

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科 応用生命科学専攻  
博士後期課程

萩原 玲子

2020

## 目 次

第1章 緒 論	1
第2章 網羅的遺伝子発現解析を用いた DFAT（脱分化脂肪細胞） の肝細胞分化制御因子の抽出	7
第3章 Foxa2、Hnf4a および Sall1 を遺伝子導入した DFAT の 肝細胞分化	30
第4章 D-Hep（DFAT 由来肝細胞様細胞）における Zone 特異的機能の発現	65
第5章 総括	91
謝辞	94
参考文献	95

## 第1章 緒論

肝臓は、アルコール代謝、アミノ酸合成、解毒作用など 500 以上の機能を担う体内で最大の臓器である。それらの機能を担う肝細胞は、肝硬変などの慢性肝不全、劇症肝炎、遺伝性肝疾患などの細胞移植治療、毒性試験および薬物動態試験などの創薬研究に貴重な細胞資源として広く利用されている (Gómez-Lechón *et al.* 2004; Azuma *et al.* 2007; Lázaro *et al.* 2007)。肝細胞ソースとして理想的なのは初代肝細胞であるが、倫理および免疫的な問題から患者あるいは臓器提供者から十分量の肝細胞を得ることは困難である。また、初代培養した肝細胞は増殖能力が低いこと、培養数日後には肝細胞特異的機能が急速に低下することから、体外培養条件下で肝細胞の機能を維持し、利用することは困難である (LeCluyse *et al.* 1996; Rogiers & Vercruyssen 1998; Papeleu *et al.* 2003; Papeleu *et al.* 2006; Levy *et al.* 2015)。これらの問題を解決するために、幹細胞のような他の細胞型から、体外培養条件下で正常かつ成熟した機能をもつ肝細胞を大量に調製する培養系の確立が求められている。

初代培養肝細胞に代わる可能性のある細胞として、成体の骨髄や脂肪組織などに含まれる間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSCs) に由来する

肝細胞様細胞がある (Spees *et al.* 2016; Wang *et al.* 2020)。MSCs は高い増殖力をもつことから大量調製が可能であり、肝細胞に類似した特性をもつ肝細胞様細胞へ分化することが報告されている (Yin *et al.* 2015; Guo *et al.* 2017)。しかし、肝細胞分化誘導培地による分化誘導方法では、MSCs から肝細胞様細胞への分化効率は低く、また取得された肝細胞様細胞の機能は、初代肝細胞に比べて低いなど問題点が多く残されている。

iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は、レトロウイルスを用いて 4 つの転写因子 (Sox2、Oct3/4、Klf4、および c-Myc) を皮膚の線維芽細胞に遺伝子導入することにより得られる多能性幹細胞である (Takahashi & Yamanaka 2006)。iPS 細胞は、高い増殖能力と分化万能性を有することから、iPS 細胞から分化誘導された肝細胞は同一ロットでの供給が可能である。しかし、患者あるいは細胞提供者から良質の iPS 細胞を作製する場合、数ヶ月以上を必要とすること、さらに iPS 細胞から成熟した肝細胞へ分化誘導するために 1 ヶ月以上の長期培養を必要とすること、iPS 細胞から肝細胞への分化効率が低いなどの解決すべき問題がある。また、iPS 細胞は ES 細胞（胚性幹細胞）と同様に高い造腫瘍性をもつことが知られている。iPS 細胞から分化誘導して取得した肝細胞の集団中に未分化な細胞が混入すると、移植後に腫瘍形成することから、安全性を慎重かつ精密に調べる必要がある。以上のことから、iPS 細胞か

ら肝細胞を大量に調製し、利用することはコストおよび安全性を考慮すると困難であると考えられている (Song *et al.* 2009; Hannoun *et al.* 2016)。

ダイレクトリプログラミング技術は、これらの問題を解決できる可能性がある。ダイレクトリプログラミング技術とは、分化した体細胞に特定の因子を導入し、iPS 細胞などの多能性幹細胞を経ずに、終末分化した細胞に直接誘導する技術であり (Shiota & Yasui 2012)、iPS 細胞を作製するプロセスが省略されるため、短時間かつ効率的に目的とする分化細胞を調製できることが報告されている (Kelaini *et al.* 2014)。また、ダイレクトリプログラミング技術では、すでに分化した体細胞を用いて肝細胞を取得するため、造腫瘍性をもたないことから、iPS 細胞や ES 細胞に比べて安全性が高いことが示されている (Ring *et al.* 2012)。

これまで、マウス線維芽細胞に異なるいくつかの転写因子を強制発現させることにより、誘導性肝細胞 (induced hepatocyte-like cells: iHep) と呼ばれる肝細胞様細胞に直接変換する技術が開発されている。Huang らは、レンチウイルスベクターを用いた Gata4、Hnf1a および Foxa3 の遺伝子導入と p19Arf の不活性化によりマウス尾端から採取した線維芽細胞を iHep に変換できることを示した (Huang *et al.* 2011)。また、Sekiya らはマウス胎仔由来の線維芽細胞において Hnf4a および Foxa2 が iHep へ分化させるために必

須要因であることを明らかにした (Sekiya & Suzuki 2011)。さらに、最近の研究ではダイレクトリプログラミング技術を用いて、ヒト線維芽細胞および脂肪由来幹細胞からヒト iHep を作製できることが報告された。Du らは、HNF4A、HNF6、ATF5、PROX1 および CEBPA の遺伝子導入によりヒト iHep の作製に成功した。また、Huang らは、FOXA3、HNF1A、および HNF4A の遺伝子導入によるヒト iHep の作製を報告した (Du *et al.* 2014; Huang *et al.* 2014; Nakamori *et al.* 2017)。これらの報告は、細胞型によって異なる肝細胞分化制御因子の組み合わせがあることを示している。したがって、機能的な肝細胞を作製するには、最も効果的な因子の組み合わせを同定することが重要である。

これまでの研究において、肝細胞分化制御因子をスクリーニングするために、肝発生から肝細胞の終末分化までに発現する転写因子からその候補遺伝子が選抜されている (Huang *et al.* 2011; Sekiya & Suzuki 2011)。しかしながら、この方法では、ウイルスベクターを用いて全ての候補遺伝子の組み合わせを細胞に遺伝子導入し、肝細胞分化の成否をスクリーニングする必要があるため、多くの時間と労力を要する。最近、網羅的な遺伝子発現解析技術を駆使することによって、肝臓疾患や心臓疾患に関連する新規の遺伝子群が同定された (Smalling *et al.* 2013; Li *et al.* 2019)。このことから網羅的な遺伝子発現

解析は、終末分化した体細胞から異なる細胞へ分化転換させるために必要と予測される候補遺伝子を効率的に抽出でき、肝細胞分化制御因子の同定に対しても有用なツールとなると考えられる。

一般的に、哺乳類において、終末分化した細胞は脱分化しないと考えられてきた (Brookes & Kumar 2005; Carlson 2005)。しかし、当研究室では、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養することにより脱分化が誘導され、この細胞株、Dedifferentiated fat cells (DFAT) は、脂肪組織の間質-血管画分に存在する脂肪由来幹細胞 (ASC) に類似した増殖および多分化能力をもつことが確認され、*in vitro* および *in vivo* において、細胞特異的分化誘導剤や特定の細胞環境を付加することにより、骨芽細胞、軟骨細胞、心筋細胞、血管内皮細胞、骨格筋細胞および神経細胞へと分化転換することも明らかにされた (Yagi *et al.* 2004; Kazama *et al.* 2008; Matsumoto *et al.* 2008; Nobusue *et al.* 2008; Oki *et al.* 2008; Yamada *et al.* 2014)。DFAT は自身の体から採取した少量の脂肪組織から均質、かつ大量調製できる多能性細胞であり、臓器不全に対する創薬研究や細胞移植治療への応用展開が開始されている。しかし、中胚葉系である成熟脂肪細胞に由来する DFAT は自身の分化系譜である中胚葉および外胚葉由来の細胞への分化は報告されているが (Wei *et al.* 2013)、内胚葉系譜である肝細胞への分化について、未だ報告はない。

これまで、ダイレクトリプログラミング技術によって体細胞から作製された肝細胞は増殖を停止しており、継代培養して継続的に利用することは困難であることから、永続的な増殖能力および肝細胞への分化能力をもつ前駆肝細胞の作製が必要である。ダイレクトプログラミング技術により、機能的な肝細胞に分化可能な DFAT を作製する培養系の確立は、成熟脂肪細胞から前駆肝細胞を安定的に大量調製することを可能とし、その結果として安全性の高い肝細胞を効率的かつ継続的に取得できることに繋がる。

本研究では、脱分化脂肪細胞 DFAT から内胚葉系譜である機能的な肝細胞を作製することを目的とし、ダイレクトリプログラミング技術を用いた迅速かつ効率的な肝細胞分化制御因子の探索および抽出を行なった。ついで、候補遺伝子を導入した DFAT を肝細胞分化誘導した結果、アルブミン合成能や薬物代謝能などの機能をもつ肝細胞に分化した。これらの結果は、ダイレクトリプログラミング技術により、DFAT が今まで成し得なかった内胚葉系譜の異なる機能をもつ細胞種への分化を可能とするものである。



## 第 2 章 網羅的遺伝子発現解析を用いた DFAT (脱分化脂肪細胞)

### の肝細胞分化制御因子の抽出

#### 緒言

ダイレクトリプログラミング技術により、マウスやヒト線維芽細胞から誘導性肝細胞 (iHep) を作製できることがいくつかの研究で報告されている (Huang *et al.* 2011; Sekiya & Suzuki 2011; Du *et al.* 2014; Nakamori *et al.* 2017)。Sekiya らはマウス胎仔線維芽細胞において Hnf4a および Foxa2 が iHep へ分化させるために必須要因であることを明らかにした。これらの肝細胞分化制御因子は、最初に肝細胞分化に重要と考えられる遺伝子を既報から 12 個 (Hex, Gata4, Gata6, Tbx3, Cebpa, Hnf1a, Hnf1 $\beta$ , Foxa1, Foxa2, Foxa3, Hnf4a, Hnf6) 選抜し、それらの候補遺伝子の全てを挿入したウイルスベクターを導入した細胞が肝細胞に分化するかを調べている。それらの候補遺伝子が肝細胞に分化誘導できることが確認されたら、次に、12 個の候補遺伝子を一つずつ間引いたウイルスベクターを導入して肝細胞へ分化するかを指標とする長期間のスクリーニングにより、候補遺伝子を絞り込んだ結果として 3 つの肝細胞分化制御遺伝子が同定されている。このように、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、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を長期間繰り返すことによって行われている。しかしながら、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、過去の論文を参考に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含まれる可能性は低い。また、分化制御因子は複数個の組合せによってリプログラミング効果を示すことから、最適な組合せを探索することは著しく困難である。したがって、本研究ではトランスクリプトーム解析を用いた分化制御因子の抽出および同定を試みた。

本章では、DFAT における肝細胞分化制御因子を同定する目的で、成熟脂肪細胞 (Adipocyte: AC)、DFAT、肝細胞 (Hepatocyte: HC)、肝幹細胞 (Resident liver stem cells: RLSC) の遺伝子発現データを解析した (図 1)。RLSC は、胎仔および新生仔マウスの肝臓に由来し、*in vitro* で高い増殖能と肝細胞および胆管上皮細胞への分化能を有する肝幹細胞である (Conigliaro *et al.* 2008)。DFAT と HC のマイクロアレイデータを比較解析することで、DFAT における肝細胞分化制御因子を抽出できると考えられる。しかし、HC は成熟肝細胞の機能に関連する遺伝子も多く発現しているため、RLSC のマイクロアレイデータを追加することで、肝細胞分化に必要な遺伝子のみを候補遺伝子として絞り込めると考えた。また、成熟脂肪細胞から DFAT

へと脱分化する過程において、多能性をもつ DFAT は種々の細胞の分化制御にかかわる分化初期マーカー遺伝子を発現するが、HC の分化制御にかかわる複数の転写因子遺伝子も発現する (Ono *et al.* 2011)。このことから、それらの DFAT で発現する HC の分化制御にかかわる転写因子遺伝子を除外するために、さらに AC のマイクロアレイデータを追加して解析に用いた。

まず、HC、RLSC、AC および DFAT の類似性を明らかにするために、相関解析、主成分分析およびクラスタリングを行なった。次いで、発現変動解析および Absent call 解析で共通する転写因子を抽出し、DFAT における肝細胞分化制御因子の抽出を試みた。

## 材料および方法

### マイクロアレイデータの取得

マウス AC の単離は、Nobusue and Kano (2008) の方法に準じて行った。マウス前駆脂肪細胞株 DFAT は、GFP トランスジェニックマウスの未分化成熟脂肪細胞から天井培養（脂肪滴を有する脂肪細胞を油滴の浮力に基づいて培養する方法）により樹立された (Nobusue *et al.* 2008)。Total RNA は、TRIzol (Invitrogen) および RNeasy Mini Kit (Qiagen) を Invitrogen 社および Qiagen 社の推奨方法に準じて使用し、DFAT およびマウス AC から抽出した。Total RNA の品質は、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) を使用して評価した。AC および DFAT の total RNA を、GeneChip One-Cycle Target Labeling and Control Reagent パッケージ (Affymetrix) を使用して標識し、Affymetrix 社の推奨方法に準じて 45101 個のプローブを検出できる Affymetrix GeneChip Mouse Genome Array にハイブリダイズさせた。シグナル強度のスキャンには、GeneChip Scanner 300 (Affymetrix) を使用した。発現データおよび生の発現データ (CEL ファイル) は、GeneChip Operating System software (Affymetrix) を使用して作成した。マイクロアレイデータは、公開および自由に利用可能なプラッ

トフォームである国立生物工学情報センター (NCBI) の Gene Expression Omnibus (GEO、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) (Barrett *et al.* 2009)に寄託され、GEO シリーズのアクセッション番号 GSM4732619、GSM4732620、GSM4732621、GSM4732622、GSM4732623、GSM4732624 (Series GSE156495) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE156495>) から取得できる。

### マイクロアレイ解析

遺伝子発現プロファイリングは、AC、DFAT、HC、RLSC およびマウス胎仔線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast : MEF) からの Total RNA サンプルについて行った。HC、RLSC および MEF のマイクロアレイデータセット (GSM785818、GSM785819、GSM785820、GSM162863、GSM424478、GSM424479 および GSM424480) を NCBI の GEO から取得した。マイクロアレイ実験によって得られた各サンプルの数値データは、確率的、統計学的に相互作用を比較するために正規化を行った。正規化は、Bioconductor package affy (<http://www.bioconductor.org/packages/2.0/bioc/html/affy.html>)

を使用して、R ([http:// www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)) で行った。正規化の方法は、RMA (robust multiarray average) を用いた。Absolute value は mas5calls 関数を用いて行った。相関係数の算出、主成分分析および階層的クラスタリングは R を用いて行った。階層的クラスタリングのクラスター間距離算出法には、他の距離関数に比べ分類感度の高いウォード法を用いて行った。Fold change 解析 ( $>\log_2^2$ ) には、Spotfire DecisionSite for Functional Genomics software package (TIBCO Software) を用いた。転写因子のアノテーションは、PANTHER Classification System database (Thomas *et al.* 2003) の PANTHER protein class Ontology browser を用いて、mus musculus の「Transcription factor」(PC00218) から取得した。Absolute value、Fold change 解析で共通するする転写因子を肝細胞分化の制御因子として推定した。

## 結果

DFAT における肝細胞分化の制御因子を同定するために、HC、RLSC、AC および DFAT の遺伝子発現プロファイルを解析した (図 1)。肝細胞分化制御因子の解析に先立って、マイクロアレイデータの再現性およびそれらを用いた比較解析の妥当性を検証するために、マイクロアレイデータの包括的評価を行った。HC、RLSC、AC および DFAT のマイクロアレイデータの相関係数を図 2 に示した。DFAT および AC、DFAT および HC の比較では、低い値が示されたのに対し、DFAT および RLSC の比較では、 $r=0.93$  という高い相関係数を示した。ついで、HC、RLSC、AC および DFAT のそれぞれに対する主成分分析の結果を図 3 に示した。第一主成分 (PC1) の寄与率は、42.2%を占め、第二主成分 (PC2) の寄与率は 41.4%であった。HC、AC および RLSC のバイオロジカルレプリケートは近接する位置にプロットされた。DFAT は、AC および HC とは大きく離れた位置にプロットされた一方、肝分化能をもつ RLSC とは近い位置にプロットされた。さらに、HC、RLSC、AC および DFAT のそれぞれに対する階層的クラスタリングの結果を図 4 に示した。クラスターの作成にはウォード法を用いた。HC、AC および DFAT は異なるクラスターに分類されたが、DFAT および RLSC は同一のクラスターに分類された。これらの結果は、DFAT と

RLSC が類似した遺伝子発現プロファイルを持つことを示し、HC、RLSC、AC および DFAT のマイクロアレイデータを解析することで、DFAT における肝細胞分化制御因子を抽出できることを示唆している。

肝細胞分化に特異的な遺伝子を抽出するために、HC および RLSC での発現が高いプローブを抽出した。抽出の際、発現が 4 倍以上高いプローブを発現差があるとした。AC と比較して、HC ではそれぞれ 1626 個のプローブが発現増加していた。一方、RLSC では、2636 個のプローブが発現増加した。

DFAT と比較して、HC では、1418 個のプローブが発現増加していた。一方、RLSC では、1042 個のプローブが発現増加した。これら 4 つのグループ (HC>AC、RLSC>AC、HC>DFAT、および RLSC>DFAT) で共通するプローブは 126 個であった (図 5)。

HC および RLSC で高発現した遺伝子の数を正確に判断するためには、偽陽性の遺伝子を除く必要がある。発現レベル (シグナル) が、信頼できる検出感度を下回った場合、その遺伝子は発現していないと定義される。MAS5.0 による absent calls を用いて、どの遺伝子が信頼できる発現値を示しているかを調べた。発現している場合は「P」(present)、発現していない場合は「A」(absent) で示される。AC と比較して、HC ではそれぞれ 18031 個のプローブが発現していた。一方、RLSC では、21402 個のプローブが発現した。



DFAT と比較して、HC では、19275 個のプローブが発現していた。一方、RLSC では、19599 個のプローブが発現した。これら 4 つのグループ (HC\_A、RLSC\_AC、HC\_DFAT、および RLSC\_DFAT) で共通するプローブは 164 個であった (図 6)。

次に、2 つの比較分析で共通したプローブを調べた結果、33 個のプローブが抽出された。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 Sall1 が抽出された。(Hnf4a は複数のプローブセットで示されていた) (図 7)。これらの転写因子の発現状況を比較した結果、抽出された転写因子の発現は、HC より RLSC で発現が低いことが示された (図 8)。

本章で試みた遺伝子発現プロファイルの網羅的解析が肝細胞分化制御因子の抽出に有効であるかを調べるために、マウス胎児線維芽細胞 (MEF) に由来する iHep における肝細胞分化制御因子 (Sekiya & Suzuki 2011) の抽出を MEF の遺伝子発現プロファイルを用いて試みた。HC、RLSC、AC および MEF のマイクロアレイデータを使用して、同様に網羅的解析を行った。その結果、

