

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06826

研究課題名(和文) 上皮-間葉系転換(EMT)を利用したダイレクトリプログラミング法の開発

研究課題名(英文) Direct reprogramming of somatic cells by epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

本橋 力(Motohashi, Tsutomu)

岐阜大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：40334932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：体細胞を別の機能細胞に直接転換するダイレクトリプログラミングは間葉系細胞では容易に起こるが、それ以外の体細胞では容易に起こらない。本研究では、様々な体細胞でダイレクトリプログラミングを可能にするための方法として、上皮-間葉系転換(EMT)を利用したダイレクトリプログラミング法の開発を試みた。角化細胞を用いた検討により、EMTを起こす転写因子を明らかにし、これによってEMTを起こした角化細胞に神経堤細胞発生マスター転写因子SOX10を発現させることによって角化細胞を神経堤様の細胞に直接転換させることに成功した。また、同様の方法で乳腺上皮細胞も神経堤様の細胞に直接転換させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維芽細胞以外の細胞種では容易に起こらないダイレクトリプログラミング法を角化細胞や乳腺上皮細胞で可能にした本研究の成果は、あらゆる体細胞のダイレクトリプログラミングへの応用が期待でき、この技術の基礎研究を超えた大きな発展につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Direct reprogramming, whereby cells are directly converted into another functional cell types, occurs primarily in mesenchymal cells but not readily in other somatic cells. In this study, our objective was to develop a direct reprogramming approach utilizing epithelial-mesenchymal transition (EMT) for various somatic cells. We identified transcription factors that induce EMT in keratinocytes, and demonstrated that the expression of SOX10, along with EMT induction, directly converted keratinocytes into neural crest-like cells. Additionally, we successfully converted mammary epithelial cells into neural crest-like cells using this method.

研究分野：発生学 幹細胞生物学

キーワード：ダイレクトリプログラミング 上皮-間葉系転換 EMT 間葉系細胞 神経堤細胞 色素細胞 乳腺上皮細胞 角化細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

体細胞を多能性細胞に転換する iPS 化と同様に、全く別の機能細胞に直接転換するダイレクトリプログラミング法が明らかになっている。この二つの現象は全く異なるメカニズムで起こるが、両者には共通して間葉系状態が関係している。iPS 化は転換の初期に上皮-間葉系転換 (EMT) が起こり、間葉系状態を経由する。一方、ダイレクトリプログラミングは間葉系細胞以外では容易に起こらない。この二つの転換現象が共通して間葉系状態を経由して成り立っていることは、間葉系状態が、元の細胞の拘束性を失った非常に柔軟性を持った状態であると考えられ、その状態に外的に何らかの情報を与えてやれば、容易に他の細胞に転換するものと思われる。本研究では細胞に上皮-間葉系転換 (EMT) を起こし間葉系状態にすることで、あらゆる細胞でダイレクトリプログラミングを可能にする方法の探索を行った。

2. 研究の目的

EMT を起こすことによって、あらゆる体細胞でダイレクトリプログラミングを可能にすることをめざし、体細胞として角化細胞と乳腺上皮細胞を選び、以下の研究を行った。

研究1 角化細胞に EMT を起こす転写因子は何か

研究2 EMT を起こした角化細胞でダイレクトリプログラミングが起こるか

研究3 角化細胞以外の体細胞で EMT を起こす転写因子は何か

研究4 EMT 起こした角化細胞以外の体細胞でもダイレクトリプログラミングが起きるか

3. 研究の方法

研究1 角化細胞に EMT を起こす転写因子の探索

マウス角化細胞 XB2 に EMT に関係すると思われる転写因子群をレトロウィルスを用いて過剰発現させ、EMT 現象の発生の有無を観察し、角化細胞で EMT を発生させる転写因子の探索を行った。EMT 発生の判断はフローサイトメーターによる間葉系細胞マーカーの発現の観察と、定量的 PCR による EMT 関係遺伝子の発現とその変化を調べることで行った。

