

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22500687

研究課題名（和文） 高血糖が低酸素環境での幹細胞機能を障害する機序の解明

研究課題名（英文） Effects of high glucose on physiological function in hypoxic stem cells

研究代表者

石塚 俊晶 (ISHIZUKA TOSHIAKI)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号：30399117

研究成果の概要（和文）：マウス間葉系幹細胞への高濃度グルコース刺激が、低酸素環境での転写因子 HIF-1 $\alpha$  や血管新生因子の発現誘導を抑制していることを見出した。次に、この機序として、高濃度グルコース刺激が、酸化ストレスの増大を介してマウス間葉系幹細胞のプロテアゾームの活性を増強し、これが低酸素環境での HIF-1 $\alpha$  分解促進につながった可能性が考えられた。糖尿病患者の幹細胞による血管再生治療において、プロテアゾーム活性の調節が新たな治療改善につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Protein levels of HIF-1 $\alpha$  and angiogenic growth factors were attenuated by glucose in hypoxic mouse mesenchymal stem cells in a dose-dependent manner. We also found that stimulation with a high-glucose concentration significantly increased intracellular superoxide levels and proteasome activity in hypoxic stem cells, which may cause HIF-1 $\alpha$  degradation. Thus, the modulation of proteasome activity may ameliorate the impaired therapeutic efficacy by autologous bone-marrow-derived cells in diabetic patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	1,000,000	0	1,000,000
2012 年度	1,000,000	0	1,000,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

キーワード：高血糖、低酸素、間葉系幹細胞、HIF-1 $\alpha$ 、酸化ストレス、プロテアゾーム

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の研究で、糖尿病患者の虚血部位での血管再生能低下には、低酸素環境での幹細胞機能障害が関与することが示唆されたが、その詳細な分子機構は未解明であった。

(2) 近年、我々は、マウス骨髄由来間葉系幹

細胞を高濃度グルコースで刺激すると、低酸素環境での細胞増殖活性が有意に低下することを見出した。

## 2. 研究の目的

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞を低酸素環境下で培養すると、転写因子 Hypoxia Inducible

Factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )が誘導され、それに伴い VEGF や PDGF 等の血管新生因子の産生が亢進することが報告されている。そこで、高濃度グルコース刺激が、低酸素環境における間葉系幹細胞の HIF-1 $\alpha$  発現誘導を阻害することにより血管新生因子の産生が低下するかを検討した。

(2) ラット培養細胞等の研究により、高濃度グルコース刺激は、プロテインキナーゼ C (PKC)の活性化を促進し酸化ストレスの増大をもたらすことが明らかになっている。また、HIF-1 $\alpha$  は、通常酸素環境ではプロテアゾームにより分解されるが、低酸素環境では HIF-1 $\alpha$  の水酸化が抑制され安定化されることが知られている。そこで、高濃度グルコース刺激による HIF-1 $\alpha$  発現誘導阻害作用への酸化ストレスやプロテアゾームの関与を検討した。

(3) 血管新生因子の産生に関与する細胞内因子としては、HIF-1 $\alpha$  以外にも様々な転写因子や細胞内シグナル伝達分子の関与が示唆されている。そこで、DNA マイクロアレイを用いて、高濃度グルコース刺激により低酸素環境下の間葉系幹細胞で発現が著しく変動する遺伝子を探索した。

### 3. 研究の方法

(1) マウスの骨髄より間葉系幹細胞を単離した後、高濃度グルコースで刺激し 5% O<sub>2</sub> の低酸素環境で培養した。培養終了後、HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現および産生をウェスタン・ブロット法及び ELISA 法で検討した。次に、HIF-1 $\alpha$  の siRNA を、リポフェクション法を用いて導入し特異的に発現低下させた間葉系幹細胞を、高濃度グルコースおよび低酸素環境で培養し、HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現および産生を比較検討した。

(2) マウス骨髄由来間葉系幹細胞に、高濃度グルコースで刺激すると同時に PKC 阻害薬や抗酸化薬あるいはプロテアゾーム活性阻害薬を投与した後、5% O<sub>2</sub> の低酸素環境で培養した。培養終了後、HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現および産生をウェスタン・ブロット法及び ELISA 法で検討した。また、ペプチドが結合した 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) がプロテアゾームによりペプチド解離が起きる性質を用いて、高濃度グルコースおよび低酸素環境での間葉系幹細胞のプロテアゾーム活性を解析した。

(3) マウス骨髄間葉系幹細胞を高濃度グルコースで刺激した後、5% O<sub>2</sub> の低酸素環境で培養した。培養終了後、RNA を抽出し、DNA マイクロアレイで対照群と比較し有意な変化

が得られた遺伝子群を抽出した。

### 4. 研究成果

(1) 5% O<sub>2</sub> の低酸素環境で培養したマウス骨髄由来間葉系幹細胞を 5.6 ~ 30 mM のグルコース濃度で刺激すると、濃度依存的に HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現および産生が低下することが明らかになった。一方、siRNA 導入により特異的に HIF-1 $\alpha$  の発現を低下させた間葉系幹細胞は、5% O<sub>2</sub> の低酸素環境で培養しても HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現および産生は誘導されず、高濃度グルコース刺激による影響もみられなかった。これにより、高濃度グルコース刺激が、低酸素環境における間葉系幹細胞の HIF-1 $\alpha$  発現誘導を阻害することにより VEGF, PDGF の産生を低下させることを明らかにした。

