

令和 5 年 4 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19916

研究課題名（和文）遺伝性希少肝臓疾患の治療に向けたダイレクトリプログラミング技術の応用

研究課題名（英文）Application of direct reprogramming technology for the treatment of hereditary rare liver diseases

研究代表者

鈴木 淳史（Suzuki, Atsushi）

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30415195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは、ダイレクトリプログラミングの手法を用いて、高い増殖能と連続的な肝細胞・胆管上皮細胞産生能を有する「誘導肝前駆細胞（iHepPC）」をヒトの血管内皮細胞から作製することに成功した。本研究では、遺伝性希少肝臓疾患のモデルマウスへヒトiHepPC由来肝細胞を移植した結果、肝疾患の機能的回復には大量の細胞が必要なわけではなく、一部の細胞が生着するだけで高い治療効果が発揮されることが判明した。また、ヒトiHepPCの作製技術を応用することで、ダイレクトリプログラミングにより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「誘導肝がん細胞（iLCC）」を作製することにも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある細胞を直接別の細胞へ変化させる「ダイレクトリプログラミング」は、将来の革新的医療を担う新しい技術の1つとして注目されている。本研究によって得られた知見や技術を基盤としてさらに研究を進展させることができれば、ヒトiHepPCから分化する大量の肝細胞を用いた自己細胞移植が可能となり、遺伝性希少肝臓疾患の再生医療が期待できる。また、ヒトiHepPCの作製技術を応用することで作製されたヒトiLCCについては、今後、肝がん患者や健常者から作製されるヒトiLCCが、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貢献することが期待される。

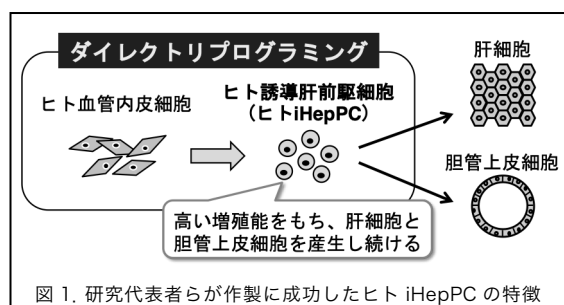
研究成果の概要（英文）：In our previous study, we have succeeded in generating human induced hepatic progenitor cells (hiHepPCs), which have high proliferative potential and continuous hepatocyte and cholangiocyte production capacity, from human vascular endothelial cells by using direct reprogramming techniques. In this study, transplantation of hiHepPC-derived hepatocytes into mouse models of hereditary rare liver diseases revealed that functional recovery from liver diseases does not require a large number of cells, but only the engraftment of a portion of cells to show a high therapeutic effect. In addition, by applying the technology for producing hiHepPCs, we succeeded in producing human induced liver cancer-forming cells (hiLCCs) with the ability to form malignant liver tumors, from human normal vascular endothelial cells.

研究分野：発生学、再生医学、腫瘍学

キーワード：細胞・組織 発生・分化 移植・再生医療 再生医学 遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ある細胞種に対し、それとは別の細胞種の運命を制御する複数の転写因子を導入することで、人工多能性幹細胞を介することなく、直接別の細胞種へその運命を転換させる「ダイレクトリプログラミング」が多くの細胞種で可能になってきた。実際に、研究代表者らは、マウスの皮膚から抽出した線維芽細胞に 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つ「誘導肝細胞 (induced hepatocyte-like cell: iHepC)」へ変化させることに成功している (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011)。さらに最近では、マウス iHepC の誘導技術を発展させることで、高い増殖能と連続的な肝細胞・胆管上皮細胞産生能を有する、より臨床への応用性が高い「誘導肝前駆細胞 (induced hepatic progenitor cell: iHepPC)」をヒトの臍帯や末梢血中の血管内皮細胞から作製することにも成功した (Inada et al., *Nat Commun*, 2020) (図 1)。ダイレクトリプログラミングには将来の医療に変革をもたらす可能性があることから、医療応用へ向けた研究が世界中で精力的に進められている。研究代表者らが作製したヒト iHepPC は、培養下で染色体異常が生じない安定した増殖や凍結保存が可能である。また、凝集塊形成により高機能性の成熟肝細胞を産生し、それらを急性肝不全モデルマウスへ移植すると肝臓由来の肝細胞と同等の救命効果を示すことから、医療への応用性が非常に高い細胞といえる。このように、ヒト iHepPC から大量に産生される肝細胞や胆管上皮細胞は、それらをドナー細胞とする細胞移植により、肝移植を必要とする様々な肝臓疾患への医療応用が強く期待される細胞である。しかし、将来の医療現場での利用を考えた場合、まず初めに肝臓に疾患をもつ動物モデルを用いた治療効果の検証が必要となる。



