

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24689017

研究課題名(和文) 幹細胞のコンピテンシー制御による老化誘導機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the age-related changes in the stem cell competency

研究代表者

金田 勇人 (Kaneda, Hayato)

国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号：40528212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞を用いた研究で、特定のmicroRNAが幹細胞のコンピテンシーの制御に重要な役割を果たし、シグナルに対して時期・領域特異的に適切な応答を示すことができていることを明らかにした。また、このメカニズムは間葉系幹細胞の老化による分化能や分泌特性の低下にも影響を及ぼしていることを明らかにした。さらに、老齢マウス由来の間葉系幹細胞の分化能や分泌因子の発現量を回復させることができることも明らかにし、若齢時に発現の高い再生誘導因子の同定に成功した。この因子は老年性機能障害として知られるリンパ球数の減少、筋再生能の低下、神経前駆細胞数の減少、炎症性因子の血中濃度上昇などを改善することが分かった。

研究成果の概要(英文)：We revealed the molecular mechanisms underlying the competence regulation in neural stem/progenitor cells. A certain microRNA is a key regulator for it and this regulatory system is necessary for spatio-temporally specific proper responses to the cell-extrinsic signals (Naka-Kaneda H. et al. PNAS, 2014). This system is also important for the aging of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) and associated with the decline in differentiation potential and expression of secretory factors. We identified a regenerative factor-derived from MSCs for age-related disorders. Upregulation of the factor ameliorates reduction of lymphocytes, insufficient muscle repair capacity, decrease of neural progenitors, and chronic inflammation.

研究分野：加齢医学

キーワード：幹細胞老化 microRNA 間葉系幹細胞 老化 組織幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 幹細胞老化のメカニズムは未解明

日本は世界で最も 65 歳以上の人口が多い国であり、世界の高齢者人口も今後 30 年で倍になると推計されている。高齢化社会が現実となり、神経変性疾患や骨粗鬆症などの加齢性疾患は重大な社会的課題である。しかしながら、「老化とは何か？何故老化するのか？」という老化現象そのものについてはほとんど分かっていない。組織恒常性の維持は細胞産生と細胞死のバランスで成り立っていると考えられるが、成体組織において生涯にわたり必要な細胞を供給し続けているのは組織幹細胞 (TSCs) である。ところが、TSCs も徐々に性質を変化させており“幹細胞老化”が起こっていることが分かってきた。これまでに造血幹細胞 (HSCs)、間葉系幹細胞 (MSCs) など複数の TSCs で幹細胞老化の現象は確認されているものの、未だ決定的な制御因子は同定されていない。また、この幹細胞老化がどの程度個体レベルの老化現象に寄与しているのかも全く分かっていない。

### (2) Competence 制御という新しい幹細胞制御機構の発見

私は脳を構成する神経とグリアの共通の幹細胞である神経幹細胞 (NSCs) が発生段階依存的に性質を変化させる分子メカニズムを調べ、このスイッチとして COUP-TF1/II を同定した。COUP-TFs は神経分化もグリア分化も直接制御はしておらず、NSCs のシグナル応答性を変化させることで分化能の変化を誘導していた。私はこの現象を幹細胞の“Competence の変化”と呼び、幹細胞の性質を制御する新しいメカニズムがあることを示した (Naka H *et al. Nature Neuroscience* 2008)。

### (3) 本研究計画作成の経緯

幹細胞の Competence 制御は、TSCs で共通性があるというデータが得られており、発生・分化・老化などの様々な生理現象における幹細胞の性質の変化・制御に関する根幹的なメカニズムではないかと考えた。そこで、Competence 制御機構の幹細胞共通性を調べ、幹細胞老化の分子メカニズムを解明・制御し、更には個体レベルの老化現象に与える影響を明らかにするために、本研究を計画するに至った。

## 2. 研究の目的

独自に見出した幹細胞の Competence 制御機構の観点から、幹細胞老化の分子メカニズムの解明を試み、さらには個体・組織レベルの老化に与える影響まで明らかにすること。

## 3. 研究の方法

### (1) Competence 制御機構の幹細胞老化への関与と幹細胞共通性の確認

最初に、NSCs の研究で発見した Competence 制御機構が HSCs や MSCs でも分化能や分泌因子の発現特性に関与しているかどうか、幹細胞共通性を調べた。また、同時に老齢マウス由来の HSCs と MSCs を用いて、機能回復が可能か調べることで、幹細胞老化への関与も調べた。

### (2) 幹細胞老化の分子メカニズム解析

若齢および老齢マウス由来の HSCs と MSCs の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、特に microRNA に注目して変化を調べた。また、パスウェイ解析や Gene Ontology 解析を行い、どのような変化が起こっているかの全体像を把握した後、加齢性機能障害の原因となっている候補遺伝子について、個別に機能解析を行い、幹細胞老化による機能障害誘導の分子メカニズムを明らかにすることを試みた。

