

「虚血によるペリサイトリプログラミング現象の分子機構を炎症に着目し解明する」

関西学院大学 生命環境学部

佐久間 理香

1 研究の背景と目的

血管周皮細胞（ペリサイト）は、毛細血管において内皮細胞を取り囲むように存在する間葉系の細胞である。脳に存在するペリサイトは、普段は脳の恒常性を維持する役割を担っているが、近年、虚血領域のペリサイトから多能性幹細胞（iSCs : ischemia-induced multipotent stem cells）が見いだされることが明らかとなっている（参考文献1）。申請者はこれまでに、iSC では幹細胞マーカーである nestin や Sox2 が高発現していること、ペリサイト幹細胞化メカニズムの一端として低酸素無糖条件（OGD: Oxygen Glucose Deprivation）が関与していることを明らかにしている（参考文献2）。しかしながら、OGD 負荷のみでは神経系へシフトしていることから、ペリサイトの幹細胞誘導メカニズムには他の要因も関与することが示唆されていた。そこで新たに着目したのが、脳梗塞後に起こる炎症とそれに伴うアシドーシス（酸性化）である。申請者はこれまでの研究にて、iSC では正常脳ペリサイトよりも、炎症にて誘導される COX-2、アシドーシスの要因となる CA9（Carbonic Anhydrase 9）の発現量が増加することを突き止めている。幹細胞を酸性環境にて培養すると、自己複製能が増加する報告がある（参考文献3、4）ことから、虚血によるペリサイトの幹細胞化には炎症に伴う酸性環境を要する可能性が高いと考えている。さらに、アシドーシスの要因であるプロトンの増加によりミトコンドリア呼吸が亢進する。近年、幹細胞と分化細胞においてミトコンドリアの形態が変化することが注目されている（参考文献5）ことから、ミトコンドリアの形態やその活性を検討することで、ペリサイトから iSC への変換を評価できるのではないかと考えた。本研究の目的は、正常脳ペリサイトを iSC が産生される虚血環境に近づけ、多分化能の獲得に関与する遺伝子を明らかにすることで、正常脳ペリサイトのリプログラミング現象を分子レベルにて解明することを試みた。

2 研究方法・研究内容

I. pH のバランスとペリサイト脱分化、及び分化能の相関の検討

申請者は既に、C.B-17 系統マウスから正常ペリサイトを単離する方法を確立している。上述した通り、ペリサイトの幹細胞化にはアシドーシスが関わっている可能性が示唆されている。予備実験にて、現行法の OGD 負荷において CA9 の発現が減少していたことから、pH によって幹細胞化と分化能が調節されている可能性が考えられている。そこで、細胞内 pH 測定試薬を用いて iSC とペリサイトの pH を測定し、分化能及び脱分化における pH のバランスに対する知見を得た。

II. 炎症から iSC 及びペリサイト幹細胞化へ受ける影響の検討

上述した通り、iSC はペリサイトよりも COX-2 が高発現していることが判明している。COX-2 を阻害することで幹細胞マーカーが低下する報告がある（参考文献6）ことから、iSC においても炎症が幹細胞マーカーの発現を誘導している可能性が示唆されていた。加えて、iSC では酸化ストレスに応答して抗酸化に寄与する Nrf2、HO-1 が高発現していた。これらのことから、活性酸素の放出により、種々の細胞や液性因子が障害され炎症反応を惹起することから、iSC の産生には炎症との関わりが高いのではないかと考えられた。さらに、当研究室の先行研究において、クロロゲン酸、レスベラトロールを加えることで Nrf2 発現量を増加させていること、またその分子メカニズムを明らかにしており、神経再生を促す報告がされている（参考文献7）ことから、Nrf2 を増やすことで、ペリサイトの脱分化に影響を与えるのかどうか検討した。

Ⅲ. ミトコンドリアダイナミクスに注目した検討

幹細胞ではミトコンドリアが分裂した状態で観察されており、分化が進むとミトコンドリアは融合して細長い形態を取っていることから、ミトコンドリアの機能と幹細胞化は密接に関与している（参考文献5）。そこで、iSC、ペリサイト、OGD 負荷ペリサイト、研究項目Ⅰ、Ⅱの条件下で培養したペリサイトのミトコンドリアの形態の観察、及びミトコンドリアの融合・分裂を進める因子について解析することで、幹細胞化とミトコンドリアの機能に相関があるかどうかを探索した。

