

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	吉井 寛毅
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Mechanosignaling 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)			
論文審査担当者			
主査	教授 加来 真人	印	
審査委員	教授 河口 浩之		
審査委員	教授 太田 耕司		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【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。MSCs の細胞分化は細胞密度、細胞形状、あるいはマトリックスの弾力性が、YAP/TAZ メカノトランスダクション機構と細胞骨格力学を調節し、MSCs の細胞分化を制御することが知られている。具体的には MSCs は硬い足場にあると F-actin が伸展し、これに伴って転写共役制御因子 YAP/TAZ が核内移行し骨分化に向かい、軟らかい足場では F-actin が収縮し YAP/TAZ が核外移行することでその活性が低下し脂肪・軟骨分化に進むことが分かっている。</p> <p>一方、近年では MSCs が多分化能のみならず MSCs 自身が 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有することが知られてきた。この性質を利用して難治性の免疫系疾患に対する新しい治療戦略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)等が挙げられる。実際に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。しかしながら、現時点では詳細な分子制御メカニズムについて明らかにされていない点も多い。</p> <p>MSCs と YAP/TAZ メカノシグナルについて多くの研究が行われてきたが、YAP/TAZ メカノシグナルと MSCs の免疫調節能が関連しているかどうかはま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 の免疫調節能におけるメカノトランスデューサー YAP/TAZ の役割を調べることを目的とした。また YAP/TAZ の主要な結合ターゲットである転写因子 TEAD が免疫調整能制御に関与しているかを調べた。</p> <p>【方法】 ヒト骨髄 MSCs を、YAP/TAZ メカノシグナル活性が低下するとされる微小環境として、軟らかいゲル上(2kpa)・浮遊状態・高密度状態、もしくは F-actin 重合阻害剤を添加して培養した。また、YAP/TAZ siRNA を導入し培養した。さらに TNF-α 刺激も加え、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。</p>			

YAP/TAZ メカノシグナルの下方制御が 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。続いて転写因子 TEAD に着目した。YAP と TAZ は転写共役因子であり、転写調節領域に結合する場合は何らかの転写因子と複合体を形成する。その代表的なターゲットとして TEAD が存在し、これが免疫調整能に関与しているか調べることにした。同様に 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。

in vivo の検証としては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) 誘発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、WB にて YAP/TAZ タンパクの分解と YAP/TAZ のターゲット遺伝子である CTGF の mRNA 発現の低下が確認された。免疫調整因子 TSG-6/IDO mRNA 発現は生理的条件下では高密度状態、即ち YAP/TAZ 転写活性が阻害されるにつれてゆるやかに上昇したが、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同等の発現傾向が確認された。このことから YAP/TAZ メカノシグナルを阻害すると免疫調整因子の産生能が上昇し、さらに TNF- α に対する応答性が向上することが示唆された。F-actin 重合阻害剤の添加、siRNA によるノックダウンによって YAP/TAZ メカノシグナルを阻害された MSCs も TSG-6、IDO mRNA 発現を増加させ、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 は活性化 T 細胞と共培養を行ったところ T 細胞の増殖を有意に抑制した。このことから YAP/TAZ 下方制御下にある MSCs は免疫調整能が増強していることがわかった。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。また、TEAD siRNA 導入 MSCs も同様に MSCs の免疫調節能が向上していた。TEAD siRNA を導入した MSCs の投与は、DSS 誘発マウス大腸炎モデルにおいて、体重減少、colitis score を有意に抑制し急性大腸炎などの炎症性腸疾患症状を改善した。

【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 の免疫調節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節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。

これらの研究成果は、歯科医学の発展に寄与するもの大きいと評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が吉井寛毅に博士(歯学)の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。