

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、学振特別研究員（RPD）1名、学術研究員5名（うち2名は特任助教称号付与）、大学院生12名（全て博士課程）、テクニカルスタッフ5名、共同研究員2名の体制で研究を進めている（2021年3月31日現在）。

人事異動について、2020年4月より白石大智と立石千瑛が大学院修士課程より博士課程へ進学した。2020年5月より高吉光（テクニカルスタッフパート）を採用した。

次いで退職者として、2020年4月末にテクニカルスタッフの新原彩が退職した。2021年3月末に仁田暁大学術研究員が熊本大学大学院生命科学研究部・助教として、清水秀幸学術研究員（特任助教）がハーバード大学医学部へ留学のため転出した。また2021年3月末に大学院生博士課程の木藤有紀（引き続き学術研究員として雇用）と中山省悟（民間へ就職）が卒業した。

A. リソソーム形成に関わる脂質輸送を制御する Protrudin/PDZD8 複合体の神経における機能解析

Protrudin はエンドソーム輸送の制御タンパク質で、神経軸索変性症の関連分子である。近年エンドソーム輸送が、ER と LyLE の間の膜接触部位(MCSs)というマイクロドメインで制御されていること、そしてその MCSs の破綻が軸索変性症の原因と関連することが示唆されていたが、ER-LE 間 MCSs の不全がどのように軸索変性に繋がるのか、

詳細な機構は不明であった。われわれは軸索変性症の発症機構の解明を目指してプロテオミクス解析により Protrudin 複合体を解析し、新たに PDZD8 を同定した。超解像顕微鏡によって PDZD8 の詳細な細胞内局在を調べたところ、ER-LyLE 間 MCSs に PDZD8 が検出された。そして Protrudin も PDZD8 も、ER と LyLE の繫留を促進する作用があることが示された。Liposome-FRET アッセイによって、PDZD8 がリン脂質やセラミドやコレステロールなど複数の脂質を抽出する活性を持つこと、そして SMP ドメインを含む領域がその責任領域であることを見出した。

エンドソーム成熟は、ER と LyLE 間の MCSs で、エンドソームの分裂と融合により進行することが示唆されており、また遺伝性痙性対麻痺の原因遺伝子の変異により ER と LyLE 間の MCSs に不全がおこり、その結果 LyLE の異常な肥大化が起こることが報告されていた。そこで神経細胞で Protrudin または PDZD8 のノックダウンを行ったところ、LyLE の肥大化が認められ、また SMP ドメインを欠損した PDZD8 を発現させても同様の表現型が認められた。よって PDZD8 による脂質輸送が、エンドソーム成熟に必要であることが示された。

また神経の極性や軸索変性症との関連について調べたところ、神経細胞において Protrudin や PDZD8 のノックダウンを行うと、極性異常が認められ、軸索変性の亢進が認められた。よって Protrudin-PDZD8 複合体は、神経細胞の極性形成に必須であり、また神経の健全性維持に働いていることが示された。

以上の結果より、Protrudin-PDZD8 複合体は、ER と LyLE の間を繫留し、その MCSs において ER から LyLE に脂質を輸送して正常なエンドソーム成熟を促進し、その結果、神経の恒常性維持に寄与することが判明した。

