

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21572

研究課題名（和文）老化制御因子としての間葉系幹細胞ならびにそのexosomesに関する研究

研究課題名（英文）Research on mesenchymal stem cells and their exosomes as aging regulators

研究代表者

葛谷 雅文（Kuzuya, Masafumi）

名古屋大学・未来社会創造機構（医）・教授

研究者番号：10283441

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：臍帯由来間葉系幹細胞（UC-MSC）の老化への影響を検討するため老化促進マウス（SAMP10）24週齢にUC-MSCを尾静脈より投与し、加齢性サルコペニアへの影響を検討した。投与12週間後評価でUC-MSC投与により骨格筋量、筋力、持久力の改善を認めた。そのメカニズムとしてUC-MSC投与による筋タンパク合成の促進（異化の抑制）、筋線維内のミトコンドリア活性化、炎症の軽減、アポトーシスの抑制などが考えられた。またUC-MSC由来のエクソゾームの全身投与によっても同様な効果が観察されたことより、UC-MSCの加齢性サルコペニアへの効果はパラクライン的な効果が想定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な組織由来の間葉系幹細胞（MSC）による種々の治療法の開発が進んでおり、臨床応用が既に始まっている疾患も存在する。しかし、その多くは局所的な障害をターゲットとした治療であり、老化自体をターゲットとする研究は今のところない。今回の我々の研究はターゲットとして筋肉老化（サルコペニア）を使用した。今回の知見からはMSCの投与は他臓器の老化にも同様な効果が期待でき、今後の老化制御、老化遅延にむけた研究に今後展開できる可能性があり、医学のみならず世界的な高齢化の進む社会に対してもインパクトが大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) on aging, 24-week-old Senescence-Accelerated Mouse (SAM) prone 10 (SAMP10) mice were injected with UC-MSCs via tail vein and the effect on age-related sarcopenia was examined. At 12 weeks after administration, the UC-MSCs improved skeletal muscle mass, muscle strength, and endurance compared to the control (PBS). The possible mechanisms of this improvement included enhancement of muscle protein synthesis (suppression of catabolism), activation of mitochondria in muscle fibers, reduction of inflammation, and suppression of apoptosis. The same effect was also observed with systemic administration of UC-MSC-derived exosomes, suggesting that the effect of UC-MSC on age-related sarcopenia is paracrine.

研究分野：老年医学

キーワード：老化 サルコペニア 間葉系幹細胞 細胞治療 エクソゾーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

老化は全身的かつ非可逆的な臓器障害を誘導する要因として認識されてきた。しかし、近年老化ならびに若年小動物の並体結合や若年動物血清の老化動物への投与により、老化動物の種々の臓器の再生(若返り)が誘導されるなどの報告がされたことより、何らかの液性因子が老化を制御している可能性が示唆されている。しかし、なお、その液性因子が何であるかは不明のままである。また、近年、様々な組織由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) による種々の治療法の開発が進んでいる。骨髄、脂肪組織、臍帯血、臍帯などの多数の組織由来の MSC を使用した種々の病態に対するトライアルがなされ、臨床応用が既に始まっている疾患も存在する。しかし、その多くは局所的な障害をターゲットとした治療であり、老化自体をターゲットとする研究は今のところない。

2. 研究の目的

本研究の目的は臍帯由来間葉系幹細胞さらにはその細胞由来の exosomes が老化を制御し、老化を基盤とする臓器障害を抑制できるかどうかを検討する。当該研究では各臓器の中でも老化による影響を最も受け、高齢者の身体機能、フレイル、健康寿命にも大きな影響を与える骨格筋萎縮・筋力低下(加齢性サルコペニア)を臓器障害のターゲットとして検討する。なお加齢性サルコペニアに対するメカニズムは十分解明されてはいないが、介入方法としては十分なたんぱく質摂取を含む栄養介入ならびにレジスタンス運動を中心とした運動介入が知られるが、今のところ効果的な薬物療法は確立されていない。本研究は将来のサルコペニアに対する細胞療法の臨床応用を目指す研究でもある。

