

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670146

研究課題名(和文)細胞リプログラミングにおける細胞増殖の意義に関する研究

研究課題名(英文)Analysis of the role of proliferation in cellular reprogramming

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維芽細胞から肝細胞様(iHep)細胞へのリプログラミングと細胞増殖の関係を一層明らかにすべく、リプログラミング過程における細胞増殖の様子を動画解析するとともに、遺伝子・タンパク質の経時的発現解析を行った。その結果、線維芽細胞にiHep細胞誘導因子を導入すると、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。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。

研究成果の概要(英文)：To examine the relationship between direct reprogramming of fibroblasts into induced hepatocyte-like (iHep) cells and cellular proliferation, we sequentially analyzed the early stage of fibroblast conversion into iHep cells using live-cell imaging, immunofluorescence staining, and quantitative polymerase chain reaction analyses. Our data demonstrated that the conversion into iHep cells began within 48 hours after introduction of the transgenes into fibroblasts, and the number of iHep cells increased gradually as the culture progressed. The rapid cell-fate conversion of fibroblasts into iHep cells and stable expansion of iHep cells will be useful in the future cell transplantation therapy and screening of drugs for patients with liver diseases.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学、再生医学

キーワード：細胞 リプログラミング 増殖 再生医療

### 1. 研究開始当初の背景

細胞のリプログラミング技術は再生医療や創薬研究への応用が期待されているが、その機序については未だ不明な点が多い。その中でも特に、細胞のリプログラミングと増殖の関係については多くの点が未解明なままである。細胞のリプログラミングと増殖の関係が明らかになれば、リプログラミングの原理に関する新たな知見を得られるだけでなく、医療応用に向けたリプログラミング技術の効率化や精度の向上などが期待される。

### 2. 研究の目的

我々が開発した肝細胞様 (iHep) 細胞の誘導技術をモデルとして使用し、線維芽細胞から肝細胞へのリプログラミングにおける細胞増殖の意義を明らかにする。

### 3. 研究の方法

我々はマウスの線維芽細胞に Hnf4 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、線維芽細胞を直接肝細胞の性質を有する iHep 細胞へと変化させることに成功した。これを踏まえ、本研究では、線維芽細胞から iHep 細胞へのリプログラミング過程にある個々の細胞について、細胞増殖のパターンを動画解析するとともに、遺伝子・タンパク質の経時的発現解析を行い、細胞のリプログラミングと増殖の関係を明らかにする。

### 4. 研究成果

iHep 細胞誘導因子を導入後、2週間にわたって細胞の動態を動画解析する方法を確立し、実際に線維芽細胞から iHep 細胞へのリプログラミング過程にある個々の細胞について細胞増殖のパターンを動画で捉えることに成功した。驚くことに、iHep 細胞誘導因子を導入後速やかに細胞の形態変化が誘導され、細胞増殖依存的にリプログラミングが進行する様子が観察された。また、線維芽細胞から iHep 細胞へのリプログラミング過程を遺伝子・タンパク質発現を指標にしてより詳細に解析した結果、線維芽細胞に iHep 細胞誘導因子を導入後、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。以上の結果は、実際の医療応用を考えた場合、iHep 細胞を短期間のうちに準備し、治療や検査に利用できる可能性を示唆している。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Suzuki A. 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,

2015. doi: 10.1097/MOG.000000000000172. (査読有)

2. Takashima Y., Terada M., Kawabata M., Suzuki A. Dynamic three-dimensional morphogenesis of intrahepatic bile ducts in mouse liver development. *Hepatology* 61, 1003-1011, 2015. doi: 10.1002/hep.27436. (査読有)

3. Suzuki A. Liver regeneration: a unique and flexible reaction depending on the type of injury. *Genes Cells* 20, 77-84, 2015. doi: 10.1111/gtc.12200. (査読有)

4. Miura S. and Suzuki A. Rapid cell-fate conversion of mouse fibroblasts into hepatocyte-like cells. *Inflamm Regen* 34, 211-216, 2014. doi: <http://doi.org/10.2492/inflammregen.34.211>. (査読有)

5. Suzuki A. Direct reprogramming. *Inflamm Regen* 34, 209-210, 2014. doi: <http://doi.org/10.2492/inflammregen.34.209>. (査読無)

6. Miura S. and Suzuki A. Acquisition of lipid metabolic capability in hepatocyte-like cells directly induced from mouse fibroblasts. *Front Cell Dev Biol* 2, 1-6, 2014. doi: 10.3389/fcell.2014.00043. (査読有)

7. Sekiya S. and Suzuki A. Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am J Pathol* 184, 1468-1478, 2014. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.005. (査読有)

8. Suzuki A. Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate. *Curr Opin Genet Dev* 23, 579-584, 2013. (査読有)

9. Takashima Y. and Suzuki A. Regulation of organogenesis and stem cell properties by T-box transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 70, 3929-3945, 2013. (査読有)

10. Hikichi T., Matoba R., Ikeda T., Watanabe A., Yamamoto T., Yoshitake S., Tamura-Nakano M., Kimura T., Kamon M., Shimura M., Kawakami K., Okuda A., Okochi H., Inoue T., Suzuki A., Masui S. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 6412-6417, 2013. doi: 10.1073/pnas.1220200110. (査読有)

