

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17722

研究課題名(和文) 運動が誘発するメタボリック/メカニカルストレスによる筋幹細胞と間葉系幹細胞の制御

研究課題名(英文) Regulation of muscle stem cell and mesenchymal stem cell by exercise induced metabolic and mechanical stress

研究代表者

齋藤 悠城 (Saito, Yuki)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40758702

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)：運動刺激は骨格筋内に存在する筋幹細胞、間葉系幹細胞(MSC)、免疫細胞を活性化することで、筋肥大や抗炎症作用を発揮することから、骨格筋の恒常性維持や再生に有効である。一方、慢性筋炎に対する運動刺激は炎症を助長し、骨格筋の線維化を悪化させるリスクがあるとされ、積極的な介入が難しい。本研究では、運動刺激に対するMSCの反応の違いを細胞・分子生物学的手法を用いて解析し、運動刺激による骨格筋の再生および線維化メカニズムの一端を明らかにした。さらに、培養細胞を用いた研究により、筋芽細胞および骨格筋由来線維芽細胞は周辺の炎症状態によってメカニカルストレスに対する反応を変化させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動は健康な骨格筋を維持するために不可欠なものと認知されているが、慢性筋炎患者に対する運動刺激は有効な治療法であると同時に、過剰な刺激となった場合には炎症を助長したり、筋機能を悪化させるリスクを有している。本研究では細胞レベルで運動刺激に対する反応を詳細に評価することで、運動刺激による骨格筋の再生および線維化メカニズムの一端を明らかにした。本研究成果は骨格筋疾患に対する運動療法の有効性・安全性を高めるために必要な基礎的データを提供することで、筋疾患治療およびリハビリテーションの発展に寄与するものであると考える。

研究成果の概要(英文)：Exercise activates muscular stem cells, mesenchymal stem cells (MSCs), and immune cells to promote muscle hypertrophy and anti-inflammatory effects, resulting in maintaining skeletal muscle homeostasis. On the other hand, excessive exercise can induce inflammation and fibrosis in chronic inflammatory myopathy patients. In this study, we clarified a part of the mechanism of skeletal muscle regeneration and fibrosis induced by exercise by animal experiment. Furthermore, in vitro cell culture studies revealed that myoblasts and skeletal muscle-derived fibroblasts altered their response to mechanical stress depending on the inflammatory state. These findings might contribute the development of effective and safe treatments for chronic myopathy patients.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：骨格筋 運動 再生 慢性炎症 間葉系細胞

1. 研究開始当初の背景

運動刺激は骨格筋内に存在する筋幹細胞、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell; MSC)、免疫細胞を活性化することで、筋肥大や抗炎症作用を発揮することから、骨格筋の恒常性維持に有効である。一方、慢性筋炎に対する運動刺激は炎症を助長し、骨格筋の線維化を悪化させるリスクがあるとされ、積極的な介入が難しい。研究代表者はこれまでの研究で、慢性筋炎モデルに対する運動刺激が platelet-derived growth factor receptor- (PDGFR) を発現する骨格筋 MSC に与える影響について解析を進めてきた。慢性筋炎モデルに対する運動刺激は骨格筋 MSC にアポトーシス抵抗性を獲得させて筋炎を悪化させる一方、運動模擬薬である AICAR(AMP キナーゼ [AMPK]活性剤)筋炎を改善させることを見出してきた。AMPK は代謝ストレスによって活性化され、タンパク合成や細胞増殖を抑制してアポトーシスに導く因子である一方、力学ストレスによって活性化される因子(YAP/TAZ など)は、通常、細胞生存・増殖を促進することが知られている。運動刺激は代謝/力学ストレスの両方の要素に関与するが、慢性炎症の環境下では、MSC が力学ストレスの感受性を高める一方で、代謝ストレスには感受性を低下させているのではないかと考えた。一方、筋幹細胞は、MSC とは逆に力学ストレスに対する反応性を低下させるため、幹細胞自身の増殖を促進できないのではないかと考えた。したがって、筋幹細胞および MSC の力学ストレスおよび代謝ストレス感受性を制御することで、慢性筋炎に対する有効な運動治療が可能になるという仮説を立て、研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究目的は、1) 慢性炎症および正常時における筋幹細胞、MSC における代謝ストレスと力学ストレス感受性の違いを明らかにし、3)代謝ストレスと力学ストレスのバランスを制御する因子・方法を探索して新規治療法につなげることである。

