

細胞機能制御學部門
Department of Molecular and Cellular Biology

分子医学分野

Division of Cell Biology

教 授：中山 敬一
Professor : Keiichi Nakayama, M.D., Ph.D.

分子医学分野（旧分子発現制御学分野）では、細胞の基本的性質である細胞周期と細胞死を制御する分子メカニズムを、遺伝学的・生化学的・細胞生物学的・発生工学的手法を用いて研究を進めている。つまり細胞周期や細胞死の制御に関わっていると推測される分子の遺伝子を単離同定し、最終的にはその遺伝子を破壊したマウス（ノックアウトマウス）を人工的に作製し、その異常を調べることによって、その分子の生理的役割を個体レベルで明らかにしようというものである。同時に最新のプロテオミクス技術を駆使して、これらの変異マウスにおけるタンパク質の異常を網羅的に解析している。つまり遺伝学と生化学の両面から生物現象に迫るという手法を用いて、細胞の分化段階特異的な細胞周期と細胞死の制御因子の量的制御機構を、選択的タンパク質分解の視点から取り組んでいる。またこれらの異常がどのように発癌に関与するかという分子メカニズムの解明から、癌に対する根本的治療法の確立を目指している。

分子医学分野は、中山敬一教授（主幹教授）、白根道子准教授、束田裕一准教授（正式所属は分子免疫学）、西山正章助教の教員を中心に、学術研究員5名（うち2名は特任助教称号付与）、非常勤研究員1名、大学院生14名（博士課程8名、修士課程4名）、テクニカルスタッフ8名の体制で研究を進めている（2014年3月31日現在）。

人事異動について、2013年4月より片山雄太を学術研究員として、仁田暁大をテクニカルスタッフとして雇用した。また2012年4月より大学院博士課程に、大西隆史（修士課程より進学）、大学院修士課程に、渡辺紘己（九州大学薬学部卒）、松本結香（九州大学理学部卒）、北之園怜往（宮崎大学農学部卒）が入学した。

次いで退職者として、2014年3月に非常勤研究員の松崎美美子が退職した（2014年4月から統合オミクス分野・助教に着任予定）。また大学院博士課程の山内隆好（引き続き学術研究員として雇用予定）、沖田康孝（就職：倉敷中央病院・研修医）と幡野敦（就職：東京大学大学院理学研究科・特任助教）の3名が卒業し、大学院修士課程の井上一平（引き続き、博士課程へ進学）が修士課程を修了した。今年度途中に大学院生博士課程の磯下理恵子が結婚および米国留学のため、また山村聰および木村敬が一身上の都合により退学となった。また大学院生修士課程の西光悦は一身上の都合により途中退学した。

A. 細胞周期依存性キナーゼ阻害分子 p57 が T 細胞分化に果たす役割の解明

T 細胞は細胞性免疫において中心的な役割を果たし、免疫系の重要な構成要素である。T 細胞の連続的な分化は、各発生段階における細胞周期の厳密な制御と関連している。これらの細胞における増殖および分化の決定は、p53 の活性化およびプレ T 細胞受容体シグナル伝達のバランスにより調節されている。しかし、このバランスの維持と細胞周期調節因子の機能との間の関係は、大部分が未知のままである。われわれは、サイクリン依存性キナーゼ阻害分子 p57 の T 細胞特異的欠損マウス (*Lck-Cre/p57^{fl/fl}* マウス) では、T 細胞成熟の初期段階である double negative stage

3 (DN3) および DN4 の間で分化が停止することを発見した。その結果、胸腺に含まれる細胞数は正常の約 1/5 まで低下していた。BrdU 取り込み率の検討と Annexin V 染色によって、特に DN4 ステージにおいて細胞周期の亢進とアポトーシスの増加が観察された。またこの T 細胞特異的 p57 欠損マウスではサイクリン依存性キナーゼの主要な基質である Rb タンパク質のリン酸化が上昇していた。一方、double positive (DP) ステージ以降で p57 を欠損させるような変異マウス (CD4-Cre/p57^{fl/fl} マウス) では、このような胸腺細胞数の減少は認めなかった。しかし末梢の成熟 T 細胞を調べてみると、抗原刺激に対する増殖率は低下し、アポトーシスの頻度は上昇していた。さらに遺伝学的解析によって、Lck-Cre/p57^{fl/fl} マウスにおける T 細胞成熟過程の初期分化異常が p53 の欠失によってほぼ完全に消失することを見出した。つまりこの分化異常は p53 の異常な活性化による細胞周期停止およびそれに引き続くアポトーシスの影響であることが明らかとなった。また E2F1 欠損マウスと交配すると、この異常は部分的に正常化された。つまりこの p57 欠失による T 細胞成熟過程の初期分化異常は、p53 活性および E2F-p53 経路の過剰活性化によって引き起こされるプレ-TCR シグナル伝達との間の不均衡に起因することを明らかにした。興味深いことに、末梢の成熟 T 細胞における細胞周期およびアポトーシスの異常は p53 の欠失によって全く抑制されなかつたことから、p53 に依存しない経路で引き起こされていることが示唆された。p57 遺伝子のみの欠失は、胸腺リンパ腫に対する感受性を付与していなかつたのに対し、T 細胞中の p57 と p53 の両方の欠失は、p53 単独欠損マウスと比較して有意に胸腺リンパ腫の発症が増加することがわかつた。われわれの実験結果は、p57-E2F-p53 軸が T 細胞の適切な分化において、ならびにリンパ腫の予防に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

