

骨格筋内在性の間葉系前駆細胞を標的とした サルコペニアの予防・治療法開発

代表研究者 東京都健康長寿医療センター 副部長 上住 聡芳

【まとめ】

サルコペニアは高齢者の健康状態や生命予後を不良にする要因である。我々は筋間質の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ており、間葉系前駆細胞特異的に発現する筋維持遺伝子の一つとして GDF10 を同定している。本研究では、ヒト骨格筋から単離した高品質な筋細胞および間葉系前駆細胞を用いて、GDF10 の骨格筋維持に果たす役割の解析を行った。その結果、GDF10 が筋細胞を維持する分子メカニズムの一端を明らかにした。

1. 研究の目的

1-1 老化間葉系前駆細胞における GDF10 の発現変化

加齢に伴う筋の衰弱（サルコペニア）は高齢者の QOL や ADL を低下させる要因である。代表研究者らは間葉系前駆細胞欠損マウスがサルコペニア様の表現型を示すことから、間葉系前駆細胞が筋組織の維持に必須であるという結果を得ている。また、間葉系前駆細胞特異的に発現する筋維持遺伝子の候補として GDF10 を同定している。そこで、実際の老化により GDF10 の発現がどのように変化するかを老化マウスを用いて調べる。

1-2 GDF10 のヒト筋細胞に及ぼす影響の解析

GDF10 は間葉系前駆細胞に特異的に発現し、骨格筋組織を維持する重要な因子と考えられる。その作用機序としては、間葉系前駆細胞で産生され筋細胞に効果を発揮するパラクライン様作用が考えられる。GDF10 は TGF- β スーパーファミリーの一員であるが、GDF10 の生理的機能や下流シグナルはほとんど分かっていない。そこで、独自に確立した高品質なヒト筋細胞の培養系を利用して、GDF10 が筋細胞に及ぼす影響を精査する。

1-3 GDF10 がヒト間葉系前駆細胞に及ぼ

す影響の解析

GDF10 の作用機序としては、1-1 で解析する筋細胞へのパラクライン様作用に加え、間葉系前駆細胞で産生され間葉系前駆細胞自身に効果を及ぼすオートクライン様作用も考えられる。そこで、高品質なヒト間葉系前駆細胞の培養系を利用し、GDF10 がヒト間葉系前駆細胞に及ぼす影響を精査する。間葉系前駆細胞が筋の脂肪化の起源であること、老化により筋の脂肪化が亢進することを考えれば、GDF10 は脂肪化に対し抑制的に働くと予想される。そこで、GDF10 がヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化にどのような影響を与えるか調べる。

2. 研究方法と経過

2-1 老化間葉系前駆細胞における GDF10 の発現変化

老化マウス、および、コントロール若齢マウスの骨格筋から間葉系前駆細胞を既報（Uezumi et al., Nat Cell Biol, 2010; Uezumi et al., Methods Mol Biol, 2016）の方法により、高精度にソーティングする。老化、または、若齢マウス由来間葉系前駆細胞における GDF10 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法により定量解析し、GDF10 の発現が老化に伴いどう変化するかを明らかにする。

2-2 GDF10 がヒト筋管細胞の形態変化に及ぼす影響

ヒト骨格筋から筋幹細胞を既報（Uezumi et al., Methods Mol Biol, 2016; Uezumi et al., Stem Cell Reports, 2016）の方法により、高精度に単離・培養する。筋幹細胞を分化誘導し、筋管細胞を形成させる。形成された筋管細胞に対して GDF10 を作用させ、形態変化に及ぼす効果を、筋収縮タンパクであるミオシン重鎖の免疫蛍光染色を定量解析することで評価する。

2-3 ヒト筋細胞における GDF10 の下流シ

グナルの解析

2-2と同様の方法で、ヒト筋管細胞を形成させ、GDF10を作用させる。TGF- β スーパーファミリーの主要な下流シグナル分子であるSmadを中心に、細胞内シグナル伝達分子の活性化状態を調べ、筋細胞におけるGDF10の細胞内下流シグナルを明らかにする。

