

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：20101  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21H03293  
研究課題名（和文）細胞老化制御に基づく組織再生リハビリテーション：セノリハビリテーションの基盤創成

研究課題名（英文）Senorehabilitation: A novel approach to tissue regeneration based on cellular senescence

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） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：老化細胞はサイトカインや成長因子など様々な生理活性因子を分泌することで周囲の細胞に働きかけて組織を再生へ導く。これまでの研究で力学刺激によって細胞老化を制御できる可能性を見い出してきたことから、リハビリテーションによる細胞老化を制御することで組織再生を促す、セノリハビリテーションという新しい可能性を見出し、検証した。

本研究課題では、*in vitro*実験と運動後のマウス骨格筋のシングルセルRNA-seqデータの解析によって、細胞老化が誘導されやすい細胞集団を同定した。加えて、肥満マウスにおける運動後の骨格筋マウスでは異なる集団が細胞誘導されやすいことも明らかにした。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞老化はサイトカインや成長因子など様々な生理活性因子を分泌することで周囲の細胞に働きかけて組織を再生へ導く一方、長期的に組織に蓄積することで慢性炎症を引き起こす原因細胞となる。この老化細胞を標的とした治療法の開発が、慢性炎症疾患および健康長寿達成のために大きな注目を集めている。本研究成果では、運動刺激によって細胞老化が誘導されやすい細胞集団を同定に成功した。この成果は、メカニカルストレスおよびリハビリテーションによる細胞老化制御の達成に向けた基盤データとなり、将来的には健康長寿社会達成につながる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：Senescent cells secrete various bioactive factors, such as cytokines and growth factors, which influence surrounding cells to promote tissue regeneration. Our previous research has suggested that mechanical stimulation can modulate cellular senescence, leading to the concept of "Senorehabilitation." This approach aims to control cellular senescence through rehabilitation to enhance tissue regeneration, and its potential has been investigated.

In this study, we identified cell populations that are more prone to senescence induction through *in vitro* experiments and single-cell RNA-seq analysis of mouse skeletal muscle post-exercise. Additionally, we discovered that different cell populations are more susceptible to senescence induction in the skeletal muscle of obese mice following exercise.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：細胞老化 再生 リハビリテーション エクササイズ 糖尿病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リハビリテーションは障害された器官・組織に対して、適切な時期に、適切なストレスを与えることによって、本来もっている修復力を引き出す企てである。外部からのマクロなストレスはミクロレベルで細胞へとつながり、細胞が働き始めるきっかけとなる。細胞老化はその細胞の働きの一つで、発生・再生・炎症に至るまでダイナミックな機能を果たすことから、医学・生物学分野で注目が集まっている。老化細胞は安定的に細胞周期を停止する一方、代謝的には非常に活発で、サイトカインやケモカイン、エクソソームなど様々な生物活性を有する因子を分泌する。この分泌現象を老化関連分泌表現型(Senescence-associate secretory phenotype: SASP)と呼ぶ。この SASP によって、老化細胞は周囲の細胞に働きかけて組織を再生へ導く一方で、老化細胞の蓄積は組織の変性や慢性炎症を引き起こすことも知られている。

我々は、これまで細胞老化がもつ有益な働きを解析し、急性炎症過程の骨格筋では、間質細胞が老化して再生能力を引き出す機能(Senescence [老化]-Clearance [除去]-Regeneration [再生]連鎖)を有すること、さらに力学ストレスによる細胞老化誘導が再生への連鎖を引き起こし、再生能力を回復させることを解明してきた (Saito Y et al., Nature Commun, 2020 & Chikenji TS, Saito Y et al., EBioMedicine, 2019)。また、メカニカルストレスによって細胞老化を制御できる可能性を見い出してきたことから、リハビリテーションによる細胞老化を制御することで組織再生を促す、セノリハビリテーションという新しい治療アプローチの可能性を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はメカニカルストレスによる細胞老化制御機構を解明し、リハビリテーションによる細胞老化を制御することで組織再生を促す、セノリハビリテーションという新しい治療アプローチの開発に向けた基盤データを取得することである。