B. 体内時計を制御する基質の結合が SCF 複合体の形成に与える影響の解明

SCF (Skp1-Cul1-F-box タンパク質) 複合体は不变因子の Cul1, Skp1, Rbx1 と可変因子の F-box タンパク質から構成されるユビキチンリガーゼのサブファミリーの 1 つであり、その活性制御の 1 つに複合体形成が挙げられる。F-box タンパク質の 1 つである Fbx13 は Cryptochromes (Crys) を基質として認識し分解することが知られている。Fbx13 の F-box ドメインを解析したところ、Fbx13 の F-box ドメインは保存度が低く Skp1 や Cul1 との結合に必要なアミノ酸のいくつかが保存されていないことがわかつた。実際、HeLa 細胞での免疫沈降実験において Fbx13 を単独で過剰発現させた細胞では、Fbx13 は SCF 複合体を形成しなかつた。しかし驚くべきことに、同時に Cry1 を過剰発現させた細胞においては Fbx13 の SCF 複合体形成が確認できた。Fbx13 の C 末端に変異を入れ Cry1 との結合を阻害した Fbx13 は SCF 複合体形成ができなかつたことから、Fbx13 と Cry1 との結合が SCF 複合体に重要であることが明らかとなつた。一方、基質結合ドメインを完全欠損させた変異体や Fbx13 の F-box ドメインに Skp2 の基質結合ドメインを付加させた変異体は Skp1 と結合できることから、Fbx13 の C 末端が SCF 形成阻害効果をもつことが示唆された。恐らく Cry 非存在下では何らかの阻害因子が Fbx13 に結合しており、そのため SCF 複合体は形成できないが、Cry の細胞内濃度が一定以上高まると、Cry が Fbx13 に結合して阻害因子を排除し、SCF 複合体を形成して Cry の分解が始まるものであると考えられた。Cry 等の時計タンパク質群は転写調節および翻訳後調節によってその周期性が保証されていると信じられているが、今回明らかになつたこの機構は、Cry タンパク質の周期的変動パターンの形成に一役買つているものと推定される。他の F-box タンパク質においては、基質の結合は SCF 複合体形成には影響しなかつたため、この

SCF 複合体形成における基質結合の関わりは Fbxl3 に特異的な制御機構だと推測される。本研究の結果は、ユビキチンリガーゼの活性制御およびサーカディアンリズム制御の 2 つの面に重要な示唆を与えるものである。

業績目録

原著論文

1. Ishikawa, Y., Hosogane, M., Okuyama, R., Aoyama, S., Onoyama, I., Nakayama, K. I., Nakayama, K. 2013. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth, differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene*, 32, 1921-1932.
2. Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K. I., Gotoh, Y. 2013. p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J.*, 32, 970-981.
3. Khor, E. C., Abel, T., Tickner, J., Chim, S. M., Wang, C., Cheng, T., Ng, B., Ng, P. Y., Teguh, D. A., Kenny, J., Yang, X., Chen, H., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Pavlos, N., Zheng, M. H., Xu, J. 2013. Loss of protein kinase C- δ protects against LPS-induced osteolysis owing to an intrinsic defect in osteoclastic bone resorption. *PLoS One*, 8, e70815.
4. Yumimoto, K., Matsumoto, M., Onoyama, I., Imaizumi, K., Nakayama, K. I. 2013. F-box and WD repeat domain-containing-7 (Fbxw7) protein targets endoplasmic reticulum-anchored osteogenic and chondrogenic transcriptional factors for degradation. *J. Biol. Chem.*, 288, 28488-28502.
5. Yamamoto, A., Takeya, R., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Sumimoto, H. 2013. Phosphorylation of NoxO1 at threonine 341 regulates its interaction with Nox1 and the superoxide-producing activity of Nox1. *FEBS J.*, 280, 5145-5159.
6. Yumimoto, K., Muneoka, T., Tsuboi, T., Nakayama, K. I. 2013. Substrate binding promotes formation of the Skp1-Cul1-Fbxl3 (SCF^{Fbxl3}) protein complex. *J. Biol. Chem.*, 288, 32766-32776.
7. Zhao, H., Bauzon, F., Fu, H., Lu, Z., Cui, J., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Locker, J., Zhu, L. 2013. Skp2 deletion unmasks a p27 safeguard that blocks tumorigenesis in the absence of pRb and p53 tumor suppressors. *Cancer Cell*, 24, 645-659.
8. Tane, S., Ikenishi, A., Okayama, H., Iwamoto, N., Nakayama, K. I., Takeuchi, T. 2014. CDK inhibitors, p21(Cip1) and p27(Kip1), participate in cell cycle exit of mammalian cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 443, 1105-1109.
9. Yaguchi, H., Yabe, I., Takahashi, H., Okumura, F., Takeuchi, A., Horiuchi, K., Kano, T., Kanda, A., Saito, W., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Hatakeyama, S., Sasaki, H. 2014.

