

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861349

研究課題名(和文)サルコペニアの予防法開発を目指した加齢に伴う骨格筋幹細胞数減少機序の解明

研究課題名(英文)The mechanism of age-related decreases in the number of muscle satellite cells

研究代表者

上住 円(池本円)(Uezumi, Madoka)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・室長

研究者番号：70435866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：老化マウスではNGFR(神経成長因子受容体)陽性の筋衛星細胞(骨格筋幹細胞)の割合が顕著に低下する。NGFR陰性筋衛星細胞に比べNGFR陽性筋衛星細胞で高い増殖・分化能が認められ、リガンドであるNGFを添加することによりさらにその能力が促進されたことから、筋衛星細胞におけるNGFRの発現とそのシグナルの重要性が示された。NGFRの発現は遅筋に付随する筋衛星細胞でより高い傾向にあり、局在異常を示す筋衛星細胞でより低い傾向にあった。以上の結果から、筋線維の収縮や代謝特性がNGFRの発現制御に関わり、加齢に伴う局在異常によるNGFRの発現低下が筋衛星細胞数の減少に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The rate of NGFR(+) satellite cells markedly decreases in aged mice. The proliferation and differentiation capacity was significantly higher in NGFR(+) satellite cells than NGFR(-) cells. The addition of NGF, one of the ligands of NGFR, further promoted proliferation of NGFR(+) satellite cells. These results indicate the importance of NGFR expression and signal in satellite cell function. The expression of NGFR was higher in satellite cells associated with slow-twitch fibers than in those associated with fast-twitch fibers. It has been thought that aberrant localization of satellite cells is related to the decrease in cell number with age. The expression of NGFR was lower in aberrantly localized satellite cells than in normally localized cells. These results suggest that the contraction and metabolic characteristic of myofibers is involved in the regulation of NGFR expression, and that lower NGFR expression by aberrant localization of satellite cells causes a decrease in cell number.

研究分野：再生医学

キーワード：老化 骨格筋 再生 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

サルコペニア(加齢に伴う筋肉量および筋機能の低下)は高齢者に転倒や骨折を誘発し、それらに伴う筋損傷からの速やかな回復は、さらなる要介護状態や寝たきりへと心身の状態を悪化させないために極めて重要である。我々はマウスを用いた研究から、実際に加齢に伴い筋再生能力が低下することを明らかにしている。成体筋組織の再生は、骨格筋幹細胞である筋衛星細胞が担っているが、老化マウス(24ヶ月齢超)では、若齢マウス(2-3ヶ月齢)に比べ、筋衛星細胞数が約半分に減少していることを見出している。これらの結果から、加齢に伴う筋衛星細胞数の減少が筋再生能力低下の一因であると考えられる。

加齢に伴う筋衛星細胞数減少の背景にある分子機序を明らかにするため、老化マウス(24ヶ月齢超)と若齢マウス(2-3ヶ月齢)の筋衛星細胞を用いて網羅的遺伝子発現比較解析を行い、老化で発現減少する NGFR (Nerve growth factor receptor, 神経成長因子受容体)を見出した。筋衛星細胞は筋線維の細胞膜と基底膜の間に局在しており、筋線維や細胞外マトリックスとの物理的な相互作用や筋線維が分泌するサイトカイン、細胞外マトリックスに保持された増殖因子等との相互作用が筋衛星細胞の維持に重要であると考えられている。そこで、細胞膜に局在し、細胞外刺激を感知してシグナルを伝えるレセプターに注目した。老化マウスの筋衛星細胞で最も発現減少していたレセプターが NGFR であったことから、その発現低下が筋衛星細胞数減少に関与している可能性が高いと考え、NGFR に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、老化マウス筋衛星細胞で発現減少する NGFR (Nerve growth factor receptor, 神経成長因子受容体)に着目し、その機能解析を通して加齢に伴う筋衛星細胞数減少機序を探る。この研究成果は、加齢に伴う筋再生能力低下機序の解明、さらには、筋衛星細胞数の維持による筋再生能力改善方法の開発につながることを期待できる。

