

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09562

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞におけるTak1-Hippo経路の重要性の解明

研究課題名(英文) Transforming Growth Factor beta-Activated Kinase 1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through Stabilization of Yap1/Taz Proteins

研究代表者

小野寺 勇太 (ONODERA, Yuta)

近畿大学・大学病院・助教

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)：骨髄由来間葉系幹細胞(BMMSC)は、多分化能性と自己複製能を有し、有用な分泌因子の産生を行う多能性幹細胞であることから細胞移植治療に利用されている。しかし、細胞増殖における詳細な制御機構は未解明である。本研究は、Tak1が細胞周期の活性化を調節する重要な分子で、BMMSCの細胞増殖に寄与することを示した。リン酸化されたTak1は、Yap1/Tazに結合して安定化し、核への移行を促す。また、Tak1阻害による静止誘導は、細胞移植における酸化ストレス耐性が高まり、BMMSC生着を改善した。本研究は、BMMSCの新規の増殖制御経路を解明し、細胞移植の治療効果を改善する有用な方法だと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、Tak1の制御がBMMSCの幹細胞性を維持する上で重要であることが解明された。Tak1はBMMSCの細胞周期の活性化に重要なキナーゼであり、Tak1の抑制が生体内と生体外の両方で細胞周期の静止状態を誘導した。Tak1は、さまざまな成長因子によって活性化される可能性があり、Yap1/Tazの安定化を通じてBMMSCの細胞周期を活性化する。また、BMMSCにおけるTak1阻害による細胞増殖の静止誘導は、細胞移植時のストレス耐性および生着結果を改善するものであった。したがってTak1は、BMMSCの自己複製に寄与するだけでなく、治療効果を改善するための重要な分子だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：BMMSCs are multipotent stem cells capable of differentiation into a variety of cell types, proliferation, and production of clinically useful secretory factors. These advantages make BMMSCs highly useful for cell transplantation therapy. However, the molecular network underlying BMMSC proliferation remains poorly understood. Here, we showed that Tak1 is a critical molecule that regulates the activation of cell cycling and that Tak1 inhibition leads to quiescence in BMMSCs both in vivo and in vitro. Tak1 was phosphorylated by growth factor stimulations, allowing it to bind and stabilize Yap1/Taz, which could then be localized to the nucleus. We also demonstrated that the quiescence induction by inhibiting Tak1 increased oxidized stress tolerance and improved BMMSC engraftment in intrabone marrow cell transplantation models. This study reveals a novel pathway controlling BMMSC proliferation and suggests a useful method to improve the therapeutic effect of BMMSC transplantation.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：間葉系幹細胞 細胞増殖 細胞移植 Tak1 Hippo Pathway

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC) は、脂肪、骨、軟骨等への多分化能と優れた細胞増殖能力を有する組織幹細胞である。骨髄、脂肪、滑膜などの組織から容易に分離することができ、サイトカイン分泌を介した組織再生の促進や免疫寛容誘導が期待できることから、現在の再生医療領域において非常に重要な移植用細胞となっている。しかし一方で、BMMSC の自己複製を維持する分子機構についてはほとんど分かっていない。

これまでの研究において、BMMSC の自己複製は①FGF-MAPK 経路、②PDGF-ERK/Akt 経路、③EGF-ERK 経路、④PI3K-Akt 経路、⑤JNK、p38MAPK を介した経路、⑥Tgf β -Tgf β R/ALK-Smad を介した経路によって維持されることが分かっている。しかし、それぞれの単独阻害が自己複製の抑制につながるということから、BMMSC の自己複製維持に決定的な役割を果たす経路はまだ見つかっていない。これらの分子経路のうち、Transforming growth factor (Tgf) β は間葉系組織の発生、分化に必須の分子経路として知られており、特に ALK-Smad を介する Canonical な経路について研究が進んでいる。しかし、ALK-Smad を抑制しても BMMSC に強い増殖抑制、形質変化は生じない。そこで申請者らは、Tgf β の non-canonical な細胞増殖活性化経路の一つである Tgf β -activated kinase (Tak1) に注目した。Tak1 は JNK、NF- κ B の活性化を介して細胞の増殖や分化に関わることが報告されていたが、幹細胞増殖における分子シグナルの全貌や重要性は明らかになっていない。

