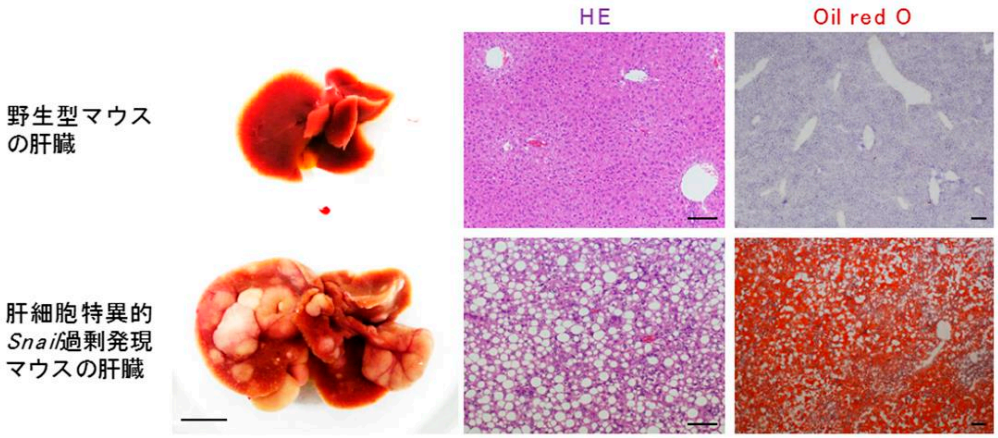
85　トランスオミクス解析による肝再生機構の理解	鈴木　淳史

【目的】本研究では、肝細胞に生じる遺伝子発現変化やエピジェネティック変化などについて解析を行い、それら多階層オミクスデータの統合的解析から肝再生メカニズムの理解を深めることを目的とする。また、得られる情報を活用することで、肝再生不全による疾患の発症機構やリプログラミング誘導による肝細胞の創生に関する研究も行い、がん治療や再生医療への貢献を目指す。

【方法】1. 肝再生制御因子過剰発現マウスの作製と解析：細胞の運動や分化、増殖、生存などにおいて重要な機能を有する転写因子 Snail の分解が肝再生時の肝細胞増殖活性化のトリガーとなることがわかっている。そこで本研究では、肝細胞において *Snail* が過剰に発現し続けると肝臓にどのような影響が生じるのかを明らかにするため、任意の時間で肝臓や肝細胞特異的に *Snail* を過剰発現できるマウスを作製し、肝臓に生じる表現型を解析した。2. 肝細胞リプログラミングを誘導する分子メカニズムの解析：線維芽細胞から「誘導肝細胞（iHepC）」へのダイレクトリプログラミングでは、誘導因子の導入後、迅速かつ劇的に細胞の運命転換が進行するが、その分子メカニズムは不明であった。そこで本研究では、iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子の挙動を詳しく解析するとともに、線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン状態変化、エピゲノム状態変化などを統合的に解析した。3. ヒト iHepC 誘導法の開発：iHepC の誘導技術は、将来、肝疾患治療への応用が期待されることから、マウス iHepC に続き、ヒト iHepC の作製を試みた。誘導された候補細胞の性状については、生体外における遺伝子／タンパク質発現解析や種々の肝機能解析、並びに生体内における肝臓組織再生能の解析によって評価した。

