

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860200

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞分泌抗老化因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification of a homeostatic factor which restores age-related dysfunctions of mesenchymal stem/stromal cells

研究代表者

大石 路子 (Oishi-Ohno, Michiko)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：80454875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(hematopoietic stem cell;MSC)の分泌因子であるGdf6をMSCの機能回復分子として同定した。Gdf6は老齢マウス由来MSCの骨芽細胞分化能を回復させ、ノックダウンにより脂肪細胞分化を阻害した。さらにGdf6を強制発現するレンチウイルスを老齢マウス腹腔内投与すると、末梢血の老化フェノタイプであるミエロイドの増加が抑制されB細胞の割合が増加した。さらに、Cardiotoxinによる筋損傷への回復能がGdf6投与群で有意増加し、eMHC陽性新生筋細胞が若齢マウスと同等に増加した。また、脳室下帯から線条体に至る広範囲にSOX2陽性の神経前駆細胞が増加していた。

研究成果の概要(英文)：Age-related tissue stem cell dysfunctions should contribute to the disruption of tissue homeostasis and subsequent pathologies. It has been reported that some kind of systemic factors in young mice have effects to ameliorate age-related inefficient muscle repair due to restoration of regenerative capacity of aged muscle satellite cells. Some of other tissue stem/progenitor cells also restored proliferation in heterochronically connected old mice. However, little is known about the homeostatic factors and the mechanisms underlying its regenerative effects. Recently, we identified Gdf6/Bmp13 as a homeostatic factor derived from young mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). Administration of Gdf6 was restored the muscle wound healing and was increased neural precursor cells in a wide range from the subventricular zone to the striatum than control aged mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：間葉系幹細胞 幹細胞老化 分泌因子 T細胞分化 免疫老化

1. 研究開始当初の背景

近年、体性幹細胞 (SSC) の老化が組織の機能障害を引き起こし、組織恒常性の破綻の一因となることが示されている。パラピオシス実験の報告から、老化した SSC の機能を回復させる分子が血中に存在することが示唆されて以来、老化促進性の分子については CCL11、C1q などが報告されてきた。また最近になり機能回復分子として、加齢により血中の発現量が減少する Gdf11 が同定され、加齢性の心肥大や骨格筋幹細胞の分化能の低下を抑制することが示されたが、そのメカニズムについては未だ不明である。

2. 研究の目的

我々は、これまでに神経幹細胞の分化能の制御に重要なシグナル応答性の制御分子として miR-17/106 を同定している (Naka-Kaneda H., PNAS, 2014)。このたび、この miR-17/106 が老齢マウス由来の間葉系幹細胞の骨分化能の回復をもたらすことを明らかにした。また、この遺伝子を導入した老齢マウス由来間葉系幹細胞 (MSC) の移植は、加齢によるリンパ球分化能の減少や皮質骨密度の減少などの老化フェノタイプを遅延した。しかしながら、移植細胞はほぼ全てが肺に生着しており、生着組織から離れた部位でのこれらの効果は分泌因子によるものであると考えた。そこで、本研究ではこの分泌因子の同定を目指し、また、この因子の生体での加齢性疾患への効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 候補分子の同定

miR-17 強制発現老齢マウス由来 MSC および若齢マウス由来 MSC とコントロール遺伝子強制発現老齢マウス由来 MSC および老齢マウス由来 MSC について DNA マイクロアレイ解析を行い、Gene Ontology 解析により分泌因子を抽出した。これらの中から発現可能であった 13 個の候補分子を得た。これらの候補分子のスクリーニングの系として骨芽細胞分化の系を持ちた。具体的には、これらの候補分泌因子を、MEF 細胞に強制発現させ、候補分泌因子を含む馴化培地を得た。馴化培地をそれぞれ 50% の割合で含む骨芽細胞分化培地を調整し、この培地中で老齢マウス由来 MSC を分化させ、分化した度合いにより間葉系幹細胞機能回復分子を同定した。

(2) 同定分子の生体の加齢性疾患への効果

同定した間葉系幹細胞機能回復分子を強制発現するレンチウイルスを老齢マウスに腹腔内投与し、個体への影響を検討した。老化すると抹消血におけるミエロイドの割

合が増加する。そこで、経時的に末梢血を採血し、ミエロイドおよびリンパ球として T, B 細胞の割合を FACS にて検討した。

さらに、老化すると骨格筋の損傷治癒が遅滞することが知られている。そこで、下肢骨格筋に cardiotoxin を投与し、5 日目に筋肉を採取し、切片を作製し、新生筋組織を embryonic myosin heavy chain で免疫染色し、損傷からの回復能を検討した。

さらに、脳における効果を検討するため、subventricular zone を含む形で切片を作製し、SOX2 陽性神経前駆細胞の分布の変化について検討した。

さらに、骨粗しょう症に対する回復能についてマイクロ CT により下肢、および脊椎の骨密度について検討した。

4. 研究成果

(1) 候補分子の同定

マイクロアレイの結果から得られた 13 の候補分子を MSC の骨芽細胞分化スクリーニングの系にてスクリーニングしたところ、Gdf6 のみが老齢 MSC の骨芽細胞分化を顕著に促進した。また、ノックダウンにより骨芽細胞分化および、脂肪細胞分化までもが顕著に抑制された。

