

令和 7 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2023～2024

課題番号：23K17199

研究課題名（和文）ダイレクトリプログラミングを利用したヒト食道上皮細胞の作製

研究課題名（英文）Generation of human esophageal epithelial cells using direct reprogramming

研究代表者

三浦 静 (Miura, Shizuka)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80822494

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ダイレクトリプログラミングを用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞から誘導食道上皮細胞を作製することを目的として研究を行った。これまでに、ダイレクトリプログラミングを利用して様々な細胞が作製されているが、食道上皮細胞を作製したという報告はない。本研究では、食道上皮細胞の誘導に必要な遺伝子を同定した。同定した遺伝子を用いて作製した誘導食道上皮細胞は、生体由来の食道上皮細胞とよく似た形態的特徴を有しており、食道上皮細胞マーカーの発現も観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いるダイレクトリプログラミングの利点としては、多能性幹細胞から分化誘導する場合と異なり、未分化な状態を経ずに目的の細胞へと直接運命転換できるので、未分化な細胞の残存による腫瘍形成のリスクがないという点が挙げられる。また、iPS細胞から食道上皮細胞を作製するためには複雑な工程を経なければならないが、ダイレクトリプログラミングの場合は、短期間で簡単に機能的な細胞を誘導することができる。そのため、本研究を基盤として自己細胞から誘導食道上皮細胞を作製することで生体由来の食道上皮細胞の代替となる新たな細胞として利用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to generate induced esophageal epithelial cells from human umbilical vein endothelial cells using direct programming. Although a variety of cells have been produced using direct programming, there have been no reports of the production of esophageal epithelial cells. In this study, we identified genes required for induction of esophageal epithelial cells. The induced esophageal epithelial cells produced using the identified genes had morphological characteristics similar to those of the in vivo derived esophageal epithelial cells, and expression of esophageal epithelial cell markers was also observed.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 再生医療 食道

## 1. 研究開始当初の背景

### 早期食道がん治療時の食道狭窄の発症

食道は喉と胃をつなぐ臓器であり、食物を胃へと運搬する重要な役割を担う。しかし、喫煙や飲酒、近年のライフスタイルの変化に伴い、食道がんを発症する患者が増加している。食道がんの治療としては、内視鏡治療、手術治療、放射線治療、薬物療法などがあり、がんのステージによって選択される。その中でも早期食道がんにおいては内視鏡による切除が推奨されている。しかしながら、切除後に切除部が再生する過程で癒着化し、食べ物が通りにくくなる「食道狭窄」を発症することが問題となっている。現在の食道狭窄に対する治療法としては、バルーンを用いて狭窄部を拡張する方法がよく用いられるが、狭窄が起こるたびにバルーンで物理的に狭窄部を拡張する必要があり、患者の身体的負担が大きい。そのため、食道狭窄予防法の確立が望まれる。

### 口腔粘膜由来細胞の移植と人工的な食道上皮細胞の作製

食道狭窄は、がん切除時の上皮細胞の欠損による炎症によって引き起こされることから、上皮細胞を他の細胞で補完することにより、狭窄を予防できるのではないかと考えられる。そうした中、最近では、口腔粘膜由来の細胞シートをがん切除部に貼り付けることで狭窄を改善する方法も研究されている。実際に、内視鏡的粘膜切除モデルのイヌに口腔粘膜由来細胞シートを移植することで狭窄の発症を予防できることが報告されており(Ohki *et al.*, *Gut*, 2006)、今後ヒトへの利用が期待される。一方、口腔粘膜の上皮細胞と食道上皮細胞は構造的によく似ているが、長期間食道上皮細胞と同様の細胞として維持できるかについては明らかになっていない。そのため、食道上皮細胞と同じ性質を有したまま長期間維持できる細胞を人工的に作製する方法の開発が急務である。その一つとして、食道上皮細胞を iPS 細胞から作製する研究が行われている。2018 年に Trisno らは、iPS 細胞からヒト食道細胞によく似た性質を有する食道組織構造体 (食道オルガノイド) を作製することに成功している (Trisno *et al.*, *Cell Stem Cell*, 2018)。しかしながら、iPS 細胞由来の食道オルガノイドが実際に生体内において食道組織を構築できるかについては明らかになっていない。

