

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22416

研究課題名（和文）細胞間RNA転送に基づくリプログラミング

研究課題名（英文）Inter-cellular RNA transfer-driven reprogramming

研究代表者

武部 貴則（Takebe, Takanori）

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：20612625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、近年我々が発見した「異なる細胞種間の直接接触を介したmRNAの伝搬機構」の解明を通じて、外来遺伝子の導入などの従来手法に依存せずに、細胞の運命を転換するための全く新しい細胞操作技術を構築することを目的としている。
ヒトiPS細胞とマウスES細胞を共培養する系を対象として、1)ヒトiPS細胞内にマウスES細胞由来のmRNAの一部が直接接触を介して転送されること、2)転送後にヒトiPS細胞のナイーブ様転換が起こること、さらに、3)マウスES細胞に由来する転写因子をコードする特定のmRNAの転送がヒトiPS細胞のナイーブ様転換に必須であること、を明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって見いだされた、細胞間mRNA転送というメカニズムは新規の生命現象であり、本現象が免疫系細胞との相互作用、ニッチ環境との相互作用などを始め、さまざまな正常の生命現象において重要な意義を担う可能性も想定される。実際、免疫系を中心に生体内でも類似の知見が徐々に報告されつつあることから、将来的にさまざまな疾患研究への可能性がある。将来的には、がんなどの疾患における細胞間相互作用を理解するための全く新たな原理基盤の提唱にもつながり、革新的な創薬研究への発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：Working with the experimental model of xenogenic cell co-culture, we recently found the striking phenomenon of bidirectional mRNA exchange between human and mouse cells. This led us to hypothesize that the transferred mRNAs influence the landscape both of transcriptome and epigenome in neighboring cell counterpart. To test this, we set up the co-culture system of human iPS cells and mouse ES cells as an experimental model and revealed the followings in this study. 1) Some portion of RNAs are transferred from mouse ES cells into human iPS cells primarily driven by direct cell-to-cell contact; 2) After the RNA transfer, human iPS cells can convert from primed to naive-like states; 3) Among mouse ES cell-derived RNAs, specific mRNAs coding transcription factors are responsible for human iPS cell conversion into naive-like states.

研究分野：発生生物学、幹細胞生物学、消化器内科学、再生医学

キーワード：細胞間相互作用 リプログラミング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト iPS 細胞は、分化状態の進んだプライム型と呼ばれ、キメラ形成能力が存在しないのに対して、マウス ES 細胞はより未分化なナイーブ型とされ、分子レベルでの分化度に関して明確な違いが定義されている。われわれは、マウス ES 細胞と、ヒト iPS 細胞という2つの異なる分化段階にある多能性幹細胞を特定条件下で培養を行うことにより、マウス mRNA がヒト iPS 細胞に受け渡されていること、さらにそれら mRNA 転送後のヒト iPS 細胞のナイーブ型転換が誘導されることを見出した。本研究では、われわれが世界で初めて発見した「異なる細胞種間の直接接触を介した mRNA の伝搬機構」の解明を通じて、細胞の運命を転換するための全く新たな細胞操作技術を構築する。すなわち、目的の特徴を有した細胞に、再プログラムしたい細胞を混ぜあわせることにより、外来遺伝子の導入などの従来手法に依存しない細胞運命の転換手法の開発を試みる。

2. 研究の目的

本研究では、異なる細胞種間の直接接触を介した mRNA の伝搬という全く新規の現象において、いかにして mRNA が伝搬されているのかの解明を試みるとともに、本機序を活用した、細胞の運命を転換するための全く新たなリプログラミング技術体系の構築を試みる。具体的には、ヒト iPS 細胞とマウス ES 細胞という異種の多能性幹細胞を用いて、mRNA 転送メカニズムの解明と、mRNA 転送に基づくヒト iPS 細胞のナイーブ型リプログラミングの実証、という2つの研究目標を設定した。

3. 研究の方法

A. ヒト iPS 細胞 (hiPSC) - マウス ES 細胞 (mESC) 間における mRNA の転送メカニズムの解明

hiPSC と mESC の間で転送されやすい、あるいは、転送されにくい RNA を特定するために、異なる蛍光タンパク質を安定発現する hiPSC と mESC を共培養後、各々の細胞を FACS により分取、RNA を単離した後、RNA-seq に供した。検出された転写産物の中から、ヒトおよびマウス特異的なリードを解析し、両細胞間で転送される RNA 群を特定した。さらに、RNA の転送動態を可視化するために、マウス・ヒトに特異的なプローブを用いた in situ hybridization 法によるイメージング解析を行った。以上により、転送されやすい・されにくい RNA の性状を検討した。

