

令和元年6月7日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H01850

研究課題名(和文)ダイレクトリプログラミングで作製された“iHep細胞”の機能的成熟誘導とその応用

研究課題名(英文) Induction of functional differentiation of induced hepatocyte-like (iHep) cells and applications thereof

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) 34,100,000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」によって作製されたiHep細胞の機能的成熟誘導とその分子機構の解明を目指して研究を行った。その結果、細胞凝集塊形成によるHippoシグナルの活性化、並びにHnf1を筆頭とする肝細胞分化関連転写因子の活性化が、iHep細胞の成熟化を強く促進することを見出した。また、肝細胞へのダイレクトリプログラミング技術ががん治療に応用できないかと考え、肝細胞分化誘導因子セットをヒトの肝がん細胞に導入した。その結果、肝がん細胞の長期的な増殖阻害やがん形質の消失、並びに肝細胞分化マーカーの発現上昇が認められ、肝がんの治療や制御に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iHep細胞の機能的成熟誘導法の開発やその分子機構の解明は、iHep細胞を用いた肝疾患患者に対する新しい移植医療の実現や、個人レベルで薬剤の効果や毒性を評価できる次世代型検査システムの構築に大きく貢献すると考えられる。また、本研究において肝細胞へのダイレクトリプログラミング技術ががん治療に応用可能なことが実証されたことから、ダイレクトリプログラミング技術を利用した肝がん細胞の肝細胞化が、肝がんの治療や制御を担う新しい治療法として発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we succeeded in direct reprogramming of mouse fibroblasts into hepatocyte-like cells using a set of defined transcription factors (TFs). These induced hepatocyte-like (iHep) cells have hepatocyte-specific properties in vitro and in vivo. However, the hepatic functions of iHep cells were insufficient compared with those of primary hepatocytes. Thus, in this study, we sought to induce functional differentiation of iHep cells, and found that cell-aggregate formation can rapidly induce hepatic maturation of iHep cells through activation of Hippo signaling. Thus, iHep cell aggregates may provide insights into potential therapies for liver diseases. Moreover, we also found that combinatorial transduction of three TFs stably suppressed cancer-specific phenotypes of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and induced the expression of hepatocyte marker genes. Thus, it is suggested that direct reprogramming technology can develop to an effective therapeutic strategy for HCC.

研究分野：発生生物学、再生医学、腫瘍生物学

キーワード：肝臓 細胞分化 ダイレクトリプログラミング 再生 がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

肝臓を構成する肝細胞は移植医療や創薬研究において利用価値の高い細胞だが、生体組織から採取できる細胞数には限界があり、培養下での増殖や維持も難しい。この問題に対し、我々は、マウスの線維芽細胞に2種類の転写因子を導入することで、肝細胞の性質をもった細胞（induced hepatocyte-like cells: iHep 細胞）を作製することに成功した。iHep 細胞の作製に見られるように、細胞の周辺環境や遺伝子発現パターンに人為的操作を加えることで、その細胞がおかれた分化状態を強制的に変更して全く別の性質をもった細胞を生み出すことを「ダイレクトリプログラミング」と呼び、次世代の医療を担う革新的技術の1つとして注目されている。ダイレクトリプログラミングによって作製される iHep 細胞は極めて有望な細胞といえるが、iHep 細胞はその特徴として未熟な性質を有し、培養下において増殖能が高く、必要な細胞数を確保できる反面、肝機能レベルが生体肝臓の肝細胞よりも低いことが問題である。そのため、iHep 細胞を真に医療現場で利用するためには、iHep 細胞の二次的な分化誘導、すなわち肝細胞としての機能的成熟を誘導する必要がある。

2. 研究の目的

iHep 細胞の機能的成熟を誘導する方法を開発するとともにその分子機構を解明し、肝疾患患者に対する新しい移植医療の実現や、個人レベルで薬剤の効果や毒性を評価できるシステムの構築に貢献する。

