

論文内容要旨

Mechanotransducing YAP/TAZ-TEAD Axis Regulates the Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells

(メカノシグナル YAP/TAZ-TEAD 経路は間葉系幹細胞の免疫調整能を制御する)

Stem Cell Reviews and Reports, 2023, in press.

主指導教員：水野 智仁教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：安達 伸生教授

(広島大学病院 整形外科)

副指導教員：宿南 知佐准教授

(医系科学研究科 生体分子機能学)

吉井 寛毅

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells (MSCs)) は自己複製能と骨・軟骨・脂肪細胞などへの多分化能を有する細胞であるため、生体から分離・培養し、移植する再生医療において大きな期待を集めてきた。特に、MSCs は転写共役制御因子 YAP/TAZ を中心としたメカノトランスダクション機構によって、細胞密度、細胞形状、あるいはマトリックス硬さなどの細胞外微小環境に応答し、細胞分化方向を決定づけることが知られている。

一方、近年では MSCs は多分化能を有するのみならず、TSG-6 や IDO といった抗炎症因子や細胞保護因子の産生を介して免疫調整能を発揮することが報告されている。この性質を利用して、難治性免疫系疾患に対する新規細胞治療法として注目されている。対象疾患の例として移植片対宿主病 (Graft Versus Host Disease: GVHD)、炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease: IBD) 等が挙げられ、本邦においても急性 GVHD に対する MSCs 治療が保険診療として行われている。

ここで重要なことに、前述した YAP/TAZ メカノシグナルによる MSCs 細胞分化機序は詳細に研究されているにもかかわらず、MSCs の免疫調整能との関係については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、ヒト骨髄由来 MSCs の免疫調整能に対して、YAP/TAZ メカノシグナリングと YAP/TAZ の主要標的転写制御因子 TEAD の役割を解明することを目指した。

【方法】

YAP/TAZ 活性が低下すると知られている、軟らかいゲル上 (2kpa) ・浮遊状態 ・高密度状態で、ヒト骨髄 MSCs を培養した。また、YAP/TAZ メカノシグナルの上流になる F-actin に対して、重合阻害剤を添加して培養した。さらに、YAP/TAZ siRNA を導入し YAP/TAZ 活性を低下させて培養した。これらの YAP/TAZ 制御培養条件化において、TNF- α 刺激を加え、細胞保護分泌因子 TSG-6 あるいは IDO mRNA 発現を qPCR で定量した。次に YAP/TAZ siRNA 導入 MSCs と T 細胞の共培養を行い、T 細胞の活性化抑制を ELISA にて評価した。

YAP/TAZ メカノシグナル活性の低下が TNF- α 誘導性の免疫調整因子の遺伝子発現にどのように影響しているか調べるために以下の4つの群から Total RNA を抽出し RNA-seq 解析を行った: negative control 導入 MSCs + 無刺激群 (n=3)、YAP/TAZ siRNA 導入 MSCs + 無刺激群 (n=3)、negative control 導入 MSCs + TNF- α 刺激群 (n=3)、YAP/TAZ siRNA 導入 MSCs + TNF- α 刺激群 (n=3)。解析として Heat map、Venn diagram assay、KEGG pathway、ChEA3 解析を行った。

転写共役制御因子 YAP/TAZ の主要な結合ターゲットである転写制御因子 TEAD が、MSCs の免疫制御能に関与するか検討した。すなわち、MSCs に TEAD siRNA を導入し TSG-6 ・ IDO mRNA 発現、T 細胞活性化抑制について評価した。さらに、in vivo での免疫制御能の変化を検証するために、ヒト炎症性腸疾患を想定しデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 誘導マウス大腸炎モデルを用いた。TEAD siRNA 導入 MSCs をマウス尾静脈から静注し、経時的に体重減少 ・ Colitis score の測定、腸の組織学的解析を行った。

【結果】

MSCs を高密度状態で培養を行うと、Western blotting 法にて YAP/TAZ タンパク発現が減少し、qPCR の結果から YAP/TAZ のターゲット遺伝子である CTGF の mRNA 発現が低下した。この YAP/TAZ 活性の低下した高密度培養状態で、MSCs における免疫調整因子 TSG-6、IDO mRNA 発現が上昇し、TNF- α 刺激時にはその発現をさらに上昇させた。浮遊状態、軟らかいゲルでの培養下でも YAP/TAZ 活性の減弱に伴い、TNF- α によって誘導される TSG-6、IDO mRNA 発現が顕著に増加した。さらに、F-actin 重合阻害剤の添加、YAP/TAZ siRNA 導入によって YAP/TAZ 活性が低下した MSCs においても同様に、TSG-6、IDO mRNA 発現が増加し、TNF- α 刺激に対する TSG-6、IDO mRNA 発現は相乗的に上昇した。また、YAP/TAZ siRNA 導入 MSCs を活性化 T 細胞と共培養したところ、T 細胞の増殖を有意に抑制した。これらのことから YAP/TAZ メカノシグナルが阻害された状態にあると、MSCs は炎症刺激に対して強く応答し、免疫制御能を発揮することが示された。

トランスクリプトームシーケンスにて YAP/TAZ siRNA 導入 MSCs + TNF- α 刺激群において TSG-6、IDO 以外にも代表的な免疫調整因子の遺伝子発現が上昇していた。Venn diagram assay、KEGG pathway、ChEA3 解析により NF- κ B シグナル経路の活性化を介して免疫調整能を向上させている可能性が示唆された。

TEAD siRNA 導入 MSCs は、Western blotting 法にて TEAD タンパク発現の減少と qPCR にて CTGF の mRNA 発現の低下が確認された。この YAP/TAZ 活性の減弱にしたがって TSG-6、IDO mRNA 発現は上昇し、TNF- α 刺激時にはその発現をさらに増加させた。T 細胞の共培養では増殖を有意に抑制していた。これらのことから TEAD siRNA 導入 MSCs も同様に免疫調整能が向上していることが示された。DSS 誘導マウス大腸炎モデルにおいて、TEAD siRNA 導入 MSCs 投与群は negative control 導入 MSCs 投与群と比較し体重減少、colitis score を有意に抑制した。組織学的解析では腸粘膜上皮と陰窩の損傷が抑えられ炎症細胞浸潤が減少していた。

【結論】

本研究は、以前から細胞分化においてよく知られていたメカノシグナル YAP/TAZ-TEAD 経路が、MSCs の免疫調整能を制御する上でも重要であることを明らかにした。具体的には、YAP/TAZ-TEAD シグナル伝達の阻害は、NF- κ B シグナル伝達経路の活性化を介して免疫調整能を向上させたということである。これらのシグナル伝達経路を詳細に理解することで、免疫系疾患に対する新規かつ有望な MSCs ベースの治療法への道を開くことができると考えられる。