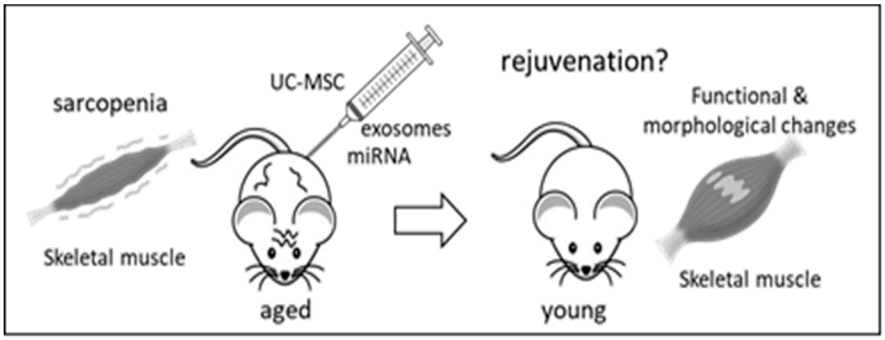
9　加齢性サルコペニアに対する細胞治療法の確立	葛谷　雅文

【目的】サルコペニアとは、加齢に伴い骨格筋の量や筋力・機能が低下した状態を指し、高齢者のフレイル状態や、転倒・骨折、インスリン抵抗性とも関連し、超高齢社会に突入している我が国でも大変注目されている疾病概念である。一方で、この加齢性サルコペニアへの介入方法としては、運動（特にレジスタンス運動）、栄養介入、特にたんぱく質強化以外に、今のところ効果的な薬物療法は確立されていない。近年、様々な組織由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells : MSCs） による種々の治療法の開発が進んでいるが、加齢性サルコペニアへの効果は不明である。本研究の目的はサルコペニアをターゲットとして、臍帯由来間葉系幹細胞臍帯由来の MSCs（umbilical cord-derived mesenchymal stem cells : UC-MSCs）さらにはその細胞由来の exosome を含む液性因子が老化を制御し、サルコペニアを抑制できるかどうかを老化促進マウス（SAMP10）を使用して検討する。

【方法】老化促進マウス（Senescence-Accelerated Mouse : SAM）prone 10（SAMP10）24 週齢の尾静脈より passage 4 の UC-MSCs、または UC-MSCs から得られた exosomes を注入した。対照として PBS を同量投与した。36 週齢時に両側下肢組織ならびに血清を採取し、以後の実験に使用した。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ならびに小動物用トレッドミルで評価した。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、筋組織内の以下の mRNA を RT-PCR 法を用いて定量化した。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×15,000 での電子顕微鏡下の評価を実施した。

【結果】加齢性サルコペニアのモデルとして使用した SAMP10 マウスの加齢に伴う四肢骨格筋の萎縮ならびに筋力や持久力などの身体機能の低下が UC-MSCs 投与により改善することを示した。UC-MSCs の投与により、骨格筋における AMPK/Sirt1 シグナルの活性化および Akt/mTOR を介する筋タンパク質の合成促進を観察した。同様に UC-MSCs はミトコンドリアの機能不全を抑制し、実際筋組織におけるミトコンドリアの biogenesis に重要な役割を果たす PGC1-α の発現を亢進させた。さらに UC-MSCs 投与により酸化ストレス産生の重要な酵素である gp91phox の発現を低下させ、筋肉における TNF-α や MCP-1 などの炎症性サイトカインの発現を抑制し、筋肉内のマクロファージの浸潤を抑制していた。Exosomes の尾静脈を介する投与も UC-MSCs とほぼ同様な効果を認めたことより UC-MSCs のパラクライン作用により SAMP10 のサルコペニアを抑制したと考えられた。

加齢性サルコペニアに対する臍帯由来間葉系幹細胞治療の可能性



9. 加齢性サルコペニアに対する細胞治療法の確立

葛谷　雅文

*名古屋大学 未来社会創造機構

Key words：サルコペニア，間葉系幹細胞，細胞治療，エクソゾーム

緒　言

サルコペニアとは、加齢に伴い骨格筋の量や筋力・機能が低下した状態を指し、高齢者のフレイル状態や、転倒・骨折、インスリン抵抗性とも関連し、超高齢社会に突入している我が国でも大変注目されている疾病概念である［1］。一方で、この加齢性サルコペニアへの介入方法としては、運動（特にレジスタンス運動）、栄養介入、特にたんぱく質強化以外に、今のところ効果的な薬物療法は確立されていない［2］。また、加齢性以外にも廃用や疾病（臓器不全、悪性腫瘍に伴う悪液質）が関与する二次性サルコペニアの概念も提案されているが［3］、これらに関しても今のところ確立された薬物療法は存在しない。今後ますます高齢者が増加する我が国では健康寿命の延伸が望まれるところであり、サルコペニアへの効果的な介入方法の確立は健康寿命の延伸にも貢献できる重要な課題である。