### 3. 研究の方法

1) ヒト骨格筋由来線維芽細胞(TIG-2M)を JCRB 細胞バンクから入手し、培養した。TIG-2M が骨格筋の再生や変性に関与する間葉系前駆細胞(Mesenchymal progenitor cell: MPC)であるかを検証するため、mesenchymal stem cell differentiation 誘導培地で培養し、骨・軟骨・脂肪への分化能を検証した。

2) TIG-2M にメカニカルストレスを負荷するため、伸展培養装置(Shellpa, メニコン)を使用した。コラーゲンコートされたストレッチチャンバー上に TIG-2M を播種し、24~72 時間培養後に 10%~20%の伸長率で cyclic stretch を実施した。培養後の細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現解析を実施した。また、運動による細胞老化誘導が起こりづらいことが推察される糖尿病状態を模擬するため、グルコースおよび炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  を添加した、糖尿病 in vitro モデルを作成し、cyclic stretch を負荷した。

3) 正常マウスおよび高脂肪食を与えた肥満マウスに対する自発的運動後の骨格筋組織におけるシングルセル RNA-seq データを取得し、バイオインフォマティクス解析を実施した。解析には R パッケージの Seurat および細胞間コミュニケーション解析可能なパッケージの Cellchat を使用した。

4) 公共データベースに存在する運動後のトランスクリプトーム解析データからメタアナリシスが可能なツールである MetaMEx を用いて、運動後のヒト骨格筋における細胞老化関連遺伝子群の発現変化の解析を実施した。

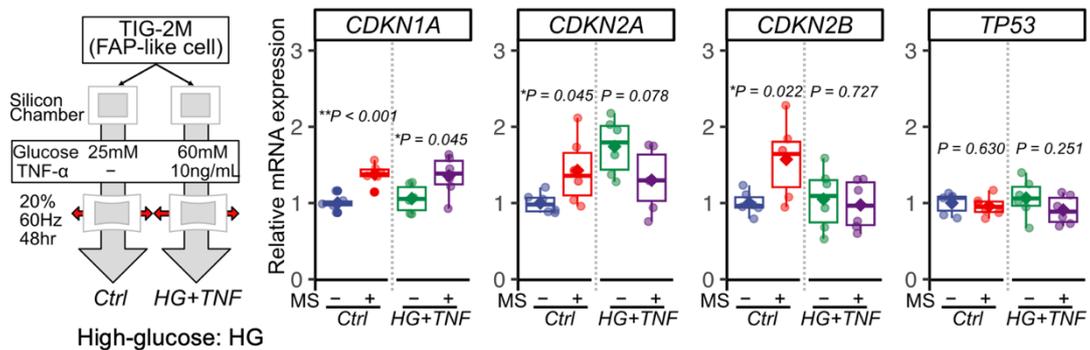
### 4. 研究成果

TIG-2M は脂肪、骨、軟骨への分化能を有する間葉系細胞としての特徴を有していたため、MPC として伸展培養実験に用いた。MPC に対する cyclic stretch は細胞老化関連遺伝子である CDKN1A, CDKN2A, および CDKN2B の発現レベルを増加させた。一方で、in vitro 糖尿病モデルとして作成した、グルコースおよび炎症性サイトカインの TNF- $\alpha$  添加培地で培養した TIG-2M では CDKN1A の発現レベルは増加した一方で、CDKN2A および CDKN2B の発現レベルは低下する傾向を示した(図)。