AC および MEF 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 153 個であった。そのうち、HC および RLSC で発現し、AC および MEF で発現していないプローブ数は、124 個であった。さらに、124 個のプローブから転写因子を抽出した結果、3 つのプローブが抽出され、これらは Hnf4a および Foxa2 であった (図 9)。これらの転写因子は、iHep の作製に必要とされる分化制御因子と完全に一致した (Sekiya & Suzuki 2011)。これらの結果は、本研究で用いた網羅的解析が肝細胞分化制御因子の抽出に有効であることを示している。

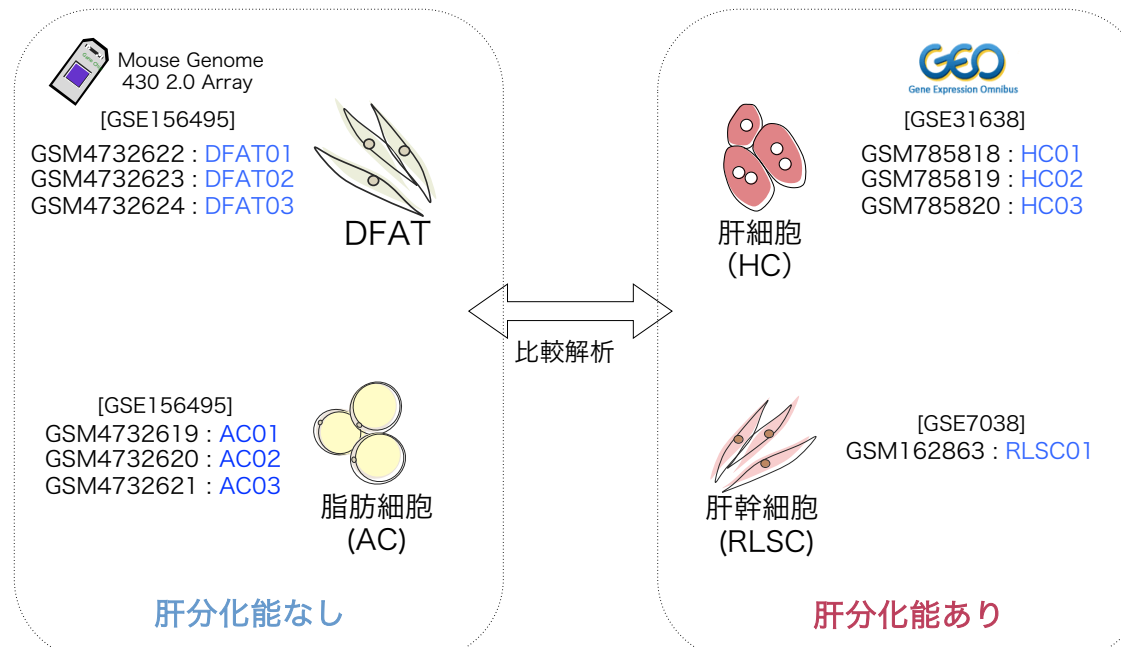


図 1. 比較解析に用いたマイクロアレイデータ

DFAT における肝細胞分化制御因子を同定するために、肝分化能を持たない AC と DFAT、肝分化能を持つ RLSC と HC のマイクロアレイデータを用いた。

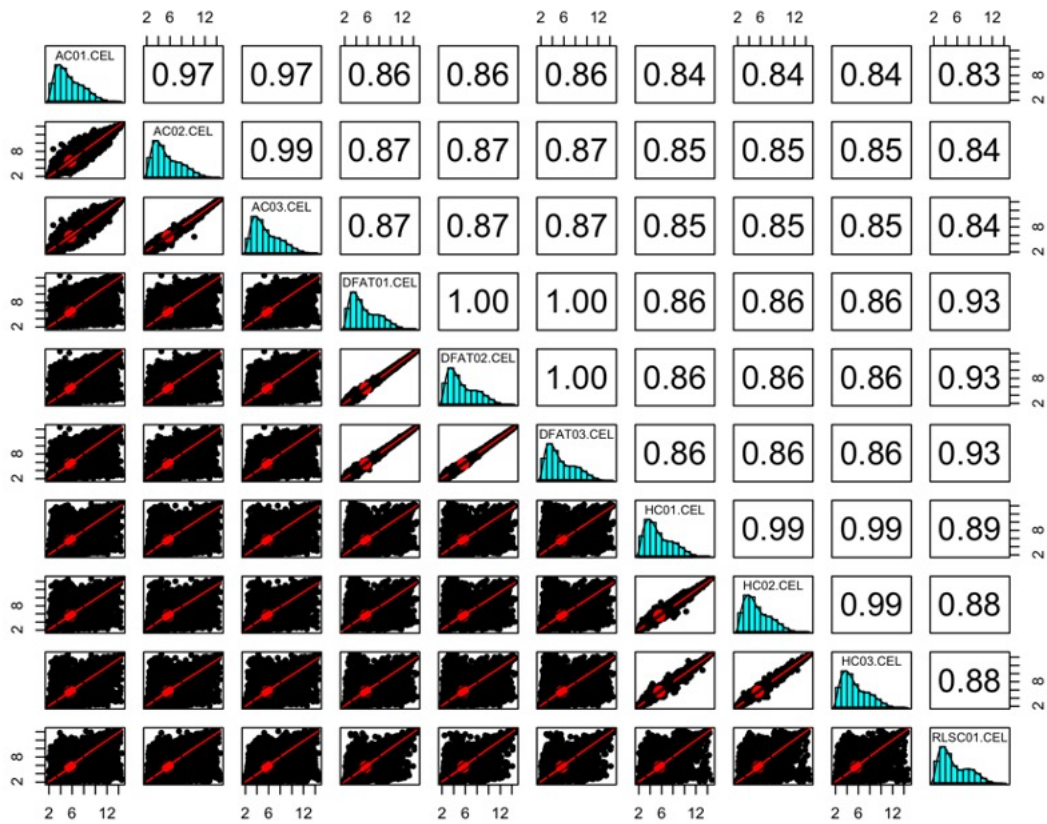


図2. AC、DFAT、HC および RLSC における相関解析

AC、DFAT、HC および RLSC のそれぞれに対する相関解析の結果を示した。下三角形のグラフは各サンプルの散布図を表し、赤線は lowess 曲線を示す。上三角形のグラフは相関係数を表す。対角のグラフは、各サンプルのヒストグラムを表した。

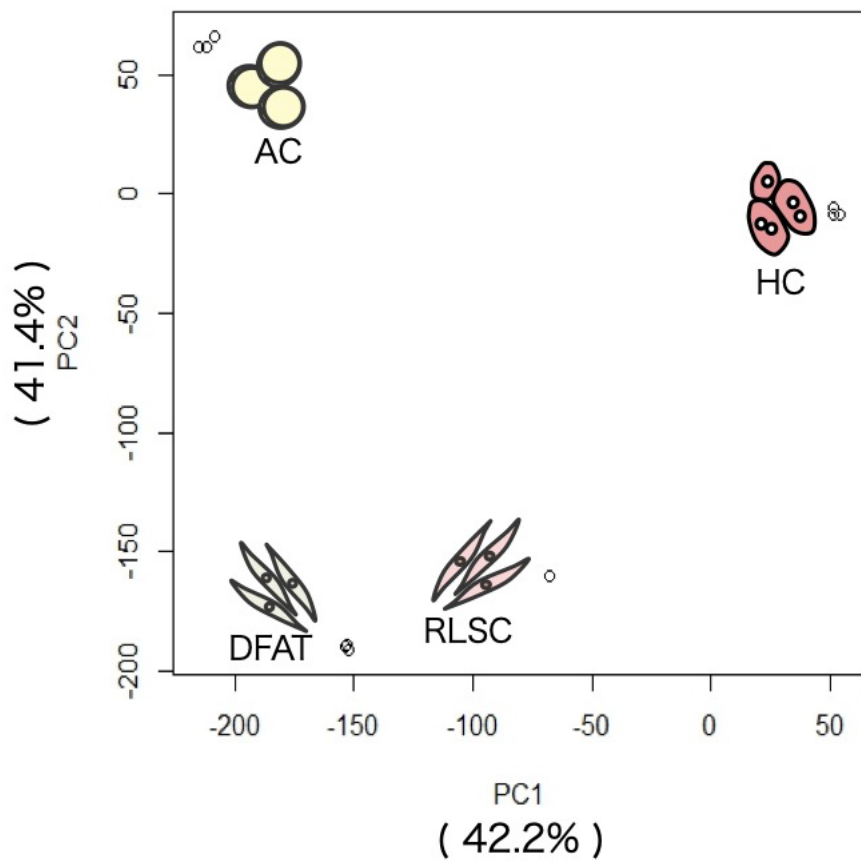


図 3. AC、DFAT、HC および RLSC における主成分分析

AC、DFAT、HC および RLSC の主成分分析の結果を示した。第 1 主成分(PC1)の寄与率は 41.4%、第 2 主成分 (PC2) の寄与率は 42.2%であった。

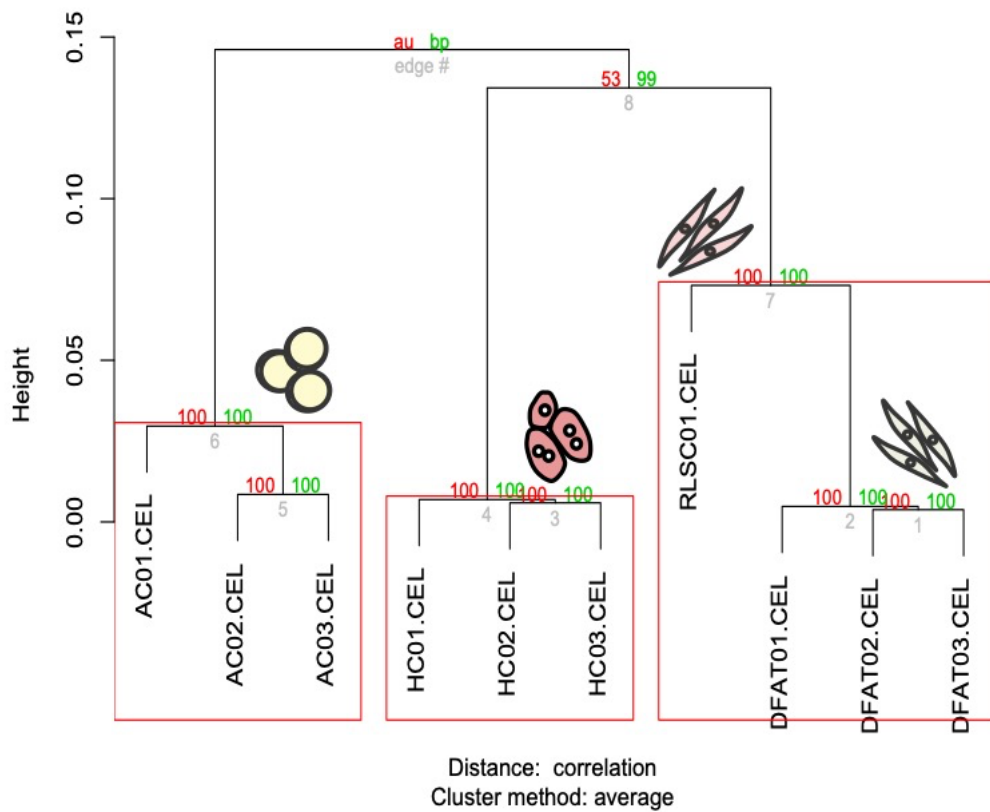


図 4. AC、DFAT、HC および RLSC における階層的クラスタリング

AC、DFAT、HC および RLSC におけるマイクロアレイデータの階層的クラスタリングの結果を示した。デンドログラム上の数値は、AU p-値 (赤), BP 値 (緑)を示した。赤枠はブートストラップ法により、信用度の高いクラスターを解析した結果を示す。クラスターの作成にはワード法を用いた。

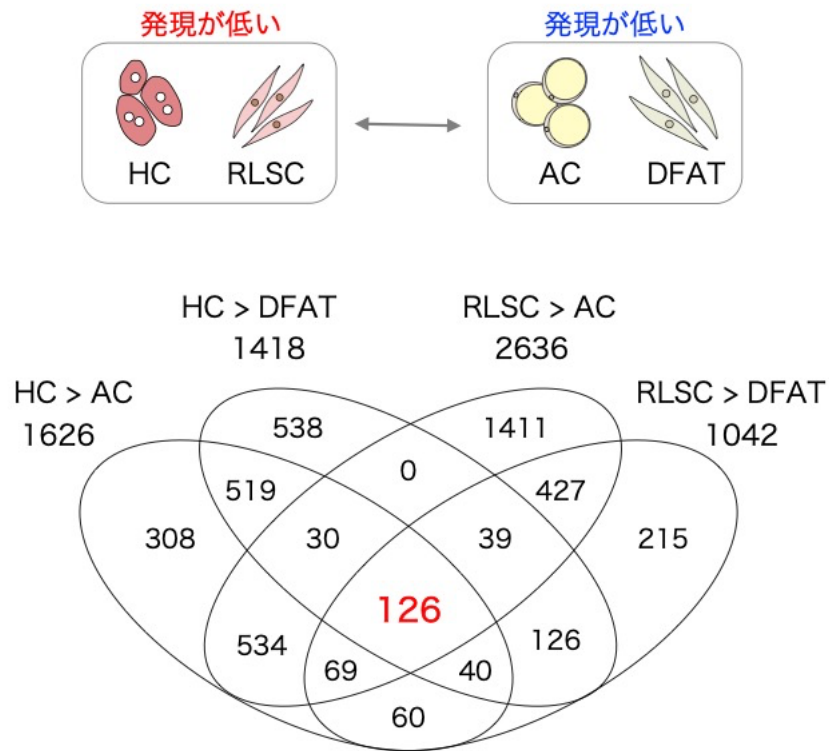


図 5. Fold change 解析

ベン図は、Fold change解析によって抽出された共通のプローブ数を示す。

HC > AC ; ACよりHCで4倍以上発現が高いプローブ、RLSC > AC ; ACよりRLSCで4倍以上発現が高いプローブ、HC > DFAT ; DFATよりHCで4倍以上発現が高いプローブ、RLSC > DFAT ; DFATよりRLSCで4倍以上発現が高いプローブを示す。

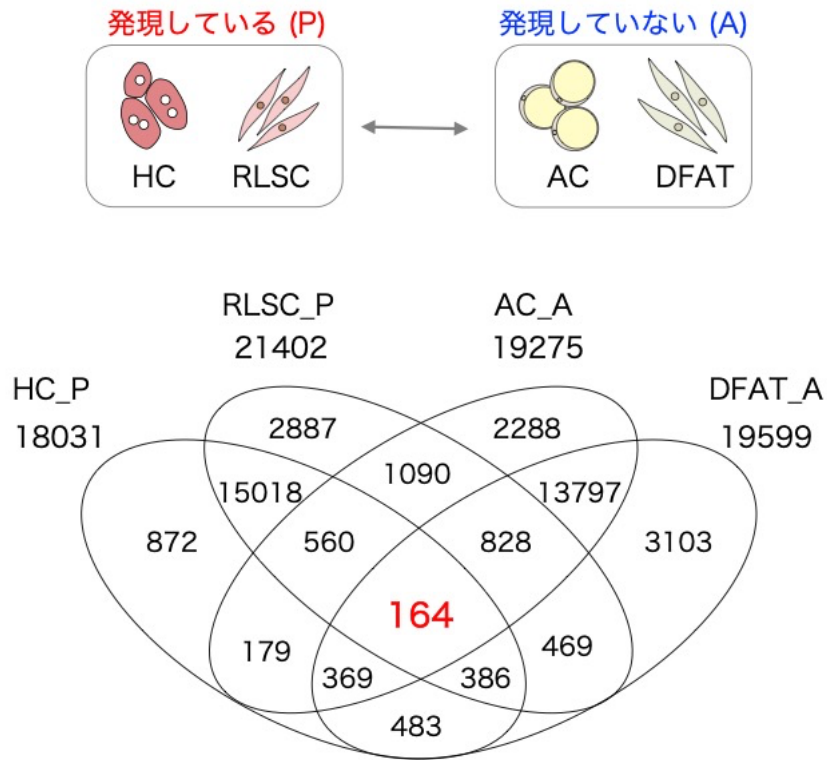


図 6. Absent call 解析

ベン図は、Absent call 解析によって抽出された共通のプローブ数を示す。

HC\_P : HC で発現しているプローブ、RLSC\_P : RLSC で発現しているプローブ、AC\_A : AC で発現していないプローブ、DFAT\_A : DFAT で発現していないプローブを示す。



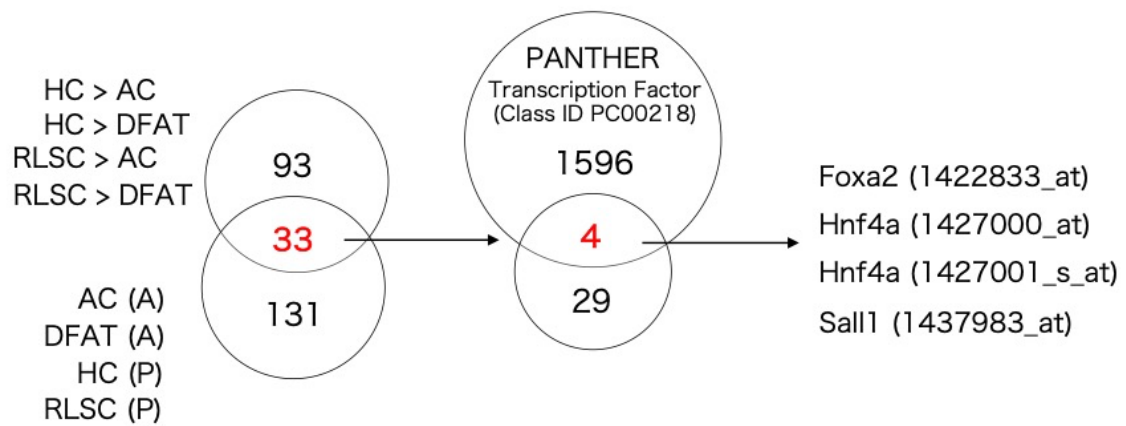


図 7. 共通遺伝子の解析

左のベン図は、HC および RLSC で発現が高いプローブ（図 5）と HC および RLSC で発現しているプローブ（図 6）で共通するプローブ数を示す。右のベン図は、共通するプローブのうち転写因子のプローブを示す。「Transcription Factor」（Class ID : PC00218）のアノテーション情報は、PANTHER Classification system から取得した。

