

令和2年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	加齢に伴う間葉系幹細胞(MSC)における TAK1-Hippo pathway シグナルの重要性と TAK1 抑制による移植用 MSC の品質制御	
研究者所属・氏名	研究代表者: 近畿大学 高度先端総合医療センター 再生医療部 小野寺 勇太 共同研究者:	

1. 研究目的・内容

間葉系幹細胞は(MSC)は現在の再生医療における中心的な細胞材料の一つである。良好な臨床効果が複数報告されている一方で、細胞そのものの性質、幹細胞としての機能がどのように維持されているのかについてはほとんど分かっていない。我々は、Tgf β activated kinase(Tak1)を欠く MSC が殆ど増殖出来ないという新しい知見を得た。

本研究の目的は、MSC の自己複製、増殖における Tak1 の重要性と機序を解明し、また Tak1 の活性化状態を調節することで MSC の新たな制御法を提案することである。具体的には、①Tak1 による MSC の細胞増殖調節機構の解明、②Tak1 阻害細胞がどのような状態にあるのかの詳細な解析、③Tak1 阻害で同期した細胞の細胞移植における優位性の証明を行う。

本研究の独自性は、MSC の増殖調節機構の解明という要求性の高い研究テーマについて、これまでほとんど研究されていなかった Tgf β の non-canonical pathway に注目し、Tak1 を介した増殖経路が極めて重要であることを初めて証明する点にある。加えて、Tak1 の標的として Hippo pathway とのつながりを示している点も独自性が高いと考えている。今回、我々が Tak1 の重要な標的として同定した Yap1/Taz1 は幹細胞や癌細胞の強力なマイトジェン(細胞増殖活性化因子)として知られており、細胞の未分化性にも深く関わっていることが報告されていた。一方で、幹細胞において Yap1/Taz1 を活性化する経路はまだ不明な点が多かった。本研究では、Yap1/Taz1 の活性化が Tgf β シグナルによることを直接的に示す結果が得られており、今後の幹細胞研究に大きく寄与すると考えている。

これまでになかった研究の展開法として、Tak1 阻害で誘導される状態が静止期に類似することに注目し、Tak1 阻害を再生医療における新しい細胞制御方法として提案している。MSC を用いた細胞移植は今や再生医療の中心的なプロトコルになっている。しかし、効果が不安定であること、移植細胞の生存性や定着率の低さが大きな問題となっている。我々は、静止期にある幹細胞が細胞外ストレスに抵抗性を持つことに着目し、Tak1 の抑制により誘導される強い細胞増殖阻害を「静止期への同期」と捉え、移植前処理に Tak1 抑制を行うという新しい移植用細胞調整法により移植成績の向上を試み、MSC の増殖制御機構に迫った。

2. 研究経過及び成果

我々は、先行研究により Tak1 の抑制が MSC において強力な細胞増殖抑制をもたらすことを見出している。Tak1 の作用機序を解明するためには、Tak1 が細胞のどの機能に重要なのかを明確にする必要がある。すなわち、細胞周期の活性化に必須であって、細胞の未分化性喪失や異常な不可逆性変化が誘導されているわけではないことを証明する必要があると考えた。

そこで、I. Tak1 リン酸化阻害剤：(5Z)-7-Oxozeaenol(以下 5zox)で増殖抑制を行った細胞の分化誘導効率(骨、脂肪、軟骨への分化)の観察、II. 5zox 添加を行った細胞のトランスクリプトーム解析、III. 新生仔マウスに 5zox 投与(2日毎、2週間)し、骨髓内 MSC の含有量、体重変化の観察および 5zox 投与を停止後、体重および骨髓内 MSC の含有量が回復するかどうかを観察した。これまでの検討で、Tak1 阻害の効果は未分化 MSC の骨・軟骨への分化能に影響(Fig1-A)している事、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(Fig1-B)している事、解糖系代謝に傾倒している事、Tak1 阻害マウスでは骨髓内 MSC の細胞数および有意な体重の減少が生じるが、投与中止後は回復する(Tak1 阻害の効果は可逆的である)事(Fig1-C)が明らかとなった。さらに、5zox 投与による発育遅延から回復したマウス同士による交配を実施したところ、次世代の出産および産仔作出に問題は認められなかった(Fig1-D)ことから Tak1 阻害ならびに 5zox 投与効果は可逆的なものであると考えられた。