(2) 生体における加齢性疾患に対する効果

生体での加齢性疾患への影響を検討した。この結果、Gdf6 強制発現レンチウイルス投与群では、加齢による末梢血におけるミエロイドの増加が抑制された。また、B 細胞の減少が有意に抑制された。

さらに、下肢の骨格筋に Cardiotoxin にて損傷を与え、筋損傷の回復について、新生筋繊維を embryonic myosin heavy chain (eMHC) で染色して検討したところ、Gdf6 投与群でコントロール老齢マウス分に比べて有意に eMHC 陽性細胞が増加しており、さらにその回復は若齢マウス筋肉と同程度であった。

脳切片を作製し、SOX2 陽性の神経前駆細胞を観察した。この結果 Gdf6 導入老齢マウスの脳では、コントロール群と比較して、脳室下帯 subventricular zone から線条体 striatum に至る広範囲に SOX2 陽性の神経前駆細胞が、老齢コントロール群に比べて有意に増加していた。

骨粗しょう症について、マイクロ CT にて解析を行ったが、使用したマウスは GDF6 強制発現レンチウイルス投与時にすでに 18 ヶ月齢を迎えており、この時点で骨粗しょう症がかなり進んでいるためか、Gdf 投与群でも顕著な差はみられなかった。

このことから、Gdf6 は生体においても免疫細胞分化や筋肉の再生、さらに神経新生にいたるまで恒常性維持分子として働いていることを示した。

今回、Gdf6 の投与では老化による Lymphopoiesis に効果がみられた。これは、

他の抗老化因子では見られたことのない効果であった。そこで、2016年度は免疫老化について新たに検討を行った。

免疫老化では、易感染性やワクチン接種への応答性の低下、癌、自己免疫疾患など様々な加齢性疾患が観察される。この一因に、T細胞のレパトア変化などが考えられている。

T細胞は胸腺に移入した前駆細胞が、胸腺上皮細胞との相互作用により分化、成熟して二次リンパ器官へと移行する。胸腺は老化により顕著に委縮し、胸腺細胞、上皮細胞ともに減少し、さらに脂肪細胞が増加するなど、胸腺の分化環境は著しく変化する。この胸腺微小環境の著しい変化が、T細胞の老化に影響しているのではないかと考え、現在以下の実験を遂行中である。

胸腺上皮細胞の1細胞 RNA-Seq. 解析

T細胞老化への胸腺での分化環境の変化が影響しているかどうかを検討するため、若齢(2-3m)および老齢(約2y)のマウス胸腺より、胸腺上皮細胞(CD45⁻, EpCAM⁺, Cass11⁺)をフローサイトメーターによりソートし、1細胞 RNA-Seq. 解析を現在行っている。これによりそれぞれの遺伝子発現プロファイルを得、老化によりどのような変化があるのかを検討する。

若齢および、老齢マウスパラピオーシス実験

T細胞分化において、若齢マウス由来のプロジェニターが老齢マウス胸腺内環境で分化すると、老化フェノタイプを示すのかを検討している。パラピオーシスモデルでは2個体の血流が交換され、若齢マウス由来胸腺前駆細胞が老齢マウス胸腺内に移入する。これにより、若齢マウス由来前駆細胞が老齢マウス胸腺環境内で分化するとどのようなフェノタイプを示すのかを検討することが出来る。そこで、移入した細胞を1細胞 RNA-Seq. 解析をするため、3か月齢の若齢マウスと2年齢の老齢マウスでパラピオーシス実験を行っている。

またこれまでの実験から、若齢と老齢のパラピオーシスペアでは、それぞれ5~10%の前駆細胞がそれぞれの胸腺に移入する。しかし、老齢同士のペアでは移入細胞が観察されなかった。現在はこの現象についても、追試してメカニズムの解明を目指している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1. Daisuke Hisamatsu, Michiko Ohno-Oishi, Shiho Nakamura, Yo Mabuchi, Hayato Naka-Kaneda. Growth differentiation factor 6 derived from mesenchymal stem/stromal cells reduces age-related

functional deterioration in multiple tissues. Aging.2016 Jun;8(6):1259-75. doi: 10.18632/aging.100982. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

1. 金田 勇人、大石路子、中村志穂(2015) 間葉系幹細胞が分泌する恒常性維持分子の探索と機能解析
第14回再生医療学会総会. 神奈川県横浜市. 2015年3月19日
2. 大石(太野)路子、中村志穂、金田(仲) 勇人(2014) 間葉系幹細胞由来の生体恒常性維持分子の検索
第37回 日本分子生物学会年会. 神奈川県横浜市. 2014年11月27日
3. 金田(仲) 勇人、大石(太野)路子、中村志穂、馬淵洋(2014) 組織幹細胞に共通する老化メカニズムの解析
第37回 日本分子生物学会年会. 神奈川県横浜市. 2014年11月27日

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 路子 (Michiko Oishi-Ohno)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・研究員
研究者番号：80454875

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()