3. 研究の方法

iHep 細胞は、移植後に肝臓組織を形成し、肝機能レベルが著しく上昇する。そのため、iHep 細胞は、肝細胞と同じく、肝臓組織を形成することによって機能的成熟に達するのではないかと考えられた。そこで本研究では、マウス iHep 細胞を低接着性培養ディッシュ内で浮遊培養させ、疑似肝臓組織として細胞凝集塊を形成させることにより、iHep 細胞の機能的成熟誘導を試みた。また、凝集塊形成と iHep 細胞の機能的成熟をつなぐ分子機構にも着目し、その解明を目指して研究を行った。さらに本研究では、マウス iHep 細胞で得られた研究成果をシームレスにヒト iHep 細胞にも適用し、実際の医療応用を見据えたヒト iHep 細胞の凝集塊形成と機能的成熟誘導も試みた。

4. 研究成果

マウス iHep 細胞を用いて、その機能的成熟誘導と分子機構の解析を進めた結果、細胞凝集塊形成による Hippo シグナルの活性化、並びに Hnf1a を筆頭とする肝細胞分化関連転写因子の活性化が、iHep 細胞の成熟化を強く促進することを見出した (Yamamoto et al., *Cell Rep.*, 2018) (図1)。また、マウス iHep 細胞において確立した機能的成熟誘導法は、ヒト iHep 細胞の機能的成熟誘導においても有用である

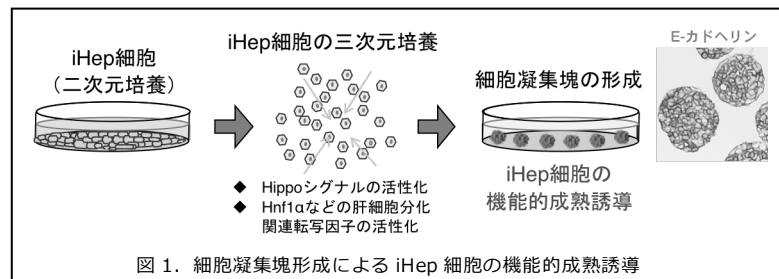


図1. 細胞凝集塊形成による iHep 細胞の機能的成熟誘導

ことが判明した (Inada et al., 論文リバイス中)。さらに本研究では、iHep 細胞の発展的研究として、肝細胞へのダイレクトリプログラミング技術ががん治療に応用できないかと考え、これまでの研究で重要性が明らかになった肝細胞分化誘導因子セット (HNF4A、FOXA3、HNF1A) をヒトの肝がん細胞に導入した。その結果、肝がん細胞の長期的な増殖阻害やがん形質の消失、並びに肝細胞分化マーカーの発現上昇が認められた (Takashima et al., *Cancer Sci.*, 2018)。このことから、ダイレクトリプログラミング技術を利用した肝がん細胞の肝細胞化が、肝がんの治療や制御に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. *Takashima Y., *Horisawa K., *Udono M., Ohkawa Y., Suzuki A. Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors. *Cancer Sci* 109, 3543-3553, 2018. (* Co-first author)
2. Yamamoto J., Udono M., Miura S., Sekiya S., Suzuki A. Cell aggregation culture induces functional differentiation of induced hepatocyte-like cells through activation of Hippo signaling. *Cell Rep* 25, 183-198, 2018.
3. Miura S. and Suzuki A. Brief summary of the current protocols for generating intestinal organoids. *Dev Growth Differ* 60, 387-392, 2018.

4. Miura S. and Suzuki A. Generation of mouse and human organoid-forming intestinal progenitor cells by direct lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* 21, 456-471, 2017.
5. Semba Y., Harada A., Maehara K., Oki S., Meno C., Ueda J., Yamagata K., Suzuki A., Onimaru M., Nogami J., Okada S., Akashi K., Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 45, 8758-8772, 2017.
6. Kawamata M. and Suzuki A. Cell fate modification toward the hepatic lineage by extrinsic factors. *J Biochem* 162, 11-16, 2017.
7. *Sekiya S., *Miura S., *Matsuda-Ito K., Suzuki A. Myofibroblasts derived from hepatic progenitor cells create the tumor microenvironment. *Stem Cell Reports* 7, 1130-1139, 2016. (* Co-first author)
8. Terada M., Horisawa K., Miura S., Takashima Y., Ohkawa Y., Sekiya S., Matsuda-Ito K., Suzuki A. Kupffer cells induce Notch-mediated hepatocyte conversion in a common mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Sci Rep* 6, 34691, 2016.
9. Goya T. and Suzuki A. Novel methods for the treatment of liver fibrosis using *in vivo* direct reprogramming technology. *Stem Cell Investig* 3, 92, 2016.
10. Takashima Y., Terada M., Udono M., Miura S., Yamamoto J., Suzuki A. Suppression of lethal-7b and miR-125a/b maturation by Lin28b enables maintenance of stem cell properties in hepatoblasts. *Hepatology* 64, 245-260, 2016.