研究2 EMT を起こした角化細胞でダイレクトリプログラミングが起こるか

EMT を起こした角化細胞に対して、神経堤細胞発生のマスター転写因子 SOX10 を発現させることで神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。神経堤細胞転換の評価は、神経堤細胞マーカー P75 の発現をフローサイトメーターで解析して行った。また、P75 陽性細胞を採取し、神経堤細胞培養条件下での自己複製と増殖能を評価し、さらに分化条件下で培養し、神経堤細胞の分化能 (神経細胞とグリア細胞への分化) を免疫染色と RT-PCR で調べた。

研究3 角化細胞以外の体細胞で EMT を起こす転写因子は何か

角化細胞以外の体細胞としてマウス乳腺上皮細胞 NMuMG を選び、この細胞で EMT を起こす転写因子を探索した。EMT に関係すると思われる転写因子群をレトロウィルスを用いて NMuMG 細胞に過剰発現させ、フローサイトメーターで間葉系細胞マーカーの発現を解析し、さらに EMT 関係遺伝子の発現を定量的 PCR で解析することで EMT 発生を判断し、転写因子を探索した。

研究4 EMT 起こした角化細胞以外の体細胞でもダイレクトリプログラミングが起きるか

EMT を起こした乳腺上皮細胞に対して SOX10 による神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。神経堤細胞転換の評価は研究2と同様に神経堤細胞マーカー P75 の発現をフローサイトメーターで解析し、さらに P75 陽性細胞を採取し、神経堤細胞培養・分化条件下での増殖能と分化能を免疫染色と RT-PCR で調べた。

上記の研究が成功したため、神経堤細胞以外の細胞へのダイレクトリプログラミングも試みた。EMT を起こした乳腺上皮細胞 NMuMG に色素細胞マスター転写因子を発現させて色素細胞への転換を試みた。色素細胞への転換の評価は、細胞形態とメラニン合成酵素の発現を RT-PCR で調べて行った。

4. 研究成果

研究成果1 角化細胞に EMT を起こす転写因子の探索

EMT 現象に関係すると推測した転写因子群をマウス角化細胞 XB2 にレトロウィルスを用いて過剰発現させ、EMT 現象の発生の有無をフローサイトメーターと定量的 PCR で調べた。スクリーニングした転写因子のうち、4つの転写因子を同時に発現することで角化細胞に間葉系の

マーカー分子である Sca-1、PDGFR α が顕著に発現し、さらに Vimentin の発現の上昇と E-Cadherin の発現の減少が観察され、典型的な EMT 現象が起きる事が判明した。

研究成果2 EMT 現象を用いたマウス角化細胞の神経堤細胞へのダイレクトリプログラミング

研究1の結果から EMT を用いた角化細胞 XB2 の神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングは、マウス線維芽細胞(MEF)では SOX10 の過剰発現のみで起こるが、この方法では XB2 細胞は全く転換しないことを既に我々は明らかにしている。XB2 細胞に研究1で明らかにした EMT に関係する4つの転写因子(4 TFs)を過剰発現させ EMT を起こし、同時に SOX10 を過剰発現させると、約10日で神経堤細胞のマーカーP75を発現する細胞が発生した (Fig. 1 a)。フローサイトメーターでこの P75 陽性細胞を採取し RT-PCR を行ったところ、神経堤細胞のマーカー遺伝子 *Foxd3*、*Pax3* の発現が認められた (Fig. 1 b)。さらに単離した P75 陽性細胞を神経堤細胞の分化条件で培養したところ、約3週間後に TuJ-1 陽性の神経細胞と GFAP 陽性のグリア細胞に分化し、神経堤細胞と同様の分化能を持つことが確認された。しかし、観察された神経細胞はごく少数でしかなく大多数がグリア細胞であり、転換して発生した神経堤細胞は、グリア細胞に運命が傾いている事が示唆された (Fig. 1 c)。

一方、4 TFs の過剰発現で XB2 細胞に EMT を起こし、その10日後に SOX10 を過剰発現させ、さらに10日培養しても、P75 陽性細胞が発生することが観察された (Fig. 2 a)。この P75 陽性細胞でも *Foxd3*、*Pax3* の発現が認められ (Fig. 2 b)、単離した P75 陽性細胞からは GFAP 陽性グリア細胞とともに多数の TuJ-1 陽性神経細胞が分化する事がわかった (Fig. 2 c)。以上より角化細胞は、EMT を経由すれば神経堤様の細胞にダイレクトリプログラミングできることがわかった。また、EMT 発生とダイレクトリプログラミングに用いるマスター転写因子の発現のタイミングを制御することで転換される目的細胞の性質が変わることが明らかになった。

