

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15938

研究課題名（和文）脳梗塞巣に自己再生する幹細胞（iSCs）の性質と発生機序の解明研究

研究課題名（英文）Brain pericytes acquire stemness via the Nrf2-dependent antioxidant system.

研究代表者

佐久間 理香（Sakuma, Rika）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：90780180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：虚血によるペリサイトの幹細胞化は抗酸化因子Nrf2が発現することが鍵であることが明らかとなった。まず、梗塞脳に免疫蛍光染色を施したところ、虚血領域のペリサイトにて活性酸素種やNrf2の増加がみられた。そこで、正常マウスの大脳皮質より単離したペリサイトと、虚血脳から単離した多能性幹細胞（iSC）においてNrf2の発現を比較したところ、iSCの核内にてNrf2が高発現していた。さらに、正常脳ペリサイトにNrf2を過剰発現させ、浮遊培養にて培養するとスフェロイドの形成が促進され、Tuj1陽性神経細胞への分化がみられた。これらの成果については原著論文として発表した（Stem Cells, 2022）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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めている。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れる。

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、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を発現させることで傷害部位が再生した報告があることから、他の組織でも酸素濃度依存因子と再生機構は密接に関連している。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る遺伝子を突き止め、知見を得ることが挙げられる。

研究成果の概要（英文）：We herein isolated nPCs from the cortex of C.B-17 mice, and compared the traits of iPCs and nPCs. The results obtained showed that nPCs and iPCs shared common pericytic markers. Furthermore, intercellular levels of reactive oxygen species and the nuclear accumulation of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2), a key player in antioxidant defenses, were higher in iPCs than in nPCs. OGD/Reoxygenation and a treatment with tBHQ, a Nrf2 inducer, increased nestin levels in nPCs. Moreover, epithelial marker levels, including nestin, Sox2, and CDH1 (E-cadherin) mRNAs, were elevated in Nrf2-overexpressing PCs, which formed neurosphere-like cell clusters that differentiated into Tuj1-positive neurons.

The present results demonstrate that oxidative stress and Nrf2 are required for the generation of stem cells after stroke, and will contribute to the development of novel therapeutic strategies for ischemic stroke.

研究分野：分子再生医学

キーワード：ペリサイト Nrf2 幹細胞 酸化ストレス 低酸素無糖負荷-再酸素化 抗酸化因子 活性酸素 脳梗塞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を用いた再生医療は、難治性疾患に対する画期的治療法として強く求められている。幹細胞を利用した移植療法としては、神経幹細胞や間葉系幹細胞が使用されているが、移植しても傷害部位に生着せず、治療効果が不十分であることが問題点として挙げられている。また、近年注目されている多能性幹細胞として、iPS細胞、ES細胞が実用化に向けて開発が進められているが、遺伝子導入による癌化リスク、拒絶反応が問題になっている。

そこで、内在性に存在するとされる幹細胞を利用した治療法が注目を浴びている。申請者は、これまでに C. B-17 系統マウス脳梗塞モデルを使用した研究において、梗塞領域から特異的に多能性幹細胞 (iSCs : ischemia-induced multipotent stem cells) が産生されることを報告している。近年、脳梗塞患者に骨髄単核球細胞移植が奏功を成しているが、その要因の一つとして、梗塞周囲にて内皮細胞と神経幹細胞が増殖していたことから、造血幹細胞を移植することで血管内皮細胞を足場として幹細胞が生着し、神経再生を促すと考えられていた。しかしながら、梗塞巣に存在するとされる幹細胞はどこから産生されているのかは不明であった。そこで、梗塞周囲や梗塞巣から組織を採取し培養したところ、梗塞巣からのみ細胞凝集塊 (スフェロイド) の形成が見られ、その後の研究で、梗塞巣から産生される神経幹細胞の起源は血管周皮細胞 (ペリサイト) であることが発見された。脳ペリサイトは普段は血流量の調節や脳の恒常性を維持する役割を担っているが、発生学的には神経堤由来であり、神経堤から多能性幹細胞に変換されることから、iSCs は虚血応答によりペリサイトがリプログラミングされ幹細胞化した産物であると考えられる。iSCs は、山中 4 因子のうち Oct3/4 を発現しておらず、腫瘍化の恐れがない (参考文献 1)。また、iSCs は内在的に産生される幹細胞であることから拒絶反応が起こる確率が極めて低い。iSCs はこれまでに神経系、中胚葉系に分化することが判明しており (参考文献 2)、ヒトの梗塞巣内でも存在していることをつきとめている (参考文献 3, 4)。これらのことから、ペリサイトのリプログラミングに関与する虚血負荷の分子レベルでのメカニズムを解明することは、iSCs を含め自然発生的に形成される幹細胞の研究基盤を築くことに繋がると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、正常脳ペリサイトを iSCs 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る。申請者は正常ペリサイト株のリプログラミングには低酸素無糖条件 (OGD; Oxygen-Glucose Deprivation) が関与していることを突き止めており (参考文献 2)、永久閉塞モデルの梗塞巣では神経再生が起こるはずである。しかしながら、実際の生体内 (in vivo) では、梗塞巣では神経幹細胞の産生は起こるものの神経系の分化には至っていない。一方で、一過性脳虚血モデルでは新生神経マーカーである DCX 陽性細胞への分化が見られている (参考文献 5)。そこで永久閉塞モデルと一過性脳虚血モデルの相違点を比較したところ、前者では血流を止めているので低酸素状態に陥ったままであるが、後者では一旦血流を止めたのち血流が再開しているため、一旦低酸素状態に陥ったのち酸素濃度の回復が見られることになる。