3. 研究の方法

Balb/c マウスに塩化バリウムの骨格筋内投与または粗精製したミオシンと完全フロイトアジュバントの免疫により、急性筋炎マウスおよび慢性筋炎モデルマウスを作成した。筋炎発症を筋機能評価により確認後、安楽死させたマウスから骨格筋を採取した。採取された骨格筋の一部は 4% パラホルムアルデヒドで固定し組織学的解析に用いた。また、採取された骨格筋の一部はコラゲナーゼで消化し、細胞を単離した。単離した骨格筋由来細胞は、さらに磁気分離システムを用いて筋幹細胞および Lineage 陰性 CD31 陰性 7-integrin 陰性 PDGFR 陽性の MSC をそれぞれ回収した。回収された細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現解析を実施した。また、マウス筋芽細胞株 C2C12 およびヒト正常骨格筋由来線維芽細胞に対し、伸展培養装置を用いてメカニカルストレスを負荷し、メカニカルストレス負荷後の遺伝子・タンパク質発現解析を実施した。また、各種サイトカインおよび成長因子を添加培養下で、細胞に対するメカニカルストレスに加えた時の遺伝子・タンパク質発現量の変化の解析を実施した。

4. 研究成果

骨格筋の再生を担う筋幹細胞と骨格筋変性の原因となる MSC をマウス骨格筋より単離・培養した。慢性筋炎モデルマウスから単離された MSC は細胞老化関連因子の発現が低いことが明らかになった。さらに興味深いことに、慢性筋炎モデルで増加する MSC のうち、PDGFR を発現する細胞で免疫チェックポイントの一つである、PD-L1 や CD47 の発現レベルを亢進させることで、免疫回避的な表現系を有することも明らかになった(図 1)。また、正常なマウスと慢性筋炎モデルマウスに対する運動刺激は MSC の異なる反応を引き起こし、慢性筋炎モデルマウス由来 MSC はアポトーシス抵抗性を獲得することで、長期的に炎症を起こした骨格筋に蓄積することがわかった。さらに、慢性筋炎モデルマウス由来 MSC は筋幹細胞の分化を阻害することを筋幹細胞との共培養実験で明らかにした(図 2)。次に、細胞老化関連因子の一つである Trp53 を KO したマウスから Lineage 陰性 CD31 陰性 7-integrin 陰性 PDGFR 陽性の MSC を単離し、骨格筋に投与し生着させた。その後、塩化バリウムによ

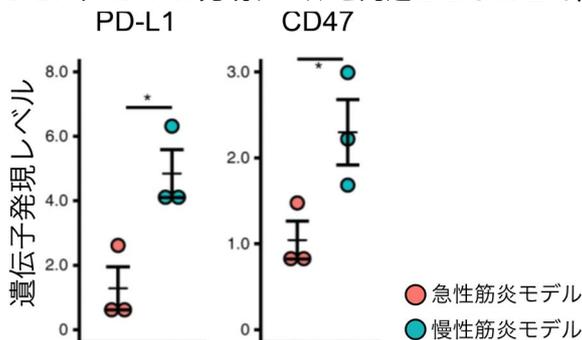


図 1. PDGFR α 陽性細胞における免疫チェックポイント因子の発現量

って急性筋炎を誘導したところ、Trp53 KO マウス由来の MSC が生着した骨格筋では筋再生が阻害されることがわかった。この結果から、MSC における細胞老化誘導が骨格筋の再生に重要である可能性が示された。次に、伸展培養装置を用いて筋芽細胞および骨格筋由来線維芽細胞に運動刺激の一つの要素であるメカニカルストレスを負荷し、その後の細胞表現系を解析した。結果、メカニカルストレスが骨格筋由来線維芽細胞の細胞老化を誘導することが明らかになった。さらに、特定のサイトカインや成長因子の存在下でのメカニカルストレス負荷は、細胞老化因子の発現レベルを変化させることも明らかになった。骨格筋治療に有効であるとされながら、その作用機序に不明な点が残されていた運動の効果、筋幹細胞と間葉系幹細胞を中心に解析を実施した本研究成果は、慢性炎症性筋疾患に対する運動による骨格筋再生と変性メカニズムの解明に寄与したと考えられる。