申請者らは、先行研究から Tak1 の活性阻害あるいは発現抑制は単独で BMMSC の増殖をほぼ完全に抑制するという結果を得た。さらに興味深いことに、BMMSC 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 BMMSC 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 BMMSC 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。

2. 研究の目的

本研究にて、BMMSC 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を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は (1) Tak1 抑制がもたらす影響の検討 (2) Tak1 の相互作用分子の探索とメカニズムの解明から Tak1 依存的細胞増殖経路を解明する (3) Tak1 阻害により静止期へ同期させた細胞の移植優位性を検討する。の三点に絞って実施した。

(1) 5 週齢 C57BL/6 マウスの下腿骨髄組織をコラゲナーゼ処理し、5%O₂ の低酸素環境下で BMMSC を樹立、培養を行った。Tak1 の作用を抑制する手段としてリン酸化 (活性化) 阻害剤である 5z-oxiozeanol (5zox) を用いて、in vivo / in vitro (成長曲線 / コロニーアッセイおよび分化誘導) 共に Tak1 の抑制効果を観察した。成長曲線は性成熟前の C57BL/6 雄マウスに 5zox を腹腔内投与し体重測定ならびに骨髄内の MSC 数を測定した。MSC 数の測定は、下腿骨髄組織をコラゲナーゼ処理し、CD11b⁻ / Ter119⁻ / CD45⁻ / PDGFR α ⁺ / Sca-1⁺ (P α S) 画分を BMMSC として FACS 解析により算出した。分化誘導は 10%FCS α MEM 培地に 20nM 5zox を添加し、骨 (β グリセロリン酸ナトリウム / デキサメタゾン / アスコルビン酸ナトリウム)・軟骨 (ITS サプリメント / デキサメタゾン / アスコルビン酸ナトリウム / BMP-2 / TGF β ₁)・脂肪細胞 (IBMX / インドメタシン / ITS サプリメント / デキサメタゾン) へとそれぞれ誘導した。

(2) 樹立した BMMSC に対し、piggyBac トランスポゾンベクターによる恒常的な HA tag-Tak1 発現細胞株の作製を行った。作製した細胞株のタンパク質抽出液から核画分を分取し、HA tag をターゲットとした coIP を実施し、HA tag-Tak1 の発現・回収を WB にて確認した。その後、coIP サンプルをトリプシンによりオンビーズ消化し、ペプチド化したサンプルを高深度 DIA プロテオーム解析に供した。なお、トリプシン消化～高深度 DIA プロテオーム解析に関しては共同研究者である「かずさ DNA 研究所 川島祐介 先生」に実施頂いた。プロテオミクス解析の結果から、Tak1 と相互作用する細胞増殖関連タンパク質 : Yap1 を同定し、WB により検出した。

(3) Tak1 の抑制効果がもたらす BMMSC の詳細な特性を解析する為に、培養時に 5zox を添加した BMMSC を用い、マイクロアレイおよび qPCR 解析を実施した。また、体外培養時に 5zox を添加し、その効果の継続性を確認した。これらの結果を受けて、細胞周期が静止期の時と類似した発現パターンであったこと、5zox の Tak1 抑制効果が可逆的であったことから筋組織および髄腔内へと移植を実施し、FACS 解析による細胞の生着数の算出と Molecular Probes® 蛍光試薬-CellROX® 染色により ROS を測定しストレス耐性能の有無を検討した。

4. 研究成果

5週齢 C57BL/6 マウスの下腿骨髄組織より BMMSC を樹立し、5zoX 添加により Tak1 のリン酸化を抑制した状態で培養した。5zoX の濃度依存的に BMMSC のコロニー形成率が低下することが観察された (図 1-A)。また、BMMSC 培養下で 5zoX を添加したまま骨・軟骨・脂肪細胞へと分化誘導を行うと、骨・軟骨細胞への分化は著しく抑制される結果となったが脂肪細胞への分化においては増加傾向にあり、Tak1 の活性化が各分化に寄与している事が明らかとなった (図 1-B)。

