

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4名（うち1名は特任助教称号付与）、大学院生13名（博士課程9名、修士課程4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（2016年3月31日現在）。

人事異動について、また2015年4月より、松本結香（修士課程より進学）、山内悠平（東北大学医学部卒）が大学院博士課程に、また中山省悟（関西学院大学卒）が大学院修士課程に入学した。

次いで退職者として、2015年9月に学術研究員（特任助教）の武石昭一郎が退職した（2014年10月から米国アルバートアインシュタイン大学へ留学）。また大学院修士課程の仁田暁大（引き続き、博士課程へ進学）、川村敦生（引き続き、博士課程へ進学）、小玉学（引き続き、博士課程へ進学）が修士課程を修了した。また大学院生博士課程の橋本 寛が学位取得修了（引き続き、学振特別研究員として在籍）、喜多泰之（引き続き在籍）、武藤義治（引き続き、学術研究員として在籍）、舟崎慎太郎（引き続き、学術研究員として在籍）が単位取得の上退学となった。

A. ユビキチンリガーゼFBXL12による栄養膜幹細胞およびT細胞分化の制御機構

どのように幹細胞がその幹細胞性を維持し、またあるときは分化プログラムを開始するのかわかることは未知の部分が多く残されている。アルデヒド脱水素酵素（ALDH）はしばしば幹細胞が発現している分子としてマーカー的に扱われているだけでなく、機能的にも幹細胞性の維持に重要であるとされている分子である。しかしどのように幹細胞でALDHの活性が制御されているのかという点については未解明であった。

FBXL12 はユビキチンリガーゼ (E3) の一種である SCF 複合体のうち、その基質認識サブユニットに F-box タンパク質の一種である FBXL12 (F box and leucine-rich repeat protein 12) を結合したものであるが、われわれは自身で開発した E3 の基質探索的プロテオミクス技術 (DiPIUS 法) を用いて FBXL12 の基質分子を探索したところ、アルデヒド脱水素酵素 3 (ALDH3) が同定された。

マウスにおける FBXL12 の発現を調べたところ、胎仔期での発現が高く、特に胎盤の海綿状栄養膜層に強く発現していることが判明した。興味深いことに、FBXL12 の分子進化を調べると胎盤を有する哺乳類のみにその遺伝子が見つかり、胎盤を有しない単孔類や有袋類などの哺乳類や哺乳類以外の生物では、その遺伝子に相当するものは発見できなかった。生化学的解析によって FBXL12 タンパク質が ALDH3 に特異的に結合すること、ALDH3 のユビキチン化を媒介していること、その半減期を調節していること、等を明らかにした。

さらに FBXL12 のノックアウトマウスを作製したところ、そのマウスの多くは胎盤の形成異常 (海綿状栄養膜層がほぼ欠失している) によって胎生期に死亡したが、一部は生まれてくるものの生涯にわたって低体重などの発達異常が認められた (子宮内胎児発育遅延)。この FBXL12 ノックアウトマウスでは ALDH3 が分解されないため、その量が上昇していた。また栄養膜幹細胞を用いた研究においても FBXL12 の低下は ALDH3 の蓄積を引き起こし、その海綿状栄養膜細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。そこでわれわれはこれらの細胞に ALDH3 を強制的に過剰発現してみたところ、同じように海綿状栄養膜細胞への分化が抑制された。逆に FBXL12 の低下状態の細胞を ALDH3 の活性を抑制する薬剤 (Gossypol) で処理すると部分的に分化障害が解除されたことより、FBXL12 が ALDH3 を分解することによって胎盤における幹細胞から特定の系列細胞への分化を促進していることが示唆された。