- Identification of anti-Sez6l2 antibody in a patient with cerebellar ataxia and retinopathy.
J. Neurol., 261, 224-226.
10. Ohnishi, T., Shirane, M., Hashimoto, Y., Saita, S., Nakayama, K. I. 2014.
Identification and characterization of a neuron-specific isoform of protrudin.
Genes Cells, 19, 97-111.
 11. Kotoshiba, S., Gopinathan, L., Pfeiffenberger, E., Rahim, A., Vardy, L. A., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Kaldis, P. 2014.
p27 is regulated independently of Skp2 in the absence of Cdk2.
Biochim. Biophys. Acta, 1843, 436-445.
 12. Lu, Z., Bauzon, F., Fu, H., Cui, J., Zhao, H., Nakayama, K., Nakayama, K. I., Zhu, L. 2014.
Skp2 suppresses apoptosis in Rb1-deficient tumours by limiting E2F1 activity.
Nat. Commun., 5, 3463.
 13. Matsumoto, A., Takeishi, S., Nakayama, K. I. 2014.
p57 regulates T cell development and prevents lymphomagenesis by balancing p53 activity and pre-TCR signaling.
Blood, in press.
 14. *Hashimoto, Y., * Shirane, M., Matsuzaki, F., Saita, S., Ohnishi, T., Nakayama, K.I. (*Co-first authors) 2014.
Protrudin regulates endoplasmic reticulum morphology and function associated with the pathogenesis of hereditary spastic paraparesis.
J. Biol. Chem. , in press.

総説

1. Shirane, M., Nakayama, K. I. 2014.
Mitochondria: FKBP38 and mitochondrial degradation.
Int. J. Biochem. Cell Biol., in press.
2. 細田将太郎, 白根道子, 中山敬一. 2013.
マイトファジーにおける選択的タンパク質脱出の発見と機構解析.
細胞工学, 32, 582-583.
3. 松本雅記, 中山敬一. 2013.
タンパク質ネットワーク構造解析とその医学応用.
実験医学 (増刊) 「ゲノム医学・生命科学研究総集編: ポストゲノムの 10 年は何をもたらしたか」, 2398-2404.
4. 中山敬一. 2013.
「静止期追い出し療法」で白血病幹細胞を根絶：慢性骨髓性白血病マウスを用いて実証
Medical Tribune, 46, 19.
5. 中山敬一. 2013.
総論.
がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて— (清木元治・秋山徹・石川冬木・内海潤・近藤豊・中山敬一・平尾敦 編, 南山堂, 東京) 261-264.
6. 武石昭一郎, 中山敬一. 2013.

- がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発.
 がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて— (清木元治・秋山徹・石川冬木・内海潤・近藤豊・中山敬一・平尾敦 編, 南山堂, 東京) 265-268.
7. 松本雅記, 中山敬一. 2013.
 発現変動タンパク質を見つける：新規プロテオミクスによる絶対定量を例に.
 実験医学別冊「見つける、量る、可視化する！質量分析実験ガイド」(杉浦悠毅・末松誠 編, 羊土社, 東京) 81-90.
 8. 武石昭一郎, 中山敬一. 2014.
 DNA 量の変化などを用いた細胞周期の解析.
 実験医学別冊「直伝！フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる！」(中内啓光・清田純 編, 羊土社, 東京) 46-57.
 9. 沖田康孝, 中山敬一. 2014.
 形態学的・生化学的变化を用いたアポトーシスの解析.
 実験医学別冊「直伝！フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる！」(中内啓光・清田純 編, 羊土社, 東京) 72-83.

学会発表

1. 中山敬一.(2013, 4/17).
 次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90 年来のがんの秘密に迫る.(招待講演)
 第 5 回お茶の水 Hematology セミナー, 東京.
2. 中山敬一.(2013, 6/13).
 次世代プロテオミクスによる癌代謝と細胞周期の統合的理解：90 年来の謎に挑む.(シンポジウム)
 第 17 回日本がん分子標的治療学会, 京都.
3. 中山敬一.(2013, 6/14).
 次世代プロテオミクスが解き明かすがんの秘密.(特別講演)
 第 40 回佐島シンポジウム, 仙台.
4. 中山敬一.(2013, 7/8).
 次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新地平：90 年来のがんの秘密に挑む.(特別講演)
 第 40 回 BMS コンファレンス, 宮崎.
5. 中山敬一.(2013, 7/12).
 Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. (招待講演)
 第 35 回内藤コンファレンス, 札幌
6. Nakayama, K. I. (2013, 8/23).
 Cell cycle and cancer stem cells: Abrogation of quiescence by Fbw7 ablation eliminates leukemia stem cells. (招待講演)
 ISEH 42nd Annual Scientific Meeting, Vienna.
7. 中山敬一.(2013, 9/12).
 がん治療における Fbxw7 抑制の二面性：光と影.(シンポジウム)