実際に、永久閉塞モデルの脳皮質において様々なタンパク質の発現を経時的に検討した実験でも次のような結果を得ている。脳皮質内に産生される nestin 陽性 iSCs は脳梗塞後 3 日目を境に血管から乖離し、慢性期に進むにつれてその数の減少が見られている。また、PDGFR β 陽性細胞が梗塞巣内に網状に張り巡らされており、血管新生が進んでいるデータを得ている。さらに慢性期に進むと、再び脳梗塞巣内に nestin 陽性 iSCs が増加し、Tuj1 陽性の神経様細胞が発現するという結果を得ている。これらの結果は、血管が新生することで酸素が再び供給され、神経系への分化が進んだと考えたと辻褄が合う。そこで本研究では、梗塞後に産生される iSCs の生存、分化細胞と梗塞巣内の酸素濃度の変化に着目し、解析した。

3. 研究の方法

I. 梗塞巣における抗酸化因子の検出

申請者は上記に記載したように、梗塞巣内の血管系、神経系のマーカー検討を中心に行っているが、梗塞巣内における組織上の経時的な酸素濃度の変化に関しては未検討である。そこで、活性酸素、抗酸化因子に関わるマーカーを梗塞脳にて染色し、組織内でのペリサイトや幹細胞の局在と相関があるかどうかを検討した。

II. iSCs 及びペリサイト幹細胞化へ受ける影響の検討

C. B-17 マウスにおける正常脳ペリサイトの単離法を確立し、iSCs と幹細胞マーカー、抗酸化因子に関わる発現遺伝子、活性酸素量を比較した。

III. ペリサイトが酸化ストレスから受ける影響

先行研究では、正常脳ペリサイトに低酸素無糖負荷を加えたところ、Sox2 については発現

が増加したものの、nestinについては発現がみられなかった(参考文献2)。そこで、正常脳ペリサイト到低酸素無糖負荷に続けて再酸素負荷(Reoxygenation)を加えた。そして、ペリサイト、OGD負荷ペリサイト、OGD負荷-再酸素化ペリサイトについて、それぞれ幹細胞化マーカー及び抗酸化因子に関わる遺伝子を比較解析した。

