

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21508

研究課題名(和文) TAK1抑制によるiPS細胞作成効率の改善と新規未分化維持培養系の開発

研究課題名(英文) Essential role of TAK1 in the maintenance of Stemness of the Mesenchymal stem cells.

研究代表者

小野寺 勇太 (ONODERA, Yuta)

近畿大学・医学部附属病院・助手

研究者番号：30510911

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄組織由来の間葉系幹細胞(BMMSC)は、創傷治癒や組織再生を目的とした移植治療の重要な細胞ソースとして注目されている。しかし、BMMSCの未分化能を制御する分子機構には未知な点が多い。TAK1に着目しその機能と介入対象としての可能性を検討した。TAK1阻害剤(5zox)濃度依存的にBMMSCの増殖能は低下した。また、Fucci-BMMSCの解析およびトランスクリプトーム解析により、TAK1の抑制はBMMSCに静止期を誘導することが明らかとなった。TAK1阻害剤が静止期同調をもたらすことを利用し、BMMSCの骨髄腔内移植を実施し、定着率の向上に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TAK1の活性阻害あるいは発現抑制は単独でMSCの増殖をほぼ完全に抑制するという観察結果を得た。ES細胞でTAK1をノックアウトし、in vivo、in vitroでMSCを誘導すると、MSCは形成されるが増殖力が著しく低下した。さらに興味深いことに、MSCで見られるTAK1依存性細胞増殖は、既知の分子経路とは独立して生じていた。このことから、TAK1はMSCの増殖に必須の分子であり、未知の分子経路によって増殖制御を行っていること、さらに、その制御はMSCを用いた新たな再生医療技術の提案につながると考えた。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMMSCs) are multipotent stem cells

capable of differentiation into a variety of cell types, proliferation, and production of clinically useful secretory factors. However, the molecular network underlying BMMSC proliferation remains poorly understood. Here, we showed that Tgf $\beta$ -activated kinase (Tak1) is a critical molecule that regulates the activation of cell cycling and that Tak1 inhibition leads to quiescence in BMMSCs. Mechanistically, Tak1 was phosphorylated by growth factor stimulations, binding with Yap1/Taz, and supported their nuclear localization through stabilization of Yap1/Taz in proliferating BMMSCs. Furthermore, we also demonstrated that the cell-cycle synchronization in quiescence by Tak1 inhibition significantly improved engraftment after intra-bone marrow cell transplantation of BMMSCs. This study may suggest a novel central pathway controlling the BMMSC proliferation and useful pre-treatment for cell transplantation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 TAK1 細胞増殖 Hippo pathway 髄腔内移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

人工多能性幹細胞(iPS細胞)、胚性幹細胞(ES細胞)の幅広い応用を目指す上では、低率な樹立効率と長期培養下での不安定さが課題となる。本研究では、多能性幹細胞の未分化性を不安定化させる要素として細胞内ストレス応答のエフェクター分子である TGF $\beta$ -activated kinase1(TAK1)に注目した。

TAK1は様々な細胞内シグナル伝達経路の中でも最も上流に位置するMAPKKKの1つであり、種を越えて幅広く保存されていることから、生物の発生、恒常性維持に極めて重要な機能を有していると考えられる。事実、TAK1のノックアウト(KO)マウスは胎生12.5日齢で致死となる(Sato S. et al. 2005.)。また細胞株を使った検討では、Stat3(Tyr705)の異所(Ser727)リン酸化を促進する(Ohkawara B. et al. 2004)こと、Wnt/ $\beta$ -カテニン経路にあるTCF/LEFの抑制(Ishitani T. et al. 1999)、Smadの核移行を制御するなど重要な知見が多く報告されている。さらに、TAK1はキナーゼでありながら核内でも機能するなど興味深い性質も明らかになってきている。

当初の計画を進める中で、TAK1の機能が多能性幹細胞における特異的な分子経路の制御より、幹細胞性の基本的機能に関わっている可能性を見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では、当初の目的である「TAK1と多能性の関わり」の解明と、「幹細胞の基本的機能である増殖、自己複製におけるTAK1の役割を解明すること」を目的とした。

特に後者については、分化多能性を有する組織幹細胞であるにもかかわらず継代毎に細胞増殖及び分化多能性能の低下が認められる骨髄由来の間葉系幹細胞(BMSCs)を研究材料とすることで、新しい再生医療技術の開発につなげることを目標とする。

