

## 血管ニッチにおける老化シグナルを介した組織幹細胞不全発症機序の解明

南野 徹<sup>1)</sup>, 岩間厚志<sup>2)</sup>

1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 循環器内科

2) 千葉大学大学院医学研究科 細胞分子医学

### 【研究の背景】

通常ヒト正常体細胞は、ある一定回数の分裂増殖後、細胞老化とよばれる分裂停止状態となる。テロメアの短縮をはじめとした様々な DNA ダメージシグナルが p53/p21 や p16 を活性化することで細胞老化が誘導される。ヒト培養細胞の寿命はドナーの年齢に相関すること、また、早老症候群患者より得られた培養細胞の寿命は有意に短いこと、さらに、老化細胞の形質変化が加齢に伴う様々な病的老化の表現系に類似していることなどが報告されている。そこで我々は、老化研究を「細胞レベルの老化が個体老化の一部の形質、特に加齢に伴う病的老化形質を担う」という細胞老化仮説に基づいて始めることにした。

これまでの研究で我々は、ヒト動脈硬化巣に老化血管細胞の集積が認められること(Circulation 2002)、老化血管細胞が様々な血管機能障害の形質(NO 産生の低下や炎症分子の発現の亢進など)を示すことで、動脈硬化やインスリン抵抗性の発症・進展に関与していることを、血管特異的 p53 欠失マウスや p21 欠失マウスを用いた解析によって明らかにした(Circulation 2003, Circulation 2006, EMBO J 2004, Cell Rep 2014)。また、肥満マウスや 2 型糖尿病患者の内臓脂肪においても老化細胞が蓄積しており、p53/p21 シグナルの活性化とともに慢性炎症を惹起し、インスリン抵抗性を誘導していた。これらの形質は、脂肪特異的 p53 欠失によって改善したことから、脂肪組織における老化細胞の蓄積が、2 型糖尿病の発症・進展に重要であることが明らかとなった(Nat Med 2009)。さらに、心不全の病態において、心臓組織内の心筋・血管・マクロファージの p53 シグナルの活性化がその発症・進展に関与していること(Nature 2007, JMCC 2015)、心不全に伴って脂肪組織における p53 シグナルの活性化が惹起されることでさらに心機能が負に制御されていること、これらの悪循環は脂肪組織特異的 p53 欠失・抑制により改善することを明らかにしてきた(Cell Metab 2012)。以上の結果は、p53 依存性老化シグナルの活性化が病的老化に関与しており、その活性化を抑制することによって動脈硬化や心不全、糖尿病などの加齢関連疾患の発症・進展を抑制できる可能性を示唆する(Circ Res 2007, Nat Rev Cardiol 2008, Cell Metab 2014)。

様々な組織において、血管は幹細胞ニッチとして働き、幹細胞の機能制御にきわめて重要な機能を有する(Morrison and Scadden *Nature* 2014, Pannerec et al. *Trends Mol Med* 2012, Goldman and Chen *Nat Neurosci* 2012, Berry et al. *Development* 2013)。血管は幹細胞の足場としてのみならず、幹細胞の特殊な酸素濃度指向性や代謝を維持するためにも極めて重要な役割を有する。血液幹細胞の増殖や分化についても、ニッチと呼ばれる微小環境が重要な役割を持っている。多くの血液幹細胞は血管の近くに存在することが知られている。具体的には、約 80%の血液幹細胞は類洞の血管細胞近くに存在し、10%は小血管に、残りの細胞は移行帯に存在する血管近くに存在する。CXC-chemokine ligand 12(CXCL12)や stem cell factor(SCF)は、主要なニッチ因子として知られており、血液幹細胞の維持に重要な役割を持っている。血管周囲に存在する間葉系細胞はニッチとして働き、高レベルの CXCL12 や SCF を発現しており、レプチン受容体が陽性であることが知られている。

一方で、申請者らを含めた複数のグループは、加齢や過食といったストレスにより、p53 依存性シグナルの活性化と老化細胞の蓄積が促進される現象を確認している。p53 は酸化ストレスや低酸素、がん原性刺激など様々な刺激によって活性化され、組織における細胞老化を促進することで、様々な加齢関連疾患、すなわち、動脈硬化や心不全、糖尿病などに関与する。これらの変化は、長寿をもたらすカロリー制限によって抑制されることから、加齢関連疾患の発症・進展に強く関与するも

のと想定される。興味深いことに、こうした p53 シグナルの活性化は全ての細胞で均一に誘導されるわけではない。申請者らは、「ヒトは血管から老いる」と言われるように、加齢や過栄養などのストレスによってまず血管において p53 シグナルが活性化され、その後、臓器・組織の老化が進行することを示唆してきた。しかしながら、これらの老化シグナルが、血液幹細胞の血管ニッチ環境に与える影響については知られていない。