一方、成体マウスにおいては FBXL12 は胸腺に強く発現している。そこでわれわれは成体における FBXL12 の機能を調べるために、胸腺のいずれの細胞群に FBXL12 タンパク質が発現しているかを検討したところ、CD4⁺CD8⁺細胞 (ダブルポジティブ細胞: DP) に強く発現していることを見出した。FBXL12 ノックアウトマウスでは DP において ALDH3 の蓄積が認められ、DP から CD4⁺CD8⁺または CD4⁺CD8⁺細胞 (シングルポジティブ細胞: SP) への分化が障害されていることが明らかとなった。この分化障害が果たして T 細胞の自律的な異常によるものか、それとも T 細胞非自律的な環境要因によるものかを区別するため、われわれは二つの方法で検討を加えた。まず骨髄移植実験を行うと、FBXL12 ノックアウトマウス由来の T 細胞は明らかに DP→SP への分化が障害されていた。しかしこの異常は骨髄移植後時間が経過するにつれて次第に軽減される傾向にあった。さらに胎仔胸腺組織培養法を用いて DP→SP への分化効率を検討したが、やはりその分化が障害されていた。これらの実験から、FBXL12 ノックアウトマウスにおける T 細胞分化障害は環境要因ではなく、T 細胞自律的な異常によるものと結論づけられた。

B. 成体神経幹細胞における p57 の役割の解明

哺乳類の脳の細胞は、成体になってからは二度と再生しないと長年考えられてきたが、近年、海馬と脳室下帯の少なくとも二つの領域には成体神経幹細胞が存在し、生涯にわたって神経細胞を新生し続けていることが明らかになった。成体神経幹細胞による神経新生は、既存の神経回路を再編成することで学習や記憶や脳の損傷の修復に貢献すると考えられている。このように成体神経幹細胞は成体の神経新生を担う重要な細胞であるが、成体神経幹細胞が発生の過程でどの細胞からどのような仕組みで作りだされるのかはこれまで未解明であった。

成体神経幹細胞はごく稀にしか分裂しないが、これは脳以外でもさまざまな組織の成体幹細胞に共通してみられる特徴である。一方で胎生期では神経幹細胞は盛んに分裂をする。これまで、胎生期において分裂を繰り返した神経幹細胞の一部が生後にランダムに選ばれて、稀にしか分裂しない成体神経幹細胞になると信じられてきたが、成体神経幹細胞は分裂の回数を重ねることによって枯渇してしまう可能性がある。そこでわれわれは、脳の神経幹細胞が過去に何回分裂したかを詳細に検討できるシステムを構築し、この通説を検証した。

その結果、胎生期の神経幹細胞の一部に分裂頻度を低く保った特別な神経幹細胞（起源細胞）群が存在し、その細胞群が成体神経幹細胞になることを見出した。この結果は、胎生期の脳の中では素早く分裂を重ねる神経幹細胞と分裂頻度の低い起源細胞が共存し、それぞれ「短期間での脳の発生」と「長期間の幹細胞維持」という二つの役割を別々に担当しているという、非常に合理的なシステムが採用されていること示している。

さらにわれわれは、成体神経幹細胞の起源細胞を作り出す分子メカニズムを解明するため、起源細胞とそれ以外の通常の胎生期の幹細胞を FACS によって単離し、遺伝子発現パターンを比較したところ、起源細胞では CDK インヒビター p57 タンパク質の発現が高いことを突き止めた。そこで脳特異的 p57 コンディショナルノックアウトマウスを作製し、その脳組織を詳細に観察したところ、この遺伝子改変マウスでは正常マウスと比較して脳の起源細胞と成体神経幹細胞の数が著しく減少していることが判明した。このことは、p57 タンパク質が起源細胞において単に細胞周期の進行を遅らせているだけではなく、起源細胞の形成や維持において必須の役割を果たしていることを示している。さらに胎生期のマウスの神経幹細胞に p57 タンパク質を過剰発現するだけで、成体神経幹細胞の特徴を備えた細胞群を強制的に作りだせることも明らかとなった。つまり、p57 は胎生期の幹細胞から成体神経幹細胞への転換を担う重要な分子であることが判明した。

