し, ER の構造調節に関与していることを示唆する. SPG33 の家系で報告されている Protrudin の変異がどのように HSP を惹起するのかを検討したところ, この変異型 Protrudin の発現は ER ストレスを誘導することがわかった. また, 変異型 Protrudin はタンパク質の安定性の上昇を認め, ゲルろ過分析により変異型 Protrudin は野生型に比べ高分子のフラクションに移行することから, 変異型 Protrudin は構造変化により凝集物を作って安定化し, これが ER ストレスを誘導するものと考えられた.

以上より, Protrudin は他の HSP 関連タンパク質と複合体を形成することで ER 形態やネットワークの制御に関与し, その破綻が HSP の病態に関与するものと考えられた.

業績目録

原著論文

1. Hashimoto, Y., Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T., Nakayama, K. I. 2014.
Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia.
J. Biol. Chem., 289, 12946-12961.
2. Hashiguchi, T., Oyamada, A., Sakuraba, K., Shimoda, K., Nakayama, K. I., Iwamoto, Y., Yoshikai, Y., Yamada, H. 2014.
Tyk2-dependent bystander activation of conventional and nonconventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection.
J. Immunol., 192, 4739-4747.
3. Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I. 2014.
p57 regulates T-cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling.
Blood, 123, 3429-3439.
4. Moroishi, T., Yamauchi, T., Nishiyama, M., Nakayama, K. I. 2014.
HERC2 targets the iron regulator FBXL5 for degradation and modulates iron metabolism.
J. Biol. Chem., 289, 16430-16441.
5. Kanatsu-Shinohara, M., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Shinohara, T. 2014.
Skp1-Cullin-F-box (SCF)-type ubiquitin ligase FBXW7 negatively regulates spermatogonial stem cell self-renewal.

- Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 111, 8826-8831.
6. Kitagawa, K., Shibata, K., Matsumoto, A., Matsumoto, M., Ohhata, T., Nakayama, K. I., Niida, H., Kitagawa, M. 2014.
Fbw7 targets GATA3 through cyclin-dependent kinase 2-dependent proteolysis and contributes to regulation of T-cell development.
Mol. Cell. Biol., 34, 2732-2744.
 7. Yugi, K., Kubota, H., Toyoshima, Y., Noguchi, R., Kawata, K., Komori, Y., Uda, S., Kunida, K., Tomizawa, Y., Funato, Y., Miki, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kashikura, K., Endo, K., Ikeda, K., Soga, T., Kuroda, S. 2014.
Reconstruction of insulin signal flow from phosphoproteome and metabolome data.
Cell Rep., 8, 1171-1183.
 8. Yamauchi, T., Nishiyama, M., Moroishi, T., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2014.
MDM2 mediates nonproteolytic polyubiquitylation of the DEAD-Box RNA helicase DDX24.
Mol. Cell. Biol., 34, 3321-3340.
 9. Saita, S., Shirane, M., Ishitani, T., Shimizu, N., Nakayama, K. I. 2014.
Role of the ANKMY2-FKBP38 Axis in Regulation of the Sonic Hedgehog (Shh) Signaling Pathway.
J. Biol. Chem., 289, 25639-25654.
 10. Adachi, S., Homoto, M., Tanaka, R., Hioki, Y., Murakami, H., Suga, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatta, T., Iemura, S., Natsume, T. 2014.
ZFP36L1 and ZFP36L2 control LDLR mRNA stability via the ERK-RSK pathway.
Nucleic Acids Res., 42, 10037-10049.
 11. Lu, W., Liu, S., Li, B., Xie, Y., Adhiambo, C., Yang, Q., Ballard, B. R., Nakayama, K. I., Matusik, R. J., Chen, Z. 2015.
SKP2 inactivation suppresses prostate tumorigenesis by mediating JARID1B ubiquitination.
Oncotarget, 6, 771-788.
 12. Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K., Nakayama, K. I. 2015.
F-box protein FBXW7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner.
J. Clin. Invest., 125, 621-635.
 13. Nakajima, T., Kitagawa, K., Ohhata, T., Sakai, S., Uchida, C., Shibata, K., Minegishi, N., Yumimoto, K., Nakayama, K. I., Masumoto, K., Katou, F., Niida, H., Kitagawa, M. 2015.
Regulation of GATA binding protein 2 levels via ubiquitin-dependent degradation by Fbw7: involvement of cyclin B-cyclin-dependent kinase 1-mediated phosphorylation of Thr176 in GATA binding protein 2.
J. Biol. Chem., in press.

14. Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K. I., Hirabayashi, Y., Gotoh, Y. 2015.
Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells.
Nat. Neurosci., in press.

総説

1. Shirane-Kitsuji, M., Nakayama, K. I. 2014.
Mitochondria: FKBP38 and mitochondrial degradation.
Int. J. Biochem. Cell Biol., 51, 19-22.
2. Takeishi, S., Nakayama, K. I. 2014.
Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells.
Br. J. Cancer, 111, 1054-1059.
3. Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2015.
Fbxw7 suppresses cancer metastasis by inhibiting niche formation.
OncoImmunology,
4. 松崎英美子, 松本雅記, 中山敬一. 2014.
がん代謝.
がん分子標的治療, 12, 59-64.

学会発表

1. 中山敬一. (2014, 5/27).
次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. (招待講演)
生命科学系 3 分野がん・ゲノム・脳支援活動合同シンポジウム, 東京.
2. Nakayama, K. I. (2014, 5/31).
FBXL12 targets ALDHs for degradation in trophoblast stem cells to induce differentiation.
(Symposium)
The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka.
3. Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I. (2014, 5/31).
Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction on leukemia stem cells through altered microenvironmental regulation. (Symposium)
The 12th Stem Cell Research Symposium, Fukuoka.
4. 松本雅記, 中津海洋一, 中山敬一. (2014, 6/25).
リン酸化定量プロテオミクスによるシグナル伝達研究. (ワークショップ)

- 第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜.
5. 中山敬一. (2014, 6/25).
全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明. (ワークショップ)
第 14 回日本蛋白質科学会年会, 横浜.
 6. 中山敬一. (2014, 7/8).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの秘密を解き明かす. (招待講演)
第 7 回 KAITEKI Forum, 東京.
 7. 中山敬一. (2014, 7/26).
医学研究に貢献する最先端分析技術. (招待講演)
九州プロサーチオープニングセミナー, 福岡.
 8. 中山敬一. (2014, 7/27).
がんの完治に向けた次世代型アプローチ. (招待講演)
第 50 回姫路市医師会夏期大学, 姫路.
 9. 中山敬一. (2014, 8/21).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 8 回レドックス・ライフイノベーション第 170 委員会, 宮崎.
 10. 中山敬一. (2014, 9/6).
ユビキチンリガーゼ FBXL5 による鉄代謝制御とその破綻. (シンポジウム)
第 38 回鉄バイオサイエンス学会学術集会, 仙台.
 11. 中山敬一. (2014, 9/25).
次世代プロテオミクスと数理科学の融合が解き明かすがんの秘密. (ランチョンセミナー)
第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜.
 12. 中山敬一. (2014, 9/26).
癌幹細胞の理解と制御：癌を完治させる治療戦略. (モーニングレクチャー)
第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜.
 13. 中山敬一. (2014, 11/4).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 23 回長崎障害者支援再生医療研究会, 長崎.
 14. Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).
FBXL12-mediated degradation of ALDH3 is essential for the exit program from the stem cell state.
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014,
Fukuoka.
 15. Muto, Y., Nishiyama, M., Moroishi, T., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).
Role of the ubiquitin ligase FBXL5 controlling iron metabolism in hematopoietic stem cells.

The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka.