Ⅳ. ペリサイトの多能性獲得の分子機構の解明

研究項目Ⅰ～Ⅲで決定されたターゲット遺伝子やタンパク質などの機能を解析し、ペリサイトにおいて多能性獲得に伴い発現が変化している遺伝子を決定した。また、幹細胞数、分化能の増加に要する目的遺伝子であるのかどうかを検討するため、effecten（QIAGEN）にて目的遺伝子を過剰発現させた。

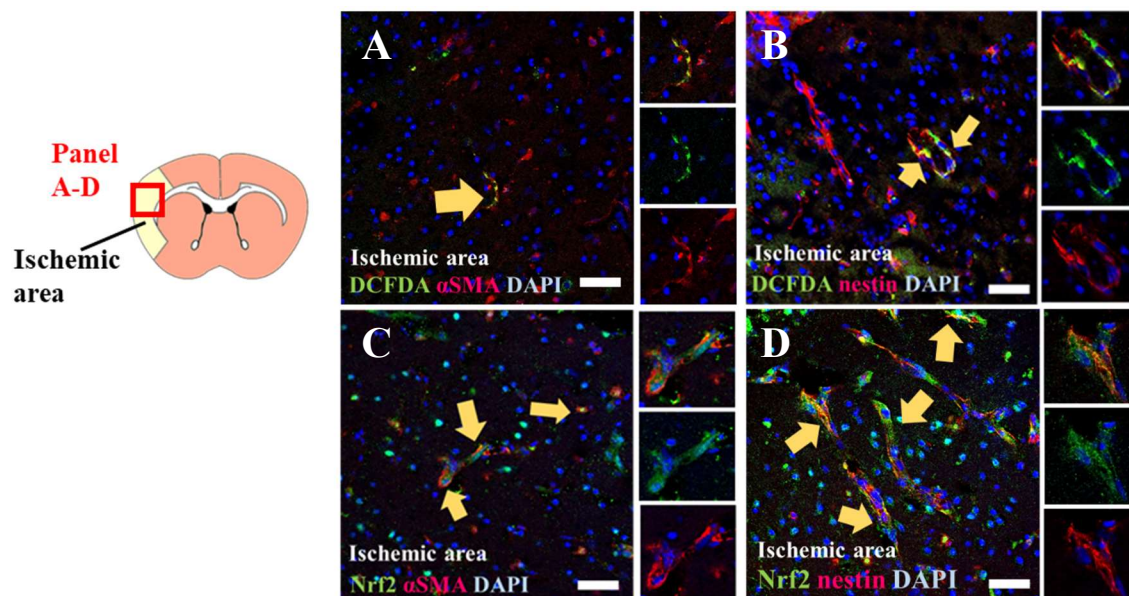
3 研究成果

A. ペリサイトと iSC における pH の検討

pH 測定試薬を用いて nPC と iSC の pH を測定したところ、nPC の pH は 7.15 ± 0.11 であり、iSC の pH は 7.45 ± 0.12 であった。このことから、nPC よりも iSC の方が pH が高く、ペリサイトの幹細胞化に酸性化に関与している可能性は低いと考えられた。