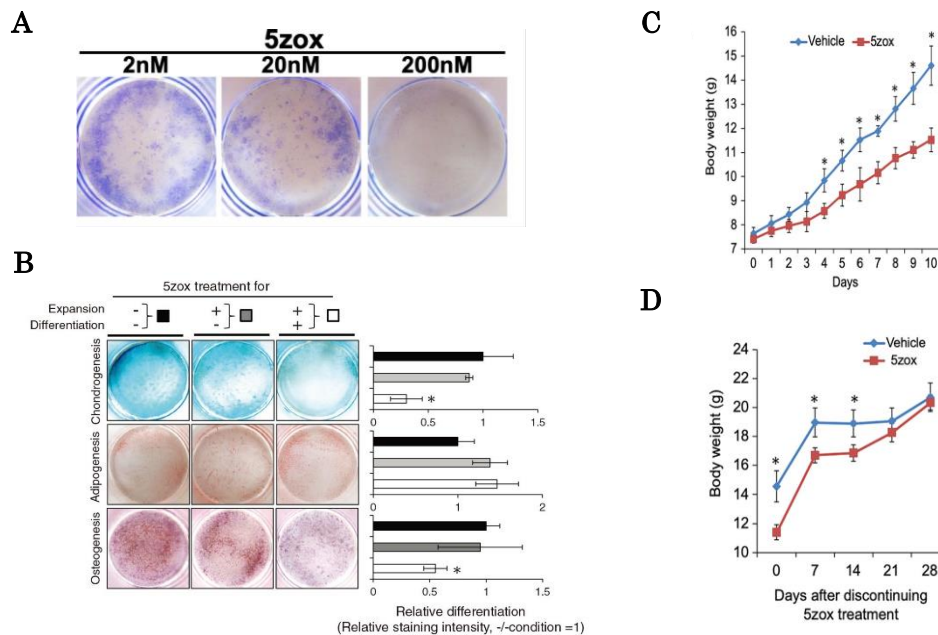


図 1. *in vitro* / *in vivo* 下における Tak1 抑制効果

次に、若齢マウスの腹腔内に対して 2 日おきに $5 \mu\text{g}$ 5zoX / マウス体重 (g) を投与し、体重測定から個体における Tak1 の抑制効果を観察した。初回の投与から 4 日目には体重増加に差が認められた (図 1-C)。それ以降は差が拡大する一方であったが、投与を打ち切り、その後も測定し続けると急激に体重増加が回復し 4 週間後には正常値まで体重増加することが観察された (図 1-D)。このことより、Tak1 は BMMSC における細胞増殖能に寄与しており、分化能に対してもその影響が認められた。また、体内においても Tak1 の抑制効果が顕著に現れており、その機能の重要性が明らかとなった。

上記の結果を受けて、キナーゼである Tak1 のパートナータンパク質の同定を試みた。BMMSC に対し、piggyBac トランスポゾンベクターによる恒常的な HA tag-Tak1 発現 BMMSC 株の作製を行った。作製した細胞株の核画分に存在する Tak1 と相互作用するタンパク質の同定を目指し、HA tag をターゲットに HA 抗体にて coIP を実施し、高深度 DIA プロテオーム解析から Tak1 と相互作用する 5581 個のタンパク質を同定した。ここから、細胞外、ミトコンドリア、その他の細胞小器官由来のタンパク質などを除くと、Tak1 に特異的に結合している Tab1、Tab2 なども含めた 355 個のタンパク質を同定することが出来た。355 個のタンパク質の中で、細胞増殖や器官サイズの制御を行う Hippo Pathway の Yap1 に着目した (表 1)。高深度 DIA プロテオーム解析で用

