

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03810

研究課題名（和文）運動器における幹細胞老化の理解と制御

研究課題名（英文）Molecular mechanism of stem cell aging in the bone marrow and muscular tissues

研究代表者

寺村 岳士 (Teramura, Takeshi)

近畿大学・大学病院・准教授

研究者番号：40460901

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：加齢の進行とともに起こる運動機能障害は健康寿命の最大の阻害要因である。本研究では、運動器の再生と機能維持を担う組織幹細胞の老化について、骨髄と筋組織に存在する幹細胞を題材に様々な階層での遺伝子発現調節機構について研究を行なった。老化モデルマウス、ヒト検体を用いた解析により幹細胞減少と異常な分化を引き起こすメカニズムを明らかにするとともに、遺伝子導入による治療の可能性を示す研究結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞老化は、高齢者にみられる組織機能の低下や様々な加齢性疾患の原因になりうるが、その原因や危険因子については未解明な点が多い。本研究では筋組織と骨髄組織に存在する幹細胞について、幹細胞老化を引き起こす原因と幹細胞劣化に至るメカニズムの一端を明らかにした。本研究結果は組織の劣化を定量的に評価する診断法や、機能回復を目指した遺伝子治療法の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Dysfunction in locomotive tissues occurs with aging is the important impediment to QOL. In this study, we investigated molecular mechanism of stem cell aging focusing on the gene regulatory mechanisms at various levels. Using bone marrow and muscular tissues from aging model mice and humans, we clarified the mechanisms causing stem cell depletion and abnormal differentiation and obtained the notion indicating the possibility of therapeutics to recover the stem cell function by gene transferring.

研究分野：再生医学

キーワード：幹細胞 幹細胞老化 再生医療 運動器 遺伝子発現 遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

超高齢化の進行にともない加齢に関連する慢性疾患が増加しており、医療経済の面からも健康寿命の延長は極めて重要な課題になっている。特に、加齢の進行とともに起こる運動機能障害は健康寿命の最大の阻害要因であり、骨粗鬆症、変形性関節症、筋萎縮を伴う加齢性運動器症候群（ロコモティブシンドローム）は、罹患者数の多さと認知症やうつ病など重大な疾患を合併するリスクが高いため、対応策の策定は喫緊の課題となっている。

近年、組織恒常性の維持における幹細胞の役割と重要性が明らかになってきている。組織幹細胞は分裂分化による体細胞の供給のほか、サイトカインの産生や代謝物の交換を通し体細胞や他の組織幹細胞の制御を行うことで組織全体のメンテナンスを行う。筋、骨格系における組織幹細胞には、筋芽細胞の前駆となる筋衛星細胞（Muscular Satellite Cell: MuSC）と骨軟骨の前駆となる間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell: MSC）が存在する。加齢に伴い筋組織内の MuSC が減少することは申請者らを含め多くの実験で確認されており、老化 MuSC では活性化した p38MPAK により自己複製が攪乱されること（Bernet JD., Nature Med 2014. Rozo M., Nature Med 2016）老化 MuSC は筋細胞ではなく線維芽細胞へ分化傾倒すること（Carlson ME., Aging Cell 2009）、全ゲノムメチローム解析により加齢 MuSC では自己複製因子がメチル化されていること（Bigot et al., Cell Rep 2015）など転写活性と形質発現を結びつけるメカニズムも解明が進んでいる。また最近、scM&Tseq を用いて、加齢 MuSC のプロモーター領域におけるメチル化はヘテロ化しており、不均一な遺伝子発現により幹細胞性が失われることが発見されている（Hernarando-Herraez et al., Nature Commun 2019）。加齢に伴う MuSC の細胞数減少に伴い筋組織の退行とサイトカイン（ミオカイン）の減弱が生じることもわかっている。MSC についても他の幹細胞と同様、細胞数の減少と多分化能の減衰といった形質変化が報告されている。