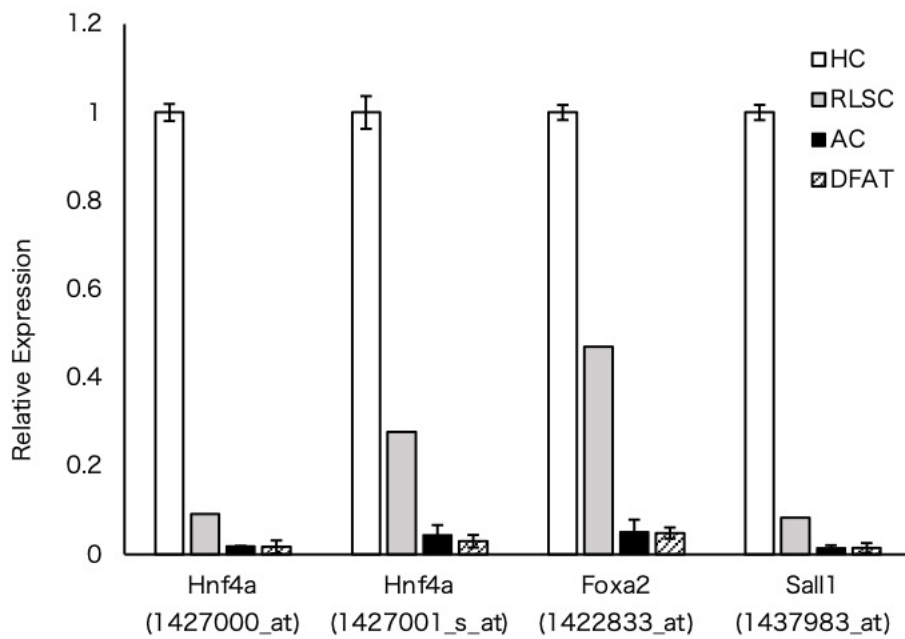


図 8. 抽出された転写因子の発現状況

マイクロアレイデータの値を用いて、各細胞における Hnf4a、Foxa2 および Sall1 の遺伝子発現状況を比較した。肝細胞での発現値を 1 とした。

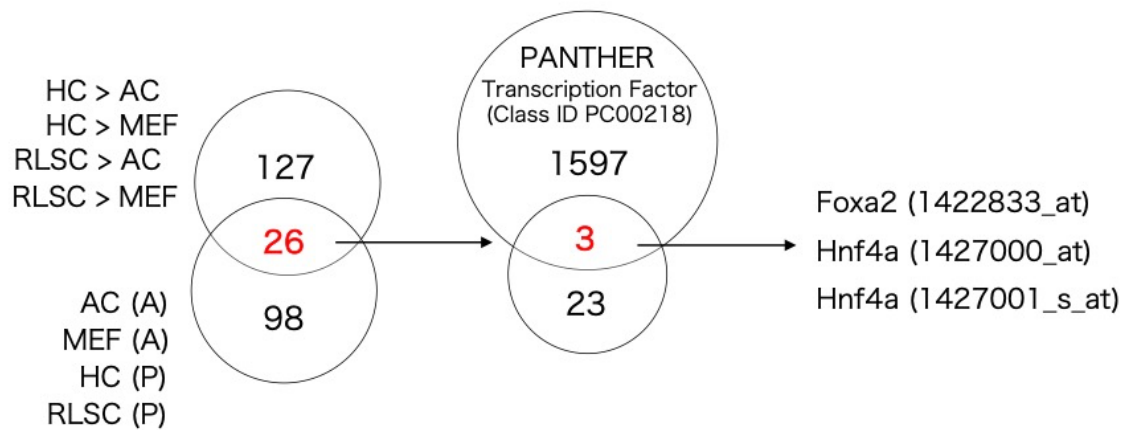


図 9. MEF の遺伝子発現データを使用した肝細胞分化制御遺伝子の抽出

左のベン図は、AC および MEF よりも HC および RLSC で発現が高いプローブ数と AC および MEF で発現しておらず HC および RLSC で発現しているプローブ数で共通するプローブ数を示す。右のベン図は、共通するプローブのうち転写因子のプローブを示す。「Transcription Factor」(Class ID : PC00218) のアノテーション情報は、PANTHER Classification system から取得した。

## 考察

ダイレクトリプログラミング技術は肝細胞を取得する上で有効であるが、分化制御因子の抽出および同定が困難であることがボトルネックとなっていた。本章では、RLSC、HC、DFAT および AC の遺伝子発現プロファイルを網羅的解析を駆使することによって、DFAT における肝細胞の分化制御因子の抽出に始めて成功した。このことは、従来のスクリーニング方法に比べて著しく短時間で客観性の高い肝細胞の分化制御因子を抽出できることを示している。また、本章で用いた網羅的遺伝子発現解析の精度と有用性を調べる目的で、iHep の作製で用いたマウス胎仔由来の線維芽細胞、RLSC、HC および AC の遺伝子発現プロファイルを同様の方法で解析した結果、Hnf4a および Foxa2 が抽出された（図8）。この結果は、遺伝子発現プロファイルを用いた網羅的解析の精度の高さと有用性の広さを示しており、ダイレクトリプログラミング技術における分化制御因子の抽出に遺伝子発現プロファイルの網羅的解析が有効であると考えられる。

本研究では、従来のダイレクトリプログラミング法のように DFAT に肝細胞の機能を発現させるのではなく、DFAT に前駆肝細胞の特性を付与したいと考えた。このことから、DFAT の肝細胞分化制御因子は、RLSC および HC の

両方で発現し、DFAT および AC では発現していない転写因子であると仮説を立てた。DFAT に前駆肝細胞の特性を付与する場合、RLSC で発現するが、DFAT で発現していない遺伝子の抽出が必須となる。しかしながら、DFAT は多能性をもつことから、RLSC および HC で発現する遺伝子を発現している可能性が高い。そのため、それらの遺伝子を排除するために HC の遺伝子発現プロファイルを用いた。RLSC では発現していないが、HC に分化すると発現変動する遺伝子が存在する。すなわち、分化すると共通して発現変動する遺伝子を排除することにより、肝細胞に分化するために必要な遺伝子を減らすことが可能となる。さらに、遺伝子を絞り込むため、DFAT の由来である AC の遺伝子発現プロファイルも用いて比較解析を行なった。その結果、DFAT を機能的な肝細胞に分化させるために必要と推定される Foxa2、Hnf4a、および Sall1 の 3 つの因子を抽出することに成功した。

## 小括

本章では、まず、HC、RLSC、DFAT および AC におけるマイクロアレイデータの再現性およびそれらを用いた比較解析の妥当性を検証するために、これらのマイクロアレイデータにおける相関係数、主成分分析およびクラスタリングを行なった。その結果、DFAT および RLSC は、 $r=0.93$  という高い相関係数を示し、主成分分析においても、AC および HC は大きく離れた位置にプロットされた一方で、DFAT および RLSC は近い位置にプロットされた。また、クラスタリングでは、DFAT および RLSC は同一のクラスターに分類された。したがって、DFAT と RLSC が類似した遺伝子発現プロファイルを持つことが明らかとなった。

次に、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、TIBCO Spotfire を用いて発現差のあるプローブを抽出した。また、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、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”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 の肝細胞分化制御因子として、Foxa2、Hnf4a および Sall1 が抽出された。

### 第3章 Foxa2、Hnf4a および Sall1 を強制発現した DFAT の肝細胞分化

#### 緒言

第2章において、網羅的遺伝子発現解析による肝細胞分化制御因子の抽出は客観性が高い方法であり、高い精度で抽出できることを示したが、抽出された Hnf4a、Foxa2 および Sall1 の3つ候補遺伝子が DFAT を機能的な肝細胞分化へと分化誘導できるかは明らかではない。

肝臓は、脂質代謝や糖代謝、胆汁酸やアルブミン (Alb) の生産・分泌、薬物代謝等、多様な機能を有する。そのため、DFAT から分化誘導した肝細胞の機能を評価するにあたっては、様々な機能を検討する必要がある。分化誘導肝細胞の評価としては、肝細胞の形状、肝関連遺伝子・タンパク質の発現、Alb 産生能をはじめとする肝機能が挙げられる (Asahina *et al.* 2004; Cai *et al.* 2007; Basma *et al.* 2009; Duan *et al.* 2010)。分化誘導肝細胞の形状としては、肝細胞に特徴的な構造の形成度合が評価基準とされる (Basma *et al.* 2009)。また、初期肝細胞マーカーである  $\alpha$ -フェトプロテイン (Afp) や初期～成熟肝細胞分化マーカーである Alb、各種 cytochrome P450 (CYP) などの遺伝子発現量や、Alb 産生、尿素産生 (Duan *et al.* 2010)、グリコーゲン貯



蔵 (Duan *et al.* 2010; Takayama *et al.* 2012)、低密度リポタンパク

(LDL) の取り込み能 (Cai *et al.* 2007; Takayama *et al.* 2012) なども評価対象となり、これらを初代培養肝細胞と比較検討することで分化誘導肝細胞の機能的評価となる。

本章では、第 2 章で抽出された 3 つの候補遺伝子 (Hnf4a、Foxa2 および Sall1) が DFAT における肝分化に必須な因子であるかを確認する目的で、Foxa2、Hnf4a および Sall1 の配列をもつレトロウイルスベクターを作製し、3 つの候補遺伝子を単独または複数組み合わせで遺伝子導入した DFAT を作製した後、肝細胞分化誘導し、候補遺伝子のスクリーニングを行なった。肝細胞分化の評価は、肝細胞分化誘導後における細胞形態、肝細胞特異的遺伝子および機能の発現を用いた。

## 材料および方法

### レトロウイルスベクターの作製

マウスFoxa2、 Hnf4aおよびSall1の完全長cDNAクローンはORIGENE (MR227354、 MR227662、 MC203471) より入手した。各cDNAクローンをテンプレートにRT-PCR法を用いて、BamHIとNotIの配列を付与したプライマーで完全長cDNA配列を増幅した。増幅したDNAフラグメントをエタノール沈澱で精製し、TAクローニング法を用いて、pBluescript SK (+)ベクターに挿入した。さらに、これらのベクターを制限酵素BamHIおよびNotI (NEB) で処理することで、Foxa2、 Hnf4aおよびSall1の各フラグメントを切り出し、同様の制限酵素で処理したpMEFレトロウイルスベクターに挿入し、 pMEF-Hnf4a-IH、 pMEF-Foxa2-IPおよびpMEF-Sall1-IBを作製した。また、対照区用として、pMEF-GFP-IBを作製した。すべての過程における制限酵素処理では、サーマルサイクラーで37°C15分インキュベートすることによってプラスミドを切断した。制限酵素処理したフラグメントは、1%アガロース電気泳動にて分離した。分離後、必要フラグメント部分のバンドをゲルごと切り出し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を使用してゲルから

DNAを抽出した。DNAの精製は、エタノール沈澱にて行った。その後、DNA Quick Ligation Kit (NEB) を用いてDNAを連結させた。

### 遺伝子導入

pMEFベクターはPlat-Eパッケージング細胞 (Morita *et al.* 2000) に電気穿孔法を用いて導入し、プライマリアディッシュ (Corning) に播種した。48時間後の培養上清を同量の10% FBS添加DMEMおよび6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  プロタミンと混合し、0.45  $\mu\text{m}$ のフィルター (Millipore) で滅菌したのち、6ウェルプレート (Corning) に播種したDFAT ( $3 \times 10^4$  cells/well) に添加し、24時間培養した。同様の操作を繰り返し、さらに24時間培養した。その後、10%FBS添加DMEMに培地を交換して、1週間培養し、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ブラストサイジン (Wako) 、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ピューロマイシン (Nacalai tesque) および50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ハイグロマイシン (Nacalai tesque) を添加した10% FBS添加DMEMで1週間セレクションを行うことで、遺伝子導入された細胞のみを選別した。

## DFAT の培養

DFAT およびレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した DFAT を以下の方法で培養した。10 % (v/v) ウシ胎児血清 (FBS : Moregate BioTech)、3.5 mg/ml グルコース (Wako)、1.8 mg /ml 炭酸水素ナトリウム (NaHCO<sub>3</sub> : Wako) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM : Nissui Pharmaceutical) を、DFAT の最終濃度が  $1 \times 10^5$  cells/ml になるように調整した。この細胞懸濁液をコラーゲンタイプ I-C (Nitta) でコートした 40 mm の組織培養皿 (TPP) に 2 ml ずつ分注し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相下の炭酸ガス培養装置内に静置した。

## 肝細胞分化誘導

DFAT およびレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した DFAT は肝細胞分化誘導のために、コンフルエントまで増殖させた。DFAT の肝細胞分化誘導方法を表 1 に示す。

(a) DFAT の培地を SHM+YAC (Chen et al., 2012) と呼ばれる、5 mM HEPES (Sigma-Aldrich)、30 mg/L L-プロリン (Sigma-Aldrich)、0.05 % BSA (Sigma-Aldrich)、10 ng/ml Epidermal growth factor (EGF : PeproTech)、1% insulin-transferrin-serine (ITS-X : Gibco)、10

$7 \times 10^{-6}$  M デキサメタゾン (Dex : Sigma-Aldrich)、10 mM ニコチンアミド (Wako)、1 mM アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich)、10 mM Y-27632 (Wako)、0.5 mM A-83-01 (Wako) および 3 mM CHIR99021 (Axon Medchem) を添加した  $\text{NaHCO}_3$  および L-グルタミンを含む DMEM/F12 (Gibco) に交換し、分化誘導した。分化誘導 2 日後に、培地を 20 ng/mL オンコスタチン M (OsM : R&D systems)、 $10^{-6}$  M Dex および 500 ng/ml R-spondin1 (PeproTech) を添加した SHM+YAC に交換し、さらに 12 日間培養した。分化誘導培地は、2 日ごとに交換した。

(b) DFAT の培地を 5 mM HEPES、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン (Roche)、0.1  $\mu\text{M}$  Dex、10 mM ニコチンアミド、2 mM L-グルタミン (Wako)、50  $\mu\text{M}$   $\beta$ メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich)、20 ng/ml Hepatocyte growth factor (HGF : PeproTech)、20 ng/ml EGF (PeproTech) を添加した 3.5 mg/ml グルコース、1.8 mg /ml  $\text{NaHCO}_3$  を添加した DMEM に交換し、14 日間分化誘導した。分化誘導培地は、2 日ごとに交換した。

(c) DFAT の培地を 10% FBS、200 mM L-グルタミン、50 ng/ml EGF、20 ng/ml Insulin-like growth factor II (IGF-II : PeproTech) 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン、0.25  $\mu\text{M}$  Dex を添加した RPMI1640 (Gibco) に交換し、分化誘導した。分化誘導 4 日後に、培地を 0.5  $\mu\text{M}$  Dex を添加した

RPMI1640 に交換し、さらに 10 日間培養した。分化誘導培地は、2 日ごとに交換した。

(d) DFAT の培地を 20 ng/ml HGF、10 ng/ml Fibroblast growth factor-4 (FGF4 : PeproTech)、1% ITS-X、5 mM ニコチンアミド、を添加した IMDM (Gibco) に交換し、分化誘導した。分化誘導 10 日後に、培地を 20 ng/mL OsM、1  $\mu$ M Dex、1% ITS-X を添加した IMDM に交換し、さらに 20 日間培養した。分化誘導培地は、2 日ごとに交換した。

#### 肝細胞の単離と初代培養

肝細胞は、標準的な二段階コラゲナーゼ灌流法によって C57BL/6N マウスの肝臓から単離した。はじめに、肝臓の門脈からのハンクス/EGTA 溶液 (カルシウムおよびマグネシウム不含) で灌流した。次に、約 40 ml の 0.05% コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) を含むハンクス溶液で灌流した。すべての灌流液は 37°C に温めて使用した。肝臓を取り出し、ハンクス液を入れたペトリ皿に移した。ピンセットを使用して肝臓組織ほぐし、穏やかに攪拌した。放出された肝細胞の懸濁液を 100  $\mu$ m ナイロンメッシュでろ過し、組織片を除去した。この細胞懸濁液を 50 ml チューブに移し、50 $\times$ g で 7 分間遠心分離を行い、細胞を回収した。次に、細胞を Percoll buffer (90 % Percoll

(GE Healthcare) , 1× Hank's) に再懸濁し、50×g で 15 分間遠心分離して死細胞を除去した。細胞を 40 ml のハンクス溶液に再懸濁し、50×g で 2 分間遠心分離して、細胞を洗浄した。洗浄作業を 2 回繰り返した。単離した肝細胞は、10 %FBS を含む SHM 培地に  $1 \times 10^5$  cells/ml なるように懸濁した。この細胞懸濁液を、コラーゲンタイプ I-C (Nitta Gelatin) でコートした 40 mm の組織培養皿 (TPP) に 2 ml ずつ分注し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相下の炭酸ガス培養装置内に静置した。初代培養肝細胞はコントロールとして実験に使用した。

## RNA 抽出

コンフルエント、分化誘導 2、4、6、8、10、12、14 日後に以下の方法で細胞から Total RNA を抽出し、さらに cDNA を合成し、RT-PCR およびリアルタイム PCR を行うことによって肝細胞分化マーカーの遺伝子発現状況を調べた。培養皿内の培地を除去後、直接 TRIzol Reagent (Invitrogen) 500 μl を加えた。細胞を TRIzol Reagent とともに、セルスクレーパーで回収したのち、1.5 ml チューブに移した。10 分間、室温で静置させたのち、クロロホルム (Wako) 100 μl を添加し、激しく震盪させ、3 分間再び室温に静置した。これを 12,000×g、15 分間、4°C で遠心処理し、水層のみを回収した。これ以

降の過程では RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用した。回収した水層と等量の 70% エタノールを添加し、10 秒間転倒混和した後 1 分間室温で静置した。サンプルを 600  $\mu$ l ずつ RNA Spin Cartridge にアプライし、4°C、8,000 $\times$ g で 15 秒遠心し、通過液を捨てた。サンプル全体が処理されるまで、サンプルを 600  $\mu$ l ずつアプライした。RNA Spin Cartridge に 350  $\mu$ l の Wash Buffer I を加え、25°C、8,000 $\times$ g で 15 秒遠心した。その後、10  $\mu$ l DNase I と 70  $\mu$ l RDT 混合液を滴下し 25°C で 15 分間放置した。次いで、350  $\mu$ l の Wash Buffer I を加え、8,000 $\times$ g、15 秒間遠心し、通過液を捨てた。さらに 500  $\mu$ l の Wash Buffer II (エタノール含有) を RNA Spin Cartridge に加え 25°C、8,000 $\times$ g で 15 秒間遠心し、通過液を廃棄した。500  $\mu$ l の Wash Buffer II (エタノール含有) を RNA Spin Cartridge に加え 25°C、8,000 $\times$ g で 2 分間遠心し、通過液とチューブを廃棄した。新しい 2 ml チューブへ RNA Spin Cartridge を移し、メンブレンを乾かすために、21,900 $\times$ g で 2 分間遠心した。再び新しい 2ml チューブへカラムを移し、RNase free water を 50  $\mu$ l 加え、25°C、3 分間放置し、RNA を溶出した。その後 4°C、8000 $\times$ g で 1 分間遠心したのち、通過液を RNA Spin Cartridge へ滴下し、25°C、3 分間放置した。その後 4°C、8000 $\times$ g で 1 分間遠心し、凍結保存を行った。



## cDNA 合成

サンプルを氷上で融解し、ND-1000 Spectrophotometer (nanodrop) を用いて RNA 量を測定し、RNA 濃度を dH<sub>2</sub>O で 500 ng/16 µl になるように調整した。4 µl super Script VILO master Mix (Applied Biosystems,) と 16 µl RNA 溶液を混合した。サーマルサイクラーを用いて、25°Cで 5 分、42°C 30 分、85°Cで 5 分インキュベートし、cDNA を調整した。その後 80 µl dH<sub>2</sub>O を添加した。

## RT-PCR 法

逆転写した cDNA 4 µl (20 ng) に対し、4 µl プライマー (5 µM : 最終濃度 0.5 µM) 、 2.0 µl 10×Ex taq buffer、 1.6 µl dNTP、 0.1 µl TaKaRa ExTaq (Takara Bio) および 8.4µl dH<sub>2</sub>O の混合液を作製し、PCR に用いた。PCR は DNA サーマルサイクラー (BIORAD : S1000) を用いて行われ、95°Cで 10 分反応させた後、95°Cで 30 秒間変性させ、60°Cで 20 秒間アニーリングし、72°Cで 30 秒間伸長させ、最後に 72°Cで 10 分間反応させた。また、内部標準マーカには GAPDH を採用した。PCR 産物は、Atlas ClearSight (Bioatlas) を添加したアガロースゲルを用いて電気泳動

