

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861217

研究課題名(和文) 遺伝子導入による体細胞からの間葉系幹細胞の誘導

研究課題名(英文) Induction of Mesenchymal Stem Cells from Somatic Cells by Direct Reprogramming/Transdifferentiation

研究代表者

寺村 岳士 (TERAMURA, Takeshi)

近畿大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40460901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSCs)は再生医療の中心的材料として注目されているが、培養による形質の劣化が顕著であり、最適な培養系、安定的な分化誘導法が必要とされている。一方で、MSCの維持・発生に関わる分子経路は明らかになっていない。申請者は、上皮間葉転換の制御因子であるTwist1に着目し、幹細胞維持に関わる遺伝子の発現と相関すること、エピジェネティック修飾因子と相互作用すること、ヒト単球において、リプログラミング因子とともにTwist1を発現させると、MSC様細胞に直接転換するという結果を得た。以上から、Twist1はMSCにおいて重要な因子であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent stem cells that are present in multiple tissues. Recent studies demonstrated that MSCs can support wound healing and tissue regeneration. On the other hand, adult MSCs exhibit cellular senescence during ex vivo expansion, which is accompanied by a reduction in self-renewal and multidifferentiation potential. To resolve this, identification of master molecules and central cascades involving MSC self-renewal is essential. Here, we focused on Twist1, which is a master regulator of epithelial-mesenchymal transition (EMT), and examined its roles in MSCs. Suppression of Twist1 led to reduction of Sox2, Bmi1, and Gata6 expressions. Contrary, over-expression of Twist1 induced expression of these genes. Mass spectrometric analysis showed that Twist1 involves epigenetic modification. Finally, we demonstrated that direct induction of MSCs from human monocytes was possible by introducing Twist1 with reprogramming factors.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSCs) は、1. サイトカイン産生性、2. 免疫抑制能力、3. 分化多能性、4. 低腫瘍原性という性質から、現状最も現実的な再生医療資源であり、既に複数の臨床試験が実施されている。しかし、加齢に伴い質的・量的変化が生じること、数回の継代培養で増殖能力や分化能力が低下することが課題となり、応用・適応範囲の制限となっている。これを解消するため、iPS 細胞や ES 細胞といった多能性幹細胞を MSC の材料とする方法の開発も進んでいる。多能性幹細胞は未分化な状態のままほぼ無限に増殖させることが可能である。また、iPS 細胞においては材料となる細胞の年齢 (老化状態) も初期化されるという利点も報告されている。一方で、多能性幹細胞からの MSC の作成については、分化効率の安定性や、安全性に課題を残している。

高品質な MSC の安定的な培養、あるいは多能性幹細胞からの MSC 誘導をより安定的に実施するためには、間葉系幹細胞の発生・維持に重要な転写因子を同定し、その分子の機能を理解することが必要である。

申請者らは、2 種類の異なる多能性幹細胞 (ES 細胞、Epiblast 幹細胞: EpiS 細胞) において MSC の分化誘導を実施した。その結果、ES 細胞に比べ EpiSC を材料とした場合に MSC への分化が高率で生じることが明らかになった (図 1A)。次に、両細胞間で発現量の異なる転写因子を抽出したところ、EpiSC においては上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子が高発現していることが明らかとなった (図 1B)。その中で、EMT

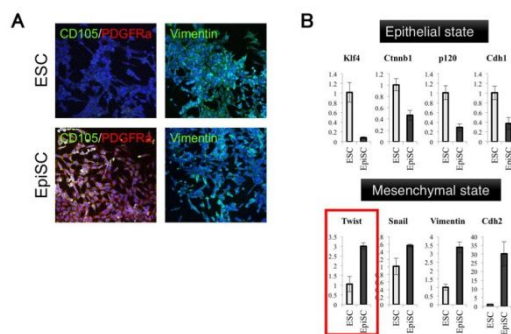


図1. ES細胞、iPS細胞からのMSC誘導とEMT関連遺伝子の発現状態

の主たる制御遺伝子である Twist1 の機能に注目し、MSC の分化、維持における機能の解明と、これを用いた高効率な MSC 作成法の開発を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MSC の発生分化に重要な因子を特定し、その機能を利用して培養 MSC にお