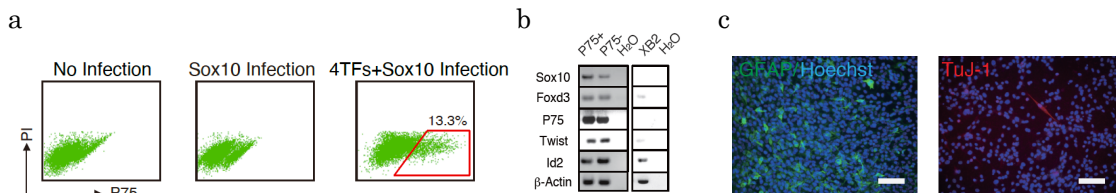


Fig. 1 SOX10 と 4 TFs の過剰発現による XB2 細胞の P75 陽性細胞への転換

a: フローサイトメーター解析、b: RT-PCR、c: P75 陽性細胞から分化した GFAP 陽性グリア細胞 (緑) と TuJ-1 陽性神経細胞 (赤)

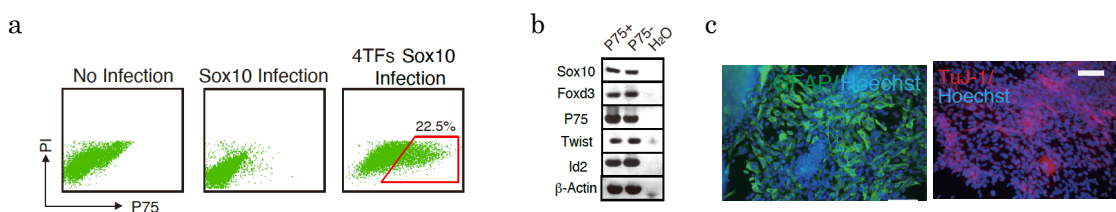


Fig. 2 4 TFs による EMT 後に SOX10 の過剰発現させた XB2 細胞の P75 陽性細胞への転換

a: フローサイトメーター解析、b: RT-PCR、c: P75 陽性細胞から分化した GFAP 陽性グリア細胞 (緑) と TuJ-1 陽性神経細胞 (赤)

研究成果3 マウス乳腺上皮細胞に EMT を起こす転写因子の探索

角化細胞以外でも EMT 現象を用いたダイレクトリプログラミング法が利用できるか検証するために、マウス乳腺上皮細胞 NMuMG で EMT を起こす転写因子の探索を行った。研究1と同様の検討の結果、角化細胞で用いた4 TFs が乳腺上皮細胞でも EMT を起こすことがわかった。

研究成果4 EMT 現象を用いたマウス乳腺上皮細胞の神経堤細胞へのダイレクトリプログラミング

乳腺上皮細胞 NMuMG に研究3で明らかにした4 TFs を過剰発現させ EMT を起こした後、神経堤細胞発生のマスター転写因子 SOX10 を発現させることで神経堤細胞への転換を試みた。遺伝子発現後10日で P75 陽性細胞が発生し (Fig. 3 a)、この P75 陽性細胞を神経堤細胞分化条件で培養すると TuJ-1 陽性神経細胞や GFAP 陽性グリア細胞に分化することが観察された (Fig. 3 b)。これにより、乳腺上皮細胞でも EMT 発生と SOX10 によって神経堤細胞様の細胞へ直接転換できることが明らかになった。一方、EMT 発生因子である TGF β 添加による EMT 発生でも神経堤細胞へ直接転換できるかどうかを試みた。NMuMG 細胞に TGF β を添加して EMT

を起こした後、SOX10を発現させても4 TFsによるEMT発生のときと同様にP75陽性細胞が発生した。このP75陽性細胞もGFAP陽性グリア細胞とTuJ-1陽性神経細胞に分化することがわかり、TGF β によるEMTでも神経堤細胞様の細胞にダイレクトリプログラミングできることがわかった。以上の結果は、EMT現象自体が本研究のダイレクトリプログラミングに重要であることを示し、EMTが細胞に柔軟性を持った状態を付与しているとした研究当初の仮説を示唆しているものと思われる。

