

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460273

研究課題名(和文)上皮-間葉系転換(EMT)モデルシステムを利用したEMTメカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) Mechanism by using EMT model system.

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：EMTに関係すると推測した転写因子のうち、SOX9またはSOX10をマウス線維芽細胞に過剰発現させると、神経堤細胞マーカー遺伝子P75、Foxd3、Pax3を発現し、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞に分化する神経堤様の細胞に直接転換することを明らかにした。また、EMTに関係すると推測した転写因子のうち、4つの転写因子が角化細胞にEMTを起こすことを明らかにした。この4つの転写因子によるEMTと共にSOX10を過剰発現させて、角化細胞を神経堤様の細胞に直接転換できる可能性も見い出した。

研究成果の概要(英文)：We revealed genes including transcription factors selectively expressed in epithelial-mesenchymal transition (EMT). Among these transcription factor genes tested, SOX10 and SOX9 were capable of converting mouse embryonic fibroblasts (MEFs) into SOX10-positive (SOX10+) cells. The SOX10+ cells were found to maintain the expression of the Neural Crest (NC) cell marker genes, P75, Foxd3 and Pax3, and were shown to differentiate into neurons, glial cells, smooth muscle cells, adipocytes and osteoblasts, suggesting that SOX10 and SOX9 directly converted MEFs into NC-like cells. Furthermore, four transcription factors among the transcription factor genes expressed in EMT induced EMT in keratinocytes. Keratinocytes were converted into NC-like cells by overexpressing SOX10 concomitant with the EMT induction.

研究分野：医歯薬学

キーワード：上皮-間葉系転換 EMT 神経堤細胞 Neural Crest 直接転換法 ダイレクトリプログラミング 転写因子SOX10

1. 研究開始当初の背景

上皮-間充織転換 (EMT) は上皮細胞が上皮としての性質を捨て去り、間葉系細胞に転換する現象であり、生物の組織や臓器の形成に非常に重要なプロセスである。また、細胞が幹細胞性を獲得する際や iPS 化に際しても EMT が非常に重要な働きをしている。EMT 現象に関与する分子は様々な解析が行われているが、未だ不明なことが多く、EMT を制御し引き起こすような分子の全貌は明らかにされていない。本研究では、EMT の典型的なモデルである神経堤細胞発生を可視化した独自の遺伝子改変マウスを用いて分子レベルで EMT のメカニズムを明らかにすることをめざす。

2. 研究の目的

我々は Sox10-IRES-GFP マウスの神経堤細胞の発現遺伝子の網羅的解析と比較解析により、EMT で高発現している遺伝子群 (約 2000 遺伝子) を明らかにした。さらにマウス胎仔での発現パターンや Gene Ontology による分子機能解析により、この遺伝子群から EMT に強く関係すると推測される転写因子遺伝子を選び出している。本研究では、*in vitro* の EMT モデルシステムを構築し、これらの候補の転写因子から実際に EMT を引き起こす遺伝子を見つけ出す。さらに、これらの転写因子が、

1. どのようなメカニズムで EMT を起こしているのか?
 2. そこから、新たな EMT 発生メカニズムに結びつくか?
- を解明することをめざす。

3. 研究の方法

本研究は、生体由来の細胞を用いた方法 (研究 1) と細胞株を用いた方法 (研究 2) で展開した。

研究 1 Sox10-IRES-GFP マウス由来の細胞を用いた EMT モデルシステムの確立

Sox10-IRES-GFP マウスから上皮系細胞を採取し、それらに既知の EMT 関連転写因子を発現させて、EMT の発生を試験管内で観察できるモデルを確立する。Sox10-IRES-GFP マウスから樹立した上皮系細胞は EMT が発生すれば GFP が発現するため、EMT 発生を容易に観察することができる。利用する上皮系細胞としては、神経上皮細胞を用いた。Sox10-IRES-GFP マウスから摘出した神経上皮細胞にレトロウイルスによる遺伝子過剰発現を試み、EMT 発生の有無を GFP の発現で判断する。この EMT モデルシステムを利用して、EMT 発生に関係する転写因子を探索する。

