

## 論文の内容の要旨

氏名：萩原 玲子

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：ダイレクトリプログラミング技術による脱分化脂肪細胞から機能的肝細胞の作製に関する研究

はじめに

これまで、細胞のトランスクリプトームに人為的操作を加えることによって、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機能をもった細胞を作り出せることが明らかにされた。この手法は、ダイレクトリプログラミング法と呼ばれ、皮膚から採取した線維芽細胞を神経系細胞、心筋細胞あるいは肝細胞などへ分化誘導できることが報告されている (Vierbuchen et al., 2010, Ieda et al., 2010, Sekiya and Suzuki 2011)。ダイレクトリプログラミング法は、iPS 細胞を経由せずに線維芽細胞から目的の細胞を直接的に作製できるため、iPS 細胞が抱える問題のいくつかを解消できると期待されている。しかし、細胞にリプログラミングを誘導する分化制御因子の同定は容易ではなく、高度な培養技術や遺伝子操作技術を駆使したスクリーニングによって目的とする転写因子の探索が行われている。また、数多くの遺伝子の中から最初に抽出される数十個の候補遺伝子は、過去の報告を参考として研究者が自ら選択するため、その中に目的とする分化制御因子が必ずしも含まれているとは限らない。近年、バイオインフォマティクス技術によってトランスクリプトームデータから様々な新規疾病関連遺伝子の同定が報告されており (Smalling et al., 2013, Li et al., 2019)、トランスクリプトーム解析は分化制御因子の同定においても有用なツールになると考えられる。

これまで、我々は成熟脂肪細胞を体外培養すると自発的に脱分化し、線維芽細胞様の脱分化脂肪細胞 (DFAT) になることを明らかにしている。また、DFAT を適切な培養条件下で分化誘導すると、骨芽細胞や骨格筋細胞などの間葉系の細胞へと分化するだけでなく、外胚葉に由来する神経細胞へと分化する多能性細胞であることを報告してきた。しかし、DFAT を内胚葉系に由来する肝細胞の分化誘導に成功したという報告はないことから、サイトカインや増殖因子を用いた分化誘導法では肝細胞を取得するのは困難であると考えられている。

本研究では、DFAT から内胚葉由来である機能的な肝細胞を作製することを目的として、まずトランスクリプトーム解析を用いて肝細胞分化制御因子を抽出した。ついで、抽出された因子を遺伝子導入した DFAT が機能的な肝細胞に分化するかを調べた。

### 1) トランスクリプトーム解析による DFAT における肝細胞分化制御因子の抽出

DFAT における肝細胞分化制御因子を抽出する目的で、10 週齢の C57BL/6 マウスの皮下脂肪組織から酵素処理によって単離した成熟脂肪細胞 (AC) および DFAT から RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いてマイクロアレイ解析を行った。肝細胞 (HC) および肝臓由来幹細胞 (RLSC) のマイクロアレイデータは、NCBI が公開している遺伝子発現データベース (GEO) から取得した。まず、肝分化能を有する細胞で特異的に発現する遺伝子を抽出するために、統計解析ソフトウェア「R」を用いて RMA による正規化を行い、TIBCO Spotfire を用いて発現差のあるプローブを抽出した。また、MAS5.0 による正規化処理を行い、Detection (Present/Absent) call によって遺伝子発現の有無を解析した。その結果、AC および DFAT よりも HC および RLSC において発現値が 4 倍以上高いプローブ数は 126 個であった。そのうち、HC および RLSC で発現し、AC および DFAT で発現していないプローブ数は、33 個であった。さらに、細胞の分化制御因子は転写因子であると考えられるため、The PANTHER Classification System から”transcription factor” (Class ID:PC00218) のアノテーション情報を取得し、33 個のプローブから転写因子のアノテーション情報が付与された 4 個のプローブを抽出した。これらの結果、DFAT の肝細胞分化に必要な分化制御因子として、Foxa2、Hnf4a および Sal11 が推定された。

## 2) Foxa2、Hnf4a および Sal11 遺伝子を導入した DFAT における肝細胞特異的遺伝子および機能の発現

まず、1)で抽出された3つの転写因子がDFATにおける肝細胞分化制御因子であるかを調べるために、レトロウイルスベクターを用いてFoxa2 (F)、Hnf4a (H) およびSal11 (S) をDFATに遺伝子導入し、デキサメタゾンおよびニコチンアミドを含む肝分化誘導培地で14日間培養した。肝分化誘導14日後において、肝細胞分化マーカーであるアルブミン (Alb) および $\alpha$ -フェトプロテイン (Afp) の遺伝子発現を調べた結果、FH およびFHS-DFAT では発現が確認されたが、FS-、HS-および各遺伝子を単独で導入したDFAT では発現が認められなかった。次に、FH-DFAT およびFHS-DFAT におけるAlb およびAfp の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで比較した結果、どちらの遺伝子もFHS-DFAT において有意に高い値を示した。また、肝分化誘導後のFHS-DFAT は初代肝細胞に類似した上皮細胞様の形態を示し、肝細胞に特徴的な2核の細胞も観察された。これらの結果は、Foxa2、Hnf4a およびSal11 の3つすべてがDFATを効率的に肝細胞に分化させるために必要であることを示している。我々は、このDFAT由来の肝細胞様細胞をD-Hep (DFAT derived hepatocyte-like cells)と名付けた。

