

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 10 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2022

課題番号：16KK0165

研究課題名（和文）間葉上皮移行を利用した迅速かつ高効率な生体内リプログラミング法の確立（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Establishing a rapid and highly efficient method for in vivo direct reprogramming of fibroblasts into epithelial lineages using mesenchymal-to-epithelial transition program(Fostering Joint International Research)

研究代表者

渡邊 和秀（Watanabe, Kazuhide）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員主管研究員

研究者番号：40749397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000 円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：申請者らは転写因子を組合せて表皮細胞へのリプログラミングを行う方法を開発した。本研究では、この方法を用いて新しい生体内ダイレクトリプログラミング法の開発することを提案した。しかし新型コロナウイルス感染症の蔓延により、渡航先での研究の遂行が困難な状況になった。そのため培養細胞を用いた研究および既存データの解析へと方向転換を行った。その結果BMPシグナルを活性化してOVOL2の発現を誘導し、線維芽細胞から表皮細胞へのケミカルリプログラミングを促進できる可能性が示唆された。上述の結果は新しい生体内リプログラミング法の開発に寄与する重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では当初の目的であった生体内ダイレクトリプログラミング法の確率は果たせなかったが、高効率で線維芽細胞を表皮細胞に転換する新しいケミカルリプログラミングの開発を進めることができた。この成果により、最終ゴールである生体内ダイレクトリプログラミング法の確立を加速することができると考えられる。この生体内リプログラミング法が確立できれば、例えば広範囲熱傷の患者さんの自身の組織を用いた表皮再形成の促進を促すなど、臨床応用への期待が持てる。

研究成果の概要（英文）：We have developed a method of reprogramming fibroblasts into epidermal cells by combining transcription factors. In this study, we proposed to explore in vivo direct reprogramming potential by applying this technology. However, due to the spread of COVID19, it has become difficult to carry out our research at the overseas destination. Therefore, we took an alternative approach by using cultured cells and by analyzing existing data. As a result, we discovered that the activation of BMP signals can induce the expression of OVOL2 and promote chemical reprogramming from fibroblasts to epidermal cells. These results are important findings that contribute to the development of new in vivo reprogramming technologies.

研究分野：分子生物学

キーワード：生体内リプログラミング 間葉上皮移行 転写因子 OVOL2 表皮細胞 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞に戻すリプログラミングを経ずに分化した細胞を別の分化した細胞へと細胞機能を直接的に変換させる技術は進歩している。しかしながら、そのような直接的な細胞機能転換を生体内で誘導する技術は確立されていない。

我々は、間葉上皮移行 (MET) を司る転写因子ネットワークの解析の中で、上皮・間葉それぞれの表現型を規定する既知・未知の転写因子の中で、上皮の表現系を規定する候補因子をスクリーニングした結果、EMT を抑制的に制御する転写因子 **OVOL2** と皮膚や肝臓など各組織に特異的なマスター制御因子との組合せが相乗的に働き、線維芽細胞から表皮細胞や肝細胞といった上皮系列の細胞に類似した細胞への転換を迅速かつ高効率に引き起こすことを発見した (論文1、図1)。