業績目録

原著論文

1. 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., 290, 10368-10381.
2. 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.
Nature Neurosci., 18, 657-665.
 3. Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, M. Y., Tumes, D. J., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Tanaka, T., Nakayama, T. 2015.
Methylation of gata3 protein at arg-261 regulates transactivation of the il5 gene in T helper 2 cells.
J. Biol. Chem., 290, 13095-13103.
 4. Watanabe, K., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2015.
FBXO21 mediates the ubiquitylation and proteasomal degradation of EID1.
Genes Cells, 20, 667-674.
 5. Maehara, K., Harada, A., Sato, Y., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Kimura, H., Ohkawa, Y. 2015.
Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation.
Epigenet. Chromatin, 8, 35.
 6. Kojima, T., Yamada, T., Akaishi, R., Furuta, I., Saitoh, T., Nakabayashi, K., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Akira, S., Minakami, H. 2015.
Role of the Atg9a gene in intrauterine growth and survival of fetal mice.
Reprod. Biol., 15, 131-138.
 7. Tsukada, Y., Akiyama, T., Nakayama, K. I. 2015.
Maternal TET3 is dispensable for embryonic development but is required for neonatal growth.
Sci. Rep., 5, 15876.
 8. Tane, S., Okayama, H., Ikenishi, A., Amemiya, Y., Nakayama, K. I., Takeuchi, T. 2015.
Two inhibitory systems and CKIs regulate cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes after birth.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 466, 147-154.
 9. Matsunuma, R., Niida, H., Ohhata, T., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Shiotani, B., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Ogura, H., Shiya, N., Kitagawa, M. 2015.
UV damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4DDB2-mediated degradation to regulate cell proliferation.
Mol. Cell. Biol., 36, 394-406.
 10. Nishiyama, M., Nita, A., Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2015.
FBXL12-mediated degradation of ALDH3 is essential for trophoblast differentiation during placental development.
Stem Cells, 33, 3327-3340.
 11. Yanagida, A., Chikada, H., Ito, K., Umino, A., Kato-Itoh, M., Yamazaki, Y., Sato, H., Kobayashi, T., Yamaguchi,

- T., Nakayama, K. I., Nakauchi, H., Kamiya, A. 2015.
Liver maturation deficiency in p57(Kip2)^{-/-} mice occurs in a hepatocytic p57(Kip2) expression-independent manner.
Dev. Biol., 407, 331-343.
12. Inoue, D., Matsumoto, M., Nagase, R., Saika, M., Fujino, T., Nakayama, K. I., Kitamura, T. 2016.
Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels.
Exp. Hematol., 44, 172-176.e171.
 13. Tanaka, M., Shiota, M., Nakao, T., Uemura, R., Nishi, S., Ohkawa, Y., Matsumoto, M., Yamaguchi, M., Osada-Oka, M., Inagaki, A., Takahashi, K., Nakayama, K. I., Gi, M., Izumi, Y., Miura, K., Iwao, H. 2016.
Identification of low-abundance proteins in serum via the isolation of HSP72 complexes.
J. Proteomics, 136, 214-221.
 14. Duquesnes, N., Callot, C., Jeannot, P., Daburon, V., Nakayama, K. I., Manenti, S., Davy, A., Besson, A. 2016.
p57 knock-in mouse reveals CDK-independent contribution in the development of Beckwith-Wiedemann syndrome.
J. Pathol., in press.
 15. Otomo, K., Amengual, O., Fujieda, Y., Nakagawa, H., Kato, M., Oku, K., Horita, T., Yasuda, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., Koike, T., Atsumi, T. 2016.
Role of apolipoprotein B100 and oxidized low-density lipoprotein in the monocyte tissue factor induction mediated by anti-beta2 glycoprotein I antibodies.
Lupus, in press.
 16. Fujieda, Y., Amengual, O., Matsumoto, M., Kuroki, K., Takahashi, H., Kono, M., Kurita, T., Otomo, K., Kato, M., Oku, K., Bohgaki, T., Horita, T., Yasuda, S., Maenaka, K., Hatakeyama, S., Nakayama, K. I., Atsumi, T. 2016.
Ribophorin II is involved in the tissue factor expression mediated by phosphatidylserine-dependent antiprothrombin antibody on monocytes.
Rheumatology (Oxford), in press.
 17. Nita, A., Nishiyama, M., Muto, Y., Nakayama, K. I. 2016.
FBXL12 regulates T-cell differentiation in a cell-autonomous manner.
Genes Cells, in press.