[学会発表] (計 25 件)

【国際】

1. Suzuki A.: Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages. *International Symposium on Epigenome 2019 "Development of Fundamental Technologies for Diagnosis and Therapy Based upon Epigenome Analysis"*, Tokyo, Japan, February 3-4, 2019. (Invited Speaker)
2. Suzuki A.: Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages. *2018 The 14th Annual Meeting of TSSCR: From Pluripotency to 3D Organoid and Personalized Medicine*, Miaoli County, Taiwan, October 26-27, 2018. (Invited Speaker for Plenary Talk)
3. Yorino M., Horisawa K., Suzuki A.: Identification of transcription factors repressing direct conversion of mouse embryonic fibroblasts into induced hepatocyte-like cells. *The 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences joint with the 3rd Symposium of the Inter-University Research Network for Trans-Omics Medicine and the 28th Hot Spring Harbor Symposium "Biomedical Sciences in the Era of Big Data"*, Fukuoka, Japan, October 18-19, 2018. (Poster)
4. Suzuki A.: Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages. *The 27th Hot Spring Harbor International Symposium "Frontiers in Stem Cell Research and Reprogramming"*, Fukuoka, Japan, October 31-November 1, 2017. (Invited Speaker)
5. Yamamoto J., Udono M., Suzuki A.: Hepatic maturation of iHep cells in cell aggregation culture. *The 27th Hot Spring Harbor International Symposium "Frontiers in Stem Cell Research and Reprogramming"*, Fukuoka, Japan, October 31-November 1, 2017. (Short Talks by Young Scientists)

【国内】

1. 鈴木淳史：ダイレクトリプログラミングによる肝細胞誘導の標準化：第18回日本再生医療学会総会シンポジウム「iPS細胞は再生医療デバイスとして成立するか—iPS細胞標準化における問題点—」、神戸、2019年3月21～23日（招待講演）
2. 鈴木淳史：ダイレクトリプログラミングによる細胞創生と医療応用：九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス、福岡、2019年1月28日（招待講演）
3. 鈴木淳史：肝臓と腸上皮組織におけるダイレクトリプログラミング研究の進展：琉球医学会特別講演会、沖縄、2019年1月22日（招待講演）
4. 鈴木淳史：Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages：第41回日本分子生物学会年会シンポジウム「ダイレクトリプログラミング：人為的細胞作出とその利用」、横浜、2018年11月28～30日（招待講演）
5. 鈴木淳史：転写因子が引き起こすエピジェネティックリモデリングと細胞運命転換：日本人類遺伝学会第63回大会シンポジウム「エピジェネティクス最前線：基礎と臨床の新知見」、横浜、2018年10月10～13日（招待講演）
6. 三浦静、鈴木淳史：肝細胞における*snail*の過剰発現は肝細胞癌を誘導する：第25回肝細胞研究会、東京、2018年7月12～13日（一般口演）
7. 従野雅義、堀澤健一、鈴木淳史：肝細胞へのダイレクトリプログラミングを阻害する転写因子の同定：第25回肝細胞研究会、東京、2018年7月12～13日（ポスター）
8. 後藤那奈子、鶴殿美弥子、鈴木淳史：線維芽細胞の不均一性がiHep細胞誘導に与える影響：第25回肝細胞研究会、東京、2018年7月12～13日（ポスター）
9. 鈴木淳史：ダイレクトリプログラミングによる腸上皮オルガノイドの作製：第18回GIリサーチフォーラム、仙台、2018年7月3日（招待講演）
10. 鈴木淳史：Direct reprogramming to hepatic and intestinal lineages：第33回九州免疫血液研究会、福岡、2018年4月21日（招待講演）
11. 三浦静、鈴木淳史：ダイレクトリプログラミングによるオルガノイド形成能を有するマウスおよびヒト腸前駆細胞の作製：第17回日本再生医療学会総会、横浜、2018年3月21～23日（一般口演）
12. 鈴木淳史：ダイレクトリプログラミングによる腸前駆細胞の作製：第7回Hepato-Diabetology Conference、東京、2018年2月9日（招待講演）
13. 鈴木淳史：肝臓：幹細胞システムの解明に向けて：第122回日本解剖学会総会・学術集会「シンポジウム：体細胞分化と組織幹細胞」、長崎、2017年3月28～30日（招待講演）
14. 鈴木淳史：細胞の運命決定とリプログラミング：東京大学・化学生命工学専攻講演会「化学と生命のかけはし」、東京、2017年3月21日（招待講演）
15. 山本純平、鈴木淳史：凝集塊形成によるiHep細胞の成熟化：第16回日本再生医療学会総会、仙台、2017年3月7～9日（一般口演）
16. 鈴木淳史：Stem cell behavior in liver regeneration and diseases：第39回日本分子生物学会年会シンポジウム「幹細胞とがんの最前線：The cutting edge of stem cell & cancer research」、横浜、2016年11月30日～12月2日（招待講演）
17. 鈴木淳史：転写因子が引き起こす細胞運命の直接転換：第89回日本生化学会大会シンポジウム「細胞外環境を転写とエピゲノムへ統合する分子機構」、仙台、2016年9月25～27日（招待講演）
18. 寺田茉衣子、堀澤健一、三浦静、高島康郎、大川恭之、関谷明香、松田花菜江、鈴木淳史：肝内胆管がんモデルマウスにおいて、クッパー細胞がNotch シグナルを活性化し、肝細胞の

