

スーパーオキシド刺激はASK1活性化を介して心筋由来幹細胞におけるCXCR4の発現を亢進する

(Superoxide Stimulation Enhances CXCR4 Expression in Heart Muscle-derived Stem Cells via ASK1 activation)

氏名 明石 晋太郎

所属 山口大学大学院医学系研究科  
応用医工学系専攻 器官病態内科学分野

平成26年 1月

## 目次

1. 要旨 . . . . . 1
2. 緒言 . . . . . 2
3. 材料と方法 . . . . . 4
4. 結果 . . . . . 7
5. 考察 . . . . . 10
6. 結論 . . . . . 13
7. 謝辞 . . . . . 13
8. 参考文献 . . . . . 14

## 要旨

背景：心筋再生のための幹細胞治療は、幹細胞表面上のホーミング因子 CXCR4 の発現が不良であるため、梗塞巣への集積 (homing) の不良によって妨げられている。CXCR4 の発現増強により、梗塞巣への幹細胞の集積を加速することが期待される。方法及び結果：心筋由来 Sca-1(+)細胞 (HDSC) を表面抗原 Sca-1 を用いて正常なマウスの心臓から単離した。細胞を CXCR4 蛍光抗体で標識し、蛍光により蛍光活性化細胞を認識することで CXCR4 を発現している細胞の割合を測定した。過酸化水素 (0.1、0.33、1 $\mu$ M) で 24 時間刺激することで、CXCR4 の発現は増強した。ウェスタンブロットにより CXCR4 蛋白量の有意な増加は示されなかった。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の刺激は ASK1p966 のリン酸化を増強した。CXCR4 の発現増強は、細胞質分画から細胞表面への CXCR4 の移行によると考えられた。結論：H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> により、ASK1 リン酸化を介して CXCR4 が細胞質から膜表面に移行することで、HDSC 上の CXCR4 の発現が増大した。

## 緒言

細胞移植療法は虚血性又は非虚血性心不全に対する有望な治療戦略である。心筋再生の細胞ソースとなりえるものは胎児心筋細胞<sup>1,2</sup>及び胚性幹細胞由来の心筋細胞<sup>3</sup>であるが、これらの細胞ソースは倫理的観点から問題がある。骨格筋芽細胞<sup>4</sup>、骨髄由来幹細胞<sup>5,6</sup>、及び心筋由来幹細胞<sup>7-9</sup>は有望な候補細胞と考えられ、虚血性及び非虚血性心不全の患者における再生療法に用いられている。しかし、その成績は将来性が期待されるものの、幹細胞から心筋細胞への分化効率が低いことは今後解決すべき問題である。これらの研究で認められた左室駆出率の改善は、移植された幹細胞から分泌された増殖因子又はサイトカインのパラクライン作用によると考えられる。心筋細胞に分化しない骨格筋芽細胞を注入した場合<sup>10</sup>、Cx43を発現せずギャップ結合を欠いているために、細胞移植後に致死性不整脈をもたらす可能性がある<sup>11,12</sup>。骨髄由来幹細胞は動物モデルにおいて心機能を改善したが<sup>5,6</sup>、移植細胞の大半は心筋細胞に分化しなかった<sup>13,14</sup>。Sca-1、c-kit、Isl-1などの幹細胞マーカーを用いて識別される心筋由来幹細胞は、心筋細胞に分化することが報告されている<sup>7-9</sup>。心筋梗塞マウスに心筋由来幹細胞を注入すると移植細胞が損傷心筋部位に集積する可能性がある<sup>7</sup>。これは、CXCケモカイン受容体4 (CXCR4) とCXCケモカインストロマ細胞由来因子1 (SDF1)の相互作用によって生じる<sup>15</sup>。しかし、心筋由来幹細胞上のCXCR4の発現は僅かであり、このことが梗塞巣内への移植幹細胞の集積と増殖を妨げている可能性がある。Tangらは、心筋由来前駆細胞において虚血プレコンディ

シヨニングが CXCR4 の発現を増強することを明らかにした<sup>16</sup>。本論文では、細胞表面上の CXCR4 の発現を改善させる新たな方法を検討し、その背後にあるシグナル伝達機構を解明した。