2-4 GDF10がヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化に及ぼす影響

ヒト骨格筋から間葉系前駆細胞を既報(Uezumi et al., Methods Mol Biol, 2016; Uezumi et al., Stem Cell Reports, 2016)の方法により、高精度に単離・培養する。間葉系前駆細胞を脂肪細胞へ分化誘導する。分化誘導時にGDF10を作用させ、間葉系前駆細胞の脂肪分化がどのような影響を受けるか、脂肪滴の蛍光染色を定量解析することで評価する。

2-5 ヒト間葉系前駆細胞におけるGDF10の下流シグナルの解析

2-4と同様の方法で、ヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化時に、GDF10を作用させる。TGF- β スーパーファミリーの主要な下流シグナル分子であるSmadを中心に、細胞内シグナル伝達分子の活性化状態を調べ、間葉系前駆細胞におけるGDF10の細胞内下流シグナルを明らかにする。

3. 研究の成果

3-1 老化間葉系前駆細胞におけるGDF10の発現変化

老化マウス、および、コントロール若齢マウスの骨格筋から間葉系前駆細胞を高精度にソーティングし、GDF10の遺伝子発現をリアルタイムPCR法により定量比較した。その結果、老化マウス由来間葉系前駆細胞では若齢マウス由来間葉系前駆細胞に比べ、GDF10の発現が約1/4に顕著に低下していることが明らかとなった。また、筋組織に存在する他の細胞でGDF10の発現は認められず、間葉系前駆細胞に非常に特異的であることが改めて確認された。

3-2 GDF10がヒト筋管細胞の形態変化に及ぼす影響

ヒト骨格筋から筋幹細胞を高精度に単離・培養し、分化誘導することで筋管細胞を形成させた。筋管細胞に対してGDF10を3

日間作用させた。3日後に筋収縮タンパクであるミオシン重鎖の免疫蛍光染色を行い、ミオシン重鎖陽性領域の面積を画像解析ソフトにより定量解析した。その結果、GDF10を作用させることにより、筋管細胞の占める面積が有意に大きくなった(図1)。

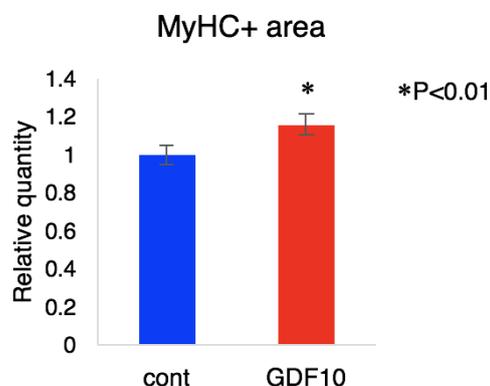


図1. ヒト筋管細胞へのGDF10の作用
ヒト筋管細胞に3日間GDF10を作用させた後、ミオシン重鎖陽性領域の面積を定量比較した。GDF10により筋細胞の占める面積が増大する。

このことからGDF10にはヒト筋細胞の肥大を誘導する作用があることが示唆された。

3-3 ヒト筋細胞におけるGDF10の下流シグナルの解析

ヒト筋管細胞にGDF10を作用させた後、TGF- β スーパーファミリーの主要な下流シグナル分子であるSmadの活性化状態を調べた。SmadはactivinやTGF- β 系で活性化されるSmad2/3経路と、BMP系で活性化されるSmad1/5/8経路に大別される。そこで、GDF10を作用させたヒト筋管細胞においてこれらのリン酸化状態を調べたところ、Smad2/3の活性化は全く生じなかったが、Smad1/5/8がGDF10刺激に応じて活性化した(図2)。なお、Smad2/3経路活性化のポジティブコントロールにはマイオスタチンを、Smad1/5/8経路活性化のポジティブコントロールにはBMP4を用いている。