IV. ペリサイトの多能性獲得の分子機構の解明

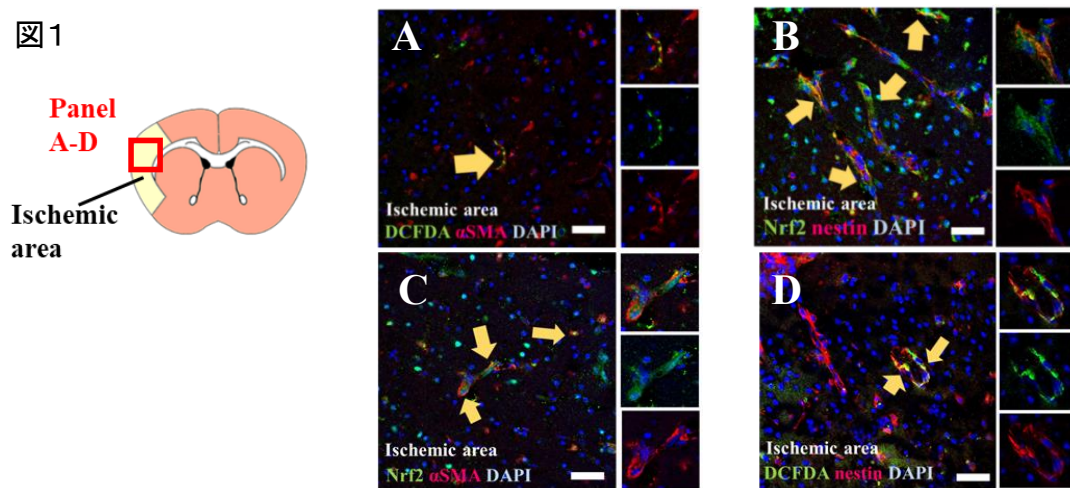
クロロゲン酸やレスベラトロール類の添加により抗酸化因子を増加させることで神経再生を促す報告がされている(参考文献6)ことから、ペリサイトに抗酸化因子の発現を増加させることで、ペリサイトの脱分化に影響を与えると考えた。そこで、抗酸化因子がペリサイトの幹細胞化、分化能の増加に要する目的遺伝子であるのかどうかを検討するため、effecten(QIAGEN)を用いて過剰発現させた。

4. 研究成果

A. 梗塞巣及び反対側におけるiSCsマーカーとNrf2発現検討

脳梗塞モデルマウスにおいて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、活性酸素(ROS)と抗酸化作用に関わるNrf2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2)の発現について比較検討した。その結果、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(図1A,B)。また、これら2つのマーカーはnestinと共発現がみられた(図1C,D)。これらの結果から、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。