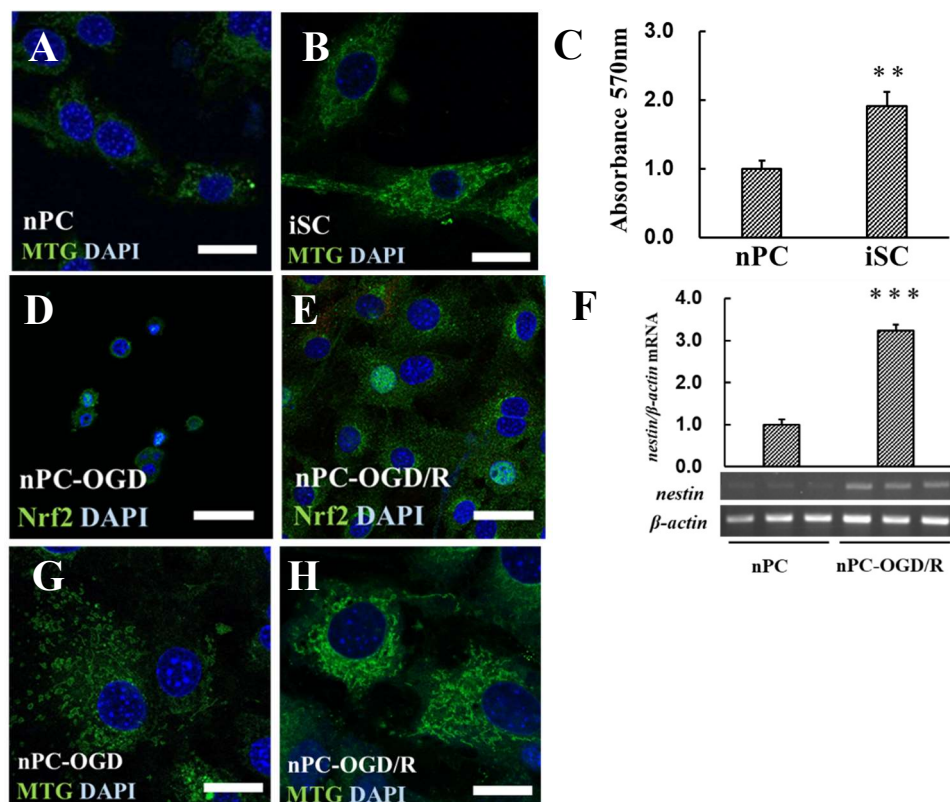
B. 梗塞巣及び反対側における iSC マーカーと Nrf2 発現検討

iSC にて Nrf2 が高発現していること、CA9 の上流域に ARE（抗酸化応答配列）が存在すること、COX-2 については炎症時だけでなく抗炎症時にも発現が増加する報告が存在している（参考文献8）ことから、炎症に伴って酸化ストレスが発生し、抗酸化因子 Nrf2 が発現することが幹細胞化のトリガーではないかと考えた。そこで、脳梗塞モデルマウスの灌流固定を行い梗塞巣を取り出し、梗塞巣と反対側についてペリサイトと幹細胞マーカー、ROS と Nrf2 の発現について比較検討したところ、ペリサイトから ROS が産生し Nrf2 が発現している様子が観察された。また、これら2つのマーカーは nestin についても共発現がみられていた。このことから、梗塞後に産生される ROS によって、ペリサイトから幹細胞化が引き起こされることが判明した。



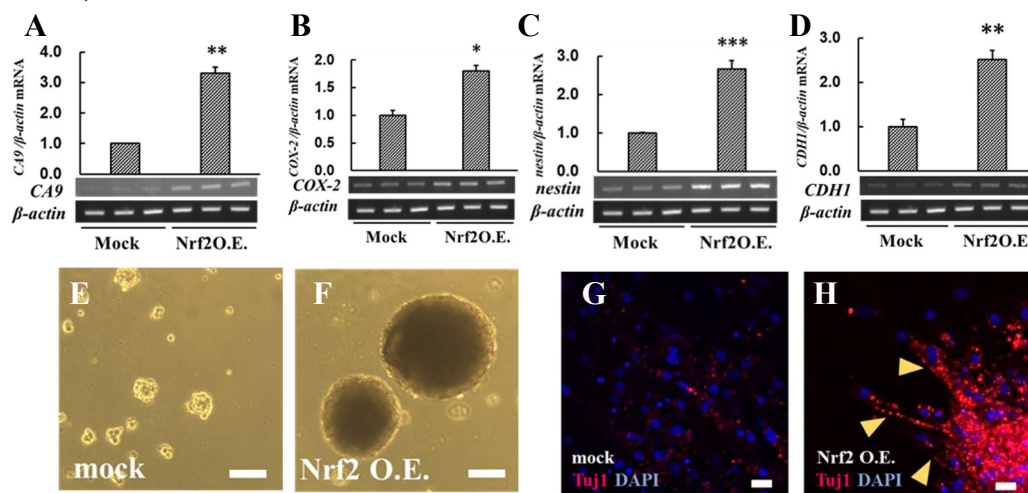
C. nPC 及び iSC におけるミトコンドリアの形態変化の検討

nPC よりも iSC にてミトコンドリアが活性化しており (A, B)、ROS についても上昇していた (C) ことから、ミトコンドリアから発生する ROS による酸化ストレスが関与するのではないかと考えた。そこで、ペリサイトに OGD 負荷を加えたのち、Reoxygenation (再酸素負荷) を加えたところ、核内 Nrf2 の発現が上昇し (D, E)、nestin についても上昇がみられた (F)。さらに、OGD/R ではミトコンドリアの形態が分裂から融合している様子へ変化がみられていた (G, H)。