[学会発表](計 27 件)

1. 山本純平、鈴木淳史：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：第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015年3月20日
2. 三浦静、鈴木淳史：iHep細胞研究から見出された肝細胞分化の新規制御機構：第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015年3月20日
3. 鈴木淳史：Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導：第14回日本再生医療学会総会、横浜、2015年3月20日
4. 鈴木淳史：Direct reprogrammingによる肝細胞の直接誘導：第2回細胞凝集研究会、福岡、2014年12月6日
5. 鈴木淳史：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：第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月16日
6. Suzuki A.：Genetic cell lineage tracing in liver regeneration and cancer: 2014 *International Symposium of Materials on Regenerative Medicine (2014 ISOMRM)*, Tao-Yuan, Taiwan, August 27, 2014.
7. 鈴木淳史：「ダイレクトリプログラミング」の現状と展望：第35回日本炎症・再生医学会、沖縄、2014年7月2日
8. 高島康郎、寺田茉衣子、鈴木淳史：マイクロRNAによる肝芽細胞の増殖制御：第21回肝細胞研究会、東京、2014年6月28日
9. 山本純平、関谷明香、鈴木淳史：凝集塊形成による iHep細胞の成熟化：第21回肝

細胞研究会、東京、2014年6月28日

10. 三浦静、関谷明香、鈴木淳史：iHep細胞研究から見出された肝細胞分化の新規制御機構：第21回肝細胞研究会、東京、2014年6月28日
11. 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：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：第21回肝細胞研究会、東京、2014年6月27日
12. 鈴木淳史：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：第66回日本細胞生物学会大会、奈良、2014年6月13日
13. 高島康郎、寺田茉衣子、鈴木淳史：The Lin28/let-7 axis regulates proliferation of hepatoblasts：第12回幹細胞シンポジウム、福岡、2014年5月31日
14. 寺田茉衣子、関谷明香、鈴木淳史：Generation of a mouse model capable of visualizing pluripotent cells in Nanog-expressing cells：第12回幹細胞シンポジウム、福岡、2014年5月30日
15. 鈴木淳史：Regulation of stem cell properties in liver development：第47回日本発生生物学会大会、名古屋、2014年5月28日
16. 鈴木淳史：「ダイレクトリプログラミング」、その現状と課題：第13回日本再生医療学会総会、京都、2014年3月5日
17. 三浦静、鈴木淳史：iHep細胞を用いた脂質代謝機能の解析：第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月5日
18. 鵜殿美弥子、鈴木淳史：線維芽細胞以外の細胞を用いた肝細胞への直接転換：第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月5日
19. 鈴木淳史：マウス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：第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月4日

20. Suzuki A.: Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate: *The 7th International Conference on Cell Therapy*, Seoul, South Korea, October 24, 2013.
21. Suzuki A.: Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate: *CSHA/ISSCR Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine*, Suzhou, China, October 17, 2013.
22. Miura S., Suzuki A.: Analysis of hepatic lipid metabolism using iHep cells: *The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells (JSRH)*, Osaka, Japan, September 27, 2013.
23. Takashima Y., Kawabata M., Suzuki A.: Analysis of intrahepatic bile ducts using a high-resolution 3D imaging system: *The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells (JSRH)*, Osaka, Japan, September 27, 2013.
24. 鈴木淳史: Prospective isolation and *in vivo* genetic lineage tracing of hepatic oval cells: *第86回日本生化学会大会*, 横浜, 2013年9月11日
25. 鈴木淳史: 特定因子による皮膚細胞から肝細胞への直接転換: *第34回日本炎症・再生医学会*, 京都, 2013年7月2日
26. Suzuki A.: Direct reprogramming of fibroblasts to hepatocyte-like cells: *23rd Conference of the Asia Pacific Association for the study of the Liver (APASL Liver Week 2013)*, Suntec City, Singapore, June 8, 2013.
27. 鈴木淳史: マウス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: *第7回日本エピジェネティクス研究会*, 奈良, 2013年5月30日

〔図書〕(計8件)

1. 鈴木淳史: 「ダイレクトリプログラミングによる肝細胞の作製」, *肝胆臓*, Vol. 70, No. 3, 2015年
2. 鈴木淳史: 「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, 2015年
3. 鈴木淳史: 「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, 2014年
4. 鈴木淳史: 「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, 2014年
5. 鈴木淳史: 「細胞のロバストな振る舞い: 再生, 発がん, リプログラミング」, *細胞工芸学*, Vol. 33, No. 1, 2014年
6. 鈴木淳史: 「細胞運命の直接転換 ダイレクトリプログラミング」, *The Frontiers in Life Sciences* シリーズ「幹細胞研究と再生医療」, 南山堂, 2013年
7. 鈴木淳史 (企画): 「肝細胞分化の人為的な誘導と疾患による破綻」, *実験医学「細胞の運命決定とリプログラミング」*, Vol. 31, No. 13, 2013年
8. 鈴木淳史 (企画): 「細胞運命制御機構の解明から医療応用へ(概論)」, *実験医学「細胞の運命決定とリプログラミング」*, Vol. 31, No. 13, 2013年

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html>

6. 研究組織

(1) 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