

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01484

研究課題名(和文) 運動器再生におけるNrf2の機能と間葉系幹細胞における重要性の解明

研究課題名(英文) Function and regulation of Nrf2 in mesenchymal stem cells

研究代表者

福田 寛二 (FUKUDA, Kanji)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50201744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体内において酸化ストレス除去を担う分子経路のマスター転写因子であるNrf2に着目し、運動器において最も含有量の多い幹細胞である間葉系幹細胞においてその発現調節機序と機能を明らかにすることを目的に研究を行った。加齢組織においては慢性炎症、あるいは転写因子Notch1の減少によりmiR-155が誘導され、C/ebp の発現が抑制されることでNrf2の発現抑制が生じ、抗ストレス経路の破綻が生じることが明らかとなった。Nrf2には幹細胞の自己複製、エピジェネティック修飾の維持に関わる機能を有することも示唆されたことから、Nrf2は運動機能維持を旨とした標的分子になりうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、加齢に伴う運動組織の退行メカニズムの解明に寄与する。また、本研究では運動負荷、ヒアルロン酸投与の二法により、抗酸化ストレスあるいは幹細胞機能の維持に重要な転写因子Nrf2の発現を賦活できる可能性を報告している。研究成果をさらに発展させることで、近年社会的な問題になっているロコモティブシンドロームをはじめとした、加齢性運動機能障害の新規治療法の開発に貢献しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Accumulation of reactive oxygen species (ROS) is a major indication of aging and could be a direct reason for tissue degeneration. Nrf2 is a master transcription factor for the anti-oxidation-related genes and disturbing its expression level lead to attenuation of the redox systems. We found that expression of Nrf2 is suppressed in aged bone marrow tissues and muscles. We found here that aging-associated-inflammation commonly observed in various aged tissues and disruption of Notch1 expression trigger overexpression of miR-155, and miR-155 inhibits expression of Nrf2 through suppression of C/ebp . This mechanism is conserved in bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) and muscular satellite cells. Results of transcriptome analysis on Nrf2 KO mice showed that Nrf2 could participate various stem cell function such as self-renewal and maintenance of epigenetic status, thus regulation of Nrf2 could be an attractive target molecule for anti-aging therapy of various locomotive tissues.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：間葉系幹細胞 幹細胞老化 ロコモティブシンドローム miRNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国は超高齢社会となっており、少子化、人口減少が進行する社会状況においては、高齢者の健康増進および社会参加が重要な課題である。高齢者の活動を制約する要因として、運動器不安定症（ロコモティブシンドローム）、サルコペニア、変形性関節症（OA）といった加齢関連性運動器疾患が挙げられる。これらはQOLを大きく低下させるだけでなく、他の疾患を合併する要因ともなりうる。様々な医学的アプローチにより、発症に至る機序やリスク因子などが明らかになりつつあるが、有効な治療法は未だ存在しない。

加齢に伴う組織退行変化において、活性酸素（ROS）の発生と蓄積は最も重要な因子である。体内外において、細胞は様々なストレスに晒されている。ROSはストレス反応のメディエーターとなりうる分子であり、非生理的レベルで産生されたROSは組織を不可逆的に変性させる。加齢組織においてはROSの蓄積が見られることが明らかになっており、加齢に伴う慢性炎症や細胞機能の低下と深く関わっていると考えられている。一方で、正常細胞には抗ストレス・解毒機構が備わっており、ROSの発生に対しては転写因子Nrf2が上流転写因子として機能することが明らかになっている。Nrf2は恒常性維持に必須の因子であり、そのノックアウトマウスは赤血球形体異常、血球数の現象、マクロファージの増加、ビリルビン値の上昇、肝機能低下、髄鞘形体異常、免疫機能の低下など全身性に異常をきたす。加齢組織において、Nrf2の発現量が低下することも明らかになっている。

すなわち、運動器におけるNrf2の機能を理解するとともに、Nrf2の量的調節に関わる要素を明らかにできれば、炎症、加齢による組織破壊の防止に寄与する新たな治療方策を開発できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動器の恒常性維持を担う分子機構が加齢により破綻するメカニズムを理解することである。本研究では特に、運動器の維持、再生に重要な機能をもつ間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSC）における、抗ストレス機構のマスター因子であるNrf2の調節機構、幹細胞におけるNrf2の機能を明らかにする。これにより、運動器の破綻や回復マーカーとしてのNrf2の可能性、さらにはNrf2を賦活することによる運動器再生の可能性について考察することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は①加齢モデルマウス、筋損傷モデルマウスを用いた検討、②マウス初代細胞、ヒト細胞株を用いた検討、③Nrf2ノックアウトマウスを用いた検討によりNrf2を制御する分子メカニズムの解明、Nrf2により制御される遺伝子ならびに分子カスケードの同定を検討する。

