

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K11612

研究課題名（和文）プリン体および尿酸の骨髄幹細胞活性に与える影響

研究課題名（英文）The effect of purine derivatives on the activity of bone marrow stem cells

研究代表者

松村 暢子（Matsumura, Nobuko）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：30317698

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）：尿酸は骨髄幹細胞の増殖や分化を制御する効果があるが、メカニズムは不明である。これまでプリン誘導体の尿酸やカフェインにシステインの細胞内取込み促進作用と、細胞内グルタチオン(GSH)増加作用があることを報告してきた。本研究はプリン誘導体のシステイン取込み促進作用に着目し、プリン誘導体の骨髄幹細胞活性調節効果の解明を試みた。免疫細胞染色の結果から、いくつかのプリン誘導体が細胞内GSHの調節に関わるタンパク質の発現を制御することを明らかにし、そのメカニズムの1つを解明した。これらのプリン誘導体による幹細胞活性調節効果の解明が進めば、プリン誘導体を用いた新たな幹細胞機能促進療法の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プリン誘導体に見いだされた骨髄幹細胞への作用が、移植後の骨髄幹細胞の生存維持および機能促進に応用できれば、脳梗塞や脊髄損傷に対する骨髄幹細胞移植治療の効果を上昇する新しい治療促進薬となると期待される。また、プリン体代謝物がほかの組織に存在する組織幹細胞を活性化すれば、プリン体の適量摂取が神経変性疾患などの高齢化社会が直面する加齢性変性疾患の病態の進行を抑制する疾患修飾療法の開発の糸口になる。

研究成果の概要（英文）：Treatment with uric acid (UA), an end product of purine, regulates stem cell functions such as proliferation and differentiation. However, its mechanism remains unclear. Recently, we have reported that purine derivatives such as UA and caffeine increase intracellular glutathione (GSH) levels by enhancing cysteine uptake, leading to cell protective activity. Then, we tried to clarify whether purine derivatives increase GSH levels also in bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). Our immunocytochemical study showed that some of the purine derivatives regulate the expressions of certain proteins that control the intracellular GSH levels, and one of the mechanisms underlying these protein expressions was determined. Further studies of the physiological role of purine derivatives in BMSCs would provide novel therapeutic approaches to activating stem cell functions.

研究分野：薬理学

キーワード：プリン体 尿酸 グルタチオン 骨髄幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

尿酸は生活習慣病である痛風の原因になる一方で、プリン体の最終代謝物としてヒトの血中に一定量維持されている。疫学調査では、血中尿酸値が低いとアルツハイマー病やパーキンソン病のリスクが上がるということが報告されており、血中尿酸濃度の維持が神経幹細胞を保護し神経新生を促進して脳の機能を維持している可能性がある。再生医療分野では、脳梗塞や脊髄損傷に対する骨髄幹細胞移植が治療効果を発揮している。その神経機能の回復は主に移植した骨髄幹細胞が持つプリン体代謝作用によることが分かってきた。そのメカニズムは骨髄幹細胞の細胞膜の外側に活性を持つプリン体代謝酵素が、細胞障害性のある ATP を分解し、生じるアデノシンが周辺に神経保護効果と過剰な免疫活性を抑制する効果を発揮するというものである。一方で、本来の骨髄幹細胞移植の目的である骨髄幹細胞から神経細胞を再生する効果についての研究は進んでおらず、プリン体代謝活性の骨髄幹細胞自身における生理的意義も不明である。プリン体の最終代謝物である尿酸は、骨髄幹細胞などの組織幹細胞に対して細胞増殖を促進し、骨細胞や神経細胞への分化を促進するなどの報告があるが、そのメカニズムは尿酸の作用として知られる抗酸化作用では説明できず、組織幹細胞に対する作用点を明らかにする必要がある。

申請者等はこれまで、尿酸やカフェインおよびパラキサンチンなどのプリン誘導体に共通する神経保護作用メカニズムとして、システイントランスポーターの excitatory amino acid carrier protein 1 (EAAC1) を介したシステイン取り込みの促進と、グルタチオン (GSH) 産生の増加を報告してきた (文献 1, 2)。GSH はシステイン、グルタミン酸およびグリシンの 3 つのアミノ酸からなるトリペプチドであり、システインの取り込みは細胞内の GSH 産生量を制御する重要な役割を担っている。GSH は細胞内の抗酸化物質として酸化ストレス抵抗性の獲得に働く (文献 3, 4) とともに、細胞の分化増殖の促進に関わることが知られている。これらのことを合わせると骨髄幹細胞の持つ高いプリン体代謝活性の骨髄幹細胞自身における生理的意義には、代謝産物による細胞内 GSH 上昇と GSH 上昇による幹細胞活性調節があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

