

NUPR1 acts as a pro-survival factor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is induced by the hypoxia mimetic reagent deferoxamine

(NUPR1は低酸素模倣剤 (deferoxamine) プレコンディショニングによりヒト骨髄由来間葉系幹細胞における生存促進因子として働く)

氏名 松永 一仁

所属 山口大学大学院医学系研究科

応用分子生命科学系専攻

消化器内科学分野

2019年 2月

## 目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景と目的	1
3. 方法	2
(1) 細胞培養	2
(2) 増殖アッセイ	3
(3) アポトーシスアッセイ	3
(4) Western blot analysis	3
(5) RNA 抽出	3
(6) 遺伝子発現連鎖解析 (SAGE)	3
(7) Oxygen consumption rate (OCR) 測定	4
(8) 免疫蛍光抗体法	4
(9) 統計学的解析	4
4. 結果	5
5. 考察	14
6. 結語	16
7. 謝辞	16
8. 参考文献	17

# 1. 要旨

再生医療に用いられる間葉系幹細胞（MSC）は、培養環境の違いが細胞の未分化能やゲノム不安定性などに影響するといわれている。特に骨髄由来間葉系幹細胞は低酸素培養を行うと未分化状態を維持したまま増殖することが知られており、より簡便に細胞を低酸素下代謝状態に保つために低酸素模倣剤 Deferoxamine（DFO）の有用性が示されている。12時間という比較的短時間の DFO 添加により細胞の増殖性低下、酸素消費量低下、ATP 産生低下を伴うミトコンドリア活性低下が認められた。DFO を添加した細胞のマイクロアレイ解析では、HIF1 $\alpha$  パスウェイや解糖系の亢進が認められた。また変動した upstream 遺伝子として HIF1 $\alpha$ 、NUPR1、EGLN などが挙げられ、MSC において DFO をより高濃度短時間投与することにより、解糖系優位の代謝変化を誘導することができることが示された。upstream 遺伝子の一つとして挙げられた NUPR1 は、ストレスなどにより誘導され、オートファジー亢進による生存に関与することが知られている。NUPR1 は DFO 濃度依存的に発現が上昇し、NUPR1 をノックダウンした細胞では増殖性の低下がみられた。さらに、アポトーシスを誘導させる staurosporine を投与することにより NUPR1 ノックダウン細胞においてアポトーシスの亢進が認められたことから、DFO 投与によって誘導される NUPR1 は MSC においても細胞保護性オートファジーに関与し、薬剤耐性にとって重要な分子であると考えられた。本研究で得られた知見は今後 MSC を用いた再生医療を行う際に細胞の生存率改善などにつながることを期待される。

## 2. 研究の背景と目的

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC) は脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞などの間葉系に属する細胞への分化能をもつ細胞で、再生医療への応用が期待されており、我々はすでに骨髄由来 BMSC を用いて肝硬変症に対する再生医療を行っている。しかし使用する培養 BMSC は細胞の培養条件などによって品質が変化してしまうため、その治癒効果にも影響を及ぼすことが考えられている。もともと骨髄内の酸素濃度は 1-7%程度であることから、BMSC は 21%酸素濃度下で培養することでストレスを受けて遺伝的安定性の維持が低下する可能性が指摘されている。また培養を重ねるに従って細胞老化、ゲノム不安定性や未分化状態の維持の低下も問題になっているが、低酸素濃度下の培養によりこれらの問題点が改善されることが報告されている [1-3]。さらに、低酸素プレコンディショニングが間葉系細胞の増殖を促進し、細胞移植後の MSC の生存率を高めるために利用されている [4、5]。低酸素培養の有用性は高いが、低酸素培養装置が必要であること、培地交換時に一過性に低酸素ではない状

態に晒されることが問題点として挙げられる。そこで鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) などの低酸素模倣剤を用いた培養法の有用性が注目されている[6]。DFOはHIF1 $\alpha$ を水酸化する prolyl-4 hydroxylase に必要な鉄をキレートすることから、HIF1 $\alpha$ の水酸化が起らず分解されにくくなるため HIF1 $\alpha$ が蓄積することにより低酸素環境を模倣する。これまでに DFO の有用性が研究されており、ワルトンジェリー由来 MSC から分化した神経様細胞に DFO プレコンディショニングを行うと細胞生存率と治療効果が改善し、DFO プレコンディショニングが細胞療法に有用であることが示されている[7]。また細胞移植前に MSC を DFO でプレコンディションすると MSC のホーミングの効率が上がり細胞療法の効率が改善すること[9]や内皮前駆細胞のホーミングを亢進させること[8]が報告されている、さらに、DFO プレコンディショニングは MSC との共培養において肝細胞や脳細胞に対する栄養効果、抗アポトーシス効果を増強すること[10、11]などが報告されているが、DFO の効果を明らかにするためにはさらなる詳細な研究が必要とされている。これまでに我々は低濃度の DFO と低酸素による MSC の代謝の変化について比較し、MSC のプレコンディショニングに低濃度の DFO が有用である可能性を報告している[12]。

nuclear protein 1 (NUPR1) (別名 p8) は種々の癌種で化学療法耐性への関連が指摘され近年注目されている分子であり、細胞保護性オートファジー誘導や p53 を介した細胞周期の抑制などが報告されている[13]。これまでに主に癌細胞で研究が行われており、耐性細胞の生存を支える重要な因子の一つであるが、詳細な薬物耐性機構については未だ明らかにされていない。間葉系幹細胞においても NUPR1 が細胞生存に関与していることが推測されるが、これまでに間葉系幹細胞での NUPR1 の働きについて詳細な報告はない。

本研究ではさらに短時間での処理を行うための濃度決定を行い、DFO を MSC に投与することで起こる遺伝子発現変化の評価を行った。さらに DFO によって誘導される NUPR1 によるストレス耐性メカニズムについて解析を行った。本研究で得られた知見は MSC 投与後の生存率改善など、今後の再生医療の進歩に有益なものになると考えられる。

## 3. 方法

### (1) 細胞培養

BMSC は Bone marrow cell を (Lonza, Basel, Switzerland) より購入し、DMEM 培地で BMSC を増殖させ 3~8 継代で使用した。BMSC はフローサイトメトリーにおいて CD45(-), CD11b(-), CD90(+), CD73(+), CD105(+ )であることを確認した。

## (2) 増殖アッセイ

96 well プレートに 1,000 個/well の MSC を播種したのち、各濃度の DFO を添加して、Incucyte HD imaging system (Essen BioScience)を用いて細胞の面積を評価することで増殖能を測定した。DFO はノバルティスファーマ社 (Tokyo, Japan) より購入した。

## (3) アポトーシスアッセイ

siRNA 処理後、96 well プレートに 3,000 個/well の細胞を播種し、3 日間培養を行った。その後 staurosporine ( $0.3 \mu\text{M}$ ) を投与し 6 時間後、CyQUANT® cell proliferation assay (Thermo Fisher Scientific)を用いて細胞数を測定し、Caspase-3 Assay Kit (Promega) を用いて細胞あたりの Caspase3 活性を計算し評価した。n=6、Triplicate で確認した。

