

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17874

研究課題名(和文) 脂肪由来間葉系幹細胞のステムセルエイジングに対する運動効果

研究課題名(英文) Effect of exercise on stem cell aging in adipose-derived stem cells

研究代表者

加藤 久詞 (Kato, Hisashi)

同志社大学・研究開発推進機構・特別研究員

研究者番号：30780275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗酸化酵素の働きを高める運動および抗酸化作用を有するメラトニンが、脂肪由来幹細胞(ADSC)の加齢による特性の変化に及ぼす影響を検討した。Wistarラットを通常食摂取群と高脂肪食摂取群に分け、20ヶ月齢まで飼育した後に、8週間の自発運動およびメラトニン投与を実施した。介入後、単離したADSCの脂肪細胞への分化能の検証とRNA-seqによる網羅的解析を実施した。その結果、運動およびメラトニンは加齢によるADSCの脂肪細胞への分化能の低下を改善すること、加齢や肥満によって増加した炎症性サイトカインや細胞外マトリックス、細胞骨格の関連因子の発現量を減少させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う組織幹細胞の機能変化は、ステムセルエイジングと呼ばれ、全身で起こる加齢変化の特性の中でも本質的なものと認識されつつあり、その原因のひとつに過剰な活性酸素種の発生が考えられている。抗酸化酵素の働きを高める運動および強力な抗酸化作用を有するメラトニンが、脂肪由来幹細胞(ADSC)のステムセルエイジングを改善する可能性を示した本研究の知見は、組織幹細胞、とりわけADSCの制御機構の解明にひとつのヒントを与えるとともに、関連学術領域を前進させるものである。さらに超高齢社会に突入し、健康長寿実現を目指す我が国において、新しい運動効果を提供できた点に社会的な意義がある。

研究成果の概要(英文)：Regular exercise causes adaptations in the antioxidant capacity, protecting cells against the harmful effects of oxidative stress. Melatonin also has antioxidant, anti-inflammatory, and many other crucial properties. Thus, the purpose of this study was to determine the impact of exercise and melatonin on stem-cell aging of adipose-derived stem cells (ADSC).

The natural aging rat model was established through feeding the rats from 8 weeks old to 20 months old. The aging rats were randomly divided into three groups: sedentary control group, voluntary exercise group, and melatonin treatment group. The main findings were as follows. First, exercise and melatonin treatment ameliorated the aging-induced impairment of ADSC differentiation into adipocytes. Second, exercise and melatonin treatment decreased the aging- and obesity-induced increment of inflammatory cytokines, extracellular matrix factors, and cytoskeletal factors in differentiated adipocytes from ADSC.

研究分野：運動生化学

キーワード：脂肪由来幹細胞 ステムセルエイジング 運動 メラトニン 肥満 抗酸化能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2007年に超高齢社会に突入した我が国において、健康長寿実現のためのエビデンス構築は喫緊の課題である。Hallmarks of aging (Cell, 153: 1194-217, 2013)として知られる加齢変化の特性の中でも組織幹細胞の老化(加齢に伴う幹細胞の枯渇,品質や機能の低下)はステムセルエイジングと呼ばれ,その本質的なものと認識されている。ステムセルエイジングの発生要因のひとつに活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)バランスの破綻が考えられている。酸化ストレスは,生命現象を支配する酸化反応と抗酸化反応のバランスが破綻し,生体が酸化反応優位に傾く現象である。老化や肥満はその発生因子の1つであり,ROSの異常産生とROS消去酵素活性の低下の両方もしくはいずれか(ROSバランスの破綻)が生じ,癌や糖尿病などの生活習慣病のほか,心疾患や神経疾患など多くの疾患の発症や進展と深く関連することが知られている。近年,ROSは幹細胞の増殖やリプログラミング,さらに分化や代謝調節など多岐に関与することが解明され,ROSは幹細胞の運命決定を担う重要なシグナル分子のひとつと考えられている。

運動は肥満を基盤とする生活習慣病の予防・改善に有効な手段のひとつであり,身体に及ぼす主な運動効果として,ROS消去酵素活性の増加,ミトコンドリア量の増加および機能亢進,炎症性サイトカインの合成・分泌の抑制による組織慢性炎症の予防・改善などが知られており,細胞の抗酸化能力を向上させる。しかし,抗酸化能力を向上させる運動がステムセルエイジングに及ぼす影響はほとんど検討されておらず,未知な領域である。

2. 研究の目的

「運動は老化や肥満に伴う活性酸素種バランスの破綻を改善し,組織幹細胞のステムセルエイジングを予防・改善する」という仮説のもと,組織幹細胞,とりわけ脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ADSC)の加齢に伴う特性変化や機能低下に及ぼす運動の影響を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 被験動物ならびに老齢ラット作成