B. mRNA 転送に基づくヒト iPS 細胞のナイーブ型リプログラミングの実証

共培養後に分取した hiPSC において、タンパク質レベルでの変化としてナイーブ、または、プライム特異的な細胞表面マーカーや転写因子をそれぞれ FACS や免疫染色により、エピジェネティックな変化として染色体の開放度を評価する ATAC-seq によりナイーブ・プライム型特異的なエンハンサーの開放度を中心に解析した。

4. 研究成果

A. ヒト iPS 細胞 (hiPSC) - マウス ES 細胞 (mESC) 間における mRNA の転送メカニズムの解明

まず、hiPSC と mESC の共培養条件を至適化するために、ヒト iPS 細胞の生存率・未分化状態の維持率、および共培養後のリプログラミング効率を指標に、両細胞の混合比率や培地組成の検討を行い、再現性の高い共培養法を確立することに成功した(図 1A)。また、予備知見として、細胞間で転送されることが判明していた β -actin mRNA について、ヒトおよびマウス特異的に検出するためのプライマー・プローブを設計し、共培養後に FACS で分取した hiPSC に含まれるマウス β -actin mRNA を定量した。その結果、最適化した共培養条件において、内在性発現量の 0.5-3.0% に相当する β -actin mRNA が細胞間で転送されることが明らかとなった(図 1B)。さらに、細胞間の直接接領域を観察するためのサンプルプロセッシング条件を最適化し、蛍光顕微鏡および電子顕微鏡を用いた解析を通じて、RNA の伝搬に寄与すると考える微細構造体の存在を明らかにした。

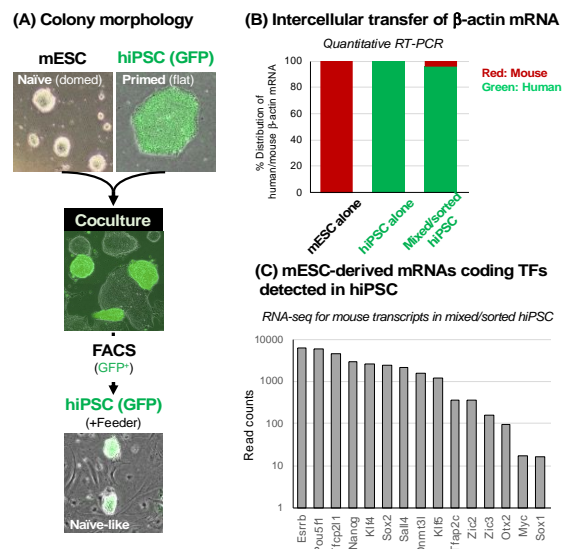


図 1: hiPSC と mESC の共培養による RNA 転送

次に、両細胞を共培養した後、FACS によって分取した hiPSC を対象として、RNA-seq を実施した。インフォマティクス解析によって、得られたリードからマウス特異的なリードを抽出し、転送されやすい RNA とされにくい RNA を特定することに成功した。具体的には、mESC に由来する RNA として、未分化性維持に關する転写因子をコードする複数の mRNA が、hiPSC に検出されることを明らかにした(図 1C)。一方、核内に係留される一部のノンコーディング RNA は、mESC から hiPSC に転送されないことも明らかとなった。

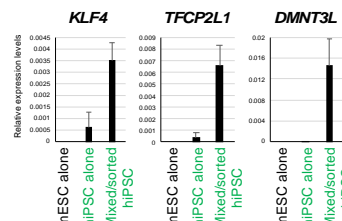
細胞間の mRNA 転送におけるメカニズムを探索する目的で、トランスウェルによる hiPSC と mESC の隔離条件による同一ウェル共培養を実施し、分泌小胞を介した mRNA 転送の有無を確認したところ、明らかな転送が確認できなかったことから、直接の細胞間接触が重要である可能性が示唆された。そこで、細胞間接触領域に観察される微細構造体が担保された状態での RNA 転送メカニズムを仮定し、微細構造の形成を抑制できる細胞骨格系の阻害剤等を添加する実験を行った。その結果、微細構造形成阻害によって mRNA 転送が阻害されることが明らかとなった。これらのことから、共培養ののちに hiPSC におけるマウス mRNA の転送現象においては、細胞間の直接接触が必須であるという可能性が示された。

B. mRNA 転送に基づくヒト iPS 細胞のナイーブ型リプログラミングの実証

まず、mESC と共培養した後の hiPSC の未分化状態の変化を複数の指標をもとに解析した。遺伝子発現状態においては、共培養していないプライム型の hiPSC と比べて、mESC と共培養した後にソーティングし、増殖してきた hiPSC では、複数のナイーブ型特異的な遺伝子群の発現が上昇していることを見出した(図 2A)。また、細胞表面マーカーのフローサイトメトリー解析や、転写因子の免疫染色など、タンパク質レベルにおいても、mESC と共培養した hiPSC において、ナイーブ型特異的な分子の発現が見られた(図 2B,C)。最終的に、本手法によって作成されたヒト iPS 細胞は、ナイーブ型細胞の維持培養条件で、増殖・未分化性維持が可能であった。他の解析結果も合わせ、mESC との共培養により、遺伝子導入や HDAC 阻害剤を用いることなく、プライム型の hiPSC をナイーブ型に類似した未分化状態へと転換可能であることが示された。