次に、常マウスおよび高脂肪食を与えた肥満マウスに対する自発的運動後の骨格筋組織におけるシングルセル RNA-seq データを取得し、バイオインフォマティクス解析を実施した。同定された細胞クラスターは、正常マウス骨格筋と肥満マウス骨格筋ともに、筋細胞、筋幹細胞、MPC、モノサイト、好中球、T 細胞、NK 細胞、血管内皮細胞、グリア細胞、テノサイトであった。運動後に細胞老化が誘導されるクラスターを同定するため、細胞老化関連遺伝子セットを用いて Gene set enrichment analysis を実施したところ、MPC 細胞集団で運動後に細胞老化関連遺伝子セットのエンリッチメントスコアが高いことがわかった。MPC 集団に着目して、正常マウスと肥満マウスをそれぞれグループ化して細胞老化関連遺伝子のエンリッチメントスコアを運動前後で比較したところ、正常マウスでは運動後にエンリッチメントスコアが増加する一方で、肥満マウスでは低下していることが明らかになった。さらにそれぞれの細胞集団で GO エンリッチメントパスウェイ解析を実施したところ、運動によって細胞老化が誘導されない肥満マウス MPC では、筋萎縮に関与することが知られる TNF シグナルや異所性組織形成に関わる Fibrosis & ossification や Myofibroblast activation に関連するパスウェイが亢進していることが明らかになった。

ついで、細胞間コミュニケーションを Cellchat を用いて実施したところ、運動後に細胞老化遺伝子セットのエンリッチメントスコアが増加した MPC クラスターにおいて、リガンド発現が最も高くなったことから、老化 MPC クラスターによる周辺細胞への働きかけが強いことが明らかになった。

最後に、ヒト骨格筋においても運動後に細胞老化が誘導されるのか、また肥満や糖尿病患者では細胞老化誘導が生じにくいのかどうかを検証するため、公共データベースに存在する運動後のトランスクリプトーム解析データからメタアナリシスが可能なツールである MetaMEx を用いて、運動後のヒト骨格筋における細胞老化関連遺伝子群の発現変化の解析を実施した。結果、正常骨格筋では細胞老化関連遺伝子である CDKN1A および TP53 の発現、さらに複数の SASP 因子についても運動後に有意な増加を認めた一方、糖尿病や肥満者の骨格筋では運動後での変化を認めなかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Miura Norihiro, Saito Yuki, Yamamoto Sena, Sato Tsukasa, Nagaoka Kentaro, Iwamoto Taiki, Miyajima Maki, Kita Arisa, Chikenji Takako S.	4. 巻 NA
2. 論文標題 Exercise-Induced Senescence of Fibro/Adipogenic Progenitors is Impaired in Diabetes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 SSRN	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2139/ssrn.4363557	査読の有無 無
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 Ijima Shogo, Saito Yuki, Nagaoka Kentaro, Yamamoto Sena, Sato Tsukasa, Miura Norihiro, Iwamoto Taiki, Miyajima Maki, Chikenji Takako S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Fisetin reduces the senescent tubular epithelial cell burden and also inhibits proliferative fibroblasts in murine lupus nephritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 960601
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.960601	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.	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 -
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、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, Yamamoto Sena, Chikenji Takako S.	4. 巻 44
2. 論文標題 Role of cellular senescence in inflammation and regeneration	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 1344116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-024-00342-5	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 Kita Arisa, Yamamoto Sena, Saito Yuki, Chikenji Takako S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cellular senescence and wound healing in aged and diabetic skin	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2024.1344116	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4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 齋藤悠城, 千見寺貴子.
2. 発表標題 骨格筋における細胞老化と筋再生
3. 学会等名 第43回日本基礎老化学会シポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022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 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術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Saito, Norihiro Miura, Sena Yamamoto, Tsukasa Sato, Kentaro Nagaoka, Taiki Iwamoto, Maki Miyajima, Arisa Kita, Takako S. Chikenji
2. 発表標題 Exercise-induced senescence-like gene signature in fibro/adipogenic progenitors is impaired in diabetes muscle
3. 学会等名 ASCB EMBO meeting Cell Bio 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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	齋藤 貴子 (千見寺貴子)  (Chikenji S. Takako)  (40452982)	北海道大学・保健科学研究所・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
---------	---------