## (4) Western blot analysis

Western blot は常法に従い行った[14]。簡潔に述べると、62.5 mM Tris-HCl (pH6.8、4%SDS、200 mM のジチオスレイトールを含んだ細胞溶解バッファーで調製し、12%アクリルアミドゲルで電気泳動した。抗体は抗  $\beta$ -actin 抗体 (Sigma)、抗 p62 抗体 (abcam)、抗 LC3 抗体 (Life Technology)、抗 NUPR1 抗体 (Protein Chicago IL) を用いた。

## (5) RNA 抽出

細胞の RNA は TRIzol Reagent (Life Technology) を用いて抽出し、SV Total RNA Isolation System (Promega) を用い、各々の製品説明書に従って精製した。RNA サンプルは ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) で定量し、Experion System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) のより質の評価を行った。

## (6) 遺伝子発現連鎖解析 (SAGE)

Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Kit (Life Technologies) を用いた。Ion Proton 次世代シーケンサーライブラリで解析するビーズを作成し、Ion PI IC 200 Kit (Life Technologies) と Ion PI Chip Kit v2 BC、Ion Proton next-generation sequencer を用いてシーケンスを行った。SAGE の結果は Ingenuity Pathways Analysis (IPA) により解析した。

## (7) Oxygen consumption rate (OCR)測定

OCR測定は Seahorse Biosciences XF96 Extracellular Flux Analyzer を用いた。XF96 microplates (Seahorse Biosciences)に 3,000 個/well の細胞を播種し、24 時間培養の後に XF Assay Medium (Seahorse Biosciences)に 25 mM グルコース (Sigma-Aldrich)を添加した培地に培地交換した。OCR は 3 分間の薬剤混合期間ののちに 5 分間隔で測定した。以下の薬剤を細胞に連続添加して測定した：1  $\mu$ g/mL oligomycin (Sigma-Aldrich)、300 nM carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; Sigma-Aldrich)、2  $\mu$ M rotenone (MP Biomedicals)。予備呼吸能や共役効率 は Seahorse Bioscience instructions で計算し、OCR は細胞数で補正を行った。

## (8) 免疫蛍光抗体法

MSC をチェンバースライド上で培養し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。免疫蛍光抗体法は Opal Multiplex Immunohistochemistry Kit (Perkin Elmer, Norwalk, CT)の製品説明書に従って行った。

## (9) 統計学的解析

等分散性は F 検定を用い、結果はスチューデント T 検定、 ウェルチ T 検定を用いて統計学的解析を行った。データは平均値±標準偏差で表示し、 $p < 0.05$  を統計学的有意差とした。

## 4. 結果

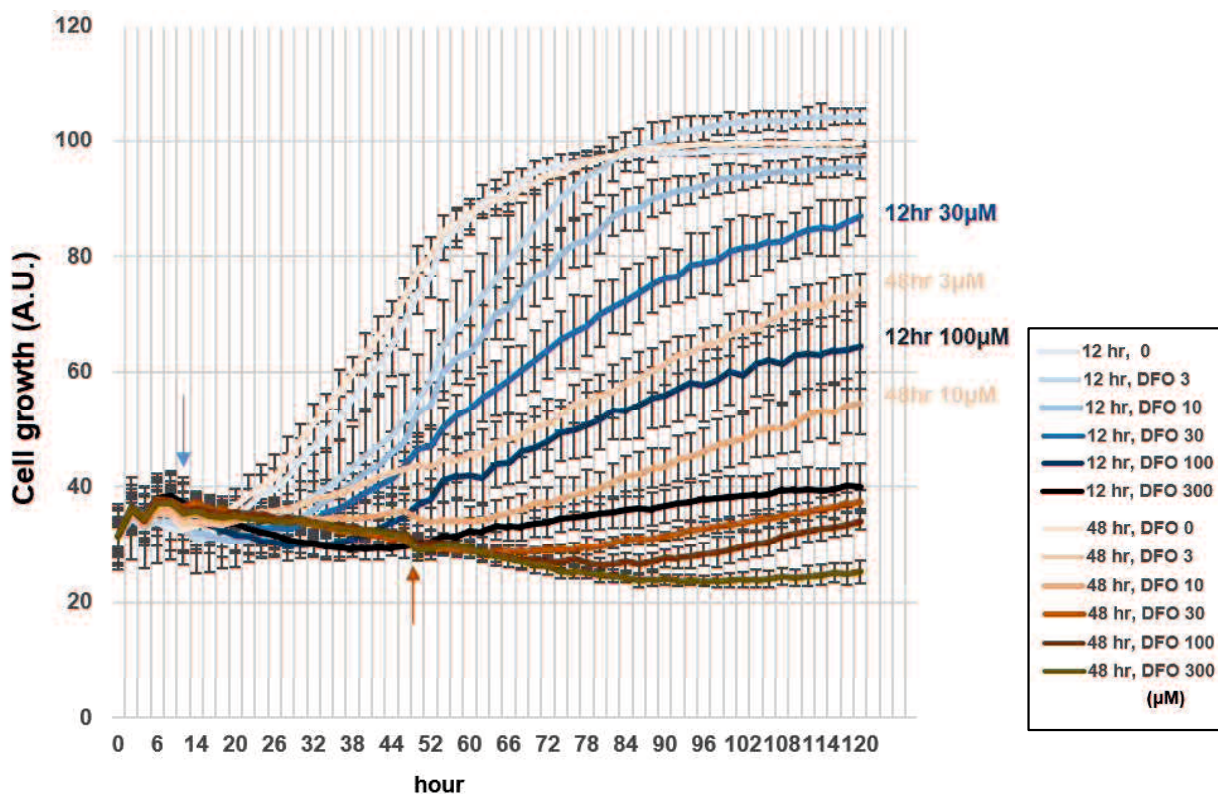
DFO はミトコンドリアの酸素消費を抑制し、細胞内 ATP 量を減少させる

DFO の増殖性に及ぼす影響を調べるため、DFO 投与時間を 12 時間及び 48 時間で各種濃度の DFO を投与し、その後 DFO の入っていない培地で培養し増殖性を評価した。これまでにプレコンディションに有用な濃度であると考えられている低濃度 DFO (3  $\mu\text{M}$ )、48 時間処理 [12]後の増殖と高濃度 DFO (約 50  $\mu\text{M}$ )、12 時間処理後の増殖速度がほぼ同程度となった (Fig. 1A)。次に細胞あたりの ATP 量を測定したところ、100  $\mu\text{M}$  以上で有意な ATP 量の低下が認められた (Fig. 1B)。ATP 量の低下の原因を調べるためフラックスアナライザーで酸素消費率 OCR (oxygen consumption rate) を測定したところ、basal respiration と maximum respiration とともに 10  $\mu\text{M}$  から低下し始め、100  $\mu\text{M}$  と 300  $\mu\text{M}$  で大きく低下した (Fig. 1C)。