B. Fbxw7 の欠失における乳腺発達障害と乳がん発生のメカニズムの研究

乳腺細胞特異的に Fbxw7 を欠損したマウスの解析を行うと、Fbxw7 がタンパク質分解の標的とする種々のタンパク質の中で、Notch1 と p63 が異常蓄積していることが判明した。また実際に乳がんを自然発症し、発生した乳がんには従来トリプルネガティブと呼ばれていた Basal-like 型と呼ばれるものを多く認めた。次に Fbxw7 を欠損して発生する乳がんをより詳しく解析するため、Fbxw7 欠損マウスの乳がん組織からがん細胞を単離し、細胞株を樹立したところ、上皮系細胞様のものから間葉系細胞様のものまで、色々なタイプの細胞株が樹立された。いずれのがん細胞株もヌードマウスに腫瘍を形成することができ、上皮系がん細胞株からは腺がん様の組織像を呈する腫瘍、間葉系がん細胞株からは間葉系腫瘍の組織像を呈する腫瘍が得られた。この結果は、Fbxw7 という一つの遺伝子の欠損から発生した乳がん組織の中に、異なるタイプの腫瘍細胞が存在すること（腫瘍内多様性）を示している。腫瘍内における多様性は近年、がん治療において治療抵抗性の原因の一つとして注目されており、腫瘍内に様々な性質のがん細胞が存在することが、すべてのがん細胞を死滅させることを難しくしてい

る要因の一つと考えられている。

そこでわれわれは、Fbxw7 という一つの遺伝子欠損から発生する腫瘍内に、どのように異なるタイプの腫瘍細胞が発生するのかを明らかにするため、マウスから樹立した上皮系がん細胞株と間葉系がん細胞株に発現する遺伝子を RNA シークエンスで網羅的に解析したところ、Fbxw7 がタンパク質分解の標的とするタンパク質の中で、上皮系がん細胞株では Notch1 と p63 の下流遺伝子群、間葉系がん細胞株では Stat3 と Jun の下流遺伝子群が活性化していた。またどちらのタイプのがん細胞株においても、Nfkb1 の下流遺伝子群が活性化しており、NF- κ B シグナルの活性化が腫瘍内多様性の形成に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

業績目録

原著論文

1. Wakabayashi Y., Tamura Y., Kouzaki K., Kikuchi N., Hiranuma K., Menuki K., Tajima T., Yamanaka Y., Sakai A., Nakayama K. I., Kawamoto T., Kitagawa K., Nakazato K. (2020, Apr)
Acetaldehyde dehydrogenase 2 deficiency increases mitochondrial reactive oxygen species emission and induces mitochondrial protease Omi/HtrA2 in skeletal muscle.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 318:R677-r690.
2. Nakagawa T., Hattori S., Nobuta R., Kimura R., Nakagawa M., Matsumoto M., Nagasawa Y., Funayama R., Miyakawa T., Inada T., Osumi N., Nakayama K. I., Nakayama K. (2020, Apr)
The autism-related protein SETD5 controls neural cell proliferation through epigenetic regulation of rDNA expression.
iScience. 23:101030.
3. Kito Y., Matsumoto M., Hatano A., Takami T., Oshikawa K., Matsumoto A., Nakayama K. I. (2020, Apr)
Cell cycle-dependent localization of the proteasome to chromatin.
Sci Rep. 10:5801.
4. Kawamura A., Katayama Y., Nishiyama M., Shoji H., Tokuoka K., Ueta Y., Miyata M., Isa T., Miyakawa T., Hayashi-Takagi A., Nakayama K. I. (2020, May)
Oligodendrocyte dysfunction due to Chd8 mutation gives rise to behavioral deficits in mice.
Hum Mol Genet. 29:1274-1291.
5. Yamauchi Y., Nita A., Nishiyama M., Muto Y., Shimizu H., Nakatsumi H., Nakayama K. I. (2020, Jun)
Skp2 contributes to cell cycle progression in trophoblast stem cells and to placental development.
Genes Cells. 25:427-438.

