

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08130

研究課題名(和文)一酸化窒素とS-ニトロシル化タンパク質のアポトーシスと細胞分化に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of nitric oxide and S-nitrosylated proteins on apoptosis and cell differentiation

研究代表者

滝沢 達也 (Takizawa, Tatsuya)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：00247305

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)：バルプロ酸(VPA)によりラット脂肪組織幹細胞(ASCs)の神経分化が著しく促進され、その過程に誘導型一酸化窒素合成酵素によるNO産生の増加と可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化が関与していることを示した。また、分化した神経様細胞は同時にS-ニトロシル化タンパク質陽性であった。神経分化誘導時にAuranofin(AF)によりS-ニトロシル化タンパク質を蓄積させると、AF濃度依存的にSNO化タンパク質陽性の神経様細胞に分化した。このことから、VPAによるラットASCsの神経分化の著しい促進には、NOシグナルとともにNOによるタンパク質のS-ニトロシル化が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、イヌやラット由来の脂肪組織幹細胞(ASCs)の神経分化がバルプロ酸により著しく促進されることを報告してきたが、メカニズムについては明確ではなかった。本研究成果により、VPAによるラットASCsの神経分化には、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)由来のNOによる可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化シグナルが関与していること、およびNOによるもう一つの経路であるタンパク質のS-ニトロシル化が関与している可能性を明らかにした。この研究成果はASCsからの神経分化経路の一端を明らかにした学術的意義があるとともに、ASCsの臨床応用を図る上での基盤的な意義を有している。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of NO-signaling and S-nitrosylation in the Valproic acid (VPA)-promoted neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells (ASCs). Increased intracellular NO was detected in neuronal cells differentiated from ASCs treated with VPA. RT-PCR analysis of ASCs treated with VPA showed increased mRNA expression of iNOS. iNOS inhibitors or a soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor decreased the incidence of neuronal cells differentiation from ASCs treated with VPA. In addition, Auranofin (AF), a thioredoxin reductase (TrxR) inhibitor, induced not only accumulation of S-nitrosylation in the cells, but also neuronal differentiation from the cells. Furthermore, the amount of S-nitrosylation induced by AF were closely associated to the incidence of neuronal cells. These results suggest that VPA promoted neuronal differentiation of ASCs through the iNOS-NO-sGC signaling pathway and S-nitrosylation.

研究分野：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：脂肪組織幹細胞 神経分化 一酸化窒素 バルプロ酸 S-ニトロシル化タンパク質 オーラノフィン
誘導型一酸化窒素合成酵素 ラット

1. 研究開始当初の背景

脂肪組織幹細胞 (ASCs) は、他の間葉系幹細胞と比較して増殖速度が早く、採取時の侵襲性が低いことから注目を集めている。研究代表者は、これまでイヌ及びラットの ASCs をヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を有するパルプロ酸(VPA)で処置すると、その後の神経分化を著しく促進することを報告してきた (Kurihara *et al.*, 2014; Okubo *et al.*, 2016)。しかしながら、VPA による神経分化の促進機序には不明な点が残っている。近年、ラット胎子終脳由来の神経幹細胞 (NSC) の神経分化に一酸化窒素(NO)が関与していることが報告された (Lameu *et al.*, 2012)。これらのことから、VPA によるラット ASCs の神経分化の著しい促進にも NO が関与している可能性が考えられる。NO の作用機構として可溶性グアニル酸シクラーゼ(sGC)の活性化による細胞内の cGMP 上昇を介する経路と、NO によるタンパク質システイン残基のチオール部に対する化学修飾 (S-ニトロシル化) を介した経路が知られている。

2. 研究の目的

本研究では、VPA が、ラット ASCs の神経分化を著しく促進する機序に一酸化窒素(NO)が関与しているかどうかを検討した。さらに、検討した結果、関与していることが明らかとなったことから、その NO の作用機構として知られている 2 つの経路 (1) 細胞内の sGC 活性化シグナル、(2)タンパク質の S-ニトロシル化などの NO の作用機序について検討した。なお、当初の研究計画では、妊娠ラットの子宮内膜のアポトーシスに及ぼす NO と NO による S-ニトロシル化タンパク質の関与についても研究を進める予定であったが、予算的な制約から上記の項目に焦点を絞って研究を進めた。

3. 研究の方法

ラット (Crj:Wistar, オス) の鼠蹊部の皮下組織から脂肪組織を採取し、既報に従い ASCs を分離した (Okubo *et al.*, 2016)。分離したラット ASCs を用いて以下の実験を行った。

