

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20189

研究課題名(和文) 間葉上皮転換(MET)モデル作製とモデルを用いた生体内MET分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Development and Molecular regulatory mechanism of mesenchymal epithelial transition (MET) model

研究代表者

高尾 知佳 (TAKAO, Tomoka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任助教

研究者番号：40612429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、間葉上皮転換(MET)は組織・器官形成など多くの重要な生命現象に関与しているが、その詳細な機構はあまり明らかにされていない。これまで間葉系幹細胞がある条件培養またはマウス移植モデルで上皮様マーカーが発現することがわかってきた。本研究はMET現象をin vitro/in vivoで再現し、リアルタイムで観察できるモデル構築を目的とした。上皮様細胞をin vivoで再現することはできなかった。しかしながら、薬剤添加研究の結果、Raf-MEKまたはWnt/カテニンシグナルがMETに関与する可能性が示された。この結果はMETシグナル制御の足掛かりになることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MET現象、特に成体内における自発的なMETについてはその全貌がほとんど明らかではない。この点に深く切り込んでいくという点で本研究は極めて独創的であると言えた。本研究の成果により既存薬を用いた薬剤研究によりMET制御機構と子宮内膜症をはじめとする各種生体内MET機構を人為的に制御できる薬剤が見つければ、新たなコンセプトの治療薬開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, mesenchymal-epithelial transition (MET) has been involved in many important life phenomena such as tissue and organ formation but not known in this detailed mechanism. Our previous results were shown that mesenchymal stem cells express epithelial-like markers in conditioned culture or in mouse transplantation models. In this study, we aimed to construct a model that reproduces the MET in vitro / in vivo and can be observed in real time. Epithelial-like cells could be reproduced in vivo, but did not reach modeling. However, we found that Raf-MEK or Wnt / -catenin signaling may be involved in MET by drug researches. It is suggested that these results a foothold of the MET signal.

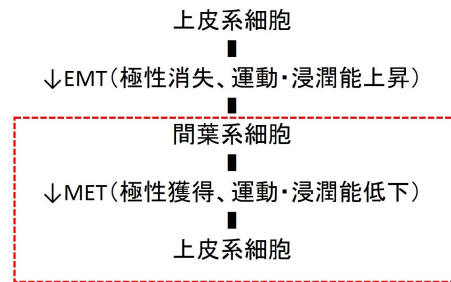
研究分野：分子生物学

キーワード：MET Wnt/ -catenin 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

これまで多くの動物において極性を持ち細胞間同士が密に結合している上皮系細胞と極性を持たず比較的弱い細胞間結合しか持たない間葉系細胞とは相互に関与しあいながら組織・器官を形成し機能していることは明らかである。上皮及び間葉系細胞は細胞の運命決定が必ずしもなされているわけではなく、生体内においては可逆的に変化しうるということが既に分かっている。特に胚発生において上皮系細胞が上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) により極性・結合を失う代わりに運動・浸潤能を獲得して移動を行い、その後間葉上皮転換 (Mesenchymal-epithelial transition; MET) により再び極性を獲得し密に機関の三次元構造の構築に寄与するといった過程を繰り返し器官形成が行われていることは良く知られている。この相互変換の繰り返しは創傷治癒やがん転移においても観察しうるプロセスである。特に EMT においては発生学や癌研究では重要な現象として多くの研究がなされており、その分子メカニズムに関しても TGF シグナルの関与など多くの知見が蓄積されている。この事から癌において EMT 現象を制御することで治療に応用する試みも多くなされてきている。その一方で、MET 現象に関する研究は EMT よりも遅れており、あくまでも EMT に付随して起こる現象として捉えられがちであった。近年、iPS 細胞のリプログラミング過程に MET 現象が関与しておりそのシグナル伝達系が明らかとなってきた (Samavarch-Tehrani et al. 2010)。その他にもいくつかのモデル系が提示され分子機構についても解明が進みつつあるが、遺伝子操作によらず生体内での現象を再現できるモデルは MET に比べ *in vitro/in vivo* 共に乏しく MET 研究の障壁となっていると考えられる。