6. Shirane M., Wada M., Morita K., Hayashi N., Kunimatsu R., Matsumoto Y., Matsuzaki F., Nakatsumi H., Ohta K., Tamura Y., Nakayama K. I. (2020, Sep)
Protrudin and PDZD8 contribute to neuronal integrity by promoting lipid extraction required for endosome maturation.
Nat Commun. 11:4576.
7. Tsukiyama T., Zou J., Kim J., Ogamino S., Shino Y., Masuda T., Merenda A., Matsumoto M., Fujioka Y., Hirose T., Terai S., Takahashi H., Ishitani T., Nakayama K. I., Ohba Y., Koo B. K., Hatakeyama S. (2020, Sep)
A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis.
Nat Commun. 11:4586.
8. Shirane M., Shoji H., Hashimoto Y., Katagiri H., Kobayashi S., Manabe T., Miyakawa T., Nakayama K. I. (2020, Nov)
Protrudin-deficient mice manifest depression-like behavior with abnormalities in activity, attention, and cued fear-conditioning.
Mol Brain. 13:146.
9. Kawamura A., Abe Y., Seki F., Katayama Y., Nishiyama M., Takata N., Tanaka K. F., Okano H., Nakayama K. I. (2020, Nov)
Chd8 mutation in oligodendrocytes alters microstructure and functional connectivity in the mouse brain.
Mol Brain. 13:160.
10. Onoyama I., Nakayama S., Shimizu H., Nakayama K. I. (2020, Dec)
Loss of Fbxw7 Impairs Development of and Induces Heterogeneous Tumor Formation in the Mouse Mammary Gland.
Cancer Res. 80:5515-5530.
11. Kokaji T., Hatano A., Ito Y., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K. I., Egami R., Terakawa A., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Ikeda K., Arita M., Matsumoto M., Nakayama K. I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2020, Dec)
Transomics analysis reveals allosteric and gene regulation axes for altered hepatic glucose-responsive metabolism in obesity.
Sci Signal. 13:eaaz1236.
12. Johmura Y., Yamanaka T., Omori S., Wang T. W., Sugiura Y., Matsumoto M., Suzuki N., Kumamoto S., Yamaguchi K., Hatakeyama S., Takami T., Yamaguchi R., Shimizu E., Ikeda K., Okahashi N., Mikawa R., Suematsu M., Arita M., Sugimoto M., Nakayama K. I., Furukawa Y., Imoto S., Nakanishi M. (2021, Jan)
Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders.

- Science.** 371:265-270.
13. Nita A., Muto Y., Katayama Y., Matsumoto A., Nishiyama M., Nakayama K. I. (2021, Feb)
The autism-related protein CHD8 contributes to the stemness and differentiation of mouse hematopoietic stem cells.
Cell Rep. 34:108688.
 14. Shimizu H., Nakayama K. I. (2021, Feb)
A universal molecular prognostic score for gastrointestinal tumors.
NPJ Genom Med. 6:6.
 15. Egami R., Kokaji T., Hatano A., Yugi K., Eto M., Morita K., Ohno S., Fujii M., Hironaka K.-I., Uematsu S., Terakawa A., Bai Y., Pan Y., Tsuchiya T., Ozaki H., Inoue H., Uda S., Kubota H., Suzuki Y., Matsumoto M., Nakayama K. I., Hirayama A., Soga T., Kuroda S. (2021, Feb)
Trans-omic analysis reveals obesity-associated dysregulation of inter-organ metabolic cycles between the liver and skeletal muscle.
iScience. 24:102217.
 16. Kawamura A., Katayama Y., Kakegawa W., Ino D., Nishiyama M., Yuzaki M., Nakayama K. I. (2021)
The autism-associated protein CHD8 is required for cerebellar development and motor function.
Cell Rep. *in press.*

総説

1. Masuda T., Tsuruda Y., Matsumoto Y., Uchida H., Nakayama K. I., Mimori K. (2020, Apr)
Drug repositioning in cancer: The current situation in Japan.
Cancer Sci. 111:1039-1046.
2. Yumimoto K., Yamauchi Y., Nakayama K. I. (2020, May)
F-box proteins and cancer.
Cancers. 12:1249-1276.
3. Shimizu H., Nakayama K. I. (2020, May)
Artificial intelligence in oncology.
Cancer Sci. 111:1452-1460.
4. Yumimoto K., Nakayama K. I. (2020, Dec)
Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor.
Semin Cancer Biol. 67:1-15.
5. Kodama M., Nakayama K. I. (2020, Dec)
A second Warburg-like effect in cancer metabolism: The metabolic shift of glutamine-derived nitrogen: A shift in glutamine-derived nitrogen metabolism from glutaminolysis to de novo nucleotide biosynthesis contributes to malignant evolution of cancer.