次に、FHS-DFATの肝分化過程における肝細胞分化マーカーの発現をリアルタイムPCRを用いて経時的に調べた。その結果、Alb、Afp およびチロシンアミノトランスフェラーゼ (Tat) の発現は肝分化誘導6日後から有意に増加し、その後も高い値を維持した。トリプトファン-2、3-ジオキシターゼ (Tdo2) の発現は、肝分化誘導の4日後から有意に増加した。さらに、肝分化誘導の14日後のFHS-DFAT (D-Hep) における肝細胞特異的機能の発現を調べた結果、アルブミンの合成、グリコーゲンの貯蔵および低密度リポタンパク質 (LDL) の取り込みが認められた。これらの結果から、D-Hep は成熟肝細胞様細胞の機能を有することが示された。

## 3) D-Hep における Zone 特異的機能の発現

肝臓の組織は多数の肝小葉が集合して構成されている。肝小葉内に配列する肝細胞はその領域 (門脈周辺: Zone 1、中心静脈周辺: Zone 3、それらの中間領域: Zone 2) によって、異なる遺伝子を発現し、特異的な機能をもつことが知られている (Jungermann & Katz 1989)。Zone 1 肝細胞は尿素の生成や糖新生、Zone 3 肝細胞は主に薬物代謝、Zone 2 肝細胞はそれら両方の機能をもつことが明らかにされている。そこで、D-Hep が Zone 1~3 のいずれの肝細胞の特性をもつかを調べる目的で、リアルタイムPCRを用いてFHS-DFATの肝細胞分化過程におけるZone 1 およびZone 3 特異的遺伝子の発現を経時的に調べた。その結果、Zone 1 特異的遺伝子であるオルニチントランスカルバミラーゼ (Ooct) およびホスホエノールピルビン酸カルボキシナーゼ 1 (Pck1) の発現は、肝分化誘導前後において認められなかった。一方で、Zone 3 特異的遺伝子である、ロイシンリッチリピート含有Gタンパク質共役型受容体 5 (Lgr5) は肝分化誘導6日後から、シトクロム P450 (Cyp) -2a5 は肝分化誘導8日後から、Cyp1a2、Cyp2e1 およびCyp7a1 の発現は、肝分化誘導10日後から急速に増加し、肝分化誘導14日後 (D-Hep) において最も高い値を示した。

D-Hep が Zone 3 肝細胞の特異的遺伝子群を発現していることから、Zone 3 肝細胞の特性である薬物代謝能を評価するため、アセトアミノフェン、タモキシフェンおよびトログリタゾンをD-Hepの培養液中に2日間添加して細胞生存率を測定した。その結果、D-Hepの細胞生存率はHCと同様に全ての薬物において著しい低下が認められた。以上の結果から、D-HepがZone 3 肝細胞の特徴をもつことが示唆された。

## まとめ

本研究では、トランスクリプトームデータからDFATの肝細胞分化制御因子として3つの転写因子 (Foxa2、Hnf4a、Sal11 ; FHS) を抽出した。レトロウイルスによってFHSを遺伝子導入したDFATは肝分化誘導培地で培養することによって線維芽細胞様から上皮細胞様へ形態変化し、肝細胞特異的機能を発現した。さらに、DFAT由来の肝細胞様細胞 (D-Hep) はいくつかの化合物の解毒を触媒し、Zone 3 肝細胞に特徴的な薬物代謝能をもつことが示された (図1)。これらのことから、D-Hepは代

用肝細胞の新たな細胞源として有用であり、肝毒性スクリーニングや薬物代謝試験などの創薬研究への応用が期待される。また、トランスクリプトーム解析はダイレクトリプログラミングに必須な分化制御因子の候補遺伝子探索のための強力なツールになると考えられる。

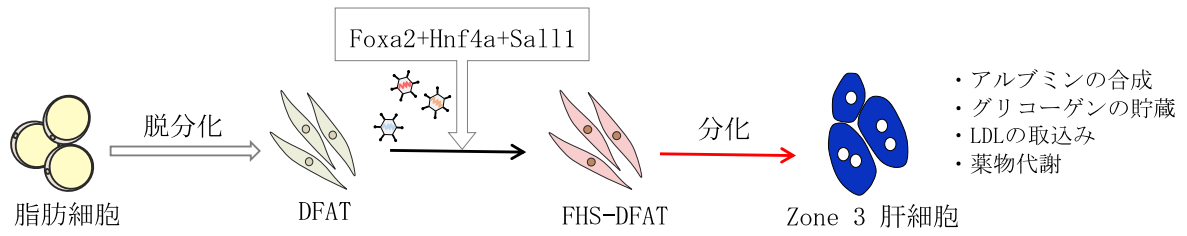


図1 DFATに由来するZone 3 肝細胞の作製