

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462155

研究課題名(和文)脳虚血後移植神経幹細胞におけるエピジェネティクスの役割

研究課題名(英文)The role of epigenetics on preconditioning of neural stem cells

研究代表者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20402076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：非致死的な刺激曝露(preconditioning)が、致死刺激に対する耐性現象を神経幹細胞でも誘導することが示唆されているが、耐性獲得メカニズムや神経幹細胞移植療法での効果は十分に解明されていない。本研究は、一過性低酸素による神経幹細胞のpreconditioningが、その後の無酸素無糖条件やヘモグロビン暴露に対する保護効果を示し、また脳卒中モデルでの移植治療効果を改善することを明らかとした。Preconditioningされた神経幹細胞では、ヒストン蛋白質の化学修飾(メチル化)が変化しており、エピジェネティックなメカニズムが耐性獲得に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Preconditioning with non-lethal stimuli is supposed to induce tolerance to the lethal insults in neural stem cells; however, the mechanisms underlying this phenomenon and the effects in stem cell therapy in stroke remain obscure. The results of this study revealed that hypoxic preconditioning to neural stem cells induced the protective effects to oxygen glucose deprivation and direct exposure to hemoglobin. In addition, hypoxic preconditioning in neural stem cells improved efficacy of stem cell therapy in a mice stroke model. Since the methylation of histone proteins was modified in the preconditioned neural stem cells, epigenetic mechanisms might be involved in hypoxic preconditioning.

研究分野：脳神経外科

キーワード：脳虚血性障害 幹細胞移植 エピジェネティクス 耐性現象

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞移植は脳卒中に対する新規治療法として期待されている。しかしながら、移植ホストにおける劣悪な環境因子が移植幹細胞死を誘導し、治療効果を減弱させることが知られている。移植細胞の生存率向上のため、様々な方法が試みられているが、非致命的な刺激曝露 (preconditioning) は最も有力な候補のひとつである。Preconditioning は、致命的な刺激に対する強力な耐性 (耐性現象) を誘導し、この現象はヒトを含む哺乳類の様々な細胞や組織でも観察される。神経幹細胞においても本現象は報告されているが、耐性獲得メカニズムを含め、十分に検討されていない。

一方、ゲノムの持つ遺伝情報の発現は、“エピジェネティクス”と呼ばれるクロマチンの化学的、構造的な修飾によっても制御される。そのメカニズムは主に DNA のメチル化およびヒストン蛋白質の化学修飾から成り立っており、ヒストンの高アセチル化および Lys4 (H3K4) のメチル化は転写を活性化し、ヒストン H3 Lys9 (H3K9) および Lys27 (H3K27) のメチル化は転写を不活化する。最近の研究により、神経幹細胞の自己複製、増殖や分化において、このエピジェネティクスが重要な役割を果たすことが解明されてきている。また、上記虚血耐性現象の獲得にもエピジェネティクスが関与していることが、近年示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では一過性低酸素刺激による神経幹細胞への preconditioning が移植後生存率へ与える影響を、脳虚血および脳出血モデルの両者を用いて検討した。更に、耐性獲得メカニズムにおけるエピジェネティクスの役割を検討した。

3. 研究の方法

(1) 神経幹細胞の分離培養

神経幹細胞は、出生後 1 日の C57BL6 マウスの subventricular zone より神経幹細胞を摘出し、分離した。線維芽細胞成長因子や表皮成長因子などを含有した培養液を用いて 10cm ディッシュ上で培養し、第 5~10 継代の細胞を使用した。

(2) 一過性低酸素刺激 (preconditioning)

培養細胞を密閉チャンバーへ移動し、24 時間の低酸素 (5%) で刺激した。致命的刺激は、preconditioning 6 時間後に負荷した。

(3) 致命的刺激負荷

培養幹細胞への致命的虚血ストレスとして、8 時間の oxygen glucose deprivation (OGD) を負荷した。無糖培養液へ変更後、上記密閉チャンバーへ培養細胞を移動し、窒素置換を行い、OGD を施行した。