16. Takeishi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I. (2014, 11/7).
Disruption of quiescence by p57 ablation confers oncogene addiction to leukemic stem cells through altered niche regulation. (Invited Speaker)
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka.
17. Nakatsumi, H., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2014, 11/8).
Nutrition signal induces inflammation via the mTOR-FOXK1-CCL2 pathway. (Invited Speaker)
The 24rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014, Fukuoka.
18. 中山敬一. (2014, 11/9).
がんにおける二つの謎：がん幹細胞とワールブルグ効果. (特別講演)
第 134 回山口県医師会生涯研修セミナー, 山口.
19. Nakayama, K. I. (2014, 11/19).
Deep and absolute quantification of human proteome unveils a global landscape of cancer metabolism. (Invited Speaker)
The 4th Japan-France Cancer Workshop, Kyoto.
20. 中山敬一. (2014, 11/23).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新天地：90 年来のがんの謎を解く. (教育講演)
第 61 回日本臨床検査医学会学術集会, 福岡.
21. 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一. (2014, 12/12).
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.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
22. 片山雄太, 西山正章, 中山敬一. (2014, 12/12).
CHD8L アイソフォームの発生と分化における機能の解析.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
23. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 武藤義治, 中山敬一. (2014, 12/12).
FBXL5-IRP2 軸による鉄代謝調節は神経幹細胞の恒常性維持に必須である.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
24. 白根道子, 中山敬一. (2014, 12/12).
ドーパミン制御による BDNF-TrkB シグナル調節機構. (ワークショップ)
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
25. 松本結香, 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2014, 12/12).
mTORC1 依存的に脱リン酸化する転写因子 FOXK2 の解析. (ワークショップ)

- 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
26. 渡辺紘己, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).
軟骨分化における Fbxw7 遺伝子の機能解析.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
27. 嘉山皓太, 渡邊心也, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 杉本のぞみ, 藤田雅俊. (2014, 12/12).
GRWD1 による核小体ストレス応答 RP-MDM2-p53 経路の制御.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
28. 原瑞季, 浅原俊一郎, 伊原佑香, 井上裕行, 照山杏子, 松田友和, 木村(小柳)真希, 中山敬一,
木戸良明. (2014, 12/12).
膵 β 細胞における細胞周期調節蛋白 p57 の機能解析.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
29. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2014, 12/12).
リン酸化プロテオミクス解析から明らかになった新規 mTORC1-FOXK1-CCL2 経路と腫瘍関
連炎症との関連. (ワークショップ)
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
30. 喜多泰之, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一. (2014, 12/12).
CHD8 は Ppar γ と C/ebp α の転写活性化を介して脂肪分化を誘導する.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
31. 西山正章, 仁田暁大, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).
FBXL12 による ALDH3 の分解は幹細胞状態からの脱出プログラムに必須である.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
32. 武石昭一郎, 松本有樹修, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一. (2014, 12/12).
p57 を欠損させた白血病幹細胞はニッチ制御の変化によりがん遺伝子依存性となる. (ワーク
ショップ)
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
33. 渡邊心也, 杉本のぞみ, 嘉山皓太, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 藤田雅俊. (2014, 12/12).
GRWD1 は核小体ストレス誘導因子 RPL23 タンパク質を制御している.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
34. 坂安優未, 住友明子, 間内清香, 津矢田(弘田)有紀, 疋田貴俊, 櫻井武, 中山敬一, 澤明, 友田
利文. (2014, 12/12).
FEZ1 によるオートファージ制御および精神疾患様症状の抑制.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
35. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 上尾裕紀, 小野山一郎, 上尾裕昭, 森正樹, 三森功士, 中山敬一. (2014,
12/12).
癌周囲の微小環境における Fbxw7 の発現量が癌転移能を規定する. (ワークショップ)

- 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
36. 井上一平, 弓本佳苗, 中山敬一. (2014, 12/12).
ユビキチンリガーゼ Fbxw7 は KLF7 の分解を介して感覚神経の分化を制御する.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
37. Okada, M., Kitamura, A., Mori, S., Nada, S., Nakatsumi, H., I.Nakamura, K. (2014, 12/12).
Function and molecular architecture of the lysosomal mTORC1 anchor: Regulator.
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
38. Matsuzaki, F., Matsumoto, M., Oshikawa, K., Nakayama-I, K. (2014, 12/12).
Absolute quantification of all human metabolic enzymes and metabolic systems analysis. (ワークショップ)
第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜.
39. 中山敬一. (2015, 1/13).
次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. (招待講演)
第 45 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 ― 創薬のパラダイムシフト ―, 東京.
40. 中山敬一. (2015, 2/13).
次世代プロテオミクスが拓く生命科学研究の新地平: 90 年来のがんの謎を解く. (特別講演)
第 13 回群馬大学大学院医学系研究科・大学院生によるワークショップ「未来を切り拓く医学研究」, 前橋.
41. 中山敬一. (2015, 2/21).
がんにおける二つの謎: がん幹細胞とワールブルグ効果. (招請講演)
第 3 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 福岡.
42. 中山敬一. (2015, 2/28).
がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法. (特別講演)
第 12 回日本免疫治療学研究会学術集会, 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。