学会発表

1. 中山 敬一. (2020, 9/1)
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. (基調講演)
第 9 回生命医薬情報学連合大会, オンライン.
2. 中山 敬一. (2020, 10/1)
がん幹細胞における細胞周期制御：がん撲滅のための治療標的としての期待. (コアシンポジウム)
第 79 回日本癌学会学術総会, 広島.
3. 中山 敬一. (2020, 10/3)
グルタミンからの窒素代謝の変化はがんの悪性進化に必須である：” 第二のワールブルグ効果” の発見. (シンポジウム)
第 79 回日本癌学会学術総会, 広島.

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。

2020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）、三浦静（特任助教）、鶴殿美弥子（学術研究員）、稲田浩気（大学院医学系学府・博士）、河野雄紀（同・博士）、後藤那奈子（同・博士）、村山僚（同・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）、池田奈美佳（同・修士）、伊藤万佑（同・修士）、唐澤臯月（同・修士）、鈴木陵雅（医学部生命科学科・学部生）、海江田千晶（テクニカルスタッフ）、本田結城（同）、太齊真理子（同）の総勢20名で研究を開始した。その後、2020年10月29日より河原真代（医学部生命科学科・学部生）が研究に参加した。鶴殿美弥子は、2020年10月1日より九州大学大学院農学研究院・細胞制御工学分野へ異動した。鈴木陵雅は、生命科学科を卒業後、2021年4月1日より九州大学大学院医学系学府・修士課程（当研究室所属）に進学することが決定した。稲田浩気は、博士号を取得後、2021年4月1日より熊本大学大学院生命科学研究部・生体機能病態学分野消化器内科学講座の医員に就任することが内定した。池田奈美佳と伊藤万佑は、修士号を取得後、2021年4月1日よりそれぞれ産業医科大学病院と帝人株式会社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)。

D. 新しい肝発がんモデルの発見とメカニズムの解明

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がもたらす代償性肥大によるものだが、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。これまでの研究では、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である 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)。そこで次に、肝細胞で Snail が過剰に発現し続けると肝臓にどのような影響が生じるのかを明らかにするため、任意の時間で肝臓や肝細胞特異的に Snail を過剰発現できるマウスを作製した。その結果、当該マウスは著しい脂肪肝と肝肥大を呈し、100%の確率で肝がんを発症して死に至ることが判明した。また、そのメカニズムの解析を行った結果、Snail は肝細胞間の密着結合 (タイトジャンクション) を構成する Cldn3 や occludin などの遺伝子発現を抑制するとともに、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現も抑制することで、肝細胞間のタイトジャンクションによって形成される毛細胆管構造を破壊し、異常な胆汁酸の血中放出を促すことが判明した。その結果、当該マウスは黄疸を呈し、胆汁酸による肝障害が続くことで脂肪肝や肝がんを発症すると考えられた (Miura and Suzuki, *Am. J. Pathol.*, 2020)。このように、我々は、肝再生の研究を行いながら肝疾患の発症機序にも着目することで、肝再生不全から生じる脂肪肝や肝がんの発症に関する研究を進めている (Tan et al., *Gastroenterology*, 2019)。

業績目録

原著論文

1. Miura S., Suzuki A. (2020, Jun)
Induction of steatohepatitis and liver tumorigenesis by enforced *Snail* expression in hepatocytes.
Am J Pathol. 190:1271-1283.
2. Horisawa K., Uono M.*, Ueno K.*, Ohkawa Y., Nagasaki M., Sekiya S., Suzuki A. (2020, Aug)
(* Co-second author)
The dynamics of transcriptional activation by hepatic reprogramming factors.
Mol Cell. 79:660-676.
3. Inada H.*, Uono M.*, Matsuda-Ito K., Horisawa K., Ohkawa Y., Miura S., Goya T., Yamamoto J., Nagasaki M., Ueno K., Saitou D., Suyama M., Maehara Y., Kumamaru W., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. (2020, Oct) (* Co-first author)
Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells.