### ダイレクトリプログラミング法を用いた細胞の作製

多能性幹細胞以外に人工的に細胞を作製する方法の一つとして、ダイレクトリプログラミングという方法がある。ダイレクトリプログラミングとは、体細胞に組織特異的な転写因子を導入することで、iPS 細胞のような未分化な状態を介さずに、直接、目的の細胞へと分化転換させる手法のことである。この方法を用いて、筋芽細胞や神経細胞など様々な細胞が作製されており (Davis *et al.*, *Cell*, 1987, Vierbuchen *et al.*, *Nature*, 2010)、当研究室においてもマウス胎仔線維芽細胞から肝細胞様細胞を作製できること (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011) や、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) からヒト誘導肝前駆細胞を作製できることを報告した (Inada *et al.*, *Nat Commun.*, 2020)。これらの細胞は、重篤な肝疾患を有するマウスに移植すると機能的な肝細胞として生着し、致死率を減少させることができる。さらに、近年、申請者らはマウス胎仔線維芽細胞および HUVEC に 4 つの転写因子を導入することで、マウスおよびヒト誘導腸前駆細胞の作製に成功している。これらの細胞は、生体由来の腸前駆細胞と同様の性質や遺伝子発現を示すことが明らかになっている (Miura and Suzuki, *Cell Stem Cell*, 2017)。また、作製したマウスおよびヒト誘導腸

前駆細胞は、大腸炎モデルマウスに移植すると障害を受けた大腸組織を機能的に再構築することができた。以上のことから、ダイレクトリプログラミングによって作製した細胞は、創薬研究や移植など医療への応用が期待される。一方、食道上皮細胞へと分化転換させる方法は確立されておらず、食道上皮細胞へのリプログラミングに重要な転写因子は明らかになっていない。

## 2．研究の目的

本研究では、ダイレクトリプログラミングを用いて、ヒト臍帯静脈内皮細胞から誘導食道上皮細胞を作製することを目的として研究を行う。これまでに、ダイレクトリプログラミングを利用して様々な細胞が作製されているが、食道上皮細胞を作製したという報告はない。本研究で誘導食道上皮細胞の作製が可能になれば、食道上皮細胞への運命転換に重要な転写因子を初めて明らかにできる。これは、医学的にも発生学的にも重要な知見となる。本研究で用いるダイレクトリプログラミングの利点としては、多能性幹細胞から分化誘導する場合と異なり、未分化な状態を経ずに目的の細胞へと直接運命転換できるので、未分化な細胞の残存による腫瘍形成のリスクがないという点が挙げられる。また、iPS 細胞から食道上皮細胞を作製するためには複雑な工程を経なければならないが、ダイレクトリプログラミングの場合は、短時間で簡単に機能的な細胞を誘導できることが申請者らの研究によって明らかになっている (Miura and Suzuki, *Front Cell Dev Biol.*, 2014, Miura and Suzuki, *Inflamm Regen.*, 2014)。そのため、本研究によって短時間で簡単に、安全で機能的な誘導食道上皮細胞を作製できれば、この技術を基盤として自己細胞から誘導食道上皮細胞を作製することで生体由来の食道上皮細胞の代替となる新たな細胞として利用できる可能性がある。

## 3．研究の方法

ヒト食道上皮細胞培養系の確立を行なうために、市販されている食道上皮細胞を得た。既報の方法を参考に、同様の培養系で培養を行い、長期間継代培養できるかということや凍結保存可能かについても解析した。つづいて、HUVEC から誘導食道上皮細胞を作製するために必要な転写因子の探索を行った。その方法として、食道の発生や恒常性の維持に重要な遺伝子の中から転写因子に着目し、候補遺伝子を搭載したレトロウイルスベクターを作製した。これらのレトロウイルスベクターを用いてレトロウイルスを作製し、HUVEC に導入した。その際、すべての候補遺伝子の組み合わせとすべての候補遺伝子から 1 遺伝子ずつ抜いた組み合わせを作り、HUVEC への導入を行なった。この中から、2 次元培養下で増殖可能な組み合わせのみを候補とし、遺伝子発現解析を行なった。遺伝子発現は、食道上皮細胞マーカーである KRT4 や KRT13 の発現を調べた。これにより、食道上皮細胞への誘導の有無を判断した。これらの組み合わせから、KRT4 や KRT13 の発現が確認されたもののみ、ヒト生体由来食道上皮細胞の培養法と同様にマトリゲルを用いた 3 次元培養を行い、誘導食道上皮細胞由来オルガノイドを作製した。その後、生体由来食道上皮細胞のオルガノイドと形態を比較した。また、組織学的解析や、長期間培養可能かについても解析した。