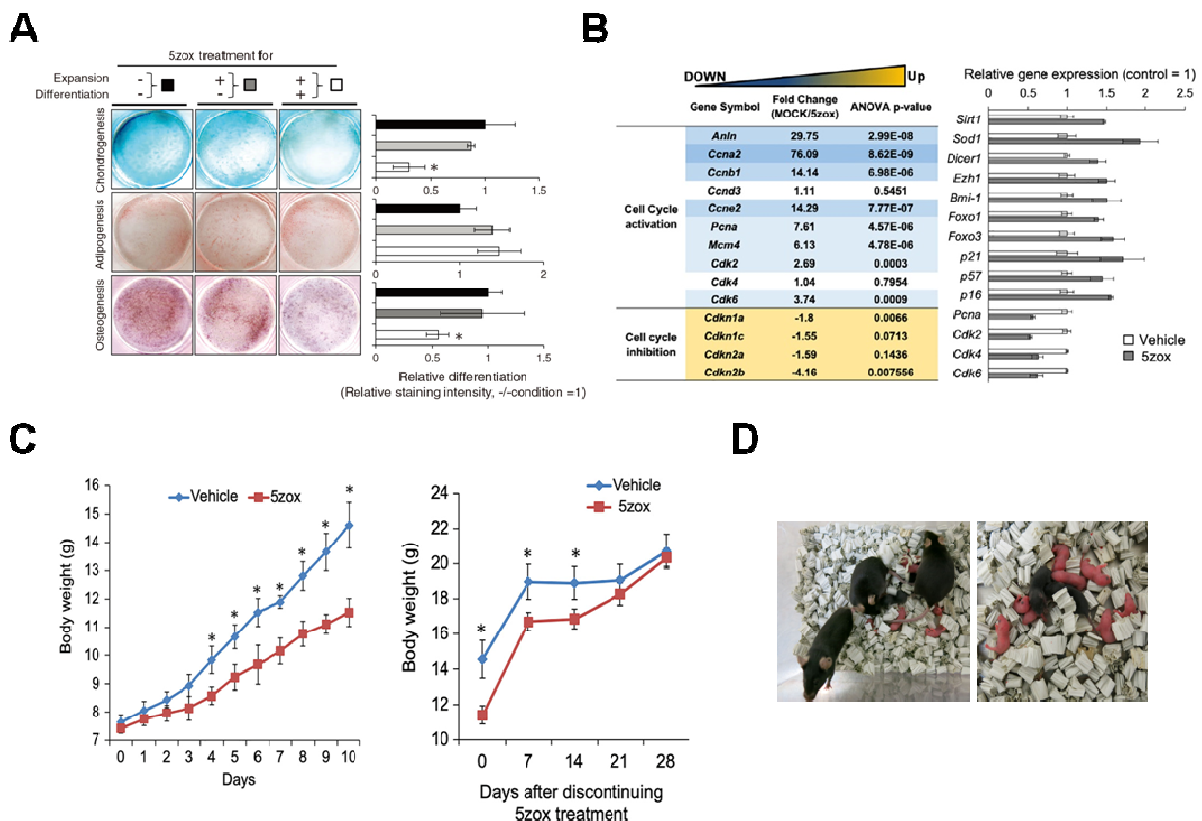


Fig1.

- A: 骨、軟骨、脂肪細胞への分化誘導
- B: Tak1阻害細胞のトランスクリプトーム解析およびqPCR解析
- C: 5zox投与マウスの体重変化
- D: 5zox投与マウスによる産仔の作出

次に、Tak1 阻害 MSC の移植を試みた。細胞を移植する際、「効果が不安定」であること、「移植細胞の生存性や定着率が低い」といった事が大きな問題・課題となっている。そこで、「Tak1 の抑制が細胞周期を停止させ、抗酸化機能を上昇させる」「5zox 投与による Tak1 の抑制は可逆的なものである」という結果を踏まえ、細胞移植への応用が可能ではないかと考えた。静止期にある幹細胞は細胞外ストレスに抵抗性を持つことが知られており、Tak1 の抑制により誘導される強い細胞増殖阻害を「静止期への同期」と捉え、移植前処理に Tak1 抑制を行うという新しい移植用細胞調整法により移植成績の向上を試み、MSC の増殖制御機構に迫った。