被験動物はWistar系雄性ラットを用いた。飼育環境への馴化を考慮して,7週齢のラットを1週間飼育した後に,8週齢のラットを無作為に通常食摂取(10kcal%脂肪含有量)群,超高脂肪食摂取(60kcal%脂肪含有量)群に分け,20ヶ月齢まで自由摂食,自由飲水の条件で飼育した。

(2) 老齢ラットへの運動およびメラトニン投与の介入方法

老齢ラットへの運動介入として,回転かご式ケージでの飼育による自発運動モデルを採用し,さらに強力な抗酸化能を有する松果体ホルモンであるメラトニンを投与する群を設定し,抗酸化能を薬理的に亢進させるポジティブコントロール群とした。20ヶ月齢の老齢ラットを無作為に通常食摂取+非介入群,通常食摂取+メラトニン投与群,高脂肪食摂取+非介入群,高脂肪食摂取+メラトニン群,高脂肪食摂取+自発運動群の5群に群分けし,8週間の介入を実施した。なお,メラトニン投与量は7.5mg/体重(kg)/dayとし,毎日同時刻に投与した。また若齢の対象群として16週齢(4ヶ月齢)のWistar系雄性ラットを採用した。

(3) ADSCの単離および脂肪細胞への分化プロトコル

介入期間終了後,麻酔下にて脱血し,皮下脂肪として鼠蹊部脂肪組織(Inguinal adipose tissue: iWAT),内臓脂肪として精巣周囲脂肪組織(Epididymal adipose tissue: eWAT)をそれぞれ採取し,申請者の研究成果の方法(J Cell Physiol., 234: 1452-1460, 2019)を参考にして成熟脂肪細胞とADSCを含む間質血管細胞群(SVF)とに分画し,その後SVFを継代培養(P3~4)することでADSCを回収した。

ADSCの脂肪細胞への分化は,6穴プラスチック培養皿を用い,100%コンフルエント後に,10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に,デキサメタゾン,3-イソブチル-1-メチルキサンチン,インスリン,インドメタシンを添加した分化培地を作成し,37°Cの5%炭酸ガスインキュベーター内で脂肪細胞へと分化させた。培地交換は3日毎に行った。分化誘導開始後9日目にサンプリングおよびOil red O染色を実施した。

(4) mRNAおよびタンパク質の発現解析

各群のラットのiWAT,eWATから単離したADSCならびにADSCから分化させた脂肪細胞の

mRNA およびタンパク質発現は、それぞれ常法に従い、real-time PCR 法とウエスタンブロット法によって定性または定量した。

(5) RNA-シーケンス解析 (RNA-seq) による網羅的解析

各群のラットの iWAT, eWAT から単離した ADSC および分化させた脂肪細胞から total RNA を抽出し, TruSeq Stranded mRNA Library Prep (Illumina), IDT for Illumina – TruSeq RNA UD Indexes (Illumina) の試薬を用いてライブラリーを作製の後に, NovaSeq 6000 (Illumina) を用いて RNA-seq による網羅的解析を実施した。その後, 得られた fastq ファイルをもとに遺伝子発現解析などのデータマイニングを行なった。

4. 研究成果

(1) 加齢, 高脂肪食摂取, メラトニン, 運動が体重および脂肪組織重量に及ぼす影響

16 週齢の若齢ラットと比較して, 20 ヶ月齢の老齢ラットは, 食餌の種類や介入の有無に関係なく体重が顕著に増加した。また老齢ラットの中で, 高脂肪食摂取群 (A-HC) は, 通常食摂取群 (A-NC) よりも体重が有意に高値を示したが, メラトニン投与による体重の変化は認められなかった (A-NC vs. A-NM, A-HC vs. A-HM)。一方, 回転ケージ飼育による自発運動群 (A-HE) では A-HC 群と比較して, 体重が減少した (図 1-1)。

皮下脂肪のひとつである鼠蹊部脂肪組織の重量の変化においても, 体重の変化と同様に, 高脂肪食摂取により顕著に増加した (A-NC vs. A-HC) が, メラトニン投与による変化は認められなかった (A-NC vs. A-NM, A-HC vs. A-HM)。さらに自発運動群 (A-HE) では, A-HC 群と比較して, 脂肪組織重量が有意に減少した (図 1-2)。