実験①：3週齢C57BL/6マウスをコントロールとし、18ヶ月齢同系マウスを加齢モデルとして使用した。同モデルより骨髄組織および骨髄MSC、大腿部筋組織および筋衛星細胞をサンプリングし、CellROXによるROS蓄積、qRT-PCR、ウェスタンブロット（WB）によるNrf2、抗酸化系遺伝子、MSCの分化・増殖に関わる遺伝子等の発現を観察した。骨髄MSCについては、骨髄組織を細切、コラゲナーゼ処理ののち、FITCコンジュゲート抗CD45抗体、同抗Ter119抗体、APCコンジュゲート抗PDGFRα抗体、PEコンジュゲート抗Sca1抗体と反応させ、FACS AriaIIによりCD45⁻/Ter119⁻/PDGFRα⁺/Sca1⁺画分を未分化MSCとしてソーティングした。筋衛星細胞については、FITCコンジュゲート抗CD11b抗体、同抗CD31抗体、同抗CD45抗体、PEコンジュゲート抗CD29抗体、APCコンジュゲート抗ITGA7抗体と反応させ、FACS AriaIIによりCD11b⁻/CD31⁻/CD45⁻/ITGA7⁺/CD29⁺画分をソーティングした。

実験②：実験①において、加齢組織ではNrf2の発現が低下するとともに、炎症により発現が上昇する短鎖非コードRNA(miRNA)miR-155が誘導されることが明らかになった。この結果から、加齢組織ではmiR-155がNrf2を抑制するという仮説をたて、これを証明するためマウス初代骨髄MSC、C2C12細胞株においてGFP-miR-155発現プラスミドを用いた強制発現実験、miR-155 mimicを用いたmiRNA導入実験を実施した。前者はGFP遺伝子の3' UTRとしてmiR-155が強制発現するコンストラクトであり、電気穿孔法にて実施した。後者はLipofectamine RNAiMAXを用いて導入した。miR-155発現細胞におけるNrf2の発現はqRT-PCR、WBにより行った。また、ヒトでも同様の現象が生じることを確認するため、ヒト株化MSC（医薬基盤研JCRB1133）を用い、miR-155 mimic RNAの導入によるNrf2の発現を観察した。

実験③：MSCにおけるNrf2の機能を解明するため、Nrf2ノックアウトマウスより初代MSCを作成し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現の変化を観察した。山本雅之先生（東北大学大学院医科学研究科医化学分野）より5週齢Nrf2ノックアウトマウス大腿部を譲り受け、骨髄組織より初代MSCを樹立した。同条件で同週同系の野生型マウスよりMSCを樹立し、コントロールとして使用した。

4. 研究成果

若齢マウス、老化マウスより骨髄組織を採取し、CellROXによりROSの蓄積量を観察したところ、加齢マウスにおいて高い蓄積量が認められた。また、加齢骨髄組織では炎症性サイトカインIL-1、IL-6などの発現亢進が認められた。抗ストレス分子の発現を観察したところ、Nrf2をはじめSOD1、Hmox1など主要な抗酸化ストレスタンパク質の発現低下を認めた(図1)。申請者らは、加齢における慢性炎症と抗ストレス分子の発現変化を結びつけるメディエーター分子としてmiRNAに注目し、特に、リウマチ、変形性関節症、慢性筋疾患など運動器疾患との関連性が報告されているmiR-155について検討を行った。

miR-155の発現は加齢骨髄、加齢骨髄MSCで有意に

発現量が上昇しており、また、miR-155を骨髄MSCにおいて強制発現させるとNrf2の発現抑制が生じることが明らかとなった(図2、Onodera et al., Aging Cell 2017)。

次に、加齢および加齢関連性炎症で生じるmiR-155の上昇とNrf2の発現低下が他の運動器でも生じていることを確認するため、若齢マウス、加齢マウスの筋組織およびCD11b⁺/CD31⁻/CD45⁻/ITGA7⁺/CD29⁺筋衛星細胞についてmiR-155、Nrf2の発現を観察した。加齢マウス筋組織、筋衛星細胞ともにmiR-155が高値となっており、Nrf2の発現は抑制されていた(Onodera et al., PLoS One 2018)。次に、miR-155がNrf2を抑制するメカニズムについて、標的予測プログラムTargetScan、

microT-CDS、転写因子結合部位解析プログラムChIP-Atlasを用いて検討したところ、miR-155は主として転写因子C/EBPβを直接の標的とし、間接的にNrf2を抑制することが明らかとなった。さらに、加齢筋組織において転写因子Notch1の低下が認められるという知見に基づき、Notch1コンディショナルノックアウトマウスより筋衛星細胞を樹立、CAG-Creプラスミドの一過性発現によりNotch1をノックアウトしたところ、miR-155の急激な発現上昇とNrf2の低下を認めた(図3)。このことから、加齢組織におけるNrf2の発現量低下は炎症誘導性miRNAであるmiR-155の発現亢進が重要な要因になっていることが明らかとなった。