第86回日本生化学会大会、横浜。

8. Hatano, A., Matsumoto, M., Nakayama, K. I. (2013, 9/16).
Quantitative phosphoproteomic analysis of calmodulin-dependent calcium signaling.
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
9. Yokoyama, R., Shibara, T., Aoshima, M., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Okamoto, N., Tsubata, T., Ando, S. (2013, 9/16).
Comprehensive quantitative phosphoproteomic approach by MS/MSALL with SWATH acquisition.
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
10. Nakayama, K. I. (2013, 9/17).
Absolute quantification of human proteome by large-scale targeted proteomics. (Invited speaker)
HUPO 2013 12th Annual World Congress, Yokohama.
11. 中山敬一. (2013, 10/4).
ワールブルグ効果とは何か？：全てを計ることによって明らかとなったがん代謝の真実. (モーニングレクチャー)
第72回日本癌学会学術総会、横浜。
12. 中山敬一. (2013, 10/25).
次世代プロテオミクスが拓く医学生物学の新地平：90年来の謎を解く. (特別講演)
第40回日本神経内分泌学会学術集会・第38回日本比較内分泌学会大会・合同大会、宮崎。
13. Nakayama, K. I. (2013, 11/5).
Fbw7 is essential for maintenance of quiescence and function of cancer stem cells. (Invited Speaker)
The 23rd Hot Spring Harbor Symposium: Recent Advances in Stem Cell Biology 2013, Fukuoka.
14. 中山敬一. (2013, 11/19).
次世代プロテオミクスが拓く生命科学の新地平：90年来のがんの謎に挑む. (招待講演)
金沢大学がん進展制御研究所・共同利用共同研究拠点シンポジウム 2013, 金沢。
15. Nakayama, K. I. (2013, 11/21).
What is the Warburg effect? Next-generation proteomics uncovers the secret of cancer. (Invited Speaker)
3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, Toulouse.
16. 武石昭一郎, 松本有樹修, 小野山一郎, 仲一仁, 平尾敦, 中山敬一. (2013, 12/3).
Fbxw7 阻害は静止期を破綻させ白血病幹細胞を根絶する。
第36回日本分子生物学会年会、神戸。
17. 脇野敦, 松本雅記, 中山敬一. (2013, 12/3).
定量的リン酸化プロテオミクスによる胸腺細胞の抗原刺激シグナル伝達機構の解明.
第36回日本分子生物学会年会、神戸。
18. 中山敬一. (2013, 12/3).
次世代プロテオミクスを用いたがん代謝の統合的理解. (ワークショップ)
第36回日本分子生物学会年会、神戸。
19. 大西隆史, 橋本寛, 細田將太郎, 中山敬一, 白根道子. (2013, 12/3).
神経特異的な新規 protrudin アイソフォームは、神経細胞の極性形成に寄与する。
第36回日本分子生物学会年会、神戸。

20. 束田裕一, 中山敬一.(2013, 12/3).
哺乳類初期胚におけるメチル化DNAの酸化防御機構.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
21. 西山正章, 中山敬一.(2013, 12/3).
ユビキチンリガーゼ SCFFBXL12複合体による幹細胞維持分子の分解と幹細胞分化に与える影響の解析.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
22. 柴田猛, 横山亮, 青島理人, 松本雅記, 中山敬一, 岡本尚一, 津幡卓一, 安東純江.(2013, 12/3).
MS/MSALL with SWATHTMM acquisitionによるEGFシグナルネットワークの網羅的リン酸化プロテオミクス.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
23. 黒田真也, 柚木克之, 久保田浩行, 曽我朋義, 松本雅記, 中山敬一.(2013, 12/3).
トランスオミクスデータによるインスリン作用の多階層ネットワークのアンバイアス同定. (ワークショップ)
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
24. 橋本寛, 松崎英美子, 細田将太郎, 大西隆史, 中山敬一, 白根道子.(2013, 12/3).
ProtrudinはER形態の制御を通じて遺伝性痙性対麻痺の病態に関与する.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
25. 都地崇拡, 渡邊心也, 松本雅記, 中山敬一, 吉田和真, 杉本のぞみ, 藤田雅俊.(2013, 12/4).
新規結合タンパク質の解析によるGRWD1の転写における機能解明.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
26. 井上一平, 弓本佳苗, 中山敬一.(2013, 12/4).
ユビキチンリガーゼ Fbxw7の新規基質KLF7の同定と解析.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
27. 矢口裕章, 矢部一郎, 高橋秀尚, 奥村文彦, 加納崇裕, 松本雅記, 中山敬一, 畠山鎮次, 佐々木秀直.(2013, 12/5).
網膜症を伴う亜急性小脳失調症における自己抗体の同定と病態解明.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
28. 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一.(2013, 12/5).
mTORC1と炎症性ケモカインをつなぐ新規分子の発見とがん促進作用.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
29. 山内隆好, 西山正章, 諸石寿朗, 弓本佳苗, 中山敬一.(2013, 12/5).
MDM2はDEADボックス型RNAヘリカーゼDDX24への非分解性のポリユビキチン化を介してリボソームRNA前駆体のプロセシングを制御する.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
30. 弓本佳苗, 宗岡哲也, 坪井智広, 中山敬一.(2013, 12/5).
基質の結合がFbxl3のSCF複合体形成を促進する.
第36回日本分子生物学会年会, 神戸.
31. 中山敬一.(2014, 1/16).