## 3. 研究の方法

マウスES細胞の培養下において、TGF $\beta$ およびTAK1のリン酸化阻害剤5Z-7-oxozeanol(5zox)存在下で維持培養を行い、未分化・分化に関するマーカーをqPCRおよびウェスタンブロットによって評価した。また、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によってTAK1のノックアウトマウスES(TAK1KO-mES)細胞を作製し、BALB/c NUDEマウスへの移植にてテラトーマを作製し評価した。

BMSCsにおけるTAK1の機能評価に関しては、培養系への5zoxの添加を実施し、細胞周期を2色の蛍光で見分けられるトランスジェニックマウス(fucciマウス)より樹立したBMSCsによって細胞周期の変化を観察した。また、さらに5zox処理を行った細胞のトランスクリプトーム解析、TAK1<sup>flox/flox</sup>:PDGFRa<sup>cre</sup>(間葉系幹細胞でTAK1の発現が消失する)ノックアウトマウスを用いて間葉系組織の発生におけるTAK1の重要性を確認した。

## 4. 研究成果

ES細胞の分化誘導でも幅広く用いられるTGF $\beta$ の添加によりTAK1を活性化し、未分化維持に関わる遺伝子発現の変化を検討した。TGF

の濃度依存的にTAK1がリン酸化され、未分化マーカー(Pou5f1、Sox2、Klf4、Nanog)の遺伝子発現が抑制された。一方で、TやTbx-6といった中胚葉系譜の分化マーカーが発現上昇し、未分化性は低下した。さらに、5zoxの存在下で培養すると、TAK1のリン酸化が抑制され、Nanogの発現が上昇した(図1)。これより、TGF $\beta$ によるTAK1

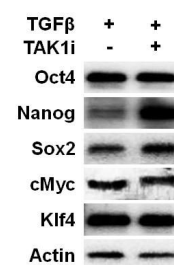


図1 ウェスタンブロット

の活性化は mES 細胞を分化させること、TAK1 の活性化を抑制することで未分化性を維持出来ることが示された。また、TAK1KO-mES 細胞を作出し、BALB/c NUDE マウスの移植にてテラトーマの形成を確認したところ、TAK1KO-mES 細胞由来のテラトーマは Wild type の ES 細胞に比べ非常に小さなテラトーマが形成された(図 2)。また、TAK1KO-mES 細胞のテラトーマ作出に限って移植のエンドポイントを延長したが結果は変わらなかった。TAK1 は mES 細胞の未分化維持、分化過程での増殖に不可欠な存在であると考えられる。

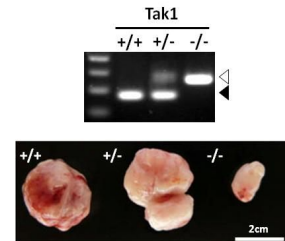


図 2 TAK1KO-mES 細胞由来のテラトーマ

TGF の添加による中胚葉系譜の分化マーカーの上昇やテラトーマの形成が著しく抑制されたことから、TAK1 の活性化は中胚葉系譜の細胞に影響を与える因子ではないかと考えた。また、これまで中胚葉系譜の幹細胞である骨髄由来の間葉系幹細胞(BMSCs)に関して研究を行ってきたことから、BMSCs における TAK1 の役割を検討した。

無血清培地に TGF を添加して BMSCs を培養すると、濃度依存的な細胞増殖を示した。また、濃度依存的な 5zox の添加に伴い TAK1 の活性化および細胞増殖は抑制された。さらに、fucci マウスより樹立した BMSCs に 5zox 処理をし、FACS により細胞周期の検討を行ったところ、5zox 処理を行うことで G0/G1 期の細胞集団が増加した。

次に、腹腔内に 5zox を投与したマウスの BMSCs の数を FACS により解析したところ、コントロール区に比べて、半量程度しか認められなかった(図 3)。in vitro と同様に in vivo でも BMSCs の増殖は抑制されていることが確認できた。

また、TAK1 の発現が消失するように作出したコンディショナルノックアウトマウスにおいては、13.5 日齢前後で胎生致死となることが確認され、発生学的にも重要な役割を担う因子であることが改めて確認された(図 3)。

