

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：33501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26501006

研究課題名(和文) 上皮間葉転換(EMT)による幹細胞誘導リプログラミングの分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of stem cell-inducing reprogramming by epithelial mesenchymal transition

研究代表者

真先 敏弘 (Masaki, Toshihiro)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：00585028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：IMS32(不死化マウスシュワン細胞)およびadultマウス一次培養シュワン細胞にSnai1をレンチウイルスを用いて導入した。その結果、これら2種のシュワン細胞に線維芽細胞様の形態変化を観察し、上皮間葉転換が起こったと考えられた。さらにIMS32においてはsphere形成能、および脂肪細胞への分化能を持つ間葉系幹細胞類似の細胞を誘導することに成功した。しかし軟骨細胞への分化能は本方法では誘導することができなかった。一方、一次培養シュワン細胞については幹細胞としての性質を誘導することはできなかった。本成果は、シュワン細胞由来リプログラミング細胞を用いた再生医療への分子的基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：Snai1 was introduced into IMS32 (immortalized mouse Schwann cell line) or adult mouse primary Schwann cells using lentivirus. In both Snai1-introduced Schwann cells, their morphologies changed to fibroblast-like appearance suggesting that epithelial mesenchymal transition (EMT) occurred. Also IMS32 acquired sphere-forming capacity, and differentiation potential to oil red O-positive preadipocyte-like cells, while differentiation potential to chondrocytes was not seen. On the other hand, Snai1 introduction did not induce these stem cell-like properties in adult mouse primary Schwann cells. These results will be molecular basis for regenerative therapy using these reprogrammed Schwann cell-derived stem cell-like cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：リプログラミング ハンセン病原菌 上皮間葉転換 幹細胞 間葉系幹細胞 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換(epithelial mesenchymal transition, EMT)は発生過程において上皮細胞から間葉系細胞を作り出す分子機構であるが、近年、幹細胞誘導リプログラミングとの関連が注目されている。近年、私たちは *Mycobacterium leprae*(ML)がシュワン細胞をリプログラムし、間葉系幹細胞に変化させることを発見した(文献1)。また、このリプログラミングの分子機構として EMT が重要な役割を果たしている証拠を得た。しかしそれを除けば、ML がシュワン細胞に幹細胞誘導リプログラミングを起こす分子機構は全く不明である。

2. 研究の目的

MLによる幹細胞誘導リプログラミングを MLを使用することなく人工的な方法、特に EMT マスター転写因子である *Snai1* の導入を中心とする方法によって再現することを試み、その過程で幹細胞誘導リプログラミングの分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 研究の材料はマウスシュワン細胞を用いる。これについては下記の2種の細胞を用いる

不死化マウスシュワン細胞 IMS32 (渡部和彦先生より供与)

adult マウス(4週~6週)一次培養シュワン細胞(文献1、MSC と呼称)

(2) EMT 関連信号伝達系刺激がマウスシュワン細胞の形態・増殖・sphere 形成能へ与える影響

本研究の最終目的の一つは EMT を介してシュワン細胞より間葉系幹細胞を誘導することであるため、当初の計画にはなかったが、*Snai1* 導入ではなく、単に信号伝達系の刺激

のみで間葉系幹細胞が誘導できないかどうかを分析した。

EMT 関連信号伝達系として TGF-beta, Wnt, Notch を選び、それぞれ TGF-beta 20 ng/ml, Wnt3a 0.3 µg/ml, Jagged-1 5 µg/ml (最終濃度)を培養液中に入れ、形態・増殖・sphere 形成能・sphere 生存期間への影響を調べた。

(3) マウスシュワン細胞への *Snai1* の導入
マウスシュワン細胞にレンチウイルスを用いて *Snai1* を導入する。*Snai1* 発現細胞は GFP で蛍光ラベルされる。*Snai1* 発現細胞は puromycin によって select され、この細胞を *Snai1* 発現細胞として実験に用いた。*Snai1* を導入した IMS32 と MSC をそれぞれ *Snai1*-IMS32, *Snai1*-MSC と呼称する。

(4) *Snai1* 導入がマウスシュワン細胞の形態・増殖・sphere 形成能・sphere 生存期間へ与える影響

EMT を通じて *Snai1* は間葉系幹細胞を誘導すると予想したが、これを検証するため、Sphere 形成能については、ultralow-attachment culture dish を用い、sphere 形成用培地 (DMEM, b-FGF, EGF 各 20 ng/ml)内で培養、直径 50µm 以上の sphere 形成を定量的に分析した。

(5) *Snai1* 導入シュワン細胞の各種間葉系細胞 (脂肪細胞、軟骨細胞) への分化能についての分析

脂肪細胞への分化は、sphere を脂肪細胞分化用培地 (StemCell Tech) 中で 3 週間培養した後、oil red O で脂肪滴が出現するかどうかを分析した。軟骨細胞への分化は、試験管内浮遊法()を用いて 3 週間培養し、軟骨への分化を分析した。