一方、様々な組織由来の間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells：MSCs）による種々の治療法の開発が進んでいる。骨髄、脂肪組織、歯髄組織、臍帯血、臍帯などの多数の組織由来のMSCsに関する知見が蓄積しつつあり、今までにMSCsを使用した多く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［4］。MSCsの特徴として、投与されたMSCsが局所で分化する可能性以外に様々なサイトカインや成長因子を放出し、パラクライン的作用によりその強い組織修復機能と免疫抑制機能が存在することが知られる［5］。さらに、近年MSCs由来exosome（直径50～200 nmの様々な細胞が分泌するタンパク質、mRNA、miRNAなどを含む複合膜小胞体）の種々の作用が報告されて注目されている［5］。

今回我々は、老化による臓器障害の代表として骨格筋（骨格筋萎縮、筋力低下：加齢性サルコペニア）をターゲットとし、MSCs、特に臍帯由来のMSCs（umbilical cord-derived mesenchymal stem cells：UC-MSCs）ならびにそのexosomesの全身投与が加齢性サルコペニアを制御できるかどうかを将来の臨床応用を目指し老化促進マウス（Senescence-Accelerated Mouse：SAM）prone 10を使用して検討する。このマウスは既に我々がサルコペニアモデルとして使用しており、24週齢ごろより骨格筋量の減少が観察されることを既に報告している［6］。UC-MSCsを使用するのは、将来の臨床応用を考えて、免疫寛容性が強く他家移植が可能であること、さらには比較的容易に非侵襲に臍帯から幹細胞が得られる利点を考慮した。

方　法

1. 動物実験

SAMのprone 10（SAMP10/TaSlc）（8週齢でJapan SLCより購入）を使用し、24週齢で尾静脈よりUC-MSCs（1×10^6/150 μl）（n＝8）（これらの細胞は東大医科研臍帯血・臍帯バンクから提供された）、またはUC-MSCs 1×10^6細胞から超遠心法にて採取されたexosomesを注入した。対照としてPBSを同量投与した（n＝7）。UC-MSCsはpassage 4を使用した。36週齢時に両側下肢組織ならびに血清を採取し、以後の実験に使用した。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RNA later 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。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

*現在の所属：名古屋鉄道健康保険組合 名鉄病院

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。なお、これらの実験は名古屋大学の倫理審査で承認された研究である（No. 31442）。

2. 筋組織中タンパク質定量ならびに mRNA 定量

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-mTOR^{Ser2448}（p-mTOR）、total Akt、phospho-Akt^{ser473}（Akt）、silent information regulator 1（Sirt1）、total extracellular signal-regulated kinase1/2（Erk1/2）、phospho-Erk1/2 $^{thr202/tyr204}$（p-Erk1/2）、total adenosine monophosphate（AMP）-activated protein kinase alpha（AMPK）、phospho-AMPK（p-AMPK）、peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator1-α（PGC1-α）、slow myosin heavy chain（MHC）、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）。

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-α、hepatocyte growth factor（HGF）、paired box-7（PAX-7）、myogenic differentiation antigen（MyoD）、tumor necrosis factor（TNF）-α、monocyte chemoattractant protein-1（MCP-1）、gp91phox、GAPDH。

3. 組織解析

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（leukocytes マーカー）、c）CD68（macrophages マーカー）、d）TUNEL 染色（apoptosis マーカー）、e）Masson's trichrome 染色（コラーゲン結合組織繊維マーカー）、f）laminin と desmin の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×15,000 での電子顕微鏡下の評価を実施した。

結　果

1. UC-MSCs の SAMP10 マウスにおける筋肉量ならびに機能への効果

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. 筋肉内のタンパク質ならびに mRNA 発現

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）-1α、p-mTOR（mammalian target of 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 2A、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）、さらには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）。