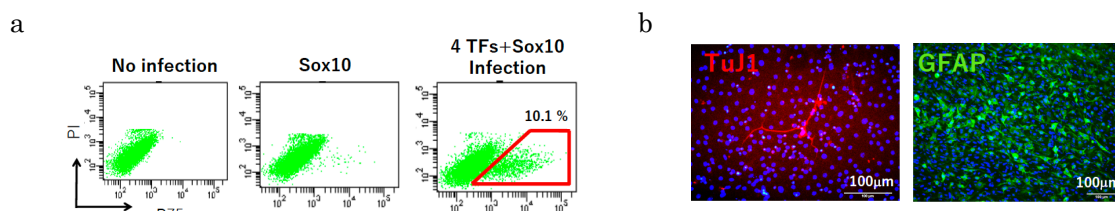


Fig. 3 4 TFsによるEMT後にSOX10の過剰発現によるNMuMG細胞のP75陽性細胞への転換 a: フローサイトメーター解析、b: GFAP陽性グリア細胞とTuJ-1陽性神経細胞

研究成果5 EMT現象を用いたマウス乳腺上皮細胞の色素細胞へのダイレクトリプログラミング

本研究のダイレクトリプログラミング法を様々な細胞種への転換にも利用したいと考え、マウス乳腺上皮細胞NMuMGの色素細胞への直接転換をこの方法で試みた。EMT関連転写因子と色素細胞発生のマスター転写因子をNMuMG細胞に発現させ17日間培養すると、樹状形態をもつ細胞に転換した。RT-PCRによりこの細胞に色素細胞マーカー遺伝子*Kit*、*Mitf*、*Trp-1*、*Trp-2*、*Tyrosinase*、*S100 β* が発現していることがわかり、NMuMG細胞が色素細胞に転換した可能性が示された。また、同様の方法でマウス角化細胞XB2も色素細胞に転換している可能性が示され、EMTを経由すれば様々な細胞にダイレクトリプログラミングできる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Le Coz Madeleine, Aktary Zackie, Watanabe Natsuki, Yajima Ichiro, Pouteaux Marie, Charoenchon Nisamane, Motohashi Tsutomu, Kunisada Takahiro, Corvelo Andre, Larue Lionel	4. 巻 141
2. 論文標題 Targeted Knockout of β -Catenin in Adult Melanocyte Stem Cells Using a Mouse Line, Dct::CreERT2, Results in Disrupted Stem Cell Renewal and Pigmentation Defects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1363 ~ 1366.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2020.08.025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Motohashi Tsutomu, Kawamura Norito, Watanabe Natsuki, Kitagawa Daisuke, Goshima Naoki, Kunisada Takahiro	4. 巻 29
2. 論文標題 Sox10 Functions as an Inducer of the Direct Conversion of Keratinocytes Into Neural Crest Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 1510 ~ 1519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2020.0106	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kishimoto I, Okano T, Nishimura K, Motohashi T, Omori K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Early Development of Resident Macrophages in the Mouse Cochlea Depends on Yolk Sac Hematopoiesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fneur.2019.01115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Motohashi T, Kunisada T.	4. 巻 1879
2. 論文標題 Melanoblasts as multipotent cells in murine skin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology.	6. 最初と最後の頁 257-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2018_144	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Motohashi T, Kunisada T.	4. 巻 1879
2. 論文標題 Direct conversion of mouse embryonic fibroblasts into neural crest cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology.	6. 最初と最後の頁 307-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/7651_2018_145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tsutomu Motohashi
2. 発表標題 Direct reprogramming of somatic cells into neural crest cells by epithelial-mesenchymal transition.
3. 学会等名 第55回日本発生病物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutomu Motohashi
2. 発表標題 Direct reprogramming of somatic cells by epithelial-mesenchymal transition.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsutomu Motohashi
2. 発表標題 Direct conversion of mouse somatic cells into neural crest cells.
3. 学会等名 第51回日本発生病物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜大学大学院、医学系研究科、再生機能医学分野
<https://www1.gifu-u.ac.jp/~saisei2/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------