Fig. 1 BMSC に対する DFO の増殖、ATP、酸素消費に及ぼす影響の評価

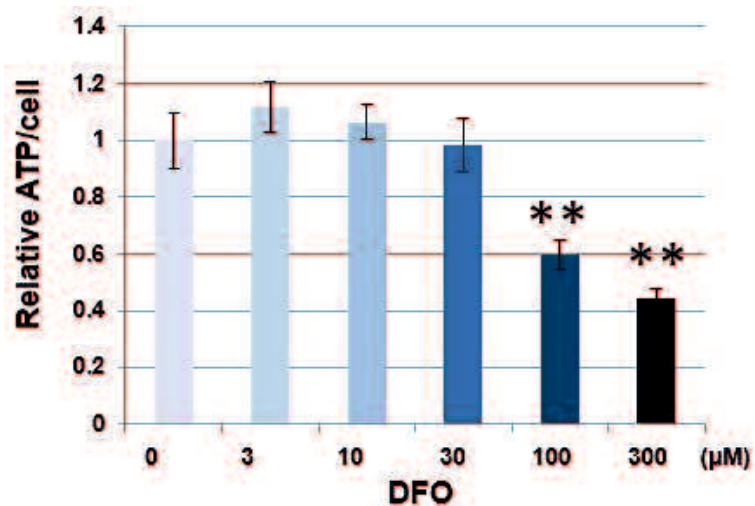
### A. DFO 濃度と投与時間が MSC の増殖に及ぼす影響の比較

DFO 投与は 12 時間 (青色で表示) または 48 時間 (茶色で表示) 行い、その後 DFO を含まない培地に変更した。

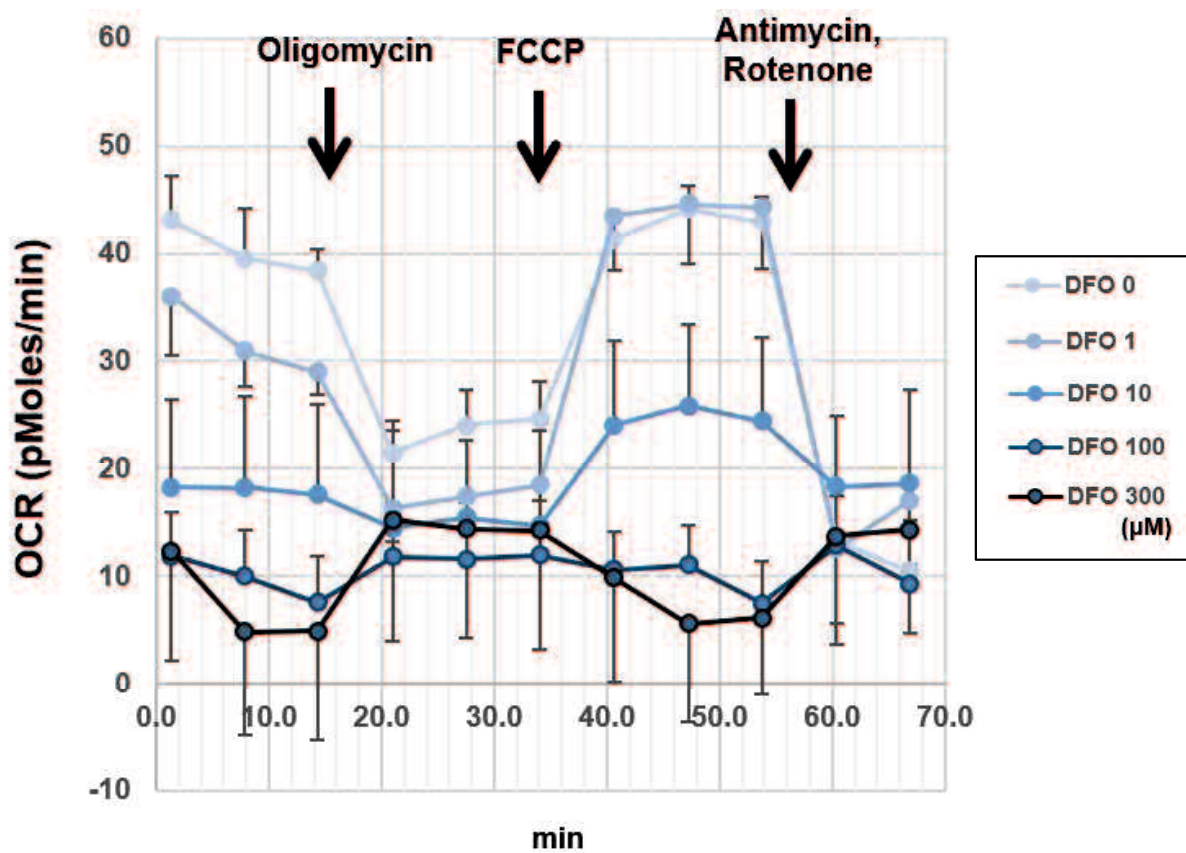


B. ATP 産生に及ぼす DFO の影響

DFO 添加 12 時間後に ATP レベルを測定した。ATP レベルは細胞数で補正した。\*p < 0.05.