次世代プロテオミクスが拓く新たな創薬アプローチ：「ネットワーク標的創薬」の実現に向けて (招待講演)

次世代医薬分子解析学講座3周年記念シンポジウム：日本版NIH元年に次世代創薬を考える、東京

32. Nakayama, K. I. (2014, 1/21).

Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. (Invited Speaker)

Kyushu University/Academia Sinica Biliateral Mini-Symposium on Cancer and Stem Cell, Taipei.

33. Nakayama, K. I. (2014, 2/7).

Comprehensive profiling of cancer metabolism by the next generation proteomics. (Invited Speaker)

International Symposium between Kyushu University Post-Global Centers of Excellence Program and School of Biomedical Sciences, Monash University: Cell-fate Decision: Function and Dysfunction in Homeostasis, Melbourne.

器官発生再生学分野

Division of Organogenesis and Regeneration

教 授：鈴木 淳史

Professor : Atsushi Suzuki, Ph.D.

器官発生再生学分野では、哺乳動物の「発生」や「再生」と「疾患」について、幹細胞の性状理解と機能制御を中心に研究を展開している。特に、代謝や解毒の中枢器官である肝臓の発生メカニズムや損傷後の再生メカニズム、幹細胞の機能破綻による疾患の発症メカニズムの解明に向け、遺伝子、細胞、組織、器官、個体レベルの実験を通じて多角的に研究を行っている。そして、得られる知見から「肝臓」という器官を統合的に理解し、肝疾患に対する革新的な治療法の開発へとつなげていく。

2013 年度においては、4 月に鈴木淳史が准教授から教授に昇任し、関谷明香（学術研究員）、高島康郎（同）、鶴殿美弥子（同）、寺田茉衣子（大学院生・博士 2 年）、三浦静（同・博士 1 年）、山本純平（同・博士 1 年）、川畠万寿代（テクニカルスタッフ）、濱野桃子（同）、海江田千晶（同）の 9 名と共に研究を開始した。その後、5 月に山本真由美（テクニカルスタッフ）が加わり、濱野桃子が退職して福岡女子大学国際文理学部の助手となった。また、9 月に川畠万寿代が退職し、11 月には本分野から関谷明香が、12 月には慶應義塾大学から堀澤健一が助教として加わった。なお、2012 年度まで本分野の学術研究員であった岩森督子は、2013 年度より本学医学研究院病態制御学の助教となった。

A. 慢性肝炎や肝内胆管がんで形成される偽胆管が 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

我々は、生体内における細胞の運命転換と肝臓病の関係に着目し、慢性的な肝障害によって門脈周囲に出現する偽胆管（偽胆管反応）の由来を明らかにすべく、誘導型 Cre/loxP システムを用いた細胞系譜追跡実験を行った。その結果、偽胆管を形成する細胞は、胆管上皮細胞の特徴をもつにも関わらず、Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換によって、肝細胞から生じることが判明した (Sekiya and Suzuki, *Am. J. Pathol.*, in press)。また、慢性肝炎に加え、発症原因が不明で予後の悪い肝内胆管がんについても同様の解析を行った結果、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、実は Notch シグナルを介した肝細胞の運命転換から生じる腫瘍であることが判明した (Sekiya and Suzuki, *J. Clin. Invest.*, 2012)。以上の結果は、

慢性的な障害に対して再生を繰り返し行う肝臓では、正常な再生応答から逸脱した特殊な状況に陥ることによって肝細胞の分化状態が破綻し、肝細胞が胆管上皮細胞の特徴を有する細胞に変化することを示している。我々は、このような現象を「疾患関連リプログラミング」と呼び、がんなどの難治性疾患との関係に注目している (Suzuki, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2013)。