ける幹細胞性の改善ならびに誘導効率の改善を行うことである。具体的には、EMT の制御遺伝子である Twist1 に着目し、MSC における Twist1 の重要性とその機能を明らかにするとともに、Twist1 を用いた MSC の分化誘導効率の改善、Twist1 を用いた MSC の作成に取り組む。

3. 研究の方法

マウス MSC は Matsuzaki らの開発した方法 (Houlihan et al., 2012) に準じて実施した。ヒト MSC は Lonza 社、Life technologies 社より購入したものを使用した。MSC の培養は 10%FCS-DMEM を用いて行い、継代 3 回以内のものを使用した。ヒト、マウス MSC において、siRNA あるいは GapmeR LNA を用いて Twist1 の発現を抑制し、SYBR-Green 法による定量遺伝子発現解析、タイムラプス解析を行い、MSC の幹細胞性、細胞増殖における機能を観察した。また、PiggyBac トランスポゾンベクターにより MSC に Twist1 を導入し、細胞形質に生じる変化を観察した。Twist1 の機能を詳細に解明するため、Myc タグ付与 TWIST1 を発現させたヒト細胞株を作成し、免疫沈降ののち、質量分析装置をもちいて相互作用するタンパク質を網羅的に抽出した。

次に、マウス ES 細胞に Twist1 を導入し、MSC の分化誘導効率が変わるかどうかを観察した。PiggyBac トランスポゾンベクターに Twist1 を挿入後、エレクトロポレーションにより ES 細胞に導入した。導入 ES 細胞はマトリゲル上に播種し、10%FCS-DMEM で 72 時間分化誘導を行った。最後に、Oct4、Sox2 などのリプログラム因子とともにヒト体細胞に導入し、MSC へのダイレクトリプログラミングが可能かどうかを検討した。通常、iPS 細胞の作成にはヒト繊維芽細胞が用いられることが多いが、MSCs は、外見上普通の繊維芽細胞と見分けにくい。そこで単球を材料とした。ヒト単球への遺伝子導入は非常に低効率となるため、改良型センダイウイルスベクター (SeVdp) を用いた遺伝子導入を行った。

4. 研究成果

実験 : マウス、ヒト MSC において Twist1 をノックダウンすると、Bmi1、Sox2、Gata6 の発現が抑制された (図 2)。GapmeR-LNA による Twist1 の発現抑制を行い、タイムラプス観察を行ったところ、Twist1 抑制細胞では細胞増殖、細胞遊走が強く抑制されていることが明らかとなった。一方、Twist1 の強制発現により、Sox2、Gata6、Bmi1 の有意な発現

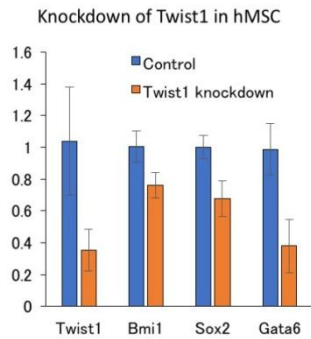


図2. ヒトMSCにおけるTwist1の抑制と幹細胞維持に関わる遺伝子発現の変化

上昇が観察された(図3)。Sox2、Bmi1、Gata6

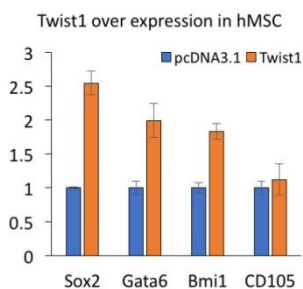


図3. ヒトMSCにおけるTwist1の強制発現と幹細胞維持に関わる遺伝子発現の変化

はいずれも成体組織幹細胞の幹細胞維持に重要であると報告されている。このことから、Twist1はMSCの幹細胞性維持に正の制御因子として機能していることが明らかとなった。