(1) VPA 処置後の神経分化誘導後の NO 産生の検出と NO 合成酵素 iNOS、eNOS、nNOS の mRNA 発現の検討

VPA 処置とその後の神経分化誘導後、免疫蛍光染色を行い、神経細胞マーカーである 83 チューブリン陽性細胞を指標として神経分化を検討した。細胞内の NO 産生は、NO の分子プローブ DAF を用いて観察した。また、神経分化誘導後の細胞から総 RNA を抽出し、RT-PCR を用いて NO 合成酵素 iNOS、eNOS、nNOS の mRNA 発現を検討し、同時に神経細胞マーカー Tubb3、NeFM、Map2 等の検出をおこなった。

(2) iNOS 阻害剤および sGC 阻害剤による NO 産生抑制後の神経分化の検討

神経分化誘導時に、iNOS 阻害剤 (1400W, DXA; Dexamethasone) を併用した後、(1)と同様に神経分化を検討した。また、sGC 阻害剤 (ODQ) 処理後の神経分化と神経細胞マーカー mRNA の発現を評価した。

(3) NO 供与体 (NOC18) および cGMP 類似体(8-bromo-cGMP)による神経分化の検討

VPA 処理により、iNOS 誘導を介した NO 産生が認められたことから、NO 供与体とし

て NOC18 を用いた神経分化を検討した。また、同様に cGMP 類似体(8-bromo-cGMP) による神経分化も合わせて検討した。

(4) Real-time RT-PCR およびクロマチン免疫沈降法による VPA の iNOS 誘導機構の解析

VPA により iNOS が誘導される機構を解析するために、Real-time RT-PCR を用いて濃度依存的な *iNOS*mRNA の発現を検討するとともに、クロマチン免疫沈降法を用いてヒストン H3K9 のアセチル化を検討した。

(5) VPA 処理と神経分化誘導後の分化細胞における S-ニトロシル化タンパク質の検出

VPA 処理とその後の神経分化誘導後の細胞における S-ニトロシル化タンパク質をビオチンスイッチ法により検出し、評価した。

(6) チオレドキシシン還元酵素 (TrxR) 阻害剤 Auranofin による S-ニトロシル化タンパク質の蓄積と神経分化の検討

TrxR を阻害すると S-ニトロシル化タンパク質が蓄積することが報告されていること (Du *et al.*, 2012) から、TrxR 阻害剤 Auranofin を用いて S-ニトロシル化タンパク質を蓄積させた時の神経分化を検討した。

4. 研究成果

(1) VPA 処置後の神経分化誘導後の NO 産生の検出と NO 合成酵素 iNOS、eNOS、nNOS の mRNA 発現の検討

既報により採取したラット ASCs を VPA により 3 日間事前処理し、その後神経分化誘導すると、8 割超の細胞が β3 チューブリン陽性の神経様細胞に分化した。同時に、細胞内の NO 産生を NO の分子プローブ(DAF)で検出すると、分化した神経様細胞はすべて NO を産生していた。さらに、神経分化誘導後の細胞から総 RNA を抽出し RT-PCR を用いて検討すると、*eNOS* と *nNOS*mRNA の発現は観察されなかった一方で、*iNOS*mRNA 発現は、VPA 処理により増加していたことから、産生された NO は iNOS 由来と考えられた。また、β3 チューブリン陽性の神経様細胞は同時に iNOS 陽性であった。さらに、分化した神経様細胞は成熟神経細胞マーカーの NeFM と Map2 を発現していた。

(2) iNOS 阻害剤および sGC 阻害剤による NO 産生抑制後の神経分化の検討

(1)の実験で、VPA 処理後の神経分化誘導により *eNOS* と *nNOS*mRNA の発現は認められず *iNOS*mRNA の発現増加のみが観察されたことから、iNOS 阻害剤 (1400W, DXA; Dexamethason) を併用した後、(1)と同様に神経分化を検討した。その結果 1400W と DXA 処理により、それぞれの神経分化は有意に抑制された。また、sGC 阻害剤 (ODQ) 処理後の神経分化も同様に有意に抑制されていた。さらに、1400W、DXA、ODQ 処理後の細胞では、*Tubb3*, *NeFM*, *Map2*mRNA 発現も抑制されていた。これらの結果から、VPA 処理後の神経分化誘導により産生される NO は、sGC の活性化を介して神経分化に関与していることが示唆された。

(3) NO 供与体 (NOC18) および cGMP 類似体(8-bromo-cGMP)による神経分化の検討

VPA 処理により、iNOS 誘導を介した NO 産生が認められたことから、NO 供与体として NOC18 を用いて神経分化を検討した。また、同様に sGC 活性化により細胞内で産生される cGMP について、その類似体(8-bromo-cGMP) による神経分化への影響も合わせて検討した。その結果、NOC18 あるいは 8-bromo-cGMP 処理は、ASCs の神経分化を有意に増加させたが、その程度は、VPA 処理よりも軽度であった。