具体的にはIV. 5zox 添加による Tak1 阻害の継続時間の検討、V. 5zox 処理した GFP-MSC の細胞移植とアポトーシス解析、VI. 移植した細胞の ROS 産生の測定、VII. マウス髄腔内への細胞移植と生着細胞の FACS 解析、VIII. 移植した細胞の幹細胞性の検討を実施した。

5zox 処理を実施した MSC は 24 時間は安定して細胞増殖が停止していることが確認された (Fig2-A)。C57BL/6J-GFP マウスの骨髄より MSC を樹立し、5zox 処理した GFP-MSC を筋組織内へ移植した (Fig2-B)。2 日後に筋組織中から GFP-MSC を回収し、FACS を用いて Annexin V / PI の共染色によりアポトーシス誘導されている細胞の数を測定した (Fig2-C)。5zox 処理をした細胞では有意にアポトーシス誘導が抑制されている事が示された。5zox 処理した細胞において、損傷部位等で見られる、サイトカインストームを始めとしたストレスへの耐性があることが示された。

次に、細胞の酸化ストレスに反応する染色試薬: Molecular Probes® 蛍光試薬—CellROX® で染色し、FACS により解析した。5zox 処理した細胞において、有意に ROS 産生が抑制されている事も確認された (Fig2-D)。また、マウス髄腔内の骨髄をニードルで除去し、空洞を簡易的に作製した。その空洞内へ 5zox 処理した GFP-MSC を移植し、移植後 1 日、3 日、7 日、28 日に回収し FACS 解析により生着率を算出した。どのタイミングにおいても、5zox 処理した MSC は未処理の細胞に比べて多く生着していることが確認された。さらに、生着していた細胞の多くは PDGFR α / Sca-1 のダブルポジティブである事が抗体染色による FACS 解析で明らかとなった。

本助成によって得られた研究成果を、「Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through Stabilization of Yap1/Taz Proteins」として研究成果を「Stem cells」(doi: 10.1002/stem.3083.)にて発表した。