【結果】1. 新規肝発がんモデルの発見とメカニズムの解明：作製された肝臓・肝細胞特異的 *Snail* 過剰発現マウスは脂肪肝とそれに続く肝がんを発症し、死に至ることが判明した。当該マウスにおいて、Snail は *Cldn3* や *occludin* などの遺伝子発現を抑制するとともに、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現も抑制することで、肝細胞間に形成される毛細胆管構造を破壊し、異常な胆汁酸の血中放出を促すことが判明した。その結果、当該マウスは黄疸を呈し、胆汁酸による肝障害が続くことで脂肪肝や肝がんを発症すると考えられた。2. 肝細胞誘導メカニズムの解明：iHepC 誘導において、導入した転写因子の DNA 結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明し、さらに Foxa 転写因子ファミリーの作用機序の違いについて興味深いデータを得ることに成功した。3. ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の直接誘導：作製したヒト iHepC の増殖能が低いことから、高い増殖能と分化能を有する肝前駆細胞をダイレクトリプログラミングの手法によって作製できないかと考え、実験を行った。その結果、3 種類の転写因子をヒトの血管内皮細胞に導入することで、長期培養による安定的な増殖と、肝細胞・胆管上皮細胞両者への分化能を併せ持つ「誘導肝前駆細胞（iHepPC）」を作製することに成功した。

肝細胞特異的な *Snail* の過剰発現による脂肪肝・肝がんの発症



85. トランスオミクス解析による肝再生機構の理解

鈴木　淳史

九州大学 生体防御医学研究所 細胞機能制御学部門 器官発生再生学分野

Key words：肝臓，再生，がん，転写因子，ダイレクトリプログラミング

緒　言

肝臓は、代謝や解毒など、生命維持に必要不可欠な役割を数多く担う重要な器官である。一方で、肝臓は哺乳類に属する動物において唯一、器官レベルの再生ができる特殊な器官としても知られている。この高い再生能力は一時的な肝臓の損傷を修復するためには大変有効であるが、その一方で、肝炎ウイルスの感染やアルコールの過剰摂取、肥満などによって慢性的な障害が肝臓にもたらされる際には、再生能力が高い分、自覚症状がでるころには症状が悪化していることもある。このように、肝臓の再生能力は「諸刃の刃」の性質を有しており、肝臓の再生と疾患は表裏一体の関係にあるともいえる。したがって、正常な再生と再生の破綻の境界を理解することは、脂肪肝や肝硬変、肝がんなど、多くの肝臓疾患の発症機構を理解することにつながると考えられる。以上を踏まえ、本研究では、肝細胞に生じる遺伝子発現変化やエピジェネティック変化などについて解析を行い、それら多階層オミクスデータの統合的解析から肝再生メカニズムの理解を深めようと考えた。また、得られる情報を活用することで、肝再生不全による疾患の発症機構やリプログラミング誘導による肝細胞の創生に関する研究も行い、がん治療や再生医療への貢献を目指して研究を進めた。その結果、脂肪肝から肝がんを引き起こす分子実体の一つを解明することに成功し［1］、また、肝細胞リプログラミングを誘導する分子メカニズムの解明やヒト誘導肝前駆細胞の作製にも成功した［2，3］。これらの知見をまとめ、報告する。

方　法

1.　肝再生制御因子過剰発現マウスの作製と解析

これまでの研究で、我々は、細胞の運動や分化、増殖、生存などにおいて重要な機能を有する転写因子 Snail に着目し、肝再生における Snail の役割について解析を行った。その結果、肝再生シグナルに応じて誘導される Glycogen synthase kinase-3β 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を見出した［4］。そこで本研究では、肝細胞で *Snail* が過剰に発現し続けると肝臓にどのような影響が生じるのかを明らかにするため、任意の時間で肝臓や肝細胞特異的に *Snail* を過剰発現できるマウスを作製し、肝臓に生じる表現型を解析した。

2.　肝細胞リプログラミングを誘導する分子メカニズムの解析

これまでの研究で、我々は、マウスの線維芽細胞に 2 つの転写因子（Hnf4α と Foxa1、2、3 のいずれか一つ）を発現させることで、肝細胞の性質を有する「誘導肝細胞（iHepC）」へと変化させることに成功した［5］。こうした細胞運命の直接転換は「ダイレクトリプログラミング」と呼ばれ、将来の革新的医療を担う新しい技術として注目されている。線維芽細胞から iHepC へのダイレクトリプログラミングでは、誘導因子の導入後、迅速かつ劇的に細胞の運命転換が進行するが、その分子メカニズムは不明であった。そこで我々は、iHepC へのダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子の挙動を詳しく解析するとともに、線維芽細胞が肝細胞の運命を獲得する過程で生じる遺伝子発現変化やクロマチン状態変化、エピゲノム状態変化などを統合的に解析した。