3. 研究の方法

(1) 筋衛星細胞での NGFR の発現確認

老化マウス(24ヶ月齢超)と若齢マウス(2-3ヶ月齢)の下肢骨格筋からコラゲナーゼ処理により単核細胞を分離する。

筋衛星細胞を認識する抗体と NGFR 抗体で単核細胞を染色し、セルソーターを用いて、老化マウスと若齢マウス筋衛星細胞における NGFR 発現レベルを比較した。

老化マウスと若齢マウス下肢骨格筋の凍結切片を作製し、Pax7 抗体(筋衛星細胞を認識)と NGFR 抗体、Laminin 2 抗体(基底膜を認識)で染色後、筋衛星細胞における NGFR 発現レベルを比較した。

(2) NGFR(-)と NGFR(+)筋衛星細胞の機能比較
若齢マウスの下肢骨格筋からセルソーターを用いて NGFR(-)と NGFR(+)筋衛星細胞を分取する。

各細胞を同数ずつ播種し、増殖培地中で4日間培養後、WST-8 (Cell Counting Kit-8, 同仁化学)および、EdU (5-ethynil-2'-deoxyuridine) 取り込み率により増殖能を比較した。

増殖培地で4日間培養後、分化培地に交換し、さらに3日間培養した。ミオシン重鎖抗体で細胞を染色し、分化能を比較した。

(3) 筋衛星細胞における NGFR シグナルの重要性の検証

若齢マウスの下肢骨格筋からセルソーターを用いて NGFR(+)筋衛星細胞を分取する。

NGFR のリガンドである NGF (Nerve growth factor, 神経成長因子), BDNF (Brain-derived neurotrophic factor, 脳由来神経栄養因子), NT-3 (Neurotrophin-3, 神経栄養因子-3), NT-4/5 (Neurotrophin-4/5, 神経栄養因子-4/5) を添加した増殖培地または分化培地で培養し、上記(2)と同様の方法で増殖・分化能を比較した。

(4) NGFR の発現制御機構の検討

若齢マウスの下肢骨格筋(ヒラメ筋:遅筋、長趾伸筋:速筋)からコラゲナーゼ処理により単一筋線維を分離する。

Pax7 抗体と NGFR 抗体で染色し、遅筋および速筋由来の単一筋線維に付随する筋衛星細胞において NGFR 発現レベルを比較した。

(5) 加齢に伴う NGFR の発現低下と筋衛星細胞の局在異常との関連性の検証

老化マウスと若齢マウス下肢骨格筋の凍結切片を作製し、Pax7 抗体と NGFR 抗体、Laminin 2 抗体で染色する。

筋衛星細胞の局在と NGFR の発現レベルとの関連性を調べる。通常、筋衛星細胞は Laminin 2 (基底膜)の内側に局在するが、加齢に伴い筋衛星細胞と筋線維の細胞膜との間に Laminin 2 が侵入し、局在異常が見られる。このような筋衛星細胞と NGFR の発現レベルとの関連性を調べた。

4. 研究成果

(1) 筋衛星細胞での NGFR の発現確認

セルソーターと免疫組織染色による解析から、個々の筋衛星細胞レベルで NGFR の発現を調べたところ、若齢マウスにおいても全ての筋衛星細胞で発現しているわけではなく、NGFR(-)と NGFR(+)の筋衛星細胞が存在していることが分かった。そして、老化マウスでは NGFR(+)筋衛星細胞の割合が顕著に低下していることが確認できた。

(2) NGFR(-)と NGFR(+)筋衛星細胞の機能比較

WST-8, EdU 取り込み率による解析とも、NGFR(-)に比べ NGFR(+)筋衛星細胞で有意に高い増殖能が認められた。また、fusion index (ミオシン重鎖陽性の筋管に含まれる核の割合)から、NGFR(+)筋衛星細胞において有意に高い分化能が認められた。

(3) 筋衛星細胞における NGFR シグナルの重要性の検証

NGFR(+)筋衛星細胞に NGF を添加することにより増殖および分化促進効果が認められた。この結果から、筋衛星細胞機能における NGFR の発現とシグナルの重要性が示された。