EMT/MET機構



現在、ヒト骨髄由来の間葉系幹細胞を用いたヒト病態を *in vitro/in vivo* で再現した子宮内膜症モデル系の構築に成功し(投稿準備中)、免疫不全マウスへ移植することで実際の臨床に近い周辺臓器との癒着や腺管構造を有するヒト細胞由来組織を自然発生させることができた。この細胞は移植前には上皮系マーカーを発現していなかったが、移植後には上皮系細胞からなる組織を形成し、*in vitro* での長期培養においても間葉上皮両マーカーを発現する細胞も観察できた。この子宮内膜症モデル細胞、さらにはその他の生殖系細胞を駆使し、*in vivo* 組織再構成モデル及び *in vitro* 三次元培養系モデルを用いて MET 現象をリアルタイムに観察できるモデルを構築することで MET 現象の分子メカニズムに迫ることができるのではないかと考え着想に至った。

2. 研究の目的

間葉上皮転換 (MET) 現象は組織・器官形成など多くの重要な生命現象に関与しているがその詳細な機構はほとんど明らかにされておらず、分子機構を探るためのモデルも乏しい現象であることから、本研究ではこれまで行ってきた種々の細胞組織において自然に近い形で MET 現象を観察できたことを足掛かりに、MET 現象を *in vitro/in vivo* で再現し、リアルタイムで観察できるモデルを作製することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来不死化間葉系幹細胞 UE6E7T-11 より誘導した子宮内膜症モデル細胞を免疫不全マウスの卵巣上に移植を行い、*in vivo* 子宮内膜症組織構築実験を行い前職で行っていた実験を再現できるかを行った。確認方法として、癒着形成、子宮内膜症様組織(腺管を含む)を構築できるかを HE 染色及び蛍光免疫染色 (Cytokeratin; CK、Vimentin, ER, PGR) で確認する。

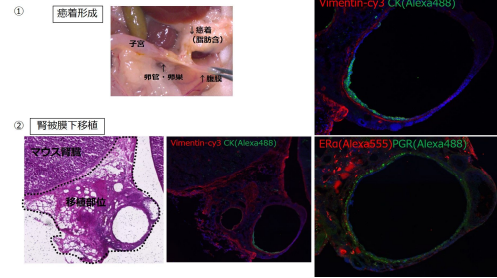
(2) 上記の実験を踏まえて UE6E7T-11 及び不死化子宮内膜間質細胞株 THESC 細胞、子宮内膜腺上皮細胞株 Hemo-1、上皮由来子宮体癌細胞株 Ishikawa 細胞に上皮細胞特異的なプロモーターを導入した発光蛋白質と蛍光蛋白質を同時に発現するレンチウイルスベクターを感染させて、*In vivo* imaging 機器である IVIS で Luciferase 活性を観察した。子宮内膜症モデル細胞 (UE6E7T-11 細胞由来、THESC 細胞由来) を用いて、MET 関連マーカーの発現解析をリアルタイム RT-PCR 法により、プロモーター活性解析を IVIS を用いて行った。

(3) 既存薬を用いた MET 誘導を調べる為、CK18 プロモーターを導入した UE6E7T-11 細胞を用いて子宮内膜症モデル細胞を誘導し、それらの細胞に幹細胞や癌細胞に関与することが既に報告されている血管新生阻害剤、Wnt/ カテニンシグナル阻害剤、EMT 阻害剤などの既存薬を添加し、IVIS による CK18 プロモーター活性および、MET マーカー (サイトケラチン; CK, E-Cadherin, N-cadherin) の蛋白質発現をウエスタンブロット法により解析を行った。

4. 研究成果

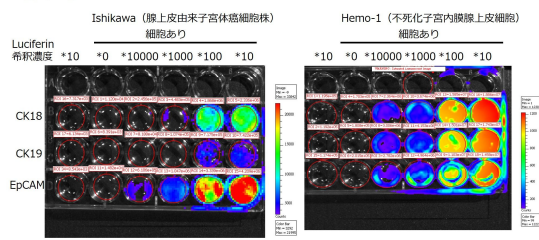
(1) まず以前より成果が得られていた骨髄由来不死化間葉系幹細胞株 UE6E7T-11 細胞を用いた子宮内膜症モデルの再現を行った。これまでと同様に癒着モデルを形成することができた(図1)が、以前得られていた子宮内膜症組織の特徴である腺管構造や腺上皮特異的な細胞の再現が難しく、結果が得られなかった。そのため腎被膜下にこれらの細胞を移植して子宮内膜症構造が得られないか検討を行った結果、腎被膜下にてサイトケラチン(CK)、ER、PGR またはビメンチン(ヒト特異的)陽性の腺管構造を含む子宮内膜症類似の組織像が得られた(図1)。このことから子宮内膜症モデル細胞によるMETの誘導の可能性について証明された。しかしながら、効率よく子宮内膜症組織を構築することが困難であったことから、まず *in vitro* で誘導することが必要と考え、次の実験を進めることにした。