3. 研究の方法

(1) 加齢性サルコペニアの出現を確認している老化促進マウス (Senescence-Accelerated Mouse: SAM) の prone 10(SAMP10) を使用し、尾静脈より臍帯由来の MSC (UC-MSC) ($1 \times 10^6/150 \mu\text{l}$) または UC-MSC 細胞上清から超遠心法にて採取された中の exosome (超遠心法にて採取) を 24 週齢に注入した。UC-MSCs は passage 4 を使用した。対照として PBS を同量投与した。36 週齢時に両側下肢筋肉を採取し、一部を組織学的検討用に液体窒素にて凍結包埋後、残りを生化学的評価、タンパク質解析用に凍結保存、mRNA 解析用に RNeasy lysis solution で保存した。採血サンプルは血清を分離し、生化学検査用に凍結保存した。36 週齢迄の経過中 4 週間ごとにマウス下肢筋力ならびに持久力を小動物用握力測定器 (5 回以上の測定の平均値を使用) 小動物用トレッドミルで評価した。トレッドミルでの持久力評価はトレッドミルのスピードならびにその勾配を徐々に上げてマウスが動くことを 10 秒以上中止した時点までの時間を評価対象とした。

(2) 筋肉組織の以下のタンパク質を western blotting 法を用いて定量化した。(total mammalian target of rapamycin (mTOR), phospho-mTORer2448 (p-mTOR), total Akt, phospho-Aktser473 (Akt), silent information regulator 1 (Sirt1), total extracellular signal-regulated kinase1/2 (Erk1/2), phospho-Erk1/2thr202/tyr204(p-Erk1/2), total adenosine monophosphate (AMP)-activated protein kinase alpha (AMPK), phospho-AMPK (p-AMPK), peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator1- (PGC1-), slow myosin heavy chain (MHC), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)) また筋組織内の以下の mRNA を RT-PCR 法を用いて定量化した (cytochrome c oxidase subunit 4 (COX)-IV, glucose transporter-4 (GLUT-4), PGC1- , hepatocyte growth factor (HGF), paired box-7 (PAX-7), myogenic differentiation antigen (MyoD), tumor necrosis factor (TNF)- , monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), gp91phox, GAPDH) 。対照ならびに実験群の骨格筋を以下の免疫組織染色、透過型電顕観察(特にミトコンドリア形態観察)を実施した。a) H&E 染色、b) CD45、c) CD68、d) TUNEL 染色、e) Masson's trichrome 染色、f) laminin & desmin 二重染色を実施した。さらに筋肉組織のミトコンドリアのサイズならびに数を評価するために 15,000x での電子顕微鏡下の評価を実施した。

4. 研究成果

(1) UC-MSCs 投与群と対照群との筋力ならびに持久力の比較では介入後 2 カ月間は有意な差を認めなかったが、その後 32 週、36 週には UC-MSCs 投与群で対照に比較し筋力ならびに持久力の改善を認めた (図 1A,B) 。さらには腓腹筋ならびにヒラメ筋の体重で補正した重量は UC-MSCs 投与群で対照に比較し有意に重かった (図 1C,D) 。さらに個々の筋繊維の横断面積も UC-MSCs 投与群で大きかった。

(2) UC-MSCs 投与群の腓腹筋では対照と比較し myosin heavy chain (MHC)、Sirt1、PGC (ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子) -1 α 、p-mTOR (mammalian target of