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 投与群で有意な低下を認めた（図 3A、B）。

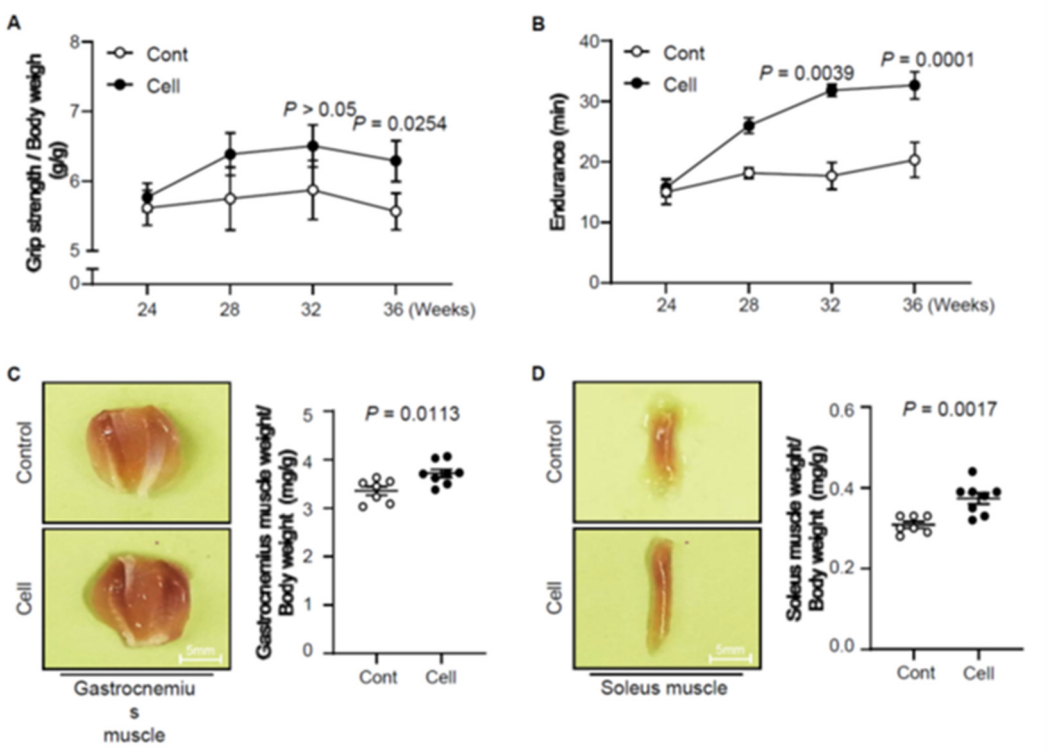


図 1. UC-MSCs 投与による筋力（Grip strength）と持久力のタイムコースならびに筋肉量への効果

A） Grip strength のタイムコース（対照ならびに細胞投与群との比較）。

B） 持久力のタイムコース（対照ならびに細胞投与群との比較）。

C） 腓腹筋量（対照と細胞投与群との比較）。代表的なサンプルならびに体重補正後のデータのプロット。

D） ヒラメ筋量（対照と細胞投与群との比較）。代表的なサンプルならびに体重補正後のデータのプロット。

統計処理：student's t-tests、p 値は図に記載済み。

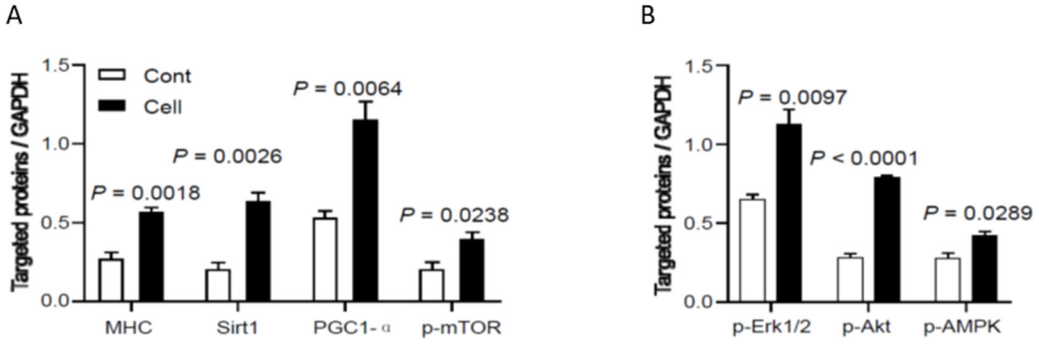


図 2. 腓腹筋における種々のタンパク発現（western blotting の結果より）

A、B）UC-MSCs 投与群ならびに対照群の 36 週齢時の腓腹筋の種々のタンパクの定量（western blotting、n=5）。統計処理：student's t-tests、p 値は図に記載済み。