Nat Commun. 11:5292.

総説

1. Horisawa K., Suzuki A. (2020, Apr)
Direct cell-fate conversion of somatic cells: Toward regenerative medicine and industries.
Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 96:131-158.
2. 鈴木 淳史 (監修). (2020, 8/10)
ダイレクトリプログラミング研究の現状と未来展望 (序論).
ダイレクトリプログラミング: 再生医療の新展開, エヌ・ティー・エス.
3. 鈴木 淳史. (2020, 8/10)
ダイレクトリプログラミングによる肝細胞の作製.
ダイレクトリプログラミング: 再生医療の新展開, エヌ・ティー・エス.
4. 三浦 静, 鈴木 淳史. (2020, 8/10)
ダイレクトリプログラミングによる腸幹/前駆細胞の作製.
ダイレクトリプログラミング: 再生医療の新展開, エヌ・ティー・エス.
5. 堀澤 健一, 鈴木 淳史. (2020, 8/10)
ダイレクトリプログラミングを用いたがん細胞制御と腫瘍抑制.
ダイレクトリプログラミング: 再生医療の新展開, エヌ・ティー・エス.

著書

1. Miura S., Suzuki A. (2020, July)
Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to acquire the identity of fetal intestine-derived progenitor cells.
Methods Mol Biol. 2171: 231-236, (Methods in Molecular Biology; Springer Protocols; “Intestinal Stem Cells”), Humana Press Inc.

受賞

1. 鈴木 淳史. (2021, 3/11)
2021年度日本再生医療学会賞 (基礎部門).

学会発表等

1. 鈴木 淳史. (2020, 5/16)
ダイレクトリプログラミングによる機能性肝細胞の作出. (招待講演).
日本薬剤学会第35年会, オンライン (紙面開催).
2. 鈴木 淳史. (2020, 5/18)

- ダイレクトリプログラミングによる機能性肝細胞の作出. (招待講演).
第19回日本再生医療学会総会シンポジウム「ダイレクトリプログラミングの進展と新しい再生医療技術開発」, オンライン.
3. 鈴木 淳史. (2020, 5/18)
ダイレクトリプログラミングによる腸上皮幹/前駆細胞の作出. (招待講演).
第19回日本再生医療学会総会シンポジウム「消化器領域の再生医学研究」, オンライン.
 4. 鈴木 淳史. (2020, 10/5)
Generation of functional hepatocytes by direct lineage reprogramming. (Invited Speaker).
第63回日本糖尿病学会シンポジウム「肝細胞の生物学 Up to Date」, オンライン.
 5. 鈴木 淳史. (2020, 11/17)
ダイレクトリプログラミングによる細胞創生と医療応用. (招待講演).
京都大学・田畑研究室セミナー, オンライン.
 6. 鈴木 淳史. (2020, 12/4)
Generation of expandable and bipotential human hepatic progenitor cells by direct lineage reprogramming. (Invited Speaker).
第43回日本分子生物学会年会ワークショップ「Cell Fate Conversion by innovative RNA modulation」, オンライン.
 7. 鈴木 淳史. (2021, 1/7)
ダイレクトリプログラミングによる細胞創生と医療応用. (招待講演).
再生・遺伝子治療Web会議, オンライン.
 8. 堀澤 健一, 鈴木 淳史. (2021, 1/19)
肝細胞へのダイレクトリプログラミングにおける転写因子機能の解析. (一般口演).
第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会, オンライン.
 9. 鈴木 淳史. (2021, 1/22)
Generation of expandable and bipotential human hepatic progenitor cells by direct lineage reprogramming. (Invited Speaker).
The 5th Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine “The Future of Trans-Omics in the Age of COVID-19”, Online.
 10. Miura S., Horisawa K., Suzuki A. (2021, 1/28)
Generation of mouse and human intestinal progenitor cells using direct reprogramming technology. (Invited Speaker).
Exchange Program Seminar between France and Japan, Frontiers of stem cell and organoid technology, From Basic to Bedside, Online.
 11. 鈴木 淳史. (2021, 2/5)
ダイレクトリプログラミングによる細胞創生と医療応用. (特別講演).

第26回関東ハートセミナー，オンライン．

12. 鈴木 淳史． (2021, 3/11)

実用性の高い肝細胞リプログラミング技術の開発．(受賞者講演)．

第20回日本再生医療学会総会，オンライン．

13. 堀澤 健一，鈴木 淳史． (2021, 3/31)

肝細胞誘導転写因子のダイナミクス解析．(ポスター発表)．

第14回日本エピジェネティクス研究会年会，オンライン．

炎症制御学分野

Division of Inflammation and Proteostasis

教授：池田 史代

Professor : Fumiyo Ikeda, Ph.D., D.D.S.

当分野では、炎症の制御機構を解明することを目的としている。そのために、翻訳後修飾の一つであるユビキチン化やオートファジーに着目し、生化学的手法から遺伝子改変マウスまでを含めた、多岐にわたるアプローチを使って解析を進めている。

当分野には、令和2年7月に根津が、令和3年2月に河野が、新たに技術補佐員として着任した。両者は、学内の春期および秋季の研究補助者雇用支援の助成（奥村）により雇用した。

本年度、新たに獲得した競争的外部資金としては、成人病の病因・病態の解明に関する研究助成金（日本応用酵素協会）（柳谷）が挙げられる。これに加えて、昨年度から継続する池田の科研費（帰国発展支援）を主な予算として研究を進行した。

令和2年度の主な研究成果を以下に述べる。それ以外にも、Penninger ラボ（オーストリア）との共同研究（Kogler et al., Cancer Res.）や、Dagdas ラボ（オーストリア）との共同研究（Stephani et al., Elife）が挙げられる。また、池田が Licchesi, Laman, Balanos-Gracia とユビキチンに関する特別号の編集委員を務めたこと（Licchesi et al., Front. Physiol.）や、3報の依頼総説を公表したことも本年度の成果の一部である。

A. 非定型である直鎖型ユビキチン鎖を生成するユビキチンリガーゼ複合体の活性制御機構の解明

本プロジェクトは、直鎖型ユビキチン鎖を制御する唯一のユビキチンリガーゼ複合体として知られる LUBAC の構成因子の制御メカニズムについての研究である。当分野では、これまでに LUBAC が炎症を制御していることを明らかにしてきたが、LUBAC 自身の制御についてはまだよく分かっていない。本研究では、博士課程の学生 Fennell が中心となり、LUBAC 構成因子のうち酵素活性中心をもつ HOIP 自身の特定の部位におけるユビキチン化が炎症反応制御において重要であることを明らかにした。生化学的、細胞学的手法、および CRISPR-Cas9 によるゲノム編集法を用いて作製した HOIP 点変異ノックインマウスなどを駆使して、HOIP がユビキチン化される複数のサイトの中でも、RBR というサイト特異的なユビキチン化が炎症制御に重要であることを明らかにした。この研究成果は EMBO J に発表しプレスリリースも行った（Fennell LM et al., EMBO J. 2020 Nov 20: e103303）。