## 2. 研究の目的

肝移植が必要になるケースが少ない遺伝性希少肝臓疾患に着目し、それらの疾患を表現型にもつ免疫不全マウスを作製してヒト iHepPC から分化誘導した成熟肝細胞の移植効果を検証することで、ヒト iHepPC 由来肝細胞を用いた遺伝性希少肝臓疾患の治療における Proof of Concept を目指す。

## 3. 研究の方法

高チロシン血症等の遺伝性希少肝臓疾患のモデルマウスを作製し、それらマウスの肝臓へヒト iHepPC 由来肝細胞を移植することで、その生着率や肝組織再生率、肝障害改善効果、マウスの生存率などを指標に細胞移植の治療効果を検証する。移植するヒト iHepPC 由来肝細胞については、まず市販のヒト血管内皮細胞にレトロウイルスで誘導因子を導入してヒト iHepPC を作製し、次に作製されたヒト iHepPC の凝集塊形成による肝細胞分化誘導を経て調達する。マウス肝臓内でヒト肝細胞の存在を定量的に検出する方法やヒト肝細胞特異的な機能を検出する方法など、本研究に必要な実験系は随時導入・確立して使用する。また、ダイレクトリプログラミングの手法を用いた肝臓疾患研究のさらなる発展に向け、ヒトの肝がんを形成する細胞を直接誘導可能な因子のスクリーニングを実施し、得られた細胞の機能解析を行う。

## 4. 研究成果

遺伝性希少肝臓疾患について、それらの原因遺伝子を欠損させた免疫不全マウスを作製し、ヒト iHepPC 由来肝細胞の移植実験を行った。その結果、ドナー細胞の生着と増殖を認めたが、疾患治療効果が高い割にその生着率はあまり高いとはいえなかった。そこで次に、肝臓へ移植したヒト iHepPC 由来肝細胞の数を経時的に解析するため、マウス肝臓内でヒト iHepPC 由来肝細胞の存在を定量的に検出可能な方法を確立し、解析を行った。その結果、移植細胞の肝臓残存率は移植後速やかに低下することが判明し、少量のドナー細胞だけが肝臓に生着することが判明した (論文投稿準備中)。以上の結果は、肝疾患の機能的回復には大量のヒト iHepPC 由来肝細胞が必要なわけではなく、一部の細胞が生着するだけで高い治療効果が発揮されることを示唆している。一方、ヒト iHepPC の作製技術を応用することで、ダイレクトリプログラミングにより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「誘導肝がん細胞 (induced liver cancer-forming cell: iLCC)」を作製することにも成功した。実験では、まず、ヒト血管内皮細胞から iLCC 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

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 iLCC 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 iLCC 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., *Hepatol. Commun.*, 2022)。誘導されたヒト 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、ヒト 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、ヒト iLCC を免疫不全マウスの肝臓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 (図 2)。以上から、今後肝がん患者や健常者から作製されるヒト 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。