研究 2 マウス細胞株を用いた EMT 現象に関する遺伝子の探索

利用する細胞株として、上皮系細胞であるマウス角化細胞株 XB2 を用いた。EMT 現象に関係すると推測した転写因子群を XB2 にレトロウイルスを用いて過剰発現させて、EMT 現象の発生の有無を調べる。EMT 発生有無は、間葉系細胞のマーカー Sca-1、PDGFR α の発現をフローサイトメーターで解析し、さらに定量的 PCR で EMT 関係遺伝子の発現の変化を観ることで判断する。このシステムを利用して、転写因子のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

研究成果 1 Sox10-IRES-GFP マウスの神経上皮細胞を用いた EMT モデルシステムの確立・EMT 関係遺伝子の探索

マウス胎仔神経管を利用した EMT モデルシステムの構築をめざして、胎齢 7.5~14.5 日胚の神経管の摘出法と培養条件、レトロウイルス感染法を検討した。高濃度の bFGF 存在下で胎仔神経管が培養できることを見出し、さらに胎齢 8.5 日胚の神経管で顕著な EMT 現象が観察できたことから、8.5 日胚神経管が本研究遂行に適していることがわかった。一方、レトロウイルスを用いた遺伝子過剰発現方法の検討では、様々な条件で胎齢 8.5 日胚の神経管へのレトロウイルスの感染を試みたが、効果的な感染方法が見い出せず、このシステムを用いた EMT 関係遺伝子の探索はできなかった。

研究成果 2 マウス角化細胞株を用いた EMT 現象に関する遺伝子の探索

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株 XB2 にレトロウイルスを用いて過剰発現させて、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から Sca-1、PDGFR α 両陽性細胞が顕著に出現することがわかった。しかも、Sca-1、PDGFR α 両陽性細胞では Vimentin の発現が上昇し、E-Cadherin の発現が減少するという典型的な EMT 現象が発生していることが観察された。フローサイトメーターで単離した Sca-1、PDGFR α 両陽性細胞では他の間葉系細胞マーカー CD105 と CD49e の発現も観察され、間葉系細胞分化培地で分化誘導したところ、脂肪細胞への分化が観察された。以上より、Sca-1、PDGFR α 両陽性細胞は角化細胞から EMT により発生した間葉系細胞であることが示唆された。今後は発生した間葉系細胞の他の細胞系譜への分化 (骨細胞、軟骨細胞など) を調べるとともに、4 つの転写因子による EMT 発生のメカニズムも解明する予定である。

一方、本研究から派生して、以下の研究成果 3 と 4 を明らかにすることができた。

研究成果 3 神経堤細胞へのダイレクトリプログラミング法の発見

これまでの研究で明らかにした遺伝子群の中から特に EMT に関係すると思われる 25 個の転写因子を選び出し、それらを Sox10-IRES-GFP マウス由来の線維芽細胞 (MEF) にレトロウィルスを用いて過剰発現させて、神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。25 個の転写因子のうち、SOX9 もしくは SOX10 を単独で過剰発現させるだけで MEF から GFP (SOX10) 陽性細胞が発生することが判明した。この GFP (SOX10) 陽性細胞をフローサイトメーターで採取して遺伝子発現を解析したところ、神経堤細胞のマーカー遺伝子 *P75*、*Foxd3*、*Pax3* 等の発現が認められた。GFP (SOX10) 陽性細胞を分化培地で分化誘導すると、神経細胞、グリア細胞、平滑筋細胞、脂肪細胞、骨細胞への分化が観察され、さらにニワトリ胚への移植実験により生体内の移動能も確認できた。以上より、GFP (SOX10) 陽性細胞は神経堤細胞と同じ分化能と移動能を持つことが認められ、SOX9 と SOX10 を過剰発現することで、MEF を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明らかになった。ただ、この神経堤様の細胞を長期間維持するためには SOX9 もしくは SOX10 だけでは十分ではなく、同時に c-MYC、KLF4 の発現が必要だった。

研究成果 4 EMT 現象を用いた神経堤細胞へのダイレクトリプログラミング

MEF 以外の細胞でも SOX10 の過剰発現を行い、神経堤細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。骨髄由来ストローマ細胞 ST2 では SOX10 の過剰発現により神経堤様細胞に転換した。一方、角化細胞 XB2、ミエローム細胞 SE1 では SOX10 では転換できなかった。そこで角化細胞に SOX10 の過剰発現と併に上記の研究成果 2 で明らかした EMT に関係する転写因子も過剰発現させると、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。フローサイトメーターで 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。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。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見いだされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Tsutomu Motohashi, Masahiro Nishioka, Daisuke Kitagawa, Norito Kawamura, Natsuki Watanabe, Takanori Wakaoka, Toshihiko Kadoya, Takahoro Kunisada. Galectin-1 enhances the generation of neural crest cells. The International Journal of Developmental Biology. 2017;61:407-413. (査読有) doi: 10.1387/ijdb.160380tm.