を行い、クールセイバー (ATTO) によってバンドを検出した。なお、使用したプライマーシーケンスを表 1 に示した。

### リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR を使用して、肝細胞特異的遺伝子群の遺伝子発現を定量化した。そのために、TaqMan Pre-Developed Assay Reagents (Applied Biosystems) の Alb (GenBank accession no. NM\_009654.3; Mm00802090\_m1)、Afp (GenBank accession no. NM\_007423.4; Mm00431715\_m1)、Tat (GenBank accession no. NM\_146214.3; Mm01244282\_m1) および Tdo2 (GenBank accession no. NM\_019911.2; Mm00451269\_m1) のプローブを使用した。また、内部標準には、マウス Gapdh (GenBank accession no. NM\_008084.2) の TaqMan プローブ (4352339E, Applied Biosystems) を用いた。逆転写した cDNA 2  $\mu$ l (10 ng) に対し、1  $\mu$ l の特異的なプローブ、1  $\mu$ l コントロールプローブ、5  $\mu$ l TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、2  $\mu$ l、dH<sub>2</sub>O の混合液を作製し、リアルタイム PCR に用いた。リアルタイム PCR は、リアルタイム定量 PCR システム (7500 Fast Real-Time PCR System : Applied Biosystems) を用いて行われ、95°C で 3 秒、62°C で 3

秒を 1 サイクルし、40 サイクル行った後、60°C で 30 秒間反応させた。

7500 Fast Real Time PCR 用のソフトウェア（バージョン 2.0.4; Applied Biosystems）を使用して、発現データを分析した。各サンプルについて、肝細胞特異的遺伝子の発現を Gapdh に対して正規化した。

### 免疫蛍光染色

肝細胞分化誘導前後の DFAT（コントロール）および FHS-DFAT と初代肝細胞（HC）の細胞培養皿の培地を除去し、超純水に 2.42 mg/ml トリス塩基（Sigma）、8 mg/ml 塩化ナトリウム（NaCl : Wako）を溶解し、pH 7.6 に合わせたトリス緩衝食塩水（TBS）を加え、室温化で 1 回洗浄した。TBS を除去し、4%パラホルムアルデヒド（4% PFA : Wako）1ml を加え、遮光し 4°C下で over night させて固定を行なった。固定後、4% PFA を除去し、TBS 1 ml を加え、室温化で 2 回洗浄した。TBS を除去し、超純水で 10 % に希釈したトリトン X-100（10% トリトン X -100 : Wako）を TBS で 50 倍に希釈した 0.2% トリトン X -100 in TBS を 1 ml 加え、室温化で 5 分間洗浄した。0.2 % トリトン X -100 in TBS を除去し、TBS を 1 ml 加え、室温化で 2 回洗浄した。TBS を捨て、TBS で希釈したヤギ抗マウスアルブミン抗体（1:200 dilution; A90-134A; Bethyl Laboratories）を 500  $\mu$ l 加え、4°C

で over night した。洗浄後、0.2% トリトン X-100 in TBS を捨て、TBS で希釈した AlexaFluor-594 共役抗ヤギ免疫グロブリン (1 : 2000 ; Molecular Probes) を 500  $\mu$ l 加え、室温遮光下で 60 分間インキュベートした。その後、2 次抗体を捨て、0.2 % トリトン X -100 in TBS 1 ml で軽くすすぎ、次に室温下で 5 分間振盪しながら 3 回洗浄した。次いで、0.2 % トリトン X -100 in TBS を捨て、TBS 1 ml を加え、室温下で洗浄した。さらに、TBS で調整した 5  $\mu$ g/ml のヘキスト 33342 を 500  $\mu$ l 加え、15 分間振盪し、核染色を行なった。TBS 1 ml で洗浄した後、細胞培養皿に、Fluoromount G (Southern Biotech) を用いて、カバーガラス (MATSUNAMI) を直接封入し、倒立蛍光顕微鏡 (Olympus DP71) で観察した。

### アルブミン定量

肝細胞分化誘導前後の DFAT (コントロール) および FHS-DFAT と HC の培養上清を回収し、PCR チューブに 150  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C で凍結保存した。アルブミンの定量は mouse albumin ELISA Kit (Shibayagi) を用いて行い、マルチプレートリーダー (BioTek) を用いて波長 562nm で測定した。

### Periodic Acid-Schiff's (PAS) 染色

肝細胞特異的機能であるグリコーゲンの貯蔵については、PAS 染色を用いて組織化学的に検索した。肝細胞分化誘導前後の DFAT（コントロール）および FHS-DFAT と HC の細胞培養皿の培地を除去し、PBS を加え、室温化で 2 回洗浄した。PBS を除去し、超純水に過ヨウ素酸（Wako）を溶解して作製した 1% 過ヨウ素酸を 1 ml 加え、室温下で 10 分間静置し、固定を行なった。1% 過ヨウ素酸を除去し、蒸留水で 2~3 回洗浄した。次いで、シッフ試薬（Wako）2 ml を加え、室温下で 10 分間静置した。その後、シッフ試薬（Wako）を除去し、1.9 g 亜硫酸ナトリウム（Wako）を 100 ml の 0.15 規定塩酸水に入れ、スターラーで一晩攪拌して作製した亜硫酸水で 3 回洗浄した。さらに、蒸留水で 2~3 回洗浄した後、マイヤーヘマトキシリン液（Wako）1 ml を加え、5 分間静置した。染色後、蒸留水で 3 回洗浄し、Fluoromount G（Southern Biotech）を用いて、カバーガラス（MATSUNAMI）を直接封入して倒立顕微鏡（Olympus DP71）で観察した。

### グリコーゲンの定量

肝細胞分化誘導前後の DFAT（コントロール）および FHS-DFAT と HC から以下の方法でグリコーゲン定量用のサンプルを回収した。細胞培養皿から培

地を除去した後、PBS 500  $\mu$ l を加えた。細胞を PBS とともに、セルスクレーパーで回収したのち、1.5 ml チューブに移した。その後、400 $\times$ g 5 分間遠心分離を行ない、上澄みを除去した。回収した細胞を dH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ l に懸濁した。この細胞懸濁液を 5 分間超音波処理した後、液体窒素で急速に凍結し、室温で解凍することで細胞を破碎した。この操作を 2 回繰り返した。グリコーゲンの分解を最小限に抑えるために、細胞懸濁液を 100 $^{\circ}$ C で 10 分間煮沸し、18,000 $\times$ g で 10 分間遠心分離を行なった。上清を回収し、測定まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。グリコーゲンの定量は、Glycogen Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (Biovision) を用いて行い、マルチプレートリーダー (BioTek) を用いて波長 570 nm で測定した。

#### LDL-uptake 解析

肝細胞分化の指標となる、LDL の取り込みにては LDL uptake assay を用いて調べた。肝細胞分化誘導前後の DFAT (コントロール) および FHS-DFAT と HC の分化誘導培地を除去し、10  $\mu$ g/ml LDL-DyLight™ 550 (Cayman Chemica) を含む培地に交換し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、95%空気の気相下の炭酸ガス培養装置内で 4 時間インキュベートした。さらに、5  $\mu$ g/ml のヘキスト 33342 を 500  $\mu$ l 加え、15 分間静置し、核染色を行なった。その後、

倒立蛍光顕微鏡（Olympus DP71）で観察した。

#### 統計処理

テューキーの有意差検定またはスチューデントの t 検定を使用して、それぞれ 2 つまたは 3 つ以上のグループ間の比較を分析した。

## 結果

第 2 章で抽出された 3 つの候補遺伝子が 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 Sall1 (S) を発現する DFAT (FHS-DFAT) を作製した。まず、FHS-DFAT を最も良好に肝細胞へ分化誘導する培地を選択する目的で FHS-DFAT をコラーゲンコートしたディッシュに播種し、様々な肝細胞分化誘導培地で培養を行なった (表 2)(Kang *et al.* 2005; Conigliaro *et al.* 2008; Sekiya & Suzuki 2011; Katsuda *et al.* 2017)。その結果、表 2 (a) で示す肝細胞分化誘導培地で培養した FHS-DFAT において肝細胞特異的遺伝子である Alb の発現および上皮様の細胞形態が認められた。

次に、各遺伝子を単独または複数組み合わせで発現した DFAT を作製し、抽出された肝分化制御因子のスクリーニングを行なった。初代肝細胞 (HC) は、肝細胞分化のコントロールとして使用した。各遺伝子を単独または複数組み合わせで遺伝子導入した DFAT をコラーゲンコートしたディッシュに播種し、肝細胞分化誘導培地で 14 日間培養を行なった。これらの DFAT で遺伝子導入した Foxa2、Hnf4a、および Sall1 の遺伝子発現を RT-PCR を用いて調べた結果、遺伝子導入した DFAT でのみ発現が確認された (図 10)。肝細胞分



化誘導 14 日後において、肝細胞分化マーカーである Alb および 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 では発現が見られなかった (図 10)。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 FH-DFAT より FHS-DFAT において有意に高い値を示した (図 11)。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 (図 12、矢頭)。これらの結果は、Foxa2、Hnf4a および Sall1 の 3 つすべてが DFAT を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。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。

D-Hep の肝細胞分化過程における細胞形態の変化を図 13 に示した。分化誘導 0 日では、繊維細胞様の細胞形態を示しているが、分化誘導 4 日後には敷石上の形態へ変化した。また、分化誘導 8 日後には二核の細胞が出現し、分化誘導 14 日後にかけて増加した。次いで、D-Hep の肝細胞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。Afp は、分化誘導 6 日後から有意な発現増加が認められ、分化誘導 12 日後で最も高い値を示した。Alb も同様に分化誘導 6 日後から有意な発現増加が認めら

れ、分化誘導 14 日後で最も高い値を示した。チロシンアミノトランスフェラーゼ (Tat) は分化誘導 4 日から 8 日後にかけて急速な発現増加が認められ、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) は肝細胞分化誘導の 4 日後から有意に発現増加した (図 14)。さらに、肝細胞分化誘導の 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。Alb の免疫蛍光染色および測定値を図 15 に示した。免疫蛍光染色の結果、D-Hep は初代肝細胞と同様の Alb 発現を示したが、コントロール区においては、Alb 陽性の細胞は観察されなかった (図 15A)。また、D-Hep の培養上清中の Alb 量は、コントロール区よりも有意に高い値を示した (図 15B)。さらに、成熟肝細胞の機能であるグリコーゲンの貯蔵を PAS 染色およびグリコーゲンの定量によって調べた (図 16)。D-Hep は、グリコーゲンを染色する PAS 染色に陽性を示した (図 16A)。また、D-Hep の細胞質中のグリコーゲン量は、初代肝細胞よりも有意に高い値を示した (図 16B)。さらに、低密度リポタンパク質 (LDL) の取り込みが認められた (図 17)。これらの結果は、D-Hep が成熟肝細胞様の機能を有することを示したものである。

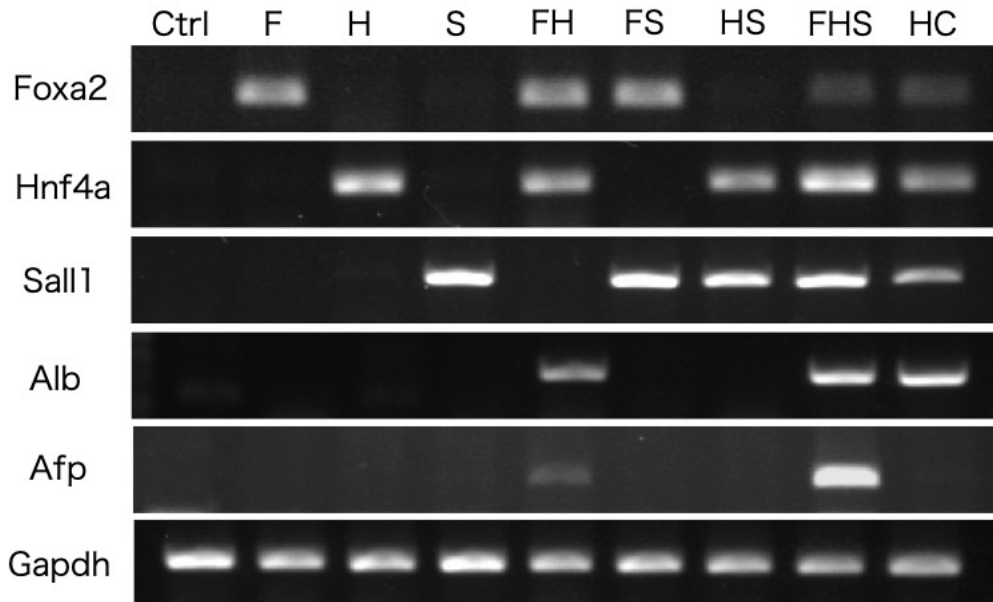


図 10. 分化誘導 14 日後における候補遺伝子および肝細胞特異的遺伝子の発現  
 3 つの候補遺伝子 (Foxa2、Hnf4a、および Sall1) を単独または複数で遺伝子導入した DFAT または、GFP ベクター (Ctrl) を遺伝子導入した DFAT を、14 日間肝細胞細胞分化誘導した。Foxa2、Hnf4a、Sall1、および肝細胞特異的遺伝子 (Alb および Afp) の発現を、RT-PCR を使用して調べた。なお、Gapdh を内部標準遺伝子とした。

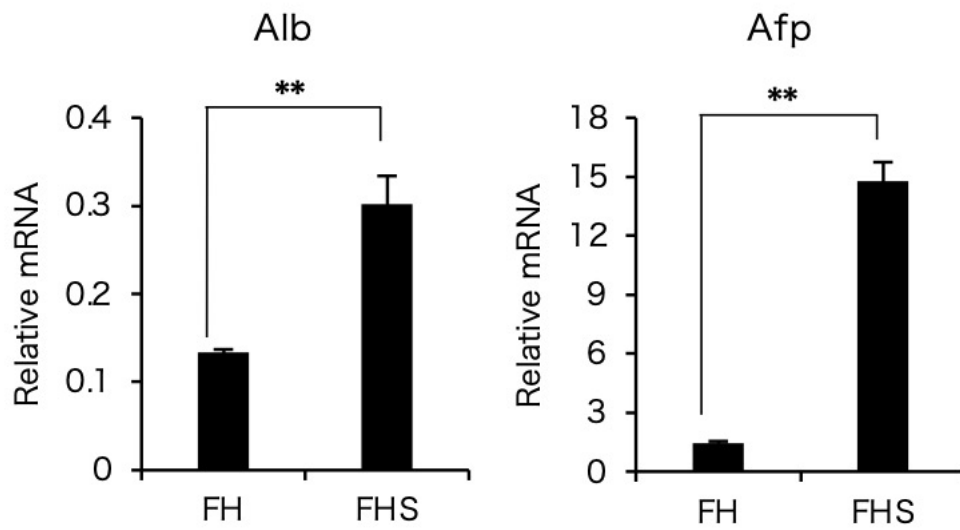


図 11. 肝細胞分化誘導後における Alb および Afp の発現

Foxa2、Hnf4a (FH) または Foxa2、Hnf4a、Sall1 (FHS) を遺伝子導入した DFAT における Alb および Afp の発現をリアルタイム RT-PCR を使用して定量化した。どちらの遺伝子も FHS を遺伝子導入した DFAT において有意に発現が高いことが示された。

肝細胞での発現値を 1 とした。\*\*:  $p < 0.01$ 。

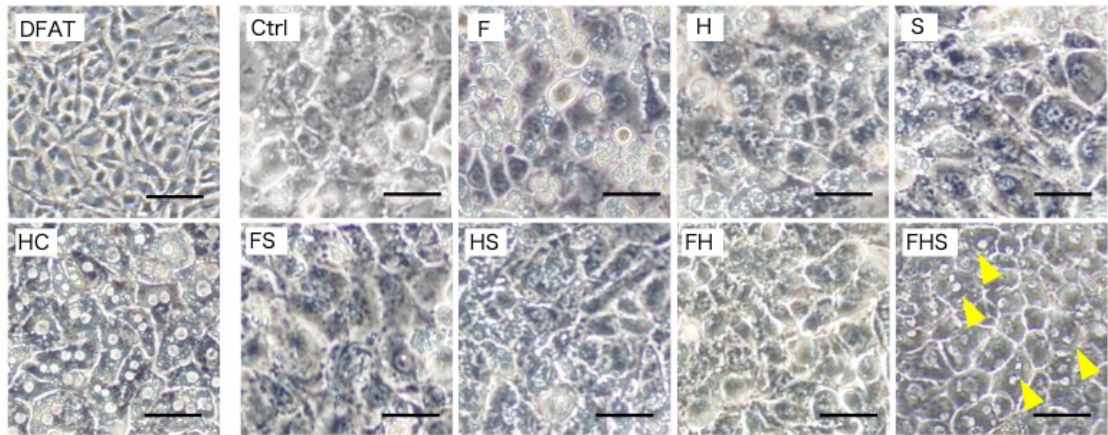


図 12. 候補遺伝子を導入した DFAT の分化誘導 14 日後における細胞形態

分化誘導前の DFAT、分化誘導後の各遺伝子を単独または複数組み合わせで遺伝子導入した DFAT および初代肝細胞の細胞形態。黄色の矢頭は、肝細胞の特徴である 2 核の細胞を示す。FHS-DFAT において敷石状の形態および 2 核の細胞が観察された。

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

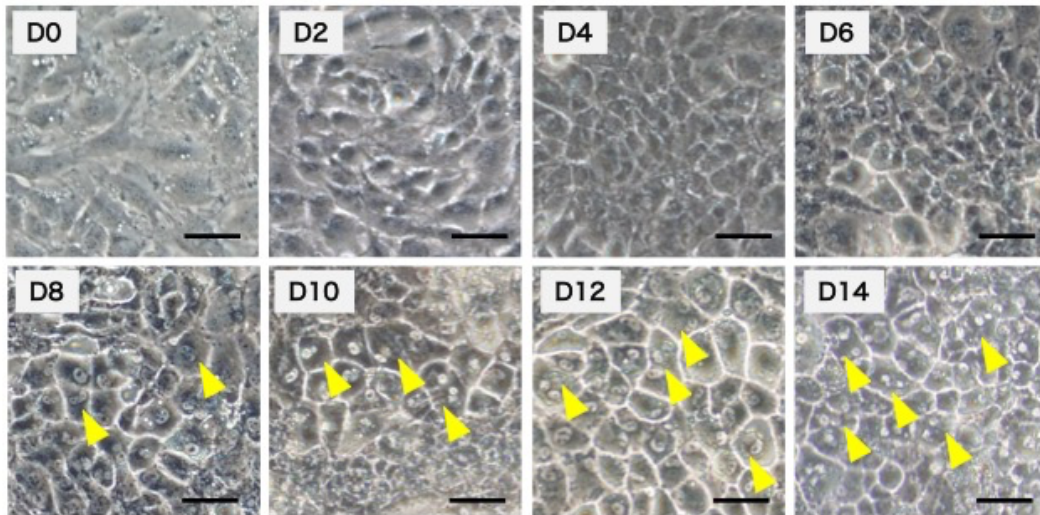


図 13. FHS -DFAT の分化過程における細胞形態の変化

FHS-DFAT の分化過程における細胞形態を経時的に評価した。黄色の矢頭は、肝細胞の特徴である 2 核の細胞を示す。分化誘導 4 日後から敷石状の形態が観察され、分化誘導 8 日から 2 核の細胞が観察された。

