

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16461

研究課題名（和文）iHep樹立における分化転換および成熟肝細胞機能獲得の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms for transdifferentiation into iHeps

研究代表者

安田 勝太郎（YASUDA, Katsutaro）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：80938621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は独自に同定したマウス肝細胞のマスター転写因子群（Hnf4a, Foxa3, Cebpa, Cebpd, Hnf6, Onecut2）の機能解析を行った。6個のマスター転写因子群について様々な組み合わせで樹立したiHepのRNA-seqおよびWGCNA解析を実施し、主要な肝機能の関連遺伝子を含むモジュールのハブとなる遺伝子の探索を行った。その結果、Hnf4aおよびFoxa3の下流でハブとなるFabp1などの遺伝子群を同定し、それらがさらに下流の遺伝子群の発現に関与することで、肝細胞としての機能を獲得するという階層性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで各細胞種には、それらの細胞を特徴づけるマスター転写因子による転写因子ネットワークが存在することが指摘されてきた。一方で、各細胞種の持つ特徴的な機能には、その機能を制御する遺伝子が存在することも指摘されてきた。今回の研究は細胞機能のハブとなる遺伝子をマスター転写因子が制御していることを明らかにした。これらの成果は、細胞種の特徴的な機能の発現を強化したデザイナー細胞の樹立等に応用可能であり、デザイナー細胞を使用した細胞療法の開発に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We conducted functional analysis of transcription factors (Hnf4a, Foxa3, Cebpa, Cebpd, Hnf6 and Onecut2) that we had already identified as master regulators of a mature hepatocyte. We conducted RNA-seq and WGCNA analysis of iHeps which were made by overexpression of various combinations of the 6 factors and searched for hub genes of each module which contains regulatory genes of hepatic functions. As a result, we identified several genes (e.g., Fabp1) as hub genes which are located downstream of the master regulators and we unveiled the existence of hierarchies between the master regulators and their downstream genes.

研究分野：肝臓再生医療

キーワード：Direct conversion iHep iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞のような分化した細胞に、肝細胞で強く発現するコア転写因子群を強制発現させると、分化転換により肝細胞様の機能を有する細胞、いわゆる iHep が得られる。しかし、初代培養肝細胞に匹敵する機能を有する細胞は得られていない。また、コア転写因子群のそれぞれの機能・役割は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

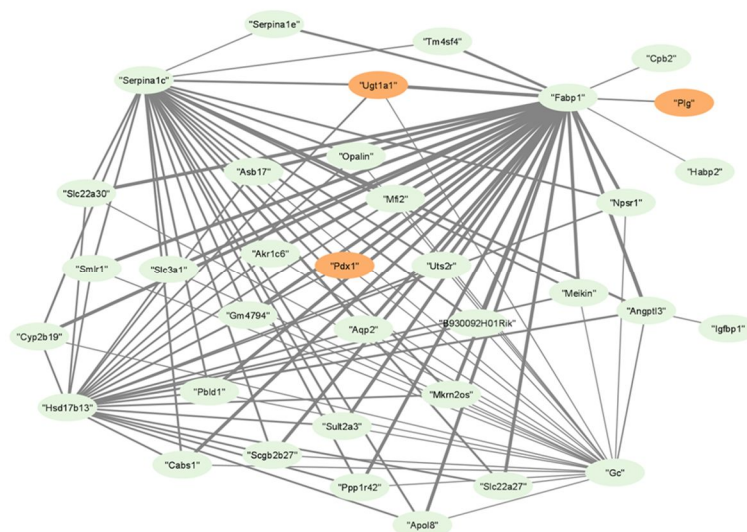
本研究では、独自のスクリーニングによる肝細胞のコア転写因子の同定と、同定したコア転写因子がマウス胎仔線維芽細胞 (MEF) やヒト線維芽細胞、ヒト iPS 細胞を分化転換させ、成熟肝細胞機能を付与する機序の解明を行う。そして、最終的には薬剤誘導性にコア転写因子を発現して成熟肝細胞様細胞に分化転換するヒト iPS 細胞株の樹立を目的とする。

3. 研究の方法

我々は独自に同定したマウス肝細胞のマスター転写因子群 (*Hnf4a*, *Foxa3*, *Cebpa*, *Cebpd*, *Hnf6*, *Onecut2*) の機能解析を行った。6 個のマスター転写因子群について、様々な組み合わせをレトロウイルスで MEF に導入して得られた iHep について、RNA-seq を実施して種々の解析を実施した。また、これら 6 個の転写因子群に 3 個の転写因子を追加し、ヒト線維芽細胞およびヒト iPS 細胞を効率よく分化転換させる転写因子の組み合わせを評価した。

