

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18470

研究課題名(和文) 筋骨格系脆弱化におけるHMGB2に基づく間葉系細胞の分化制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism of mesenchymal stem cell differentiation based on HMGB2 in musculoskeletal fragility

研究代表者

李 徳哲 (Deokcheol, Lee)

宮崎大学・医学部・プロジェクト研究員

研究者番号：60768175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：異所性脂肪の増加などの骨格筋の質の低下が、直接的に筋力低下、さらにはサルコペニアの原因となる。我々はhigh-mobility group box 2 (HMGB2)の発現低下によって、間葉系幹細胞の脂肪分化能が著明に低下することを示してきた。本研究では、HMGB2欠損により、間葉系幹細胞においてその分化制御因子である β -cateninの発現、酸化ストレス能が増加することを明らかにした。加齢やサルコペニア誘導下のHMGB2欠損マウスにおいても同様の傾向を示し、筋内異所性脂肪発生、筋重量減少が抑制された。HMGB2が筋内異所性脂肪発生の重要な制御因子である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命の阻害因子である加齢性骨格筋減少症(サルコペニア)は新しい概念であり、その機序の解明が急務である。サルコペニアにおいて、骨格筋内の異所性脂肪が直接的に筋力を低下させるとの知見が近年増えている。Wnt/ β -catenin経路や酸化ストレス反応などに作用する、HMGB2の筋内脂肪発生制御機構を明らかにしたことは、サルコペニアのみならず加齢現象の予防・治療法研究に貢献することと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Deterioration of muscle quality, such as ectopic fat infiltration, directly reduces muscle strength and causes sarcopenia. Our recent study showed that high-mobility group box 2 (HMGB2) deficiency in mesenchymal stem cells (MSCs) reduces the differentiation potency into adipocytes.

This study showed that β -catenin expression and anti-oxidative stress capacity were also enhanced in MSCs from HMGB2 knockout (KO) mice. Furthermore, muscular volume less decreased, and the expression of adipogenesis-promoting factors and fat infiltration in muscles was less induced in HMGB2 KO mice than in wild-type mice during aging or in a sarcopenia-inducing model. Thus, our findings indicate that HMGB2 induces adipogenesis or fat infiltration into muscles by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway and the reaction to anti-oxidative stress.

研究分野：整形外科

キーワード：HMGB2 サルコペニア 骨格筋 異所性脂肪 β -catenin 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動器の障害により移動機能が低下した状態はロコモティブシンドロームと定義され、その原因として骨粗鬆症に加え、近年では加齢性筋量減少-サルコペニアが注目されている。サルコペニアの病態の背景の一つに、骨格筋への異所性脂肪浸潤による筋骨格系脆弱化が考えられている。さらに、この筋内異所性脂肪浸潤は不可逆的に加齢とともに進行し、腱断裂修復においては再断裂などの術後成績不良因子ともなる。

しかしながら、筋骨格系脆弱化に関与する筋内異所性脂肪浸潤の分子基盤については未だ不明であり、病態制御の解明に基づくサルコペニアの予防・治療法の確立が急務である。申請者らの研究グループは、HMGB2 欠損は間葉系細胞の脂肪分化を抑制するのみならず、骨分化を促進することを明らかにし、その筋骨格系脆弱化の制御因子としての役割を見出していた (Sci. Rep. 2018; Taniguchi et al. J. Biol. Chem. 2011)。

2. 研究の目的

本研究では間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) の骨や脂肪への分化選択関門における High mobility group box 2 (HMGB2) の役割に着目し、生体の加齢/骨折/腱断裂に関連した筋骨格系脆弱化における HMGB2 の病態生理学的な意義およびその制御機構を初めて証明することが目的である。

さらに、その創造性としてこれまで未知であった「筋内異所性脂肪の起源と発生機序」の解明により、筋骨格系脆弱化に起因する加齢性筋量減少-サルコペニアの病態解明が期待される。

3. 研究の方法

(1) 野生型 (wild type: WT) マウスを対照とした HMGB2 欠損 (knockout: KO) マウス骨髄由来 MSC を用い、HMGB2 の発現抑制による MSC の脂肪分化抑制機序を比較解析した。

MSC を脂肪分化誘導し、分化過程の Wnt/ β -catenin 経路の要素の発現量をウェスタンブロットで反定量した。

分化過程の NRF2 発現量ならびに、H₂O₂ による酸化ストレスを加えた状態での SOD アッセイによる抗酸化ストレス能、MTT アッセイによる細胞生存能を評価した。

(2) WT マウスを対照とした HMGB2 KO マウスの、2、6、12 月齢での加齢による骨格筋性状変化を比較した。

体重・腓腹筋重量、type2 筋繊維 (速筋) の量、筋内異所性脂肪の発生を評価した。

腓腹筋における脂肪分化誘導因子、筋委縮誘導因子の発現量を定量的 PCR で測定した。

(3) WT マウスを対照とした HMGB2 KO マウスの、アキレス腱・脛骨神経断裂モデル (サルコペニア誘導モデル) を作成し、断裂 1、2、8、16 週後の腓腹筋性状を比較した。