また、培養幹細胞への出血ストレス負荷には、あらかじめマウスより採取したヘモグロビンの暴露を行った。

致命的刺激による細胞障害は、LIVE/DEAD viability / cytotoxicity assay などにより評価した。

(4) Western blot 解析

ヒストン蛋白質の化学修飾は、特異抗体を用いた western blot 法で解析した。6、12、24 時間の一過性低酸素刺激を負荷した神経幹細胞の蛋白質サンプルを抽出した。30 mg のサンプルを 10% NuPAGE Bis-Tris gel を用いて電気泳動し、polyvinylidene difluoride 膜へ転写した。膜はブロッキング後、一次抗体および二次抗体と反応させ、結合抗体を chemiluminescence 法で発光した。Fuji LAS 4000 Lumino Image Analyzer (Fuji Film 社) で検出した。

(5) マウス脳虚血・脳出血モデルの作成と神経幹細胞移植

脳卒中モデルの作成には雄性 C57BL/6 マウスを使用した。脳虚血モデルは、同マウスをフローゼン麻酔下に、6-0 ナイロン糸で右中大脳動脈を 45 分間閉塞し、作成した。脳出血モデルは、あらかじめ尾静脈より採取しておいた自己血を線条体へ 20 μ l 注入し、作成した。

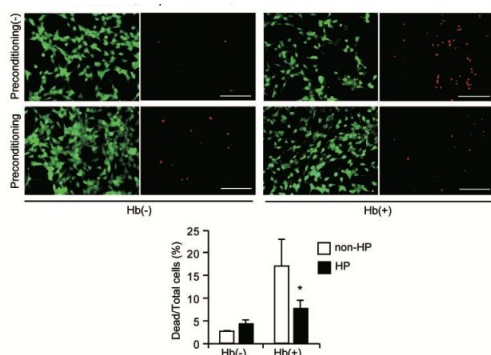
神経幹細胞は、脳虚血モデルでは、虚血 6 時間後に移植した。周囲ペナンプラ領域の大脳皮質 4 箇所を幹細胞混濁溶液 (1×10^5 cells/ μ l) を注入した。一方、脳出血モデルでは、出血 3 日後に幹細胞混濁溶液 (1×10^5 cells/ μ l) を周囲線条体 2 箇所へ注入した。

移植後 35 日に灌流固定を行い、脳を摘出し、薄切切片を作成した。残存神経細胞数や移植後幹細胞の分化を免疫染色で解析した。また、移植後 1、3、7、14、21、28、35 日での運動機能をシリンダーテストで評価した。

4 . 研究成果

(1) Hypoxic preconditioning の保護効果

培養神経幹細胞への 24 時間の hypoxic preconditioning は、その後の 8 時間の OGD に対し、約 35%の保護効果を示した。また、同 preconditioning は、ヘモグロビン暴露による細胞障害を、約 50%減弱した (図 1 参照)。

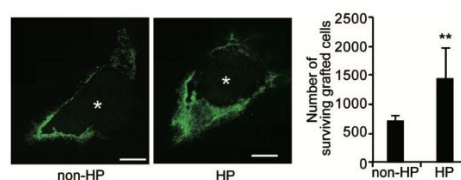


(図 1) Preconditioning による神経幹細胞の Hb 暴露に対する保護効果 (LIVE/DEAD viability / cytotoxicity assay 解析)

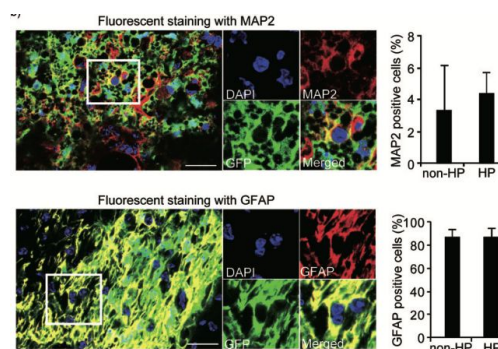
(2) Hypoxic preconditioning による移植後生存率の改善