MSC の老化と組織の機能低下の直接的な関係性は明らかになっていないが、MSC が関節滑膜、筋組織、脂肪組織、骨髄内などに広く存在し、サイトカインやエクソソームの分泌を介した周辺細胞の恒常性維持に寄与していることを考えると、加齢性の組織退行と MSC の老化が関連している可能性は高い。一方、MuSC や MSC の老化に伴う分化能力の変化、遺伝子発現、エピゲノム状態変化における一貫した結論はなく、運動器の加齢性変化における幹細胞老化の重要性については明確でなかった。一方、MuSC や MSC といった幹細胞の老化の原因や老化によりもたらされる形質を正しく理解することは、細胞移植の分野においても極めて重要である。現在、MSC を用いた細胞移植医療が普及しているが、年齢と細胞の品質の関係性、治療効果に対する治験は限られている。高齢ドナーから得られる MSC や MuSC の増殖能力、継代培養に対する耐性は若齢ドナーに由来する幹細胞の特性とは明らかに異なっており、臨床効果を正確に予測する指標の開発あるいは幹細胞性を回復させる技術の開発は重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、運動器の再生と機能維持を担う組織幹細胞である MuSC と MSC の老化について、加齢により生じる特性の変化を明らかにすること、幹細胞の加齢性変化をもたらす因子を明らかにすることである。細胞移植の分野においては「培養後の老化形質」を理解する必要がある。ドナーの年齢により、MSC や MuSC の増殖能力、継代培養に対する耐性は明らかに異なる。一方、サイトカイン産生能力や脂肪、筋分化におけるドナー年齢による能力差については一貫した結論は出ていない。ドナー年齢により差が出やすいとされる骨分化能力についても、培養条件によって解決されるといった報告もある。このことから、幹細胞の老化形質にはドナー年齢に影響を受けにくい、あるいは培養下で大きく変化し、in vivo での特性を把握できていないもの存在する可能性がある。本研究では、フローサイトメトリーにより組織から直接幹細胞および前駆細胞の分画を採取し、RNA シークエンス（RNAseq）、NET-CAGE、マイクロアレイ等の OMICS により解析を行う。さらに本研究では、老化により著しく減少する転写因子を遺伝子治療用ステルス型センダイウイルス（SRV）で補充し幹細胞の若返りを試みる。SRV は MSC や MuSC といった通常遺伝子導入が困難な初代細胞に対してもほぼ 100%の感染成績を示し、数ヶ月に渡り高い遺伝子

発現を維持する。さらに、細胞の自然免疫を回避しインターフェロンの誘導を起こさず、siRNA による除去も可能である。SRV によりクロマチン構造の変化や転写活性に関わる遺伝子を導入し、移植細胞の品質を改善できるかどうかを検討した。

3. 研究の方法

幹細胞老化の原因や形質が未だ未解明であり、また、組織機能の低下との関連性が不明確である原因として、組織を構成する全細胞に占める幹細胞の割合が非常に低率であることが大きな理由である。また、MuSC、MSC を組織から取り出し長期間培養を行うと、急速に老化 (Senescence) する、あるいは形質が変化してしまい、体内の状態を正しくモデルできないという問題もある。そこで本研究では、若齢 (3 週齢)、加齢 (1.5 年齢) マウス、老化モデルマウス SAMP8 マウスを用い、骨髄、筋組織を材料とし、大腿骨、大腿筋をクリーニング後にコラゲナーゼ処理し、CD45⁻/Ter119⁻/PDGFR α ⁺/Sca1⁺ (P α S) として MSC を、CD11b⁻/CD31⁻/CD45⁻/Int α 7⁺/CD29⁺ として MuSC を含む筋幹・前駆細胞 (MPC) を、さらに MPC から CD34⁺/CXCR4⁺ を発現する細胞を筋衛星細胞 MuSC として分離した。MSC、MPC を取り出したのちに 1 週間程度の初代培養で最小限の拡大培養を行い、トランスクリプトーム解析、NET-CAGE 解析を行なった。

MSC、MuSC において、加齢により大きく影響を受ける遺伝子を抽出後、強制発現および siRNA による抑制実験を行い、未分化性、分化能力、増殖の変化を観察した。

また、研究を進める中で、特に筋組織において MPC の幹細胞性を喪失させる因子として、筋-脂肪連関に着目した。幹細胞に加齢性変化を誘導する分子として脂肪細胞より発現する Exosome を超遠心により採取、精製し、miRNA アレイおよび RNA シークエンスにより内包される miRNA を解析した。また、老化脂肪細胞由来 Exosome において特に高い発現を示す miRNA について、MuSC での強制発現あるいは抑制を行い、細胞の増殖、筋分化への作用について解析を行なった。

さらに、本研究では、遺伝子治療技術を用い幹細胞老化治療の可能性を探ることを最終的な目的としていた。遺伝子治療用ステルス型センダイウイルス (SRV) は MSC や MuSC といった通常遺伝子導入が困難な初代細胞に対してもほぼ 100% の感染成績を示し、数ヶ月に渡り高い遺伝子発現を維持する。さらに、細胞の自然免疫を回避しインターフェロンの誘導を起こさず、siRNA による除去も可能である。加齢により発現が低下している、あるいは過去の文献で細胞老化の影響により減弱することが報告されている転写因子を中心に、これらを発現する SRV を作製し、MSC への導入と幹細胞性の変化を観察した。また、特に変化の大きい転写因子については NET-CAGE を用い、より詳細な解析を行なった。