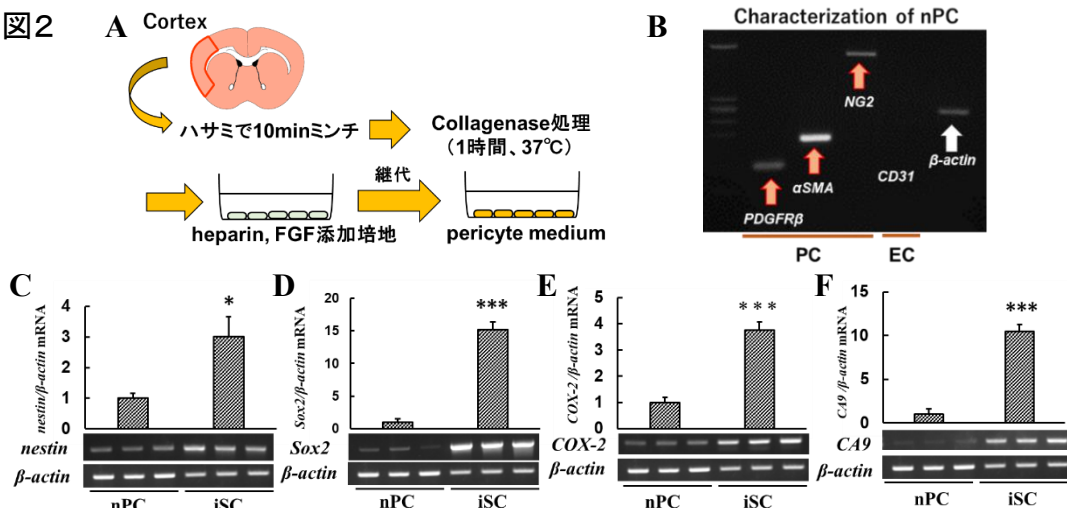
図1

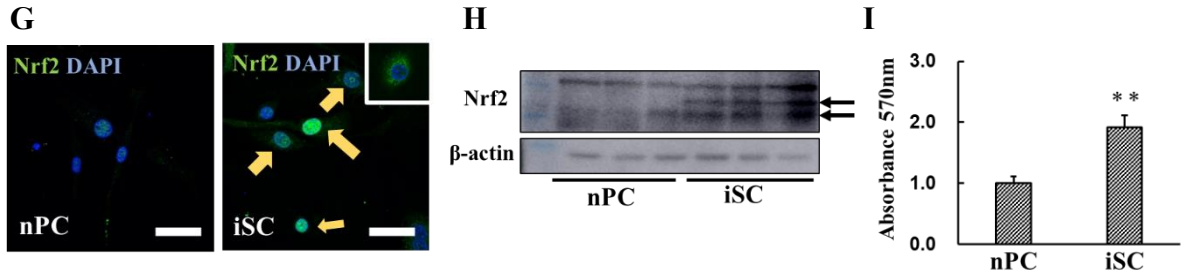


B. iSCsにおいてNrf2とNrf2関連遺伝子が増加していた

図2Aの方法により正常大脳皮質よりペリサイトを単離した。そして、このペリサイトには血管内皮細胞の混入がないことを確認した(図2B)。そして、正常脳ペリサイトとiSCsにおいてRT-PCRにて発現遺伝子を解析したところ、幹細胞マーカーであるnestin, Sox2が増加しており(図2C,D)、CA9, COX-2が高発現していることが判明した(図2E,F)。さらに、免疫組織化学染色とwestern blottingにて、iSCsにおいてNrf2が発現していることが判明した(図2G,H)。CA9の上流域にはARE(抗酸化応答配列)が存在すること、COX-2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7)。加えて、活性酸素量についても正常脳ペリサイトよりもiSCsにて高検出されていた(図2I)ことから、活性酸素の放出により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。

図2

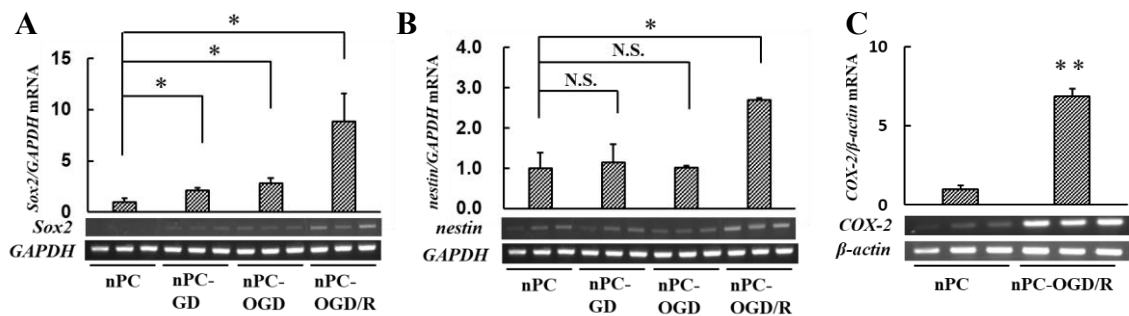




C. ペリサイトの幹細胞化には酸化ストレスが関与していた

正常脳ペリサイトに OGD 負荷に続けて再酸素化 (Reoxygenation) を行い、酸化ストレスを与えたところ、OGD/Reoxy 条件下において幹細胞マーカー (図 3A, B)、及び COX-2 (図 3C) の増加がみられた。

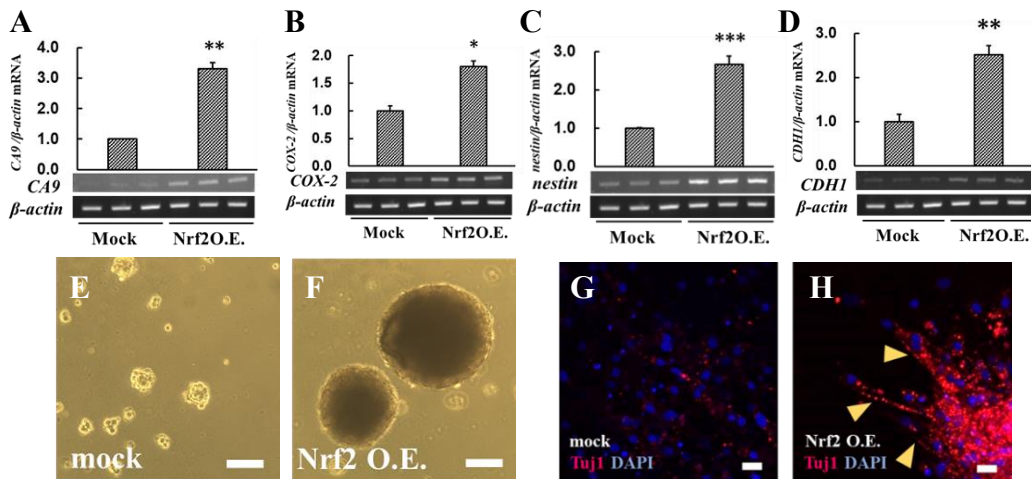
図3



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 (図 4A-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 (図 4E, 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細胞への分化がみられた (図 4G, H)。