3.　ヒト iHepC 誘導法の開発

上述した iHepC の誘導技術は、将来、肝疾患治療への応用が期待されることから、マウス iHepC に続き、ヒト iHepC

の作製を試みた。誘導された候補細胞の性状については、生体外における遺伝子／タンパク質発現解析や種々の肝機能解析、並びに生体内における肝臓組織再生能の解析によって評価した。

結果および考察

1. 新規肝発がんモデルの発見とメカニズムの解明

作製した肝臓・肝細胞特異的 *Snail* 過剰発現マウスは、著しい脂肪肝と肝肥大を呈し、100%の確率で肝がんを発症して死に至ることが判明した（図 1）。そこで、引き続きそのメカニズムについて解析を行ったところ、Snail は肝細胞間の密着結合（タイトジャンクション）を構成する Cldn3 や occludin などの遺伝子発現を抑制するとともに、胆汁酸合成に関わる酵素の遺伝子発現も抑制することで、肝細胞間のタイトジャンクションによって形成される毛細胆管構造を破壊し、異常な胆汁酸の血中放出を促すことが判明した。その結果として、当該マウスは黄疸を呈し、胆汁酸による肝障害が続くことで脂肪肝や肝がんを発症すると考えられた［1］。以上の結果は、肝再生不全から生じる脂肪肝や肝がんの発症に関する重要な知見となった。

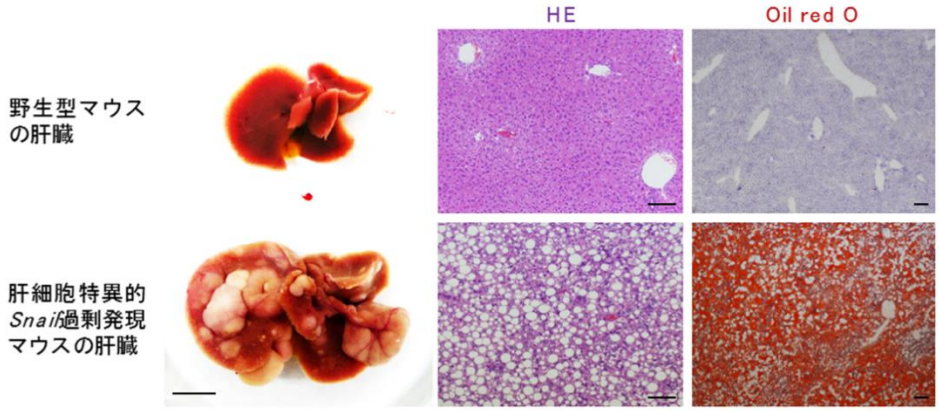
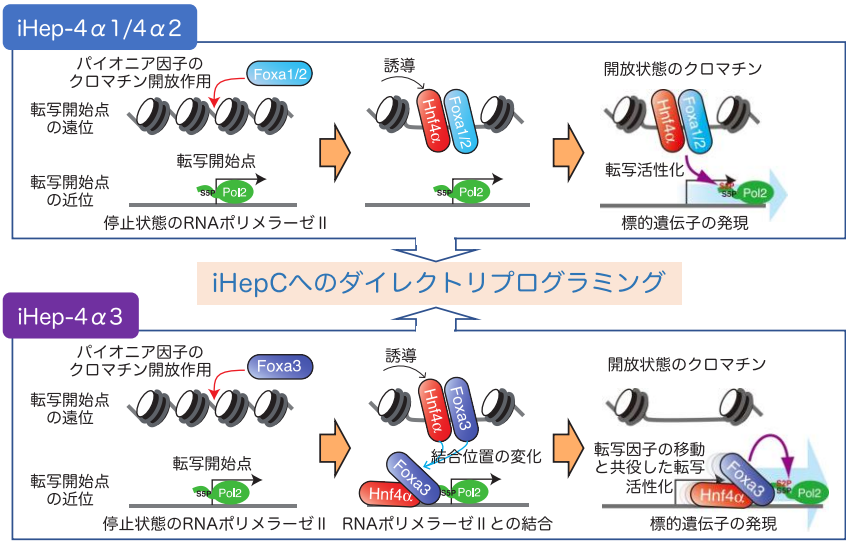