2014 年度においては、鈴木淳史（教授）、関谷明香（助教）、堀澤健一（同）、鶴殿美弥子（学術研究員）、高島康郎（同）、寺田茉衣子（大学院生・博士3年）、三浦静（同・博士2年）、山本純平（同・博士2年）、海江田千晶（テクニカルスタッフ）、山本真由美（同）の10名に、4月から後藤那奈子（学部4年生・21世紀プログラム）、伊藤花菜江（テクニカルスタッフ）、本田結城（同）の3名が加わり、総勢13名で研究を行った。

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; 特許出願済み)。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、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）。

本研究では、マウスで得られた成果をヒトへ応用し、ヒト iHep 細胞の作製とその医療・創薬への応用を目指して研究を進めている。しかしながら、そもそも iHep 細胞が肝細胞の代わりとして薬剤反応性試験に利用できるのか、iHep 細胞への誘導にはどれくらいの時間がかかるのかなど、将来の医療応用を見据えた上で疑問が残っていた。そこで、平成 26 年度では、マウスの iHep 細胞を用いてこれらの疑問点について検証を行った。まず、前者について、iHep 細胞の脂質代謝に関する機能を解析した。その結果、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できることが示された（Miura and Suzuki, *Front. Cell Dev. Biol.*, 2014）。したがって、iHep 細胞は、将来、脂肪性肝疾患の治療に有効な新規薬剤のスクリーニングや遺伝的脂質代謝異常症のメカニズム解明に向けた研究において優れたツールになりうると考えられる。また、後者では、iHep 細胞の作製過程を詳細に解析した結果、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が明らかとなった（Miura and Suzuki, *Inflamm. Regen.*, 2014）。この結果は、実際の医療応用を考えた上で、iHep 細胞を短期間のうちに用意し、治療や検査に利用できる可能性を示唆している。

B. 三次元組織再構築法を用いた肝内胆管形成のイメージング解析

肝臓の発生では、肝幹細胞（肝芽細胞）から分化した胆管上皮細胞が門脈周囲に ductal plate と呼ばれる細胞層を形成し、発生プログラムにしたがって徐々に肝内胆管を形成していく。肝内胆管は肝臓内で管構造を形成するため、その形態形成過程を詳しく調べるには、肝発生初期から胆管上皮細胞を連続的かつ立体的に解析する必要がある。しかしながら、肝内胆管の発生は、これまで主に組織切片を用いた二次元平面で解析されており、三次元形態形成過程の解析や形態計測学に基づいた定量的な解析は行われていなかった。そこで我々は、マウスの胎仔から成体に至るまでの肝内胆管の立体構造をコンピューター上で再構築することでモデル化し、成長する管構造の長さや枝の数、結合予測値、門脈からの離散距離といった形態計測学的な事項について解析を行い、肝内胆管の発生過程を詳細かつ定量的に調べた。その結果、三次元再構築モデルを用いた時空間的な観察と形態計測学的解析による定量的な解析によって、立体的かつ動的な胆管形成モデルを構築することに成功した（Takashima et al., *Hepatology*, 2015）。本研究で用いた三次元イメージング技術は、アプローチのしにくい組織内部の立体構造を解析

可能なことから、今後、発生学や病理学の分野で広く利用されることが期待される。

C. 慢性肝炎や肝内胆管がんで形成される偽胆管が Notch シグナルを介した肝細胞の分化転換から生じることを発見

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)。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)。

D. 肝臓の再生に必要な肝細胞の増殖活性化機構の解明

アポロ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行っている。最近の研究では、細胞の運動や分化、増殖、生存などにおいて重要な機能を有する転写因子のひとつ、Snail に着目し、肝再生における Snail の役割について解析を行った。その結果、肝再生シグナルに応じて誘導される Glycogen synthase kinase (GSK)-3 β 依存的な Snail の分解が、肝細胞の増殖活性化のトリガーになっていることを見出した (Sekiya and Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011)。

本研究成果やそこから導きだされる新しい概念は、今後の肝再生療法や肝硬変・肝がんの原因究明や治療法の開発に貢献することが期待される。また、肝臓はなぜ再生できるのか、他の臓器はなぜ再生できないのかといった疑問に対する生物学的理解を深めることもできる (Suzuki, *Genes Cells*, 2015)。複雑な肝臓の再生には Snail の他にも多

くの分子が関与するはずであり、今後は肝臓における Snail の機能的役割の解析をさらに進めながら、他の分子の関与も積極的に解析することで、肝再生の分子メカニズムの全体像を明らかにしていきたい。また、肝再生の研究を行いながら肝再生の異常も視野に入れ、肝再生不全から生じる肝硬変や肝がんの発症に関しても研究を進めていきたい。

E. 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）。現在では、これまでに我々が同定した転写因子やマイクロRNAによる肝芽細胞の制御機構について新たな知見が得られており、今後の研究展開が楽しみな状況である。

F. 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、多分化能、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)。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ための基盤科学になりうる。そこで、慢性肝炎を誘導した p53 欠損マウスから CD133⁺CD45⁻TER119⁻ 細胞を分離し、CD133⁺CD45⁻TER119⁻ 細胞画分以外の細胞画分に含まれる細胞と腫瘍形成能について比較した。その結果、p53 を欠損した CD133⁺CD45⁻TER119⁻ 細胞のみが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 CD133⁺CD45⁻TER119⁻ 細胞は肝がんに含まれる「がん幹細胞」のもとになる細胞である可能性が高い。そこで現在では、肝がんのがん幹細胞についても研究を進めている。

業績目録

原著論文

1. Sekiya, S., Suzuki, A. 2014.
Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver.
Am J Pathol 184, 1468–1478.
2. Miura, S., Suzuki, A. 2014.
Acquisition of lipid metabolic capability in hepatocyte-like cells directly induced from mouse fibroblasts.
Front Cell Dev Biol 2, 1–6.
3. Miura, S., Suzuki, A. 2014.

Rapid cell-fate conversion of mouse fibroblasts into hepatocyte-like cells.

Inflamm Renen 34, 211–216.

4. Takashima, Y., Terada, M., Kawabata, M., Suzuki, A. 2015.

Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development.

Hepatology 61, 1003–1011.

総説等

1. 鈴木淳史. 2014

Direct reprogramming ～皮膚線維芽細胞から肝細胞へ

感染・炎症・免疫、Vol. 44, No. 1.

2. 鈴木淳史. 2014

皮膚細胞から肝細胞へのダイレクトリプログラミング

細胞、Vol. 46, No. 5.

3. Suzuki, A. 2014.

Direct reprogramming.

Inflamm Renen 34, 209–210.

4. Suzuki, A. 2015.

Liver regeneration: a unique and flexible reaction depending on the type of injury.

Genes Cells 20, 77–84.

5. 鈴木淳史. 2015

医療応用へ向けた肝細胞の直接誘導技術

実験医学増刊「再生医療 2015 幹細胞と疾患 iPS 細胞の研究最前線」、Vol. 33, No. 2.

6. 鈴木淳史. 2015

ダイレクトリプログラミングによる肝細胞の作製

肝胆膵、Vol. 70, No. 3.

受賞

1. 寺田茉衣子 (2014, 7/23)

第17回生医研リトリート2014、優秀口演賞

2. 鈴木淳史 (2015, 2/24)

第11回日本学術振興会賞

学会発表等

1. 鈴木淳史 (2014, 5/28)

Regulation of stem cell properties in liver development (招待講演、座長、オーガナイザー)