なお、本研究で実施した動物実験は近畿大学医学部実験動物委員会の承認のもとに実施した。また、ヒト組織については、近畿大学医学部倫理委員会の承認のもとで手術の際に廃棄される組織あるいは露出する組織、血液の一部を非侵襲的に採取した。全て提供者の同意の上で検体の採取と研究への使用を行った。

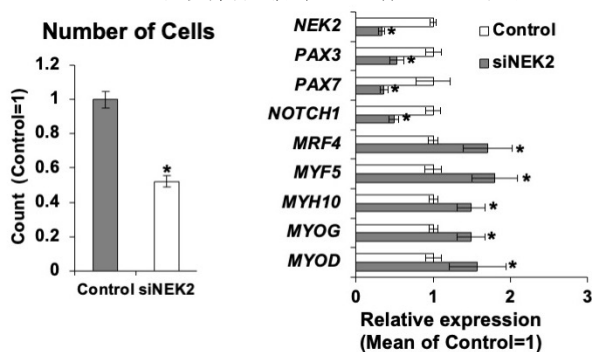
4. 研究成果

まず、幹細胞の加齢変化を抽出するため、若齢および加齢マウス骨髄より初代培養細胞を作製し、NET-CAGE および RNAseq による網羅的な解析を行なった。また、若齢マウス、加齢マウスの大腿部より FACS を用いて MPC を採取し、微量 RNA を対象とするマイクロアレイ解析を実施した。骨髄 MSC においては、in vivo で見られる加齢性組織変性を反映するような幹細胞性維持の破綻に直結するような遺伝子発現の変化は認められなかった。

一方、MPCはMSCにくらべ組織含有量が多く、加齢マウスにおいてもFACSでの採取と解析が十分に可能であった。MPC、MuSCとも加齢マウスでの著しい現象が認められた(図1)。

組織より直接抽出したMPCについてトランスクリプトーム解析を行なったところ、染色体の分離・分配に関わる遺伝子であるNek2の遺伝子発現が加齢により低下することを発見した。Nek2はMPCの増殖に必須であり、抑制した細胞ではアポトーシスの発生と細胞数の減少が認められた。Nek2を抑制したMPCでは幹細胞性に関する遺伝子が低下しており、一方でMrf4、Myf5といった分化関連遺伝子の上昇が認められた。さらに、ヒト初代MPCにおいてNek2の抑制を行なったところ、自己複製の低下と分化の促進が認められ、Nek2の機能はマウスとヒトで保存されていることが明らかになった(図2)。

図2. NEK2の発現抑制で誘導される幹細胞性の低下



本研究により、加齢組織での幹細胞性は、脂肪組織の増大など組織組成の変化とexosomeを介したmiRNAによる抑制的制御により抑制的に制御されていることが明らかになった。

本研究の目的は、筋や骨髄で加齢により生じる幹細胞性の低下メカニズムを明らかにすることと、加齢により低下した転写因子を、SRVを用いた遺伝子導入により補うことで、幹細胞性を上昇させる技術を開発することであった。我々はトランスクリプトームおよびPCR解析の結果と過去の報告から、NANOG、SALL4、HMG1、PCGF6、TWIST1をSRVに組み込み、MSCで発現させた。

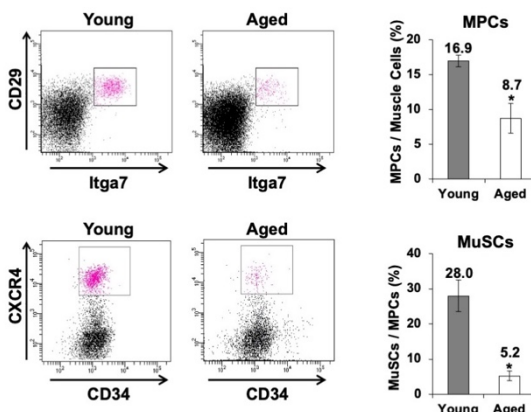


図1. 若齢、加齢マウス筋組織におけるMPCおよびMuSCの割合

本研究により、筋組織の幹細胞では老化によりNek2の発現が低下しており、自己複製の低下と分化の促進が生じることで、幹細胞の減少を招いていることが明らかになった。

筋組織における幹細胞の加齢性変化についての検討を進める中で、加齢筋組織では異所性の脂肪蓄積が進行しており、加齢による脂肪組織の蓄積と筋幹細胞の量には逆の相関がある可能性が示唆された。そこで我々は、加齢マウスの脂肪組織を若齢マウスへ移植し、筋幹細胞の変化を観察した。