これまでの研究で、Nrf2は抗ストレス応答カスケードにおけるマスター転写因子として機能することが明らかとなっている。一方、一部のがん細胞においてNrf2は核酸合成、グルタミン代謝にも深く関与していること(Mitsuishi et al., Cancer Cell 2012)、抗老化遺伝子Sirtuinの発現制御に関与していること(Yoon et al., Cell Death Dis 2016)、糖代謝の制御を介してiPS細胞の成立にも関与する(Hawkins et al., Cell Rep 2016)など、幹細胞において幅広い機能があることがわかってきた。そこで我々は、MSCの幹細胞性維持におけるNrf2の機能を理解するため、Nrf2ノックアウトマウスよりMSCを作製し、マイクロアレイ解析を行うことでNrf2が制御する遺伝子ならびにシグナルカスケードの同定に必要な知見を得ることを試みた。5週齢のNrf2ノックアウトマウス

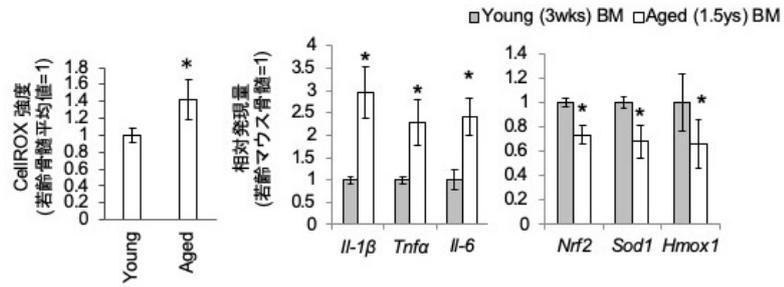


図1. 加齢マウスにおけるROSの蓄積とNrf2の低下

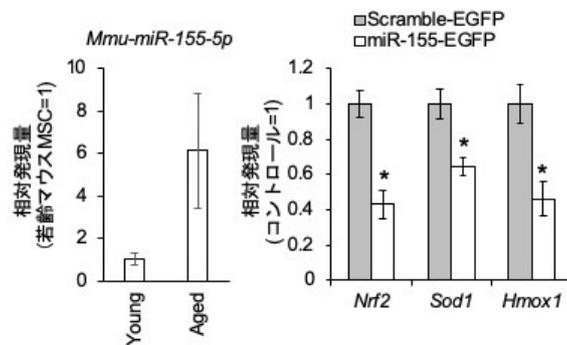


図2. 加齢マウスにおけるmiR-155の発現とmiR-155によるNrf2の抑制

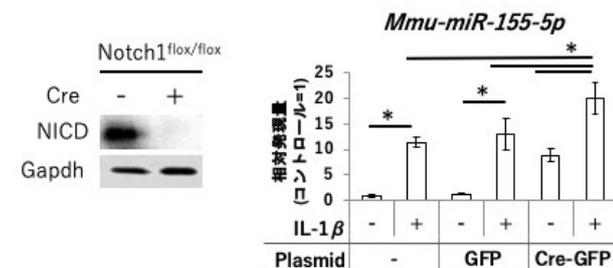
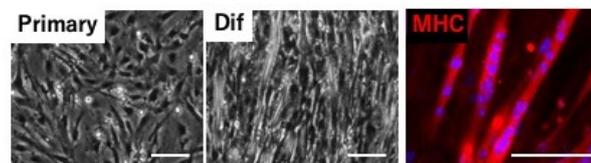


図3. Notch1コンディショナルノックアウトマウス筋衛星細胞におけるmiR-155の発現

5週齢のNrf2ノックアウトマウス

大腿骨より MSC を樹立したところ、ノックアウトマウス由来 MSC は増殖が遅く、細胞質が拡大した細胞を多く認めた。発現解析を行ったところ、Nrf2 ノックアウト MSC において Hmox1、Nqo1、Txn1、Gpx、Prdx など抗酸化ストレス遺伝子が有意に低下していた。幹細胞の自己複製に関する遺伝子について検討したところ、Notch1、Id1、Id4、Snail など MSC の未分化性制御に関する遺伝子に加え、幹細胞のエピジェネティック修飾に関わるポリコム遺伝子 Pcgf1/2/3 が有意に低下していることを発見した (図 4)。現在、ヒト MSC を用いてヒト幹細胞でも同様のメカニズムが保存されているかどうかについて検討を進めている。