(4) Real-time RT-PCR およびクロマチン免疫沈降法による VPA の iNOS 誘導機構の解析

Real-time RT-PCR を用いて VPA の濃度依存的な *iNOS*mRNA の発現を検討すると、VPA 濃度依存的に *iNOS*mRNA の発現が認められた。さらに、クロマチン免疫沈降法を用いてヒストン H3K9 のアセチル化を検討すると、iNOS 遺伝子領域のヒストン H3K9 のアセチル化が起きていたことから、VPA によるエピジェネティックな制御を介して iNOS が誘導されていることが明らかになった。

(5) VPA 処理後の神経分化誘導による分化細胞における S-ニトロシル化タンパク質の検出

VPA 処理後に神経分化誘導した細胞において、ビオチンスイッチ法を用いて S-ニトロシル化タンパク質を検出すると、神経細胞様に分化した細胞の大半が S-ニトロシル化タンパク質陽性であった。これらの結果から、VPA 処理後の神経分化において、産生される NO により S-ニトロシル化タンパク質が蓄積し、この蓄積が神経分化に関与している可能性が示唆された。

(6) チオレドキシン還元酵素 (TrxR) 阻害剤 Auranofin による S-ニトロシル化タンパク質の蓄積と神経分化の検討

TrxR を阻害すると S-ニトロシル化タンパク質が蓄積することが報告されている (Du *et al.*, 2012) ことから、TrxR 阻害剤 Auranofin を用いて、S-ニトロシル化タンパク質を蓄積させた時の神経分化を検討した。Auranofin 濃度依存的に S-ニトロシル化タンパク質陽性細胞が増加し、また、S-ニトロシル化タンパク質陽性細胞は同時に神経細胞マーカー β 3 チューブリンに陽性であり、Auranofin 濃度依存的に神経分化が促進されていた。さらに、RT-PCR により解析すると、Auranofin 濃度依存的な神経細胞マーカー *Tubb3*, *NeFM*, *Map2* mRNA 発現の増加が観察された。これらの結果は、VPA により産生が増加する NO により S-ニトロシル化タンパク質が増加し、これが ASCs からの神経分化に促進的に関与している可能性を示唆している。

本研究は麻布大学動物実験委員会による承認を受けて実施した。

<引用文献>

1. Kurihara Y, Suzuki T, Sakaue M, Murayama O, Miyazaki Y, Onuki A, Aoki T, Saito M, Fujii Y, Hisasune M, Tanaka K and Takizawa T. Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, decreases proliferation of and induces specific neurogenic differentiation of canine adipose tissue-derived stem cells. *J. Vet. Med. Sci.* 2014 Jan;76(1):15-23.

2. Okubo T, Hayashi D, Yaguchi T, Fujita Y, Sakaue M, Suzuki T, Tsukamoto A, Murayama O, Lynch J, Miyazaki Y, Tanaka K and Takizawa T. Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Exp. Anim.* 65 (2016) 45–51.
3. Lameu C, Trujillo CA, Schwindt TT, Negraes PD, Pillat MM, Morais KLP, Lebrun I, Ulrich H. Interactions between the NO-citrulline cycle and BDNF in differentiation of neural stem cells. *J. Biol. Chem.* 2012 Aug 24; 287(35): 29690-701.
4. Du Y, Huihui Zhang H, Lu J, and Holmgren A. Glutathione and Glutaredoxin Act as a Backup of Human Thioredoxin Reductase 1 to Reduce Thioredoxin 1 Preventing Cell Death by Aurothioglucose. *J. Biol. Chem.* 2012 Nov 2; 287(45): 38210-9.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Takumi Okubo, Shinri Fujimoto, Daiki Hayashi, Takehito Suzuki, Motoharu Sakaue, Yoko Miyazaki, Kazuaki Tanaka, Makoto Usami and Tatsuya Takizawa	4. 巻 93
2. 論文標題 Valproic acid promotes mature neuronal differentiation of adipose tissue-derived stem cells through iNOS-NO-sGC signaling pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 1,5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.niox.2019.08.008	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川健太、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也
2. 発表標題 バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の神経分化におけるS-ニトロシル化の影響
3. 学会等名 第161回 日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川健太、大久保巧、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也
2. 発表標題 バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の神経分化の促進とS-ニトロシル化の関与
3. 学会等名 第90回 日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 並木湧佑、藤本真理、大久保巧、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也
2. 発表標題 バルプロ酸によるラット脂肪組織幹細胞の神経分化の促進と硫化水素の関与
3. 学会等名 第90回 日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤本真理、並木湧佑、宮崎陽子、田中和明、滝沢達也
2. 発表標題 硫化水素はバルプロ酸により誘導されるラット脂肪組織幹細胞の神経分化に関与する
3. 学会等名 第92回 日本生化学会
4. 発表年 2019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	田中 和明 (Tanaka Kazuaki) (50345873)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	
研究協力者	鈴木 武人 (Suzuki Takehito) (90532052)	麻布大学・獣医学部・准教授 (32701)	