## 4．研究成果

本研究では、ダイレクトリプログラミングという新しい方法を用いて研究を行った。これまでの我々の研究で、ダイレクトリプログラミングで作製した細胞は、転写状態は生体由来の細胞とよく似ていることは明らかになっている。しかし、生体由来の細胞と DNA のメチル化状態も同様

であるかはわかっていない。真に生体由来の細胞と同様の細胞を作製するためには、遺伝子発現だけでなくエピゲノムの解析も必要である。そこで、我々が作製した誘導腸幹細胞由来のオルガノイドと生体の腸幹細胞由来オルガノイドの DNA メチル化状態を解析した。その結果、二つの細胞のメチル化状態は非常によく似ており、ダイレクトリプログラミングで作製した細胞は転写だけでなくエピゲノムレベルで非常によく似た細胞を作製できることを明らかにした (Horisawa, Miura et al., *Scientific Reports*, 2023.)

上記の結果によって、ダイレクトリプログラミングを用いることで生体由来の細胞の代替となる細胞を作製できると考えられたため、この方法を用いて研究を進めた。そのために、まず、市販されているヒト食道上皮細胞を既報の方法で培養した。ヒト食道上皮細胞をマトリゲルを用いた三次元培養することで、重層化したオルガノイドを形成できた。この細胞は数回継代し、維持することができた。また、凍結保存も可能であった。つづいて、HUVEC から誘導食道上皮細胞を作製するために必要な転写因子を食道の発生や分化に重要な遺伝子の中から探索した。その結果、二次元培養下で増殖可能な組み合わせの同定に成功した。さらに、特定の遺伝子を導入することによって、食道上皮細胞マーカーである KRT4 や KRT13 の発現も確認できた。この細胞は、継代が可能であり、長期間培養することができた。さらに、マトリゲルを用いた三次元培養を行うと生体由来の細胞と同様に重層化様構造が観察された。そのため、組織学的にも生体由来食道上皮細胞とよく似た細胞が作製できていると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Miura Shizuka, Horisawa Kenichi, Iwamori Tokuko, Tsujino Satoshi, Inoue Kazuya, Karasawa Satsuki, Yamamoto Junpei, Ohkawa Yasuyuki, Sekiya Sayaka, Suzuki Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Hepatocytes differentiate into intestinal epithelial cells through a hybrid epithelial/mesenchymal cell state in culture	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3940-3940
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-024-47869-2	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 Kenichi, Miura Shizuka, Araki Hiromitsu, Miura Fumihito, Ito Takashi, Suzuki Atsushi	4. 巻 13
2. 論文標題 Transcription factor-mediated direct cellular reprogramming yields cell-type specific DNA methylation signature	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22317-22317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-49546-8	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 Minegishi Misa, Kuchimaru Takahiro, Nishikawa Kaori, Isagawa Takayuki, Iwano Satoshi, Iida Kei, Hara Hiromasa, Miura Shizuka et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Secretory GFP reconstitution labeling of neighboring cells interrogates cell-cell interactions in metastatic niches	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 8031-8031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-43855-2	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐澤臯月, 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 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 三浦静, 堀澤健一, 唐澤皐月, 鈴木淳史
2. 発表標題 脱分化型肝細胞の腸上皮細胞への運命転換
3. 学会等名 第31回肝細胞研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三浦 静, 堀澤 健一, 唐澤 皐月, 鈴木 淳史
2. 発表標題 肝細胞から腸上皮細胞への運命転換
3. 学会等名 第97回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三浦 静, 堀澤 健一, 唐澤 皐月, 鈴木 淳史
2. 発表標題 脱分化型肝細胞の腸上皮細胞への運命転換
3. 学会等名 第47回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 三浦 静, 堀澤 健一, 唐澤 皐月, 鈴木 淳史
2. 発表標題 肝細胞から腸上皮細胞への運命転換
3. 学会等名 第24回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2025年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------