第47回日本発生生物学会大会シンポジウム「Decoding and Handling the Stem Cell System」、名古屋

2. 寺田茉衣子、関谷明香、鈴木淳史 (2014, 5/30)
Generation of a mouse model capable of visualizing pluripotent cells in Nanog-expressing cells (一般口演、選抜あり)
第12回幹細胞シンポジウム、福岡
3. 高島康郎、寺田茉衣子、鈴木淳史 (2014, 5/31)
The Lin28/let-7 axis regulates proliferation of hepatoblasts (一般口演、選抜あり)
第12回幹細胞シンポジウム、福岡
4. 鈴木淳史 (2014, 6/13)
線維芽細胞から肝細胞へのダイレクトリプログラミング (招待講演、座長、オーガナイザー)
第66回日本細胞生物学会大会 テクニカルシンポジウム 2 「細胞の運命転換技術と応用」、奈良
5. Suzuki, A. (2014, 6/17)
Direct reprogramming of fibroblasts to hepatocyte-like cells (Invited Speaker)
THE UEHARA MEMORIAL FOUNDATION SYMPOSIUM
2014, Innovative Medicine: Basic Research and Development, Tokyo, Japan
6. 塩尻信義、上野友也、福地智一、鈴木淳史、山本太一、野口民夫、小池亨 (2014, 6/27)
肝臓特異的Hhex遺伝子欠失マウス肝臓における嚢胞発生とWntシグナル (ポスター)
第21回肝細胞研究会、東京
7. 三浦静、関谷明香、鈴木淳史 (2014, 6/28)
iHep細胞研究から見出された肝細胞分化の新規制御機構 (一般口演、選抜あり)
第21回肝細胞研究会、東京
8. 山本純平、関谷明香、鈴木淳史 (2014, 6/28)
凝集塊形成によるiHep細胞の成熟化 (一般口演、選抜あり)
第21回肝細胞研究会、東京
9. 高島康郎、寺田茉衣子、鈴木淳史 (2014, 6/28)
マイクロRNAによる肝芽細胞の増殖制御 (一般口演、選抜あり)
第21回肝細胞研究会、東京
10. 鈴木淳史 (2014, 7/2)
「ダイレクトリプログラミング」の現状と展望 (招待講演)
第35回日本炎症・再生医学会、沖縄
11. Suzuki, A. (2014, 8/27)
Genetic cell lineage tracing in liver regeneration and cancer (Invited Speaker)
2014 International Symposium of

Materials on Regenerative Medicine (2014 ISOMRM), Tao-Yuan, Taiwan

12. 鈴木淳史 (2014, 10/3)
肝細胞分化の人為的な誘導と疾患による破綻 (招待講演)
大日本住友製薬株式会社 社内講演会、大阪
13. 鈴木淳史 (2014, 10/9)
肝細胞分化の人為的な誘導と疾患による破綻 (特別講演)
福岡臨床肝臓懇話会、福岡
14. 鈴木淳史 (2014, 10/16)
線維芽細胞から肝細胞へのダイレクトリプログラミング (招待講演)
第87回日本生化学会大会「創薬や再生医療の基盤となる「動くクロマチン構造」を追う」、京都
15. Terada, M., Sekiya, S., Suzuki, A. (2014, 11/8)
Generation of a mouse model capable of visualizing pluripotent cells in
Nanog-expressing cells (Poster)
The 24th Hot Spring Harbor International Symposium “Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014”, Fukuoka, Japan
16. Yamamoto, J., Sekiya, S., Miura, S., Suzuki, A. (2014, 11/8)
Maturation of iHep cells in cell aggregation culture (Poster)
The 24th Hot Spring Harbor International Symposium “Recent Advances in Immunology and Inflammation 2014”, Fukuoka, Japan
17. 高島康郎、寺田茉衣子、川畑万寿代、鈴木淳史 (2014, 11/28)
3Dイメージングと形態計測学による肝内胆管の形態形成過程の解析 (一般口演)
新学術領域「上皮管腔形成」若手主催研究会「In vitro培養系を用いた上皮管腔構造の解析検討会」、東京
18. 鈴木淳史 (2014, 12/6)
Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導 (特別講演)
第2回細胞凝集研究会、福岡
19. 鈴木淳史 (2015, 3/20)
Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導 (招待講演、座長、オーガナイザー)
第14回日本再生医療学会総会シンポジウム「リプログラミングと多能性幹細胞」、横浜
20. 三浦静、鈴木淳史 (2015, 3/20)
iHep細胞研究から見出された肝細胞分化の新規制御機構 (一般口演、選抜あり)
第14回日本再生医療学会総会、横浜
21. 山本純平、鈴木淳史 (2015, 3/20)
ダイレクトリプログラミングによって誘導された肝細胞様細胞の成熟化 (一般口演、選抜あり)

り)

第14回日本再生医療学会総会、横浜

22. 鈴木淳史 (2015, 3/27)

肝臓の形成と病態のメカニズム ~肝障害・肝腫瘍における細胞分化の新たな知見~(特別講演)

第14回肝細胞イメージングカンファレンス、福岡