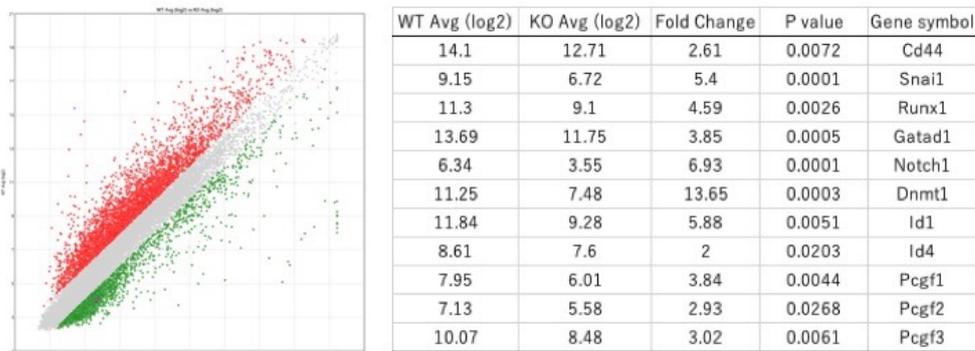


図 4. Nrf2 ノックアウトマウス由来 MSC における幹細胞性関連遺伝子の発現低下

最後に、Nrf2 の量的調節に関連する介入法について運動負荷、ヒアルロン酸投与の 2 点について検討をおこなった。前者は高齢者における運動機能向上、保存を目的に採用される手法であり、後者は変形性膝関節症などで実施されている。その結果、ラットに対する運動負荷は骨髄細胞の Nrf2 量を増加させること、軟骨細胞に対するヒアルロン酸添加は Nrf2 の発現量を上昇させることが明らかとなった。適度な運動負荷が Nrf2 の発現を介し、パーキンソン病実験モデルにおける機能障害を回復させることが報告されており (Aguiar et al. Neurochem Res 2015; Camiletti-Moirón et al. Int J Sports Med 2015) 本研究結果はこれに矛盾しないと考えられる。

本研究では、加齢に伴う運動器の機能低下において、MSC、筋衛星細胞をモデルに抗酸化ストレス分子 Nrf2 の発現低下と活性酸素の蓄積に関する原因解明と介入方法の提案を目指した研究を行った。その結果、骨髄、筋組織で生じる Nrf2 の発現量低下は miR-155 が一因となっており、その発現は炎症や転写因子 Notch1 の喪失で誘導されることが明らかとなった。また、Nrf2 の発現は従来の治療法で誘導できる可能性も示唆され、今後は Nrf2 の機能についてのより詳細な解明と、介入法についての定量的な解析が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1: Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Itokazu M, Mori T, Fukuda K. Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscular satellite cells. PLoS One. 2018 Oct 1;13(10):e0204860. (査読有)
- 2: Teramura T, Onodera Y. Stem cell depletion by inflammation-associated miR-155. Aging (Albany NY). 2018 Jan 23;10(1):17-18. (査読有)
- 3: Onodera Y, Teramura T, Takehara T, Obora K, Mori T, Fukuda K. miR-155 induces ROS generation through downregulation of antioxidation-related genes in mesenchymal stem cells. Aging Cell. 2017 Dec;16(6):1369-1380. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 糸数真紀、小野寺勇太、竹原俊幸、寺村岳士、福田寛二 「Inflammation-associated miR-155 activates differentiation of muscle satellite cells through suppression of C/ebp β」第 32 回日本軟骨代謝学会、2019 年 3 月
- ② 寺村岳士、小野寺勇太、竹原俊幸、福田寛二 「miR-155 は間葉系幹細胞において抗酸化系遺伝子の発現を抑制し ROS 産生に寄与する」第 39 回日本炎症再生医学会、2018 年 7 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

1. 研究分担者氏名：高橋 英夫
ローマ字氏名：(TAKAHASHI, Hideo)
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60335627
2. 研究分担者氏名：丹羽 淳子
ローマ字氏名：(NIWA, Atsuko)
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部
職名：講師
研究者番号（8桁）：60122082
3. 研究分担者氏名：寺村 岳士
ローマ字氏名：(TERAMURA, Takeshi)
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部附属病院
職名：講師
研究者番号（8桁）：40460901
4. 研究分担者氏名：竹原 俊幸
ローマ字氏名：(TAKEHARA, Toshiyuki)
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：60580561
5. 研究分担者氏名：小野寺 勇太
ローマ字氏名：(ONODERA, Yuta)
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：30510911

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。