(4) NGFR の発現制御機構の検討

NGFR の発現制御機構について調べるため、遅筋であるヒラメ筋と速筋である長趾伸筋から単一筋線維を取り出し、それらに付随する筋衛星細胞での NGFR 発現レベルを比較した。その結果、速筋に比べ、遅筋に付随する筋衛星細胞で NGFR の発現がより高い傾向が見られた。この結果から、筋線維の収縮や代謝特性が NGFR の発現制御に関与している可能性が示唆された。

(5) 加齢に伴う NGFR の発現低下と筋衛星細胞の局在異常との関連性の検証

通常、筋衛星細胞は筋線維の細胞膜の外側で基底膜の内側に局在しているが、老化マウスでは、基底膜成分である Laminin 2 が筋衛星細胞と筋線維の細胞膜との間に入り込み、筋衛星細胞の局在異常が認められる。このような局在異常が細胞数の減少に関与する可能性が示唆されているため、局在異常と NGFR の発現レベルとの関連性を調べた。その結果、局在異常を示す筋衛星細胞で NGFR の発現がより低い傾向にあり、加齢に伴う局在異常による NGFR の発現低下が筋衛星細胞数の減少に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N. Pro-insulin-like growth factor-II ameliorates age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration. *Stem Cells*. 33(8): 2456-2468, 2015. 査読有
DOI: 10.1002/stem.2045.

Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, Maruyama M. Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function. *Aging Cell*. 14(4): 616-624, 2015. 査読有

DOI: 10.1111/ace1.12337.

Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K. Identification and characterization of PDGFR⁺ mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis*. 5: e1186, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/cddis.2014.161.

Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. *Front Physiol*. 5:68, 2014. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2014.00068.

〔学会発表〕(計8件)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘. Pro-IGF-II の補充による老化骨格筋再生能力の改善. 筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発 平成 27 年度研究班会議、2015 年 12 月 9 日、国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

上住 円、サルコペニアの発症または進行に関与する因子の同定. 第三回若手による骨格筋細胞研究会、2015 年 11 月 25 日、九州大学病院キャンパス(福岡県・福岡市)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘. Pro-IGF-II の補充は老化筋再生不良を改善させる. 第 1 回日本筋学会学術集会、2015 年 8 月 8 日、国立精神・神経医療研究センター(東京都・小平市)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘. Pro-IGF-II 補充による老化骨格筋再生不良改善効果の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会、2015 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘. Pro-IGF-II の補充による老化骨格筋再生能力改善効果の検討. 第 14 回 Conference for BioSignal and Medicine、2014 年 11 月 22 日、ラフォーレ修善寺(静岡県・伊豆市)

上住 円、Pro-IGF-II は老化筋再生不良を改善させる. 第 2 回若手による骨格筋細胞研究会、2014 年 11 月 4 日、コープイン京都(京都府・京都市)

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘. 老化骨格筋再生能力低下を引き起こす環境因子の同定. 第 13 回日本再生医療学会総会、2014 年 3 月 4 日、国立京都

国際会館（京都府・京都市）

上住 円．老化骨格筋再生能力低下を引き起こす環境因子の同定．第1回若手による骨格筋研究会、2013年11月27日、京都大学iPS細胞研究所（京都府・京都市）

〔図書〕（計2件）

上住 円、上住聡芳．筋肉の基礎 update. Orthopaedics. 全日本病院出版会、28(13): 17-22, 2015.

上住 円、上住 聡芳．サルコペニア予防のための骨格筋再生. Geriat. Med. 株式会社ライフ・サイエンス、52(4): 407-411, 2014.

〔その他〕

上住 円、橋本有弘. BioMedサーカス.com（医学生物学の総合ポータルサイト）、執筆者自身による研究論文レビュー、2015年9月22日掲載

http://biomedcircus.com/paper_03_41.htm

!

6．研究組織

(1)研究代表者

上住 円（UEZUMI, Madoka）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・室長

研究者番号：70435866