Uniprot Ac.	Protein name	Gene name	Molecular Weight	Identified Peptide Count	Protein Group Score
Q62073	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	Map3k7	64 kDa	9	0.999984327
Q8CF89	TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 1	Tab1	55 kDa	11	0.999811275
Q99K90	TGF-beta-activated kinase 2 and MAP3K7-binding protein 2	Tab2	76 kDa	12	0.999956191
Q64729	TGF-beta receptor type-1	Tgfr1	56 kDa	2	0.99744756
O88393	TGF-beta receptor type-3	Tgfr3	94 kDa	1	0.9862289
P46938	Transcriptional coactivator YAP1	Yap1	52 kDa	5	0.999598096

表 1. BMMSC における HA tag-Tak1 の coIP-LC/MS/MS 解析

いた coIP サンプルで WB を行い Tak1 と Yap1 の発現を確認することが出来た (図 2-A)。BMMSC において、Tak1 と Yap1 は核内で発現していることが確認されており (C:細胞質 / N:核)、5zoX 添加によって核内での発現を共に著しく低下させることも確認出来た (図 2-B, C)。

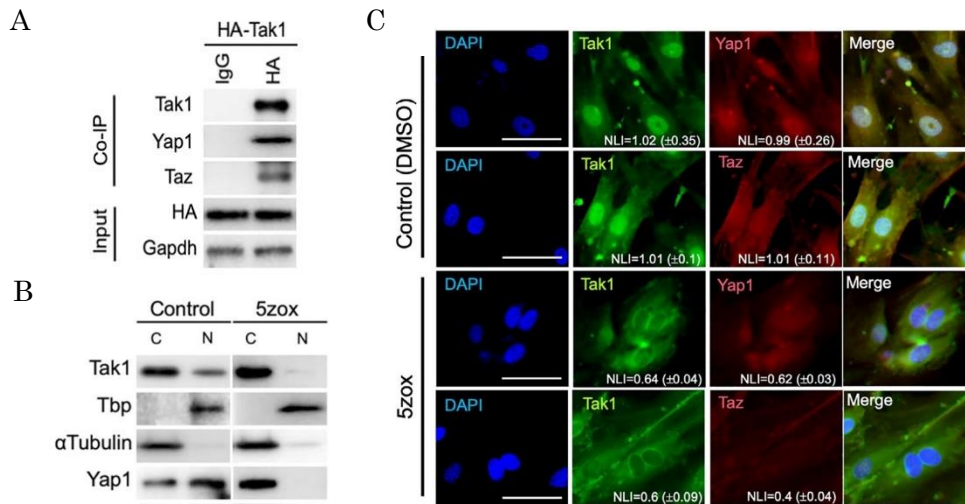


図 2. Tak1 と相互作用する Yap1 と局在の変化

プロテオミクス解析より Tak1 と Hippo Pathway の関わりが明らかとなったが、Tak1 抑制効果をもたらす BMMSC の詳細な特性を解析する為に、Tak1 の活性化を抑制した BMMSC のマイクロアレイ解析および qPCR 解析を実施した。Tak1 の活性化を抑制すると、細胞周期の静止期に関わる遺伝子や抗酸化関連遺伝子の発現が上昇していることが確認された (図 3)。

静止期様の細胞はストレス耐性が強く、移植床でのサイトカインストームといった過度なストレス環境下への移植への応用が期待される。そこで、移植に先駆けて 5zox の静止期誘導効果がどれほど継続されるのか検証した。BMMSC 培養時に 5zox 処理を 48 時間施し、5zox フリー培地へと培地交換を行った。24 時間は静止期様の状態を維持していたが、その後は緩やかに細胞周期の回復が認められた (図 4-A)。また、この細胞をマウス大腿筋に創傷部位に移植し、ROS 産生を FACS 解析にて観察したところ、著しく低下している事を認めた (図 4-B)。さらに、マウス髄腔内への移植においては、術後 28 日後でも多くの細胞が存在しており (図 4-C)、その多くが P α S 陽性細胞であったことから、分化することなく幹細胞性を維持したままホーミングしていることが示唆された (図 4-D)。