Natsuki Watanabe, Tsutomu Motohashi, Masahiro Nishioka, Norito Kawamura, Tomohisa Hirobe, and Takahiro Kunisada. Multipotency of melanoblasts isolated from murine skin depends on the Notch signal pathway. Developmental Dynamics. 2016;245:460-471. (査読有) doi: 10.1002/DVDY.24385.

Tsutomu Motohashi, Natsuki Watanabe, Masahiro Nishioka, Yuhki Nakatake, Piao Yulan, Hiromi Mochizuki, Yoshifumi Kawamura, Minoru S. H. Ko, Naoki Goshima and Takahiro Kunisada. Gene array analysis of neural crest cells identifies transcription factors necessary for direct conversion of embryonic fibroblasts into neural crest cells. Biology Open. 2016;5:311-322. (査読有) doi:10.1242/bio.015735.

Takahiro Kunisada, Kenichi Tezuka, Hitomi Aoki, Tsutomu Motohashi. The stemness of neural crest cells and their derivatives. Birth Defects Research Part C: Embryo Today. 2014;102:251-62. (査読有) doi: 10.1002/bdrc.21079.

[学会発表](計 6 件)

Tsutomu Motohashi, Norito Kawamura, Natsuki Watanabe, Naoki Goshima, Takahiro Kunisada. Direct conversion of mouse somatic cells into neural crest cells. 日本分子生物学会 第 40 回年会 2017 年 12 月 8 日 (神戸)

Tsutomu Motohashi, Natsuki Watanabe, Norito Kawamura, Yuhki Nakatake, Minoru Ko, Naoki Goshima, Takahiro Kunisada. Gene array analysis of neural crest cells identifies transcription factors necessary for direct conversion of embryonic fibroblasts into neural crest

cells. 日本分子生物学会 第 39 回年会
2016 年 12 月 2 日 (横浜)

本橋 力, 渡邊奈月, 河村徳人, 中武悠樹, 洪 実, 五島直樹, 國貞隆弘 網羅的遺伝子発現解析による神経堤細胞への直接転換に関係する転写因子の同定 第 27 回日本色素細胞学会学術大会 2016 年 11 月 13 日 (岐阜)

Tsutomu Motohashi, Natsuki Watanabe, Masahiro Nishioka, Yuhki Nakatake, Minoru Ko, Naoki Goshima, Takahiro Kunisada. Generation of neural crest cells by direct lineage conversion. 日本発生生物学会 第 48 回大会 2015 年 6 月 3 日 (つくば市)

Natsuki Watanabe, Tsutomu Motohashi, Tomohisa Hirobe, Takahiro Kunisada. Notch signal plays important roles for the multipotency of melanoblasts. Global Controls in STEM CELLS 2014 年 11 月 5 日 (Singapore)

Tsutomu Motohashi, Natsuki Watanabe, Takahiro Kunisada. Neural Crest cells sustain their multipotency throughout embryogenesis. Global Controls in STEM CELLS 2014 年 11 月 5 日 (Singapore)

〔図書〕(計 2 件)

Tsutomu Motohashi, Takahiro Kunisada. Extended Multipotency of Neural Crest Cells and Neural Crest-Derived Cells. In Trainor P, ed. Curr Top Dev Biol., pt 526. UK: Academic Press; 2015:111:69-95.

國貞隆弘, 吉田尚弘, 青木仁美, 本橋 力. 第 1 章 脊椎動物における色素細胞の発生 神経堤からメラノサイトが出現するメカニズム: 伊藤祥輔, 芝原茂樹, 錦織千佳子監修, 色素細胞 第 2 版 基礎から臨床へ, 東京: 慶應義塾大学出版会; 2015 年: 310, 1-16.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<https://www1.gifu-u.ac.jp/~saisei2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
本橋 力 (MOTOHASHI, Tsutomu)
岐阜大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 40334932

(2) 研究分担者
なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
渡邊 奈月 (WATANABE, Natsuki)
岐阜大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号: なし

若岡 敬紀 (WAKAOKA, Takanori)
岐阜大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号: なし