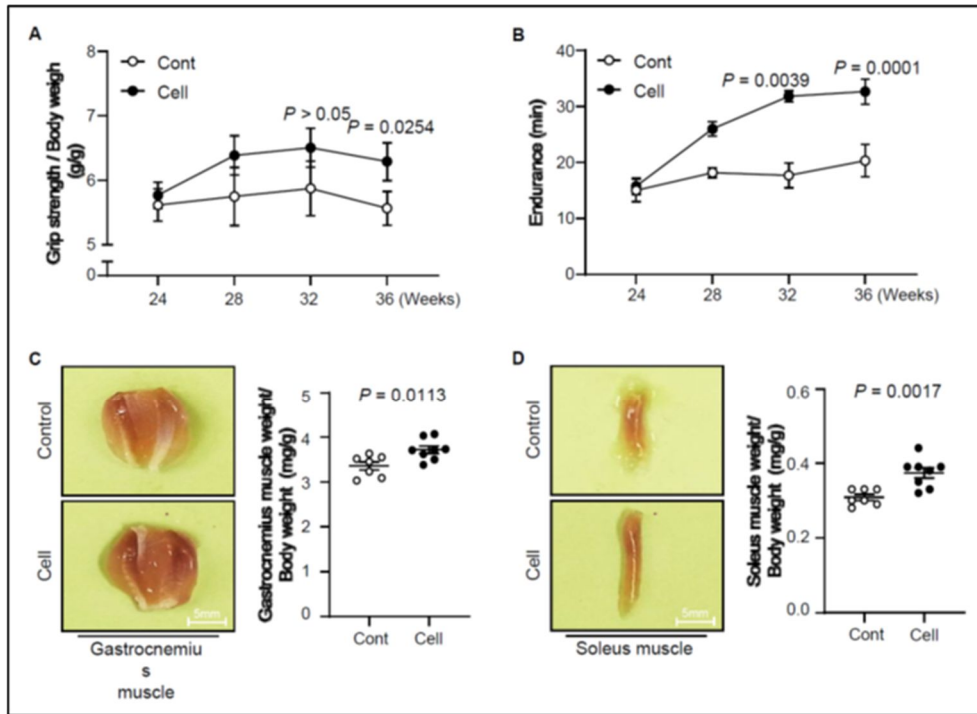


図 1. UC-MSCs投与による筋力 (Grip strength) と持久力のタイムコースならびに筋肉量への効果

rapamycin)、p-ERK (extracellular signal-regulated kinase) 1/2、p-AKT (Protein Kinase B) ならびに p-AMPK (AMP-activated protein kinase) タンパクの発現が著しく増加していた (図 2 A,B)。これらの結果からは UC-MSCs 投与により骨格筋における筋タンパク合成の促進 (異化の抑制) さらに筋線維内のミトコンドリア活性化が想定される。実際 UC-MSCs 投与で MHC の増加や電顕での観察によりミトコンドリアの数ならびにサイズの増大を認めた (data not shown)。

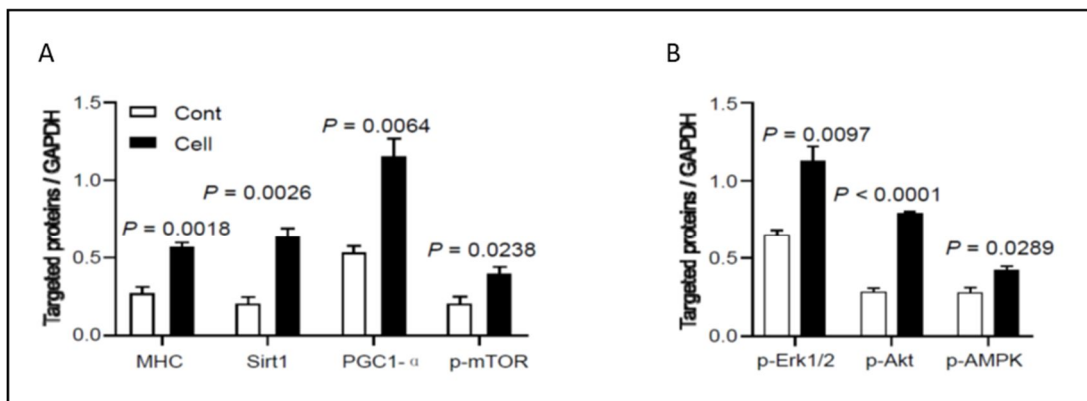


図 2. 腓腹筋における種々のタンパク発現 (western blottingの結果より)

腓腹筋、ヒラメ筋における種々の mRNA 発現を検討したところ、gp91phox (食細胞 NADPH オキシターゼの主成分)、TNF- α 、MCP-1 の発現が対照と比較し UC-MSCs 投与群で有意な増加を認めた (図 3)。

(3) 腓腹筋ならびにヒラメ筋の CD68 の免疫染色 (マクロファージのマーカー) では UC-MSCs 投与群 (36 週齢) は対照と比較し、明らかに CD68+細胞数は減少していた (図 4A,B)。またアポトーシスの存在を定量化するため TUNEL 染色を実施したが、対照に比し UC-MSCs 投与群では両筋肉でアポトーシスの減少を認めた (図 4C,D)。

(4) Exosome 投与においても対照と比較し、UC-MSCs 投与とほぼ同様の筋力、持久力の改善ならびに筋量の増加を認めた。

(5) Exosome の in vitro の効果を検討した。マウス筋芽細胞株の C2C12 細胞を用いた系で H₂O₂ により誘導されたアポトーシスに対する抑制作用、doxorubicin を用いた細胞老化の抑制作用、さらには exosome の筋芽細胞の分化促進作用を合わせて認めた (data not shown)。