骨髄幹細胞において尿酸やプリン誘導体がシステイントランスポーター (EAAC1) を活性化し、GSH 産生を促進するかどうかに焦点を当て、尿酸の作用点と骨髄幹細胞の幹細胞機能に与える影響を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨髄幹細胞の初代培養

8 週齢の C57BL/6J マウス的大腿骨および橈骨を摘出し、フラッシング法により骨髄組織を採取した。骨髄組織塊を 21G ニードルに 2 回通してホモジナイズし、70  $\mu$ m ナイロンメッシュで凝集塊を除去した。細胞懸濁液を 250  $\times$  G で 10 分間遠心し、回収した細胞を Mesencult expansion kit (mouse) (STEMCELL Technologies) の骨髄幹細胞培養液に懸濁し、有核細胞が  $3 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度になるよう培養フラスコにまいた。37  $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、低酸素 (5%O<sub>2</sub>) 環境下で 7 日間培養して得られた骨髄幹細胞を  $1.3 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で継代し、2~3 日後に実験に用いた。

骨髄幹細胞の表現型解析は BD FACSCanto™ II フローサイトメーターシステム (BD Biosciences) を用いて、マウス骨髄幹細胞特異的表面抗原の CD29 (  $\alpha$  - integrin) および Sca-1 (Ly-6A/E) と陰性表面抗原の CD45 (hematopoietic stem cell marker) の発現について解析した。

### (3) 骨髄幹細胞の多分化能の解析

#### 脂肪細胞への分化

90%以上の密度に培養した骨髄幹細胞を脂肪細胞分化誘導培地 (STEMCELL Technologies) の中で 5 日間培養し、脂肪細胞を Oil-Red O を用いて染色した。

#### 神経細胞への分化

骨髄幹細胞培養 7 日目の細胞に Notch 細胞内ドメイン (NICD) 発現ベクター<sup>1</sup>を一過性に遺伝子導入して 2 日間培養し、神経細胞の生存に必要な 3 つの栄養因子 (basic FGF, Forskolin, Ciliary neurotropic factor) を添加してさらに 3 日間培養した。(文献 5)

免疫細胞染色法を用いて神経細胞特異的な Tubulin beta (Tuj1)、GABA 作動性神経特異的 Glutamate Decarboxylase 1 (GAD67)、ドパミン作動性神経特異的 Tyrosine hydroxylase (TH)、グルタミン酸作動性神経特異的 type I vesicular glutamate transporter (vGlt1) の発現を検出した。

1, RIKEN BRC より入手した pEFBOSneomNotch1 RAMIC (cat# RDB06771) の NICD 遺伝子を Gateway Dest458 ベクターに入れなおして用いた。

#### (4) 骨髄幹細胞におけるシステイン取り込み活性の測定

EAAC1 によるシステイン取り込み活性は細胞内のシステイン量の増加あるいは培養液中のシステインの減少により評価した。骨髄幹細胞の培養液にプリン誘導体を 0~100 $\mu$ M 添加し 1 時間培養し、培養液および細胞から低分子成分を 0.1M 過塩素酸で抽出した。中和した後システインと GSH を ABD-F (Dojindo) で蛍光標識し、LC-20AD HPLC システム (島津) を用いて逆相カラム (Inertsil ODS-2, GL Sciences) により分離し、励起光 380 nm, 吸収 510 nm の溶出ピークを検出した。

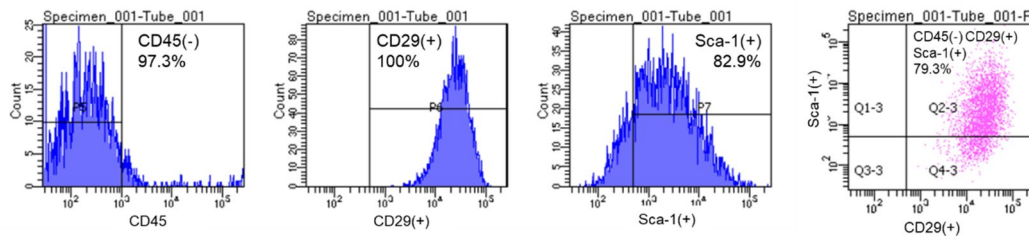
#### (5) 骨髄幹細胞における GSH 調節タンパク質発現の解析

プリン誘導体を 0~100 $\mu$ M 添加後 1 時間培養し、骨髄幹細胞におけるタンパク質発現の変化を免疫細胞染色およびウエスタンブロッティングで解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 培養骨髄幹細胞の表現型および多分化能の解析

