

平成 28 年 6 月 12 日現在

機関番号：35504

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650039

研究課題名(和文) 組織性カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of growth-promoting mechanism of neural stem cells with tissue kallikrein.

研究代表者

岩館 寛大 (Hiromoto, Iwadate)

山口東京理科大学・工学部・講師

研究者番号：70279107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究は組織性カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進作用機構メカニズムの解明のために、カリクレインの基質の同定と作用メカニズムの解明を目指した。その結果、カリクレインが神経幹細胞のNF- $\kappa$ B経路を抑制することが確認された。そこで、NF- $\kappa$ B経路を活性化する経路を調べた結果、カリクレインはIL-1 type I 受容体を切断することが示され、このタンパク質がカリクレインの基質であることが明らかとなった。NF- $\kappa$ B経路の活性化は神経幹細胞の分化を促進する報告があることから、カリクレインは神経幹細胞の分化を抑えることにより、みかけの細胞増殖速度を増加させていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the growth-promoting mechanism of action mechanism of neural stem cells with tissue kallikrein. In this study, We found that kallikrein inhibited NF-kappa B pathway of neural stem cells. As a result of examining the pathways that activate NF-kappa B pathway, we found that kallikrein cleaved the IL-1 type I receptor. Activation of the NF- $\kappa$ B pathway has been reported to promote the differentiation of neural stem cells. These results suggests that suppressing the differentiation of neural stem cells by kallikrein increases the apparent cell growth rate in neural stem cells.

研究分野：生化学

キーワード：組織性カリクレイン 神経幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

組織性カリクレイン (KLK1, 以下カリクレインと記述する) はカリクレイン遺伝子ファミリーのメンバーの一つである。カリクレイン遺伝子ファミリーはラットで 10 種、ヒトで 15 種のメンバーが知られている (psudogene は含まない)。これらの生理学的意義は未だ明確ではないが、ヒトでは PSA を含むいくつかのメンバーが腫瘍マーカータンパク質として注目されている。また、ヒトの 6 番目のメンバーである hKLK6 は Alzheimer's disease で発現が低下し、アミロイド代謝に関与する可能性があること、hKLK8(neuropsin)は脳で強く発現し、海馬において long-term potentiation (LTP) に関与することが知られており、ヒトではカリクレイン遺伝子ファミリーがいくつかの神経機能や病態に関わっていると思われる。

一方、カリクレインはキニンノーゲンに作用してキニンを遊離する酵素として知られており、カリクレインにより遊離されたキニンはキニン B<sub>2</sub> 受容体を介して血圧降下、発痛など様々な生物活性を持つことがわかっていることから、一般にカリクレインによる生物活性は遊離されたキニンによるものであると考えられている。我々は *in vitro* で組織性カリクレインがキニンノーゲン以外のタンパク質 (ポリペプチド) を切断することを報告し (Iwadate, H. et al., Life Sci., 73, 3149(2003)), ラットの胎仔期から生後 3 日目くらいまで神経細胞の核内に発現し、5 日目以降は細胞質に分布し、そして、成体ラットでは神経細胞体および突起周辺部にカリクレインの分布が変化する興味深い現象を見出した (Iwadate, H. et al., Brain Res., 863, 87(2000))。さらにカリクレインの mRNA 発現は胎仔期から新生仔期に一過的に非常に高い発現量を示す (Iwadate, H. et al., Can. J. Physiol. Pharmacol., 80, 245(2002)) ことから、カリクレインが中枢神経系構築過程で重要な機能を担っていることが示唆された。これまでの中枢神経系におけるカリクレインの作用として、Chao らはカリクレインが虚血性脳卒中による傷害を緩和すること (Chao, L. et al., Front Biosci. 11, 1323 (2006)) や、Liu らはカリクレインがグルタミン酸による誘導される神経細胞毒性を緩和することを報告している (L. Liu et al., J. Neurosci. Res. 87, 3576 (2009))。これらの報告はいずれも、カリクレインにより遊離したキニンによるキニン B<sub>2</sub> 受容体を介した経路によるものであり、我々が見出した現象とは根本的に異なる機構によるものと考えられる。これまでのカリクレインに関する研究はカリクレインの唯一の基質はキニンノーゲンであり、キニン遊離がカリクレインの主な機能であるという視点でしか研究されていなかった。また、本来分泌性である組織性カリクレインが今まで発現が知られていなかった大脳に発現し、特に胎仔期から新生仔期に