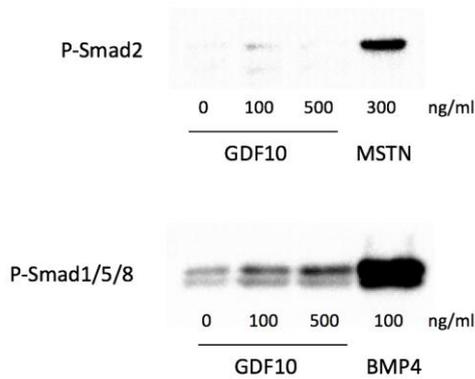


図2. GDF10によってヒト筋管細胞で活性化される Smad シグナル

ヒト筋管細胞に GDF10 を作用させた後に Smad のリン酸化状態を調べた。Smad1/5/8 のリン酸化が亢進していることが分かる。

3-2 で GDF10 がヒト筋細胞に対して肥大作用を発揮し得ることが示されたことから、筋細胞において同化作用を促進し肥大を誘導することが知られている Akt シグナルについても精査した。ヒト筋管細胞に GDF10 を作用させた後、Akt のリン酸化状態を調べたところ、GDF10 刺激に応じて Akt の活性化が起こった (図3)。



図3. GDF10によってヒト筋管細胞で活性化される Akt シグナル

ヒト筋管細胞に GDF10 を作用させた後に Akt のリン酸化状態を調べた。Akt のリン酸化が亢進していることが分かる。

Smad1/5/8 は典型的な BMP 系の下流シグナルであるが、筋細胞における BMP シグナルの活性化は筋量を正に制御することが示されている (Sartori et al., Nat Genet, 2013; Winbanks et al., J Cell Biol, 2013)。また、筋細胞における Akt の活性化は筋肥大を誘導する (Lai et al., Mol Cell Biol, 2004; Blaauw et al., FASEB J, 2009)。これらの先行研究を考慮に入れると、間葉系前駆細胞で特異的に発現する GDF10 は、隣接する筋細胞に作用し、筋細胞内において BMP、Akt シグナルの活性化を引き起こし、同化・肥大作用を発揮することで筋組織の維持に機能していると考えられる。

3-4 GDF10 がヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化に及ぼす影響

ヒト骨格筋から間葉系前駆細胞を高精度に単離・培養し、脂肪細胞へ分化誘導した。分化誘導と同時に GDF10 を作用させた。分化誘導後に脂肪滴を Bodipy 色素で蛍光染色し、染色強度を蛍光イメージアナライザーで定量解析することで、GDF10 が脂肪分化に及ぼす影響を調べた。その結果、GDF10 はヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化に影響を及ぼさなかった (図4)。

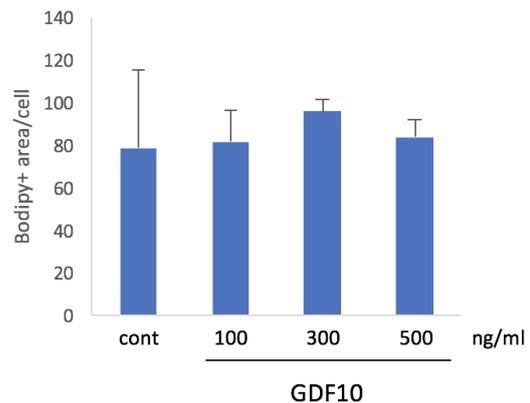


図4. ヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化に及ぼす GDF10 の影響

ヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化誘導時に GDF10 を作用させた後、細胞あたりの脂肪滴が占める面積を定量した。

3-5 ヒト間葉系前駆細胞における GDF10 の下流シグナルの解析

ヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化時に、GDF10 を作用させ、Smad のリン酸化状態を調べた。3-4 で GDF10 は間葉系前駆細胞の脂肪分化に影響を及ぼさなかったことを反映してか、Smad のリン酸化状態も変化しなかった。

4. 今後の課題

本研究の成果を以下にまとめる。

- 1) GDF10 の発現は間葉系前駆細胞に極めて特異的で老化に伴い顕著に低下する。
- 2) GDF10 はヒト筋細胞において BMP、Akt シグナルを惹起し、同化・肥大作用を発揮する。
- 3) GDF10 はヒト間葉系前駆細胞の脂肪分化には特に影響しない。

本研究では、主に GDF10 の機能をヒト骨格筋由来細胞を用いた *in vitro* の実験系で評価したが、本研究の成果から GDF10 はサル

コペニア予防を図る上で、極めて有望な生理活性因子と言える。現在、**GDF10** のサルコペニアに対する予防効果を、老化マウスへの投与実験等の *in vivo* の実験系で検証を進めている。

5. 研究成果の公表方法

上記の研究成果および今後の課題で述べた *in vivo* での研究成果をまとめ、研究論文として投稿・発表する準備を進めている。