筋重量/体重比を測定した。

筋内異所性脂肪の発生を組織標本にて評価した。

腓腹筋における脂肪分化誘導因子、筋委縮誘導因子の発現量を定量的 PCR で測定した。

腓腹筋における NRF2、 β -catenin、PDGFR α の発現を免疫染色で評価した。

4. 研究成果

(1) 脂肪分化誘導下 WT, KO MSC の解析

過去の報告通り、WT MSC において Oil-Red O 染色で分化誘導 1 週での脂肪細胞への分化、および誘導早期の HMGB2 発現上昇・その後の低下を確認した。一方、HMGB2 発現抑制により MSC の脂肪分化能は著明に低下した。MSC の分化選択関門において、Wnt/ β -catenin 経路の活性化により MSC は骨分化し、経路抑制により脂肪分化する。KO MSC では分化誘導前から β -catenin の発現が増加していた。また、分化誘導下において KO 細胞では、 β -catenin のユビキチン化を阻害し、核内移行を促す Dvl1, p-GSK 3 (Ser 9) の発現が増加していた。

酸化ストレスによって脂肪分化誘導遺伝子が活性化され、MSC は脂肪分化誘導される。抗酸化ストレス反応は NRF2 により誘導され、脂肪分化誘導下において KO MSC では WT MSC に比較して NRF2 が高発現だった。また、抗酸化酵素である SOD の活性は、KO MSC で高く KO MSC の細胞生存率 (MTT アッセイ) は 0-1000 μ M まで H2O2 各濃度において、WT より 20%以上有意に高かった。

(2) WT, KO マウス腓腹筋の加齢変化の解析

筋骨格系の明らかな奇形は HMB2 欠損によっては認めなかった。内臓周囲脂肪は WT と同様に KO マウスにおいても認めしたが、12 月齢での筋内異所性脂肪は HE 染色、走査型電子顕微鏡評価観察において少なかった。12 月齢 KO マウスにおいて体重は WT マウスと比較して 12%有意に軽く、腓腹筋も有意ではないが軽い傾向にあった。2, 12 か月齢おける NADH-DR 染色では、KO マウスにおいて type-2 筋繊維の比率が高かった (66% vs 71%, 56% vs 65%)。

腓腹筋における定量的 PCR では、まず、WT マウスにおいて *Hmgb2* の発現は加齢ともに減少した。骨、脂肪、筋細胞において、その成熟化とともに HMGB2 の発現は低下することが報告されている。WT、KO マウスともに 6 月齢で筋萎縮誘導因子 *Atrogin-1*, *Murf1* の発現量が増加し、WT-KO 間に差は無かった。一方、WT マウスにおいて特に 12 月齢で増加する脂肪分化転写因子 *Pparg* の発現は、KO マウスでは各月齢で有意に発現が低かった。

(3) WT, KO マウスサルコペニアモデルの解析

腱断裂と脱神経処置による腓腹筋への萎縮、異所性脂肪発生などのサルコペニア変化誘導により、2 週間後から筋重量は Sham 側と比較して劇的に減少した。KO マウス断裂側筋重量は、各 time point で Sham 側の 50%を超え、有意に WT マウスと比較して重かった。

HE 染色、走査型電子顕微鏡評価観察においては WT で豊富に認めた筋内異所性脂肪の量は、KO マウスにおいては少なかった。

モデル腓腹筋における定量的 PCR では、WT マウスにおいて、断裂後早期に著明に *Hmgb2*、脂肪分化転写因子 *Pparg*, *Cebpa* が上昇、その後低下した。一方、KO マウスにおいて脂肪分化転写因子の発現は有意に低かった。また、*Atrogin-1*, *Murf1* の発現も KO マウスにおいて低かった。

免疫染色では、断裂後早期に WT マウスにおいては、筋内異所性脂肪の起源となる間質の

PDGFRA 陽性細胞が増加を認めたが、KO マウスにおいては同陽性細胞の発現は少なかった。一方、KO マウスにおいては WT と比較して NRF2 の発現が著明に増加し、 β -catenin は断裂後早期から多くの核内移行を認めた (WT では細胞質に多く発現)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takuji Yokoe
2. 発表標題 HMGB2 regulates the differentiation of mesenchymal stem cells by suppressing the expression of -catenin
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Deokcheol Lee
2. 発表標題 The effect of HMGB2 on musculoskeletal degeneration including ectopic fat infiltration into the muscle
3. 学会等名 The 9th Spring Scientific Congress of Korean Society of sarcopenia (招待講演)
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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