【図1】 MSC誘導子宮内膜症モデルの再現



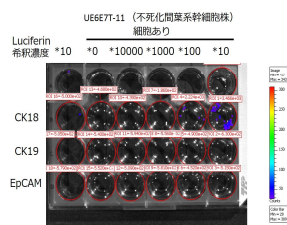
(2) 上皮細胞特異的なプロモーター(CK18, CK19, EpCAM プロモーター)を導入した発光蛋白質と蛍光蛋白質を同時に発現するレンチウイルスベクターを作成し、このベクターが稼働しているかについて子宮上皮細胞株 Hemo-1 または上皮由来子宮体癌細胞株 Ishikawa 細胞に感染させてプロモーター活性を IVIS で確認した。Hemo-1 と Ishikawa 細胞両者で共にすべてのプロモーター活性

【図2】 上皮特異的なプロモーター導入細胞(上皮細胞感染)



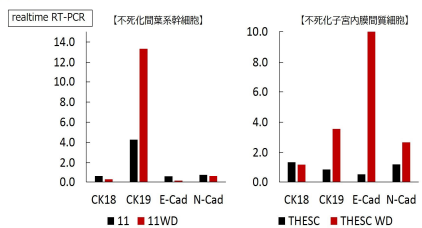
上皮由来細胞ではプロモーター活性が認められた

【図3】 上皮特異的なプロモーター導入細胞(間葉系幹細胞感染)



間葉系幹細胞ではプロモーター活性は認められなかった

【図4】 子宮内膜症誘導モデルプロトコルにおける上皮マーカーの変動

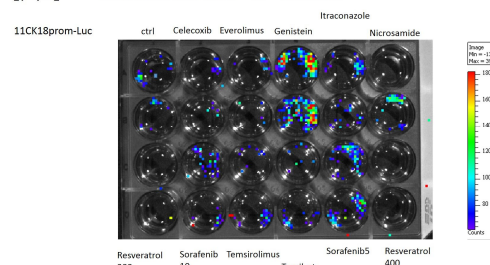


内膜症誘導プロトコルで一部上皮マーカーが上昇した

細胞と各々子宮内膜症モデル細胞へ誘導を行い IVIS でプロモーター活性を確認した。しかしながらルシフェラーゼ活性は認められなかった(data not shown)。以上の結果から、*in vitro* 子宮内膜症モデル細胞誘導方法により mRNA レベルでの上皮マーカーの発現誘導は認められたが、プロモーター活性を認めることが出来なかったことから、*in vitro* での子宮内膜症モデル細胞誘導方法単独だけでは MET を強く起こす事は難しいことが示唆された。

(3) 上記の結果から子宮内膜症モデル細胞への誘導による上皮細胞マーカーの一部上昇は認められたことから、誘導方法に対し他の因子を加える必要性が考えられた。我々が進めている他研究における薬剤実験で、既存薬として血管新生阻害剤や Wnt/ カテニンシグナル阻害剤、EMT 阻害剤を使用していたことから、これらの薬剤を CK18 プロモーター導入 UE6E7T-11 細胞から誘導した子宮内膜症モデル細胞に添加し CK18 プロモーター活性を IVIS で検討した。今回 CK18 プロモーターを選択したのは CK18 や CK19 は正常子宮内膜上皮や子宮内膜症上皮で発現