C. 12 時間 DFO treatment した細胞のフラックスアナライザーによる OCR の評価



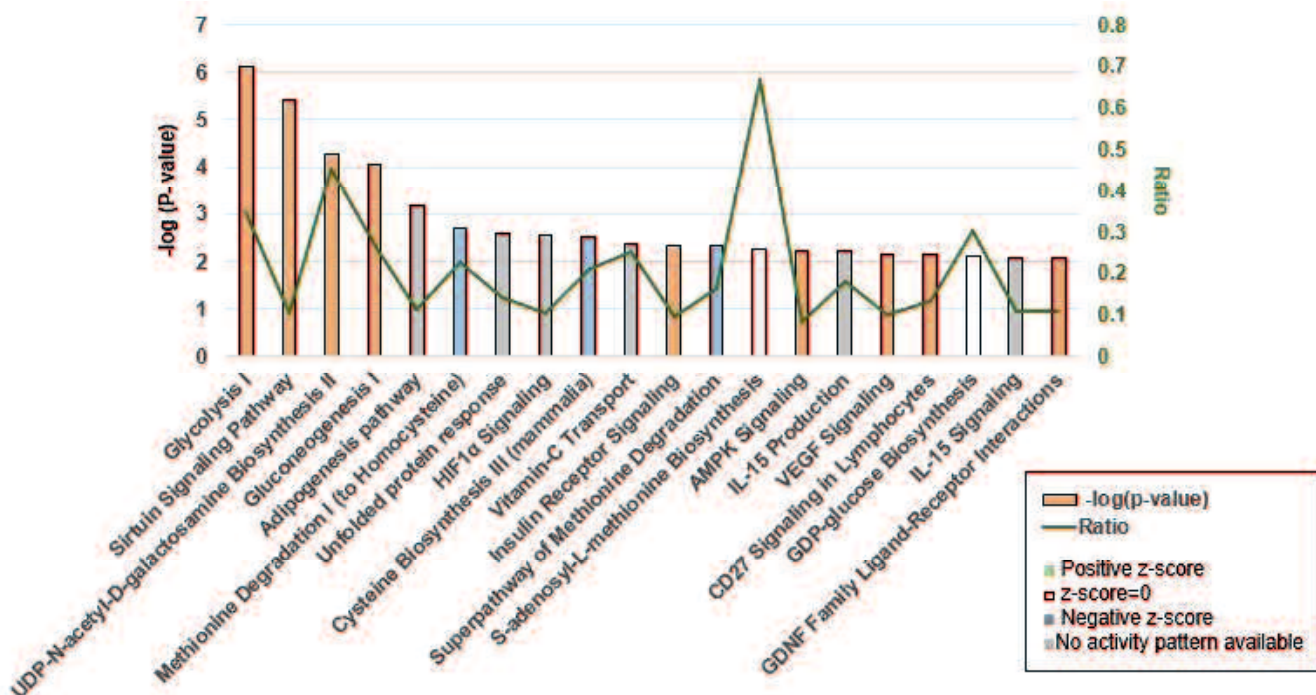


## DFO 投与によりエネルギー代謝関連遺伝子発現が変化する

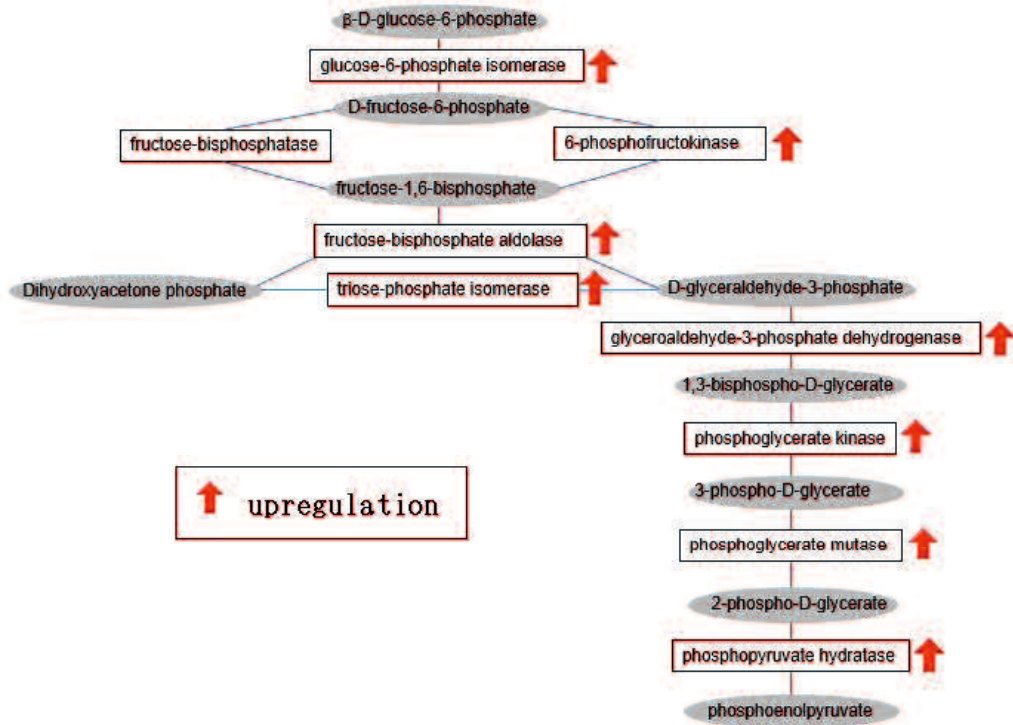
MSC に DFO 50  $\mu$ M 投与後 12 時間で RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。IPA ソフトウェアを用いて遺伝子の機能分類を行ったところ、Glycolysis、Gluconeogenesis などの解糖系に関わるパスウェイや、HIF1 $\alpha$  シグナリングや VEGF シグナリングが変化の見られたパスウェイとして挙げられた (Fig. 2A)。Glycolysis パスウェイに注目すると glucose 6 phosphate isomerase, 6-phosphofructokinase, fructose-bisphosphate aldolase, triose-phosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoglycerate kinase, phosphoglycerate mutase, phosphopyruvate hydratase などの酵素の発現の増加が認められた (Fig. 2B)。HIF1 $\alpha$  パスウェイでは HIF1 $\alpha$  のターゲット遺伝子である GLUT、LDH、VEGF の発現増加が認められ、DFO による HIF1 $\alpha$  の分解抑制による変化として矛盾しない結果であった (Fig. 2C)。Activated または Inhibit された Upstream 因子について評価したところ、Deferoxamine の他に HIF1 $\alpha$  が最も Activate されており、低酸素刺激によって誘導される EPAS1 や PDGF が挙がっていた。さらにミトコンドリアストレスに関与するといわれている NUPR1 も活性化していた。また抑制されていた Upstream 因子として EGLN (Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase) や curcumin が挙がってきた (Fig. 2D)。