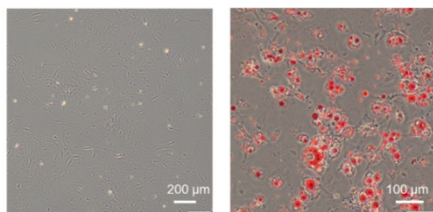
培養 21 日目の骨髄幹細胞の表現型をフローサイトメトリーにより解析した。死細胞や 2 つ以上の細胞が凝集したものを除いた細胞集団の中で、CD45 陰性細胞は 97.3%、CD29 陽性細胞は 100%、Sca-1 陽性細胞は 82.9% であった。CD45 陰性、CD29 陽性、Sca-1 陽性すべての表現型を示す細胞は 79.3% 得られた。(図 1)



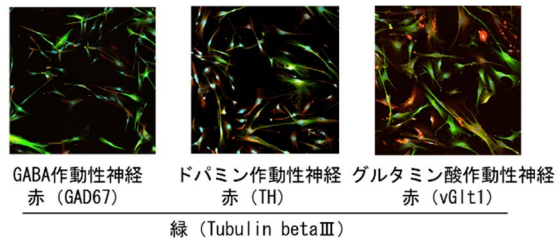
(図 1) フローサイトメトリーによるマウス骨髄幹細胞培養の表現型解析

#### (2) 培養骨髄幹細胞の多分化能の解析

培養 17 日目に脂肪細胞への分化誘導を開始し 5 日後に脂肪滴を Oil-Red O で染色される脂肪滴を持つ脂肪細胞が観察された。(図 2) 培養 7 日目に神経分化誘導し 5 日目に GABA 作動神経、ドパミン作動神経、グルタミン酸作動性神経が観察された。(図 3)



(図 2) マウス骨髄幹細胞と脂肪細胞分化。未分化マウス骨髄幹細胞培養 16 日目 (左) とマウス骨髄幹細胞由来脂肪細胞 (右)



(図 3) マウス骨髄幹細胞の神経細胞への分化

#### (その他の結果)

プリン誘導体による骨髄幹細胞におけるシステイン取り込みへの影響と、骨髄幹細胞における GSH 調節タンパク質発現への影響については論文発表後に公表する予定である。

#### <引用文献>

1. Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, Wang F, Kikuchi-Utsumi K, Nakaki T. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience* 2011; 181: 206-215.
2. Matsumura, N., Kinoshita, C., Bhadhprasit, W., Nakaki, T., Aoyama, K. A purine derivative, paraxanthine, promotes cysteine uptake for glutathione synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences* 151: 37-45: 2023.
3. Matsumura, N., Aoyama K. Glutathione-mediated neuroprotective effect of purine derivatives. *International Journal of Molecular Sciences* 24: 13067: 2023.
4. 松村暢子, 木下千智, 青山晃治 神経細胞におけるグルタチオン産生調節機構 *日本薬理学雑誌* 156巻1号 26-30 2021
5. Nagane, K., Kitada, M., Wakao, S., Dezawa, M., Tabata, Y. Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells using spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng Part A* 15:

1655-1665: 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumura Nobuko, Aoyama Koji	4. 巻 24
2. 論文標題 Glutathione-Mediated Neuroprotective Effect of Purine Derivatives	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 13067 ~ 13067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241713067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 松村 暢子, 木下 千智, 青山 晃治	4. 巻 156
2. 論文標題 神経細胞におけるグルタチオン産生調節	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本薬理学雑誌	6. 最初と最後の頁 26 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.20068	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村暢子、木下千智、角田ワツタナボン、中木敏夫、青山晃治
2. 発表標題 パラキサンチンによるシステイン依存的グルタチオン産生の促進
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 松村暢子、角田ワツタナボン、青山晃治
2. 発表標題 プリン誘導体によるシステインの取り込みおよび細胞内グルタチオン量の調節
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村暢子、角田ワツタナボン、木下千智、青山晃治
2. 発表標題 パラキサンチンのシステイン取り込み促進作用と神経保護作用
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023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	青山 晃治  (Aoyama Koji)  (00420943)	帝京大学・医学部・教授   (32643)	
研究分担者	木下 千智  (Kinoshita Chisato)  (10567085)	帝京大学・医学部・講師   (32643)	

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
---------	---------