図4



以上の結果から、虚血によるペリサイトの幹細胞化には、虚血に伴いペリサイトから活性酸素が産生され酸化ストレスが発生し、抗酸化作用に寄与する因子 Nrf2 が増加することが鍵であることが判明した (Stem cells, 2022)。

次の目標は、ペリサイト幹細胞化に関わる Nrf2 活性化経路を特定し、将来的に新規治療法を開発するための基礎的なデータを得ることである。最終年度 (令和 4 年度) は兵庫医科大学へ異動したことから、実験の立ち上げと再現性の確認を行いながらデータの収集に専念した。脳梗塞モデルマウスを作製し、梗塞内に幹細胞マーカーが高発現する 3 日目までに ROS、リン酸化 Nrf2 の発現変化を経時的に観察したところ、梗塞後 12 時間から ROS が産生され、1 日目から脳軟膜にリン酸化 Nrf2 が強発現することが判明した。また、ペリサイトと iSCs の比較において、iSCs の核内にリン酸化 Nrf2 が強く発現していた。これらの結果から、Nrf2 活性化経路にはリン酸化が関わっていることが考えられる。今後、Nrf2 リン酸化経路に絞りペリサイト幹細胞化分子メカニズムの解明を進める予定である。

【参考文献】

1. Sakuma R, et al., Comparative characterization of ischemia-induced brain multipotent stem cells with mesenchymal stem cells: Similarities and differences. *Stem Cells Dev.* 27: 1322-1338, 2018.
2. Sakuma R, et al., Brain pericytes serve as microglia-generating multipotent vascular stem cells following ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 13: 57, 2016.
3. Beppu M, et al., Isolation and Characterization of Cerebellum-Derived Stem Cells in Poststroke Human Brain. *Stem Cells Dev.* 28: 528-542, 2019.
4. Tatebayashi K, et al., Identification of Multipotent Stem Cells in Human Brain Tissue Following Stroke. *Stem Cells Dev.* 26: 787-797, 2017.
5. Nakata M, et al., Induction of Perivascular Neural Stem Cells and Possible Contribution to Neurogenesis Following Transient Brain Ischemia/Reperfusion Injury. *Transl Stroke Res.* 8:131-143, 2017.
6. Wei M, et al., Natural Polyphenol Chlorogenic Acid Protects Against Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity by Activating ERK/Nrf2 Antioxidative Pathway. *Toxicol Sci.* 162: 99-112, 2018.
7. Luo C, et al., The role of COX-2 and Nrf2/ARE in anti-inflammation and antioxidative stress: Aging and anti-aging. *Med Hypotheses.* 77:174-178, 2011.

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 1件）

1. 著者名 Sakuma Rika, Kobayashi Miku, Kobashi Rui, Onishi Mako, Maeda Mitsuyo, Kataoka Yosky, Imaoka Susumu	4. 巻 40
2. 論文標題 Brain Pericytes Acquire Stemness via the Nrf2-Dependent Antioxidant System	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 641 ~ 654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/stmcls/sxac024	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐久間理香、湊雄介、前田誠司、八木秀司
2. 発表標題 虚血による脳ペリサイトの幹細胞化現象には抗酸化因子Nrf2が関与する
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐久間理香、小林未来、小橋瑞、大西真子、前田光代、片岡洋祐、今岡進
2. 発表標題 Nrf2-expressing pericytes acquire the traits of stemness.
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林未来、佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 The study in iPC traits and the neuronal differentiation abilities of iPC and normal brain pericyte
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 引頭美衣、佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 The study in iSC characteristics under hypoxia and oxidative stress
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐久間理香、今岡進
2. 発表標題 Comparative study of expressions of the oxygen-dependent and insulin-like growth factors between normal brain pericytes and the multipotent stem cells derived from brain pericytes following ischemia
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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