### (3) 幹細胞老化が個体レベルの老化現象に与える影響の検証

幹細胞老化のメカニズム解析の結果を基に、人為的に特定の幹細胞特異的に老化を誘導し、多臓器の機能障害が誘導されるかどうかなど、個体レベルの老化現象に影響を及ぼしているかどうか調べた。

## 4. 研究成果

### (1) Competence 制御機構の解明

NSCs の運命決定段階以前に、潜在的な分化能を発揮するための Competence 獲得段階があることを突き止めたが、その分子の実体は全く分かっていなかった。COUP-TFs をノックダウンして Competence の変化を起こらなくした NSCs の遺伝子発現を網羅的に調べると、コントロールに比べて microRNA の miR-17/106 の発現が高く維持されていることが分かった。また、この miR-17 を過剰発現させることにより、発生段階が進んでグリア新生型となった NSCs に、ニューロン産生能を回復させることができることを明らかにした (図 1)。これらの結果は *PNAS* 誌から発表を行い、特許も取得した。

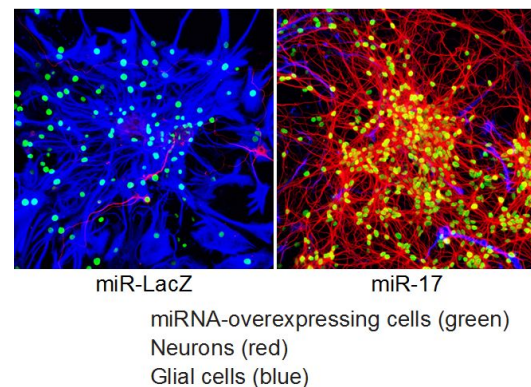


図 1 miR-17 過剰発現による NSCs のニューロン産生能の回復

(2) Competence 制御機構は複数の組織幹細胞において加齢性機能障害の誘導に関与している

若齢および老齢マウス由来の HSCs と MSCs をセルソーターで分取し、網羅的な遺伝子発現プロファイルを調べた。その結果、miR-17/106 を含む多数の microRNA の発現変動が観察された。老齢マウス由来の MSCs に、miR-17 を過剰発現させると、骨芽細胞および脂肪細胞への分化能を回復することができた。miR-17 のような特定の microRNA は、異なる組織幹細胞において、機能的共通性を示し、その発現量の変化は幹細胞老化に影響を及ぼしていることが示唆された。

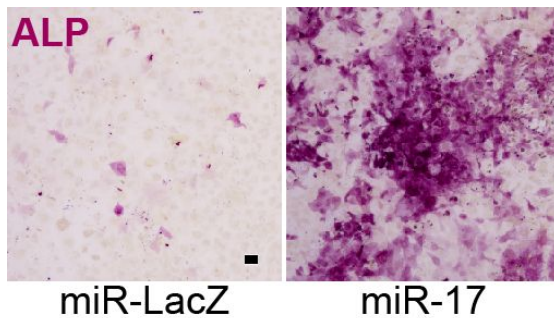


図 2 miR-17 過剰発現による老齢マウス由来 MSCs の骨芽細胞分化能の回復

(3) 幹細胞老化の分子メカニズムの解明

若齢および老齢の MSCs における mRNA および microRNA の発現プロファイルを調べ、パスウェイ解析や Gene Ontology 解析を行ったところ、特定のシグナル伝達経路に異常が起こっていることが明らかとなった。また、この異常により、生理的なシグナル因子の添加だけで、DNA 損傷の蓄積が誘導された。このシグナル伝達経路が DNA 修復能に必要であることは知られていない。また、この経路には microRNA が必須であることも分かり、この経路を直接制御している microRNA の同定を試みている。

(4) 幹細胞の分泌特性の回復による組織恒常性の回復

Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる老化した細胞の分泌特性の変化が、細胞老化と個体老化をつなぐメカニズムとして注目されつつある。しかし、TSCs にも SASP が誘導されるのかどうかは明らかになっていなかった。老齢マウス由来 MSCs では様々な分泌因子の発現が変動しており、SASP が誘導されていることが分かった。MSCs は多様な再生誘導因子を分泌することが知られているが、未だ決定的な因子は同定されていない。私達は、miR-17 の過剰発現により発現量が回復する分泌因子を調べ、それらの内一つに、老年性機能障害を回復する効果があることを突き止めた。この因子の

血中濃度を老齢マウスで上昇させると、老年性機能障害として知られる、リンパ球数の減少、筋再生能の低下、神経前駆細胞数の減少、慢性炎症の誘導などを改善する効果があることを明らかにした(図 3)。特許出願を済ませ、現在論文投稿中である。また、この結果を基に、製薬企業と老年性疾患に対する創薬研究をスタートさせた。