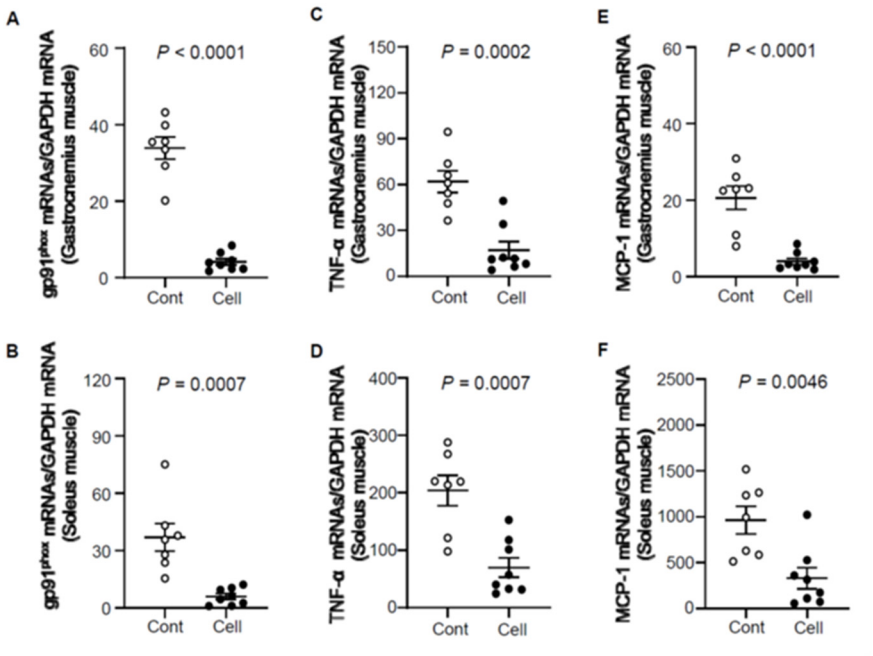


図 3. 腓腹筋およびヒラメ筋の種々の mRNA 発現量（RT-PCR の結果より）

UC-MSCs 投与群（Cell）ならびに対照群（Cont）の 36 週齢時の腓腹筋およびヒラメ筋における gp91phox、TNF-α、MCP-1 の mRNA 定量プロット。

A、C、D）腓腹筋。

B、D、F）ヒラメ筋。

統計処理：student's t-tests、p 値は図に記載済み。

3. 筋肉の免疫染色

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）は対照に比較し明らかに $CD68^+$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）。

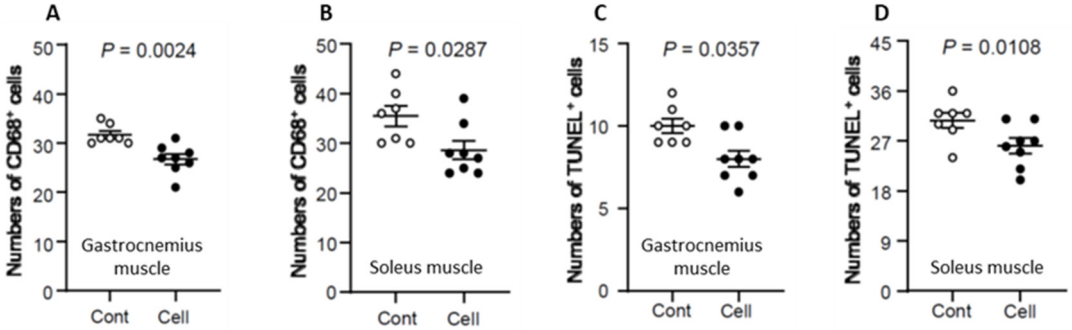


図 4. 腓腹筋およびヒラメ筋における CD68 陽性細胞ならびにアポトーシス

UC-MSCs 投与群（Cell）ならびに対照群（Cont）の 36 週齢時の腓腹筋およびヒラメ筋における $CD68^+$の免疫染色（マクロファージ）ならびに TUNEL 染色（アポトーシス細胞）。

A、B）$CD68^+$の免疫染色（マクロファージ）を基にした細胞数。

C、D）TUNEL 染色を基にしたアポトーシス細胞数。

統計処理：student's t-tests、p 値は図に記載済み。

腓腹筋ならびにヒラメ筋の laminin 5（基底膜構成タンパク）ならびに desmin（中間径フィラメントタンパク質）の二重染色では対照と比較し UC-MSCs 投与群では両タンパクの増加を認め、成熟安定した骨格筋の構造を確認した（data not shown）。