(2) PKC 阻害薬 Go6976 10 nM あるいは抗酸化薬 Tempol 30 mM をマウス骨髄由来間葉系幹細胞に前投与すると、高濃度グルコース (30 mM) 刺激による低酸素環境 (5% O<sub>2</sub>) での HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF 発現誘導抑制作用は消失した。また、ジヒドロエチジウムを用いたフローサイトメトリーによる解析を行い、高濃度グルコース刺激が、低酸素環境でのスーパーオキシド産生量を有意に増加させることを示した。さらに、ウェスタン・ブロット法やスペクトロメーターを用いた解析により、高濃度グルコース刺激 (30 mM) は、低酸素環境 (5% O<sub>2</sub>) での NADPH oxidase gp91phox の発現およびミトコンドリア complex I, complex III の活性を有意に促進させた。以上より、高濃度グルコース刺激が、PKC 活性化および酸化ストレスの増大を介して、低酸素環境での HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF の発現・産生を抑制している可能性が示唆された。

(3) プロテアゾーム活性阻害薬 MG132 5  $\mu$ M を前投与すると、高濃度グルコース刺激による低酸素環境 (5% O<sub>2</sub>) での HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF 発現誘導抑制作用を有意に回復させた。また、間葉系幹細胞にあらかじめ HIF-1 $\alpha$  siRNA を導入し HIF-1 $\alpha$  をノックダウンしておくと、MG132 による HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF 発現回復作用は消失した。さらに、プロテアゾーム活性は、低酸素環境 (5% O<sub>2</sub>) では通常酸素環境に比して低下するものの、グルコース濃度を高めていくと活性が回復することを見出した。以上より、高濃度グルコース刺激によるプロテアゾームの活性増強が、低酸素環境での HIF-1 $\alpha$  の分解促進につながり、VEGF, PDGF の発現・産生が抑制された可能性が考えられる。

(4) 高濃度グルコース刺激により低酸素環境下でのマウス間葉系幹細胞で発現変動が

みられる遺伝子の網羅的解析を行ったが、これまで明らかになった HIF-1 $\alpha$ , VEGF, PDGF, gp91phox, complex I, complex III 以外に著しい発現変動を示す遺伝子の存在を確認できなかった。

#### 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 6 件)

- ① T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe, Effect of nicotine on the proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. *Current Medicinal Chemistry* 査読有 19, 2012, 5164-5169.
- ② T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe,  $\beta$ 1-adrenoceptor stimulation enhances the differentiation of mouse-induced pluripotent stem cells into neural progenitor cells. *Neuroscience Letters* 査読有 525, 2012, 60-65.
- ③ T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Involvement of nicotinic acetylcholine receptor in the proliferation of mouse induced pluripotent stem cells. *Life Sciences* 査読有 90, 2012, 637-648.
- ④ T. Ishizuka, Y. Watanabe.  $\alpha$ 1-adrenoceptor stimulation enhances leukemia inhibitory factor-induced proliferation of mouse-induced pluripotent stem cells. *European Journal of Pharmacology* 査読有 668, 2011, 42-56.
- ⑤ T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Effect of angiotensin II on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into mesodermal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 420, 2012, 148-155.
- ⑥ T. Ishizuka, T. Hinata, Y. Watanabe. Superoxide induced by a high-glucose concentration attenuates production of angiogenic growth factors in hypoxic mouse mesenchymal stem cells. *Journal of Endocrinology* 査読有 208, 2011, 147-159.

[学会発表] (計 25 件)

- ① 石塚 俊晶, 五嶋 葉月, 小澤 亜也子, 渡辺 康裕, 多能性幹細胞におけるG蛋白共役型受容体の役割と再生医療への応用、第86回日本薬理学会年会シンポジウム、2013. 3. 21、福岡
- ② 小澤 亜也子, 石塚 俊晶, 五嶋 葉月, 渡辺 康裕, マウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化に対する 5-HT4 受容体刺激の影響、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 21、福岡
- ③ T. Ishizuka, H. Goshima, A. Ozawa, Y. Watanabe. Involvement of Gq-coupled receptor-dependent signaling pathway on the DNA synthesis of human induced pluripotent stem cells. *American Society for Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2013. 2013. 3. 8. Indianapolis, USA.
- ④ 五嶋 葉月, 石塚 俊晶, 小澤 亜也子, 渡辺 康裕, ヒト人工多能性幹細胞の DNA 合成に対する Gq 蛋白質共役型受容体の関与、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012. 10. 20、東京
- ⑤ 小澤 亜也子, 石塚 俊晶, 五嶋 葉月, 渡辺 康裕, セロトニン受容体刺激がマウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に与える影響、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012. 10. 20、東京
- ⑥ 石塚 俊晶, 五嶋 葉月, 小澤 亜也子, 渡辺 康裕, 多能性幹細胞における膜結合型受容体の役割、第 127 回日本薬理学会関東部会、2012. 10. 20、東京
- ⑦ T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Effects of serotonin on proliferation and differentiation into neural progenitor cells of mouse induced pluripotent stem cells. 第55回日本神経化学会、2012. 9. 30、神戸
- ⑧ 石塚 俊晶, 小澤 亜也子, 五嶋 葉月, 渡辺 康裕, マウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に与える serotonin の影響、第 63 回日本薬理学会北部会、2012. 9. 14、新潟
- ⑨ Y. Watanabe, T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima. Effects of nicotine on proliferation and differentiation into cardiovascular progenitor cells in human induced pluripotent stem cells. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmacology. 2012. 7. 17. Granada, Spain.
- ⑩ 五嶋 葉月, 石塚 俊晶, 小澤 亜也子, 渡辺 康裕, ヒト人工多能性幹細胞の増殖および心血管前駆細胞への分化に対する  $\alpha$ 1 および  $\beta$  アドレナリン受容体刺激の