以上より, 老齢ラットにおける 2 ヶ月間のメラトニン投与および自発運動の介入による形態変化は, 自発運動のみで生じることが示された。

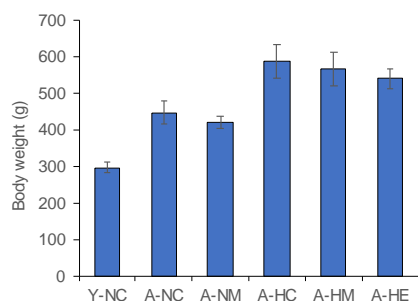


図 1-1. 老齢ラットの体重変化における高脂肪食摂取, メラトニン, 運動の影響

Y-NC; Young-Normal diet (ND) -fed + Control rat, A-NC; Aging-ND-fed + Control rat, A-NM; Aging-ND-fed + Melatonin treatment rat, A-HC Aging-High-fat diet (HFD) -fed + Control rat, A-HM; Aging-HFD-fed + Melatonin treatment rat, A-HE; Aging-HFD-fed + Exercise rat. 平均値 ± 標準偏差 (n=5)

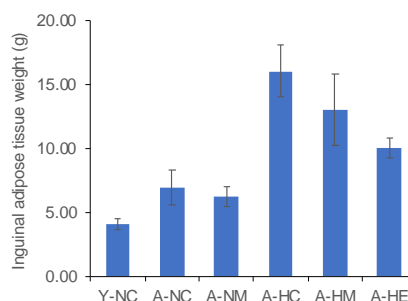


図 1-2. 老齢ラットの鼠蹊部脂肪組織重量の変化における高脂肪食摂取, メラトニン, 運動の影響

群設定は図 1-1 と同様。平均値 ± 標準偏差 (n=5)

(2) ADSC, 分化脂肪細胞における加齢および高脂肪食摂取の影響

16 週齢の若齢ラット (Y-NC), 20 ヶ月齢の老齢ラット (A-NC, A-HC) の鼠蹊部脂肪組織から脂肪由来幹細胞 (ADSC) を単離し, 加齢および高脂肪食摂取による食餌誘発性肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の影響を RNA シーケンス解析により検討した。遺伝子発現解析の結果をヒートマップで示した (図 2-1A)。さらに発現変動遺伝子がどのような分子パスウェイを持つ遺伝子が多いのかを調べるために Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析を実施した。その結果, プロテアソーム, Focal adhesion (細胞外マトリックス-細胞間の接着装置である接着斑), ケモカインシグナルが上位にランク付けされた (図 2-1B)。

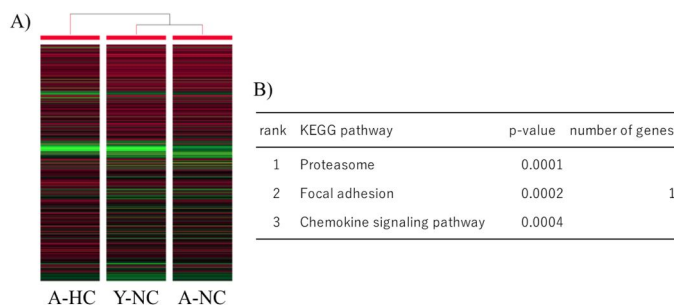


図 2-1. 鼠蹊部脂肪組織から単離した脂肪由来幹細胞に及ぼす加齢および高脂肪食摂取の網羅的解析

A) 発現遺伝子のヒートマップ B) KEGG パスウェイ解析の上位 3 パスウェイ. Y-NC; Young-ND-fed + Control rat, A-NC; Aging-ND-fed + Control rat, A-HC Aging-HFD-fed + Control rat (n=3)

次にそれぞれの群 (Y-NC, A-NC, and A-HC) から単離した ADSC の脂肪細胞へと分化能に及ぼす加齢および DIO の影響を検討した。ADSC の脂肪細胞への分化能は、脂肪滴のオイルレッド O 染色で評価し、加齢によって著しく分化能が低下した (図 2-2B)。次に RNA シーケンスによる網羅的解析を実施し、発現遺伝子の階層クラスタリングの結果をヒートマップで示した (図 2-2A)。その結果、分化能の変化と同様に若齢ラット (Y-NC) と老齢ラット (A-NC, A-HC) で同様の発現パターンを示した。さらに発現変動遺伝子の KEGG パスウェイ解析の結果、mTOR シグナル, Cell cycle, 細胞老化のパスウェイが上位にランク付けされた (図 2-2C)。