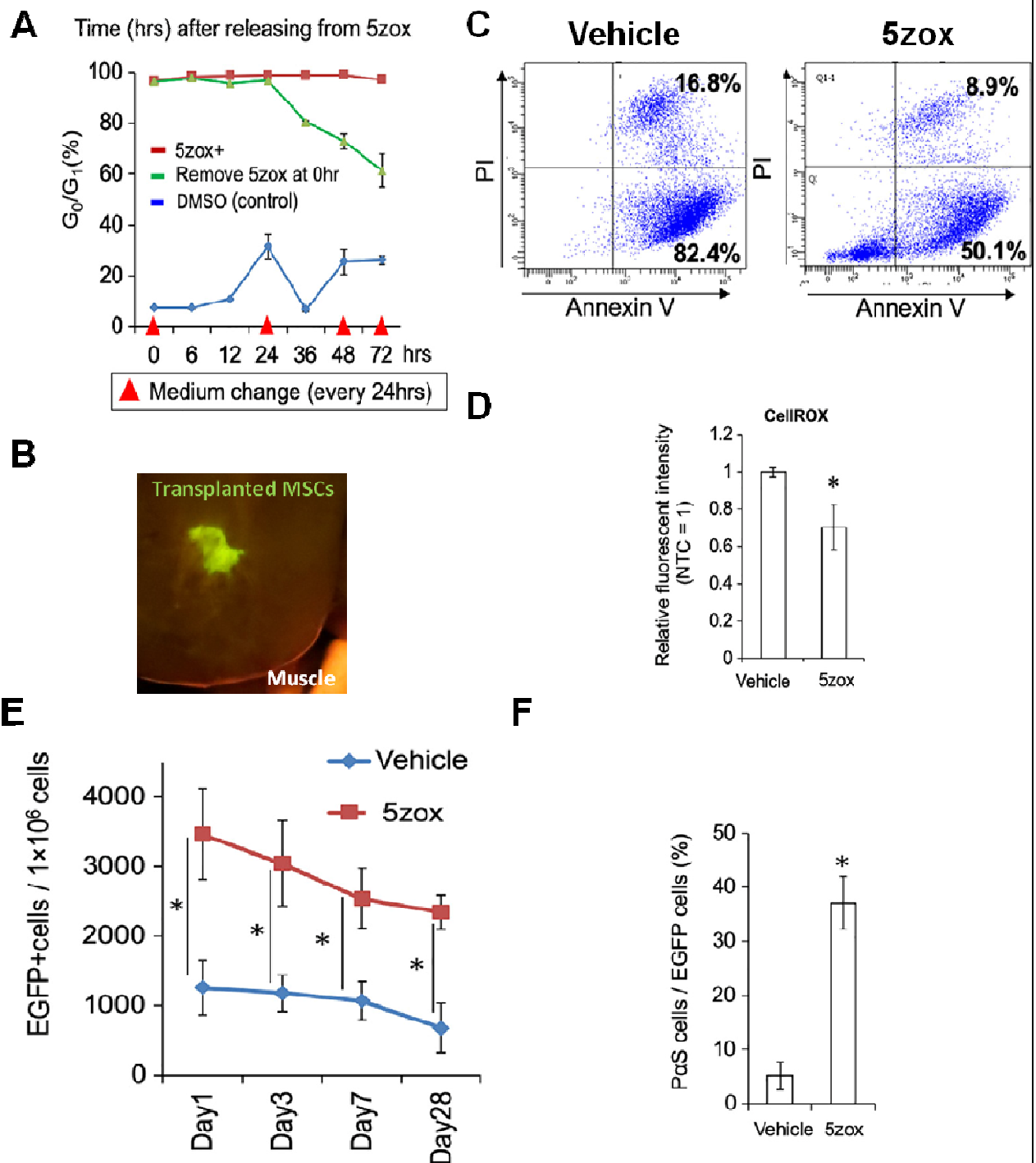


Fig2.

- A: 5zox添加によるTak1阻害の継続時間の検討
- B: 5zox処理したGFP-MSGの筋組織内への移植
- C: 移植された5zox処理GFP-MSGのアポトーシス解析
- D: 移植した細胞のROS産生の測定
- E: マウス髄腔内への細胞移植と生着細胞のFACS解析
- F: 移植した細胞の幹細胞性の検討

3. 本研究と関連した今後の研究計画

課題として取り上げた一つとして、Tak1 の結合ドメインを含む相互作用解析を実施した。MSC の核内に発現する Tak1 と相互作用しているタンパク質を共免疫沈降法によって回収し、抗体-マグネティックビーズにより回収してきた複合体をトリプシンによりオンビーズ消化した。処理したサンプルを用いて高深度 DIA プロテオーム解析を実施した。先の論文で報告した Hippo pathway で重要な役割を果たす Yap1 / Taz を始めとした数千種類ものタンパク質が一度に同定された。膨大なデータであることから現在もデータ解析に多くの時間を費やしている。その中から、増殖や分化に関する機能が報告されているタンパク質および、検出されたアミノ酸数などから同定の信頼度の高いタンパク質 X を抽出した。これまでの予備実験からタンパク質 X は増殖・分化能に機能していることが予想される。今後は MSC の未分化維持に関わるカスケードとの関連性を解明したいと考えている。

また、Tak1 の活性化抑制が増殖や抗ストレス機能に影響を与えたこと、タンパク質 X が老齢マウスでも発現が低下している事から、老化細胞、老齢マウスへのアンチエイジング効果への応用も考えている。老齢マウスにおける MSC は FACS 解析において不均一な細胞集団を形成する事が分かっている。体内においては加齢と共に慢性的な微炎症が観察されていることや、骨髄組織内においては加齢と共に脂肪細胞が増殖することが分かっている。老齢マウスにおける Tak1 抑制効果が体内の幹細胞にもたらす効果を検討したいと考えている。

マウスのみならずヒト骨髄由来 MSC においても検討を予定しており、学内による倫理委員会を経て臨床検体の採取も進行中である。今後は種を越えた普遍的な制御機構の解明にも挑戦する。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Stem cells	海外誌	2019年12月
第20回日本再生医療学会総会	口頭(オンライン)	2021年3月13日
第33回日本軟骨代謝学会	口頭(オンライン)	2021年3月26日