Fig. 2 DFO 投与による遺伝子発現解析

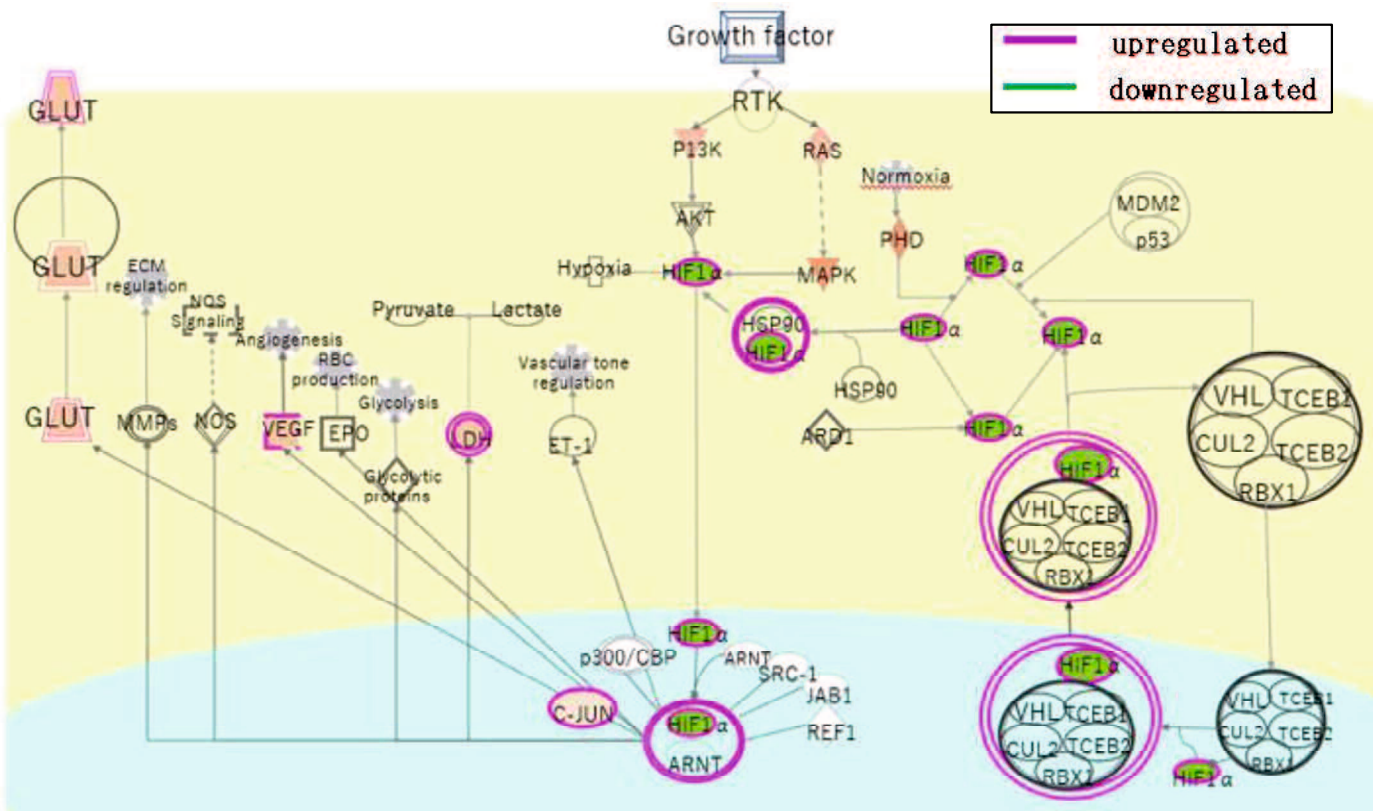
### A. IPA 解析による既知のパスウェイランキング



B. glycolysis pathway において発現変動した遺伝子群



C. HIF1 シグナルパスウェイの変化



D. Upstream regulator の上位 5 つ、下位 5 つの regulator

Upstream Regulator	Predicted Activation State	Activation z-score	p-value of overlap
HIF1A	Activated	6.753	5.2E-24
NUPR1	Activated	5.364	3.4E-11
STAT4	Activated	4.922	7.5E-07
CD38	Activated	4.154	9.1E-06
deferroxamine	Activated	4.034	3.7E-09
PD98059	Inhibited	-3.177	2.9E-03
U0126	Inhibited	-3.354	2.5E-03
curcumin	Inhibited	-3.495	4.1E-01
salirasib	Inhibited	-4.021	3.5E-14
EGLN	Inhibited	-7.307	3.1E-49

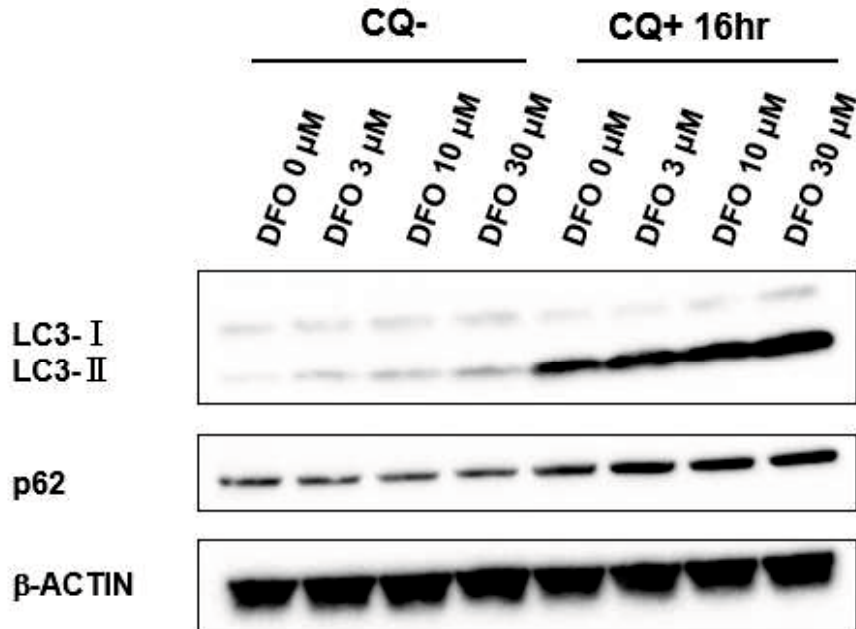
DF0 投与で NUPR1 の発現とオートファジーが亢進する

これまでに我々が報告した DF0 3  $\mu$ M 処理後 48 時間の MSC のマイクロアレイ解析によって得られた発現解析でも NUPR1 の活性化が示唆されたこと [12] と、NUPR1 は細胞保護性オートファジーに関与することから、DF0 投与によりオートファジーが亢進するかどうか検討した。DF0 の濃度に依存して LC3-II の発現増加が認められ、p62 はわずかに発現低下が見られた。オートファジー阻害剤 chloroquine (CQ) を 16 時間処理した細胞で DF0 濃度依存的に LC3-II と p62 の増加が認められオートファジーの亢進が示唆された (Fig. 3A)。さらに DF0 10  $\mu$ M と CQ 投与した細胞を蛍光免疫染色で評価したところ、抗 LC3 抗体陽性の puncta の増加が認められ DF0 投与によるオートファジーの亢進を示唆した (Fig. 3B)。DF0 投与後 48 時間において NUPR1 の発現は、DF0 濃度依存的に発現上昇が認められた (Fig. 3C)。DF0 によって NUPR1 の発現が亢進することから、同様の変化が低酸素によって発現が変化するか検証し、低酸素環境における培養で NUPR1 の発現上昇が認められた (Fig. 3D)。またオートファジーが亢進することが知られているアミノ酸飢餓培地である HBSS 処理後 2 時間から NUPR1 の発現増加が認められた (Fig. 3E)。