実験: Twist1はbHLHドメインを有するDNA結合転写因子である。上記標的遺伝子については、直接転写制御因子として関わっている可能性が高いが、それ以外にも他のタンパク質との相互作用を介して重要な細胞機能に関わっている可能性がある。例えば腫瘍細胞株においては、p53と相互作用し、その安定性に作用することが報告されている。我々は、Twist1を導入した上皮系細胞がMSC様細胞に転換するという先行研究の結果に着目した。細胞運命を大きく変えることから、エピジェネティック修飾に関与しているという仮説を立て、相互作用するタンパク質を探索するため、質量分析による網羅解析を実施した。その結果、TETs、TEX10などエピジェネティック修飾に直接関わる因子が抽出された。

TETタンパク質は、DNAのヒドロキシメチル化に関与するタンパク質である。近年、ヒドロキシメチル化が細胞の分化、発生以外にも、様々な疾患に関わっていることが報告されている。そこで申請者らは、軟骨細胞の変性におけるTwist1の関わりとTETを介したヒドロキ

シメチル化状態の変化に関する研究を実施した。その結果、Twist1の導入により、TET1の発現が上昇し、MMP3の発現が誘導されるといふ新規メカニズムを明らかにした(図4, Hasei and Teramura et al. 2017)。

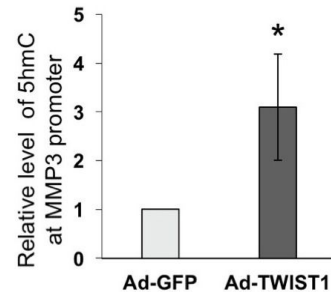


図4. Adenovirusベクターを用いたヒト軟骨細胞へのTwist1の導入とMMP3の発現変化

実験: 先の検討において、マウスES細胞(naïve型幹細胞)は、EpiS細胞(Primed型幹細胞)に比べMSCに分化しにくいことを示唆する結果を得ていた。Twist1の発現量がMSCへの分化能の違いの一因となっていることを確認するため、PiggyBacトランスポゾンにTwist1 cDNAを組み込み、Twist1強制発現ES細胞を作成した。未分化時の形態変化は見られなかったが、分化誘導後、未処理ES細胞からはMSC様の細胞が得られなかったのに対し、Twist1導入ES細胞からは多くのMSC様細胞が得られた。このことから、Twist1は未分化時にはその機能を発さないが、初期分化の際に強力にMSCへ誘導する作用を有することが明らかになった。

実験: Twist1がMSCへの誘導を促進するという結果を受けて、遺伝子導入によるリプログラミング時にTwist1を加えることで、直接MSC様細胞が得られるかどうかを検討した。細胞リプログラミングについてはiPS細胞の作成法に準じた。

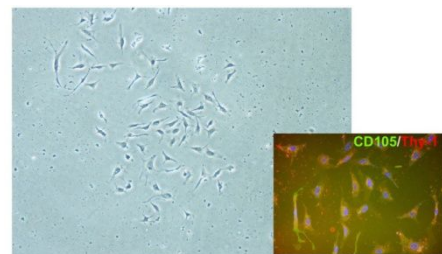


図5. Twist1を用いたヒト単球からのMSCの直接誘導

本研究では、MSCへの転換を判別しやすくするため、ヒト血球を材料とした。ヒト血球への遺伝子導入ならびにリプログラミングの誘導は非常に低率であることが知られている。そこで、産業技術総合研究所の中西らが

開発したセンダイウイルスベクターSeVdp を使用した (Nakanishi et al., 2012)。SeVdp 感染から 5 日目にトランスポゾンベクターを用いて Twist1 を導入し、リプログラミングを継続したところ、約 2 週間で紡錘状の形態を示し、コロニーを形成する細胞が得られた。免疫染色にて確認したところ、同細胞は CD105、Thy1 を発現しており、MSC 様の細胞へと転換していることが確認された。