4. 研究成果

RNA-seq を実施して、まずは *Hnf4a*, *Foxa3* のみの 2F-iHep と、*Cebpa*, *Cebpd*, *Hnf6*, *Onecut2* を追加した 6F-iHep で遺伝子発現を比較した。6F-iHep では *Cyp3a11* 遺伝子をはじめとした各種 *Cyp* 遺伝子発現や *Fabp* 遺伝子といった脂質代謝関連遺伝子、成熟肝細胞マーカーである *Mup* 遺伝子の発現が高まっていた。続いて各種転写因子の機能解析を行うため、6 因子から 1 因子ずつ引いて作製した iHep について発現遺伝子の解析を進めた。その結果判明したことは、*Hnf4a* および *Foxa3* がいかに肝細胞への分化転換に主要な役割を演じているかであった。主成分分析の結果、これら 2 つの転写因子のうちどちらかを 6 因子から抜くと、全体的な遺伝子発現が大きく変わることが示された。DEG 抽出から Metascape による解析を実施すると、これら 2 つの転写因子を 6 因子から抜くと、肝細胞の主要な機能を司る遺伝子群の発現が大きく低下することが示された。これら 2 つの転写因子の分化転換に対する貢献度が大きいため、残り 4 因子のそれぞれの機能を比較して評価することが困難になったので、今度は 2F-iHep に 4 因子を一つずつ加え、RNA-seq で遺伝子発現を解析した。その結果、特に *Cebpa* は補体や凝固系、脂質代謝や薬剤代謝など多くの肝細胞機能に貢献することが判明した。また *HNF6(Onecut1)* と *Onecut2* ではお互いに近い遺伝子同士であるにも関わらず GO 解析の結果が大きく異なり、特に *Onecut2* は上皮細胞への分化を促進していることが示唆された。WGCNA 解析を行い、マスター転写因子の下流で肝細胞の主要な機能を制御するハブ遺伝子を探索した。遺伝子発現の傾向により発現変動遺伝子を群分けし、そのうち既報で肝臓関連遺伝子と指摘されている遺伝子を含む 10 のモジュールをピックアップした。そのうち、*Hnf4a*, *Foxa3*, *HNF6* を含むモジュールについて、発現遺伝子のネットワークを確認したところ、*Fabp1*, *Serpin1c*, *Hsd17b13* などの遺伝子群がこのモジュールのハブとなる遺伝子であると考えられた。これらのハブ遺伝子がさらに下流の遺伝子群の発現に関与することで、肝細胞としての機能を発揮するという階層性が明らかになった。ChIP-atlas を用いて、肝細胞機能に貢献する *Cebpa* の結合先の遺伝子群を検索し



たところ、肝細胞の成熟化に寄与するとされる SWI/SNF complex の *Smarca2* が含まれていた。*Smarca2*はWGCNA解析で得られたモジュールの一つに含まれており、同じモジュール内には*Cebpd*, *Onecut2*が含まれていた。*Cebpa*のみならず、*Cebpd*, *Onecut2*も*Smarca2*の発現促進を介して、iHep への分化転換を促進している可能性が示唆された。6F-iHep にさらに *Myc* を強制発現させると、RNA-seq 後の PCA 解析で、さらに 6F-iHep が大きく分化することが分かった。*Myc*の分化転換促進作用について調べるため、DEG 解析と PCA 解析で変動遺伝子を絞ったところ、*Gpd1* 遺伝子の発現が高まることが分かった。*Gpd1* は NAD⁺の供給増を介してミトコンドリアの ATP 産生を高める。肝細胞は全身の細胞のなかでも心筋細胞同様にミトコンドリアの豊富な細胞であることが知られており、肝細胞への分化転換においてミトコンドリアの機能亢進が重要であると推察された。今後、この *Gpd1* 遺伝子を肝細胞のマスター転写因子とともに強制発現させることで、iHep への分化転換効率が高まるのか、確認していく。

次に、我々はマウスで同定した 6 個のマスター転写因子をヒト線維芽細胞およびヒト iPS 細胞にレンチウイルスを用いて強制発現させた。結果としてアルブミンを発現するヒト iHep が得られたが、マウス iHep のようなコロニーは形成されず、分化転換効率も非常に低かった。マウスとヒトでは分化転換を惹起するマスター転写因子の組み合わせが異なる可能性が考えられたため、マウスの 6 個の転写因子に加え、既報でマスター転写因子として報告された 3 個の転写因子 (*HNF1A*, *PROX1*, *ATF5*) を含めた計 9 個の転写因子を用いたスクリーニングを実施した。具体的には、ヒト線維芽細胞にこれら 9 個の転写因子を様々な組み合わせでレンチウイルスを用いて強制発現させ、免疫染色や遺伝子発現で評価を行った。その結果、候補となる転写因子の組み合わせを同定し、分化転換効率も 20-30%まで高まった。しかし、依然としてマウス iHep が形成するような増殖性のあるコロニーは形成されなかった。我々はさらにヒト iPS 細胞にも同様の組み合わせの転写因子群を強制発現させたが、ヒト線維芽細胞の場合よりもさらに分化転換効率が低下した。ヒト線維芽細胞よりもヒト iPS 細胞の方が分化転換効率が低い理由はわからない。しかし、我々の最終的な目標は、疾患由来ヒト iPS 細胞を分化転換により目的の細胞に分化・成熟化させ、疾患表現型を *in vitro* において再現することにある。そのためにも、せめて iHep の機能評価が可能になるであろう 30%以上の分化転換効率を実現したい。そこで、我々は培地を含めた培養法の検討や、別の転写因子の追加等検討した。例えば、ヒト線維芽細胞に *HNF4A*, *FOXA3*, *CEBPA* の 3 個の転写因子をレンチウイルスを用いて強制発現させると、30%程度の分化転換効率を得られる。これら 3 因子に *MYCL* 遺伝子を追加で強制発現させると、数%とわずかではあるが統計学的有意差をもって分化転換効率が改善した。また、ヒト iPS 細胞の分化転換で SWI/SNF complex の一つである *SMARCA4* の発現を試薬でノックダウンさせることで、分化転換効率の改善を認めた。*SMARCA4* は iPS 細胞の未分化状態を維持するのに必須の SWI/SNF complex であり、iPS 細胞の未分化維持機構を抑え込むことで、分化転換効率が改善したものと考えられた。今後研究を継続し、ヒト iPS 細胞からでも効率よく iHep 樹立可能なマスター転写因子の組み合わせを同定するとともに、適切な培養条件の同定を行っていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------