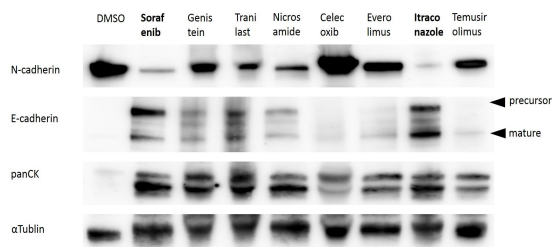
【図5】 薬剤を用いた上皮マーカー誘導実験



発現

することはすでに報告されているが(Dharmaraj N et al., 2014, Konrad L et al., 2019)、CK18は今回の内膜症誘導方法では図4の結果から誘導が認められなかった。しかしながらCK19は発現が認められたがルシフェラーゼ活性が認められなかったことから、挙動変化の不一致があったことから、今回挙動の一致が認められているCK18プロモーター導入細胞を使用することにした。一部の薬剤で誘導細胞におけるCK18プロモーター活性を認めた(図5)。同様の方法を用いて上皮マーカー(CK、E-Cadherin)と間質マーカー(N-Cadherin)の蛋白質発現をウエスタンブロット法により確認した。結果としてCKは多くの薬剤添加群で発現が上昇していたが、E-cadherinの発現上昇及びN-Cadherinの抑制はソラフェニブ(マルチキナーゼ阻害剤、Raf-1阻害)やイトラコナゾール(cytochromeP450,CYP3A4阻害)で認められた(図6)。またN-Cadherinの発現抑制はあまり強くないものの、E-Cadherinの発現上昇が認められたのは

【図6】 薬剤を用いた上皮マーカー誘導実験
11WDCK18prom-Luc



ゲニスチン(チロシンキナーゼ阻害剤)、ニコロサミド(STAT3阻害剤)及びトラニラスト(抗アレルギー剤)だった。よりMET誘導に効果的な結果が得られたのはソラフェニブとイトラコナゾールであり、イトラコナゾールはCYP3A4阻害剤であるが、Ueda et al.らの報告によると、イトラコナゾールはWnt/カテニンシグナルにも関与していることからCYP以外のシグナル阻害に関わっているとも考えられる。これらの結果から、METシグナル促進にはRaf-MEK-ERKシグナルやWnt/カテニンシグナルが関与している可能性が示唆された。さらに上皮マーカーの増加が認められたSTAT3阻害剤やチロシンキナーゼ阻害剤の関与も阻害剤の組合せとして重要である可能性もある。しかしながらソラフェニブにより阻害されるRaf-1の下流にはMEK-ERKシグナルを介した多彩なシグナルが存在することから、今後ERK阻害剤(SCH772984、XMD8-92、FR180204)、S6K阻害剤(BI-D1870、PF-4708671、AT7867)、IKK阻害剤(IKK-16、TPCA-1)、GSK-3阻害剤(CHIR-99021、SB216763、CHIR-98014)、AKT阻害剤(MK-2206、GSK690693)等を用いてMETシグナルの詳細を明らかにしていく必要があり現在解析中である。これらの結果はMETシグナル解明の一助になり得る結果であり、今後の研究進捗が期待される。

ゲニスチン(チロシンキナーゼ阻害剤)、ニコロサミド(STAT3阻害剤)及びトラニラスト(抗アレルギー剤)だった。よりMET誘導に効果的な結果が得られたのはソラフェニブとイトラコナゾールであり、イトラコナゾールはCYP3A4阻害剤であるが、Ueda et al.らの報告によると、イトラコナゾールはWnt/カテニンシグナルにも関与していることからCYP以外のシグナル阻害に関わっているとも考えられる。これらの結果から、METシグナル促進にはRaf-MEK-ERKシグナルやWnt/カテニンシグナルが関与している可能性が示唆された。さらに上皮マーカーの増加が認められたSTAT3阻害剤やチロシンキナーゼ阻害剤の関与も阻害剤の組合せとして重要である可能性もある。しかしながらソラフェニブにより阻害されるRaf-1の下流にはMEK-ERKシグナルを介した多彩なシグナルが存在することから、今後ERK阻害剤(SCH772984、XMD8-92、FR180204)、S6K阻害剤(BI-D1870、PF-4708671、AT7867)、IKK阻害剤(IKK-16、TPCA-1)、GSK-3阻害剤(CHIR-99021、SB216763、CHIR-98014)、AKT阻害剤(MK-2206、GSK690693)等を用いてMETシグナルの詳細を明らかにしていく必要があり現在解析中である。これらの結果はMETシグナル解明の一助になり得る結果であり、今後の研究進捗が期待される。