分化転換を誘導する：第23回肝細胞研究会、大阪、2016年7月7～8日（一般口演）

19. 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とその応用：第23回HAB研究機構学術年会、つくば、2016年5月26～28日（招待講演）
20. 鈴木淳史：Regulation of stem cell properties in liver development：The 14th Stem Cell Research Symposium、兵庫、2016年5月20～21日（招待講演）

〔図書〕（計3件）

1. 鈴木淳史：「Notchシグナルを介した肝細胞の分化転換による肝内胆管癌の発生」、*The Liver Cancer Journal*、Vol.9, No.2, 2017年（12月25日発行）
2. 三浦静、鈴木淳史：「ダイレクトリプログラミング法によるオルガノイドの形成能をもつマウスおよびヒトの腸前駆細胞の作製」、*ライフサイエンス新着論文レビュー*、<http://first.lifesciencedb.jp/archives/17253>、2017年10月16日
3. 鈴木淳史：「肝再生医療への応用に向けた人工肝細胞の作製」、*小児外科*、Vol. 49, No. 5, 2017年（5月25日発行）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：ゲノム編集された細胞の製造方法

発明者：鈴木淳史、川又理樹

権利者：九州大学

種類：特許

番号：特願 2018-232946

出願年：2018年

国内外の別：国内

名称：ダイレクトリプログラミングによるヒト肝幹細胞又は前駆細胞の作製

発明者：鈴木淳史

権利者：九州大学

種類：特許

番号：特願 2017-204432

出願年：2017年

国内外の別：国内

〔その他〕

【研究室ホームページ】

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/orgreg/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：堀澤 健一

ローマ字氏名：Kenichi Horisawa

研究協力者氏名：前原 喜彦

ローマ字氏名：Yoshihiko Maehara

研究協力者氏名：調 憲

ローマ字氏名：Ken Shirabe

研究協力者氏名：熊丸 渉

ローマ字氏名：Wataru Kumamaru

研究協力者氏名：大川 恭行

ローマ字氏名：Yasuyuki Ohkawa

研究協力者氏名：高島 康郎
ローマ字氏名：Yasuo Takashima

研究協力者氏名：山本 純平
ローマ字氏名：Junpei Yamamoto

研究協力者氏名：三浦 静
ローマ字氏名：Shizuka Miura

研究協力者氏名：鵜殿 美弥子
ローマ字氏名：Miyako Udono

研究協力者氏名：川又 理樹
ローマ字氏名：Masaki Kawamata

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。