総説

1. Yumimoto, K., Nakayama, K. I. 2015.
Fbxw7 suppresses cancer metastasis by inhibiting niche formation.
OncoImmunology, 4, e1022308.
2. 白根道子. 2015.
膜コンタクト部位によるエンドソーム輸送の制御機構.

細胞工学, 34, 59-64.

3. 弓本佳苗, 中山敬一. 2015.
ユビキチンリガーゼ Fbxw7 はがんニッチ形成を抑制する.
実験医学, 33, 1303-1306.
4. 吉岡進, 中山敬一. 2015.
次世代プロテオミクス技術がもたらす個別化医療の新展開.
検査と技術, 43, 1186-1190.
5. 川村敦生, 西山正章, 中山敬一. 2016.
自閉症スペクトラムの原因遺伝子 CHD8.
分子精神医学, in press.

学会発表

1. 中山敬一. (2015, 4/12).
全タンパク質の絶対定量情報に基づくがん代謝シフトの数理科学的解明. (招待講演)
第29回日本医学会総会 2015 関西, 京都.
2. 中山敬一. (2015, 4/24).
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. (教育講演)
第88回日本内分泌学会学術総会, 東京.
3. 中山敬一. (2015, 5/9).
がん幹細胞を撲滅する: 細胞周期研究から生まれた逆転の発想. (特別講演)
日本生化学会東北支部第81回例会・シンポジウム, 仙台.
4. Nakayama, K. (2015, 7/23).
Next-generation proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism. (招待講演)
第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 札幌.
5. Yumimoto, K., Akiyoshi, S., Ueo, H., Sagara, Y., Onoyama, I., Ueo, H., Ohno, S., Mori, M., Mimori, K., Nakayama, K. I. (2015, 7/24).
Fbxw7 inhibits cancer metastasis in a non-cell-autonomous manner.
第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 札幌.
6. 中山敬一. (2015, 9/11).
全タンパク質絶対定量がもたらす生命科学革命. (招待講演)
第58回日本神経化学学会大会, 大宮.
7. 中山敬一. (2015, 9/17).
次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明. (特別講演)
第40回医用マススペクトル学会年会, 浜松.
8. 中山敬一. (2015, 10/9).

がん幹細胞の細胞周期調節機構の解明と治療への応用.(シンポジウム)

第74回日本癌学会学術総会, 名古屋.

9. 中山敬一.(2015, 11/20).

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26回日本消化器癌発生学会総会, 米子.

10. 弓本佳苗, 秋吉清百合, 上尾裕紀, 小野山一郎, 上尾裕昭, 大野真司, 森正樹, 三森功士, 中山敬一.
(2015, 12/1).

非がん細胞のFbxw7はがんニッチ形成を抑制する.(ワークショップ)

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

11. 中井智和, 名田成之, 中津海洋一, 中山敬一, 岡田雅人.(2015, 12/1).

mTORC1 シグナルを制御する Ragulator の機能の分子基盤.

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

12. 武藤義治, 西山正章, 諸石寿朗, 中山敬一.(2015, 12/1).

肝臓におけるユビキチンリガーゼ FBXL5 欠損は鉄代謝異常と肝がんを生じる.

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

13. 西山正章, 仁田暁大, 弓本佳苗, 中山敬一.(2015, 12/1).

FBXL12 による ALDH3 の分解はトロホブラストの分化に必須である.(一般口演)

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

14. 川村敦生, 西山正章, 片山雄太, 中山敬一.(2015, 12/1).