## 材料及び方法

本実験は、いずれも山口大学動物管理使用委員会による承認を得た。本研究は、国立衛生研究所が発表した「実験動物の管理と使用に関する指針」(NIH Publication No.85-23, 1996 改訂)に準拠している。

動物 C57BL/6 マウスは日本エスエルシー (静岡) より購入し、山口大学動物センターで飼育した。

### 心臓由来 Sca-1(+)細胞の分離と培養

心臓由来 Sca-1(+)細胞 (HDSC) を磁気細胞選別システム (MACS, Miltenyi Biotec) を用いて既報のとおり分離した<sup>7</sup>。簡単に説明すると、C57BL/6 マウス (8 週齢) をペントバルビタール (50mg/kg、腹腔内投与) で麻酔し、頸椎脱臼により安楽死させた。心臓を摘出し、生理食塩水を加えた氷冷皿上でハサミで細切した。

小さく切った心臓組織を 0.4% II 型コラゲナーゼ (Worthington Biochemical) 溶液中で 30 分間、37°C で攪拌しながら分離した。40  $\mu$ m メッシュフィルタ (Falcon) で濾過した後、ビオチン結合抗 Sca-1 抗体 (1:100) を細胞混合液に添加し、氷冷にて 15 分間処理した。抗ビオチンマイクロビーズ (1:4) を 4°C で 10 分間添加し、この細胞混合液を磁気細胞分離カラムに 2 度通して選別した。選別細胞を 10%FBS、抗生物質、及び PDGF-bb (10 ng/ml, R&D)、EGF (10 ng/ml, Sigma)、LIF (2.5 ng/ml, Sigma) といった成長因子を添加した DMEM 培地中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した。

### フローサイトメトリー

Sca-1 に対して作成した抗体(Becton Dickinson)を PBS (1:100) 200  $\mu$ L 中に懸濁した新鮮分離 HDSC (20,000 cell) に添加した。アイソタイプ特異的な陰性 IgG を陰性対照として用いた。表面抗原を蛍光活性化細胞選別装置 (FACS, FC500, Coulter, USA) により検出した。

#### ウェスタンブロット

培養 HDSC をガラスホモジナイザーに入れ、プロテアーゼインヒビターカクテル (Roche, IN, USA) を含む RIPA 緩衝液により氷上で溶解した。ホモジネートを等量の溶解緩衝液と混合し、1,000 g で 20 分間遠心した。上清を用いて Bradford 法により蛋白濃度を測定した。各群から等量の蛋白 (50 $\mu$ g) を 10%ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 上の電気泳動により分離し、ニトロセルロース膜に転写した。この膜を Tris 緩衝生理食塩水で希釈した 5%脱脂乳溶液に 1 時間浸し、非特異的結合をブロッキングした。次にこの膜を、CXCR4、ASK1 に対する一次抗体と 4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。さらにこの膜をを二次抗体と室温で 2 時間インキュベートした。増感化学発光法 (ECL) によりバンドを可視化し、ルミノイメージアナライザー (LAS-1000、富士フィルム) を用いて定量化した。バンド密度は対照に対する割合で表した。

#### 細胞表面の CXCR4 発現

2 週間培養した HDSC をトリプシン処理して遠心洗浄し、0.5%FBS 添加 DMEM で  $2 \times 10^5$  cell の密度に懸濁し 6 ウェル培養プレート (Corning 3516, USA) に播種した。対照群では細胞に  $H_2O_2$  を添加せず 24 時間培養した。 $H_2O_2$  群には 3 段階

の  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.1、0.3、1 $\mu\text{M}$ ) を添加して 24 時間培養した。トリプシン処理して細胞を分離し、遠心洗浄して FACS 解析に供した。実験回数は各群 4 回とした。

#### ASK1 のリン酸化

各群で  $7 \times 10^5$  の培養 HDSC を用いた。ASK1 の蛋白量、並びに ASK1 のセリン 83 と 966 でのリン酸化に対する 24 時間  $\text{H}_2\text{O}_2$  曝露の影響をウェスタンブロットで解析した。(N=4)。

#### 統計解析

データは平均値 $\pm$ SD で表している。群間差を ANOVA により解析し、有意差が検出された場合は Scheffe の多重比較を用いた。0.05 未満の p 値を統計的有意とみなした。