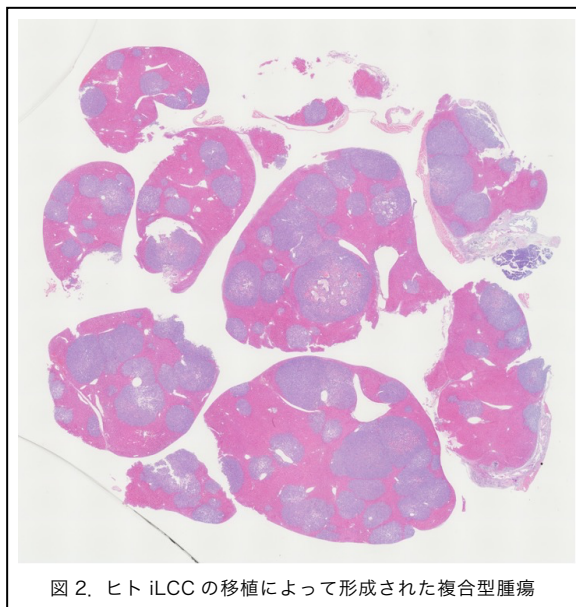


図 2. ヒト iLCC の移植によって形成された複合型腫瘍

<引用文献>

1. Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390–393, 2011.
2. Inada H., Udono 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. Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells. *Nat Commun* 11, 5292, 2020.
3. Goya T., Horisawa K., Udono M., Ohkawa Y., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. Direct conversion of human endothelial cells into liver cancer-forming cells using nonintegrative episomal vectors. *Hepatol Commun* 6, 1725–1740, 2022.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawamata M., Suzuki H.I., Kimura R., Suzuki A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41551-023-01011-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Horisawa-Takada Y., Kodera C., Takemoto K., Sakashita A., Horisawa K., Maeda R., Shimada R., Usuki S., Fujimura S., Tani N., Matsuura K., Akiyama T., Suzuki A., Niwa H., Tachibana M., Ohba T., Katabuchi H., Namekawa S.H., Araki K., Ishiguro K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3184
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23378-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kozuki S., Sakurai S., Suzuki A., Yamamoto T., Toyoshima F.	4. 巻 27
2. 論文標題 Delineation of biliary epithelial cell dynamics in maternal liver during pregnancy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 192, 201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goya T., Horisawa K., Udono M., Ohkawa Y., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Direct conversion of human endothelial cells into liver cancer-forming cells using nonintegrative episomal vectors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatology Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/hep4.1911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 淳史	4. 巻 72
2. 論文標題 肝臓における幹細胞システムの特異性とリプログラミング (総説)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 119, 124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201326	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 鈴木 淳史	4. 巻 21
2. 論文標題 肝臓と腸におけるダイレクトリプログラミング誘導法の開発 (総説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 24, 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 河野 雄紀, 三浦 静, 川又 理樹, 堀澤 健一, 吉丸 耕一郎, 松浦 俊治, 田尻 達郎, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川又 理樹, 鈴木 洋, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第7回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堀澤 健一, 三浦 静, 荒木 啓充, 三浦 史仁, 伊藤 隆司, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 静, 辻野 智史, 堀澤 健一, 井上 和也, 唐澤 皐月, 鈴木 淳史
2. 発表標題 培養下における肝細胞から腸幹/前駆細胞への運命転換
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐澤 皐月, 川又 理樹, 三浦 静, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第29回肝細胞研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kawamata M., Suzuki H.I., Suzuki A.
2. 発表標題 Rational optimization of versatile genome editing applicability by tuning CRISPR-Cas9 activity
3. 学会等名 The 31th Hot Spring Harbor International Symposium “Expanding views on Systems biology and Immunology” (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川又 理樹, 鈴木 洋, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 陵雅, 堀澤 健一, 三浦 静, 大川 恭行, 鈴木 淳史
2. 発表標題 誘導腸前駆細胞におけるリプログラミング機構の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 静, 堀澤 健一, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 唐澤 皐月, 川又 理樹, 三浦 静, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 合谷 孟, 堀澤 健一, 鶴殿 美弥子, 小川 佳宏, 鈴木 淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによるヒト肝癌モデルの作成
3. 学会等名 第118回日本内科学会総会・講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki A.
2. 発表標題 Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages
3. 学会等名 The 18th Stem Cell Research Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川又 理樹, 鈴木 洋, 鈴木 淳史
2. 発表標題 活性調節型CRISPR-Cas9による安全で効率的な遺伝子治療技術の開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田 浩気, 鶴殿 美弥子, 松田 花菜江, 堀澤 健一, 小川 佳宏, 田中 靖人, 鈴木 淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミング法によるヒト血管内皮細胞から肝前駆細胞への分化誘導
3. 学会等名 第28回肝細胞研究会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 鈴木 淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の作製
3. 学会等名 第62回日本先天代謝異常学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inada H., Udono M., Matsuda K., Horisawa K., Ogawa Y., Tanaka Y., Suzuki A.
2. 発表標題 Generation of cystic fibrosis disease model by using direct reprogramming technology
3. 学会等名 The 72nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD)（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川又 理樹，鈴木 洋，鈴木 淳史
2. 発表標題 Development of a novel rainbow/barcode dual labeling system using CRISPR-Cas9
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会ワークショップ「Investigating cellular diversity by multi-scale single cell analyses」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀澤 健一，鈴木 淳史
2. 発表標題 肝細胞ダイレクトリプログラミング過程における転写因子のダイナミクス解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki A.
2. 発表標題 Direct reprogramming technology for basic research and clinical applications
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Meeting on Liver Development, Metabolism, Disease & Cancer (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kawamata M., Suzuki Hl., Suzuki A.
2. 発表標題 Development of CRISPR-based rainbow/barcode dual labeling system
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium Chromatin Potential in Development and Differentiation “New Technologies Meet Biology” (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Suzuki A.
2. 発表標題 Direct reprogramming technology for basic research and clinical applications
3. 学会等名 The 30th Hot Spring Harbor International Symposium Chromatin Potential in Development and Differentiation “New Technologies Meet Biology” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 雄紀, 鈴木 淳史
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河原 真代, 三浦 静, 鈴木 陵雅, 鈴木 淳史
2. 発表標題 ヒト誘導肝前駆細胞と他細胞の共培養による凝集体形成
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三浦 静, 辻野 智史, 堀澤 健一, 井上 和也, 唐澤 皇月, 鈴木 淳史
2. 発表標題 培養下における肝細胞から腸幹/前駆細胞への運命転換
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 淳史
2. 発表標題 ダイレクトリプログラミング技術を用いた基礎研究の推進と医療展開
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会シンポジウム「多能性幹細胞からの組織構築」(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ <a href="https://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html">https://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	堀澤 健一  (Horisawa Kenichi)		
研究協力者	川又 理樹  (Kawamata Masaki)		
研究協力者	三浦 静  (Miura Shizuka)		
研究協力者	大川 恭行  (Ohkawa Yasuyuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関