

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09263

研究課題名（和文）転写因子TWIST1による分化転換と未分化性誘導を利用した間葉系幹細胞の作製

研究課題名（英文）Creation of mesenchymal stem cells using transdifferentiation and undifferentiated induction by the transcription factor TWIST1

研究代表者

森 樹史（Mori, Tatsufumi）

近畿大学・ライフサイエンス研究所・助手

研究者番号：40760492

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）：間葉系幹細胞は優れたサイトカイン産生能力と分化能力を有することから様々な疾患に対する再生医療材料として注目されている。一方で、MSCの未分化性や分化多能性、増殖といった幹細胞としての性質がどのように成立し維持されているのかはわかっていない。これまでの研究によりMSCのステムネスに関わる重要な転写因子としてTwist1が関与していることがわかった。本研究ではTwist1の詳細な制御機構の解明とin vivoにおけるTwist1を過剰発現したMSCの効果について検討を行い、肺線維症モデルマウスの治療効果について明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MSCにおける重要な転写因子が明らかとなることで、新しい再生医療技術の開発や移植用細胞の評価法の開発につながる。また、本研究により細胞表面タンパクとしてLRRC15がTwist1と相関していることがわかった。これは今後の臨床応用において、より高品質で生存性の高いMSCの作製において非常に有用な情報となる。

研究成果の概要（英文）：MSCs are somatic stem cells can isolated from various connective tissues such as bone marrow, fat, and synovial membrane. Because of its properties of cytokine secretion, multiple differentiation and niche formation, MSCs has been an attractive cell source for cell transplantation therapy. On the other hand, molecular mechanisms regulating stemness of the MSCs is largely unknown. Previous studies have implicated Twist1 as an important transcription factor involved in MSC stemness.

In this study, we elucidated the detailed regulatory mechanism of Twist1 and examined the effects of MSCs overexpressing Twist1 in vivo to elucidate the therapeutic effects in a mouse model of pulmonary fibrosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 Twist1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄や脂肪、滑膜等の組織から分離される幹細胞であり、骨、脂肪、軟骨細胞への分化能と CD29、CD44、CD90、CD105 といった表面抗原により同定される。MSC を用いた再生医療は関節や筋など運動器をはじめ、様々な組織において有効性が報告されており、今後一層普及することが予想される。MSC の分離および培養における最大の問題は、MSC の幹細胞性 (ステムネス) を維持する機構が明らかでないために、幹細胞の「品質」を定量的に評価することが困難なことである。これまでに、未分化性やあるいは増殖能を予測するマーカーとして幾つかの表面抗原の有効性が報告されてきたが、いずれも直接的な細胞機能との関連性が不明瞭である。胚性幹細胞 (ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) など未分化性の高い幹細胞で発現する転写因子 Nanog、Oct4、Sox2 を用いて MSC を評価する手法も報告されているが、これらの分子についても、MSC のステムネスとの直接的関連性は高くないと考えられている。さらに、MSC は由来する組織によって性質が異なることも知られている。治療に用いられている MSC の品質を評価し、最適な培養系を開発する上で、細胞機能に定量性をもって直結するような指標は欠かせない。

申請者らは、MSC の未分化性、増殖力、遊走能と相関する転写因子を探索し、Twist1 が MSC の幹細胞性 (ステムネス) に深く関わっていることを観察した。Twist1 の発現はドナーの加齢あるいは細胞の老化に伴って低下しており、siRNA による発現抑制によって増殖、遊走能の著しい減衰を認めた。逆に、センダイウイルスを用いた強制発現により、増殖能力、未分化性は上昇し、恒常的発現により分化の抑制を認めた。詳細に解析したところ、Twist1 の発現は全ゲノムのメチル化レベルを低下させており、ChIPseq、NET-CAGE 解析の結果、Twist1 は幹細胞性制御に関わる ID 遺伝子のプロモーター領域に結合していることを確認した。また、同時に上皮系移行および分化状態維持に関わる KLF 遺伝子を抑制していることが明らかとなった。このことから Twist1 は細胞のメチル化レベルを低下させるとともに低分化状態に維持し、かつ細胞の間葉系移行を促進することで、「MSCらしさ」をもたらしていると考えられた。この性質を利用し、CD34 造血幹細胞に Twist1 を導入したところ、MSC 様の形態を有する細胞が得られることが明らかになった。

本研究では、前年までの科研費若手研究で得られた知見をさらに発展させ、「Twist1 による MSC の幹細胞性獲得」を医療技術として有用化する為、Twist1 と強く相関する細胞表面抗原の同定 遺伝子治療用ベクターを用いた Twist1 の導入と正常な幹細胞の誘導を進めた。

2. 研究の目的

これまでの研究により Twist1 の過剰発現および抑制により、ヒトおよびマウス MSC における幹細胞の特性に対する Twist1 の重要性を明らかにした。そこで本研究では更に Twisit1 を用いた幹細胞性誘導を真に有用な医療技術として発展させるため、MSC のマーカーとしての利用、および制御可能な技術としての再開発、およびそのために必要な知見の集取を行うことである。