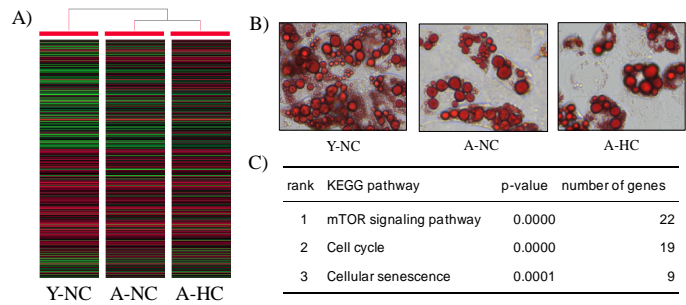


図 2-2. 鼠蹊部脂肪組織から単離した脂肪由来幹細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす加齢および高脂肪食摂取の網羅的解析
A) 発現遺伝子のヒートマップ B) オイルレッド O 染色の顕微鏡写真 C) KEGG パスウェイ解析の上位 3 パスウェイ。群設定は図 2-1 と同様。(n=3)

(3) 老齢ラットから単離した ADSC および分化脂肪細胞における運動の影響

図 1 の結果から、DIO 老齢ラットに対する抗肥満効果はメラトニン投与よりも運動の方が効果的であることが示された。したがって、ADSC および ADSC の脂肪細胞への分化能に及ぼす運動の影響を RNA シーケンス解析により検討した。

3 群 (A-NC, A-HE, and A-HC) から単離した ADSC の発現遺伝子の結果をヒートマップで示した (図 3-1)。さらに発現変動遺伝子の KEGG パスウェイ解析の結果、Cytokine-cytokine receptor interaction, Focal adhesion, マイトファジーのパスウェイが上位にランク付けされた (図 3-1B)。

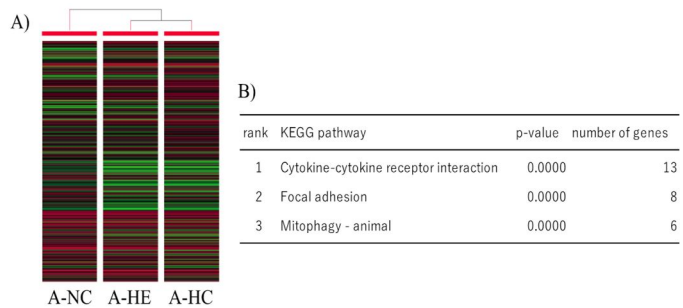


図 3-1. 鼠蹊部脂肪組織から単離した脂肪由来幹細胞に及ぼす高脂肪食摂取および運動の網羅的解析
A) 発現遺伝子のヒートマップ B) KEGG パスウェイ解析の上位 3 パスウェイ。A-NC; Aging-ND-fed + Control rat, A-HC Aging-HFD-fed + Control rat, A-HE; Aging-HFD-fed + Exercise rat (n=3)

次に単離した ADSC の脂肪細胞へと分化能に及ぼす運動の影響を検討した。ADSC の脂肪細胞への分化能は、高脂肪食摂取群 (A-HC) で顕著に分化能が低下したが、自発運動の介入によって分化能が改善することが示された (図 3-2B)。

次に RNA シーケンスによる網羅的解析を実施し、発現遺伝子の階層クラスタリングの結果をヒートマップで示した (図 3-2A)。その結果、分化能の変化と同様に分化能が著しく低下した高脂肪食摂取群 (A-HC) が別カテゴリーに分類され、A-NC と A-HE は同じカテゴリーに分類された。さらに発現変動遺伝子の KEGG パスウェイ解析の結果、Metabolic pathway, MAPK signaling pathway, PPAR signaling pathway が上位にランク付けされた (図 3-2C)。

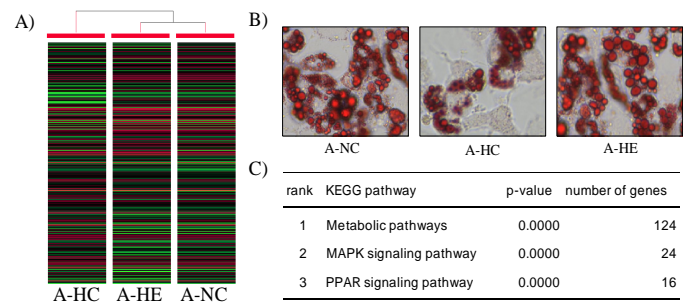


図 3-2. 鼠蹊部脂肪組織から単離した脂肪由来幹細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす高脂肪食摂取および運動の網羅的解析
A) 発現遺伝子のヒートマップ B) オイルレッド O 染色の顕微鏡写真 C) KEGG パスウェイ解析の上位 3 パスウェイ。群設定は図 3-1 と同様。(n=3)