## 【目 的】

血液幹細胞は、生物の生涯にわたって、炎症や感染、ゲノムストレスなど様々な外的刺激に暴露される。これらの刺激は、血液幹細胞の細胞数を減らすばかりでなく、その機能を低下させることで、病的老化や悪性化、すなわち、幹細胞老化の原因となっている。しかしこれらの刺激が、どのように血液幹細胞のニッチ(間葉系細胞・類洞血管細胞)の老化に影響を与えるか、ニッチの老化がどのように血液幹細胞の機能不全に関与しているかについてはよく知られていない。そこで本研究では、ニッチの老化に焦点を当てて研究を進めることとした。

## 【方 法】

申請者らはこれまでの研究において、組織特異的 p53 ノックアウトマウスモデルを確立し、心臓や脂肪組織における p53 の活性化が、それぞれ心不全や糖尿病の発症に重要であることを明らかにした。これまでの検討により、加齢や過食などのストレスによって、まず血管において p53 シグナルが活性化し細胞老化様形質が出現する。その後、臓器の機能異常が進行することを観察している。この際、血管ニッチにおける p53 依存性老化シグナルの活性化が、ニッチと組織幹細胞とのコミュニケーションの不調を誘導し、臓器・組織の機能不全や再生能の低下をもたらしている可能性が想定される。この仮説を検証するため、まず、放射線照射や抗がん剤などのストレスを加えることで、どのように血管ニッチが老化性変化をきたし、血液幹細胞や前駆細胞に影響を与えるかを検討した。次に、タモキシフェンによって p53 の抑制因子である Mdm2 の欠失を血管特異的に誘導するシステムを用いて、血管内皮特異的に p53 シグナルを活性化するマウスモデルを確立した。血管内皮 p53 活性化に伴う血管ニッチの組織学的変化を検証しつつ、血液幹細胞や前駆細胞の量的変化や質的变化について FACS や PCR 解析などを用いて検証した。これらのマウスの形質を放射線照射や抗がん剤などのストレスを与えたマウスと比較した。

## 【結 果】

血液幹細胞の老化を促進する因子として放射線暴露や 5-FU などの化学療法治療薬が知られている。しかし、その血管ニッチに対する影響については知られていない。そこでまずマウスに対して放射線暴露や 5-FU 投与を行なった後、骨髄組織の血管ニッチの形質について調べてみたところ、老化シグナル p53 の活性化と血管細胞数の減少が認められた。PCR 解析では、p53 の標的遺伝子である Cdkn1a や Bax の発現の増加も認められた。組織学的には、血管ニッチ構造の異常な変化も認められた。次に、高齢マウスにおいて血管ニッチの形質を検証したところ、同様に p53 発現の増加を認めた。

次に血管内皮細胞特異的 Mdm2 ノックアウトマウスを確立し、p53 活性化による血管ニッチ機能の変化を観察した。高容量のタモキシフェンにより p53 の活性化を誘導すると、マウスは 2 週間以内に死亡したが、これらの形質は p53 をダブルノックアウトすることで、完全に改善することから、p53 依存的な形質であることが確認された。低用量のタモキシフェン誘導では血管ニッチにおける p53 の活性化は認めるものの、致命的な形質を認めなかった。このような条件においては、血管ニッチ構造の異常な変化とともに、血液幹細胞死数の増加、血液幹細胞や前駆細胞数の減少を認めた。これらの変化は、p53 をダブルノックアウトすることで、完全に改善することから、p53 依存的な形質であることが確認された。また、血管ニッチ機能の低下に伴って、末梢循環での血液前駆細胞の流出が促進されており、細胞分裂の促進傾向も認めた。

最後にこれらの血管ニッチにおける網羅的トランスクリプトーム解析を行ったところ、p53 活性化に伴ってその標的遺伝子群の発現の亢進、CXCL12 や SCF などの発現低下を認めた。

## 【考 察】

本研究において、加齢や放射線暴露、5-FUなどの化学療法治療薬による形質が、血管内皮細胞特異的Mdm2ノックアウトマウスに類似していたことは、ストレスがまず血管ニッチの形質変化をもたらすことで、血液幹細胞のステムネスに影響を及ぼしていることが明らかとなった。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

加齢や放射線暴露、5-FUなどの化学療法治療薬に伴う骨髄機能の低下に対して、血管ニッチを標的とした治療ストラテジーの開発が期待される。

## 【参考・引用文献】

Minamino T and Iwama A et al. Hematopoietic insults damage bone marrow niche by activating p53 in vascular endothelial cells. *Experimental Hematology* 2018; 63: 41-51.