

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860192

研究課題名(和文) 間葉-上皮転換における転写因子の役割とその機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Mesenchymal - Epithelial Transition (MET) during iHep cells induction

研究代表者

関谷 明香 (Sekiya, Sayaka)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：10645633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、間葉系細胞である線維芽細胞にHnf4 とFoxa (Foxa1 or Foxa2 or Foxa3) という肝細胞の分化に関連する転写因子を導入し、上皮細胞であるiHep細胞へと変化させることに成功した。iHep細胞作成過程には間葉-上皮転換(MET)というダイナミックな変化が見られる。本研究はMETと転写因子の関わりを明らかにすることを目的として行った。

本研究では、まずMETの誘導とその時間的変化を明らかにし、次に、遺伝子・タンパク質発現解析を行い、iHep細胞誘導因子の標的候補を複数同定することに成功した。今後の解析によりiHep細胞誘導にともなうMETの実態解明が進むと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that overexpression of Hnf4a/Foxa(Foxa1 or Foxa2 or Foxa3) in mouse embryonic fibroblasts(MEFs) enables the production of induced hepatocyte-like cells(iHeps). During this process, Mesenchymal - Epithelial Transition(MET) is vital and contribute to the direct conversion of MEFs. In this study, we sought to clarify the molecular mechanism of MET that result from iHep factors (Hnf4a and Foxa genes) introduction. Our study revealed MET occur the initial stage of MEFs conversion. Moreover, using microarrays, we picked up the target genes of iHep factors as candidates. These findings will contribute to reveal the MET process after introducing the iHep factors into MEFs.

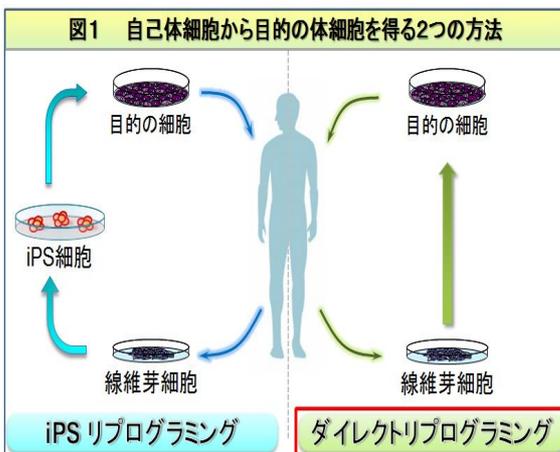
研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞 リプログラミング MET 転写因子 肝臓

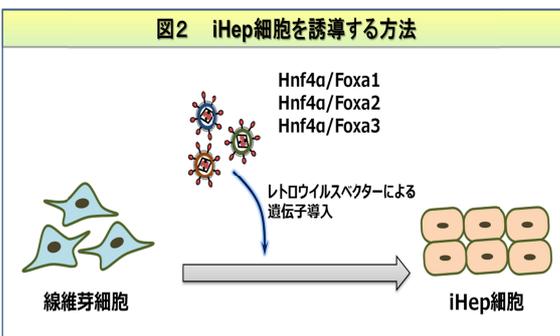
1. 研究開始当初の背景

皮膚などの比較的採取しやすい体細胞を別の組織の細胞に変換する技術の開発は、再生医療の実現に向けた重要なテーマのひとつである。

細胞の系譜を転換することを直接転換 (Direct conversion) と呼び、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell : iPS 細胞) の誘導方法の発見 (Takahashi et al., *Cell*, 2006) を契機に急速に研究が進み、体細胞から目的の細胞を作り出す2つの技術が確立されつつある。1つは、体細胞から iPS 細胞を誘導し、そこから目的の細胞を分化誘導する方法、もう1つは、分化の状態を直接異なる分化状態に転換するダイレクトリプログラミングという方法である (図1)。



我々はダイレクトリプログラミングという方法で、マウス皮膚線維芽細胞を肝細胞の性質を有する細胞 (induced hepatocyte-like cells : iHep 細胞) へと直接変化させることに成功した (参考文献 : Sekiya et al., *Nature*, 2011) (図2)。



