

研究報告書

「肝細胞分化関連遺伝子の導入による皮膚細胞からの肝細胞作製技術」

研究期間：平成 20 年 6 月～平成 24 年 3 月

研究者：鈴木 淳史

1. 研究のねらい

通常、肝細胞は多くの転写因子の働きによって発生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが、稀に、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肝細胞へと直接変化させることが可能になるかもしれない。そこで本さきがけ研究では、肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、線維芽細胞から肝細胞を直接作り出すことを試みた。

2. 研究成果

2-1. 肝細胞の運命決定因子の探索とマウス胎仔線維芽細胞からの iHep 細胞作製

肝細胞の運命決定因子をスクリーニングするために、肝臓の発生過程において肝細胞の分化に関連する 12 個の転写因子に着目した。レトロウイルスを用いてこれら 12 因子を同時にマウス胎仔線維芽細胞(MEF)に導入すると、肝細胞マーカーであるアルブミンや α -フェトプロテイン、及び、上皮細胞マーカーである E-cadherin の発現が強く誘導された。そこで次に、12 因子のうち必須の因子を抽出するために、12 因子から 1 因子を除いたウイルスをそれぞれ用意して解析を行った。その結果、Hnf4a を除いたときのみ、肝細胞マーカーの発現誘導が強く阻害されることが判明した。そこで、Hnf4a とその他の 1 因子、計 2 因子を MEF に導入したところ、Hnf4a & Foxa1、Hnf4a & Foxa2、Hnf4a & Foxa3 の 3 つの組み合わせにおいてのみ肝細胞マーカーや上皮細胞マーカーの発現が強く誘導された。さらに、これらの遺伝子セットを導入した MEF をコラーゲンや肝細胞増殖因子と共に培養すると、およそ 1 ヶ月後には MEF が上皮様形態をもった細胞に変化することが明らかとなった。我々は、これらの上皮様細胞を iHep 細胞(induced hepatocyte-like cells)と名付けた。

2-2. iHep 細胞の性状解析

MEF から作製された iHep 細胞は、そのほとんどが E-cadherin、アルブミンともに陽性であった。また、iHep 細胞はグリコーゲンの蓄積や低比重リポタンパク質(LDL)の取り込み、アルブミンの分泌、アンモニア代謝と尿素合成、シトクロム P450 活性、インドシアニングリーンの取り込みと排出、脂質代謝、薬物代謝などの肝細胞に特有の機能を有しており、肝細胞と同様に細胞間をタイトジャンクションで連結して毛細胆管を形成していた。さらに、iHep 細胞は肝機能を発揮する一連の酵素群をコードする遺伝子も発現していた。以上から、iHep 細胞は肝細胞のもつ形態的・機能的特徴を有することが明らかとなった。

2-3. iHep 細胞による肝臓組織の再構築と肝機能補助

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に対し、正常マウスから取得した肝細胞を移植すると、肝細胞は損傷を受けた肝臓組織を機能的に再構築し、マウスの命を救うことができる。そこで本研究では、iHep 細胞を高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ移植し、iHep 細胞が肝細胞として機能するか否かを調べた。その結果、iHep 細胞は損傷を受けた高チロシン血症モデルマウスの肝臓組織を再構築し、肝機能を補助することで、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。

2-4. iHep 細胞を用いた遺伝子治療/組織再生モデル

次に、iHep 細胞を用いた治療モデルの可能性を検証すべく、高チロシン血症モデルマウスの MEF から作製した iHep 細胞に対し、欠損遺伝子を導入して遺伝的な肝機能疾患の治療を行った。その後、これらの細胞を高チロシン血症モデルマウスの肝臓に移植したところ、移植した細胞は正常細胞と同じように損傷を受けた肝臓組織を再構築可能なことが判明した。この結果は、遺伝的な肝疾患をもつ患者自身の線維芽細胞を用いて iHep 細胞を作製し、生体外における遺伝子治療を経てから肝臓へ移植することで、肝臓を機能的に再生させて治療することが可能な新しい治療モデルを提示しているといえる。

2-5. 成体マウス線維芽細胞からの iHep 細胞作製

以上に述べたように、我々は MEF から iHep 細胞を作製することに成功したことから、続いて、成体マウスの皮膚から抽出した線維芽細胞(MDF)からも iHep 細胞の作製を試みた。その結果、MEF と同様に、MDF に対しても Hnf4a と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれかひとつ) を導入することで、肝細胞のもつ形態的・機能的特徴を有した iHep 細胞を作製することができた。また、これら MDF 由来 iHep 細胞は、高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ移植後に損傷を受けた肝臓組織を再構築することも可能であった。

2-6. 結語

本研究では、たった2つ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、線維芽細胞から肝細胞を直接作製することに成功した(図 1)。