B. 予測されたユビキチンリガーゼ部位と直鎖型ユビキチン鎖の特異的認識部位を持つ HOIL-1L 分子による炎症制御機構の解明

LUBAC の構成因子である HOIL-1L は、ヒト自己免疫疾患患者における遺伝子変異も見つかっており、その炎症や免疫反応の制御機構を明らかにすることは重要である。HOIL-1L にはリガーゼ部位 RBR が存在するが、直鎖型ユビキチン鎖生成において酵素活性中心を持たない。よって、HOIL-1L は偽リガーゼだと信じられてきたが、最近 Kellsall et al. により、HOIL-1L がリガーゼ活性依存的に、新規エステル結合型のユビキチン化を担うことが明らかにされた。我々は、さらに、HOIL-1L 依存性のエステル結合によるユビキチン化が、すでに形成されたユビキチンの鎖を追加して修飾することを明らかにした。また、ネガティブ染色電子顕微鏡技術 (Negative Stain Electron Microscopy), Crosslinking 質量分析法, および Mass photometry 法により、これまで不明であった LUBAC のストイキオメトリについて解析を行った。これらについては、博士課程の学生 Carvajal が中心となってプロジェクトを進行し、現在投稿中 (in revision) (Carvajal et al., BioRxiv) である。HOIL-1L のリガーゼ活性の生体内における役割は不明であることから、現在、HOIL-1L リガーゼ不活型変異体を発現するノックインマウスを用いて (マウスラインは樹立済), 初代培養系, およびマウスにおける生理学的機能の解析を奥村が中心となり進めている。

さらに、HOIL-1L には直鎖型のユビキチン鎖を特異的に認識する NZF 部位が存在する。この部位は、炎症反応細胞内シグナルに重要であることが知られているが、その詳しい生物学的効果や制御機構については不明である。よって、我々は HOIL-1L-NZF の直鎖型ユビキチン鎖と結合できない変異体を発現するノックインマウスを CRISPR-Cas9 技術により作成し、その生体内における役割を解析した。その結果、驚いたことに、マウスにおける HOIL-1L-NZF の変異の挿入により、LPS やサイトカイン TNF 誘導性ショック反応が明確に抑制されることを観察した。メカニズムとしては、HOIL-1L-NZF の変異体は TNF 受容体にうまくリクルートされないことが原因となり下流シグナルである NF- κ B 活性が抑制されると考えられる。この研究は博士課程学生である Gomez-Diaz が中心となり進めており、現在投稿準備中である。本研究成果について、池田が第 43 回日本分子生物学会年会および、第 15 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウムにおいて、口演した。

C. 抗アポトーシス分子 XIAP のオートファジー制御における役割とその制御機構の解明

ユビキチンリガーゼであり、抗アポトーシス分子である XIAP は、クローン病などの自己免疫疾患において遺伝子変異が見つかっており、ヒトにおける免疫、炎症制御に役割を果たすことが示唆されている。われわれは、以前行ったオートファジー誘導因

子を同定するためのスクリーニングによって、XIAP を同定したこと、またその既知の機能が、炎症や細胞死といったわれわれの研究の着眼点と重なったことから、XIAP がどのようにオートファジーを制御しているのか、その分子学的制御機構を明らかにすることを目的で研究を進めている。生化学的解析により確認した酵素活性抑制型の XIAP 変異体を発現するノックインマウスについては作成済みであり、これらのマウス由来の細胞やマウスにおけるゼノファジー（細菌感染に対するオートファジー）について、解析を進行中である。本研究成果の一部について、池田が第 13 回オートファジー研究会にて指定講演を行った。