本研究では、高性能な MSC を得るための培養系の開発、および MSC の新しい作成法の開発を目的に、MSC の能力に深く関わる転写因子の探索と機能の解明を目指した研究を行った。EMT の制御因子である Twist1 に着目し、Twist1 が MSC において幹細胞維持に関わる遺伝子の発現を正に制御していること、増殖や遊走に関わること、MSC を強制発現させることで、ES 細胞から MSC への分化を効率化させられることを発見した。さらに、これらの知見を応用し、ヒト血球からほぼ直接的に MSC 様細胞を得ることに成功した。これは、当初より計画目標に掲げていたことであり、本研究により達成されたと考えている。また、本研究で実施した質量分析により、Twist1 がエピジェネティック修飾制と関わっている可能性が明らかになった。相互作用する可能性が高い因子を同定したが、詳細な機能、相互作用による機能的変化や必要性など、未知な点が多い。この点については、幹細胞における Twist1 の機能を理解する上で解決すべき課題である。また、Twist1 が MSC の誘導に極めて重要な因子であることが明らかになったが、Twist1 を恒常的に発現することによる分化への影響や、腫瘍形成性の変化など、応用する上で慎重に検討すべき課題も多い。これについても今後、詳細に解析していく予定である。

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 6 件)

1. Obora K, Onodera Y, Takehara T, Frampton J, Hasei J, Ozaki T, Teramura T (corresponding author), Fukuda K. Inflammation-induced miRNA-155 inhibits self-renewal of neural stem cells via suppression of CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) expression. Sci Rep. 2017 Feb 27;7:43604. doi: 10.1038/srep43604. 査読：有

- 2: Hasei J, Teramura T (Co-1st author), Takehara T, Onodera Y, Horii T, Olmer M, Hatada I, Fukuda K, Ozaki T, Lotz MK, Asahara H. TWIST1 induces MMP3 expression through up-regulating DNA hydroxymethylation and promotes catabolic responses in human chondrocytes. Sci Rep. 2017 Feb 21;7:42990. doi: 10.1038/srep42990. 査読：有
- 3: Kitada K, Kizu A, Teramura T, Takehara T, Hayashi M, Tachibana D, Wanibuchi H, Fukushima S, Koyama M, Yoshida K, Morita T. Gene-modified embryonic stem cell test to characterize chemical risks. Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Nov;22(22):18252-9. doi: 10.1007/s11356-015-5051-0. 査読：有
- 4: Takehara T, Teramura T (corresponding author), Onodera Y, Frampton J, Fukuda K. Cdh2 stabilizes FGFR1 and contributes to primed-state pluripotency in mouse epiblast stem cells. Sci Rep. 2015 Sep 30;5:14722. doi: 10.1038/srep14722. 査読：有
- 5: Onodera Y, Teramura T (corresponding author), Takehara T, Shigi K, Fukuda K. Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells. FEBS Open Bio. 2015 Jun 6;5:492-501. doi: 10.1016/j.fob.2015.06.001. 査読：有
- 6: Onodera Y, Teramura T (corresponding author), Takehara T, Fukuda K. Hyaluronic acid regulates a key redox control factor Nrf2 via phosphorylation of Akt in bovine articular chondrocytes. FEBS Open Bio. 2015 May 29;5:476-84. doi: 10.1016/j.fob.2015.05.007. 査読：有

[学会発表](計 1 件)

1. 寺村岳土、浅原弘嗣、福田寛二「多能性幹細胞からの間葉系幹細胞の分化誘導と軟骨再生」日本整形外科学会学術集会(シンポジウム) 16 年 10 月 13 日 .福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

[産業財産権]

取得状況(計 2 件)

名称：免疫不全動物を用いた細胞の製法
発明者：寺村岳土、福田寛二
権利者：学校法人近畿大学

種類：特許
番号：588852
取得年月日：平成 22 年 12 月 8 日
国内外の別：平成 28 年 2 月 26 日

名称：間葉系細胞または軟骨細胞の製法ならび
に発癌性の抑制法
発明者：寺村岳士、福田寛二
権利者：学校法人近畿大学
種類：特許
番号：5636174
出願年月日：平成 21 年 7 月 10 日
国内外の別：平成 26 年 10 月 24 日

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

寺村 岳士 (TERAMURA, Takeshi)
近畿大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40460901

(4)研究協力者

浅原 弘嗣 (ASAHARA, Hiroshi)
東京医科歯科大学・医学部・教授
Martin Lotz
スクリプス研究所・分子実験医学部門・教授