Fig. 3 DFO 投与による NUPR1 の発現の変化とオートファジーの評価

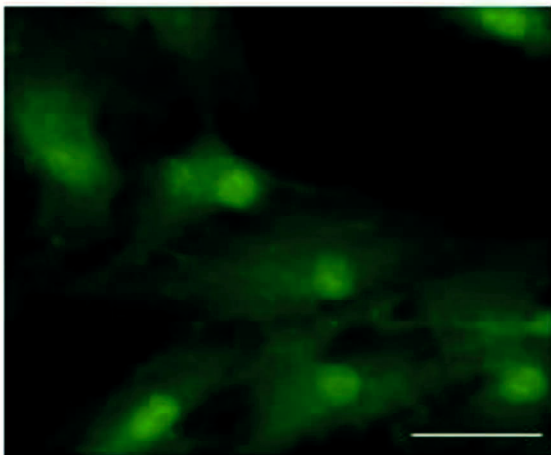
A. DFO 投与によるオートファジー関連タンパクの発現の評価

Chloroquine (CQ) を添加後 16 時間でタンパクを回収し評価した

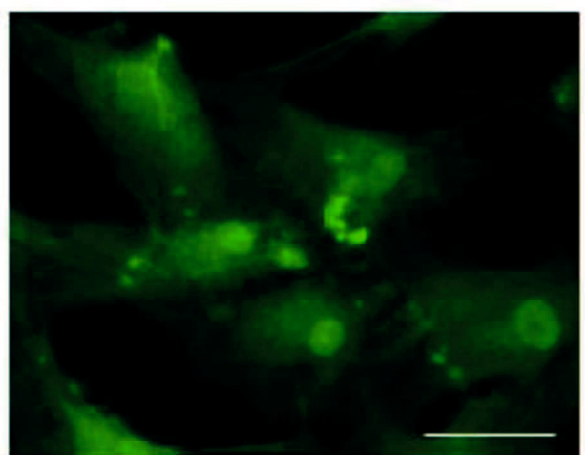


B. オートファジーマーカーLC3 免疫染色による評価

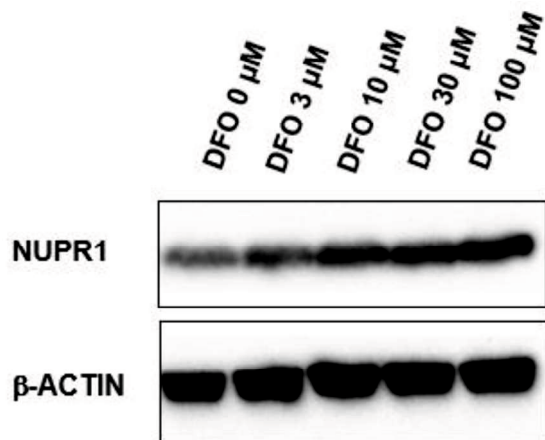
**Anti-LC3**  
**DFO (-) + CQ**



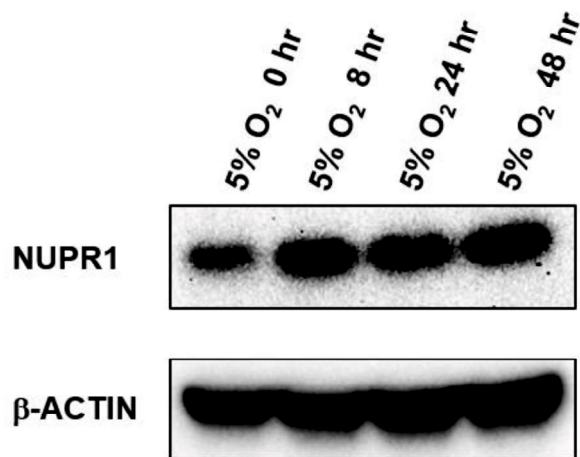
**Anti-LC3**  
**DFO (+) + CQ**



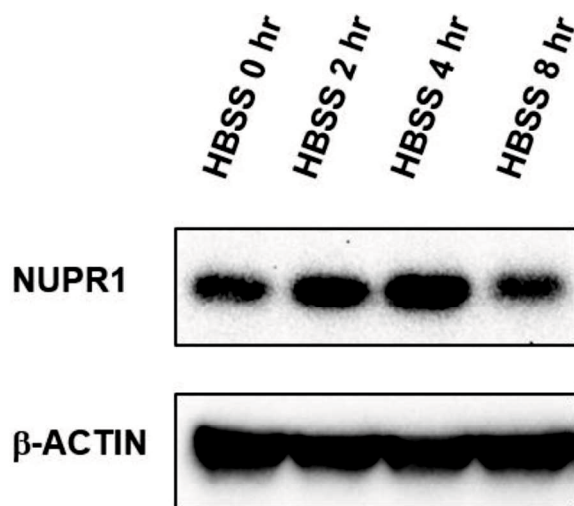
C. DFO 投与による NUPR1 の発現の変化の評価



D. 低酸素処理による NUPR1 の発現の変化の評価



E. アミノ酸欠乏培地 (HBSS) 培養での NUPR1 の発現の変化の評価

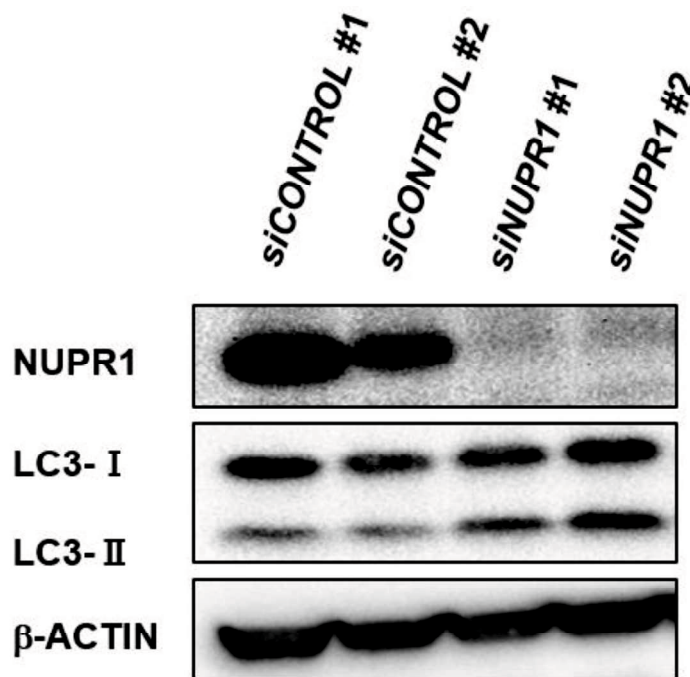


NUPR1 ノックダウンにより MSC の増殖性が低下し、Drug resistance が低下する

次に MSC において NUPR1 の機能評価をするため、siRNA で NUPR1 をノックダウンして検討した。ノックダウンした細胞で LC3-II の増加が認められた (Fig. 4A)。通常培地で増殖性を評価したところ、NUPR1 をノックダウンした細胞では増殖性の軽度低下が認められた、さらに DFO を投与した培地では増殖性の低下の差がより大きくなった (Fig. 4B)。次にこれまでにがん細胞で NUPR1 の drug resistance への関与が報告されているため、staurosporine 投与によるアポトーシスの評価を行った。NUPR1 ノックダウンにより staurosporine によって誘導される Caspase3 活性の増加が認められた (Fig. 4C)。