次に、mESC との共培養による hiPSC のリプログラミング系を対象として、mRNA の受け渡しに基づくリプログラミング現象の立証を試みた。まず、両細胞の共培養条件において、mESC と接触している hiPSC が、接触していない細胞と比べて、高頻度に未分化マーカーを維持していることを見出し、mESC から mRNA を受け取った細胞がリプログラミングを経て、その後、生存していることが示唆された。そこでマウス ES 細胞からの mRNA 転送がヒト iPS 細胞のリプログラミングに必要なかどうかを明らかにするために、マウス種特異的な RNAi をヒト iPS 細胞に施した(図 3)。具体的には、特定した転送されやすい RNA 群のうち、未分化性維持に参与する転写因子をコードする mRNA を選別し、それらに対する RNAi 標的配列をマウス特異的になるように設計、ヒト iPS 細胞に RNAi ベクターを発現させた。マウス ES 細胞との共培養後に生じるリプログラミングヒト iPS 細胞の出現効率を評価した結果、特定のマウス由来転写因子をコードする RNA の発現抑制によって、ヒト iPS 細胞のリプログラミングがほぼ完全に消失することがわかった。加えて、マウス ES 細胞との共培養によって生じるオープンクロマチン領域の変化を ATAC-seq で評価したところ、これらの特定した転写因子の結合サイトが共培養依存的に有意に開放していることを見出した。以上のことから、mRNA 転送を伴うマウス ES 細胞との共培養によって、ヒト iPS 細胞はナイーブ型細胞への運命転換されることが示唆された。

(A) qPCR analysis of naïve pluripotency markers (Human specific transcripts)



(B) Cell surface markers (C) Naive-specific TFs

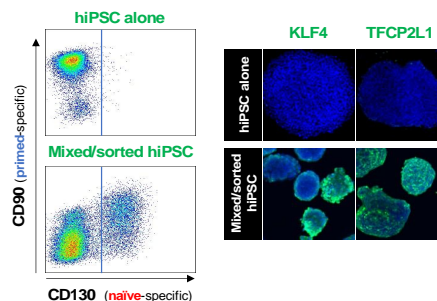


図 2: mESC との共培養による hiPSC のナイーブ様転換

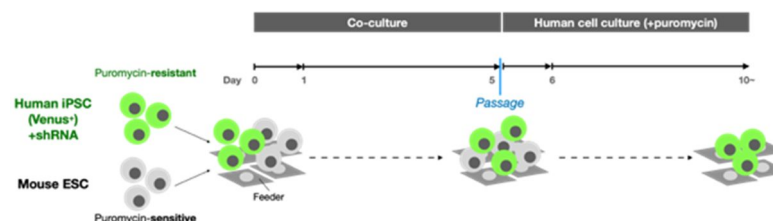


図 3: mRNA 転送に基づく hiPSC のリプログラミング現象の検証

本研究によって見いだされた、細胞間 mRNA 転送というメカニズムは新規の生命現象であり、本現象が免疫系細胞との相互作用、ニッチ環境との相互作用などを始め、さまざまな正常の生命現象において重要な意義を担う可能性も想定される。実際、例えば、mRNA 転送による神経(小脳プルキンエ細胞)炎症増悪メカニズム (PLoS Biol, 2014, 12(6): e1001875.) についての報告や、リンパ球の免疫シナプスを介した炎症反応の増悪 (J Immunol, 2017, 199 (9) 3086-3093) など、免疫系を中心に生体内でも類似の知見が徐々に報告されつつあることから、将来的にさまざまな疾患研究への可能性が期待される。

近年、プライム型ヒト iPS 細胞は株間の質的ばらつきが大きいことが、創薬・再生医療応用上の極めて重要な未解決課題となっている。本提案により、遺伝子操作を伴わない安全かつ低コストなナイーブ型 iPS 細胞の創出手法が確立されれば、高品質で安定な医療用幹細胞ストックの