加齢マウスの脂肪を移植した若齢マウスではMPCの存在率が一時的に減少していた(図3)。我々は、脂肪組織から産生されるExosomeがMPCの増殖を抑制、あるいは分化を促進していると考え、若齢および加齢マウス脂肪組織よりExosomeを抽出し、in vitroでMPCへの添加を行なった。その結果、加齢マウスに由来するExosome(Ag-exosome)はMPCの増殖を抑制した。Exosome内のmiRNAを解析したところ、Ag-exosomeの中にはLet-7d-3pが存在していることが明らかになった。さらに、外科手術の際の廃棄脂肪組織を用いてLet-7d-3pの発現を観察したところ、高齢者の脂肪組織ではLet-7d-3pの発現が上昇していることがわかった(図4)。

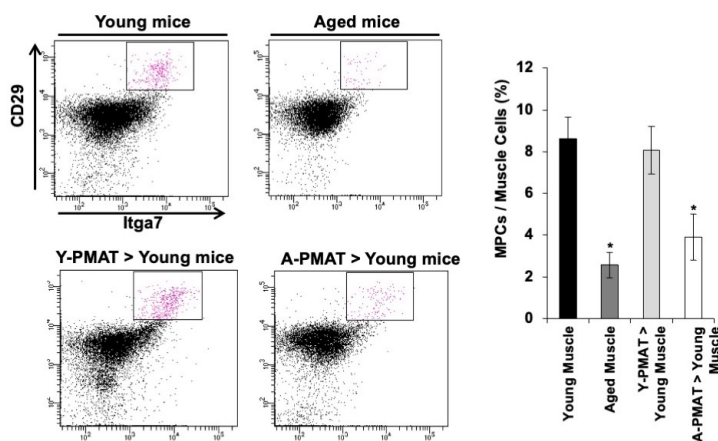


図3. 加齢マウスの脂肪移植により筋組織の幹細胞は減少する

本研究の目的は、筋や骨髄で加齢により生じる幹細胞性の低下メカニズムを明らかにすることと、加齢により低下した転写因子を、SRVを用いた遺伝子導入により補うことで、幹細胞性を上昇させる技術を開発することであった。我々はトランスクリプトームおよびPCR解析の結果と過去の報告から、NANOG、SALL4、HMG1、PCGF6、TWIST1をSRVに組み込み、MSCで発現させた。

その中で、TWIST1 の発現による変化は顕著であり、若齢ドナーから取得される MSC に特徴的な

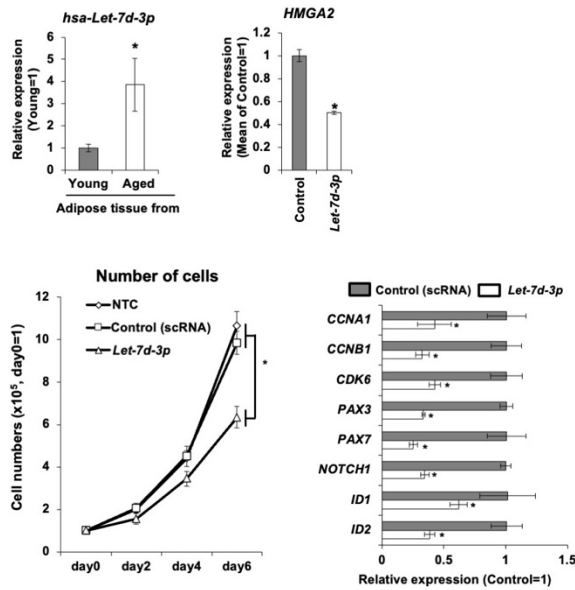


図 4. 脂肪由来 Exosome に含有される Let-7d-3p は筋幹細胞の増殖、未分化性を抑制する。

しかしながら、微量 RNA を対象としたマイクロアレイ解析や RNAseq を駆使することで、筋組織の幹細胞における加齢性変化とその原因の一端が明らかになった。また、SRV 技術を応用することで、当初の目的であった、転写因子の発現による幹細胞性の回復について重要な知見が得られた。本研究で得られたデータセットや知見をもとにさらに研究を進めることで、幹細胞老化と組織機能の低下についての本質的な理解が進むと考えられる。