これら 2 つの転写因子は肝細胞の運命を決定する「マスター制御因子」と考えられ、肝細胞分化を促す複雑な転写因子ネットワークの根幹に位置するものと考えられる。

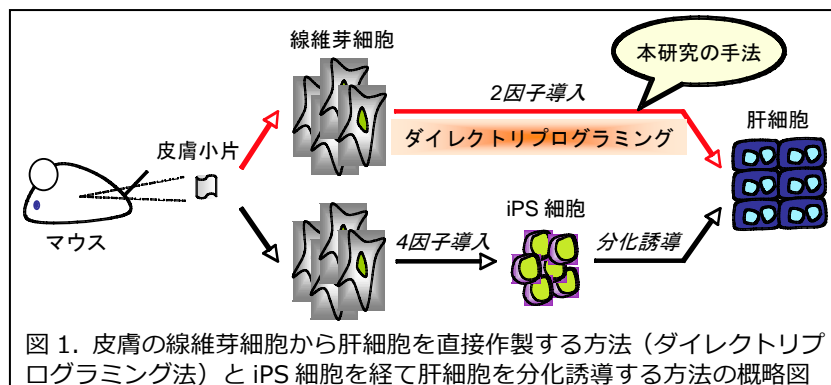


図 1. 皮膚の線維芽細胞から肝細胞を直接作製する方法(ダイレクトリプログラミング法)とiPS細胞を経て肝細胞を分化誘導する方法の概略図

2 つの転写因子が細胞内でどのような変化を引き起こし、細胞の運命転換を誘導して肝細胞を作り出すのか、そのメカニズムは非常に興味深い。一方、本研究はヒト iHep 細胞の作製に向けた基盤科学となることは言うまでもなく、ヒトで iHep 細胞が作製されれば、肝疾患に対する細胞移植や人工肝臓への応用が期待できる。また、創薬研究において、薬の効果や毒性を

評価するためのツールとして iHep 細胞が利用される可能性も十分に考えられる。

3, 今後の展開

これまでのマウス iHep 細胞研究を基盤とし、「ヒト iHep 細胞の作製」、「iHep 細胞作製メカニズムの解明」、「iHep 作製技術の効率化・簡素化」を目指す。

4, 自己評価

本さきがけ研究では、目的であった「肝細胞の運命決定を担う特定因子の同定」と「それら特定因子を用いた線維芽細胞からの肝細胞作製」を達成することができた。研究総括をはじめ、多くの方から助言をいただき、そして時には反発して議論しながら研究を進めてきた経験は私にとってかけがえのないものであり、今後の研究を進める上で大きな自信となった。今後も、この成功に慢心せず、iHep 細胞の臨床応用に向けてさらに研究を進めていきたい。

5, 研究総括の見解

iHep を構想し、実現にまで至った事は極めて高く評価できる。研究の進め方、ラボ内での管理、他研究者とのやり取り、論文の纏め方、など十分に独立研究者としての能力がある事を示したと評価する。今後、メカニズムの解明、ヒト iHep の作製などに是非成功し、この分野の第一人者へと進む事を期待する。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390–393, 2011.
2. Sekiya S. and Suzuki A. Glycogen synthase kinase 3 β -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 11175–11180, 2011.
3. Onoyama I., Suzuki A., Matsumoto A., Tomita K., Katagiri H., Oike Y., Nakayama K., Nakayama K.I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest* 121, 342–354, 2011. ✓

(2)特許出願

研究期間累積件数:2 件

発明者: 鈴木 淳史
発明の名称: 誘導肝細胞
出願人: 九州大学
出願日: 2011/2/16

発明者: 鈴木 淳史
発明の名称: 肝臓細胞を作製する方法
出願人: 九州大学

出 願 日: 2010/2/16

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

<主要な学会発表(すべて招待講演)>

1. 鈴木淳史: 細胞運命の人為的制御 ~皮膚から肝臓をつくる~: *先端医療・バイオニックM EMS 共創フォーラム*、福岡、2011年12月5日
2. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *2011 International Forum for Stem Cell Translational Research*, Shanghai, China, October 23, 2011.
3. 鈴木淳史: 肝臓の再生機構と発癌: *第70回日本癌学会学術総会・腫瘍別シンポジウム*、名古屋、2011年10月3日
4. 鈴木淳史: 肝幹細胞のプロスペクティブな解析: 生体外の解析から生体内の解析へ: *日本遺伝学会第83回大会*、京都、2011年9月22日
5. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *The 7th FAOPS Congress*, Taipei, Taiwan, September 11-14, 2011.
6. Suzuki A.: Induction of functional hepatocytes from fibroblasts by defined factors. *43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists jointly sponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (JSDB-APDBN) meeting*, Kyoto, Japan, June 21, 2010.

<受賞>

1. 2009年4月: 平成21年度文部科学大臣表彰若手科学者賞
2. 2009年3月: 第8回日本再生医療学会・若手研究奨励賞
3. 2008年6月: 第15回肝細胞研究会・会長賞