構築に供する。また、iPS細胞を標的の分化細胞へ直接転換する技術の確立も実現可能と考えられる。将来的には、がんなどの疾患における細胞間相互作用を理解するための全く新たな原理基盤の提唱につながり、革新的な創薬研究への発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakabe Kokoro, Takebe Takanori, Asai Akihiro	4. 巻 15
2. 論文標題 Organoid Medicine in Hepatology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Liver Disease	6. 最初と最後の頁 3~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cld.855	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 該当する
1. 著者名 Liu Tianyi, Zhou Linli, Yang Kun, Iwasawa Kentaro, Kadekaro Ana Luisa, Takebe Takanori, Andl Thomas, Zhang Yuhang	4. 巻 4
2. 論文標題 The -catenin/YAP signaling axis is a key regulator of melanoma-associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Signal Transduction and Targeted Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41392-019-0100-7	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 該当する
1. 著者名 Fang Hongbao, Yao Shankun, Chen Qixin, Liu Chunyan, Cai Yuqi, Geng Shanshan, Bai Yang, Tian Zhiqi, Zacharias Amanda L., Takebe Takanori, Chen Yuncong, Guo Zijian, He Weijiang, Diao Jiajie	4. 巻 13
2. 論文標題 De Novo-Designed Near-Infrared Nanoaggregates for Super-Resolution Monitoring of Lysosomes in Cells, in Whole Organoids, and in Vivo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Nano	6. 最初と最後の頁 14426 ~ 14436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.9b08011	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 Koike Hiroyuki, Iwasawa Kentaro, Ouchi Rie, Maezawa Mari, Giesbrecht Kirsten, Saiki Norikazu, Ferguson Autumn, Kimura Masaki, Thompson Wendy L., Wells James M., Zorn Aaron M., Takebe Takanori	4. 巻 574
2. 論文標題 Modelling human hepato-biliary-pancreatic organogenesis from the foregut?midgut boundary	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 112 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-019-1598-0	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 Takebe Takanori	4. 巻 25
2. 論文標題 Creativity for a cure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Medicine	6. 最初と最後の頁 868 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41591-019-0471-x	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 -

1. 著者名 Takebe Takanori, Wells James M.	4. 巻 364
2. 論文標題 Organoids by design	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 956 ~ 959
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aaw7567	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 Ouchi Rie, Togo Shodai, Kimura Masaki, Shinozawa Tadahiro, Koido Masaru, Koike Hiroyuki, Thompson Wendy, Karns Rebekah A., Mayhew Christopher N., McGrath Patrick S., McCauley Heather A., Zhang Ran-Ran, Lewis Kyle, Hakozaiki Shoyo, Ferguson Autumn, Saiki Norikazu, Yoneyama Yosuke, Takebe Takanori, et al.	4. 巻 30
2. 論文標題 Modeling Steatohepatitis in Humans with Pluripotent Stem Cell-Derived Organoids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Metabolism	6. 最初と最後の頁 374 ~ 384.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cmet.2019.05.007	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

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 17件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Modeling hepato-biliary-pancreatic organogenesis from pluripotency
3. 学会等名 NYSCF Innovators Retreat (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Modeling hepato-biliary-pancreatic organogenesis in a dish
3. 学会等名 Nature Research Round Table (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Modeling hepatobiliary diseases in a dish
3. 学会等名 International Alagille meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 The forefront of Organoid Medicine
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Organoid by design
3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Organoid Medicine For Liver Disorders
3. 学会等名 ISSCR/KSSCR International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 The promise of organoid, medicine -from screen to therapeutics-
3. 学会等名 2019 Taiwan-TMDU Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Organoid by Design: Modeling hepato-pancreato-biliary organogenesis
3. 学会等名 ITALY Nature Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Directing Complex Organogenesis from Human iPSC towards Therapy
3. 学会等名 The CiRA 2019 International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 The Era of Organoid Medicine
3. 学会等名 Japanese Society for Quality and Safety in Healthcare (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Designer's Organoids by Narrative Engineering
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Augmented Cell Engineering
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Next-gen drug development with human organoid technology
3. 学会等名 The Japanese Society for the Study of Xenobiotics (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Modeling Hepato-Biliary-Pancreatic Organogenesis towards Therapy
3. 学会等名 Tissue Organoids and Disease Keystone Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 A forefront of human organoid medicine
3. 学会等名 Japan Society of Experimental Diabetes and Obesity (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Potential of human organoid medicine
3. 学会等名 AMED Symposium (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takanori Takebe
2. 発表標題 Promise and impact of human organoid transplantation
3. 学会等名 19th liver transplantation medical forum (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 佐藤 俊朗、武部 貴則、永樂 元次	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 368
3. 書名 決定版 オルガノイド実験スタンダード	

1. 著者名 米山鷹介、武部貴則	4. 発行年 2019年
2. 出版社 北隆館	5. 総ページ数 150
3. 書名 別冊 BIO Clinica 慢性炎症と疾患 オルガノイドを活用した医科学研究	

1. 著者名 大堀桃子，仁尾泰徳，川上絵理，武部貴則	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 141
3. 書名 実験医学2020年1月号iPS細胞のいま オルガノイド医療の可能性と課題	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------