さらに、Twist1 過剰発現 MSC から得られた知見に基づき、生体内でより高い増殖能と治療能を有する生きた MSC の特異的マーカーを同定することにある。

3. 研究の方法

マウスモデルとして、C57BL/6 マウス大腿骨より骨髓組織を回収した。回収した骨髓組織を溶血させたのち、PBS で洗浄する。0.01% コラゲナーゼにて 37℃、30 分間処理し、MSC を含む細胞集団を遠心にて回収した。これを 10%FCS-DMEM にて 10 日間培養し、初代 MSC を得た。尚、MSC の評価は PDGFR α 、CD105、Sca1 抗体を用いて FACS で評価した。細胞の 95% 以上がマーカーに対して三重陽性を示し、1 回または 2 回継代した細胞のみを、以降の実験に使用した。

ヒト由来の MSC は材料提供に同意した患者から採取した。50mL の注射器と 18G の注射針を用いて、手術中に露出した骨髓組織から 5mL の骨髓液を吸引した。採取した骨髓液を遠心分離し、コラゲナーゼ I 型で 15 分間処理した。遠心分離した後、10%FCS-DMEM で 2 回洗浄し、10%FCS-DMEM 中、5%CO₂、5%O₂、37℃ の条件下で細胞培養皿にプレティング。培養 2 日目に培地を交換し、死細胞や残渣を除去。10 日後、線維芽細胞のコロニーを形成した BMSCs を CD105 抗体と CD44 抗体を用いて FACS で評価した。95% 以上の細胞でマーカーの二重陽性を示し、1 回または 2 回継代した細胞のみをその後の実験に使用した。

Twist1 の強制発現はセンダイウイルスベクター (SRV-TW1) により行い、トランスフェクション後 72 時間のものを用いた。Twist1 の抑制は Lipofectamine RNAiMAX を用い siRNA を導入することで誘導し、トランスフェクション後 48 時間の MSC をサンプルとした。

Lrrc15- および Lrrc15+ の MSC の骨髓へのホーミング特性を調べるために、FACS ソートした CD11b-/CD45-/Ter119-/CD105+/Lrrc15- または CD11b-/CD45-/Ter119-/CD105+/Lrrc15+ 集団を 8 週齢の C57BL/6 より採取し、 5×10^4 細胞を 8 週齢の雄 B6 マウスの尾静脈より移植した。細胞移植 28 日 (4 週間) 後、骨髓組織を採取し、FACS Aria II を用いて EGFP 陽性細胞を解析した。

BPF モデルを準備するため、B6 マウスを 2% イソフルランで麻酔した。麻酔後、20 μ L のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に BLM を気管内注入して肺線維症を誘導した。BLM 投与 24 時間後、B6-EGFP マウスの 5×10^4 個の CD11b-/CD45-/Ter119-/CD105+/Lrrc15- または CD11b-/CD45-/Ter119-/CD105+/Lrrc15+ 細胞を尾静脈から注射した。MSC 移植から 28 日後にマウスを犠牲にし、肺を採取して qPCR とウェスタンブロット解析を行った。

4. 研究成果

MSCは *in vitro* での継代を繰り返すことで老化が進行する。ヒト MSC では10回、マウス MSC では6回継代することで、細胞質の肥大と α -ガラクトシダーゼの発現を示す典型的な細胞老化が認められた(図1)。老化した MSC では、Twist1 の発現(図2)および幹関連転写因子 Id1/ID1、Id2/ID2、Bmi1/BMI1、Zeb1/ZEB1、Notch1/NOTCH1、Foxp1/FOXP1、Etv1/ETV1 の発現が、マウスおよびヒト MSC の両方で有意に抑制されていた。

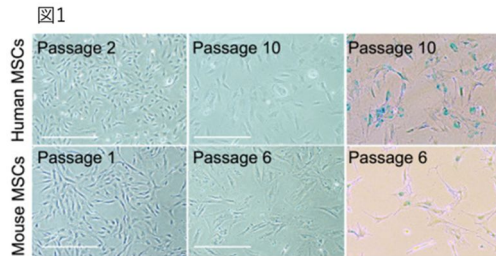
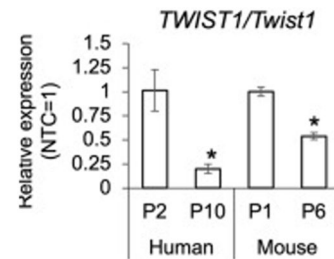


図2



siTwist1 で処理した MSC では、細胞増殖はスクランブル RNA で処理した対照 MSC に比べて、マウスでは70%、ヒトでは約60%に減少した。siTwist1 処理したヒト MSC をタイムラプス顕微鏡で観察したところ、細胞の運動性も劇的に抑制されていた(図3)。ウェスタンブロット解析により、siTwist1 処理 MSC ではP16INK4A の発現が有意に上昇することが示された。qRT-PCR により、siTwist1 処理 MSC では幹細胞関連転写因子および治療サイトカインの遺伝子発現が低下することが示された(図4)。