続いて、この技術をヒト細胞へと応用することを念頭に、iHep 細胞誘導因子の導入細胞内における振る舞いを明らかにすることを目指した。

ヒト iHep 細胞の作製技術が確立され

ることで、肝疾患に対する細胞移植や人工肝臓の新たな細胞源を提供することができ、iHep 細胞が臨床の現場で利用されることが期待される。具体的には、移植が必要な重篤肝疾患の患者に対し、患者自身もしくはドナーの皮膚小片から作製した iHep 細胞を移植医療や人工肝臓の作製に利用することができる。また、創薬研究において、現在は高価な市販のヒト肝細胞を用いて薬効や毒性が評価されているが、ヒト iHep 細胞を代替品として利用することができれば、薬の研究開発費を抑えることが可能であり、薬の低価格化が実現する可能性も十分に考えられる。また、肝疾患をもつ患者自身の皮膚小片から作製した iHep 細胞を薬剤試験に用いることで、副作用の少ない理想的な治療薬を選択することが可能となり、苦痛や負担を軽減することができる。

(参考文献)

Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475(7356):390-393, 2011.

2. 研究の目的

間葉系細胞である線維芽細胞は Hepatocyte nuclear factor (Hnf) 4α と Forkhead box (Fox) a (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、上皮細胞である iHep 細胞へと変化する。

マウス線維芽細胞に iHep 細胞誘導因子を導入すると、初期過程において間葉-上皮転換 (Mesenchymal Epithelial Transition ; MET) の誘導と上皮-間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition ; EMT) の抑制というダイナミックな変化が起こることは明らかである。しかし、MET/EMT の誘導/抑制機序は未だ不明である。

そこで本研究は、マウス iHep 細胞の作成過程をツールとして、線維芽細胞の MET/EMT と iHep 細胞誘導因子の関係を明らかとすることを目的とした。

本研究から得られる成果は、肝細胞のダイレクトリプログラミング法をヒトに応用し、肝疾患に対する革新的な治療法の開発や新しい創薬技術の開発につながるだけでなく、MET/EMT 研究においても新しい発見を提供することが期待される。EMT の獲得が運動性の亢進や細胞外基質の蓄積をもたらすことから、がん細

胞の浸潤や臓器の線維症との関連が精力的に研究されており、複数の分子が重要な役割を果たすことが報告されている。一方、固形がんの進展・転移の成立における MET に関する詳細なシグナルについてはまだ報告されていない。本研究により、MET/EMT のメカニズムが明らかになれば、がん細胞の浸潤・転移の機構に新たな知見を与えることとなり、新しい抑がん治療にも貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

マウス線維芽細胞を用いて、様々な遺伝子導入条件で iHep 細胞作成を試み、作製過程の細胞を継時的に形態や遺伝子発現・タンパク質発現など、分子生物学的手法によって詳細に解析した。また、iHep 細胞誘導因子の標的となる遺伝子を探索するため、作製した細胞に関してマイクロアレイを用いて、発現遺伝子の網羅的解析を行った。特に、MET/EMT 関連遺伝子群の発現変化に着目し、iHep 細胞誘導因子の標的候補遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

マウス線維芽細胞に iHep 細胞誘導因子を導入し、継時的に性状解析やタンパク質発現解析を行った結果、MET の誘導とその時間的变化が明らかとなった。また、作製した iHep 細胞の網羅的遺伝子解析を行った結果、MET 関連因子群の発現上昇、並びに EMT 関連因子群の発現低下が明らかとなった。そして、これらの遺伝子から iHep 細胞誘導因子の標的候補を複数同定することに成功した。今後、iHep 細胞誘導因子の標的候補についてさらに解析を進めることで、iHep 細胞誘導にともなう MET/EMT の誘導/抑制の実態解明が進むと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. 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(査読あり)

doi: 10.1016/j.ajpath.2014.01.005

[学会発表](計6件)

寺田 茉衣子、関谷 明香、鈴木 淳史：
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：第 38 回日本分子生物学会、神戸、2015 年 12 月 1 日

寺田 茉衣子、関谷 明香、鈴木 淳史：
Generation of a mouse model of capable of visualizing pluripotent cells in Nanog-expressing cells : The 24th Hot Spring Harbor International Symposium、福岡、2014 年 11 月 8 日

山本 純平、関谷 明香、三浦 静、鈴木 淳史：
Maturation of iHep cells in cell aggregation culture : The 24th Hot Spring Harbor International Symposium、福岡、2014 年 11 月 8 日

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(6/27-28)

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

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 31 日

[図書](計1件)

1. 関谷明香、鈴木 淳史
：「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」

[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/lab/orgreg/top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

関谷明香 (SEKIYA Sayaka)

九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：10645633

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし