

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18937

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞のステムネスにおけるTWIST1の機能解明

研究課題名(英文) Functional elucidation of TWIST 1 in stemness of Mesenchymal stem cells

研究代表者

森 樹史 (MORI, Tatsufumi)

近畿大学・ライフサイエンス研究所・助手

研究者番号：40760492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)は優れたサイトカイン産生能力と分化能力を有することから様々な疾患に対する再生医療材料として注目されている。一方で、MSCの未分化性や分化多能性、増殖といった幹細胞としての性質がどのように成立し維持されているのかはわかっていない。本研究ではMSCのステムネスに関わる重要な転写因子としてTWIST1に注目し、MSCの幹細胞性に与える影響を検討した。MSCにおけるTWIST1の強制発現は細胞増殖を活性化し分化を抑制した。マイクロアレイ解析、ChIPseq解析の結果、TWIST1はID1をはじめとする分化抑制因子の転写調節領域に結合し直接制御していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCにおける重要な転写因子が明らかとなることで、新しい再生医療技術の開発や移植用細胞の評価法の開発につながる。また、TWIST1は骨肉腫など間葉系の癌で高発現となることが報告されており、TWIST1の制御技術を研究することで新しい癌治療の開発にもつながる。

研究成果の概要(英文)：MSCs are somatic stem cells can isolated from various connective tissues such as bone marrow, fat, and synovial membrane. Because of its properties of cytokine secretion, multiple differentiation and niche formation, MSCs has been an attractive cell source for cell transplantation therapy. On the other hand, molecular mechanisms regulating stemness of the MSCs is largely unknown. Here we focused on a transcription factor TWIST1 as a molecule involving stemness of the MSCs. In the human MSCs, overexpression of TWIST1 significantly activated cell proliferation and inhibited differentiation, contrary, suppression of TWIST1 resulted in reduction of cell proliferation. Transcriptome and ChIPseq analysis revealed that TWIST1 directly bind to promoter region of other transcription factors regulating undifferentiation status of the stem cells. From these we concluded that TWIST1 is a master regulator of stemness in the MSCs and useful as a marker evaluating potentials of the MSCs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄や脂肪、滑膜等の組織から分離される幹細胞であり、骨、脂肪、軟骨細胞への分化能と CD29、CD44、CD90、CD105 といった表面抗原により同定される。MSC を用いた再生医療は関節や筋など運動器をはじめ、様々な組織において有効性が報告されており、今後一層普及することが予想される。MSC の分離および培養における最大の問題は、MSC の幹細胞性 (ステムネス) を維持する機構が明らかでないために、幹細胞の「品質」を定量的に評価することが困難なことである。これまでに、未分化性やあるいは増殖能を予測するマーカーとして幾つかの表面抗原の有効性が報告されてきたが、いずれも直接的な細胞機能との関連性が不明瞭である。胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) など未分化性の高い幹細胞で発現する転写因子 Nanog、Oct4、Sox2 を用いて MSC を評価する手法も報告されているが、これらの分子についても、MSC のステムネスとの直接的関連性は高くないと考えられている。さらに、MSC は由来する組織によって性質が異なることも知られている。治療に用いられている MSC の品質を評価し、最適な培養系を開発する上で、細胞機能に定量性をもって直結するような指標は欠かせない。

申請者らは、ES 細胞、iPS 細胞から MSC を分化誘導する研究の中で、上皮間葉転換や細胞の遊走を制御する転写因子『TWIST1』が MSC の誘導効率と深く関連していることを発見した。さらに、TWIST1 を抑制した MSC では細胞増殖や細胞の遊走が著しく抑制され、細胞死あるいは細胞老化に類似した形質を示すようになること、転写因子 Sox2 やポリコム遺伝子 Bmi1、分化抑制遺伝子 Id 遺伝子群の発現が強く抑制されることを発見した。近年、別のグループから、TWIST1 を高発現する細胞が治療効果に優れることが報告されている (Boregowda et al., EBioMedicine 2015)。

一方で、MSC における TWIST1 の機能はほとんど明らかになっていない。これまでに報告されている TWIST1 の機能の中でステムネスに関するものとしては、①p53 と直接相互作用し、p53 の DNA 結合を阻害 (Piccinin et al., Cancer Cell 2012)、②HoxA2 との相互作用 (Stacinopoulos et al., JBC 2005)、③Bmi-1 とともに Cancer ステムネスに関与 (Yang et al., Nat Cell Biol 2010)、④p16Ink4 と p21 の発現を阻害 (Ansieau et al., Cancer Cell 2008)、⑤Ink4 への Ezh を促進する (Cakourous et al., MCB 2012) などがあるが、いずれもどのように未分化性や多分化能性に関与するかは示されていない。一方で、強制発現により乳腺上皮細胞にステムネスを誘導できることは複数の研究グループによって示されており (Schmidt et al., Cell Rep 2015) ステムネス成立における重要性は確実である。

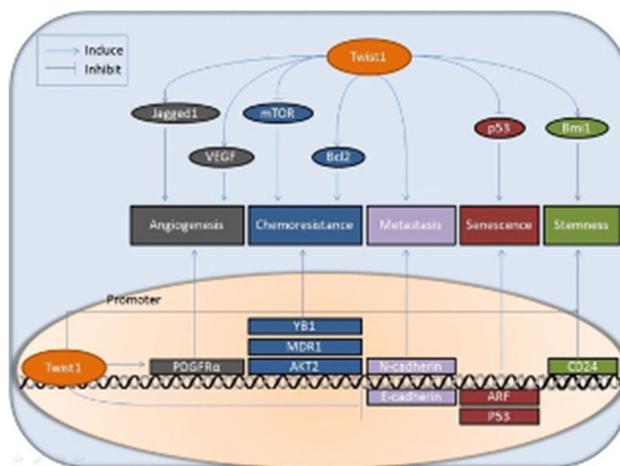


図 1. 細胞内における TWIST1 の幅広い機能

2. 研究の目的

TWIST1 は転写因子であり、カドヘリンや細胞骨格を調節する遺伝子の調節領域(プロモーター)付近に結合して発現量を調節することが基本機能であると理解されてきた。癌の悪性化との関連はよく研究されているが、正常な幹細胞、ステムネスにおける意味はよくわかっていない。これは、正常幹細胞における TWIST1 の詳細な標的領域と作用方向(すなわち、アクチベーターとして機能するのか、サブレッサー/インスレーターとして機能するのか)をゲノムワイドにカバーしたデータが存在していないことが一因と考えられる。本研究で

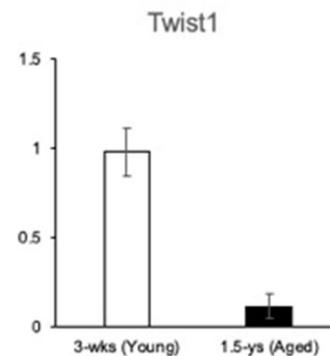


図2. 加齢マウスでのTwist1の発現

は、TWIST1 は MSC ゲノム上の何を標的にしどのような制御を行っているのか、またそれにより幹細胞では何が起こるのかを明らかにするため、MSC における TWIST1 の作用部位と転写活性の変化を網羅的に示すデータを取得することを目的とした。

3. 研究の方法

マウスモデルとして、C57BL/6 マウス大腿骨より骨髓組織を回収した。回収した骨髓組織を塩化カリウム低調液にて溶血させたのち、PBS で洗浄する。0.05%コラゲナーゼにて 37℃、30 分間処理し、MSC を含む細胞集団を遠心にて回収した。これを 10%FCS-DMEM にて 1 週間培養し、初代 MSC を得た。本研究では、加齢との関係を明らかにするため、若齢マウス(3 週齢) 加齢マウス(80 週齢) マウスより骨髓組織を分離し、FACS Aria を用いて PDGFRa+/Sca1+/CD45-/Ter117-/CD31-として未分化 MSC を分離した。マウス MSC における Twist1 の抑制は siRNA、GapmeR LNA にて実施した。

ヒト MSC は理化学研究所バイオリソースセンターより取得した。TWIST1 の強制発現はセンダイウイルスベクター(SRV-TW1)により行い、トランスフェクション後 72 時間のものを用いた。TWIST1 の抑制は Lipofectamine RNAiMAX を用い siRNA を導入することで誘導し、トランスフェクション後 48 時間の MSC をサンプルとした。

マイクロアレイ解析については、SRV-TW1 をトランスフェクションしたヒト MSC より TRIzol を用いて total RNA を回収し、DNase 処理を行ったのち、Claiom S human array にて転写発現の解析を行った。ChIPseq については、SRV-TW1 をトランスフェクションしたヒト MSC を 1%ホルムアルデヒドで 10 分間固定後、Lysis buffer を用いて核分画を抽出し、MNase 処理をしたのちに氷上で超音波処理を行った。抗 TWIST1 モノクローナル抗体を用いてクロマチンサンプルを免疫沈降し、3 回洗浄後に脱架橋を行い、エタノール沈殿で精製、HiSeq2000 にてシーケンスを実施した。

4. 研究成果

Twist1 の発現は若齢マウス骨髄 MSC で高く、老化に伴って減弱した。In vitro においても、継代数が多く老化の兆候を示した細胞において、Twist1 発現の減少が見られた。この結果は、過去に報告された結果と一致する。また、siRNA にて *Twist1* を抑制すると、マウス MSC の増殖は抑制された。

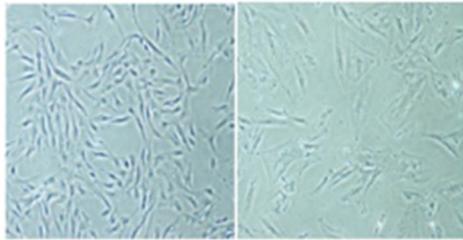
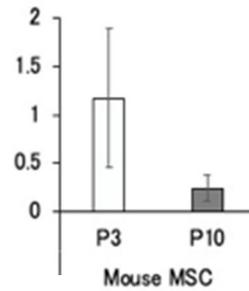


図 3. 過継代マウス MSC での Twist1 の発現



ヒト MSC において、SRV-TW1 の導入は細胞増殖を強力に賦活した。TW1 導入細胞は未分化な形状を保ったまま高い増殖力を示し、タイムラプス観察では遊走能の著しい向上も観察された。

分化能力の変化を観察するため TW1 導入ヒト MSC (TW1-MSC) を脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化させたところ、いずれの細胞への分化も抑制された。一方で、老化した細胞において TWIST1 を強制発現させると、老化形質が進行し細胞死が誘導された。

ヒト MSC における TWIST1 の標的遺伝子を明らかにするためマイクロアレイ解析を実施したところ、TW1-MSC では細胞分裂に関する遺伝子発現が活性化されており、幹細胞の未分化/分化に関わる遺伝子として特に分化抑制遺伝子 ID1 の発現に変化が認められた。Realtime PCR により詳細に検証した結果、Gata6、Bmi1、CD105 遺伝子においても TWIST1 による発現上昇が観察された。このことから、TWIST1 は MSC において細胞分裂を促進するとともに ID1 など分化抑制を担う転写因子の発現制御を行うことで MSC の未分化性を維持していると考えられた。

次に、TWIST1 が直接結合する領域を理解するため、ChIPseq を行った。マイクロアレイ、RT-PCR の結果と一致し、TWIST1 は ID1、GATA6 等のプロモーター領域に結合していた。

興味深いことに、これらの遺伝子における TWIST1 の結合領域は P53 タンパク質の結合領域と一致していた。

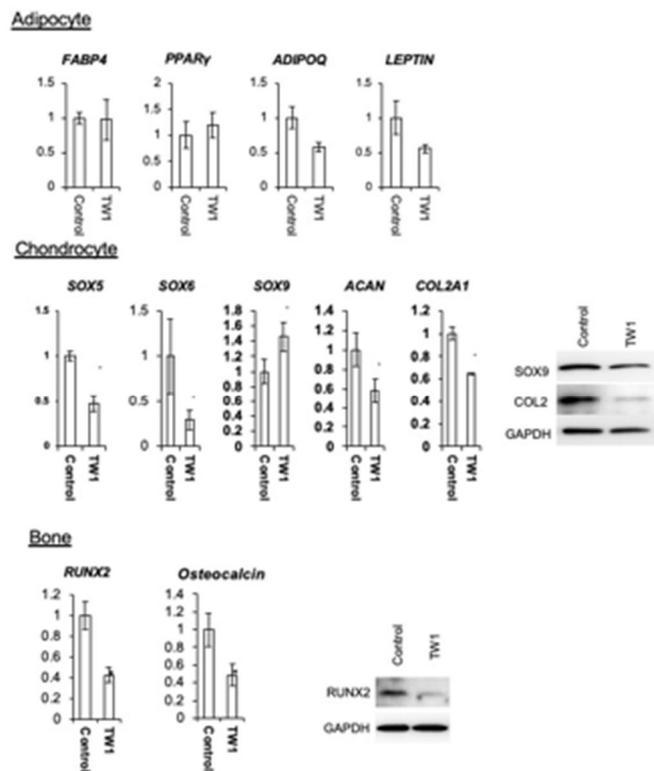


図 4. TW1-MSC における分化マーカー遺伝子の発現

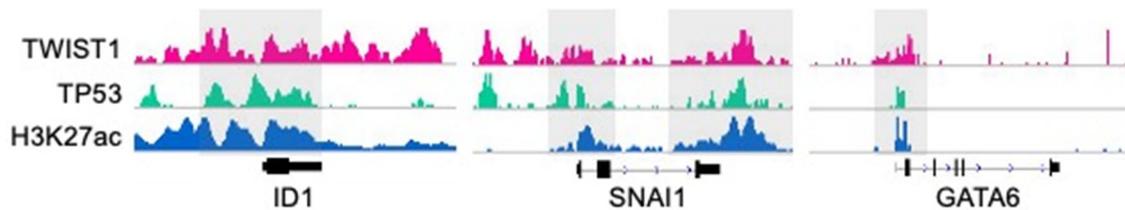


図 5. ヒト MSC での TWIST1 に対する ChIPseq

以上のことから、P53 の基礎発
現レベルが低い細胞において

は TWIST1 は未分化維持や自己複製に機能するが、P53 が発現しやすい状態にある老化細胞などでは TWIST1 による標的遺伝子の発現賦活が生じず、むしろ強制発現によるストレスで細胞老化や細胞死が誘導されることが考えられた。

本研究により TWIST1 の発現は MSC の自己複製能力に関与しており、幹細胞の能力を評価するマーカーとして有効であることが確認された。TWIST1 は幹細胞の未分化維持に関わる遺伝子のプロモーター等に直接結合し、またその機能が P53 タンパク質と排他的な関係にある可能性も示唆された。今後、P53 の制御などを組み合わせることで、TWIST1 による幹細胞機能の回復、改良や、肉腫をはじめとする TWIST1 強発現腫瘍の制御法の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 森 樹史 |
| 2. 発表標題 間葉系幹細胞のステムネスにおけるTWIST1の機能について |
| 3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|