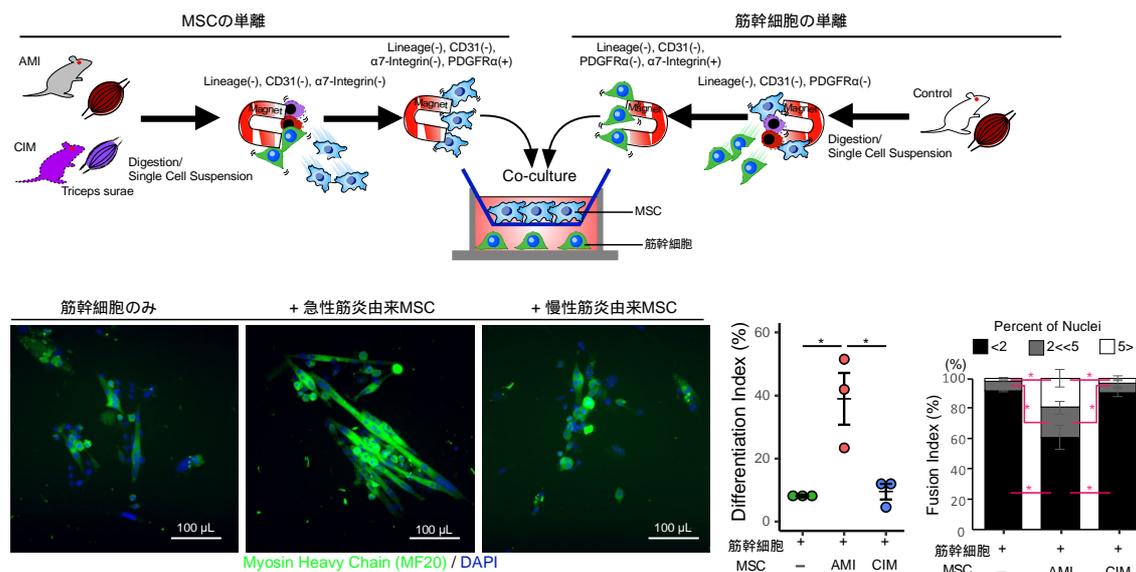


図2 . MSCによる筋幹細胞の分化促進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 齋藤悠城、千見寺貴子	4. 巻 40
2. 論文標題 運動による細胞老化制御と骨格筋再生	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 86 - 91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Saito Yuki、Chikenji Takako S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Diverse Roles of Cellular Senescence in Skeletal Muscle Inflammation, Regeneration, and Therapeutics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 739510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2021.739510	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 齋藤悠城	4. 巻 89 (1-6)
2. 論文標題 Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors[研究論文紹介]	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 札幌医学雑誌	6. 最初と最後の頁 44 - 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Chikenji Takako S.、Saito Yuki、Konari Naoto、Nakano Masako、Mizue Yuka、Otani Miho、Fujimiya Mineko	4. 巻 44
2. 論文標題 p16INK4A-expressing mesenchymal stromal cells restore the senescence?clearance?regeneration sequence that is impaired in chronic muscle inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 86 ~ 97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2019.05.012	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 Saito Yuki, Chikenji Takako S., Matsumura Takashi, Nakano Masako, Fujimiya Mineko	4. 巻 11
2. 論文標題 Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 889
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-14734-x	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 齋藤悠城、千見寺貴子
2. 発表標題 骨格筋間葉系前駆細胞の細胞老化と骨格筋の再生
3. 学会等名 第26回日本基礎理学療法学会学術集会 シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Norihito Miura, Yuki Saito, Arisa Kita, Maki Miyajima, Tsukasa Sato, Sena Yamamoto, Mineko Fujimiya, Takako S. Chikenji
2. 発表標題 Lower-expression of Cdkn2a is associated with dysregulation of fibro-adipogenic progenitors results in skeletal muscle atrophy and degeneration in diabetic mice.
3. 学会等名 The 6th International Cell Senescence Association Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Saito, Takako Chikenji, Takashi Matsumura, Mineko Fujimiya.
2. 発表標題 Exercise enhances skeletal muscle regeneration by promoting senescence in fibro-adipogenic progenitors
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Saito, Takako S. Chikenji, Alyssa Vrieze, Tamara Tchkonja, James L. Kirkland, Peter C. Amadio, Anne Gingery.
2. 発表標題 Cellular Senescence in Tendon Aging and Pathology
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takako S. Chikenji, Yuki Saito, Alyssa Vrieze, Sandra Passe, Tamara Tchkonja, James L. Kirkland, Peter C. Amadio, Anne Gingery
2. 発表標題 Senescent cells escape from immune clearance in fibrotic subsynovial connective tissue in carpal tunnel syndrome
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Saito, Takako Saito
2. 発表標題 Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha Signaling in Carpal Tunnel Syndrome
3. 学会等名 Musculoskeletal Research Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>札幌医科大学プレスリリース EbioMedicie https://web.sapmed.ac.jp/jp/news/press/jmjbbn000000fgcw.html 北海道大学プレスリリース Nature Communications https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/03/post-636.html 札幌医科大学 プレスリリース Nature Communications https://web.sapmed.ac.jp/jp/news/press/jmjbbn000000ovj9.html 北海道大学プレスリリース Nature Communications 英語 https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/cells-must-age-for-muscles-to-regenerate-in-muscle-degenerating-diseases/</p>

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
研究協力者	千見寺 貴子 (Chikenji Takako) (40452982)	北海道大学・保健科学院・教授 (10101)	

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