- 影響、第126回日本薬理学会関東部会、2012.7.14、東京
- ⑪ T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Involvement of adrenergic receptors on proliferation and differentiation of mouse induced pluripotent stem cells. 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2012.6.15 Yokohama, Japan
- ⑫ 石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の神経前駆細胞への分化に対する $\beta$ アドレナリン受容体刺激の影響、第85回日本薬理学会年会、2012.3.16、京都
- ⑬ 小澤 亜也子、石塚 俊晶、五嶋 葉月、渡辺 康裕、アンジオテンシン II タイプ1受容体刺激によるヒト人工多能性幹細胞の増殖促進作用に対するPI3K/AktおよびMEK/ERKの関与、第85回日本薬理学会年会、2012.3.14、京都
- ⑭ 五嶋 葉月、石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の心血管前駆細胞への分化に及ぼすアンジオテンシン II の影響、第85回日本薬理学会年会、2012.3.14、京都
- ⑮ Y. Watanabe, T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Effects of nicotine on proliferation and differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. 4<sup>th</sup> International Conference on Drug Discovery and Therapy 2012.2 Dubai, UAE
- ⑯ T. Ishizuka, A. Ozawa, H. Goshima, Y. Watanabe. Effects of angiotensin II on proliferation and differentiation into neural progenitor cells in mouse induced pluripotent stem cells. 41<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience 2011.11.16 Washington D. C., U. S. A
- ⑰ 五嶋 葉月、小澤 亜也子、石塚 俊晶、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞のDNA合成に関与する細胞内シグナル伝達分子への $\alpha 1$  アドレナリン受容体刺激の影響、第125回日本薬理学会関東部会、2011.11.15、船橋
- ⑱ 石塚 俊晶、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖および神経前駆細胞への分化に対する神経伝達物質受容体の役割、第54回日本神経化学会、2011.9.28、加賀市
- ⑲ 石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖・分化に対するニコチン刺激の影響、第124回日本薬理学会関東部会、2011.6.4、東京
- ⑳ 五嶋 葉月、石塚 俊晶、小澤 亜也子、渡辺 康裕、 $\alpha 1$  アドレナリン受容体刺激によるマウス人工多能性幹細胞の増殖促進へのPI3K/AktおよびMEK/MAPKの関与、第84回日本薬理学会年会、2011.3.22、横浜
- ㉑ 石塚 俊晶、小澤 亜也子、五嶋 葉月、渡辺 康裕、マウス人工多能性幹細胞の増殖・分化に及ぼすアンジオテンシン II の影響、第84回日本薬理学会年会、2011.3.22、横浜
- ㉒ T. Ishizuka, Y. Watanabe. Involvement of neurotransmitters on the proliferation of mouse induced pluripotent stem cells. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of Society for Neuroscience 2010.11.14 San Diego, USA
- ㉓ 小澤 亜也子、石塚 俊晶、渡辺 康裕、高グルコース刺激は、酸化ストレスの増大を介して、低酸素環境でのマウス骨髄間葉系幹細胞のHIF-1 $\alpha$ 発現を低下させる、第123回日本薬理学会関東部会、2010.10.23、栃木
- ㉔ Y. Watanabe, T. Ishizuka, T. Hiramoto. Nicotinic acetylcholine receptor stimulation enhances the DNA synthesis and proliferation of mouse induced pluripotent stem cells. 16<sup>th</sup> World Congress on Basic and Clinical Pharmacology 2010.7.17 Copenhagen, Denmark
- ㉕ 石塚 俊晶、渡辺 康裕、ニコチン刺激は、LIF存在下でマウス人工多能性幹細胞の増殖活性を促進させる、第122回日本薬理学会関東部会、2010.6.5、静岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石塚 俊晶 (ISHIZUKA TOSHIKI)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授  
研究者番号：30399117

### (2) 研究分担者

藤田 真敬 (FUJITA MASANORI)  
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・准教授  
研究者番号：20525927

渡辺 康裕 (WATANABE YASUHIRO)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授  
研究者番号：90127324