参考文献

- Samavarch-Tehrani et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. Cell Stem Cell. 2010 Jul 2;7(1):64-77.
- Konrad L et al. Similar Characteristics of Endometrial and Endometriotic Epithelial Cells. Reprod Sci. 2019 Jan;26(1):49-59.
- Dharmaraj N et al. Expression of the transmembrane mucins, MUC1, MUC4 and MUC16, in normal endometrium and in endometriosis. Hum Reprod. 2014 Aug;29(8):1730-8.
- Ueda et al. Anticancer Res. Modulates Hedgehog, WNT/ -catenin, as well as Akt Signalling, and Inhibits Proliferation of Cervical Cancer Cells.2017 Jul;37(7):3521-3526.

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Miki F, Maruyama T, Miyazaki K, Takao T, Yoshimasa Y, Katakura S, Hihara H, Uchida S, Masuda H, Uchida H, Nagai T, Shibata S, Tanaka M: The orientation of a decellularized uterine scaffold determines the tissue topology and architecture of the regenerated uterus in rats. Biol Reprod. 2019; 100(5): 1215-1227. 査読有
doi: 10.1093/biolre/ioz004.

〔学会発表〕(計8件)

(1)Tetsuo Maruyama, Satomi Katakura, Tomoka Takao, Toru Arase, Yushi Yoshimasa, Shoko Tomisato, Sayaka Uchida, Hirotaka Masuda, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: P2RY is involved in the migration and invasion of human extravillous trophoblast. Society for Reproductive Investigation 66th Annual Scientific Meeting (SRI2019). 2019年.

(2)升田博隆, 古谷正敬, 丸山哲夫, 高尾知佳, 内田 浩, 内田明花, 吉政佑之・片倉慧美, 吉村泰典, 片淵秀隆, 田中 守: 子宮内膜幹細胞と上皮間葉転換をターゲットとした非内分泌

的な子宮内膜症の新規治療．第 23 回日本生殖内分泌学会．2018 年．

(3)高尾知佳, 丸山哲夫, 内田 浩, 内田明花, 三木史恵, 片倉慧美, 吉政佑之, 富里祥子, 升田博隆, 田中 守: ヒト正常子宮平滑筋細胞に対する子宮筋腫関連遺伝子 MED12 の変異導入による機能的病因解析．第 23 回日本生殖内分泌学会．2018 年．

(4)高尾知佳, 升田博隆, 三木史恵, 片倉慧美, 吉政佑之, 富里祥子, 内田明花, 内田 浩, 田中 守, 丸山哲夫: 子宮体癌細胞の幹様細胞とそれを治療標的とする既存薬の探索．第 41 回日本分子生物学会．2018 年．

(5)Tetsuo Maruyama, Tomoka Takao, Hirotaka Masuda, Fumie Miki, Sayaka Uchida, Hiroshi Uchida, Mamoru Tanaka: Attempts to establish screening system for identification of drugs targeting human uterine endometrial cancer stem-like cells. International Society for Stem Cell Research 2018 annual meeting (ISSCR2018). 2018 年．

(6)高尾知佳, 丸山哲夫, 小野政徳, 内田 浩, 升田博隆, 内田明花, 三木史恵, 片倉慧美, 吉政佑之, 藤原 浩, 田中 守, 青木大輔: CRISPR/CAS9 システムにより MED12 変異を導入したヒト子宮筋腫モデルの開発の試み．第 70 回日本産科婦人科学会．2018 年．

(7)[International Session Workshop] Hirotaka Masuda, Masataka Furuya, Tetsuo Maruyama, Fumie Miki, Satomi Katakura, Yushi Yoshimasa, Sayaka Uchida, Hiroshi Uchida, Tomoka Takao, Hidetaka Katabuchi, Mamoru Tanaka, Daisuke Aoki: Anovel approach to treat endometriosis via targeting epithelial-mesenchymal transition. 第 70 回日本産科婦人科学会．2018 年．

(8)片倉慧美, 丸山哲夫, 高尾知佳, 瀬田康弘, 吉政佑之, 富里祥子, 三木史恵, 内田明花, 升田博隆, 内田 浩, 田中 守, 青木大輔: Extravillous trophoblast の新しいマーカーとしての G 蛋白共役型受容体 P2RY14 とその細胞浸潤における役割．第 70 回日本産科婦人科学会．2018 年．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。