図 1. 肝細胞特異的な *Snail* の過剰発現による脂肪肝・肝がんの発症
野生型マウス（上段）並びに肝細胞特異的*Snail*過剰発現マウス（下段）の肝臓マクロ像と肝臓組織切片のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、オイルレッドO染色（脂肪滴が赤く染色される）をそれぞれ示す。スケールバー：1 cm（肝臓マクロ像）、100 μm（肝臓組織切片）。

2. 肝細胞誘導メカニズムの解明

本研究では、導入した転写因子の DNA 結合から始まる一連のダイナミックな細胞状態変化の全容を解明し、さらに Foxa 転写因子ファミリーの作用機序の違いについて興味深いデータを得ることができた［2］。iHepC 誘導因子の一つである Foxa3 は、同じファミリーに属する Foxa1 や Foxa2 と同じくパイオニア因子として転写開始点遠位に結合しクロマチン構造を開くが、Foxa3 はその後速やかに転写開始点近位に転位して RNA ポリメラーゼⅡや Hnf4α と結合し、それらと一緒に DNA 上を動くことで標的遺伝子の転写を活性化することが判明した（図 2）。この特徴的な Foxa3 の作用機序は、Hnf4α と Foxa3 を用いた iHepC 誘導に必須であることも判明した。RNA ポリメラーゼⅡと転写因子の機能的な結合は他の転写因子でも起こりうることから、細胞運命制御に関わる転写因子の新しい機能として、今後の研究の発展が期待される。この研究で明らかとなった iHepC の誘導メカニズムは、iHepC の質の向上や安全性の担保など、iHepC の医療応用において重要な知見になるだけでなく、肝細胞の分化機序やその破綻による病気の発症機構の解明にもつながると考えられる。



※ Hnf4αとFoxa1、Hnf4αとFoxa2、Hnf4αとFoxa3の組み合わせで作製したiHepCをそれぞれiHep-4α1、iHep-4α2、iHep-4α3と呼ぶ

図 2. iHepC 誘導メカニズムの概略図

本研究で解明された新しい転写因子の作用機序を示す。iHepC 誘導因子の一つである Foxa3 は、同じファミリーに属する Foxa1 や Foxa2 と同じくパイオニア因子として転写開始点遠位に結合しクロマチン構造を開くが、Foxa3 はその後速やかに転写開始点近位に転位して RNA ポリメラーゼⅡや Hnf4α と結合し、それらと一緒に DNA 上を動くことで標的遺伝子の転写を活性化する。

3. ダイレクトリプログラミングによるヒト肝前駆細胞の直接誘導

ヒト iHepC の作製を進めた結果、作製されたヒト iHepC は増殖能が低く、大量の細胞を必要とする細胞移植医療や創薬研究に応用することは難しいと考えられた。この問題に対し、我々は、増殖できない肝細胞ではなく、高い増殖能と分化能を有する肝前駆細胞をダイレクトリプログラミングの手法によって作り出せないかと考えた。この考えに基づき転写因子の組み合わせを再検討した結果、最終的に 3 つの転写因子（FOXA3、HNF1A、HNF6）をヒトの臍帯静脈や末梢血由来の血管内皮細胞に導入することで、長期培養による安定的な増殖が可能な「誘導肝前駆細胞（iHepPC）」を作製することに成功した [3]。作製されたヒト iHepPC は三次元培養下で肝・胆管組織様構造体を形成し、それぞれ機能的な肝細胞と胆管上皮細胞へ分化・成熟する能力をもっていた（図 3）。また、ヒト iHepPC から分化した肝細胞を致死率の高い急性肝不全モデルマウス（生存率 2 割）の肝臓へ移植したところ、マウス肝臓内でヒト肝実質組織を再構築して機能し、高い救命効果（生存率 8 割）を発揮することも判明した。ヒト iHepPC から機能的に成熟した肝細胞や胆管上皮細胞を大量に調達できることから、将来、それら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医療システムの構築が期待される。