4. 研究成果

(1) EMT 関連信号伝達系刺激がマウスシュワン細胞の形態・増殖・sphere 形成能・sphere 生存期間へ与える影響

MSC は sphere 形成能を持たなかったが、IMS32 はもともと sphere 形成能を持っていることが判明した。しかしこれらの sphere の生存期間は 2 週間程度であり、それを超えて生存する sphere は存在しなかった。これらの細胞を TGF-beta で刺激したところ、いずれも線維芽細胞様の間葉系細胞形態に変化し、明らかに増殖速度が増加した。この現象は Snai1-IMS32, Snai1-MSC でも観察され、TGF-beta はマウスシュワン細胞に EMT を起こすことが示唆された。また TGF-beta 刺激後の IMS32 および MSC は非刺激細胞よりも有意に直径の大きい sphere を形成したが、50 μm 以上という基準による sphere 形成数においては有意な差は見られなかった。また sphere の生存期間についても TGF-beta は有意な影響を与えなかった。Wnt3a, Jagged-1 による刺激ではマウスシュワン細胞の形態・増殖・sphere 形成能には明らかな変化は見られなかった。sphere 生存期間については jagged-1 刺激でわずかな延長が見られたが、幹細胞一般に見られるような数か月に渡る生存は実現できなかった。

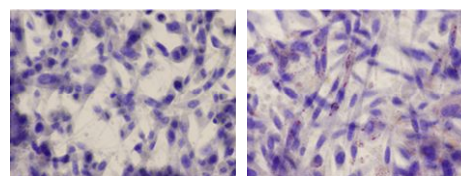
(2) Snai1 導入がマウスシュワン細胞の形態・増殖・sphere 形成能へ与える影響
結果(1)において TGF-beta 単独刺激でも EMT が誘導されることが示唆されたため、Snai1-IMS2, Snai1-MSC についてもまず TGF-beta で 2 週間程度刺激した。この時点で間葉系細胞様形態への変化と増殖速度の増加がみられた。TGF-beta 刺激後、sphere 形成培地で培養し、sphere 形成能 Snai1 非導入

細胞と比較した。Snai1-MSC では MSC 同様 sphere 形成は見られなかった。Snai1-IMS32 では sphere 形成能培養 10 日目の直径 50 μm 以上の sphere 数については IMS32 に比し有意差は見られなかった。しかし sphere の形態上は Snai1-IMS32 の方が明らかに細胞密度が高く、完全な球形に近い sphere が形成され、IMS32 と比較して形態的な差が見られた。しかし sphere 生存期間については IMS32 との差は見られなかった。

(3) Snai1 導入シュワン細胞の各種間葉系細胞（脂肪細胞、軟骨細胞）への分化能についての分析

Snai1-IMS32 由来 sphere に対し脂肪分化用培地で 3 週間培養したところ、培養細胞の 30-40% に細かい oil red O 陽性の脂肪滴を多数認め、脂肪細胞前駆細胞様細胞へ分化したと考えられた。

Oil red O 染色



IMS32

Snai1-IMS32

一方、IMS32 由来 sphere においては oil red O 陽性脂肪滴含有細胞は 3% 以下であった。

Snai1-IMS32 由来 sphere に対し軟骨分化を試みたが、軟骨への分化は見られなかった。

(4) まとめ

IMS32 に Snai1 導入と TGF-beta 刺激を組み合わせることで脂肪分化能のみを持つ間葉系未熟細胞を誘導できたのが、本研究の最大の成果である。残念ながら adult マウス一次培養シユ

ワン細胞には TGF-beta 刺激で EMTこそ誘導はできたが、間葉系幹細胞への誘導は成功しなかった。本研究の結果は、シュワン細胞由来リプログラミング細胞を用いた再生医療への第一歩となるものである。また本研究の結果から、細胞の不死化が幹細胞誘導と何らかの関係の有していることを示唆された。一次培養シュワン細胞よりの間葉系幹細胞誘導には TGF-beta, Snai1 導入に加えてさらに cell cycle に関連した何らかの刺激が必要と考えられる。

<引用文献>

Masaki T et al., Reprogramming adult Schwann cells to stem cell-like cells by leprosy bacilli promotes dissemination of infection. Cell 2013;152:51-67

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

Okuma H, Masaki T, Saito F, Hagiwara H, Ikeda M, Matsumura K, Sonoo M, Rambukkana A. Recapitulation of ML-induced reprogramming of Schwann cells by artificial methods. 第 57 回日本神経学会学術大会、2016.5.18、神戸コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真先 敏弘 (MASAKI, Toshihiro)
帝京科学大学・医療科学部・教授
研究者番号：00585028

(2) 研究分担者

斉藤 史明 (SAITO, Fumiaki)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40286993

松村 喜一郎 (MATSUMURA, Kiichiro)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：40286993

萩原 宏毅 (HAGIWARA, Hiroki)

帝京科学大学・医療科学部・教授

研究者番号：40286993

(3) 研究協力者

University of Edinburgh・MRC Centre for
Regenerative Medicine・Professor
Anura Rambukkana