クロマチンリモデリング因子 CHD8 はオリゴデンドロサイトの分化に必須である.(一般口演)

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

15. 仁田暁大, 西山正章, 中山敬一.(2015, 12/1).

ユビキチンリガーゼ FBXL12 による ALDH3 分解促進と胸腺細胞の分化制御に果たす役割の解析

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

16. 川田健太郎, 柚木克之, 幡野敦, 国田勝行, 藤井雅史, 大野聡, 富沢瑤子, 佐野貴規, 角田裕晶, 宇田新介, 久保田浩行, 鈴木穰, 松本雅記, 中山敬一, 黒田真也.(2015, 12/2).

インスリン刺激時における網羅的遺伝子発現調節ネットワークの再構築.

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

17. 富沢瑤子, 柚木克之, 宇田新介, 幡野敦, 松本雅記, 中山敬一, 黒田真也.(2015, 12/2).

リン酸化プロテオームによる EGF 刺激濃度・時間依存的なシグナル伝達応答の網羅的解析.

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

18. 比嘉綱己, 沖田康孝, 松本有樹修, 武石昭一郎, 中山敬一.(2015, 12/3).

p57 は静止状態の腸管幹細胞を制御することで腸管上皮の恒常性を維持する.

第38回日本分子生物学会年会, 神戸.

19. 松本雅記, 中山敬一.(2015, 12/3).

- 大規模定量プロテオミクスで挑むがん代謝の実体解明 (ワークショップ)
第38回日本分子生物学会年会, 神戸.
20. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一. (2015, 12/4).
mTORC1 の活性化はFOXK1 経路を介して炎症を誘導する. (ワークショップ)
第38回日本分子生物学会年会, 神戸.
21. 中山敬一. (2016, 1/15).
細胞周期から見たがん幹細胞の治療抵抗性のメカニズム. (招待講演)
日本がん分子標的治療学会第11回トランスレーショナルリサーチワークショップ, 東京.
22. Nakayama, K. (2016, 2/18).
Large-scale targeted proteomics unveils a global landscape of cancer metabolism.
The 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, Maui, USA.
23. 中山敬一. (2016, 3/3).
CREST シンポジウム「次世代プロテオミクスによるがん代謝シフトの全体像の解明」. (招待講演)
トランスオミクスによる生命システムの解明, 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。

2015 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）、松田花菜江（同）、寺田茉衣子（大学院医学系学府・博士 4 年）、三浦静（同・博士 3 年）、山本純平（同・博士 3 年）、合谷孟（同・博士 1 年）、後藤那奈子（同・修士 1 年）、辻野智史（同・修士 1 年）、従野雅義（医学部生命科学科・4 年）、海江田千晶（テクニカルスタッフ）、山本真由美（同）、本田結城（同）の総勢 16 名で研究を開始した。途中、高島康郎が特任助教となり、伊藤香奈（テクニカルスタッフ）が研究に加わった。また、後藤那奈子が休学して技能補佐員となり、関谷明香、山本真由美、伊藤香奈が退職した。

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、障害を受けた脾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 *Hnf4α* 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、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)。

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、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; Suzuki, *Curr Opin Gastroenterol*, 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)。また、

最近の研究では、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が明らかとなった（Takashima et al., *Hepatology*, in press）。

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. Takashima, Y., Terada, M., Udono, M., Miura, S., Yamamoto, J., Suzuki, A. 2016.
Suppression of let-7b and miR-125a/b maturation by Lin28b enables maintenance of stem cell properties in hepatoblasts.

Hepatology, in press.