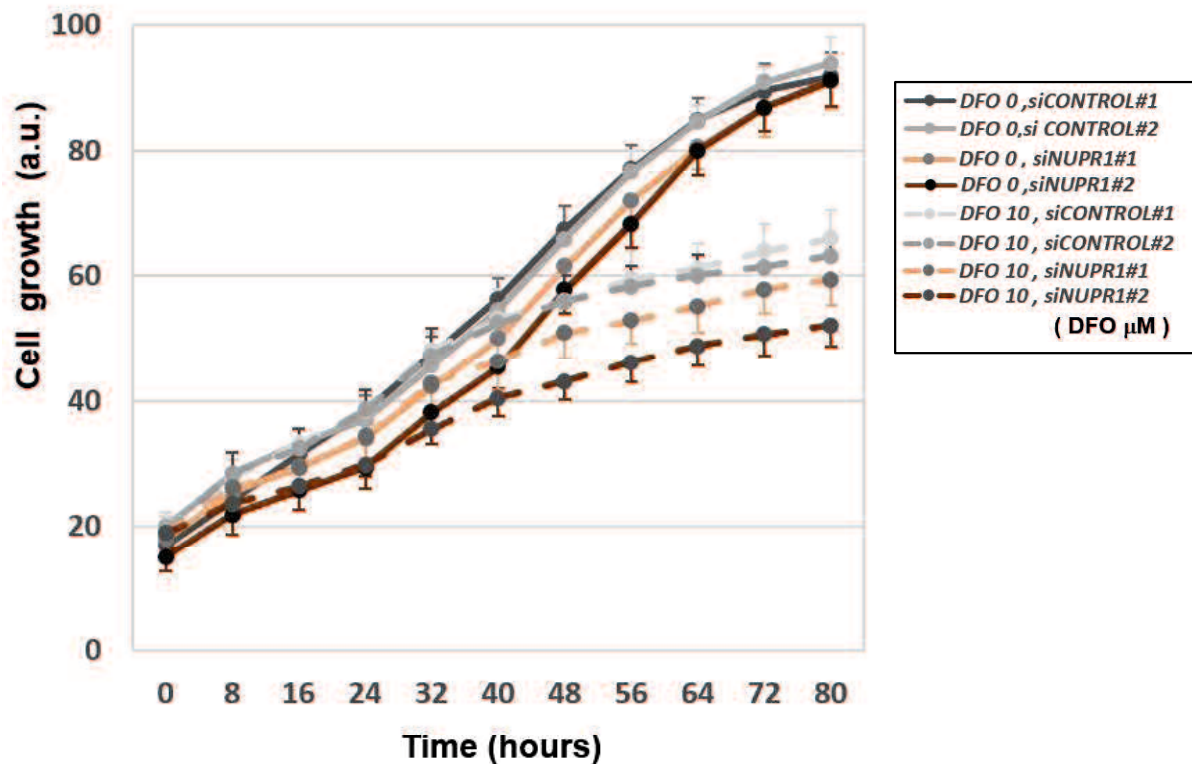
Fig. 4 NUPR1 ノックダウンにより起こる変化の解析

A. siRNA により NUPR1 をノックダウンした MSC のウエスタンブロットによる解析



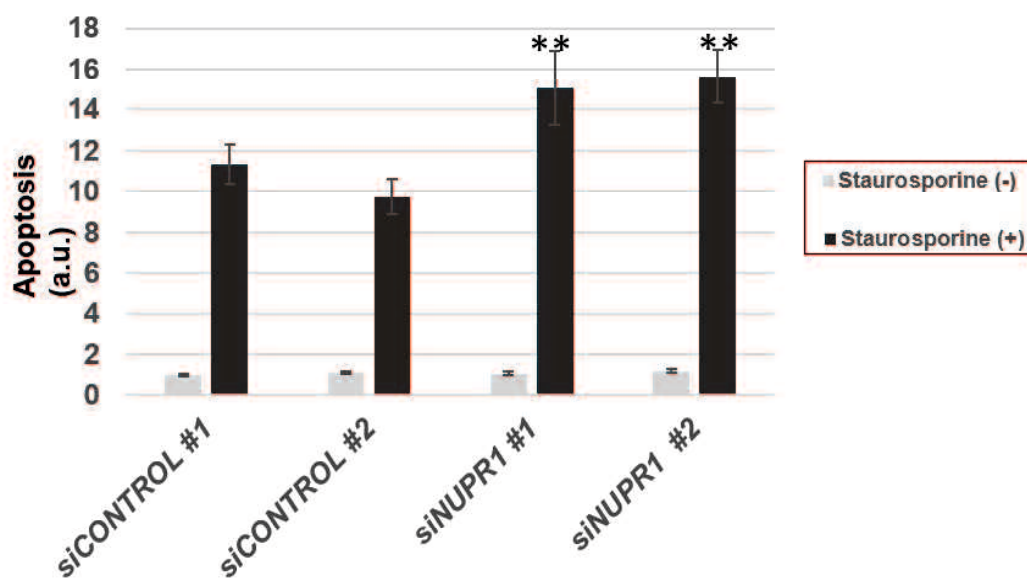
B. NUPR1 ノックダウンが MSC の増殖性に及ぼす影響の評価

Incucyte により増殖性を 2 時間ごとに測定した (n=6)。



B. NUPR1 ノックダウンが Staurosporine による誘導アポトーシスに及ぼす影響の評価

staurosporine 投与 6 時間後の Casp3 活性を示した。Casp3 の活性は細胞数により補正した。\*\*は siCONTROL#1 に対する統計学的有意差、 $p < 0.01$  を示している。



## 5. 考察

これまでに MSC の低酸素培養に関する研究が行われ、MSC を筋肉内注射した際に低酸素プレコンディショニングした細胞の細胞保持率が高かったという報告[7、9]など、低酸素プレコンディショニングの有用性が注目されている。DF0 は古くから鉄過剰症に使われている安全性が高い薬剤で、低酸素環境を模倣することから、低酸素培養に代わる方法になり得ることをこれまでに我々は報告している[12]。プレコンディショニングに有用な濃度であると報告した DF0 3  $\mu\text{M}$ 、48 時間処理後の増殖性と DF0 約 50  $\mu\text{M}$ 、12 時間の処理後の増殖速度がほぼ同程度となったこと、細胞の ATP 量の低下と OCR の低下が認められたことからミトコンドリアの酸化的リン酸化の阻害が起こり解糖系優位の代謝に変化したことから、これまでの 48 時間よりもより短時間の処理で MSC をプレコンディショニングできる可能性が示された。

これまでに DF0 の増殖抑制には主に HIF1 $\alpha$  の分解に必要な水酸化を起こす PDH の活性低下による HIF1 $\alpha$  の蓄積によるものと考えられている。既知のパスウェイ解析では Glycolysis が第一位にランクされ生体内に必要な 6 種の代謝物のうち、Pyruvate を除く 5 種の合成に関わる酵素の遺伝子発現の増加が認められ、解糖系代謝とミトコンドリア代謝に関わるサーチュインシグナルパスウェイ、HIF1 $\alpha$ 、VEGF シグナリングもランクされたことから、12 時間の処理でも鉄をキレートすることによる低酸素環境を模倣する変化が明らかであった。変化のあった upstream regulators には、HIF1 $\alpha$  や NUPR1 の上昇、EGLN やクルクミンなどの低下が認められた。EGLN はその酵素活性のために鉄が必要であることから、低下した upstream regulator として挙がってきた理由としては DF0 により鉄がキレートされたことを示唆していると考えられる。クルクミンには鉄キレート作用が示されており[15]、マウスやラットで鉄を低減させることが報告されており[16]、酸化ストレス抑制などへの応用が期待されている[15]。上昇した upstream regulator として NUPR1 があげられるが、48 時間 10  $\mu\text{M}$  DF0 処理した細胞でも同様の結果であった[12]。NUPR1 は癌細胞で化学療法耐性に関わる重要な遺伝子であることが示唆されており、栄養飢餓や低酸素などの環境ストレスにより誘導される。さらに NUPR1 は細胞保護性オートファジーへの関与[13]や、p53 を介した細胞周期抑制能を持つことが知られている。そこで実際に DF0 によりオートファジーが MSC で起こるか評価したところ DF0 と CQ を投与することで LC3-II の増加と p62 の増加が認められ、オートファジーが亢進することが示された。さらに NUPR1 の発現を評価したところ、NUPR1 は DF0、低酸素、アミノ酸飢餓での発現上昇が認められ、オートファジーの亢進と共に発現が増加していた。オートファジーは、代謝前駆物質の再生と細胞内不要物の消去を行うことにより細胞機能を維持するという、ストレス下の生存メカニズムや、細胞内小器官のターンオーバーにより細胞死を予防する保護的メカニズムとして機能している[17]。NIH3T3 線維芽細胞で DF0 処理がタンパク質凝集とアグリソームを誘



導し、オートファジー関連遺伝子である p62/SQSTM1 を誘導させることが報告されているが [18]、一方で鉄過剰状態でもオートファジーが起こり、DF0 投与でオートファジーを抑制することが報告されていることもあり [19]、培養環境や細胞の状態で変化することが考えられる。

NUPR1 が細胞保護性オートファジーに関与することが注目されていることから [13]、NUPR1 の働きを評価するために siRNA によるノックダウンを行い、細胞の増殖性の低下が認められた。それは MSC において NUPR1 が生存促進因子として働いていることが考えられる。NUPR1 のノックダウンは癌細胞の増殖を抑制することが報告されているが [20]、今回の結果はその報告と比較して程度が低いものであった。NUPR1 ノックダウンで LC3-II の増加が認められたことは、これまでに A549 細胞などで NUPR1 がオートリソソーム放出の調節に関与すること、NUPR1 欠乏がオートファジーの誘導やオートリソソームによるクリアランスを障害するという報告 [21] と矛盾しない。また細胞質の空胞化と細胞の早期老化が NUPR1 欠乏で認められたことも報告されている。しかし本研究では MSC で明らかな空胞化や早期老化は認めなかった (data not shown)。増殖抑制が癌細胞に比べて低いことから MSC では NUPR1 への依存性が癌細胞に比べ低く、早期老化などのフェノタイプが出にくいと考えられるが、今後更なる解析が必要である。