かけて神経細胞の核内で発現することは、中枢神経系形成時にキニン遊離とは全く異なる新規機能を示唆するものである。この可能性を示したのは我々が初めてであり、このような新しい視点から行われた研究は今まで存在しなかった。

### 2. 研究の目的

第 1 項で述べた背景より、我々はカリクレインの中枢神経系での新規機能を解析する過程で、カリクレインをラット神経幹細胞の培養液に添加すると 2 倍以上の増殖促進作用を示すことを見出した。カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進作用は抗カリクレイン抗体を添加することにより消失することから、カリクレイン標品中に混入した物質ではなくカリクレインの作用によるものと考えられた。また、この作用はキニン B<sub>2</sub> レセプターアンタゴニストである Hoe140 により阻害されなかった。以上のことから、カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進作用は、カリクレインがキニンノーゲンを加水分解してキニン遊離したことによるものではなく、カリクレインがキニンノーゲン以外の新規基質に作用した (あるいはカリクレインとタンパク質の相互作用による可能性も考えられる) 結果であると考えられた。また、カリクレインを HeLa 細胞, GH3 細胞, PC12 やグリア細胞の培養上清に添加しても、細胞増殖促進作用は示さずカリクレインの細胞増殖促進作用は神経幹細胞に対して比較的特異性の高いものと考えられた。

本研究課題は、カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進作用機構を明らかにすることを目的とし、そのために 1.カリクレインの基質の同定, 2.この作用メカニズムに関わるシグナル伝達系路の解明を目指すものである。

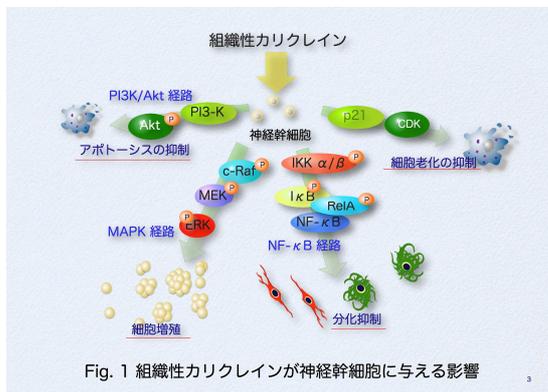
### 3. 研究の方法

カリクレインの神経幹細胞に対する増殖促進作用の測定は、ポリエチレンイミン・ラミニンコートした 96-well プレートに神経幹細胞を播種し、最終濃度が 10~100 ng/mL になるようにカリクレインを添加し、0~11 日目の細胞数を Cell Counting Kit-8 で測定した。神経幹細胞のタンパク質試料の調製は、ポリエチレンイミンコートしたシャーレに 2x10<sup>6</sup> 個の神経幹細胞を播種し、最終濃度 100 ng/mL のカリクレインを添加し、72 時間培養した。その後、この細胞を 0.1% Triton X-100, プロテアーゼ阻害剤とホスファターゼ阻害剤を含む緩衝液で溶解した。遠心分離により上清と沈殿に分離した後、タンパク質を定量してウエスタンブロット解析などの試料として用いた。蛍光免疫染色は、ポリエチレンイミンコートしたカバーガラス上に神経幹細胞を播種し、最終濃度 100 ng/mL のカリクレインを添加し、0~7 日目の神経幹細胞を取り出して、Bouin 溶液で固定した。その後、

抗ネスチン抗体, 抗 GFAP 抗体, 抗 III Tubulin 抗体, 抗リン酸化 RelA 抗体などを用いて, それぞれのタンパク質が存在する細胞内の部位を調べた。siRNA を調製は, siDirect(Ui-Tei, K. et al., Nucleic Acids Res., 32, 936(2004))により設計し, Ambion 社製の Silencer siRNA Construction Kit により調製した。抑制効果の確認は siRNA を Lipofectamine RNAiMAX で神経幹細胞にトランスフェクションし, 24 時間培養した後, これらの細胞より total RNA を抽出し, 逆転写した後, リアルタイム PCR を用いて行った。

#### 4. 研究成果

はじめに, カリクレインによる神経幹細胞の増殖促進作用について, 4 つの可能性を考えた (Fig. 1)。すなわち, ERK などの MAPK 活性化による細胞増殖促進, アポトーシスの抑制, 細胞老化の抑制, 神経幹細胞の分化抑制が考えられた。はじめに,



の細胞増殖の活性化について, カリクレインを神経幹細胞の培養液に添加し, 神経幹細胞数の経時変化を調べることににより, カリクレインが神経幹細胞の増殖速度に与える影響を調べた。その結果, カリクレインの濃度依存的に神経幹細胞の増殖促進作用が認められた (Fig. 2)。