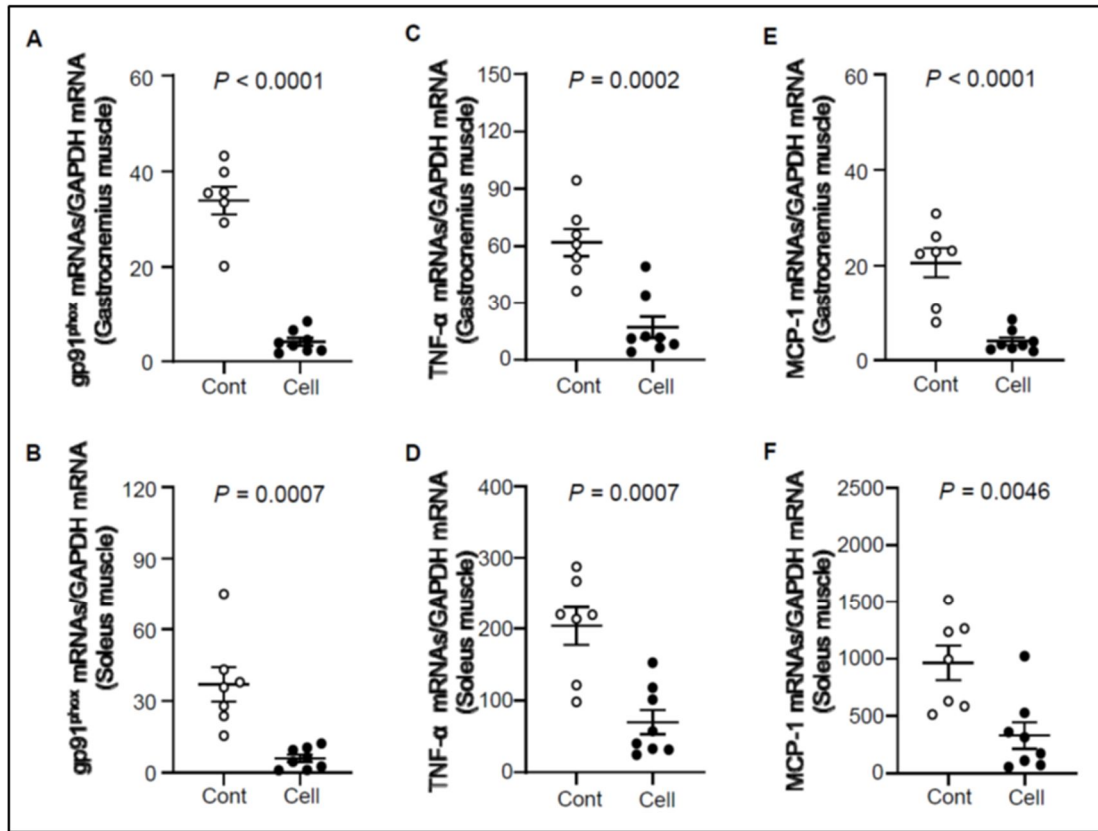


図3. 腓腹筋およびヒラメ筋における種々のmRNA発現 (RT-PCRの結果より)

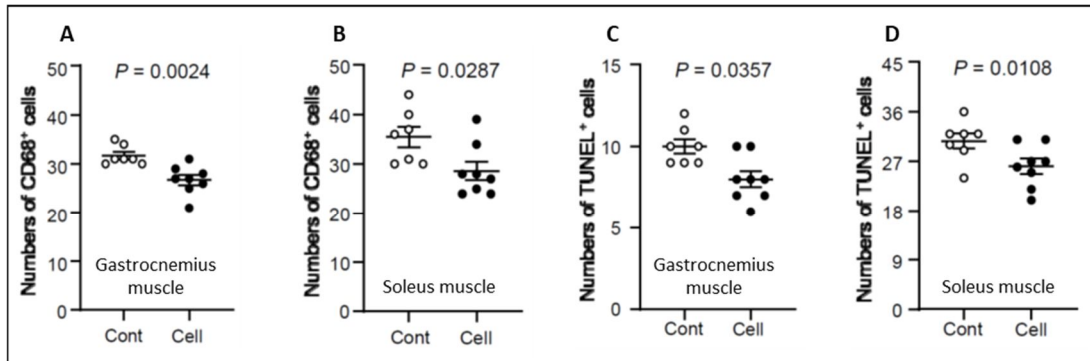


図4. 腓腹筋およびヒラメ筋におけるCD68陽性細胞ならびにアポトーシス

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 筋肉量の低下抑制に用いる細胞調製物	発明者 成憲武、黄哲、朴麗梅、葛谷雅文、原田雅充	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、2020-190551	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	黄 哲 (Kou Tetsu) (30745112)	名古屋大学・医学系研究科・特任講師 (13901)	
研究分担者	朴 麗梅 (Boku Reimei) (60867208)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	

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