自己血注入マウス脳出血モデルを使用し、hypoxic preconditioning が移植後神経幹細胞の生存率へ及ぼす効果を検討した。培養神経幹細胞は脳内出血作成 3 日後にマウスへ移植した。Hypoxic preconditioning は脳出血での移植後生存率を有意に上昇させた (約 60%) (図 2 参照)。神経幹細胞の成熟神経細胞 (MAP2 陽性) もしくはアストロサイト (GFAP 陽性) への分化へは、preconditioning は影響を与えなかった (図 3 参照)

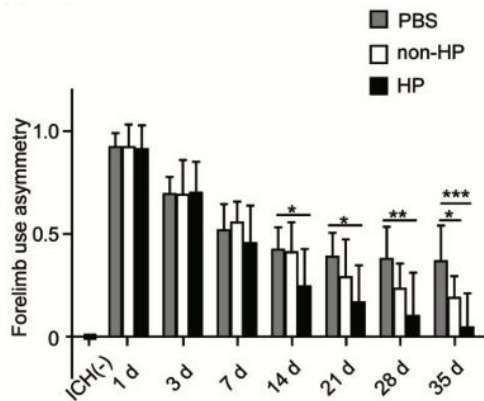
Preconditioning を施行していない神経幹細胞による移植治療と比較し、出血後の神経機能 (シリンダーテスト) も有意に改善させた (図 4 参照)。



(図 2) 移植 35 日後の残存移植神経幹細胞の評価。Preconditioning 群では残存細胞数が有意に上昇した ($p < 0.05$)



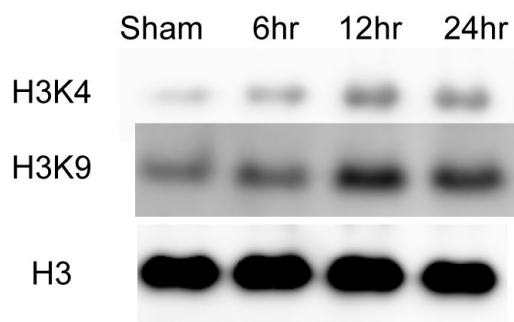
(図 3) 移植 35 日後の移植神経幹細胞の分化。MAP2 : 成熟神経幹細胞マーカー、GFAP : アストロサイトマーカー。



(図4) 移植治療マウスの神経学的評価。Preconditioning 群では、移植 35 日後の時点で、non-preconditioning 群と比較して神経症状が良好だった (***) $p < 0.05$)。

(3) Hypoxic preconditioning のヒストン蛋白質化学修飾へ及ぼす効果

H3 のアセチル化は hypoxic preconditioning による明らかな発現変化を認めなかった。一方、H3K4 のメチル化と H3K9 のメチル化は hypoxic preconditioning 後に発現が亢進する傾向を認めた。H3K27 メチル化に関しては明らかな発現変化を認めなかった (図5)。



(図5) Western blot 解析結果 (神経幹細胞の preconditioning 後ヒストン修飾の変化)

Hypoxic preconditioning された神経幹細胞では、ヒストン蛋白質の化学修飾(メチル化)が変化している傾向を認め、エピジェネティ

ックなメカニズムが耐性獲得に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Takuma Wakai, Purnima Narasimhan, Hiroyuki Sakata, Eric Wang, Hideyuki Yoshioka, Hiroyuki Kinouchi, and Pak H Chan: Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 36: 3134-3145, 2016

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2017 年 4 月 1 日 Brain 2019 (Berlin) Hypoxic preconditioning enhances neural stem cell transplantation therapy after intracerebral hemorrhage in mice. Norito Fukuda, Takuma Wakai, Hideyuki Yoshioka, Pak H. Chan, Hiroyuki Kinouchi

2. 2016 年 8 月 27 日 第 17 回日本分子脳神経外科学会(東京) マウス脳出血モデルに対する hypoxic preconditioning を併用した神経幹細胞移植治療の効果. 若井卓馬、吉岡秀幸、八木貴、館岡達、福田憲人、金丸和也、Chan PH、木内博之

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 秀幸 (YOSHIOKA, Hideyuki)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：20402076

(2)研究分担者

八木 貴 (YAGI, Takashi)
山梨大学・総合研究部・助教
研究者番号：90345702