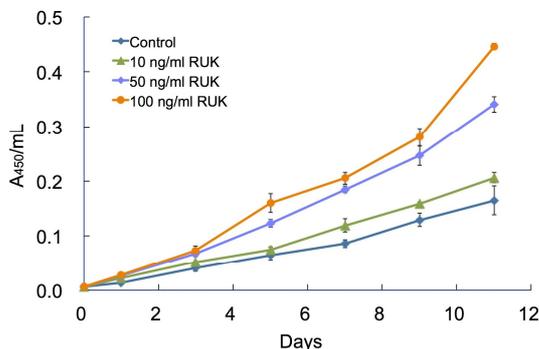


Fig. 2 組織性カリクレインが神経幹細胞の増殖速度に与える影響

そこで, カリクレインの神経幹細胞の ERK のリン酸化へ与える影響をウエスタンブロット解析により調べた結果, カリクレインの添加により ERK のリン酸化が促進されること

が明らかになった。この結果はカリクレインが ERK を活性化し, 細胞増殖促進作用を示すことが示唆している (Fig. 3)。

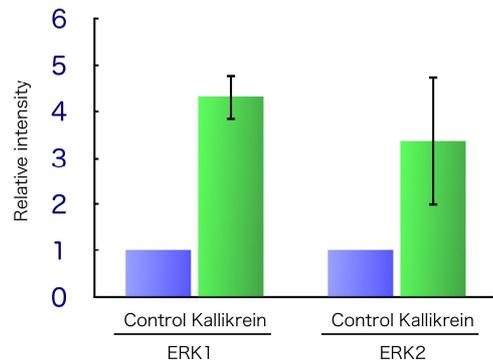


Fig. 3 カリクレインがERKのリン酸化に与える影響

次に および の神経幹細胞のアポトーシスや細胞老化を抑制することによって, 神経幹細胞の見かけの増殖速度を増加させる可能性について検討した。しかし, カリクレインはアポトーシスの抑制作用や細胞老化の抑制作用は示さなかった。

一方, ストレス下において, 海馬の神経前駆細胞や神経幹細胞様細胞が減少することが報告されており (Koo, J.W. et al., PNAS., 107, 2669(2010)), このような抑制を起こすシグナル伝達経路として NF- $\kappa$ B 経路が報告されている。さらに, NF- $\kappa$ B 経路が神経幹細胞から神経細胞への初期分化に必要とされることが報告されている (Zhang, Y. et al., Stem Cells, 30, 510(2012))。以上のことから, カリクレインが神経幹細胞の NF- $\kappa$ B 経路を抑制して, 神経幹細胞の分化を促進することにより神経幹細胞の見かけの増殖速度を促進する可能性が示唆された。そこで, カリクレインが神経幹細胞の NF- $\kappa$ B 経路を抑制しているか検討を行った。NF- $\kappa$ B 経路を構成する分子には NEMO, IKK /  $\alpha$ , RelA, NF- $\kappa$ B などがあ

るが, カリクレインが神経幹細胞の RelA のリン酸化に与える影響を蛍光免疫細胞染色により調べた。その結果, カリクレインの添加によりリン酸化 RelA の細胞内の染色強度の低下が認められた。カリクレインを添加し, EGF と bFGF を除いて神経幹細胞を分化誘導させると, 通常は神経幹細胞質内や核内のリン酸化 RelA の染色強度が高くなるのに対して, カリクレインを添加すると分化誘導後 1~2 日目のリン酸化 RelA の細胞質内と核内の染色強度の低下が認められた。このことはカリクレインが神経幹細胞の RelA の活性化を抑制していることを示唆している。このカリクレインによる RelA の抑制を確認するために, ウエスタンブロット解析によりカリクレインが RelA のリン酸化へ与える影響を調べた。その結果, カリクレイン添加により RelA のリン酸化が抑制されることが確認できた (Fig. 4)。

カリクレインにより神経幹細胞のNF- $\kappa$ B経路が抑制されることを示唆する結果が得られたので、この作用のさらなる検討を行った。NF- $\kappa$ B経路においてRelAの活性化は、上流分子であるIKK $\gamma$ により制御されている。このタンパク質はTAK1などによりリン酸化されると活性化し、IKK $\gamma$ のリン酸化を行う。IKK $\gamma$ はリン酸化されると分解され、IKK $\gamma$ の分解によりRelAを含むNF- $\kappa$ B複合体が活性化される。そこで、ウエスタンブロット解析によりRelAの上流分子であるIKK $\gamma$ がカリクレインによりリン酸化が抑制されるか調べた結果、カリクレイン添加によってIKK $\gamma$ のリン酸化が抑制されることが分かり、カリクレインにより神経幹細胞のNF- $\kappa$ B経路が抑制されることがわかった (Fig. 5)。

