

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：(主 査) 教授 加野 浩一郎

(副 査) 教授 山 室 裕

教授 関 泰一郎

教授 坂 井 学

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。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、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。以上の研究背景から本論文では、成熟脂肪細胞に由来する DFAT から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の抽出を試みている。ついで、抽出された分化制御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について検討している。

第 1 章では、研究の背景について紹介し、研究目的を提示している。

第 2 章では、成熟脂肪細胞に由来する DFAT における肝細胞分化制御因子を抽出する目的で、成熟脂肪細胞 (AC)、DFAT、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を比較解析した。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、発現差のあるプローブを抽出した。

また、Detection 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は、33 個であった。さらに、転写因子のアノテーション情報から 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 Sa111 の抽出に成功した。

第 3 章では、第 2 章において抽出した 3 つの因子が DFAT における肝細胞分化制御因子であるかを調べる目的で、Foxa2 (F)、Hnf4a (H) および Sa111 (S) を遺伝子導入した DFAT を作製し、肝細胞分化誘導 14 日後におけるアルブミン (Alb) および α -フェトプロテイン (Afp) 遺伝子の発現を調べた。その結果、FH および FHS-DFAT ではそれらの遺伝子の発現が認められたが、FS-、HS- および各遺伝子を単独で導入した DFAT ではいずれも発現しなかった。次に、FH-DFAT および FHS-DFAT における Alb および Afp の遺伝子発現量を比較した結果、いずれの遺伝子も FHS-DFAT において有意に高い値を示した。また、肝細胞分化誘導後の 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、DFAT を効率的に肝細胞に分化させるには、Foxa2、Hnf4a および Sa111 の 3 つすべてが必要であることを示している。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。次いで、FHS-DFAT の肝細胞分化過程における肝細胞分化マーカー遺伝子の発現を経時的に調べた。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の発現は肝細胞分化誘導 6 日後から有意に増加し、その後も高い値を維持した。トリプロファン-2,3-ジオキシゲナーゼの発現は、肝細胞分化誘導の 4 日後から有意に増加した。さらに、肝細胞分化誘導後の FHS-DFAT (D-Hep) における肝細胞特異的機能の発現を調べた。その結果、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の取り込みが認められた。以上の結果から、D-Hep は成熟した肝細胞の機能をもつことを明らかにした。また、第 2 および 3 章の結果から、トランスクリプトーム解析によって抽出された 3 つの因子が DFAT における肝細胞分化制御因子であると結論づけている。

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。第 4 章では、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、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およびホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ 1 の発現は、肝細胞分化誘導前後のいずれにおいても認められなかった。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 は肝細胞分化誘導 6 日後から、シトクロム P450 (Cyp) -2a5 は肝細胞分化誘導 8 日後から、Cyp1a2、Cyp2e1 および Cyp7a1 の発現は、肝細胞分化誘導 10 日後から急速に増加し、肝細胞分化誘導 14 日後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に D-Hep の培養液中に添加し、細胞生存率を測定した。その結果、D-Hep の細胞生存率は全ての薬物において著しく低下することが明らかとなった。以上の結果から、D-Hep は Zone 3 肝細胞の特徴をもつと結論づけ

ている。

第5章では、すべての結果について以下のように総括している。本論文では、トランスクリプトームデータから抽出した3つの転写因子（Foxa2、Hnf4a、Sa111；FHS）を遺伝子導入したDFATは、肝細胞分化誘導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）は薬物代謝にかかわる遺伝子を発現し、複数の化合物を解毒したことから、Zone 3肝細胞に特徴的な薬物代謝能をもつことを明らかにした。

以上のように、本論文は、ダイレトリプログラミング技術により成熟脂肪細胞に由来するDFATから機能的肝細胞を作製する方法を確立するとともに、細胞分化の制御因子の探索においてトランスクリプトーム解析の有効性を証明するものである。これらの知見は、細胞生物学およびその応用分野に広く貢献する価値ある集積と認められる。よって本論文は、博士（生物資源科学）の学位を授与されるに値すると判定した。

以 上

令和3年2月22日