考　察

サルコペニアのモデルとして使用した SAMP10 マウスの加齢に伴う四肢骨格筋の萎縮ならびに筋力や持久力などの身体機能の低下が UC-MSCs 投与により改善することを示した。UC-MSCs の投与により、骨格筋における AMPK/Sirt1 シグナルの活性化および Akt/mTOR を介する筋タンパク質の合成促進を観察した。同様に UC-MSCs はミトコンドリアの機能不全を抑制し、実際筋組織におけるミトコンドリアの biogenesis に重要な役割を果たす PGC1-α の発現を亢進させた。さらに UC-MSCs 投与により酸化ストレス産生の重要な酵素である nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate oxidase subunit（gp91phox）の発現を低下させ、筋肉における TNF-α や MCT-1 などの炎症性サイトカインの発現を抑制し、筋肉内のマクロファージの浸潤を抑制していた。

この UC-MSCs のこれらの効果がこの幹細胞が骨格筋に生着し筋繊維に分化することも考えられるが、トレース実験ではほとんどの細胞が肺にトラップされているのを見ると、その可能性は低い。むしろ、UC-MSCs がパラクラインに放出する何らかの因子の作用による可能性が高いと思われる。我々は UC-MSCs 由来の exosomes を SAMP10 マウスの尾静脈より投与する実験を実施した。なお解析途中ではあるが、UC-MSCs とほぼ同様なサルコペニア抑制効果を見出している。

以前我々はこの SAMP10 に運動負荷を掛け、サルコペニアへの影響を報告している［6］。実際に 3 回/週、40 分/回のトレッドミルによる運動負荷でサルコペニアの発症が抑制された。今回も UC-MSCs 投与群にも運動負荷をかけたところ、非負荷群に比較しさらに著しいサルコペニア改善効果を認めた。

以上より、今後のヒトへの応用を考えた時には、この UC-MSCs 投与と運動療法の併用療法がサルコペニア予防または治療に効果的である可能性があると思われた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学ヒューマンライフコード応用細胞医療学研究室の成憲武特任教授、黄哲特任講師、朴麗梅特任助手である。

文　献

1） Cruz-Jentoft AJ, Sayer AA. Sarcopenia. Lancet. 2019 Jun 29;393(10191):2636-2646. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31138-9. Epub 2019 Jun 3. Erratum in: Lancet. 2019 Jun 29;393(10191):2590. PMID: 31171417.

2） Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Schneider SM, Zúñiga C, Arai H, Boirie Y, Chen LK, Fielding RA, Martin FC, Michel JP, Sieber C, Stout JR, Studenski SA, Vellas B, Woo J, Zamboni M, Cederholm T. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). Age Ageing. 2014 Nov;43(6):748-59. doi: 10.1093/ageing/afu115. Epub 2014 Sep 21. PMID: 25241753; PMCID: PMC4204661.

3） Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinková E, Vandewoude M, Zamboni M; European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing. 2010 Jul;39(4):412-23. doi: 10.1093/ageing/afq034. Epub 2010 Apr 13. PMID: 20392703; PMCID: PMC2886201.

4) Najar M, Melki R, Khalife F, Lagneaux L, Bouhtit F, Moussa Agha D, Fahmi H, Lewalle P, Fayyad-Kazan M, Merimi M. Therapeutic Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Value, Challenges and Optimization. Front Cell Dev Biol. 2022 Jan 14;9:716853. doi: 10.3389/fcell.2021.716853. PMID: 35096805; PMCID: PMC8795900.
5) Hade MD, Suire CN, Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. Cells. 2021 Aug 1;10(8):1959. doi: 10.3390/cells10081959. PMID: 34440728; PMCID: PMC8393426.
6) Inoue A, Cheng XW, Huang Z, Hu L, Kikuchi R, Jiang H, Piao L, Sasaki T, Itakura K, Wu H, Zhao G, Lei Y, Yang G, Zhu E, Li X, Sato K, Koike T, Kuzuya M. Exercise restores muscle stem cell mobilization, regenerative capacity and muscle metabolic alterations via adiponectin/AdipoR1 activation in SAMP10 mice. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2017 Jun;8(3):370-385. doi: 10.1002/jcsm.12166. Epub 2016 Nov 29. PMID: 27897419; PMCID: PMC5476856.