D. Nrf2 過剰発現によるペリサイトの脱分化検討

正常脳ペリサイトに Nrf2 を過剰発現させたところ、CA9、COX-2 だけでなく、nestin や E-カドヘリン (CDH1) の発現上昇がみられた (A-D)。また、mock 及び Nrf2 過剰発現ペリサイトからスフェロイドを形成させ、7日目培養後のスフェロイド (E, F) を神経誘導培地に移して7日間培養したところ、Nrf2 過剰発現スフェロイドのみ神経系への分化がみられた (G, H)。



1 以上のことから、ペリサイトの幹細胞化現象には梗塞後に産生される活性酸素により酸
2 化ストレスが発生し、抗酸化因子 Nrf2 が発現することがトリガーになっていることが示唆
3 された。

4 4 生活や産業への貢献および波及効果

6 申請者は、マウスだけでなくヒトの梗塞巣内にも幹細胞が誘導されていることをつきと
7 めている(参考文献 9、10)。本研究成果は将来、脳梗塞患者を対象とした新規薬の開発
8 にも直結する可能性を秘めており、幹細胞の分野において高い国際競争力を持つと考えら
9 れる。幹細胞の分野において、iSC以外で内在的に存在する幹細胞の中で骨髄由来間葉系幹
10 細胞(MSCs)や脂肪由来幹細胞(ADSC)などが広く臨床応用に用いられているが、実際には
11 これらの幹細胞を移植しても投与した細胞の多くは肺や脾臓、肝臓などでトラップされ傷
12 害部位には到達せず、ほとんど神経系に分化しないことが判明している。申請者もiSCとMS
13 Cの特性を比較検討した研究にて両者の細胞は起源が全く異なるものであり、iSCはMSCより
14 も電気生理学的にも機能的な神経系に分化することを報告している。

15 虚血によって組織が再生する例は他の虚血性疾患でも報告されている。例えば、心筋梗塞では、
16 マウスの損傷した心臓に低酸素応答系の鍵因子である HIF-1 α を発現させることで傷害部位が
17 再生した報告がある(参考文献 11)ことから、他の組織でも酸素濃度依存因子と再生機構は密
18 接に関与している。今後の課題として、脳梗塞モデルと心筋梗塞モデルの両者にて発現が変動す
19 る遺伝子を突き止め、知見を得ることが挙げられる。

20 【参考文献】

- 22 1. Sakuma R, et al., Comparative characterization of ischemia-induced brain multipotent stem cells with
23 mesenchymal stem cells: Similarities and differences. Stem Cells Dev. 27: 1322-1338, 2018.
- 24 2. Sakuma R, et al., Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells
25 following ischemic stroke. J Neuroinflammation. 13: 57, 2016.
- 26 3. Peishan Hu, et al., Acidosis enhances the self-renewal and mitochondrial respiration of stem cell-like
27 glioma cells through CYP24A1-mediated reduction of vitamin D. Cell Death & Disease, 10:25, 2019.
- 28 4. Filatova A, et al., Acidosis Acts through HSP90 in a PHD/VHL-Independent Manner to Promote HIF
29 Function and Stem Cell Maintenance in Glioma. Cancer Research, 76: 5845-5856, 2016.
- 30 5. Wanet A, et al., Connecting Mitochondria, Metabolism, and Stem Cell Fate. Stem Cells Dev, 24:1957-
31 71, 2015.
- 32 6. Nam SM, et al., Comparison of pharmacological and genetic inhibition of cyclooxygenase-2: effects
33 on adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus. J Vet Sci, 16:245-251, 2015.
- 34 7. H Li, et al., Resveratrol reserved hypoxia-ischemia induced childhood hippocampal dysfunction and
35 neurogenesis via improving mitochondrial dynamics. Neurosci Res, doi: 10.1016/j.neures.2019.11.012,
36 2019.
- 37 8. Tavakolpour S. Interleukin 7 receptor polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: A meta-analysis.
38 Mult Scler Relat Disord 2016;8:66-73.
- 39 9. Beppu M, et al., Isolation and Characterization of Cerebellum-Derived Stem Cells in Poststroke Human
40 Brain. Stem Cells Dev. 28: 528-542, 2019.
- 41 10. Tatebayashi K, et al., Identification of Multipotent Stem Cells in Human Brain Tissue Following Stroke.
42 Stem Cells Dev. 26: 787-797, 2017.
- 43 11. Nakada Y, et al., Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. Nature. 541: 222-227, 2017.