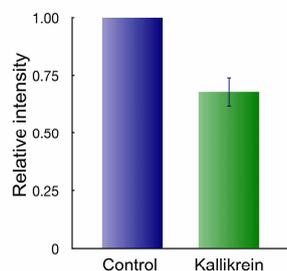


Fig. 4 カリクレインがRelAのリン酸化に与える影響

カリクレインによるNF- $\kappa$ B経路の抑制が行われるかさらに確認するために、NF- $\kappa$ B経路により転写が活性化されるIL-6遺伝子の発現をリアルタイムPCRにより調べた。その結果、カリクレインを添加しない神経幹細胞に比べて、カリクレインの添加した細胞ではIL-6遺伝子の発現量が14%まで発現量が低下していた (Fig. 6)。

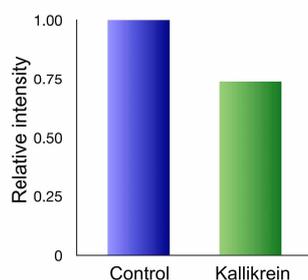


Fig. 5 カリクレインがIKK $\alpha/\beta$ のリン酸化に与える影響

以上の結果は、カリクレインを培養液に添加により神経幹細胞のNF- $\kappa$ B経路が抑制されることを示し、これにより神経幹細胞の分化が抑制される可能性を示唆している。

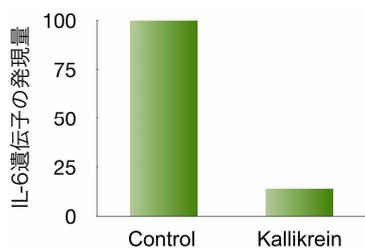


Fig. 6 カリクレインがIL-6遺伝子の発現に与える影響

カリクレインはプロテアーゼであることから、カリクレインが何らかの受容体と結合してNF- $\kappa$ B経路を抑制する可能性は低いと思われる。したがって、カリクレインを神経幹細胞の培養液に添加することにより神経

幹細胞のNF- $\kappa$ B経路が抑制される作用は、カリクレインが培養液に含まれるタンパク質または神経幹細胞の細胞表面に露出するタンパク質を加水分解することが考えられる。NF- $\kappa$ B経路を活性化する分子には、IL-1, TNF- $\alpha$ , LPS, 活性酸素などがあるが、これらのうちカリクレインにより加水分解される可能性がある分子にはIL-1やTNF- $\alpha$ が考えられる。そこで、これらの分子に関する分子のうち、IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 type I 受容体, IL-1 type II 受容体, TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  受容体遺伝子の神経幹細胞における発現をリアルタイムPCRで調べた。その結果、神経幹細胞ではIL-1 $\beta$ 以外のすべての遺伝子が発現していた。これらの遺伝子のうち、IL-1 $\alpha$ およびTNF- $\alpha$ は培養上清中に含まれ、ウエスタンブロット解析が難しいと考えられた。また、IL-1 type II 受容体は細胞質側のドメインが欠損しているため、NF- $\kappa$ B経路の活性化に関係ないと考えられる。したがって、はじめに比較的解析が容易であると思われたIL-1 type I 受容体について、カリクレインにより加水分解が行われるか確認した。カリクレインを作用させた神経幹細胞とコントロールの細胞より生体膜を多く含む分画を調製して、膜タンパク質を調製した後、この試料をIL-1 type I 受容体のアミノ末端側を認識する抗体を用いてウエスタンブロット解析した。その結果、コントロールの細胞より抽出した試料ではIL-1 type I 受容体のバンドが確認されたのに対して、カリクレインを培養液に添加した神経幹細胞より調製した試料ではIL-1 type I 受容体のバンドが消失し、IL-1 type I 受容体が分解されていることが確認できた (Fig. 7)。