B. 特定因子による皮膚細胞から肝細胞への直接変換

肝細胞は多くの転写因子の働きによって胎生期に肝前駆細胞から分化するのが普通だが、まれに、障害を受けた膵臓の外分泌細胞や骨髄などに含まれる間葉系幹細胞から肝細胞が分化することがある。また、骨髄移植後に血液細胞が肝細胞と融合し、肝細胞として肝臓組織を構築することもある。これらの事象は、肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させる因子の存在を唆しており、ある環境下ではそれらの因子が活性化して肝細胞以外の細胞を肝細胞に変化させていると考えられる。したがって、もし、このような肝細胞の運命決定因子を同定することができれば、それらを使って皮膚の線維芽細胞を肝細胞へと直接変化させることができると考えられる。そこで本研究では、肝細胞の運命決定を担う特定因子を同定し、マウスの線維芽細胞から肝細胞を作り出すことを試みた。その結果、線維芽細胞に $Hnf4\alpha$ と $Foxa$ ($Foxa1$ 、 $Foxa2$ 、 $Foxa3$ のいずれかひとつ) という肝細胞分化に関連した 2 種類の転写因子を導入することで、線維芽細胞を肝細胞の性質をもった細胞 (iHep 細胞) へと直接変化させることに成功し、肝細胞の運命決定因子を同定した (Sekiya and Suzuki, *Nature*, 2011; 特許出願済み)。作製した iHep 細胞は肝細胞の形態的特徴や遺伝子・タンパク質発現を有し、肝細胞特有の機能をもったまま培養下での増殖や維持、凍結保存が可能であった。また、肝機能不全で死に至る高チロシン血症モデルマウスの肝臓へ iHep 細胞を移植すると、肝細胞として障害を受けた肝臓組織を機能的に再構築し、マウスの致死率を大幅に減少させることができた。本法では、わずか 2 種類の転写因子を線維芽細胞に発現させるだけで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を経由することなく、線維芽細胞から直接肝細胞を作製可能なことから、移植医療や創薬研究、バイオ人工肝臓の開発などへの応用が期待される。

C. 肝臓の再生に必要な肝細胞の増殖活性化機構の解明

アポロドーロスが著わしたギリシャ神話にも登場するように、肝臓は我々哺乳類で唯一の「再生する器官」であり、その再生の様子は小さい頃に見たトカゲ尾の再生を彷彿

とさせるエレガントでダイナミックなものである。一般的な肝再生は、幹細胞や前駆細胞の増殖を伴わない成熟肝細胞の増殖再活性化による代償性肥大であるが、そのメカニズムには未だ謎の部分が多い。そこで我々は、肝細胞の増殖再活性化や再生終了時の増殖停止など、肝再生を司る重要なステップを制御する分子メカニズムを明らかにすべく研究を行っている。最近の研究では、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のひとつ、*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 (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を見出した (Sekiya and Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011)。

本研究成果やそこから導きだされる新しい概念は、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。複雑な肝臓の再生には *Snail* の他にも多くの分子が関与するはずであり、今後は肝臓における *Snail* の機能的役割の解析をさらに進めながら、他の分子の関与も積極的に解析することで、肝再生の分子メカニズムの全体像を明らかにしていきたい。また、肝再生の研究を行いながら肝再生の異常も視野に入れ、肝再生不全から生じる肝硬変や肝がんの発症に関しても研究を進めていきたい。

D. マウス胎仔肝幹細胞の分離・回収と機能解析

肝臓の発生は、心臓に近接した前腸内胚葉が心臓や間質組織からの刺激によって肝臓に特化することで始まる。肝臓を構成する細胞には肝上皮細胞（肝細胞と胆管上皮細胞）や血液細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞など複数あるが、そのうちの肝細胞と胆管上皮細胞だけが前腸内胚葉由来であり、それらの起源は同一の細胞であると考えられている。この細胞は、数十年前から肝芽細胞 (hepatoblast) と呼ばれ、肝芽細胞こそ肝臓の幹細胞（肝幹細胞）であると考えられてきた。ところが、肝芽細胞が肝幹細胞の性質を満たす細胞か否かを実験的に証明するには、従来の実験技術では不十分であった。それは、肝臓が肝上皮細胞以外にも多くの種類の細胞を含む複雑な構造体であるがために、数が少なく、形態的に他の細胞と見分けがつかない肝芽細胞だけを肝芽細胞以外の細胞から完全に切り離して解析することが難しかったためである。そこで我々は、肝芽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たまま回収可能な装置であるフローサイトメトリー (fluorescence activated cell sorting: FACS) を利用した。そして、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し、マウス胎仔肝臓細胞の10万個にわずか6個しか存在しない肝芽細胞がc-Met⁺ CD49f^{+/low} c-Kit⁻ CD45⁻ TER119⁻ 細胞画分中に極めて限定して含まれることを突き止め、その同定と特異的分離・回収に成功した (Suzuki et al., *Hepatology*, 2000; Suzuki et al., *J. Cell Biol.*, 2002; 特許登録済み)。

このように、独自の手法を確立してマウス胎仔肝臓から肝芽細胞(=肝幹細胞)を分離できることから、肝発生において肝芽細胞の増殖や分化を司る分子メカニズムにアプローチすることが可能になった。実際に、これまで行った研究では、肝芽細胞の自己複製や肝細胞分化が、肝細胞増殖因子(HGF) やオンコスタチンM(OSM)などの液性因子、C/EBP α やTbx3などの転写因子、コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックスによって制御されていることを明らかにした (Suzuki et al., *Development*, 2003; Suzuki et al., *Development*, 2008; Takashima and Suzuki, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2013)。現在では、これまでに我々が同定した転写因子やマイクロRNAによる肝芽細胞の制御機構について新たな知見が得られており、今後の研究展開が楽しみな状況である。

