

間葉系前駆細胞の老化から探るサルコペニアの発症機序

東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム 筋老化再生医学

上住 聡芳

【研究背景】

超高齢社会に突入した我が国は世界屈指の長寿大国であるが、平均寿命と健康寿命の間には約10年の乖離がある。このことは、日常生活に制限が出たり、介護が必要な状態で人生最後の10年を過ごさなければならないことを意味し、健康的に老いることは極めて重要な課題となっている。

骨格筋は運動や身体活動を掌る組織であり、また、インスリンの最大の標的臓器として全身の代謝調節に重要な役割を果たす。骨格筋の萎縮や機能低下は様々な疾患と関連し、activity of daily living (ADL) およびquality of life (QOL)を損なう主要な原因である。疫学研究により骨格筋量の多い人は種々の疾病に対する罹患率が低下し、長寿であることが明らかとなっており (Heitmann et al., BMJ, 2009; Srikanthan et al., Am J Med, 2014)、加齢に伴う筋の衰弱 (サルコペニア) を予防することは上述の難題に解決策を与えてくれると考えられる。サルコペニアは認知症と並ぶ要介護の2大要因であることが明らかになってきており、その解決を目的とする本研究の医学的意義は大きく、さらに、サルコペニアを低減できれば労働力人口の増加や社会保障負担の軽減につながり、経済・社会的にも大きなインパクトを持つ。

このように、骨格筋は健康的な生活を送る上で重要な臓器であるが、筋に脂肪化・線維化をきたすことがあり、筋機能低下の要因となることが知られている。筋の脂肪化は霜降り肉で見られる様に、日本人にとって身近な現象であるが、脂肪化がどのように生じるのか、そのメカニズムは不明であった。研究代表者らは筋間質に存在する間葉系前駆細胞を発見し、本細胞が筋の脂肪化・線維化の起源となることを世界で初めて証明した (Uezumi et al., Nat Cell Biol, 2010)。間葉系前駆細胞の疾患における重要性を明らかにしてきたが、間葉系前駆細胞は健康な筋にも存在する。間葉系前駆細胞の健康な定常状態の筋における役割を明らかにするため、間葉系前駆細胞を特異的に欠損するマウスを作製したところ、サルコペニアに酷似した表現型を示すことを見出している。これらから、間葉系前駆細胞は定常状態の骨格筋の維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。サルコペニアにおいて筋力の低下は筋量低下に先行して起こることから、筋量の減少だけではサルコペニアを説明できず、筋の質的变化がサルコペニアの引き金になっていると考えられる (Goodpaster et al., J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2006)。老化による筋の質的变化の代表が筋の脂肪化である。これらから、老化により間葉系前駆細胞が脂肪化へ傾くことにより、その筋維持機構が破綻しサルコペニアが誘導されるという新しい概念の創出に至った。本研究では、間葉系前駆細胞による筋維持機構、および、その加齢変化を研究し、サルコペニアの発症メカニズム解明および予防・治療法の開発を目指す。

【研究目的】

骨格筋に内在する間葉系前駆細胞が筋組織を維持する機構、および、その筋維持機構の加齢変化を研究し、サルコペニアのメカニズム解明と予防・治療法開発へと発展させる。

【研究計画】

研究代表者らが発見した間葉系前駆細胞を欠損させるとサルコペニアに酷似した表現型を示すことを見出し、間葉系前駆細胞が定常状態の骨格筋の維持に必須の役割を果たすことを明らかにしている。間葉系前駆細胞による骨格筋の維持メカニズム、および、サルコペニアの発症機序を明らかにするため、間葉系前駆細胞欠損筋、および、老化間葉系前駆細胞のトランスクリプトーム解析結果を統合し、老化間葉系前駆細胞で特異的に発現低下することでサルコペニアが導かれる筋維持遺伝子の候補を同定した。

そこで、本研究では候補筋維持遺伝子の機能解析を行い、筋組織維持における重要性、および、サルコペニア発症への関与を明らかにする。

1) 間葉系前駆細胞で発現する筋維持遺伝子の機能解析

同定した筋維持遺伝子の候補の一つであるGDF10に注目し、その機能解析を行う。GDF10ノックアウト (KO) マウスの骨格筋を解析し、GDF10が筋におよぼす作用を明らかにする。また、GDF10を高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作製し、筋への作用やサルコペニアの予防効果を検討する。もし、KOマウスで筋萎縮が誘導されれば、GDF10がサルコペニアの責任遺伝子であることの証明となり、GDF10自身、および、GDF10が惹起する生物学的シグナル系は、サルコペニアの発症を防止するための標的となり得る。