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

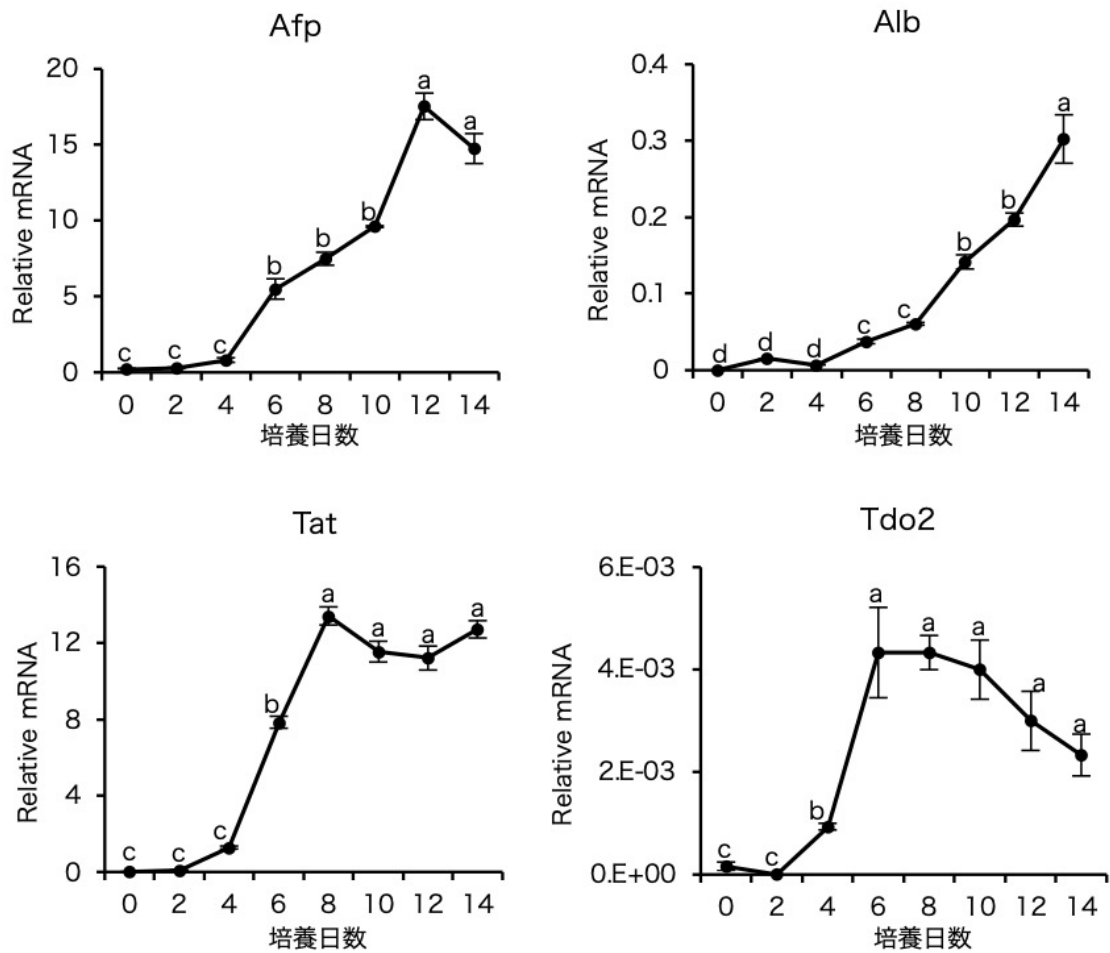


図 14. FHS-DFAT の分化過程における肝細胞特異的遺伝子群の発現変化

肝細胞分化過程における Afp、Alb、Tat および Tdo2 の遺伝子発現変化を調べた結果、Afp、Alb および Tat は分化誘導 6 日から、Tdo2 は分化誘導 4 日後から有意な発現増加が示された。

肝細胞での発現値を 1 とした。a-b:  $p < 0.01$ 。

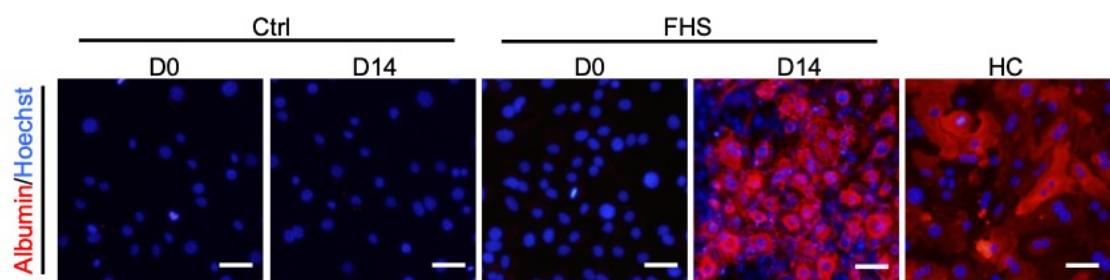


図 15A. FHS-DFAT の分化誘導後におけるアルブミンの発現

分化誘導後の FHS-DFAT において初代肝細胞と同様にアルブミンの発現が認められた。

アルブミンの免疫蛍光染色後の倒立蛍光顕微鏡写真を示す。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。



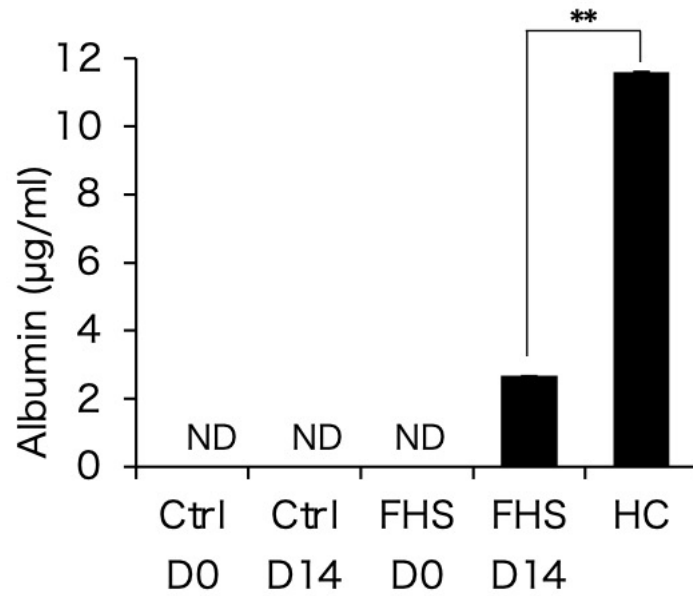


図 15B. 分化誘導後の FHS-DFAT におけるアルブミンの分泌

肝細胞分化誘導 14 日後の FHS-DFAT の培養上清中においてアルブミンが検出された。ND は検出不可を示す。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

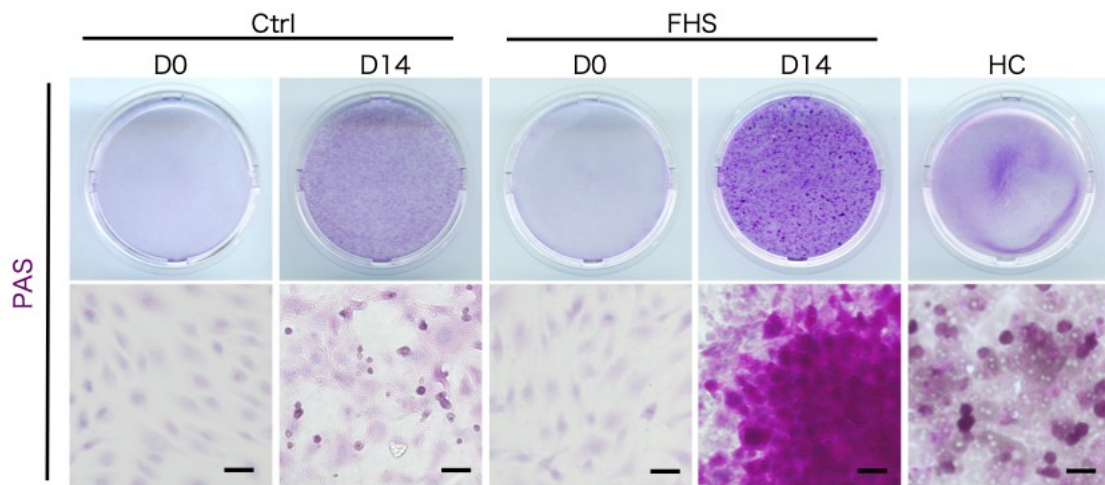


図 16A. 分化誘導後における FHS-DFAT の PAS 染色像

分化誘導後の FHS-DFAT においてグリコーゲンの貯蔵が認められた。

上段は PAS 染色全体像、下段は PAS 染色後の倒立顕微鏡写真を示す。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

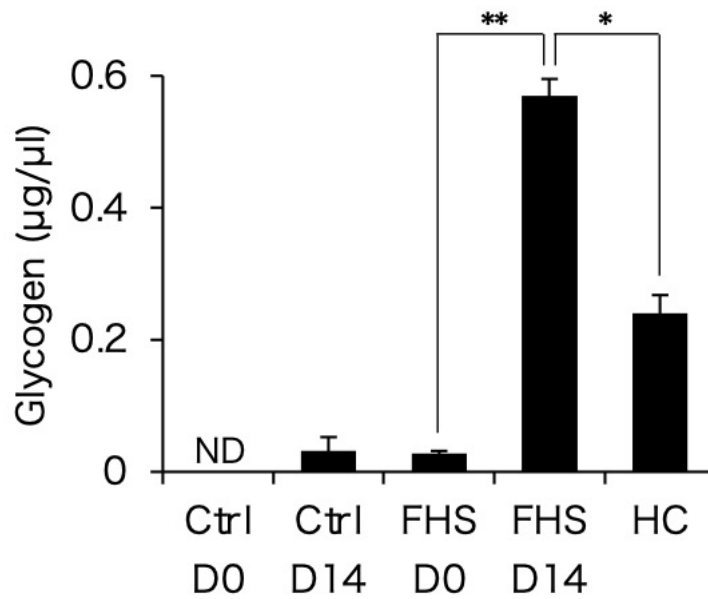


図 16B. 分化誘導後の FHS-DFAT における細胞内グリコーゲンの定量

細胞内グリコーゲン量は、分化誘導後の FHS-DFAT において初代肝細胞よりも有意に高い値を示した。ND は検出不可を示す。\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ 。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

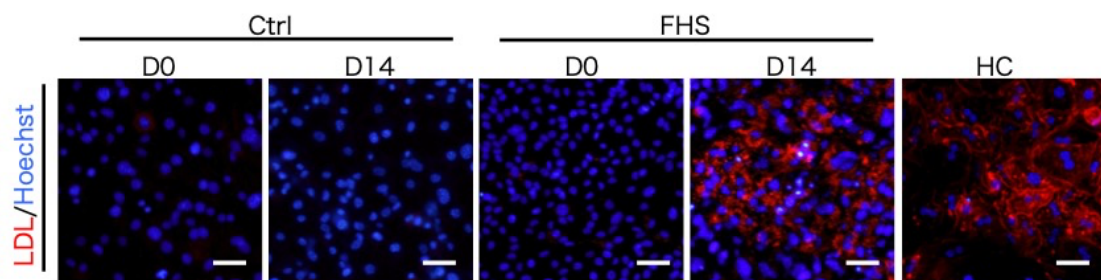


図 17. 分化誘導後の FHS-DFAT における LDL の取り込み

分化誘導後の FHS-DFAT において初代肝細胞と同様に LDL の取り込みが認められた。

LDL-Dilight 550 添加 48 時間後の倒立顕微鏡写真を示す。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

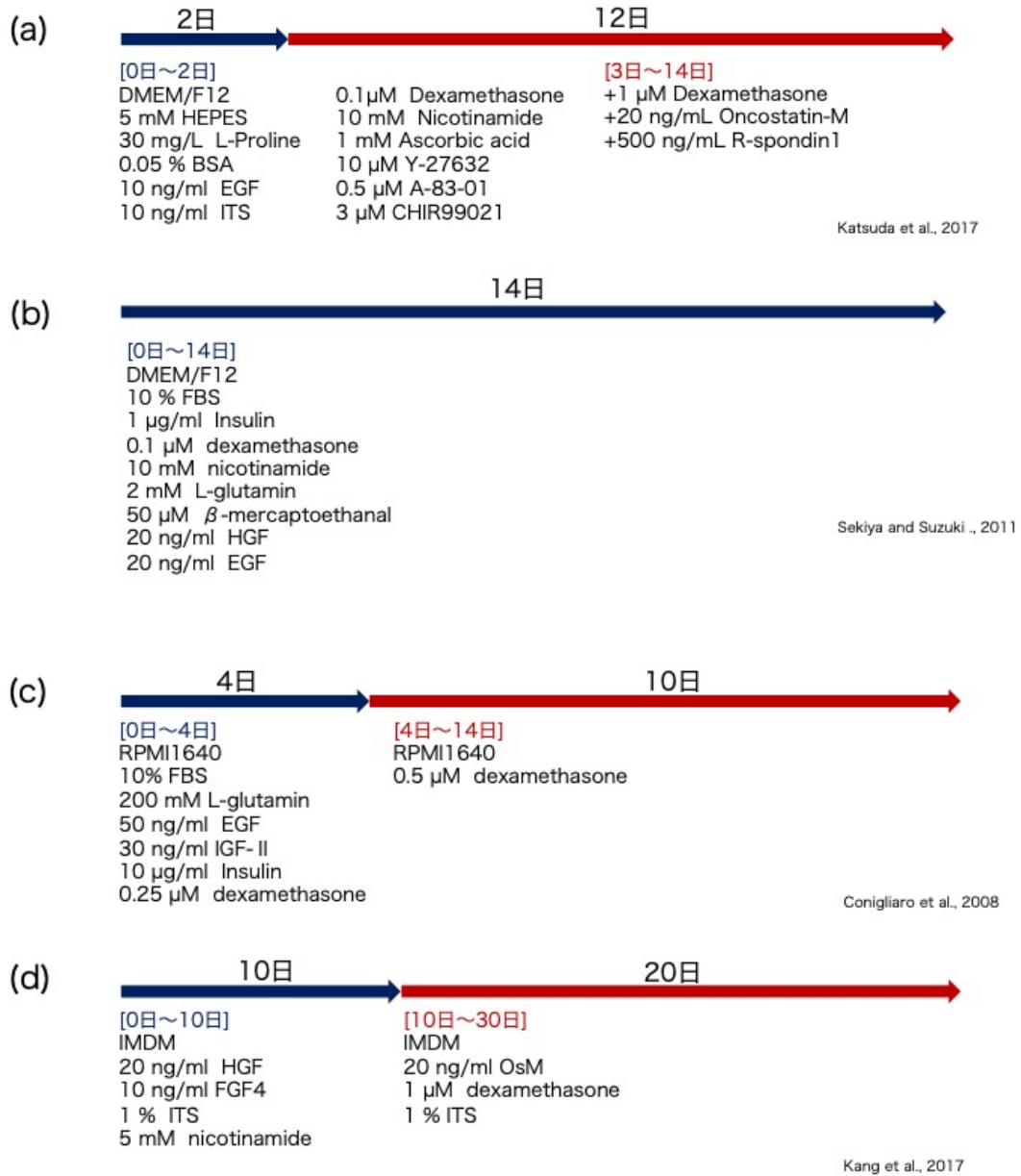
HC : 初代肝細胞。

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。

表 1. Foxa2、Hnf4a、Sall1 および肝細胞特異的遺伝子のプライマー配列

遺伝子番号	遺伝子名	プライマー配列 (5'-3')
NM_010446.3	Foxa2	Forward : GGAGCCGTGAAGATGGAA
		Reverse : CGCCCACACATAGGATGACA
NM_008261.2	Hnf4a	Forward : GCGACTCTCTAAAACCCTTGC
		Reverse : TTCTTCCTCACGCTCCTCCT
NM_021390.3	Sall1	Forward : CACAAGAAACCCAAGTGGCG
		Reverse : GGACCACTGCGTTTGTGAAC
NM_009654.4	Alb	Forward : CACCTTTCCTATCAACCCCACTA
		Reverse : AGCAGTCAGCCAGTTCACCA
NM_007423.4	Afp	Forward : GGACTGCTCGAAACATCCCA
		Reverse : TCTCGGCAGGTTCTGGAAAC
NM_002046	Gapdh	Forward : GGAAGCTTGTTCATCAATGG
		Reverse : GTTGTTCATGGATGACCTTGG

表 2. 肝細胞分化誘導方法



## 考察

本章では、Foxa2、Hnf4a および Sall1 を DFAT に遺伝子導入することにより、機能的な肝細胞様細胞を作製できることを明らかにした。Hnf4a は、肝臓発生中の肝細胞分化だけでなく、出生後の脂質、コレステロール、グルコース代謝や胆汁酸分泌の恒常性維持にも関与する複数の標的遺伝子の転写活性を制御する (Li *et al.* 2000; Hayhurst *et al.* 2001; Parviz *et al.* 2003)。また、標的遺伝子のクロマチン構造を制御することが知られており (Rollini & Fournier 1999)、肝細胞で発現する遺伝子発現の大部分は Hnf4a によって直接的または間接的に調節されている (Odom *et al.* 2004)。Forkhead box のサブファミリーA のメンバーである Foxa1/2/3 は、マウスを含む哺乳動物の発育において重要な役割を果たしている。Foxa2 は、凝縮したクロマチンに結合するパイオニア転写因子として機能し、肝細胞特異的遺伝子においては、エンハンサーとして他の転写因子のアクセスを可能にする (Cirillo *et al.* 2002)。マウス線維芽細胞などの非肝細胞は、Hnf4a や Foxa2 などの転写因子によって直接的に肝細胞に変換されることがいくつかの研究で示されている (Sekiya & Suzuki 2011; Nakamori *et al.* 2017)が、DFAT の分化においても Hnf4a や Foxa2 が重要な役割を果たしていることが示唆される。

一方で、リプログラミング、肝臓の分化および発達における Sall1 の役割は報告されていない。Sall1 は、中枢神経系、肢芽、心臓、腎臓の発生時に発現するジンクフィンガー転写因子として同定されている (Nishinakamura *et al.* 2001; Karantzali *et al.* 2011)。ES 細胞でも高発現しており、Karantzali らは、Sall1 が幹細胞の多能性を制御する遺伝子であること明らかにしている (Karantzali *et al.* 2011)。胚体形成期に Sall1 を過剰発現させると、中胚葉と外胚葉への分化が抑制されるが、内胚葉への分化には影響しないことが明らかにされている。実際に、Sall1 を発現させた胚様体では神経や心臓の発生に関連する遺伝子の発現が誘導されない (Karantzali *et al.* 2011)。Sall1 はヘテロクロマチンに局在し、ヌクレオソーム再構築デアセチラーゼ複合体の一部と相互作用することで、転写抑制因子として作用していると考えられる (Lauberth & Rauchman 2006)。これらの知見から、Sall1 は、中胚葉と外胚葉への分化を抑制する転写抑制因子として作用することにより、FHS-DFAT の内胚葉系である肝細胞への分化を誘導しているものと考えられる。