D. オルガネラ量の恒常性を司るシステムの理解

細胞内のオルガネラの存在量は、その生合成と分解によって制御されている。オルガネラがダメージを受けると、オートファジーによって分解されることが知られている。一方で、オルガネラの基礎量は動物種に関わらず、細胞種によって決まっている。これは、細胞種によって決まったオルガネラ量を恒常的に保存する機構、オルガネラ量恒常性維持機構が備わっていることを示唆しているが、その全貌は理解されていない。我々は、オートファジーによって、狙ったオルガネラを減少できる細胞株を樹立して、任意のオルガネラを減少させた場合に引き起こされる細胞応答を解析している。そのなかで、ミトコンドリアを減少させた場合に、翻訳制御や細胞周期の停止が引き起こされることを見出している。現在はこれらの細胞応答がミトコンドリア量の恒常性に果たす役割を解析しているところである。本研究成果の一部について、柳谷が口頭発表を行った(第 43 回日本分子生物学会年会ワークショップ)。

業績目録

原著論文

1. Kogler M., Tortola L., Negri G.L., Leopoldi A., El-Naggar A.M., Mereiter S., Gomez Diaz C., Nitsch R., Tortora D., Kavirayani A.M., Gapp B.V., Rao S., Uribealgo I., Hoffmann D., Cikes D., Novatchkova M., Williams D.A., Trent J.M., Ikeda F., Daugaard M., Hagelkruys A., Sorensen P.H., Penninger J.M. (2020, May)
HACE1 Prevents Lung Carcinogenesis via Inhibition of RAC-family GTPases.
Cancer Res. 80(14):3009-3022.
2. Stephani M., Picchianti L., Gajic A., Beveridge R., Skarwan E., Sanchez de Medina Hernandez V., Mohseni A., Clavel M., Zeng Y., Naumann C., Matuszkiewicz M., Turco E., Loeffke C., Li B., Dürnberger G., Schutzbier M., Chen H.T., Abdrakhmanov A., Savova A., Chia K.S., Djamei A.,

Schaffner I., Abel S., Jiang L., Mechtler K., Ikeda F., Martens S., Clausen T., Dagdas Y. (2020, Aug)
A cross-kingdom conserved ER-phagy receptor maintains endoplasmic reticulum homeostasis during stress.

Elife. 9:e58396.

3. Fennell L.M., Gomez Diaz C., Deszcz L., Kavirayani A., Hoffmann D., Yanagitani K., Schleiffer A., Mechtler K., Hagelkruys A., Penninger J., Ikeda F. (2020, Dec)
Site-specific ubiquitination of the E3 ligase HOIP regulates apoptosis and immune signaling.
EMBO J. 39(24):e103303.

総説

1. Ikeda F. (2020, Sep)
Mitophagy is induced by short ubiquitin chains on mitochondria.
J Cell Biol. 219(9):e202008031.
2. Ikeda F. (2020, Nov)
Diverse ubiquitin codes in the regulation of inflammatory signaling.
Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 96(9):431-439.
3. Licchesi J.D.F., Laman H., Ikeda F. and Bolanos-Garcia V.M. (2020, Nov)
Editorial: E3 Ubiquitin Ligases: From Structure to Physiology.
Front. Physiol. 11:621053.
4. Ikeda F. (2020, Dec)
Ubiquitin conjugating enzymes in the regulation of the autophagy-dependent degradation pathway.
Matrix Biol. S0945-053X(20):30112-8.
5. Klionsky D.J., et al. (2021, Jan)
Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.
Autophagy. 17(1):1-382.

学会発表

1. 池田 史代. (2020, 11/6) 口頭発表
Regulation of inflammatory responses by the ubiquitin system.
第15回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム.
2. 池田 史代. (2020, 12/2-4) 口頭発表
Regulatory mechanisms of NF- κ B activation signal by the specific recognition of linear ubiquitin chains.
第43回日本分子生物学会年会.
3. 柳谷 耕太. (2020, 12/2-4) 口頭発表

An Artificial approach to investigate homeostatic systems for organelle abundance.

第 43 回日本分子生物学会年会.

4. 池田 史代. (2020, 12/21) 口頭発表
バルクオートファジーのユビキチンシステムによる制御.
第 13 回オートファジー研究会.