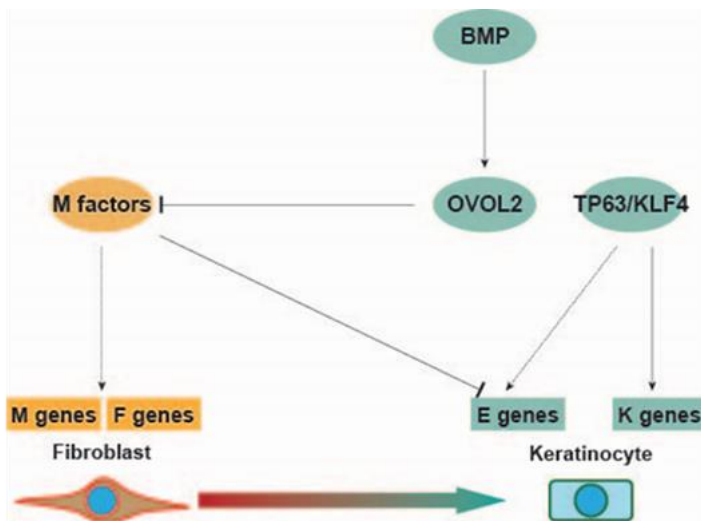


図1 線維芽細胞から表皮細胞への高効率ダイレクトリプログラミング法
OVOL2,TP63,KLF4 を用いた高効率ダイレクトリプログラミング法の図解

論文1. Watanabe K., Liu Y., Noguchi S., Murray M., Chang J.C., Kishima M., Nishimura H., Hashimoto K., Minoda A., Suzuki H., OVOL2 induces mesenchymal-to-epithelial transition in fibroblasts and enhances cell-state reprogramming towards epithelial lineages. Sci Rep. 2019 Apr 24;9(1):6490.

2. 研究の目的

本研究の目的は、この線維芽細胞から表皮細胞への迅速かつ高効率なリプログラミング法を生体に応用し、新しい生体内ダイレクトリプログラミング法を開発することであった。しかしながら、2020年からの国内外での新型コロナウイルス感染症の蔓延により、カリフォルニア大学アーバイン校との国際共同研究で進めていく予定だった遺伝子改変マウスを用いた動物実験が困難な状況になった。国内でも動物実験棟の閉鎖などの影響で時間と労力のかかるウィルス導入実験などは当面の実施が難しくなった。そのため、実験マウスを用いて生体内リプログラミング法を開発するプロジェクトを一時保留とし、以下に示す培養細胞を用いた実験および既存のデータの解析へと方向転換を行った。

・培養細胞を用いたケミカルリプログラミング法の探索

培養細胞を用いて基礎的なメカニズムを解明することで将来的に生体内リプログラミング法に応用することを目的とする。具体的には、遺伝子導入による転写因子の強制発現を用いず、生体分子や低分子化合物による処理を用いた新しいケミカルリプログラミング法の開発を目指す。

・既存データを用いた上皮組織構築における上皮間葉移行プログラムの役割の解明

既存の生体組織の一細胞解析データを解析して組織構築の中での上皮間葉移行の役割を見出すことを目的とした。発生学的に表皮組織と関連性の高い乳腺上皮組織のシングルセル RNA-seq およびシングルセル ATAC-seq を解析し、遺伝子発現とエピゲノム制御の観点から上皮間葉移行のプログラムが上皮組織の系統分化に果たす役割を解明することを目指す。

3. 研究の方法

・生体内リプログラミング法の確立

生体内ダイレクトリプログラミング法を開発するための方法として実験マウスに導入できるウィルスベクターの作成を行う。これまでのヒト細胞を用いた研究ではヒトの遺伝子を用いて研究を行っていたため、マウスのオルソログの遺伝子 (Ovol2, Trp63, Klf4) を発現するベクター

システムを構築する。その後、これらのベクターをマウスの真皮線維芽細胞に導入して、表皮特異的 GFP マーカーを発現する遺伝子改変マウスを用いて生体内リプログラミング法の検証と最適化を行う予定だったが、上述の理由により方向転換を余儀なくされた。

・培養細胞を用いたケミカルリプログラミング法の探索

初代培養のヒト線維芽細胞を用いて、ケミカルリプログラミングを可能にする方法を探索する。過去のデータから BMP シグナルを活性化することで OVOL2 の発現を誘導できることがわかっている（図1）ので、OVOL2 の遺伝子導入の代わりにリコンビナント BMP 蛋白で刺激を行うことで TP63/KLF4 の遺伝子導入と組み合わせて、線維芽細胞から表皮細胞へのリプログラミングを試み、形態変化、マーカー発現変化、遺伝子発現変化などを検証する。

・既存データを用いた上皮組織構築における上皮間葉移行プログラムの役割の解明

これまで我々の研究グループでは発生学的に表皮組織に近い乳腺上皮組織の一細胞解析を行った。それらのシングルセル RNA-seq およびシングルセル ATAC-seq を用いたバイオインフォマティクス解析により上皮間葉移行のプログラムが乳腺上皮のサブタイプの分化誘導の際にどう変化していくかを解析する。