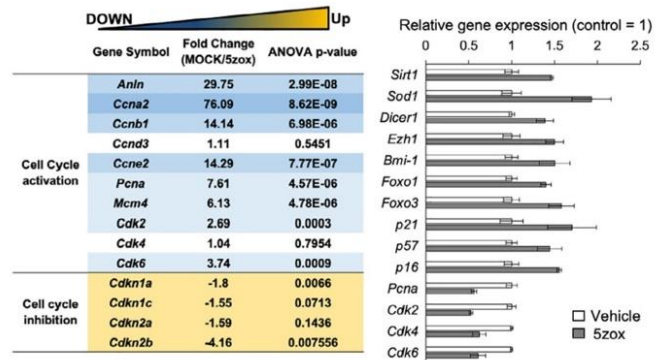


図 3. Tak1 抑制 BMMSC の遺伝発現解析

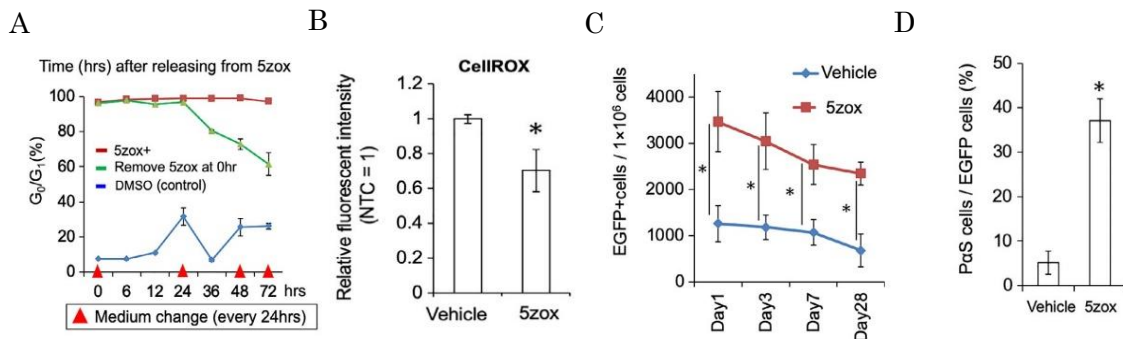


図 4. Tak1 阻害 BMMSC の移植

本研究の成果から、Tak1 の制御が BMMSC の幹細胞性を維持する上で重要であることが解明された。Tak1 は BMMSC の細胞周期の活性化に重要なキナーゼであり、Tak1 の抑制が生体内と生体外の両方で細胞周期の静止状態を誘導した。Tak1 は、さまざまな成長因子によって活性化される可能性があり、Yap1/Taz の安定化を通じて BMMSC の細胞周期を活性化する (図 5)。また、BMMSC における Tak1 阻害による細胞増殖の静止誘導は、細胞移植時のストレス耐性および生着結果が