2) 候補筋維持遺伝子GDF10の抗サルコペニア効果の検討

候補筋維持遺伝子GDF10は間葉系前駆細胞で特異的に発現し、老化によってその発現が有意に減少する。そこで、老化マウスへGDF10を投与しマウスの生理学的解析、および、骨格筋の解析を実施し、GDF10の抗サルコペニア効果を検討する。

【結果】

1) 間葉系前駆細胞で発現する筋維持遺伝子の機能解析

間葉系前駆細胞の役割を明らかにするために、間葉系前駆細胞を特異的に欠損するマウスを作製した。間葉系前駆細胞特異的なマーカーであるPdgfraのプロモーターによってタモキシフェン誘導型Creリコンビナーゼを発現するマウス (Pdgfra-CreERマウス) と、Creが作用するとジフレリア毒素Aを発現するマウス (R26R-DTAマウス) を交配し、Pdgfra-CreER/R26R-DTAマウスを作製した。10~11週齢においてタモキシフェンを投与し、間葉系前駆細胞の欠損を誘導した。免疫組織学的解析、および、フローサイトメーター (FACS) 解析によって、間葉系前駆細胞の定量解析を行ったところ、タモキシフェン投与によって間葉系前駆細胞数がコントロールマウスの20%程度まで激減してしまうことを確認した。この間葉系前駆細胞欠損マウスは体重、筋力の有意な低下を示した。また、筋重量の低下、および、筋線維の萎縮が認められ、間葉系前駆細胞が筋維持に必須の役割を果たしていることが示された。

間葉系前駆細胞による筋維持機構、および、サルコペニア発症への関連を明らかにするため、以下の網羅的遺伝子発現解析を実施した。まず、「①間葉系前駆細胞欠損により萎縮した骨格筋で発現低下する遺伝子」を探索した。間葉系前駆細胞を特異的に欠損させるため当然、間葉系前駆細胞で発現する遺伝子は低下するはずである。さらに、間葉系前駆細胞欠損によって筋が萎縮してしまうため、健康な定常状態の筋の維持に重要な遺伝子が絞り込めるはずである。しかし、この解析は筋組織全体をサンプルに用いるため、間葉系前駆細胞以外の細胞で発現する遺伝子も含まれてくる。そこで次に、FACSによって純化した若齢および老化マウス由来の細胞を用いて「②間葉系前駆細胞に特異的に発現しており老化により低下する遺伝子」を探索した。①と②の両方の条件を満たす遺伝子には、老化間葉系前駆細胞で特異的に発現低下することでサルコペニアが導かれる筋維持遺伝子の候補が含まれると考えられる。この中で、GDF10に注目した。

まず、GDF10の発現の確認を行ったところ、骨格筋組織に存在する他の細胞では発現が極めて低く、間葉系前駆細胞での高い特異性が確認され、また、若齢マウスに比して老化マウスではその発現レベルが30%以下に低下することも確認された。また、間葉系前駆細胞におけるGDF10の発現は、生体内で存在している状態では非常に高いレベルで発現しているが、*in vitro*で培養するとその発現レベルは顕著に低下し、脂肪分化するとさらに低下した。このことから、若い健康な筋においては間葉系前駆細胞がGDF10を高発現し筋維持に機能しているが、老化によって脂肪化に傾くことでGDF10による維持作用が減弱すると考えられる。

GDF10の機能を明らかにするためにGDF10 KOマウスの解析を行った。GDF10 KOマウスは野生型マウスに比べ統計学的有意な体重の低下、筋量の減少を示した。骨格筋の組織学的解析を行ったところ、GDF10 KOマウスでは筋線維の総数に変化はなかったが、統計学的有意な筋線維の萎縮が認められた。肝臓、内臓脂肪、褐色脂肪など他の代謝性臓器の重量に差は見られず、単なる成長不良ではなく骨格筋の維持機構の異常が考えられた。続いて、CAGプロモーターによってGDF10を高発現するTgマウスの解析を行った。まず、GDF10の発現解析を行ったところ、野生型マウスの骨格筋に比して、約60倍GDF10が高発現していることが確認された。本Tgマウスの表現型を解析したが、体重、筋量に有意差は認められなかった。これは、若齢マウスでは元々間葉系前駆細胞でGDF10が高発現しているため、トランスジェーンによる効果が得られにくかったためと考えられた。現在、Tgマウスを老化させており、今後、老化Tgマウスを用いてGDF10の高発現によるサルコペニアの予防効果を解析する予定である。