## 結果

FACS 解析により新鮮に分離した HDSC の Sca-1 陽性率は  $92 \pm 2\%$  であった。

### 細胞表面の CXCR4 の発現

対照群における細胞表面の CXCR4 の発現率は  $11.9 \pm 4.7\%$  であった (図 1a)。

$H_2O_2$  ( $0.33 \mu M$ ) 曝露群における CXCR4 の発現率は  $29.2 \pm 5.8\%$  と有意に上昇した (対照に比較し  $P < 0.05$ , 図 1b)。CXCR4 の発現率は  $0.1 \sim 1.0 \mu M$  の範囲では用量依存性ではなかった (データ表示せず)。

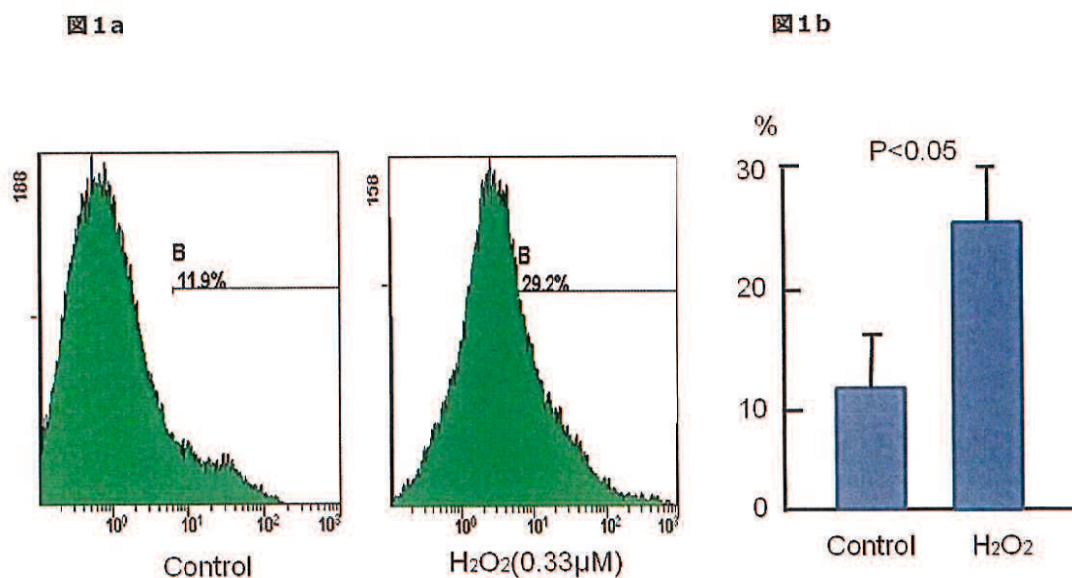


図 1a. 光活性化細胞選別法 (FACS) により検出された細胞表面上の CXCR4 発現の典型例。  $0.33 \mu M H_2O_2$  添加により CXCR4 の発現が増加した。 b. CXCR4 陽性率に関する FACS 解析の結果。  $H_2O_2$  は CXCR4 の発現を有意に増加させた ( $P < 0.05$ ,  $N=4$ )。

### CXCR4 蛋白発現量の変化

CXCR4 蛋白発現量は 24 時間  $H_2O_2$  曝露後に変化しなかった。ASK1 蛋白の発現量は 24 時間  $H_2O_2$  曝露後に有意に変化しなかった。しかし、ASK1 p966 のリン酸化は有意に増加し、ASK1 p86 には変化を認めなかった (図 2,3)。