改善するものであった。したがって Tak1 は、BMSC の自己複製に寄与するだけでなく、治療効果を改善するための重要な分子だと考えられる。

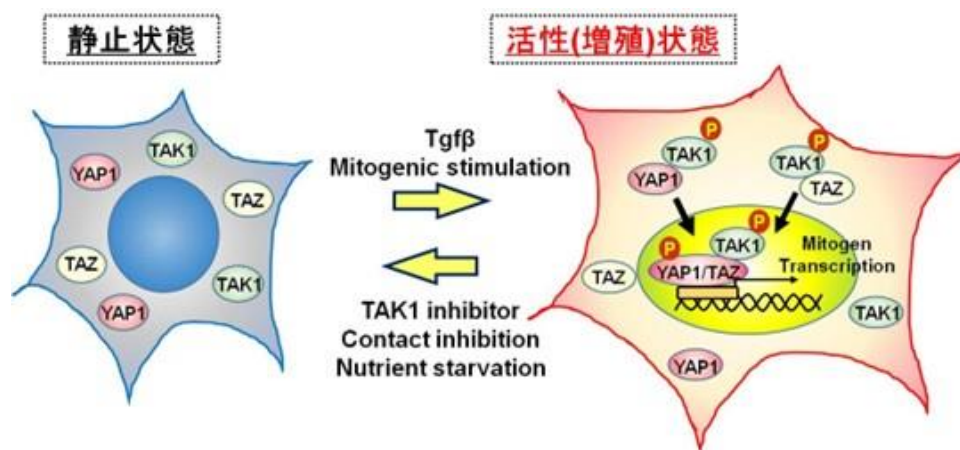


図 5. BMSC における Tak1 の増殖制御メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Fukuda K.	4. 巻 37(12)
2. 論文標題 Transforming Growth Factor β -Activated Kinase 1 Regulates Mesenchymal Stem Cell Proliferation Through Stabilization of Yap1/Taz Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem cells	6. 最初と最後の頁 1595-1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.3083.	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 Hourii K, Mori T, Onodera Y, Tsujimoto T, Takehara T, Nakao S, Teramura T, Fukuda K.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 miR-142 induces accumulation of reactive oxygen species (ROS) by inhibiting pexophagy in aged bone marrow mesenchymal stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Report	6. 最初と最後の頁 3735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-60346-2.	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 Tsujimoto T, Mori T, Hourii K, Onodera Y, Takehara T, Shigi K, Nakao S, Teramura T, Fukuda K.	4. 巻 523(3)
2. 論文標題 miR-155 inhibits mitophagy through suppression of BAG5, a partner protein of PINK1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 707-712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.01.022.	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 Mori T, Onodera Y, Itokazu M, Takehara T, Shigi K, Iwawaki N, Akagi M, Teramura T.	4. 巻 201
2. 論文標題 Depletion of NIMA-related kinase Nek2 induces aberrant self-renewal and apoptosis in stem/progenitor cells of aged muscular tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 111619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2022.111619	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野寺勇太
2. 発表標題 TAK1は加齢性の筋衛星細胞機能減衰に關与する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 法里慧
2. 発表標題 miR-142はAg-BMMSCのペキソファジーを阻害し酸化ストレスの蓄積を誘導する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辻本宜敏
2. 発表標題 miR-155はBCL2 associated athanogene 5 (BAG5)の抑制を介したミトファジー機構の制御に關与する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野寺 勇太 寺村 岳士 信貴 香苗 森 樹史 竹原 俊幸 福田 寛二
2. 発表標題 骨髓間葉系幹細胞 (BMMSC) におけるTGFbeta-activated kinase (Tak1)の抑制は静止期を誘導し移植細胞の定着効率を向上させる
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 信貴香苗 小野寺勇太 竹原俊幸 寺村岳士 福田寛二
2. 発表標題 Tak1は増殖性サイトカイン依存性のBMMSC増殖を制御し、その阻害は可逆的増殖停止を誘導する。
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福田寛二 小野寺勇太 信貴香苗 竹原俊幸 寺村岳士
2. 発表標題 Tak1はYap1/Tazとの相互作用を介し骨髄間葉系幹細胞 (BMMSC) の細胞周期を制御する。
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野寺勇太 寺村岳士 竹原俊幸 福田寛二
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞におけるTak1の抑制は静止期を誘導し移植細胞の定着効率を向上させる。
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野寺勇太 竹原俊幸 寺村岳士 福田寛二
2. 発表標題 間葉系幹細胞におけるTGFb-activated kinase (TAK1)の抑制はYap1の制御を介して静止期を誘導し細胞移植の効率に寄与する。
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 樹史, 小野寺 勇太, 信貴 香苗, 系数 万紀, 岩脇 菜摘, 竹原 俊幸, 赤木 将男, 寺村 岳士
2. 発表標題 NINA-related kinase (NEK2)は加齢マウスでの筋衛星細胞の減少に關与する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺 勇太, 信貴 香苗, 系数 万紀, 森 樹史, 岩脇 菜摘, 竹原 俊幸, 福田 寛二, 寺村 岳士
2. 発表標題 核小体タンパク質LYARは骨髓間葉系幹細胞の脂肪分化を制御する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 系数 万紀, 小野寺 勇太, 森 樹史, 岩脇 菜摘, 信貴 香苗, 竹原 俊幸, 福田 寛二, 寺村 岳士
2. 発表標題 加齢脂肪組織由来エクソソームはmiRNA Let7d-Hmga2経路で筋衛星細胞の細胞増殖を阻害する
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

〔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)	

6. 研究組織（つづき）

	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	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