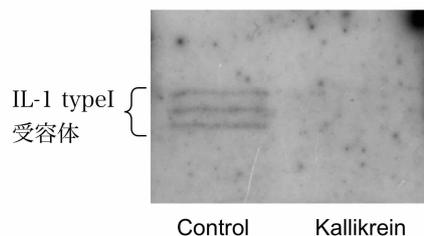


Fig. 7 カリクレインによるIL-1 type I 受容体の加水分解

そこで、カリクレインによるIL-1 type I 受容体の加水分解が神経幹細胞の増殖促進作用を示すか調べるために、IL-1 type I 受容体を特異的にノックダウンするsiRNAの合成を試みた。RNA合成に必要なDNAテンプレートをKlenowフラグメントにより合成した。このテンプレートDNAを用いてsiRNAの合成を行ったところ、約25bpのRNAのバンドが得られsiRNAの合成ができていることが確認された。次にこれらのsiRNAを神経幹細胞にトランスフェクションしたところ、3つのsiRNAのうち、rsi IL-1RI-1について約50%の発現抑制、rsi IL-1RI-2およびrsi IL-1RI-3

についてはリアルタイム PCR で検出できない量 (<1%)まで IL-1 type1 受容体の発現量が抑制され、神経幹細胞の IL-1 type1 受容体をノックダウンする siRNA を調製することができた。今後はこれらの siRNA を神経幹細胞にトランスフェクションし神経幹細胞の増殖へ与える影響を確認する予定である。

本研究によりカリクレインが神経幹細胞の IL-1 type1 受容体を加水分解することにより NF- B 経路を抑制することが示された。カリクレインにより神経幹細胞の NF- B 経路が抑制されると、神経幹細胞の分化が抑制されることが考えられる。神経幹細胞の分化が抑制されると増殖できる細胞数が減少しないため、神経幹細胞の見かけの増殖速度が上昇したと考えられ、これにより神経幹細胞の増殖促進作用が起こったと考えられる。

予備的な実験ではあるが、我々はラットにカリクレインを投与するとラット大脳の海馬歯状回において、神経幹細胞様の細胞が増加することも見出している。以上の結果はカリクレインが *in vitro*, *in vivo* で神経幹細胞の増殖促進作用を持つことを示す興味深い現象を示している。このことは本研究の追究により組織性カリクレインまたはこれと同じ作用をもつ物質を用いることにより、内在性の神経幹細胞から神経細胞の新生を誘導できる可能性を示している。一般に脳梗塞による脳血管障害やアルツハイマーなどの疾病により失われた神経細胞は再生することができない。しかし、本研究の成果によりこれらの疾病を治療する再生医療への応用も期待できる。この分野では iPS 細胞をはじめとした幹細胞を利用した再生医療が注目されているが、今回我々が見つけた現象のさらなる機能解明により、幹細胞を利用するよりもより容易で治療費のかからない治療への応用が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

岩館 寛大, 幹細胞と再生医療, 理大科学フォーラム, 査読無し, Vol. 32, No. 12, 2015, pp24-29.

〔学会発表〕(計 6 件)

H. Iwadate et al., Growth-stimulating effect of kallikrein on rat neural stem cells. Growth-stimulating effect of kallikrein on rat neural stem cells., The 3rd International Workshop on Green Innovation, 平成 26 年 3 月 10 日, 山口東京理科大学 (山口県山陽小野田市)

岩館 寛大 他, 組織性カリクレインによる神経幹細胞増殖促進機構の解明, 第 87 回日本生化学会大会, 平成 26 年 10 月 18 日, 国立京都国際会館 京都宝ヶ池プリンスホテル (京都府京都市)

峰 史穂他, 組織性カリクレインが神経幹

細胞の NF- B 経路へ与える影響の解析, 第 15 回液晶研究所シンポジウム 第 12 回先進材料研究所シンポジウム 合同シンポジウム, 平成 27 年 3 月 9 日, 山口東京理科大学 (山口県山陽小野田市)

岩館 寛大 他, 組織性カリクレインによるラット神経幹細胞の IL-1 受容体の切断, 第 38 回 日本分子生物学会, 第 88 回 日本生化学会大会合同大会, 平成 27 年 12 月 3 日, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市)

下里 隆弘 他, IL-1 がラット神経幹細胞へ与える影響の解析, 第 16 回液晶研究所シンポジウム 第 13 回先進材料研究所シンポジウム 合同シンポジウム, 平成 27 年 3 月 9 日, 山口東京理科大学 (山口県山陽小野田市)

岩館 寛大, NF- B 経路が神経幹細胞とがん細胞に与える影響, 第 16 回液晶研究所シンポジウム 第 13 回先進材料研究所シンポジウム 合同シンポジウム, 平成 27 年 3 月 9 日, 山口東京理科大学 (山口県山陽小野田市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩館 寛大 (IWADATE, Hiromoto)

山陽小野田市立山口東京理科大学 工学部  
応用化学科 准教授

研究者番号 : 70279107