E. 成体マウス肝幹細胞の分離・回収と機能解析

成熟肝細胞の増殖が阻害された特殊な状況では幹/前駆細胞の増殖が活性化して肝臓を再生すると考えられており、我々は肝臓の幹細胞システムの全体像を理解する目的で成体マウス肝臓に存在する肝幹細胞の分離・回収とその機能解析も行っている。これまでの研究では、慢性肝炎を誘導した成体マウスの肝臓から CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を分離し、クローナルな解析系を用いて機能解析を行った結果、それらが高い増殖能、多分化能、自己複製能といった肝幹細胞の特性を有することを明らかにした。また、高チロシン血症モデルマウスであるFAH欠損マウスの肝臓に CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を移植したところ、ドナー細胞は肝臓内に生着して増殖し、2ヶ月後には肝臓の大部分を再構築していた。以上から、マウス胎仔肝臓と同様に、成体マウス肝臓からも肝幹細胞を分離することが可能になった (Suzuki et al., *Hepatology*, 2008)。また、これら特殊状況下で出現する肝幹細胞の形態的特徴は、人の肝炎や肝がんなどで観察される細胞に似ていることから、成体マウスの肝幹細胞研究は、肝炎や肝がんに対する肝幹細胞の役割を検証するための基盤科学になりうる。そこで、慢性肝炎を誘導したp53欠損マウスから CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞を分離し、CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞画分以外の細胞画分に含まれる細胞と腫瘍形成能について比較した。その結果、p53を欠損し

た CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞のみが免疫不全マウスの皮下で腫瘍を形成し、腫瘍の内部には肝細胞がんと胆管上皮細胞がんの両者が混在していた (Suzuki et al., *Hepatology*, 2008)。このことから、慢性肝炎で出現する CD133⁺ CD45⁻ TER119⁻ 細胞は肝がんに含まれる「がん幹細胞」のもととなる細胞である可能性が高い。そこで現在では、肝がんのがん幹細胞についても研究を進めている。

業績目録

原著論文

1. Hikichi, T., Matoba, R., Ikeda, T., Watanabe, A., Yamamoto, T., Yoshitake, S., Tamura-Nakano, M., Kimura, T., Kamon, M., Shimura, M., Kawakami, K., Okuda, A., Okochi, H., Inoue, T., Suzuki, A., Masui, S. 2013.
Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 6412–6417.
2. Sekiya, S., Suzuki, A. 2014. Hepatocytes, rather than cholangiocytes, can be the major source of primitive ductules in the chronically injured mouse liver. *Am J Pathol*, in press.

総説等

1. 鈴木淳史 (企画) . 2013
細胞運命制御機構の解明から医療応用へ (概論)
実験医学「細胞の運命決定とリプログラミング」、Vol. 31, No. 13.
2. 鈴木淳史 (企画) . 2013
肝細胞分化の人為的な誘導と疾患による破綻
実験医学「細胞の運命決定とリプログラミング」、Vol. 31, No. 13.
3. Takashima, Y., Suzuki, A. 2013.
Regulation of organogenesis and stem cell properties by T-box transcription factors.
Cell Mol Life Sci 70, 3929–3945.
4. Suzuki, A. 2013.
Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate.
Curr Opin Genet Dev 23, 579–584.
5. 鈴木淳史. 2013

細胞運命の直接転換 —ダイレクトリプログラミング—

The Frontiers in Life Sciences シリーズ「幹細胞研究と再生医療」、南山堂

6. 鈴木淳史. 2014
細胞のロバストな振る舞い：再生、発がん、リプログラミング
細胞工学、Vol. 33, No. 1.

学会発表等

1. 鈴木淳史 (2013, 4/19)
肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦（招待講演）
高知大学大学院医学専攻DCセミナー、高知
2. 鈴木淳史 (2013, 5/30)
マウス線維芽細胞から肝細胞へのダイレクトリプログラミング（招待講演）
第7回日本エピジェネティクス研究会、奈良
3. Suzuki, A. (2013, 6/8)
Direct reprogramming of fibroblasts to hepatocyte-like cells (Invited Speaker)
23rd Conference of the Asia Pacific Association for the study of the Liver (APASL Liver Week 2013) “Liver Stem Cells: Hope for the Near Future”, Suntec City, Singapore
4. Suzuki, A. (2013, 6/22)
Direct reprogramming of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells (Invited Speaker, Chairperson)
The First International Meeting for Epithelial Tubulology, Hokkaido, Japan
5. Miura, S., Sekiya, S., Suzuki, A. (2013, 6/23)
Analysis of reprogramming process from fibroblasts to induced hepatocyte-like cells (Poster)
The First International Meeting for Epithelial Tubulology, Hokkaido, Japan
6. Takashima, Y., Suzuki, A. (2013, 6/27)
Lin28b/let-7 axis regulates proliferation of embryonic hepatoblasts (Poster)
The 8th International Symposium of the Institute Network, Kyoto, Japan
7. Suzuki, A. (2013, 6/28)
Direct reprogramming of fibroblasts to hepatocyte-like cells (Invited Speaker)
The 8th International Symposium of the Institute Network, Kyoto, Japan
8. 鈴木淳史 (2013, 7/2)
特定因子による皮膚細胞から肝細胞への直接転換（招待講演、座長、モジュレーター）
第34回日本炎症・再生医学会（シンポジウム）、京都

