

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390054

研究課題名（和文） 肝臓の幹細胞システムを制御する分子基盤の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism underlying liver stem cell system

研究代表者

鈴木 淳史（SUZUKI ATSUSHI）

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：30415195

研究成果の概要（和文）：

再生医療や次世代がん医療の確立を目指す上で、各臓器・組織に含まれる「幹細胞」の性状を理解し、その破綻のメカニズムを解明することは必要不可欠といえる。本研究では、内胚葉に由来する複雑な実質臓器のひとつ、肝臓の幹細胞（肝幹細胞）の機能解析を行うことで、肝臓の発生過程、再生過程、腫瘍形成過程で細胞の分化や増殖を制御する分子機構の解明を試みた。これまでにに行った研究の結果、肝幹細胞の未分化性と分化を制御する分子機構を明らかにしただけでなく、部分肝切除等の障害後に生じる肝幹細胞が関与しない肝再生において、分裂を停止した肝細胞が再び増殖を開始するための分子機構を発見した。また、得られた成果を基盤として細胞の分化破綻による組織形成異常や発がんのメカニズム解析にも研究を発展させ、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管がんが、実際は肝細胞の分化転換によって生じることを明らかにした。以上の研究成果は、肝臓に対する再生医療の進展や新しいがん医療技術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）：

The study of tissue-specific stem cells is important for the development of regenerative medicine and cancer therapy. In this study, we sought to clarify the molecular mechanism regulating differentiation and proliferation of hepatic stem cells in liver development, regeneration and carcinogenesis. Our study revealed mechanisms underlying not only differentiation of hepatic stem cells, but also proliferation of differentiated hepatocytes in liver regeneration after loss of liver mass or hepatic injury. Moreover, although intrahepatic cholangiocarcinoma has been known to originate from malignant transformation of intrahepatic cholangiocytes, we found that intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. These findings will contribute to the development of therapeutic strategies for liver diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：幹細胞、肝臓、発生、再生医学、がん

1. 研究開始当初の背景

肝臓は、血液細胞を含む複数種の細胞によって構成された集合体として機能しており、数が少なく、形態による識別が困難な肝幹細胞に的を絞った研究は極めて難しい。そのため、肝幹細胞の存在やその特性は長い間不明確であった。そこで我々は、肝幹細胞を他の細胞から選別する手法として、細胞表面抗原を抗体で染色した細胞を生きのまま回収可能な装置であるフローサイトメトリーを利用し、回収された細胞の性状をクローナルな解析系（1 つ 1 つの細胞を個別に解析する手法）にて調べ、結果として、高い増殖能、多分化能、自己複製能、肝組織再構築能といった肝幹細胞の特性をすべて満たす細胞を、マウス胎仔肝臓から特異的に分離・回収することに成功した（Suzuki et al., *Hepatology*, 2000; Suzuki et al., *J Cell Biol*, 2002; 特許登録済）。このように、独自の手法を確立して肝幹細胞を分離できることから、肝幹細胞の増殖や分化を制御する分子機構の解析が可能になった（Suzuki et al., *Development*, 2003）肝幹細胞の研究領域において、フローサイトメトリーを用いた細胞分離とクローン解析という精度の高い実験手法を独自に開発し活用している我々の研究は、極めて独創性の高い研究といえる。

2. 研究の目的

再生医療の実現に向けた潮流の中で、各臓器や組織の幹細胞を同定し、その特性を制御する分子メカニズムを解明することは、極めて重要な研究課題といえる。また、近年注目されている幹細胞と発がんの関係においても、いわゆる「がん幹細胞」の同定とその特性制御の分子基盤の解明が強く求められている。こうした状況の中、我々は、肝臓における幹細胞システムの全容解明とその医療応用を主たる目的として研究を推進している。本研究では、これまで我々が開発してきた肝幹細胞（肝臓の組織幹細胞）の分離技術や単一細胞レベルの解析手法を駆使して研究を行い、肝臓の発生過程、再生過程、腫瘍形成過程で細胞の分化や増殖を制御する分子機構の解明を試みる。

3. 研究の方法

マウス肝臓から分離した肝幹細胞のクローナルな培養系を用いて液性因子の添加や遺伝子の過剰発現/発現抑制を行い、それらに応じた肝幹細胞の機能変化を分子生物学的及び生化学的手法によって解析する。また、任意の時間で肝臓特異的に特定の遺伝子領域を欠損させることができる遺伝子改変マウスを複数作製し、遺伝子・タンパク質の発

現解析や組織学的解析などを行うことによって、肝臓の再生や腫瘍化における細胞動態や形質転換の状態を生体内で解析する。

4. 研究成果

本研究では、肝臓の発生過程において肝幹細胞の増殖や分化を制御する転写因子ネットワークやシグナル分子、マイクロ RNA の役割が明らかになりつつあるだけでなく、肝再生における転写因子 Snail の役割を解析した結果から、肝再生シグナルに応じて誘導される GSK-3 β 依存的な Snail の分解が肝細胞の増殖活性化のトリガーになっていることが判明した（Sekiya and Suzuki, *PNAS*, 2011）。これらの研究から得られた成果及びそこから導きだされる新しい概念は、これまでの肝再生の概念を刷新する革新的なものであり、今後の肝再生療法や肝硬変・肝がんの原因究明や治療法の開発に貢献することが期待される。また、肝臓はなぜ再生できるのか、他の臓器はなぜ再生できないのかといった疑問に対する生物学的理解を深めることもできる。