## 小括

本章では、第 1 章で抽出された候補遺伝子が DFAT における肝細胞分化制御因子であることを同定するために、レトロウイルスベクターを用いて候補遺伝子を発現する DFAT (FHS-DFAT) を作製した。FHS-DFAT をいくつかの肝細胞分化誘導培地で培養した結果、Y-27632 および CHIR-99021 などを含む肝細胞分化誘導培地においては肝細胞特異的遺伝子であるアルブミンの発現および上皮細胞様の細胞形態を誘導した。

次に、各遺伝子を単独または複数組み合わせで遺伝子導入した DFAT を作製し、抽出された候補遺伝子のスクリーニングを行なった。肝細胞分化誘導後の FH および FHS-DFAT において、Alb および Afp の遺伝子発現が確認された。次に、FH-DFAT と FHS-DFAT における Alb および Afp の遺伝子発現量を比較したところ、いずれの遺伝子も FH-DFAT より 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 は上皮細胞様の形態を示し、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ためには、Foxa2、Hnf4a および Sall1 の 3 つすべてが必要であることを示したものである。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。

次に、D-Hep の肝分化過程における肝細胞分化マーカーの発現を調べた。その結果、Alb、Afp および Tat は肝細胞分化誘導 6 日後から、Tdo2 は肝細胞分化誘導の 4 日後から有意に発現増加した。また、Alb の発現、グリコーゲンの貯蔵および LDL の取り込みといった肝細胞特異的機能の発現も確認された。これらの結果は、D-Hep が成熟肝細胞様の機能を有することを示したものである。

## 第4章 D-Hep における Zone 特異的機能の発現

### 緒言

肝臓の組織は六角形をした肝小葉が多数集合して構成されている。肝小葉は肝臓の構造の最小単位であり、中心には中心静脈、六角形の角には、胆管、門脈、肝動脈から成る門脈域が存在する。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)。肝細胞全体では、アルブミンやグリコーゲンの合成などの機能を発現しており、Zone 1 肝細胞は尿素の生成や糖新生、Zone 3 肝細胞は高いグルタミン産生能や薬物代謝などの機能をもつことが明らかにされている (図 18)。

肝障害は、①肝臓がびまん性に障害を受けるもの、②不均一に障害を受けるもの、の2種類に大別される。②の例として、門脈域に位置する Zone 1 肝細胞が障害を受けるウイルス性肝炎、中心静脈域に位置する Zone 3 肝細胞が障害を受けるアルコール性脂肪肝炎・薬物誘発性肝障害など数多くの不均一な肝障害、すなわち「Zone 特異的な肝障害」がある。Zone 特異的な肝障害が生

じる原因は、肝細胞が Zone に応じた特異な機能を有していることにあるが、再生医療研究や創薬研究に使用される既存の肝細胞モデルのほとんどは Zone 特異的な機能を有していない。そのため、現行の創薬技術では、肝臓の不均一性を加味した肝障害の予防法や治療技術の開発が実施できない。そのため、Zone 特異的な機能をもった肝細胞が作出できれば、肝疾患・肝不全に対する細胞移植治療や創薬技術の開発に向けた基礎的な知見となり、新しい治療法の開発に貢献することが期待される。

本章では、D-Hep の Zone 特異性を調べるために、Zone1 および Zone 特異的遺伝子群の発現を経時に調べた。次いで、Zone3 肝細胞特異的機能である薬物代謝能を評価した。

## 材料および方法

### DFAT の培養

DFAT の培養は、第 3 章の方法に準じて行なった。

### 肝細胞分化誘導

肝細胞分化誘導は、第 3 章に示す誘導方法 (a) に準じて行なった。

### RNA 抽出

RNA 抽出は、第 3 章の方法に準じて行なった。

### cDNA 合成

cDNA 合成は、第 3 章の方法に準じて行なった。

### リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR を使用して、Zone 特異的遺伝子群の遺伝子発現を定量化した。TaqMan Pre-Developed Assay Reagents (Applied Biosystems) の Cyp1a2 (GenBank accession no. NM\_009993.3;

Mm00487224\_m1)、Cyp2e1 (GenBank accession no. NM\_021282.2;  
Mm00491127\_m1)、Cyp2a5 (GenBank accession no. NM\_007812.4;  
Mm00487248\_g1)、Cyp7a1 (GenBank accession no. NM\_007824.2;  
Mm00484150\_m1)、Lgr5 (GenBank accession no. NM\_010195.2;  
Mm00438890\_m1)、Otc (GenBank accession no. NM\_008769.3;  
Mm00493267\_m1)および Pck1 (GenBank accession no. NM\_011044.2;  
Mm01247058\_m1)のプローブを使用した。リアルタイム PCR 法は第 3 章の  
方法に準じて行なった。

### 免疫蛍光染色

細胞培養皿の培地を除去し、TBS を加え、室温化で 1 回洗浄した。TBS を  
除去し、4% PFA 1ml を加え、遮光し 4°C 下で over night させて固定を行な  
った。固定後、4%PFA を除去し、TBS 1ml を加え、室温化で 2 回洗浄し  
た。TBS を除去し、0.2% トリトン X -100 in TBS を 1 ml 加え、室温化で 5  
分間洗浄した。0.2% トリトン X -100 in TBS を除去し、TBS を 1ml 加え、  
室温化で 2 回洗浄した。TBS を捨て、超純水に BSA (Sigma-Aldrich) を溶  
解した 10% BSA ストック溶液とヤギ血清 (Vector Laboratories) を TBS  
で 10 倍に希釈して作製した 10% ヤギ血清- 1% BSA を 1ml 加え、室温で 1

時間振盪しながらブロッキングした。その後、10% ヤギ血清- 1% BSA を捨て、1% BSA in TBS で希釈したマウス抗 Cyp1a2 抗体 (1:200 dilution; D-51; Santa Cruz) を 500  $\mu$ l 加え、4°C で over night した。その後、1 次抗体を捨て、0.2% トリトン X -100 in TBS 1ml で軽くすすぎ、次に室温化で 30 分間振盪しながら洗浄した。洗浄後、0.2% トリトン X -100 in TBS を捨て、1% BSA in TBS で希釈した AlexaFluor-594 共役抗マウス免疫グロブリン (1 : 2000 ; Molecular Probes) を 500  $\mu$ l 加え、室温遮光下で 60 分間インキュベートした。その後、2 次抗体を捨て、0.2% トリトン X -100 in TBS 1ml で軽くすすぎ、次に室温下で 5 分間振盪しながら 3 回洗浄した。次いで、0.2% トリトン X -100 in TBS を捨て、TBS 1 ml を加え、室温下で洗浄した。さらに、TBS で調整した 5  $\mu$ g/ml のヘキスト 33342 を 500  $\mu$ l 加え、15 分間振盪し、核染色を行なった。TBS 1ml で洗浄した後、細胞培養皿に、Fluoromount G (Southern Biotech) を用いて、カバーガラス (MATSUNAMI) を直接封入し、倒立蛍光顕微鏡 (Olympus DP71) で観察した。

#### 細胞生存率の測定

トログリタゾン、アセトアミノフェン (APAP) またはタモキシフェン (すべて Wako) を D-Hep の培養液に添加し、2 日後に細胞生存率を測定した。細胞生存率は、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay Kit (Promega) を Promega 社の推奨する方法に準じて使用し、細胞内 ATP 量を測定することにより調べた。発光シグナルは、マルチプレートリーダー (Synergy 2 : BioTek) を用いて測定した。コントロール区は、試験化合物の非存在下でのインキュベーションを示す。コントロール区の生存率を 100%とした。

#### Cyp1a2 活性の測定

初代肝細胞、FHS-DFAT の分化誘導前および分化誘導 14 日後に培養液を交換し、24 時間後に Cyp1a2 の活性値を測定した。Cyp1a2 の活性は P450-Glo™ CYP1A2 Assay Kit (Promega) を用いて行い、マルチプレートリーダー (Synergy 2 : BioTek) を用いて測定した。

#### GPT 量の測定

アセトアミノフェン添加 2 日後 の HC、DFAT および D-Hep に培養上清を回収し、PCR チューブに 150  $\mu$ l ずつ分注し、-80°C で凍結保存した。GPT 量



は Transaminase C-2 Test Wako (Wako) を用いて行い、マルチプレートリーダー (BioTek) を用いて波長 562nm で測定した。

### GSHの定量

アセトアミノフェン添加 2 日後の HC、DFAT および D-Hep において以下の方法で GSH 定量用のサンプルを回収した。細胞培養皿から培地を除去した後、PBS 1 ml を加えた。細胞を PBS とともに、セルスクレーパーで回収したのち、1.5 ml チューブに移した。その後、200×g で 5 分間遠心分離を行ない、上澄みを除去した。さらに、PBS 300  $\mu$ l を加え、200×g で 5 分間遠心分離を行ない、上澄みを除去した。回収した細胞を 10 mM/L HCl 80  $\mu$ l に懸濁した。この細胞懸濁液を 5 分間超音波処理した後、液体窒素で急速に凍結し、室温で解凍することで細胞を破碎した。この操作を 2 回繰り返した。細胞懸濁液に 5% 5-スルホサリチル酸二水和物 (SSA: Wako) 水溶液 20  $\mu$ l を加え、4°C 8000×g で 10 分間遠心分離を行なった後、上澄みを回収した。回収した上澄みと同量の dH<sub>2</sub>O を加え、測定まで-80°Cで保存した。GSH の定量は、GSSG/GSH Quantification kits (Dojindo) を用いて行い、マルチプレートリーダー (BioTek) を用いて波長 570nm で測定した。

## 統計処理

第 3 章の方法に準じて行なった。

## 結果

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 (図 19)。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 (Oct) 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 (図 19A)。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) は分化誘導 6 日後から、シトクロム P450 (Cyp) -2a5 は分化誘導 8 日後から、Cyp1a2、Cyp2e1 および Cyp7a1 の発現は、分化誘導 10 日後から急速に増加し、分化誘導 14 日後 (D-Hep) において最も高い値を示した (図 19B)。

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、APAP、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 (図 20)。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。一方で、コントロール区では、生存率の低下は認められなかった (図 21)。

次に、D-Hep が Zone 3 肝細胞の特徴を持つことから、D-Hep の薬物代謝能を詳しく調べるために、代謝経路がよく知られている APAP の代謝を評価した。APAP は、Cyp1a2 および Cyp2e1 のよって NAPQI 呼ばれる有毒な代謝物を生成する。NAPQI は通常、グルタチオン抱合によって無毒性の物質に変化し、尿中へ排泄される。しかし、APAP の過剰摂取は NAPQI が大量に生成されるため、グルタチオンの枯渇が起こる。その結果、細胞内に NAPQI が蓄積し、肝細胞傷害が引き起こされる (図 22) (Ramachandran & Jaeschke 2018)。Cyp1a2 の免疫蛍光染色および活性値を図 23 に示した。分化誘導前において、Cyp1a2 陽性の細胞は観察されなかったが、D-Hep は初代肝細胞と同様の Cyp1a2 の発現を示した (図 23A)。また、Cyp1a2 の活性値は、コントロール区と比較して有意に高い値を示した (図 23B)。次に、2 mM、5 mM および 10 mM の APAP を D-Hep の培養液中に 2 日間添加し、細胞生存率を測定した。その結果、5 mM および 10 mM の APAP を添加した培養液で、D-Hep の生存率が著しく低下した (図 24)。細胞内グルタチオン (GSH) の値は、2 mM および 5 mM でコントロール区に比べて有意に低く、特に 5 mM で著しく低下した (図 25)。D-Hep が APAP によって細胞傷害を受けているかを調べるために、培養液中のグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT) の濃度を測定した。GPT の濃度は、初代肝細胞および 5

mM APAP 添加区でコントロール区に比べて有意に高かった (図 26)。これらの結果は、D-Hep が初代肝細胞と同程度の APAP を代謝する能力を持つことを示しており、D-Hep は Zone 3 肝細胞の薬物代謝能をもつことが示唆された。

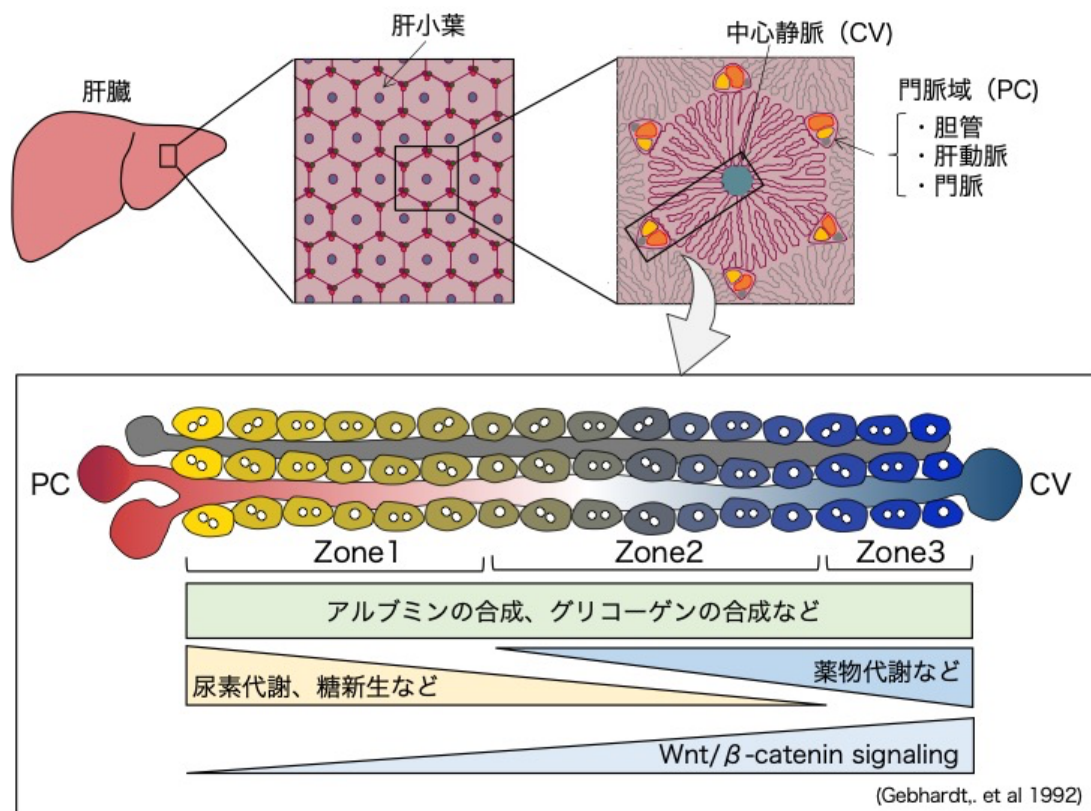


図 18. 肝組織の構造と肝細胞の機能

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。

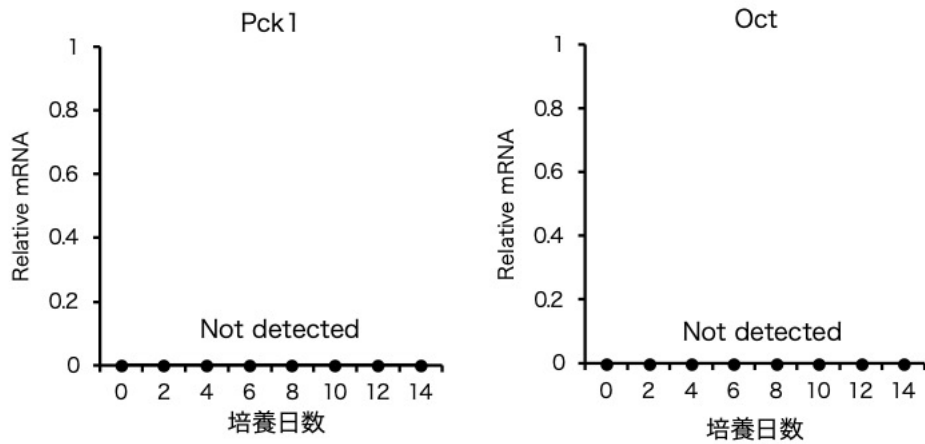


図 19A. FHS-DFAT の分化誘導過程における Zone 1 特異的遺伝子の発現変化  
 Zone 1 特異的遺伝子である Pck1 および Oct は、FHS-DFAT の肝細胞分化過程において認められなかった。

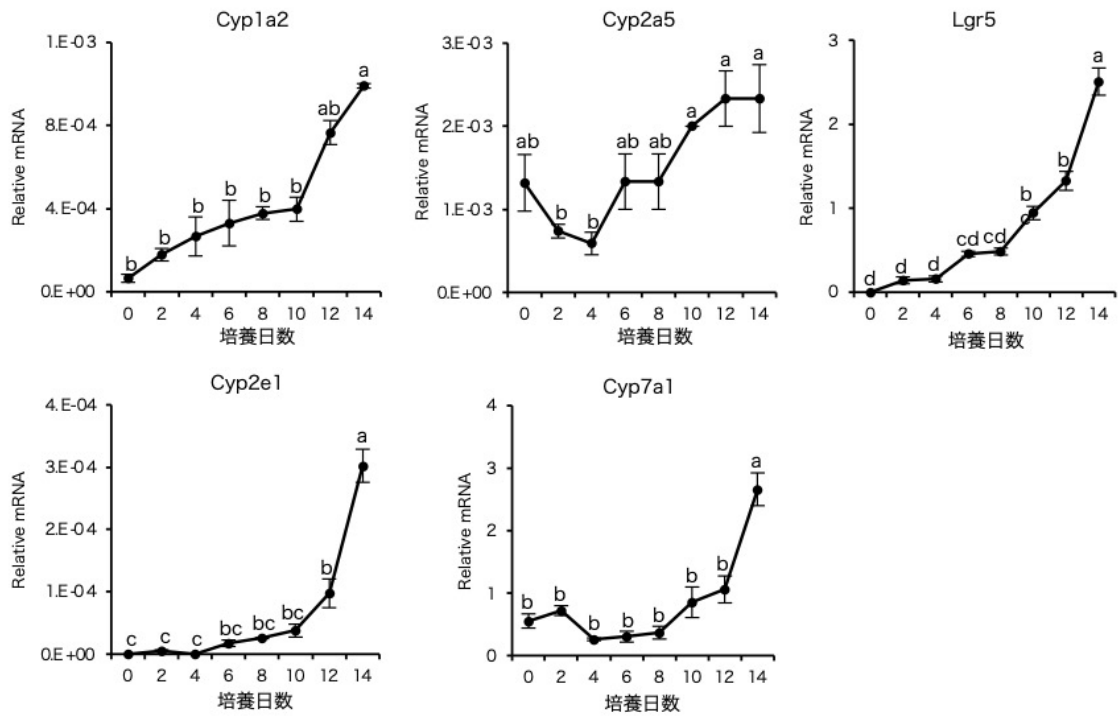


図 19B. FHS-DFAT の分化誘導過程における Zone 3 特異的遺伝子の発現変化  
 Zone 3 特異的遺伝子である Lgr5 は分化誘導 6 日後から、Cyp2a5 は分化誘導 8 日後から、Cyp1a2、Cyp2e1 および Cyp7a1 の発現は、分化誘導 10 日後から急速に増加し、肝分化誘導 14 日後において最も高い値を示した。  
 肝細胞での発現値を 1 とした。a-d: p < 0.01。