4. 研究成果

・生体内リプログラミング法の確立

生体内ダイレクトリプログラミング法を開発するための方法として実験マウスに導入できるウイルスベクターの構築を行った。具体的には、これまでヒト細胞の実験に使用していたヒト遺伝子 (OVOL2、TP63、KLF4) を用いたリプログラミングカクテルに代わり、マウスのオルソログの遺伝子 (Ovol2、Trp63、Klf4) を発現するレンチウイルスベクターシステムを構築した。これらは今後実験マウスを用いた生体内リプログラミング法の開発を進める上で必須となるシステムである。

・培養細胞を用いたケミカルリプログラミング法の探索

初代培養のヒト線維芽細胞を用いて、ケミカルリプログラミングを可能にする方法を探索した。まず BMP シグナルを活性化することで OVOL2 の発現し、TP63/KLF4 の強制発現と組み合わせて、線維芽細胞から表皮細胞へのリプログラミングを試み、5 日後に形態変化や遺伝子発現を評価した（図2）。その結果、BMP 刺激のみの場合、間葉系細胞の紡錘形の形態の減少が見られたものの、表皮細胞マーカーの発現誘導などは見られなかった。TP63/KLF4 の強制発現のみでも形態変化、遺伝子発現変化を見ると表皮細胞へのリプログラミングは不完全であった。それに対し、BMP 刺激と TP63/KLF4 の強制発現を組み合わせた場合、より表皮細胞に近い形態変化がみられ、遺伝子発現も間葉系遺伝子群の発現が抑制され、上皮系マーカーや表皮細胞特異マーカーの発