高い増殖、遊走性、細胞サイズの低下が誘導された。TWIST1 発現 MSC では ID 遺伝子や Notch1 をはじめとする幹細胞性維持因子の発現が上昇しており (図 5)、細胞老化による TWIST1 の発現低下が幹細胞老化における幹細胞性喪失の大きな原因となっていることが明らかになった。SRV-TWIST1 導入 MSC は高い増殖性を維持していたが、脂肪分化、骨分化への抵抗性を示し、遺伝子導入による幹細胞性の向上、細胞老化からの回復に应用するためには、SRV の制御技術の開発が必要であると考えられた。

本研究では、組織幹細胞の不均一性により当初予定していた NET-CAGE、ATAC-seq によるゲノム構造および活性の解析について明瞭なデータを得ることはできなかった。

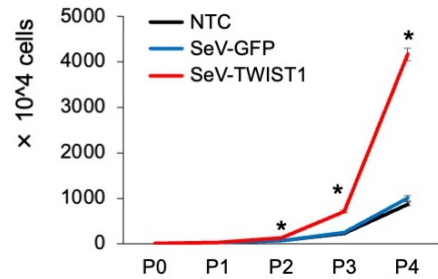


図 5. TWIST1 の強制発現は MSC の未分化性と増殖性を促進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawahara Masanari, Akasaki Yukio, Kurakazu Ichiro, Sueishi Takuya, Toya Masakazu, Uchida Taisuke, Tsutsui Tomoaki, Hirose Ryota, Tsushima Hidetoshi, Teramura Takeshi, Nakashima Yasuharu	4. 巻 36
2. 論文標題 C10orf10/DEPP activates mitochondrial autophagy and maintains chondrocyte viability in the pathogenesis of osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 22145 ~ 22161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202100896R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mori Tatsufumi, Onodera Yuta, Itokazu Maki, Takehara Toshiyuki, Shigi Kanae, Iwawaki Natsumi, Akagi Masao, Teramura Takeshi	4. 巻 201
2. 論文標題 Depletion of NIMA-related kinase Nek2 induces aberrant self-renewal and apoptosis in stem/progenitor cells of aged muscular tissues	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 111619 ~ 111619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2022.111619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mori Tatsufumi, Igarashi Masatsugu, Onodera Yuta, Takehara Toshiyuki, Itokazu Maki, Teramura Takeshi	4. 巻 651
2. 論文標題 Fibrinogen supports self-renewal of mesenchymal stem cells under serum-reduced condition through autophagy activation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 70 ~ 78
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.009	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Itokazu Maki, Onodera Yuta, Mori Tatsufumi, Inoue Shinji, Yamagishi Kotaro, Moritake Akihiro, Iwawaki Natsumi, Shigi Kanae, Takehara Toshiyuki, Higashimoto Yuji, Akagi Masao, Teramura Takeshi	4. 巻 298
2. 論文標題 Adipose-derived exosomes block muscular stem cell proliferation in aged mouse by delivering miRNA Let-7d-3p that targets transcription factor HMGA2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102098 ~ 102098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102098	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawata Manabu, Teramura Takeshi, Ordoukhanian Philip, Head Steven R, Natarajan Padmaja, Sundaresan Aishwarya, Olmer Merissa, Asahara Hiroshi, Lotz Martin K	4. 巻 81
2. 論文標題 Kruppel-like factor-4 and Kruppel-like factor-2 are important regulators of joint tissue cells and protect against tissue destruction and inflammation in osteoarthritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of the Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 1179 ~ 1188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/annrheumdis-2021-221867	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小野寺勇太、寺村岳土、竹原俊幸、福田寛二
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞におけるTak1の抑制は静止期を誘導し移植細胞の定着効率を向上させる
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田寛二、小野寺勇太、寺村岳土、竹原俊幸、福田寛二
2. 発表標題 Tak1はYap1/Tazとの相互作用を介し骨髄間葉系幹細胞 (BMMSC) の細胞周期を制御する。
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 信貴香苗、小野寺勇太、竹原俊幸、寺村岳土、福田寛二
2. 発表標題 Tak1は増殖性サイトカイン依存性のBMMSC増殖を制御し、その阻害は可逆的増殖停止を誘導する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究分担者	小野寺 勇太 (Yuta Onodera) (30510911)	近畿大学・大学病院・助手 (34419)	
研究分担者	村川 泰裕 (Yasuhiro Murakawa) (50765469)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医学研究センター・ チームリーダー (82401)	
研究分担者	竹原 俊幸 (Toshiyuki Takehara) (60580561)	近畿大学・大学病院・助教 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------