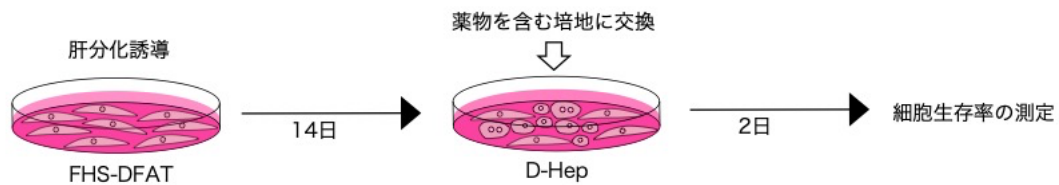


図 20. 薬物代謝実験の概略図

FHS-DFAT を肝細胞分化誘導して得られた D-Hep の培養液中に薬物を 2 日間添加し、細胞生存率を測定した。

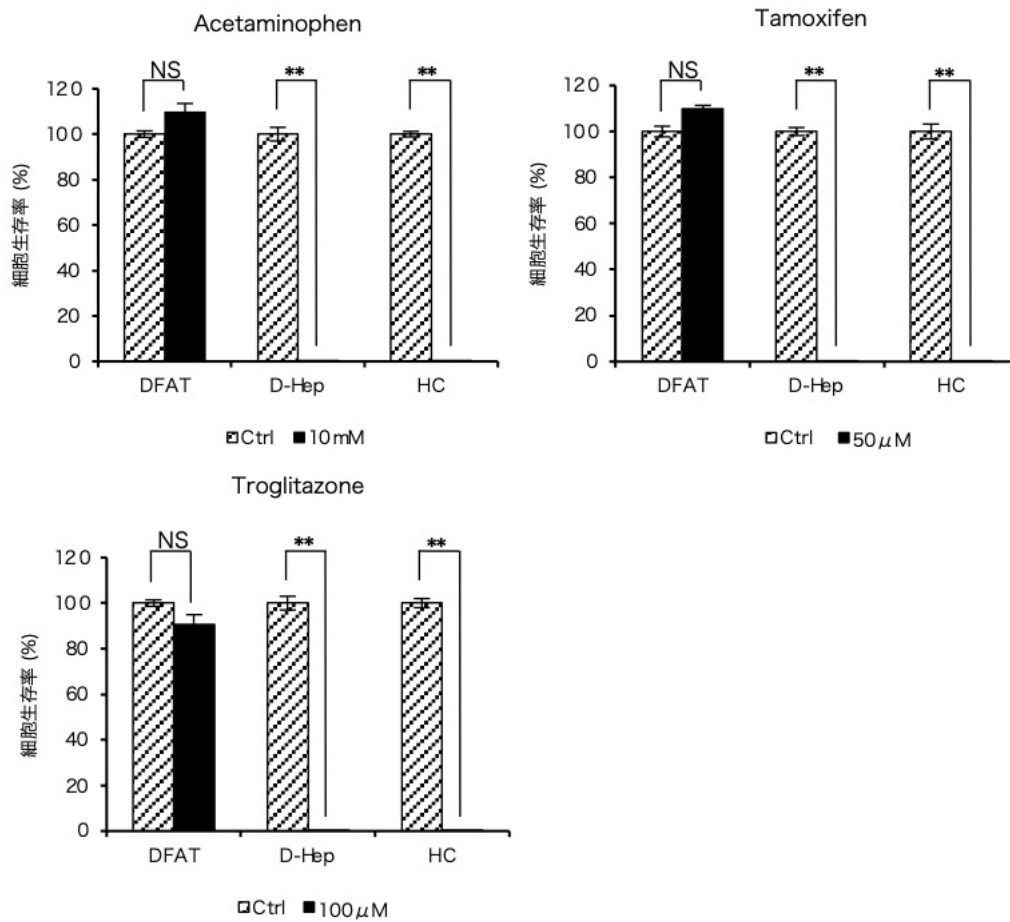


図 21. D-Hep における種々の薬物に対する代謝能の評価

DFAT、D-Hep、および初代肝細胞の細胞生存率は、3つの化合物（トログリタゾン、アセトアミノフェン、およびタモキシフェン）への48時間の曝露後にATPアッセイによって評価した。

すべての薬物添加区において、D-Hepの細胞生存率は著しい低下が認められた。NSは有意差なしを示す。\*\* :  $p < 0.01$ 。

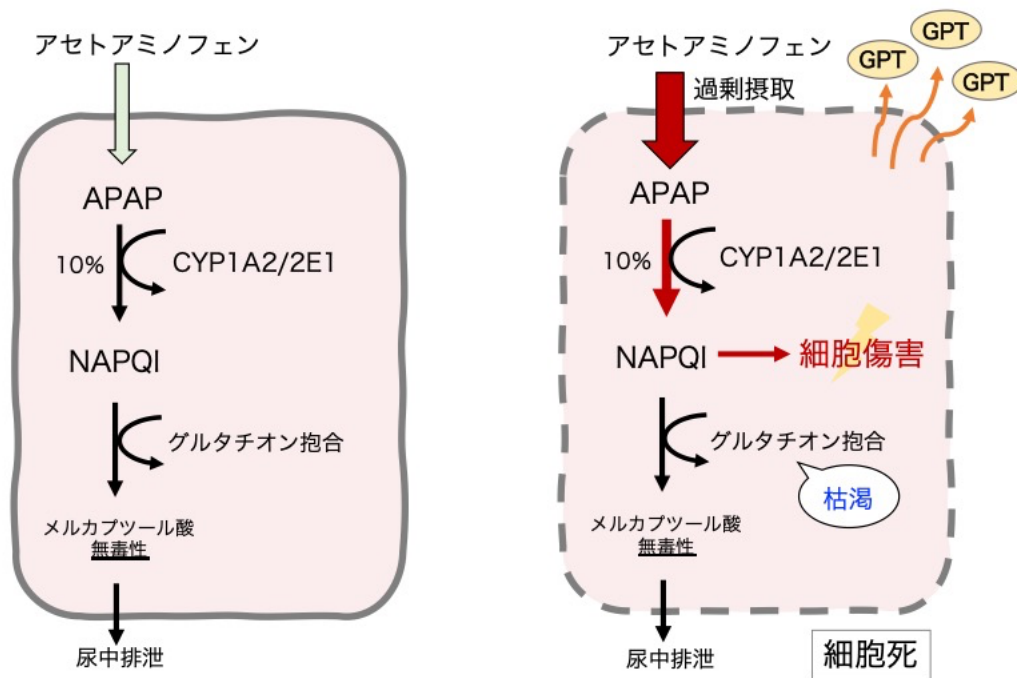


図.22 肝細胞におけるアセトアミノフェンの代謝

アセトアミノフェンは肝細胞において、薬物代謝酵素によってNAPQIに代謝され、グルタチオンによる抱合を受けた後、尿中へ代謝される（左）。一方で、アセトアミノフェンの過剰摂取は、グルタチオンの枯渇が起こり、NAPQIが肝細胞内へ蓄積した結果引き起こされる（右）。

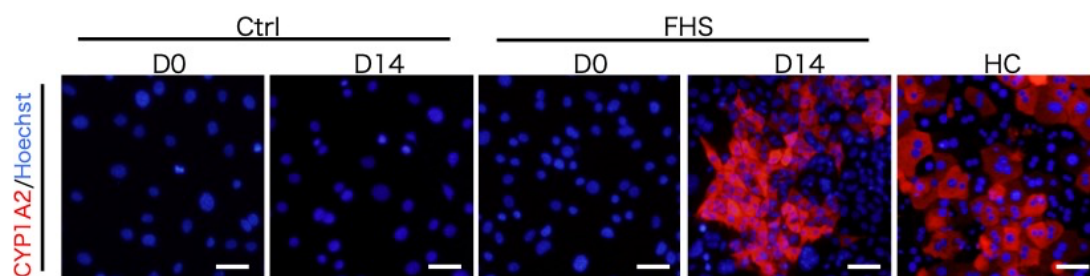


図 23A. 分化誘導後の FHS-DFAT における Cyp1a2 の発現

Cyp1a2 の免疫蛍光染色後の倒立蛍光顕微鏡写真を示す。

分化誘導後の FHS-DFAT において Cyp1a2 の発現が認められた。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

スケールバーは 50 $\mu$ m を示す。

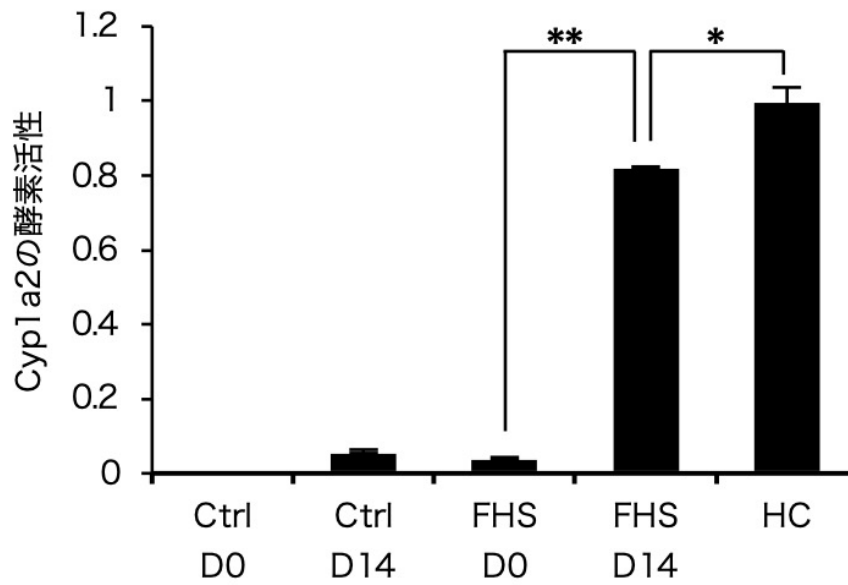


図 23B. 分化誘導後の FHS-DFAT における Cyp1a2 の活性

Cyp1a2 の活性値は分化誘導後の FHS-DFAT において、コントロール区と比べて有意に高い値を示した。

Ctrl : DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

FHS : FHS-DFAT の分化誘導 0 日 (D0) および分化誘導 14 日後 (D14)。

HC : 初代肝細胞。

HC での測定値を 1 とした。\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 。

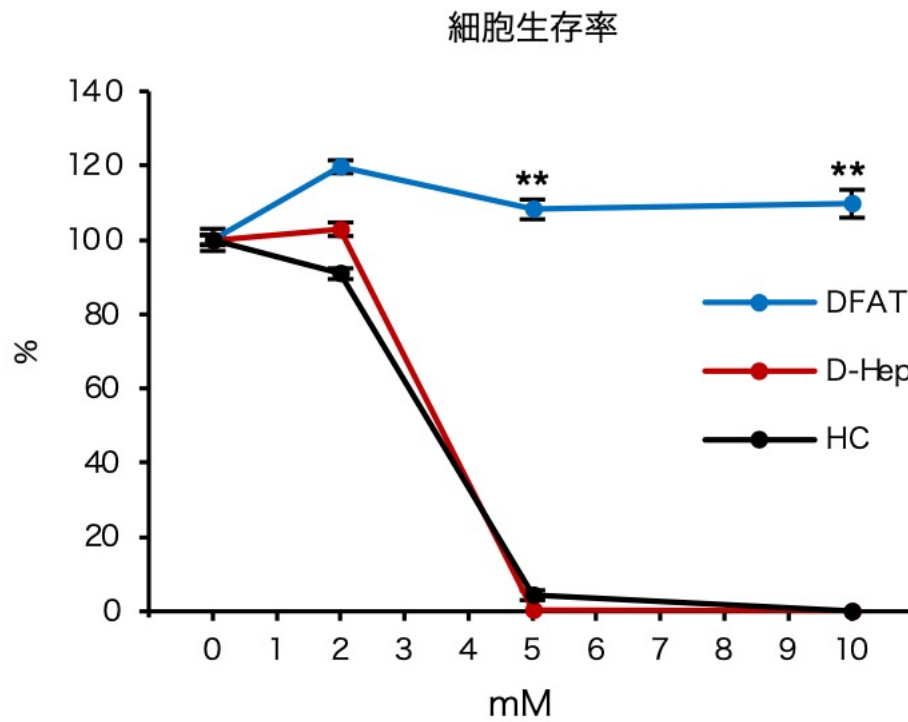


図 24. アセトアミノフェン添加 2 日後における細胞生存率

D-Hep の細胞生存率は、初代肝細胞と同様に 5 mM および 10 mM のアセトアミノフェン添加区において著しい低下が認められた。\*\* :  $p < 0.01$ 。

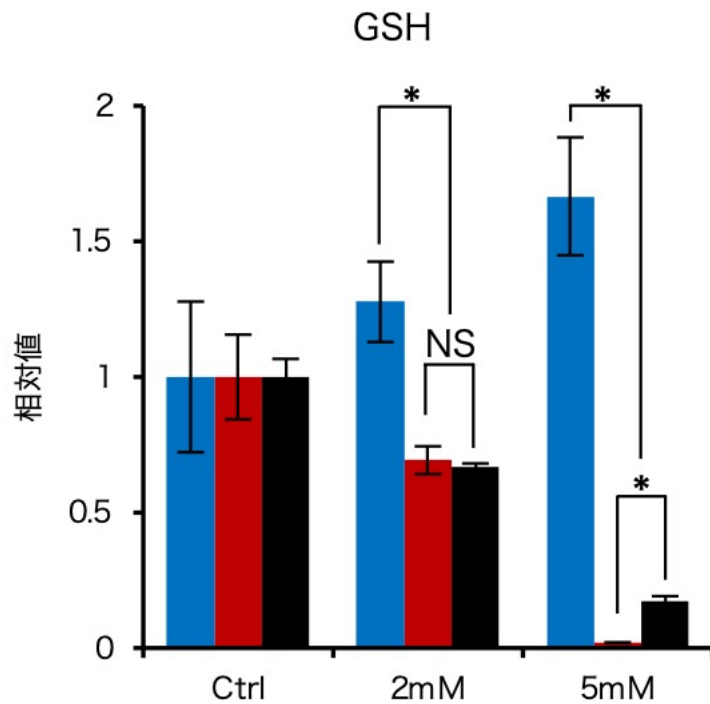


図 25. アセトアミノフェン添加 2 日後における細胞内グルタチオン量

D-Hep の細胞内グルタチオン量は初代肝細胞と同様に、コントロール区と比べて、2 mM と 5 mM のアセトアミノフェン添加区において有意に低い値を示し、特に 5 mM で著しい低下が認められた。

Ctrl での測定値を 1 とした。

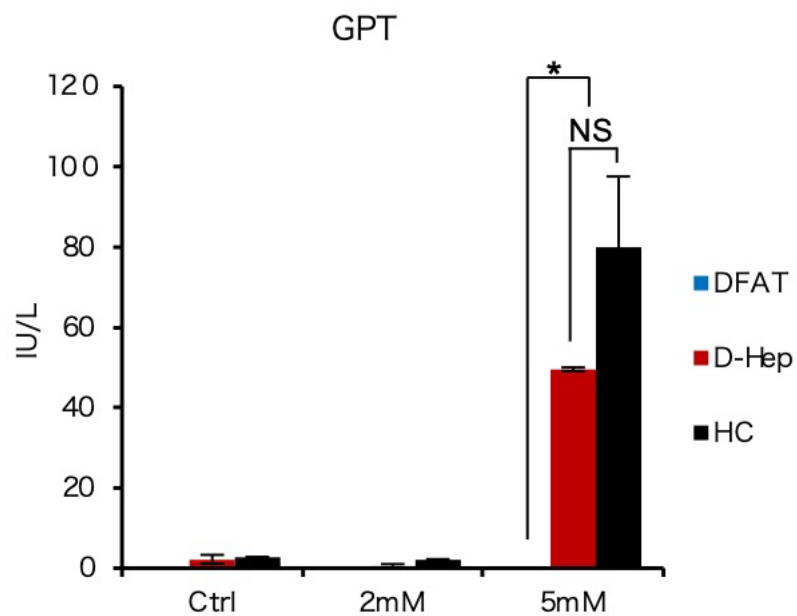


図 26. アセトアミノフェン添加 2 日後における培養上清中の GPT 量

D-Hep における培養上清中の GPT 量は、5 mM で初代肝細胞と同様に有意に高い値を示した。

Ctrl での測定値を 1 とした。



## 考察

Foxa2、Hnf4a、Sall1 を遺伝子導入した DFAT が Zone 3 肝細胞に分化するメカニズムは明らかではない。肝細胞は肝小葉の位置に応じて規則的に異なる代謝能を示すことが知られている (Gebhardt 1992)。この Liver zonation の形成には、血中の酸素濃度やホルモン濃度勾配などの関与が示唆されている (Jungermann & Kietzmann 1996)。また、Wnt / $\beta$ -カテニンシグナルの制御により Liver zonation が形成・維持されていることも明らかとなっている (Burke *et al.* 2009)。Wnt / $\beta$ -カテニンシグナル伝達活性は中心静脈周辺で最も高く、核内に存在する  $\beta$ -カテニンは肝臓の CYP 遺伝子など薬物代謝酵素の発現の活性化を直接調節する (Benhamouche *et al.* 2006; Sekine *et al.* 2006; Burke *et al.* 2009)。Wnt / $\beta$ -カテニンシグナルは、Wnt のアゴニストである R-spondin が Zone 3 肝細胞で高発現する受容体である Lgr5 に結合することによって活性化される (Braeuning *et al.* 2006; Yoon & Lee 2012; Clevers *et al.* 2014)。そのため、本研究結果から、DFAT-FHS は、Wnt / $\beta$ -カテニンシグナルの活性化により Zone 3 肝細胞への分化が誘導されたことが推測される。

FHS-DFAT における Lgr5 の発現は、肝細胞分化誘導 10 日および 12 日後

に急速に増加した (図 5b)。また、グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3 ベータ (GSK3 $\beta$ ) の選択的な阻害剤である CHIR99021 (CHIR) は、Wnt / $\beta$ -カテニンシグナル伝達を活性化する強力な誘導物質であることが報告されている (Chen *et al.* 2014)。さらに、これらの結果と一致して、第 2 章において抽出された DFAT における肝細胞分化制御因子である Sall1 は、 $\beta$ -カテニンとの Wnt シグナル伝達を協調的に促進することが明らかにされている (Sato *et al.* 2004)。したがって、これらの結果は、FHS-DFAT が肝細胞分化の初期段階から Lgr5 を発現していること (図 4a)、R-spondin1 と CHIR99021 が肝細胞分化誘導培地に含まれていることから Zone 3 肝細胞に分化したことを示唆している。

Wnt / $\beta$ -カテニンシグナルは Zone 1 肝細胞で抑制、Zone 3 肝細胞で活性化されていることから、D-Hep の Zone 特異性は、Wnt アンタゴニストによるシグナル伝達の阻害によって Zone 1 肝細胞に向けられる可能性がある。

## 小括

本章では、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行われた。Zone 1 特異的遺伝子である Oct および 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、Lgr5 は肝分化誘導 6 日後から、Cyp2a5 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。次に、Zone 3 肝細胞の特性である薬物代謝能を評価した。APAP、タモキシフェン および トログリタゾン を D-Hep の培養液中に添加して細胞生存率を測定した結果、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。