図 2

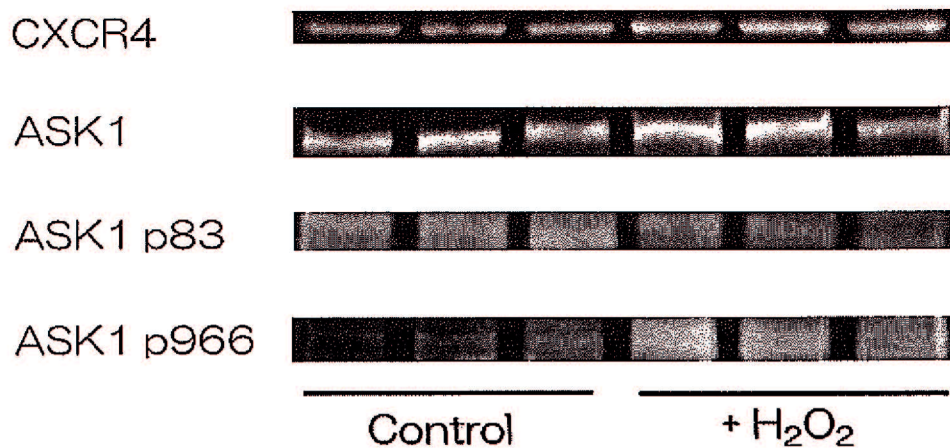


図 2.  $H_2O_2$  曝露前後の CXCR4、ASK1、ASK1 p83 及び ASK1 p966 のウェスタンブロット。ASK1 p966 は  $H_2O_2$  曝露後に増加した。

図3

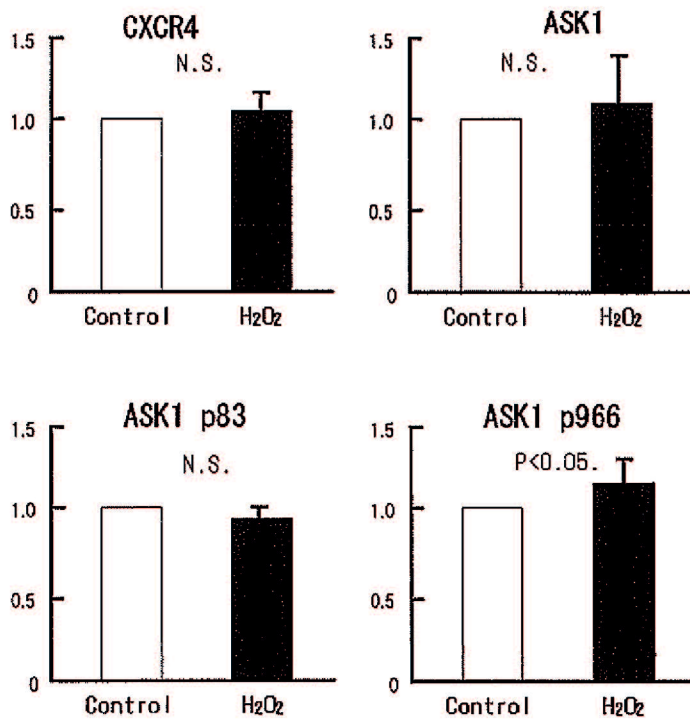


図3. CXCR4、ASK1、ASK1 p83 及び ASK1 p966 のウェスタンブロットの結果。データは対照に対する比率で表している。ASK1 p966 は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露後に有意に増加した。

## 考察

心筋由来幹細胞(HDSC)は表面マーカーSca-1 を用いて分離することができる。<sup>17</sup>HDSC はこれまでに心筋細胞に分化することが明らかにされている<sup>18-19</sup>。しかし、HDSCは、損傷した病変への細胞集積を加速するCXCR4の発現が低いため、HDSCを用いた細胞治療はさほど強力なものではない<sup>20-21</sup>。したがって、HDSC上のCXCR4の発現を増強させる方法が模索されている。本研究において我々は、24時間H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>曝露がHDSC上の細胞表面CXCR4発現を増加させることを見いだした。さらに我々は、細胞表面CXCR4発現の増加にはCXCR4蛋白の増加を伴わず、ASK1のセリン966でのASK1のリン酸化が増強することを明らかにした(図4)。我々の知る限りにおいて、本研究は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>により誘導される細胞表面CXCR4の増加がASK1 p966のリン酸化を介した細胞内側から細胞表面へのCXCR4の移動によることを示した最初のエビデンスである。我々の結果をさらに確実なものにするには、今後の研究において表面ビオチン化アッセイを行う必要がある。これまで、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ASK1経路は、JNKとP38MAPKを含む下流のシグナル伝達経路につながるアポトーシス促進経路として知られている<sup>22-25</sup>。しかし我々の研究からは、JNKとP38MAPKはCXCR4の移動には関係していないことが判明しており(データ表示せず)、PKD1などその他の経路がASK1 p966のリン酸化に関わっている可能性が示唆された<sup>21</sup>。この経路の詳細は、今後の研究において解明される必要がある。これまでの研究から、CXCR4発現の増加は幹細胞の損傷部位への集積を加速し、再生を促進することが示唆されている<sup>26-32</sup>。