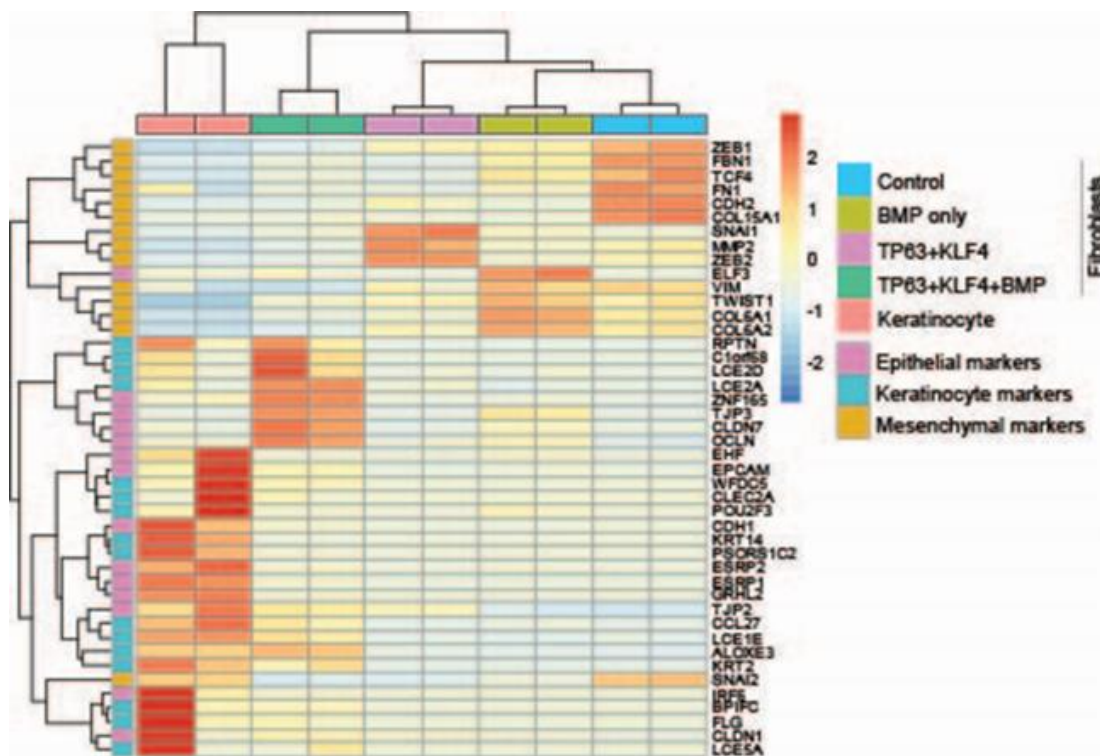


図2 BMP シグナル刺激による表皮細胞へのダイレクトリプログラミングの促進

線維芽細胞にBMP 刺激、TP63/KLF4 の遺伝子導入の組合わせを行い、表皮細胞へのダイレクトリプログラミングを試みた。それぞれの条件におけるRNA-seq による遺伝子発現解析結果を示す。

現上昇がみられた（図2）。これらの結果から、BMP シグナルの活性化は OVOL2 の強制発現同様に線維芽細胞から表皮細胞へのリプログラミングを促進する働きを持つことが示唆された。今後、この方法を改良し、リプログラミングに最適な条件を検討するとともに、TP63/KLF4 の強制発現を代替するケミカルリプログラミング法を探索して、将来的に遺伝子導入を伴わない生体内リプログラミング法の開発に繋げていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1 . 著者名 Pervolarakis Nicholas, Nguyen Quy H., Williams Justice, Gong Yanwen, Gutierrez Guadalupe, Sun Peng, Jhutti Darisha, Zheng Grace X.Y., Nemec Corey M., Dai Xing, Watanabe Kazuhide, Kessenbrock Kai	4 . 巻 33
2 . 論文標題 Integrated Single-Cell Transcriptomics and Chromatin Accessibility Analysis Reveals Regulators of Mammary Epithelial Cell Identity	5 . 発行年 2020年
3 . 雑誌名 Cell Reports	6 . 最初と最後の頁 108273 ~ 108273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108273	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 該当する

1 . 著者名 Watanabe Kazuhide, Liu Ye, Noguchi Shuhei, Murray Madeleine, Chang Jen-Chien, Kishima Mami, Nishimura Hajime, Hashimoto Kosuke, Minoda Aki, Suzuki Harukazu	4 . 巻 9
2 . 論文標題 OVOL2 induces mesenchymal-to-epithelial transition in fibroblasts and enhances cell-state reprogramming towards epithelial lineages	5 . 発行年 2019年
3 . 雑誌名 Scientific Reports	6 . 最初と最後の頁 np
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-43021-z	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 Watanabe Kazuhide, Liu Ye, Noguchi Shuhei, Murray Madeleine, Chang Jen-Chien, Kishima Mami, Nishimura Hajime, Hashimoto Kosuke, Minoda Aki, Suzuki Harukazu	4 . 巻 NA
2 . 論文標題 OVOL2 induces mesenchymal-to-epithelial transition in fibroblasts and enhances reprogramming to epithelial lineages	5 . 発行年 2019年
3 . 雑誌名 BioRxiv	6 . 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/577692	査読の有無 無
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 Watanabe Kazuhide, Panchy Nicholas, Noguchi Shuhei, Suzuki Harukazu, Hong Tian	4 . 巻 NA
2 . 論文標題 Combinatorial perturbation analysis reveals divergent regulations of mesenchymal genes during epithelial-to-mesenchymal transition	5 . 発行年 2019年
3 . 雑誌名 BioRxiv	6 . 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/627372	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazuhide Watanabe
2. 発表標題 Divergent regulations of mesenchymal genes during epithelial-to-mesenchymal transition
3. 学会等名 TEMTIA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuhide Watanabe
2. 発表標題 OVOL2 and tissue-specific reprogramming factors cooperatively induce epithelial phenotype in fibroblasts
3. 学会等名 Keystone Symposia
4. 発表年 2019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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ダイ シン (Dai Xing)	カリフォルニア大学アーバイン校・Department of Biological Chemistry・Professor	

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			
米国	University of California, Irvine			
米国	University of California, Irvine			