(4) まとめ

本研究の結果は、運動は加齢や肥満に伴う抗肥満効果が期待できること、さらに組織幹細胞、とりわけ脂肪由来幹細胞 (ADSC) の機能および分化異常を改善する可能性があることを強く示唆した。また運動および抗酸化能を有するメラトニン投与の共通した効果として、加齢や肥満によって ADSC で増加した炎症性サイトカインや細胞外マトリックス、細胞骨格関連因子の発現量を減少させることが明らかとなった (data not shown)。これらの結果は、加齢や肥満に伴う ADSC の機能異常の予防・改善には抗酸化能を亢進させることが重要であることを示唆しており、研究開始時の仮説を一部証明する結果となった。しかし、ADSC に及ぼす運動やメラトニンの作用機序を明らかにするところまでは至らず、今後の課題となった。しかし、その点を差し引

いても、本研究は組織幹細胞に及ぼす運動の新しい知見を提供できたと考える。

引用文献

López-Otín C et al. The hallmarks of aging. *Cell* 153(6): 1194-1217, 2013

Kato H et al. Exercise ameliorates high-fat diet-induced impairment of differentiation of adipose-derived stem cells into neuron-like cells in rats. *J Cell Physiol* 234(2): 1452-1460, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kato Hisashi, Shibahara Takuya, Rahman Nazibur, Takakura Hisashi, Ohira Yoshinobu, Izawa Tetsuya	4. 巻 6
2. 論文標題 Effect of a 9-week exercise training regimen on expression of developmental genes related to growth-dependent fat expansion in juvenile rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13880 ~ e13880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13880	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 Kato Hisashi, Minamizato Hidemasa, Ohno Hideki, Ohira Yoshinobu, Izawa Tetsuya	4. 巻 234
2. 論文標題 Exercise ameliorates high-fat diet-induced impairment of differentiation of adipose-derived stem cells into neuron-like cells in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1452 ~ 1460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.26957	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kato H., Osawa S., Imai K., Takakura H., Ohira Y., Izawa T.
2. 発表標題 Effect of exercise training on neurogenesis of adipose-derived stem cells isolated from fat-depot in high-fat diet-fed rats.
3. 学会等名 Cell Symposia: Exercise Metabolism Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ohira Y., Ozaki Y., Kato H., Izawa T.
2. 発表標題 Effects of inhibition of reactive oxygen species on the properties of rat soleus muscle during hindlimb suspension.
3. 学会等名 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology and Space Life Science and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Osawa S., Kato H., Maeda Y., Takakura H., Ohira Y., Izawa T.
2. 発表標題 Effect of 9-week exercise training regimen on expression of developmental genes in adipose-derived stem cells of rats.
3. 学会等名 40th Annual Meeting of the International Society for Gravitational Physiology and Space Life Science and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤久詞, 前田優希, 大澤晴大, 大平充宣, 井澤鉄也.
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす微小重力および運動の影響.
3. 学会等名 第65回日本宇宙航空環境医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤久詞, 大澤晴大, 只野愛実, 前田優希, 高倉久志, 井澤鉄也.
2. 発表標題 運動トレーニングに伴う体重・体脂肪量調節に及ぼすメラトニンの影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤晴太, 加藤久詞, 前田優希, 只野愛実, 井澤鉄也.
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化に及ぼすアミノ酸の影響は高脂肪食摂取と運動トレーニングで異なるか?
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田優希，加藤久詞，大澤晴太，只野優希，高倉久志，井澤鉄也。
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化能に及ぼす運動トレーニングおよび微小重力の影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 櫻井拓也，白土 健，加藤久詞，石橋義永，井澤鉄也，芳賀脩光，大野秀樹，木崎節子。
2. 発表標題 脂肪細胞のベージュ化に伴う遺伝子発現変化の包括的解析
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤久詞，今井一貴，大澤晴太，高倉久志，大平充宣，井澤鉄也
2. 発表標題 脂肪由来間葉系幹細胞の神経様細胞への分化能に及ぼす高脂肪食摂取および運動トレーニングの影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井澤鉄也，加藤久詞，大澤晴太，今井一貴，高倉久志，大平充宣
2. 発表標題 代謝プロファイル運動トレーニングならびに高脂肪食摂取が脂肪組織由来幹細胞（ADSC）の代謝プロファイルに及ぼす影響
3. 学会等名 第73回日本体力医学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato H., Ohira Y., Izawa T
2. 発表標題 Effect of endurance exercise training on neurogenesis of adipose-derived stem cells, isolated from fat-depot in Wistar rats
3. 学会等名 ISGP/ESA Life Sciences Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社大学スポーツ健康科学部 スポーツ生化学研究室ホームページ https://izawalab.wixsite.com/izawalab
--

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

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
---------	---------