梗塞マウスにおいて、 $H_2O_2$  により生じる CXCR4 発現の増加が再生の程度に及ぼす *in vivo* での影響を今後検討する必要がある。

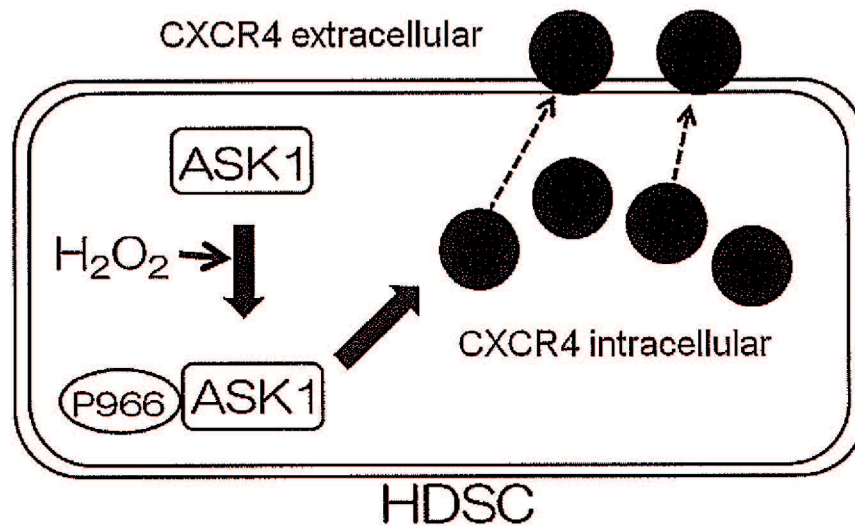


図 4.  $H_2O_2$  により ASK1 リン酸化を介して CXCR4 分子が細胞内から細胞外膜に移動することを示している。

#### この研究の限界

低濃度の  $H_2O_2$  は細胞表面の CXCR4 発現を増加させることができるが、高用量の  $H_2O_2$  はアポトーシス又は壊死による細胞死を生じさせる可能性もある<sup>22-25</sup>。我々の研究では、アポトーシスの程度は確認していないが、 $0.33\mu M$  の  $H_2O_2$  ではアポトーシスに促進性でなく、細胞表面の CXCR4 誘導に適していると考えら

れた。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 阻害剤の添加を行うことで、我々の研究がさらに強化されると考えられ、今後の研究でこれを行う必要がある。ASK1 p966 に関連する下流経路はいまだ明確にされていない。この点を今後さらに明確化すべきである。

結論 低用量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 曝露は、ASK1 p 966 のリン酸化を通じて HDSC 細胞表面上の CXCR4 の発現を増加させることができる。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導、ご助言いただきました器官病態内科学 松崎益徳前教授、矢野雅文教授に感謝を申し上げます。また、直接、臨床研究ならびに論文作成のご指導をいただきました器官病態内科学 前准教授 三浦俊郎博士に多大の感謝を申し上げます。また、優れた技術的補助をしてくださった石原里江氏、岡本陽子氏及び岩本和子氏に感謝申し上げます。

## 参考文献

1. Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T., Murry, CE. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*, **100**:193–202, 1999.
2. Soonpaa, MH., Koh, GY., Klug, MG., Field, LJ. Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science*, **264**:98–101, 1994.
3. Klug, MG., Soonpaa, MH., Koh, GY., Field, LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, **98**:216–224, 1996.
4. Taylor, DA., Atkins, BZ., Hungspreugs, P., Jones, TR., Reedy, MC., Hutcherson, KA., Glower, DD., Kraus, WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*, **4**:929–933, 1998.
5. Tomita, S., Li, RK., Weisel, RD., Mickle, DA., Kim, EJ., Sakai, T., Jia, ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation*, **100**:II247–II256, 1999.
6. Hosada, T., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P. Mechanism of myocardial regeneration. *Circulation J*, **74**:13–17, 2010.
7. Oh, H., Bradfute, SB., Gallardo, TD., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, LH., Behringer, RR., Garry, DJ., Entman, ML., Schneider,



- MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**:12313–12318, 2003.
8. Beltrami, AP., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, **114**:763–776, 2003.
  9. Laugwitz K, Moretti A, Lam J, Peter G, Chen Y, Woodard S, Lin, LZ., Cai, CL., Lu, MM., Reth, M., Platoshyn, O., Yuan, JX., Evans, S., Chien, KR. Postnatal *Isl1*<sup>+</sup> cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, **433**:647-653, 2005.
  10. Leobon, B., Garcin, I., Menasche, P., Vilquin, JT., Audinat, E., Charpak, S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**:7808-7811, 2003.
  11. Menasché, P., Hagege, AA., Vilquin, JT., Desnos, M., Abergel, E., Pouzet, B., Bel, A., Sarateanu, S., Scorsin, M., Schwartz, K., Bruneval, P., Benbunan, M., Marolleau, JP., Duboc, D. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, **4**:1078-1083, 2003.
  12. Abraham, MR., Henrikson, CA., Tung, L., Chang, MG., Aon, M., Xue, T., Li, RA., O'Rourke, B., Marban, E. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res*, **97**:159-167, 2005.

- cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem*, **279**:11384-11391, 2004.
19. Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimenti, S., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglio, M., Latronico, MV., Coletta, M., Vivarelli, E., Frati, L., Cossu, G., Giacomello, A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, **95**:911-921, 2004.
  20. Matsuura, K., Honda, A., Nagai, T., Fukushima, N., Iwanaga, K., Tokunaga, M., Shimizu, T., Okano, T., Kasanuki, H., Hagiwara, N., Komuro, I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest*, **119**:2204-2217, 2009.
  21. Limbourg, A., Limbourg, F., Drexler, H. Cell-based therapies for ischemic heart disease. *Circulation J*, **73**:2179-2182, 2009.
  22. Yamaguchi, O., Watanabe, T., Nishida, K., Kashiwase, K., Higuchi, Y., Takeda, T., Hikoso, S., Hirotsu, S., Asahi, M., Taniike, M., Nakai, A., Tsujimoto, I., Matsumura, Y., Miyazaki, J., Chien, KR., Matsuzawa, A., Sadamitsu, C., Ichijo, H., Baccarini, M., Hori, M., Otsu, K. Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest*, **114**:937-943, 2004.
  23. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling

- pathways.*Science*, 275:90-94, 1997.
24. Zhang, W., Zheng, S., Stortz, P., Min, W. Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not tumor necrosis factor.*J Biol Chem*, 280:19036-19044, 2005.
  25. Goldman, EH., Chen, L., Fu, H. Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation.*J Biol Chem*, 279:10442-10449, 2004.
  26. Seong, HA., Jung, H., Ichijo, H., Ha, H. Reciprocal negative regulation of PDK1 and ASK1 signaling by direct interaction and phosphorylation.*J Biol Chem*, 285:2397-2424, 2010.
  27. Stellos, K., Langer, H., Daub, K., Schoenberger, T., Gauss, A., Geisler, T., Bigalke, B., Mueller, I, Schumm, M., Schaefer, I., Seizer, P., Kraemer, BF., Siegel- Axel, D., May, AE., Lindemann, S., Gawaz, M. Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34<sup>+</sup> cells to endothelial progenitor cells.*Circulation*, 117:206-215, 2008.
  28. Aiuti, A., Webb, IJ., Bleul, C., Springer, T., Gutierrez-Ramos, JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34<sup>+</sup> progenitors to peripheral blood.*J Exp Med*, 185:111-120, 1997.
  29. Abbott, JD., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, DS., Giordano, FJ. Stromal

cell-derived factor-1 alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury.*Circulation*, 110:3300-3305, 2004.

30. Askari, AT., Unzek, S., Popovic, ZB., Goldman, CK., Forudi, F., Kiedrowski, M., Rovner, A., Ellis, SG., Thomas, JD., DiCorleto, PE., Topol, EJ., Penn, MS. Effect of stromal-cell derived factor-1 on stem cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy.*Lancet*, 362:697-703, 2003.
31. Sun, Y., Cheng, Z., Ma, L., Pei, G.  $\beta$ -arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation.*J Biol Chem*, 277:49212-49219, 2002.
32. Haider, HKh., Jiang, S., Idris, NM., Ashraf, M. IGF-1-overexpressing mesenchymal stem cells accelerate bone marrow stem cell mobilization via paracrine activation of SDF-1alpha/CXCR4 signaling to promote myocardial repair.*Circ Res*, 103:1300-1308, 2008.