本研究では NUPR1 をノックダウンすることにより staurosporine によるアポトーシスが亢進し NUPR1 の薬剤耐性の重要性が示されたが、これまでに NUPR1 は薬剤耐性に関わっていることが報告されているものの [22]、詳細な薬物耐性機構については未だ明らかにされていない。膵癌細胞で飢餓状態や gemcitabine に耐性を持つ原因として NUPR1/RELB/IER3 survival pathway の関与や、乳癌細胞では CDKN1A/p21 リン酸化と核外移行が doxorubicin などの化学療法剤への耐性に重要であると報告されている [23]。本研究でも p21 の細胞質局在とリン酸化について評価したが明らかな変化は認めず (data not shown)、更なる解析が必要である。近年、癌細胞以外の細胞でも NUPR1 の有用性が検討されており、ケラチノサイトでは紫外線刺激によるストレス反応に関与していることが報告されている [24] ことから、MSC における NUPR1 の有用性は今後さらに詳細に検討される必要があると考えられる。

以上、MSC の 12 時間という短時間での DF0 プレコンディショニングでも、解糖系優位の代謝変化が起こることからより早いプレコンディショニングを行える可能性が示された。さらに DF0 投与、低酸素、飢餓状態によって NUPR1 は発現亢進し、細胞生存改善につながる可能性があることから、今後本研究は MSC を用いた再生医療を行う際に必要な MSC の調製に重要な知見になると考えられる。

## 6. 結語

BMSC に対して短時間の DFO を投与することにより、NUPR1 が活性化され、細胞保護的オートファジーの亢進や、ストレス耐性因子として働くことで細胞の生存促進に働くことが示された。本研究で得られた知見は BMSC 投与後の生存率改善など、今後の再生医療の進歩に有益なものになると考えられる。

## 7. 謝辞

本研究に当たり、熱心にご指導いただきました消化器内科学 坂井田 功教授、高見太郎講師、藤澤浩一助教、技術指導をいただきましたスタッフの皆様に心より感謝申し上げます。

本論文は下記雑誌にて公開している論文を和訳したものである。

Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition より学位論文としての投稿を許可されている。

論文題目 : NUPR1 acts as a pro-survival factor in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and is induced by the hypoxia mimetic reagent deferoxamine

著者 : Kazuhito Matsunaga, Koichi Fujisawa, Taro Takami, Guzel Burganova, Nanami Sasai, Toshihiko Matsumoto, Naoki Yamamoto, Isao Sakaida

## 8. 参考文献

- 1 Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010 Apr;223: 27-35.
- 2 Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*. 2014 May;3: 643-52.
- 3 Sugrue T, Lowndes NF, Ceredig R. Hypoxia enhances the radioresistance of mouse mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2014 Aug;32: 2188-200.
- 4 Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, et al. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells*. 2015 Jun;33: 1818-28.
- 5 Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Aug;26: 2173-82.
- 6 Oses C, Olivares B, Ezquer M, et al. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferoxamine increases the production of pro-angiogenic, neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS One*. 2017;12: e0178011.
- 7 Nouri F, Salehinejad P, Nematollahi-Mahani SN, Kamarul T, Zarrindast MR, Sharifi AM. Deferoxamine Preconditioning of Neural-Like Cells Derived from Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells as a Strategy to Promote Their Tolerance and Therapeutic Potential: An In Vitro Study. *Cell Mol Neurobiol*. 2016 Jul;36: 689-700.
- 8 Cheng XW, Kuzuya M, Kim W, et al. Exercise training stimulates ischemia-induced neovascularization via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent hypoxia-induced factor-1 alpha reactivation in mice of advanced age. *Circulation*. 2010 Aug 17;122: 707-16.
- 9 Najafi R, Sharifi AM. Deferoxamine preconditioning potentiates mesenchymal stem cell homing in vitro and in streptozotocin-diabetic rats. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 Jul;13: 959-72.
- 10 Qin HH, Filippi C, Sun S, Lehec S, Dhawan A, Hughes RD. Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells on co-cultured human primary hepatocytes. *Stem cell research & therapy*. 2015 Dec 1;6: 237.
- 11 Chu K, Jung KH, Kim SJ, et al. Transplantation of human neural stem cells protect against ischemia in a preventive mode via hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in

the host brain. *Brain Res.* 2008 May 1;1207: 182-92.

12 Fujisawa K, Takami T, Okada S, et al. Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions. *Stem Cells.* 2018 Aug;36: 1226-36.

13 Hamidi T, Cano CE, Grasso D, et al. Nupr1-aurora kinase A pathway provides protection against metabolic stress-mediated autophagic-associated cell death. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 1;18: 5234-46.

14 Fujisawa K, Hara K, Takami T, et al. Evaluation of the effects of ascorbic acid on metabolism of human mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy.* 2018 Apr 6;9: 93.

15 Jiao Y, Wilkinson Jt, Christine Pietsch E, et al. Iron chelation in the biological activity of curcumin. *Free Radic Biol Med.* 2006 Apr 1;40: 1152-60.

16 Chin D, Huebbe P, Frank J, Rimbach G, Pallauf K. Curcumin may impair iron status when fed to mice for six months. *Redox Biol.* 2014;2: 563-9.

17 Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013 May 9;368: 1845-6.

18 Inoue H, Hanawa N, Katsumata SI, Katsumata-Tsuboi R, Takahashi N, Uehara M. Iron deficiency induces autophagy and activates Nrf2 signal through modulating p62/SQSTM1. *Biomed Res.* 2017;38: 343-50.

19 Zheng Q, Zhao Y, Guo J, et al. Iron overload promotes mitochondrial fragmentation in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients through activation of the AMPK/MFF/Drp1 pathway. *Cell Death Dis.* 2018 May 1;9: 515.

20 Grasso D, Garcia MN, Hamidi T, et al. Genetic inactivation of the pancreatitis-inducible gene Nupr1 impairs PanIN formation by modulating Kras(G12D)-induced senescence. *Cell Death Differ.* 2014 Oct;21: 1633-41.

21 Mu Y, Yan X, Li D, et al. NUPR1 maintains autolysosomal efflux by activating SNAP25 transcription in cancer cells. *Autophagy.* 2018;14: 654-70.

22 Malicet C, Giroux V, Vasseur S, Dagorn JC, Neira JL, Iovanna JL. Regulation of apoptosis by the p8/prothymosin alpha complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 21;103: 2671-6.

23 Vincent AJ, Ren S, Harris LG, et al. Cytoplasmic translocation of p21 mediates NUPR1-induced chemoresistance: NUPR1 and p21 in chemoresistance. *FEBS Lett.* 2012 Sep 21;586: 3429-34.

24 Narzt MS, Nagelreiter IM, Oskolkova O, et al. A novel role for NUPR1 in the keratinocyte stress response to UV oxidized phospholipids. *Redox Biol.* 2018 Nov 13;20: 467-82.