最後に、マイクロアレイ解析を行ったところ、5zox 処理を施した細胞は細胞分裂期特異的な遺伝子の発現が抑制され、細胞周期の停止、抗ストレス遺伝子など、静止期に特異的な遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった(図 4)。

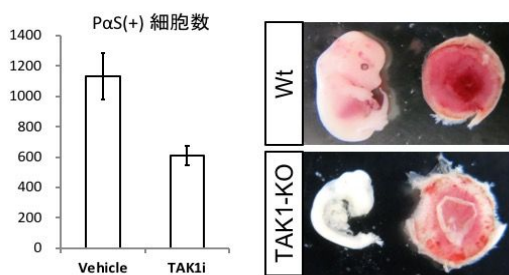


図 3 TAK1阻害によるMSCの減少と組織形成阻害  
(左) 生体マウスへのTAK1インヒビター投与と骨髄MSCの減少  
(右) TAK1コンディショナルノックアウトマウス (TAK1<sup>fllox/fllox</sup>;PDGFR $\alpha$ Cre) の表現系

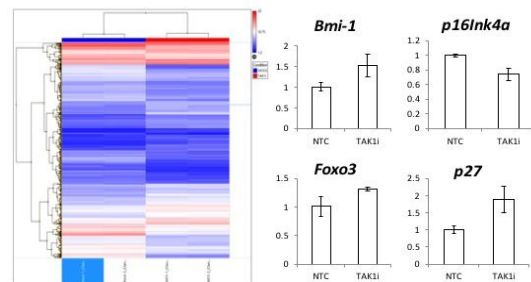


図 4 TAK1阻害MSCにおけるトランスクリプトーム解析  
(左) マイクロアレイ解析  
(右) qPCRによるバリデーション

今後は、5zox 処理を行った細胞の髄腔内移植などを実施し、生体内での生着や組織修復能などを検討し、静止期特異的な細胞に見られるストレス耐性を生かした新たな移植法への応用が期待出来ると考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Itokazu M, Mori T, Fukuda K.,

Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells., PLoS One. 2018 Oct 1;13(10):e0204860., 査読:有り

Teramura T, **Onodera Y.**, Stem cell depletion by inflammation-associated miR-155., Aging (Albany NY). 2018 Jan 23;10(1):17-18., 査読:有り

**Onodera Y.**, Teramura T, Takehara T, Obora K, Mori T, Fukuda K., miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells., Aging Cell. 2017 Dec;16(6):1369-1380., 査読:有り

Obora K, **Onodera Y.**, Takehara T, Frampton J, Hasei J, Ozaki T, Teramura T, 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., 査読:有り

〔学会発表〕(計 5件)

TGF $\beta$ -activated kinase(TAK1)は間葉系幹細胞の Stemness の維持に重要である。**小野寺勇太** 竹原俊幸 寺村岳士 福田寛二. 第18回日本再生医療学会総会. 2019年3月23日. 兵庫

TGF $\beta$ -activated kinase(TAK1)は骨髄間葉系幹細胞(BMMSC)の細胞増殖に必須である。**小野寺勇太** 寺村岳士 竹原俊幸 福田寛二. 第32回日本軟骨代謝学会. 2019年3月2日. 大阪.

TGF $\beta$ -activated kinase(TAK1)は間葉系幹細胞の増殖を制御する。**小野寺勇太** 竹原俊幸 中馬新一郎 寺村岳士 福田寛二. 第31回日本軟骨代謝学会. 2018年3月2日. 愛知.

TGF $\beta$ -activated kinase(TAK1)は間葉系幹細胞の増殖に必要である。**小野寺勇太** 寺村岳士 竹原俊幸 福田寛二. 第30回日本軟骨代謝学会. 2017年3月4日. 京都.

TGF $\beta$ -activated kinase(TAK1)は間葉系幹細胞の維持に重要である。**小野寺勇太** 寺村岳士 竹原俊幸 大洞佳代子 長谷井嬢 福田寛二. 第31回日本整形外科基礎学術集会. 2016年10月13日. 福岡.

〔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〕

ホームページ：<http://www.med.kindai.ac.jp/stemcell/> 近畿大学 高度先端総合医療センター 再生医療部

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：寺村 岳士

ローマ字氏名：(TERAMURA, Takeshi)

研究協力者氏名：竹原 俊幸

ローマ字氏名：( TAKEHARA , Toshiyuki )