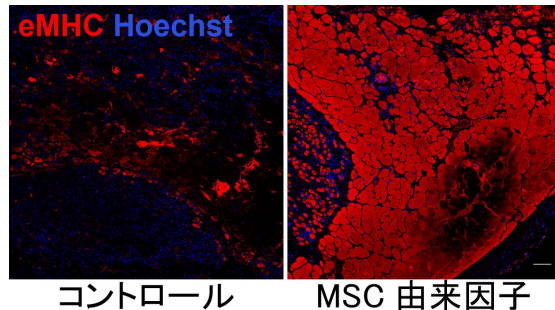


図 3 MSC 由来再生誘導因子の過剰発現による老齢マウスにおける筋再生能の回復

(5) 特定の組織幹細胞の老化を誘導することによる全身性の炎症の誘導

miR-17/106 が幹細胞の機能および老化にもなう機能低下に重大な役割を担っていることが分かってきた。次の段階として、このような幹細胞老化が個体レベルの老化現象に与える影響に興味を持たれる。個体スケールの老化現象を検討するにあたり、どの組織の機能障害が重要なのが不明という大きな問題がある。私達は、いくつかの理由から腸の老化に注目し、*Lgr5* を発現する腸管上皮幹細胞で、薬剤依存的に miR-17/106 を欠損する遺伝子改変マウスを作製した。3 カ月齢のマウスに、タモキシフェンを投与して腸管上皮幹細胞で miR-17/106 を欠損させると、血漿中のいくつかの炎症性サイトカイン量が、投与後 8~12 週で上昇した。近年、慢性炎症は老化の原因の一つだという報告がなされており、幹細胞老化が全身性の老化現象に寄与していることを支持する結果であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Naka-Kaneda H., Nakamura S., Igarashi M., Aoi H., Kanki H., Tsuyama J., Tsutsumi S., Aburatani H., Shimazaki T. & Okano H. The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 1604-1609 (2014) 査読有り

2. Naka-Kaneda H., Shimazaki T. & Okano H. MicroRNA-mediated regulation of the neurogenic-to-gliogenic competence transition of neural stem/progenitor cells. *Neurogenesis* 1, e29542-1-4 (2014) 査読有り

〔学会発表〕(計 9件)

1. 金田 勇人, 幹細胞老化のメカニズムと制御, 日本再生医療学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2015/3/21.
2. 金田 勇人, 間葉系幹細胞が分泌する恒常性維持因子の探索と機能解析, 日本再生医療学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2015/3/19.
3. 金田(仲) 勇人, 組織幹細胞に共通する老化メカニズムの解析, 日本分子生物学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014/11/27.
4. 金田 勇人, 組織幹細胞に共通する老化メカニズムの解析と制御法の開発, 日本再生医療学会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2014/3/6.
5. Hayato Naka-Kaneda, Functional Restoration of Aged Stem Cells by Regulating their Competence, 幹細胞シンポジウム, 東京大学 伊藤国際学術研究センター(東京都文京区), 2013/5/17.
6. 仲・金田 勇人, Bidirectional Control of Neural Stem Cell Competence, 日本分子生物学会, 福岡国際会議場・マリメッセ福岡(福岡県福岡市), 2012/12/14.
7. 仲・金田 勇人, Bidirectional Control of Competence in mouse and human Neural Stem Cells, 日本神経科学学会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 2012/9/19.
8. Hayato Kaneda, Shiho Nakamura, Takuya Shimazaki, Hideyuki Okano, BIDIRECTIONAL CONTROL OF THE COMPETENCE OF MOUSE AND HUMAN NEURAL

STEM CELLS, International Society for Stem Cell Research, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2012/6/14.

9. Hayato Kaneda, Bidirectional Control of Competence in mouse and human Neural Stem Cells, 幹細胞シンポジウム, 淡路夢舞台国際会議場(兵庫県淡路市), 2012/5/31.

〔図書〕(計 2件)

1. 金田 勇人, 島崎 琢也, 岡野 栄之, 神経幹細胞の分化能の時系列的な変化とそのメカニズム, 実験医学増刊 33(再生医療 2015), 羊土社(東京) p. 273-278 (2015)
2. 金田 勇人, 島崎 琢也, 岡野 栄之, 神経幹細胞分化の制御機構, 日本臨床 73(再生医療), 日本臨床社(大阪) p. 204-209 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 加齢による生理機能の低下を回復または改善する組成物  
 発明者: 金田 勇人  
 権利者: 国立研究開発法人理化学研究所  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2015-256045  
 出願年月日: 2015/12/28  
 国内外の別: 国内

取得状況(計 1件)

名称: 神経分化促進剤  
 発明者: 岡野 栄之、島崎 琢也、仲 勇人  
 権利者: 学校法人慶應義塾  
 種類: 特許  
 番号: 5794693 号  
 取得年月日: 2015/08/21  
 国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 勇人 (KANEDA, Hayato)  
 国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・上級研究員

研究者番号: 40528212