次に、代謝経路がよく知られている APAP の代謝能について調べた。

Cyp1a2 陽性の細胞は分化誘導前において観察されなかったが、D-Hep は初代肝細胞と同様の Cyp1a2 の発現を示した。また、Cyp1a2 の活性値は、分化誘導前と比較して有意に高い値を示した。異なる濃度の APAP を 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、5 mM および 10 mM の APAP を添加した培養液で、D-Hep の生存率が著しく低下した。GSH の値

は、2 mM および 5 mM でコントロール区に比べて有意に低く、特に 5mM で著しく低下した。培養上清中の GPT 量は、初代肝細胞および 5 mM APAP 添加区でコントロール区に比べて有意に高かった。これらの結果は、D-Hep が APAP を代謝する能力を持つことを示している。したがって、D-Hep は Zone 3 肝細胞の薬物代謝能をもつことが示唆された。

## 第5章 総括

本研究は、ダイレクトリプログラミングを用いて DFAT 由来の機能的な肝細胞の作製を目的として行われた。まず、遺伝子発現プロファイルを用いて、DFAT における肝細胞分化制御因子の抽出を試みた。次いで、候補遺伝子を遺伝子導入した DFAT を作製し、肝細胞へ分化するかを調べた後、候補遺伝子のスクリーニングを行なった。さらに、DFAT 由来肝細胞 (D-Hep) の肝細胞特異的遺伝子および機能の発現を調べるとともに、D-Hep の Zone 特異的性質についても調べた。

DFAT が内胚葉系の細胞である肝細胞への分化に必要な分化制御因子を抽出するため、肝細胞 (HC)、肝幹細胞 (RLSC)、脂肪細胞 (AC) および DFAT のトランスクリプトーム発現を相関解析、主成分分析およびクラスター解析した結果、DFAT の遺伝子発現プロファイルは、HC や AC とは大きく異なるが、RLSC とは類似性が高いことが示された。次いで、発現変動解析および Absolute call 解析を行なった結果、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 個確認された。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、これらのプローブの遺伝子機能情報から、最終的に、

Foxa2、Hnf4a および Sall1 を導入候補遺伝子として選定した。

選定した候補遺伝子が 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、候補遺伝子を遺伝子導入した DFAT を作製し、肝細胞分化能を評価した。全遺伝子を導入した DFAT を特定の肝細胞分化誘導培地で分化誘導した結果、アルブミンを発現し、上皮細胞様の細胞形態を示す肝細胞様細胞へと分化した。次いで、分化制御に必須な遺伝子をスクリーニングするために、各遺伝子を単独または組み合わせて遺伝子導入した DFAT を作製した。Foxa2 および Hnf4a を遺伝子導入した DFAT (FH-DFAT) と Foxa2、Hnf4a および Sall1 を全て遺伝子導入した DFAT (FHS-DFAT) の肝細胞分化誘導後において Alb および Afp の発現が認められた。肝細胞分化誘導後の FHS-DFAT は、他の遺伝子導入した DFAT に比べて、上皮細胞様の細胞形態を示し、2 核の細胞が観察された。また、アルブミンおよび Afp の発現は FH-DFAT と比べて有意に高い値を示した。以上の結果から、DFAT の肝細胞分化制御因子として、

Foxa2、Hnf4a および Sall1 の全てが必須であることが確認された。肝細胞分化誘導後の FHS-DFAT の肝細胞機能を評価した結果、アルブミンのタンパク質発現・分泌、グリコーゲンの貯蔵および LDL の取り込みが認められた。また、Afp、アルブミン、Tat は分化誘導 6 日後から、Tdo2 は分化誘導の 4 日

後から有意に発現増加した。FHS-DFAT を肝細胞分化誘導することによって得られた肝細胞様細胞を D-Hep と名付けた。

次いで、D-Hep が Zone 特異的性質をもつかを調べるために、FHS-DFAT の肝細胞分化過程における Zone 1、Zone 3 特異的遺伝子群の発現を経時的に調べた。次いで、D-Hep における Zone 特異的機能の発現について調べた。FHS-DFAT の肝細胞分化過程において、Zone 1 特異的遺伝子である Oct および Pck1 の発現は認められなかった。一方で、Zone 3 特異的遺伝子である、Lgr5 は分化誘導 6 日後から、Cyp2a5 は分化誘導 8 日後から、Cyp1a2、Cyp2e1 および Cyp7a1 の発現は、分化誘導 10 日後から急速に増加し、分化誘導 14 日後において最も高い値を示した。これらの結果から、D-Hep は Zone 3 肝細胞の性質をもつことが示唆された。Zone 3 肝細胞の主要な機能である薬物代謝能を評価するために、D-Hep の培養液中にアセトアミノフェン、トログリタゾンまたはタモキシフェンを添加し、細胞生存率を測定した。D-Hep の細胞生存率は初代肝細胞と同様に全ての薬物において著しい低下が認められた。次いで、D-Hep におけるアセトアミノフェンの代謝能について詳細に調べた。D-Hep の細胞生存率は、5 mM と 10 mM のアセトアミノフェン添加により著しく低下した。細胞内グルタチオン量においても 2 mM と 5 mM でコントロール区に比べて有意に低い値を示した。また、培養上清中の

GPT 濃度も、5 mM でコントロール区に比べて有意に高い値を示した。これらの結果から、D-Hep は初代肝細胞と同程度のアセトアミノフェン代謝能をもつことが確認された。

本研究で得られた知見は、D-Hep が代用肝細胞の新たな細胞源としての有用性を示すものであり、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も期待されるものである。また、本研究で用い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探索に極めて有効なツールになると考えられる。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導と研究に専念できる環境を与えて頂いた 加野 浩一郎 教授 に深く感謝いたします。本研究の遂行にあたり、終始、熱のこもった的確な御指示により私を導いて下さった 沖 嘉尚 助教 に心から感謝致します。本論文の作成ならび審査にあたり、御指導、御助言を頂いた 山室 裕 教授、関 泰一郎 教授 および 坂井 学 教授に感謝致します。

本実験を行うにあたり、御協力頂いた研究員の松丸卓史氏、伊林志穂氏、元学部生の萬條かれん氏、ならびに動物生体機構学研究室の学友に感謝します。最後に、研究に専念できる環境を与えてくれた私の両親に心から感謝します。

## 参考文献

Asahina, K., Fujimori, H., Shimizu-Saito, K., Kumashiro, Y., Okamura, K., Tanaka, Y., Teramoto, K., Arij, S. & Teraoka, H. (2004) Expression of the liver-specific gene Cyp7a1 reveals hepatic differentiation in embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells. *Genes Cells* **9**, 1297-1308.

Azuma, H., Paulk, N., Ranade, A., Dorrell, C., Al-Dhalimy, M., Ellis, E., Strom, S., Kay, M.A., Finegold, M. & Grompe, M. (2007) Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat Biotechnol* **25**, 903-910.

Barrett, T., Troup, D.B., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Rudnev, D., Evangelista, C., Kim, I.F., Soboleva, A., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Muetter, R.N. & Edgar, R. (2009) NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res* **37**, D885-890.

Basma, H., Soto-Gutiérrez, A., Yannam, G.R. *et al.* (2009) Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* **136**, 990-999.

Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C. & Colnot, S. (2006) Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* **10**, 759-770.

Braeuning, A., Ittrich, C., Köhle, C., Hailfinger, S., Bonin, M., Buchmann, A. & Schwarz, M. (2006) Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *Febs j* **273**, 5051-5061.

Brockes, J.P. & Kumar, A. (2005) Appendage regeneration in adult vertebrates and implications for regenerative medicine. *Science* **310**, 1919-1923.

Burke, Z.D., Reed, K.R., Pheasant, T.J., Sansom, O.J., Clarke, A.R. & Tosh,

D. (2009) Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism. *Gastroenterology* **136**, 2316-2324.e2311-2313.

Cai, J., Zhao, Y., Liu, Y., Ye, F., Song, Z., Qin, H., Meng, S., Chen, Y., Zhou, R., Song, X., Guo, Y., Ding, M. & Deng, H. (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* **45**, 1229-1239.

Carlson, B.M. (2005) Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat Rec B New Anat* **287**, 4-13.

Chen, E.Y., DeRan, M.T., Ignatius, M.S., Grandinetti, K.B., Clagg, R., McCarthy, K.M., Lobbardi, R.M., Brockmann, J., Keller, C., Wu, X. & Langenau, D.M. (2014) Glycogen synthase kinase 3 inhibitors induce the canonical WNT/ $\beta$ -catenin pathway to suppress growth and self-renewal in embryonal rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 5349-5354.

Cirillo, L.A., Lin, F.R., Cuesta, I., Friedman, D., Jarnik, M. & Zaret, K.S. (2002) Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4. *Mol Cell* **9**, 279-289.

Clevers, H., Loh, K.M. & Nusse, R. (2014) Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* **346**, 1248012.

Conigliaro, A., Colletti, M., Cicchini, C., Guerra, M.T., Manfredini, R., Zini, R., Bordoni, V., Siepi, F., Leopizzi, M., Tripodi, M. & Amicone, L. (2008) Isolation and characterization of a murine resident liver stem cell. *Cell Death Differ* **15**, 123-133.

Du, Y., Wang, J., Jia, J. *et al.* (2014) Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 394-403.

Duan, Y., Ma, X., Zou, W., Wang, C., Bahbahan, I.S., Ahuja, T.P., Tolstikov, V. & Zern, M.A. (2010) Differentiation and characterization of

metabolically functioning hepatocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* **28**, 674-686.

Gebhardt, R. (1992) Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* **53**, 275-354.

Gómez-Lechón, M.J., Donato, M.T., Castell, J.V. & Jover, R. (2004) Human hepatocytes in primary culture: the choice to investigate drug metabolism in man. *Curr Drug Metab* **5**, 443-462.

Guo, R., Tang, W., Yuan, Q., Hui, L., Wang, X. & Xie, X. (2017) Chemical Cocktails Enable Hepatic Reprogramming of Mouse Fibroblasts with a Single Transcription Factor. *Stem Cell Reports* **9**, 499-512.

Hannoun, Z., Steichen, C., Dianat, N., Weber, A. & Dubart-Kupperschmitt, A. (2016) The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes. *J Hepatol* **65**, 182-199.

Hayhurst, G.P., Lee, Y.H., Lambert, G., Ward, J.M. & Gonzalez, F.J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4alpha (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**, 1393-1403.

Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X. & Hui, L. (2011) Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* **475**, 386-389.

Huang, P., Zhang, L., Gao, Y. *et al.* (2014) Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* **14**, 370-384.

Jungermann, K. & Katz, N. (1989) Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev* **69**, 708-764.

Jungermann, K. & Kietzmann, T. (1996) Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* **16**, 179-203.

Kang, X.Q., Zang, W.J., Bao, L.J., Li, D.L., Song, T.S., Xu, X.L. & Yu, X.J. (2005) Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* **11**, 7461-7465.

Karantzali, E., Lekakis, V., Ioannou, M., Hadjimichael, C., Papamatheakis, J. & Kretsovali, A. (2011) Sall1 regulates embryonic stem cell differentiation in association with nanog. *J Biol Chem* **286**, 1037-1045.

Katsuda, T., Kawamata, M., Hagiwara, K., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Camargo, F.D. & Ochiya, T. (2017) Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity. *Cell Stem Cell* **20**, 41-55.

Kazama, T., Fujie, M., Endo, T. & Kano, K. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can transdifferentiate into skeletal myocytes in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **377**, 780-785.



Kelaini, S., Cochrane, A. & Margariti, A. (2014) Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state. *Stem Cells Cloning* **7**, 19-29.

Lauberth, S.M. & Rauchman, M. (2006) A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *J Biol Chem* **281**, 23922-23931.

Lázaro, C.A., Chang, M., Tang, W., Campbell, J., Sullivan, D.G., Gretch, D.R., Corey, L., Coombs, R.W. & Fausto, N. (2007) Hepatitis C virus replication in transfected and serum-infected cultured human fetal hepatocytes. *Am J Pathol* **170**, 478-489.

LeCluyse, E.L., Bullock, P.L. & Parkinson, A. (1996) Strategies for restoration and maintenance of normal hepatic structure and function in long-term cultures of rat hepatocytes. *Adv Drug Del Rev* **22**, 133-186.

Levy, G., Bomze, D., Heinz, S., Ramachandran, S.D., Noerenberg, A., Cohen, M., Shibolet, O., Sklan, E., Braspenning, J. & Nahmias, Y. (2015) Long-term culture and expansion of primary human hepatocytes. *Nat Biotechnol* **33**, 1264-1271.

Li, J., Ning, G. & Duncan, S.A. (2000) Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha. *Genes Dev* **14**, 464-474.

Li, K., Hu, F., Xiong, W., Wei, Q. & Liu, F.F. (2019) Network-based transcriptomic analysis reveals novel melatonin-sensitive genes in cardiovascular system. *Endocrine* **64**, 414-419.

Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., Fukuda, N., Iribe, Y., Tanaka, N., Matsubara, Y., Sakuma, T., Satomi, A., Otaki, M., Ryu, J. & Mugishima, H. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* **215**, 210-222.

Morita, S., Kojima, T. & Kitamura, T. (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* **7**, 1063-1066.

Nakamori, D., Akamine, H., Takayama, K., Sakurai, F. & Mizuguchi, H. (2017) Direct conversion of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by ATF5, PROX1, FOXA2, FOXA3, and HNF4A transduction. *Sci Rep* **7**, 16675.

Nishinakamura, R., Matsumoto, Y., Nakao, K., Nakamura, K., Sato, A., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Scully, S., Lacey, D.L., Katsuki, M., Asashima, M. & Yokota, T. (2001) Murine homolog of SALL1 is essential for ureteric bud invasion in kidney development. *Development* **128**, 3105-3115.

Nobusue, H., Endo, T. & Kano, K. (2008) Establishment of a preadipocyte cell line derived from mature adipocytes of GFP

transgenic mice and formation of adipose tissue. *Cell Tissue Res* **332**, 435-446.

Odom, D.T., Zizlsperger, N., Gordon, D.B., Bell, G.W., Rinaldi, N.J., Murray, H.L., Volkert, T.L., Schreiber, J., Rolfe, P.A., Gifford, D.K., Fraenkel, E., Bell, G.I. & Young, R.A. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-1381.

Oki, Y., Watanabe, S., Endo, T. & Kano, K. (2008) Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells can trans-differentiate into osteoblasts in vitro and in vivo only by all-trans retinoic acid. *Cell Struct Funct* **33**, 211-222.

Ono, H., Oki, Y., Bono, H. & Kano, K. (2011) Gene expression profiling in multipotent DFAT cells derived from mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 562-567.

Papeleu, P., Loyer, P., Vanhaecke, T., Elaut, G., Geerts, A., Guguen-

Guillouzo, C. & Rogiers, V. (2003) Trichostatin A induces differential cell cycle arrests but does not induce apoptosis in primary cultures of mitogen-stimulated rat hepatocytes. *J Hepatol* **39**, 374-382.

Papeleu, P., Vanhaecke, T. & Rogiers, V. (2006) Histone Deacetylase Inhibition: A Differentiation Therapy for Cultured Primary Hepatocytes? *Current Enzyme Inhibition* **2**, 91-104.

Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W.D., Savatski, L., Adamson, J.W., Ning, G., Kaestner, K.H., Rossi, J.M., Zaret, K.S. & Duncan, S.A. (2003) Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* **34**, 292-296.

Ramachandran, A. & Jaeschke, H. (2018) Acetaminophen Toxicity: Novel Insights Into Mechanisms and Future Perspectives. *Gene Expr* **18**, 19-30.

Ring, K.L., Tong, L.M., Balestra, M.E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li,

G., Walker, D., Zhang, W.R., Kreitzer, A.C. & Huang, Y. (2012) Direct reprogramming of mouse and human fibroblasts into multipotent neural stem cells with a single factor. *Cell Stem Cell* **11**, 100-109.

Rogiers, V. & Vercruyse, A. (1998) Hepatocyte cultures in drug metabolism and toxicological research and testing. *Methods Mol Biol* **107**, 279-294.

Rollini, P. & Fournier, R.E. (1999) The HNF-4/HNF-1alpha transactivation cascade regulates gene activity and chromatin structure of the human serine protease inhibitor gene cluster at 14q32.1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 10308-10313.

Sato, A., Kishida, S., Tanaka, T., Kikuchi, A., Kodama, T., Asashima, M. & Nishinakamura, R. (2004) Sall1, a causative gene for Townes-Brocks syndrome, enhances the canonical Wnt signaling by localizing to heterochromatin. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 103-113.

Sekine, S., Lan, B.Y., Bedolli, M., Feng, S. & Hebrok, M. (2006) Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* **43**, 817-825.

Sekiya, S. & Suzuki, A. (2011) Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* **475**, 390-393.

Shiota, G. & Yasui, T. (2012) Progress in stem cell biology in regenerative medicine for liver disease. *Hepatol Res* **42**, 15-21.

Smalling, R.L., Delker, D.A., Zhang, Y., Nieto, N., McGuinness, M.S., Liu, S., Friedman, S.L., Hagedorn, C.H. & Wang, L. (2013) Genome-wide transcriptome analysis identifies novel gene signatures implicated in human chronic liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **305**, G364-374.

Song, Z., Cai, J., Liu, Y. *et al.* (2009) Efficient generation of hepatocyte-

like cells from human induced pluripotent stem cells. *Cell Res* **19**, 1233-1242.

Spees, J.L., Lee, R.H. & Gregory, C.A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther* **7**, 125.

Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.

Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sugawara, M., Kikuchi, K., Higuchi, M., Nagamoto, Y., Watanabe, H., Tashiro, K., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M.K. & Mizuguchi, H. (2012) Generation of metabolically functioning hepatocytes from human pluripotent stem cells by FOXA2 and HNF1  $\alpha$  transduction. *J Hepatol* **57**, 628-636.

Thomas, P.D., Kejariwal, A., Campbell, M.J., Mi, H., Diemer, K., Guo, N., Ladunga, I., Ulitsky-Lazareva, B., Muruganujan, A., Rabkin, S.,



Vandergriff, J.A. & Doremieux, O. (2003) PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res* **31**, 334-341.

Wang, J., Fu, X., Yan, Y., Li, S., Duan, Y., Marie Inglis, B., Si, W. & Zheng, B. (2020) In vitro differentiation of rhesus macaque bone marrow- and adipose tissue-derived MSCs into hepatocyte-like cells. *Exp Ther Med* **20**, 251-260.

Wei, S., Zan, L., Hausman, G.J., Rasmussen, T.P., Bergen, W.G. & Dodson, M.V. (2013) Dedifferentiated adipocyte-derived progeny cells (DFAT cells): Potential stem cells of adipose tissue. *Adipocyte* **2**, 122-127.

Yagi, K., Kondo, D., Okazaki, Y. & Kano, K. (2004) A novel preadipocyte cell line established from mouse adult mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 967-974.

Yamada, H., Ito, D., Oki, Y., Kitagawa, M., Matsumoto, T., Watari, T. & Kano, K. (2014) Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **454**, 341-346.

Yin, L., Zhu, Y., Yang, J., Ni, Y., Zhou, Z., Chen, Y. & Wen, L. (2015) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol Med Rep* **11**, 1722-1732.

Yoon, J.K. & Lee, J.S. (2012) Cellular signaling and biological functions of R-spondins. *Cell Signal* **24**, 369-377.