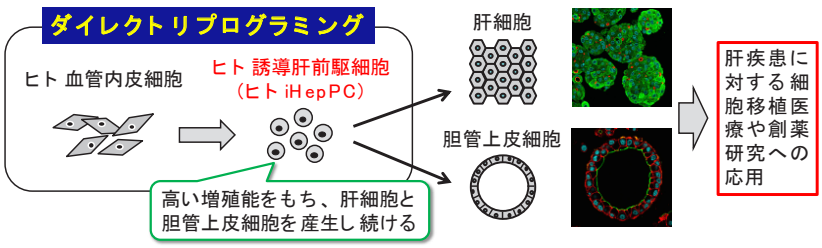


図 3. ヒト iHepPC の誘導とその性状の概略図

ダイレクトリプログラミングによるヒトiHepPCの誘導とヒトiHepPCから肝細胞・胆管上皮細胞への分化を示す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学生体防御医学研究所器官発生再生学分野の三浦静、堀澤健一、鵜殿美弥子、関谷明香、稲田浩気、松田花菜江、合谷孟、山本純平、同研究所トランスクリプトミクス分野の大川恭行、同研究所情報生物学分野の須山幹太、齋藤大助、京都大学大学院医学研究科附属ゲノム医学センターバイオメディカル情報解析分野（スーパーグローバルコース医学生命系ユニット）の長﨑正朗、国立国際医療研究センターゲノム医科学プロジェクトの植野和子、九州大学大学院消化器・総合外科の前原喜彦、九州大学病院口腔顎顔面外科の熊丸渉、九州大学大学院病態制御内科学の小川佳宏である。本研究を遂行するにあたり、共同研究者の皆様のお力添えを賜りましたこと、また、上原記念生命科学財団より助成を賜りましたことに心より感謝申し上げます。

文　献

1） Miura S. and Suzuki A. Induction of steatohepatitis and liver tumorigenesis by enforced *Snail* expression in hepatocytes. Am J Pathol 190, 1271–1283, 2020. PMID: 32188584. DOI: 10.1016/j.ajpath.2020.02.005.

2） Horisawa K., Udono M., Ueno K., Ohkawa Y., Nagasaki M., Sekiya S., Suzuki A. The dynamics of transcriptional activation by hepatic reprogramming factors. Mol Cell 79, 660–676, 2020. PMID: 32755593. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.07.012.

3） Inada H., Udono M., Matsuda-Ito K., Horisawa K., Ohkawa Y., Miura S., Goya T., Yamamoto J., Nagasaki M., Ueno K., Saitou D., Suyama M., Maehara Y., Kumamaru W., Ogawa Y., Sekiya S., Suzuki A. Direct reprogramming of human umbilical vein- and peripheral blood-derived endothelial cells into hepatic progenitor cells. Nat Commun 11, 5292, 2020. PMID: 33087715. DOI: 10.1038/s41467-020-19041-z.

4） Sekiya S. and Suzuki A. Glycogen synthase kinase 3β-dependent Snail degradation directs hepatocyte proliferation in normal liver regeneration. Proc Natl Acad Sci USA 108, 11175–11180, 2011. PMID: 21690373. DOI: 10.1073/pnas.1016122108.

5） Sekiya S. and Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. Nature 475, 390–393, 2011. PMID: 21716291. DOI: 10.1038/nature10263.