総説等

1. 鈴木淳史. 2015
ダイレクトリプログラミングとは？
細胞工学別冊「ダイレクトリプログラミング」（企画・監修）
2. 関谷明香、鈴木淳史. 2015
マウス iHep 細胞の作製方法
細胞工学別冊「ダイレクトリプログラミング」
3. 堀澤健一、鈴木淳史. 2015
世界のダイレクトリプログラミング研究の動向
細胞工学別冊「ダイレクトリプログラミング」
4. Suzuki, A. 2015.
Evidence of cell-fate conversion from hepatocytes to cholangiocytes in the injured liver: *in vivo* genetic lineage-tracing approaches.
Curr Opin Gastroenterol 31, 247–251.
5. 鈴木淳史. 2015
皮膚細胞から肝細胞を直接誘導する技術
日本臨牀増刊号「再生医療」（日本臨牀社）
6. 鈴木淳史. 2015
iPS 細胞を経由しないダイレクトリプログラミング：線維芽細胞から肝細胞へ
腎と透析、Vol. 79, No. 6.
7. Horisawa, K. and Suzuki, A. 2015.
Cell-based regenerative therapy for liver disease.
Innovative Medicine: Basic Research and Development, Springer Japan (Tokyo), 327–339.

受賞

1. 三浦静（2015, 7/16）
第18回生医研リトリート2015、優秀ポスター賞

学会発表等

1. 鈴木淳史（2015, 4/24）
ダイレクトリプログラミングによる肝細胞の作製とその応用（招待講演）
第101回日本消化器病学会総会、仙台
2. 鈴木淳史（2015, 5/1）

- Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導（招待講演）
遺伝子・デリバリー研究会 第15回シンポジウム、京都
3. 鈴木淳史（2015, 5/22）
Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導（招待講演）
第51回日本肝臓学会総会、熊本
4. 鈴木淳史（2015, 7/1）
Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate（招待講演）
熊本大学リエゾンラボ研究会／リーディングプログラム：HIGO最先端研究セミナー、熊本
5. Suzuki, A. (2015, 8/22)
Generation of functional hepatocyte-like cells by direct reprogramming technology (Invited Speaker, Chairperson)
The Second International Meeting for Epithelial Tubulology, Hokkaido, Japan
6. 鈴木淳史（2015, 8/24）
Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導（招待講演）
北海道大学 獣医学研究談話会、北海道
7. Suzuki, A. (2015, 9/28)
A challenge to medical innovation from biological aspects (Keynote Address)
Tsukuba Global Science Week 2015, Tsukuba, Japan
8. Takashima, Y., Terada, M., Udono, M., Suzuki, A. (2015, 11/14)
Lin28b-mediated microRNA regulation in mouse hepatoblasts（一般口演）
The 25th Hot Spring Harbor International Symposium “Cutting Edge of Technical Innovations in Structural and Systems Biology”, Fukuoka, Japan
9. 鈴木淳史（2015, 11/16）
肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦（招待講演）
自治医科大学 大学院特別講義（セミナー）、栃木
10. 寺田茉衣子、関谷明香、鈴木淳史（2015, 12/1）
肝内胆管がん発症過程における肝細胞のNotchシグナル活性化機序（ポスター発表）
第38回日本分子生物学会年会、神戸
11. 鈴木淳史（2015, 12/3）
肝臓の疾患における細胞運命転換のメカニズム（招待講演、座長、WSオーガナイザー）
第38回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞運命変換」、神戸
12. 鈴木淳史（2016, 1/10）
細胞運命の直接転換 ～皮膚から肝臓をつくる～（招待講演）
生化若手の会 九州支部 冬のセミナー、福岡
13. 鈴木淳史（2016, 2/8）

細胞運命転換による肝内胆管がんの発症メカニズム（招待講演）

平成27年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、東京

14. Miura, S. and Suzuki, A. (2016, 3/15)

Overexpression of transcription factor Snail induces liver tumor formation (Poster)

Keystone Symposia “Stem Cells and Regeneration in the Digestive Organs”, Keystone, Colorado, USA

15. Suzuki, A. (2016, 3/17)

Stem cell systems in the liver (Invited Speaker)

Keystone Symposia “Stem Cells and Regeneration in the Digestive Organs”, Keystone, Colorado, USA