9. 鈴木淳史 (2013, 8/3)
肝細胞分化の人為的な誘導と疾患による破綻 (一般講演)
第2回IDE研究会、東京
10. 鈴木淳史 (2013, 8/31)
肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦 (特別講演)
The 12th Hepatitis Expert Meeting、東京
11. 寺田茉衣子、鈴木淳史 (2013, 9/6)
肝内胆管癌発生過程における肝細胞の形質転換機構の解析 (ポスター)
「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」平成25年度がん若手研究者ワークショップ、長野
12. 鈴木淳史 (2013, 9/10)
細胞運命の直接転換～皮膚から肝臓をつくる～ (講義)
静岡三大学連携講義 (臓器生理・再生学特論) 「臓器生理と再生の研究最前線～大学でのバイオ基礎科学研究から企業研究～」、静岡
13. 鈴木淳史 (2013, 9/11)
Prospective isolation and in vivo genetic lineage tracing of hepatic oval cells (招待講演)
第86回日本化学会大会 (International Symposium)、横浜
14. Takashima, Y., Kawabata, M., Suzuki, A. (2013, 9/27)
Analysis of intrahepatic bile ducts using a high-resolution 3D imaging system (Poster)
The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells (JSRH), Osaka, Japan
15. Miura, S., Suzuki, A. (2013, 9/27)
Analysis of hepatic lipid metabolism using iHep cells (Poster)
The 20th Annual Meeting of the Japanese Society of the Research of Hepatic Cells (JSRH), Osaka, Japan
16. Suzuki, A. (2013, 10/17)
Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate (Invited Speaker)
CSHA/ISSCR Joint Meeting on Stem Cells in Science and Medicine, Suzhou, China
17. Suzuki, A. (2013, 10/24)
Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate (Invited Speaker)
The 7th International Conference on Cell Therapy, Seoul, South Korea
18. Takashima, Y., Kawabata, M., Suzuki, A. (2013, 11/5)

Analysis of intrahepatic bile ducts using a high-resolution 3D imaging system (Poster)

The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium jointly with The 3rd

‘Grants for Excellent Graduate Schools’ International Symposium,

“Recent Advances in Stem Cell Biology 2013”, Fukuoka, Japan

19. Miura, S., Suzuki, A. (2013, 11/5)

Analysis of hepatic lipid metabolism using iHep cells (Poster)

The 23rd Hot Spring Harbor International Symposium jointly with The 3rd

‘Grants for Excellent Graduate Schools’ International Symposium,

“Recent Advances in Stem Cell Biology 2013”, Fukuoka, Japan

20. 鈴木淳史 (2013, 11/9)

肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦 (特別講演)

第8回信州肝胆膵外科先端医療研究会、長野

21. 鈴木淳史 (2013, 12/4)

マウス線維芽細胞から肝細胞へのダイレクトプログラミング (招待講演)

第36回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞系譜とエピゲノムダイナミクス」、神戸

22. 鵜殿美弥子、鈴木淳史 (2013, 12/5)

線維芽細胞以外の細胞を用いた肝細胞への直接転換 (ポスター)

第36回日本分子生物学会年会、神戸

23. 三浦静、鈴木淳史 (2013, 12/5)

iHep 細胞を用いた脂質代謝機能の解析 (ポスター)

第36回日本分子生物学会年会、神戸

24. 鈴木淳史 (2014, 1/14)

特定因子による皮膚細胞から肝細胞への直接転換 (ポスター)

JST戦略的創造研究推進事業「iPS細胞」研究支援3制度合同シンポジウム2014 ~iPS細胞研

究の今～、東京

25. Suzuki, A. (2014, 1/21)

Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate (Invited Speaker)

Kyushu University / Academia Sinica Bilateral Mini-Symposium on Cancer and Stem Cell,

Taipei, Taiwan

26. 鈴木淳史 (2014, 1/24)

肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦 (招待講演)

新潟大学教育講演、新潟

27. 鈴木淳史 (2014, 2/6)
Artificial induction and disease-related conversion of the hepatic fate (招待講演)
理研CDBセミナー、神戸
28. 鈴木淳史 (2014, 2/8)
肝臓における幹細胞研究の進展と次世代医療への挑戦 (特別講演)
2014 肝免疫フォーラム、東京
29. 寺田茉衣子、鈴木淳史 (2014, 2/18)
肝内胆管癌における肝細胞の形質転換機構に関する研究 (ポスター)
平成25年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「個体レベルからみた炎症とがん」、滋賀
30. 鈴木淳史 (2014, 3/5)
「ダイレクトリプログラミング」、その現状と課題 (招待講演、座長、モジュレーター)
第13回日本再生医療学会総会シンポジウム「Direct Reprogrammingの最近の進歩」、京都
31. 鈴木淳史 (2014, 3/13)
皮膚細胞から肝細胞へのダイレクトリプログラミング (推薦講演)
九州大学「共進化社会システム創成拠点フォーラム」、東京