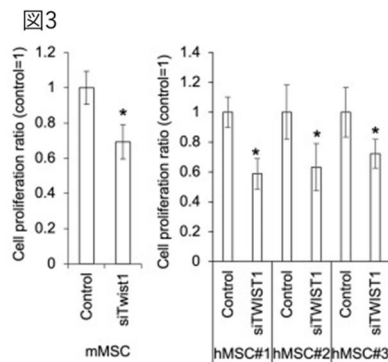
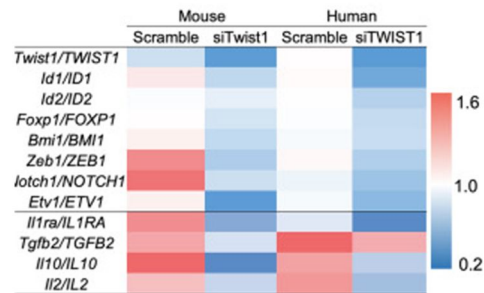
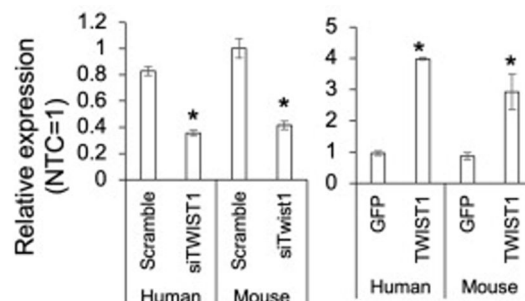


図4



Twist1 の発現と相関する細胞表面タンパク質に焦点を当てて発現差のある遺伝子のリストを分析することにより、LRRC15 の発現が Twist1 を過剰発現した MSC において有意に高いことを見出した。また、siRNA を用いて Twist1 の発現を抑制したところ、LRRC15 の発現も抑制されることがわかった(図5)。

図5



LRRC15+間葉系幹細胞が細胞移植の治療可能性を示すかどうかを調べるため、プレオマイシンの気管内注入により作製した肺線維症（PF）モデルに LRRC15+MSC を静脈注射により移植した。その結果、プレオマイシンを注入すると、線維化マーカーである Col1a1、Tgfb1、Ch11、Il6 の発現が有意に増加した。CD105+/Lrrc15- および CD105+/Lrrc15+ の MSC を移植した両群では、Col1a1、Tgfb1、Ch11 の発現が有意に減少した(図 6)。マッソントリクローム染色による組織学的解析では、プレオマイシン投与モデルマウスの肺にコラーゲン線維の蓄積が起こっており、MSC 移植マウスでは線維性変化が抑制されていた(図 7)。

図6

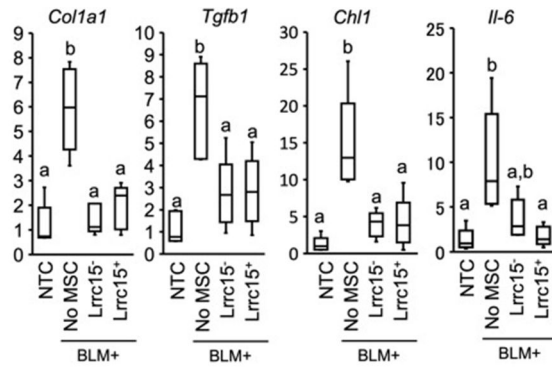
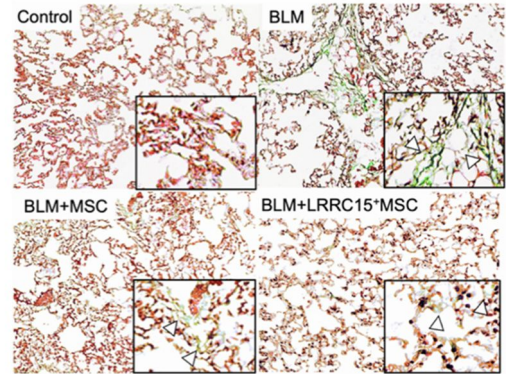


図7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Toriumi Kensuke, Onodera Yuta, Takehara Toshiyuki, Mori Tatsufumi, Hasei Joe, Shigi Kanae, Iwawaki Natsumi, Ozaki Toshifumi, Akagi Masao, Nakanishi Mahito, Teramura Takeshi	4. 巻 26
2. 論文標題 LRRC15 expression indicates high level of stemness regulated by TWIST1 in mesenchymal stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106946 ~ 106946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106946	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	寺村 岳士 (Teramura Takeshi) (40460901)	近畿大学・大学病院・准教授 (34419)	
研究分担者	竹原 俊幸 (Takehara Toshiyuki) (60580561)	近畿大学・大学病院・助教 (34419)	

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