一方、肝臓における腫瘍形成の研究では、作製した複数の遺伝子改変マウスを用いて細胞の分化破綻による組織形成異常や発がんのメカニズムについて解析を行った。その結果、これまで胆管上皮細胞から発生すると考えられていた肝内胆管がんが、実際は Notch シグナルの活性化を介した肝細胞の分化転換によって生じることが明らかとなった（Sekiya and Suzuki, *J Clin Invest*, 2012）。本研究で得られた結果は、ウイルス性肝炎の患者がなぜ肝内胆管がんを発症するのかという臨床上の疑問に対する答えを提供していると考えられる。このような症例では、肝炎ウイルスに感染した肝細胞が Notch シグナルの活性化を介して胆管上皮細胞に似た細胞へと変化し、肝内胆管がんの発症を導くと考えられる。本研究において、Notch シグナルを抑制することによって肝細胞の分化転換を抑制できたことは、Notch シグナルの抑制が肝内胆管がんの発症を抑えるための治療戦略として有望であることを示唆している。

以上のように、本研究では、将来の肝再生誘導法や肝がん治療法の開発に関わる重要な知見を得ることに成功した。

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 4 件）

1. Sekiya S. and Suzuki A. Intrahepatic

- cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes. *J Clin Invest* 122, 3914-3918, 2012. (査読有) <http://www.jci.org/articles/view/63065>
2. Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* 475, 390-393, 2011. (査読有) doi: 10.1038/nature10263.
 3. Sekiya S. and Suzuki A. Glycogen synthase kinase 3 β -dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 11175-11180, 2011. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1016122108.
 4. Onoyama I., Suzuki A., Matsumoto A., Tomita K., Katagiri H., Oike Y., Nakayama K., Nakayama K. I. Fbxw7 regulates lipid metabolism and cell fate decisions in the mouse liver. *J Clin Invest* 121, 342-354, 2011. (査読有) doi: 10.1172/JCI40725.

[学会発表] (計 26 件)

1. 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35回日本分子生物学会年会ワークショップ「転写因子による細胞運命の直接転換」、福岡、2012年12月13日
2. 高島康郎、鈴木淳史：ヘテロクロニック遺伝子群による肝芽細胞の増殖の制御：第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月12日
3. 三浦静、関谷明香、鈴木淳史：肝細胞誘導におけるリプログラミング過程の観察と解析：第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月12日
4. Suzuki A.: Directed cell fate reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells. *ISSCR-Roddenberry International Symposium on Cellular Reprogramming*, San Francisco, CA, USA, October 25, 2012.
5. Suzuki A.: Directed cell fate reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells. *Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012*, Taipei, Taiwan, October 7, 2012.
6. 鈴木淳史：肝臓の再生と疾患に関わる肝細胞の運命転換：第19回肝細胞研究会 (シンポジウム)、札幌、2012年6月29日
7. 高島康郎、鈴木淳史：肝芽細胞におけるRNA結合タンパク質とマイクロRNAによる細胞増殖の制御：第19回肝細胞研究会、札幌、2012年6月29日
8. 三浦静、関谷明香、大城戸絵理、鈴木淳史：肝細胞誘導におけるリプログラミング過程

- の観察と解析：第19回肝細胞研究会、札幌、2012年6月29日
9. 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11回日本再生医療学会総会プレナリーセッション「幹細胞 reprogrammingの現状と展望」、横浜、2012年6月13日
 10. 高島康郎、鈴木淳史：Lin28b は肝芽細胞の増殖を制御する：第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月13日
 11. 鈴木淳史：肝臓の再生機構と発癌：第70回日本癌学会学術総会・腫瘍別シンポジウム、名古屋、2011年10月3日
 12. 鈴木淳史：肝幹細胞のプロスペクティブな解析：生体外の解析から生体内の解析へ：日本遺伝学会第83回大会、京都、2011年9月22日
 13. 鈴木淳史：肝オーバル細胞の分離と系譜解析：第69回日本癌学会学術総会、大阪、2010年9月24日
 14. 鈴木淳史：肝オーバル細胞の分離と系譜解析：第20回日本サイトメトリー学会、東京、2010年6月26日
 15. Suzuki A.: Prospective isolation and clonal analysis of hepatic stem cells in adult mouse liver. *The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research*, Taichung, Taiwan, April 17, 2010.

[図書] (計 6 件)

1. 鈴木淳史：「肝内胆管癌がNotchシグナルを介した肝細胞の分化転換から生じることを発見」、*分子消化器病*, Vol. 10, No. 1, 2013年
2. 鈴木淳史：「肝細胞分化を誘導するマスター因子の同定」、*生化学*, Vol. 84, No. 8, 2012年
3. 鈴木淳史：「特定因子による細胞運命の直接転換」、*実験医学増刊「幹細胞のメディカルサイエンス」*, Vol. 30, No. 10, 2012年
4. 鈴木淳史：「肝再生の仕組みに関する新知見 - 増殖を求め続ける肝細胞と負の制御」、*医学のあゆみ*, Vol. 240, No. 9, 2012年
5. 鈴木淳史：「特定因子による皮膚細胞から肝細胞への直接変換」、*分子消化器病*, Vol. 8, No. 4, 2011年
6. 鈴木淳史：「がん幹細胞とエピジェネティクス - 環境の変化がいざなう細胞運命のリプログラミング」、*実験医学増刊「がん幹細胞 - ステムネス, ニッチ, 標的治療への理解」*, Vol. 29, No. 20, 2011年

[その他]

ホームページ等
<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/lab/origreg/index.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・准教授

研究者番号：30415195