研究代表者らはヒト骨格筋から骨格筋幹細胞を純化する方法を確立しているが (Uezumi et al., *Stem Cell Reports*, 2016; Uezumi et al., *Methods in Mol Bio*, 2016)、本方法によって得られたヒト骨格筋幹細胞を分化させ筋管細胞を形成させ、無血清条件で維持する系を確立した。この実験系を用いて、GDF10をヒト筋管細胞に作用させ、その効果を調べた。その結果、GDF10の添加によって有意な筋管細胞の肥大が確認され、GDF10の筋肥大作用が明らかになった。また、GDF10によって惹起される細胞内シグナル経路を精査したところ、筋肥大シグナルとして知られているBMPおよびAktシグナル経路が活性化されることを見出した。

2) 候補筋維持遺伝子GDF10の抗サルコペニア効果の検討

研究項目1)の結果から、間葉系前駆細胞で特異的に発現する候補筋維持遺伝子GDF10が筋維持作用・筋肥大作用を有することが明らかとなった。GDF10 Tgマウスを用いてサルコペニアの予防効果を検討するには、Tgマウスをが老化するまで待つ必要がある。そこで、老化マウスにGDF10を投与することでその抗サルコペニア作用を検討することとした。

老化マウス (C57BL/6Nマウス、26~27ヶ月齢) に対して、浸透圧ポンプを用いてGDF10を2週間、持続的に投与した。2週間後に筋重量の測定を行ったところ、コントロール老化マウスに比べ投与老化マウスでは、腓腹筋、大腿四頭筋において有意な増加が認められた。前脛骨筋、長趾伸筋においては筋量増加傾向が見られたが有意差は認められなかった。特に差が認められた大腿四頭筋の組織学的解析を行ったところ、筋線維の総数はGDF10の投与によって変化はなかったが、GDF10投与老化マウスにおいて統

計学的有意な筋線維の肥大が認められた。

【考察】

1) 間葉系前駆細胞で発現する筋維持遺伝子の機能解析

間葉系前駆細胞欠損マウスを作製し、その筋量・筋機能の低下を伴うサルコペニア様の表現型を見出し、間葉系前駆細胞が筋の維持に必須であることを明らかにした。間葉系前駆細胞による筋維持機構の解析を進め、筋維持遺伝子の候補として間葉系前駆細胞特異的に発現し老化で低下するGDF10を見出した。GDF10の発現は間葉系前駆細胞が脂肪分化すると顕著に低下し、老化による筋の脂肪化亢進がサルコペニアに寄与する所見とよく合致する。さらに、GDF10 KOマウス、および、ヒト筋管細胞に対するGDF10の添加実験から、GDF10の筋維持作用・筋肥大作用が明らかとなり、サルコペニアを予防・治療する上で、GDF10自身、および、GDF10が惹起する生物学的シグナル系は重要な標的になると考えられた。

2) 候補筋維持遺伝子GDF10の抗サルコペニア効果の検討

老化マウスへのGDF10の投与実験から、その抗サルコペニア効果が認められた。本実験において、26～27ヶ月齢のマウスを老化マウスとして用いたが、マウスにおいて筋量は21ヶ月齢までは維持されており、それ以降に減少する。即ち、今回用いた老化マウスでは筋量低下を伴うサルコペニアが既に発症したマウスである。サルコペニアを発症した老化マウスの筋量を回復できたことから、GDF10自身、および、GDF10が惹起する生物学的シグナル系を標的とすることは、サルコペニア治療に有効になると考えられた。

【まとめ】

間葉系前駆細胞による骨格筋の維持メカニズム、および、その筋維持機構の加齢変化を解析することで、間葉系前駆細胞特異的に発現し老化で低下するGDF10の筋維持作用・筋肥大作用を明らかにした。また、老化マウスを用いた検討からGDF10の抗サルコペニア作用を示した。