

96. 細胞極性因子が担うサテライト細胞の老化抑制効果

堀居 直希

熊本大学 発生医学研究所 筋発生再生分野

Key words : aPKC λ , サテライト細胞, 細胞老化, サルコペニア

緒言

現在の日本は今後数十年継続される超高齢化社会を迎え、国民医療費や介護費の増大の観点から健康寿命の延伸の必要性が高まっている。その中で、加齢に伴う筋量および筋機能の低下（サルコペニア）は、高齢者のQOL（生活の質）やADL（日常生活動作）を損なうだけでなく、糖尿病や心血管疾患などの慢性疾患リスクの増大に関与する [1, 2]。サルコペニアを引き起こす要因の1つには、運動トレーニングによる筋肥大や損傷からの筋再生に必須の役割を担う骨格筋幹細胞（サテライト細胞）の数・機能低下が関与することが報告されている [3, 4]。そのため、サテライト細胞の機能における加齢変化の分子機序を明らかにすることは、サルコペニアの予防・改善戦略を講じる上で重要な課題である。

これまでに我々は、細胞が持つ空間的な極性（細胞極性）の形態維持に重要な役割を担う細胞極性因子の1つであるScribが発現量依存的にサテライト細胞の運命決定を巧妙に制御し、筋再生に必須の役割を担うことを報告してきた [5]。そこで、他の細胞極性因子についてもサテライト細胞の機能を制御している可能性があるかと仮説を立てた。プロテインキナーゼCファミリーに属し、主要な細胞極性因子の1つである非典型PKC λ （atypical PKC λ : aPKC λ ）をサテライト細胞特異的に欠損させた遺伝子改変マウスでは、サテライト細胞が細胞老化様の表現型を呈し、筋再生能が低下することを見出した。また、サテライト細胞の長期培養により人為的に細胞老化を誘導すると、aPKC λ の発現が低下することを確認している。しかし、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下に、aPKC λ 発現低下が関与するかは明らかではない。そこで本研究は、細胞極性因子「aPKC λ 」の加齢変化に着目し、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下の分子機序を明らかにすることを目的とした。

方法

1. 実験動物

本研究では、2~3ヵ月齢の若齢マウスおよび加齢によるサテライト細胞の機能低下の表現型が観察される24~28ヵ月齢の老齢マウスを対象とした。すべての動物実験は、熊本大学遺伝子組換え生物等第二種使用等安全委員会および動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. サテライト細胞の単離・培養

若齢マウスおよび老齢マウスから筋組織（長趾伸筋）を採取し、0.2% type I collagenase で処理（37°C、90分間）することで、筋線維を単離した。その後、単離した筋線維からサテライト細胞を回収し、増殖培地（Growth medium [GM]: 30% fetal bovine serum [FBS]、1% chicken-embryo extract [CEE]、10 ng/ml basic fibroblast growth factor [bFGF]、1% penicillin-streptomycin [PS] を添加した DMEM）を用いて 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。また、レトロウイルスベクター（RV）を用いて aPKC λ 遺伝子発現レベルを人為的に制御することで、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下を回復できるか否かを検証した。具体的には、老齢マウスから単離したサテライト細胞に RV aPKC λ -IRES-eGFP を導入し、aPKC λ 発現を増加回復させた

(aPKC λ -RV)。コントロール群には、RV-IRES-eGFPを導入した (CON-RV)。

3. Quantitative PCR (qPCR)

Isogen II (Nippon Gene) で RNA を回収し、ゲノム DNA リムーバーを含む ReverTraAce キット (Toyobo) を用いて cDNA を合成した。qPCR には、Thunderbird SYBR qPCR mix (Toyobo) および CFX96 Touch Real-time PCR 検出システム (Bio-Rad) を使用した。aPKC λ 遺伝子発現量を検量線法によって定量化し、その値を内在性コントロールとして TATA ボックス結合タンパク質 (TBP) の発現量で補正した。

4. 免疫染色

サンプルを 2% Paraformaldehyde (PFA) で固定した後、0.3% Triton X-100 および 5% Goat serum を含む PBS を用いて室温で 20 分間ブロッキングおよび透過処理をした。抗 Phospho-Histone H2A.X (yH2AX : Cell signaling, 1 : 1,000) 抗体を用いてインキュベート (4°C、一晚) した後、抗 Rabbit IgG-Alexa Fluor555 抗体 (Thermo Fisher Scientific, 1 : 1,000) を用いて可視化した。EdU の取り込みは、10 μ M EdU を培養細胞に添加後、5% CO₂ 環境下で 3 時間インキュベートし、Click-iT EdU Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。DAPI (NACALAI TESQUE) を添加することで核を染色し、蛍光顕微鏡 (Olympus) で観察した。

結果

1. サテライト細胞における aPKC λ 発現の加齢変化

若齢マウス (Young) および老齢マウス (Aged) からサテライト細胞を単離・培養し、サテライト細胞の機能および aPKC λ 発現を比較検討した。若齢マウスと比較して、老齢マウスでは細胞増殖能の指標である EdU 陽性細胞数が有意に低下し (図 1A)、ゲノム不安定性の指標である yH2AX 陽性細胞数が有意に増大した (図 1B)。また、若齢マウスと比較して、老齢マウスでは aPKC λ 発現が有意に低下した (Data not shown)。

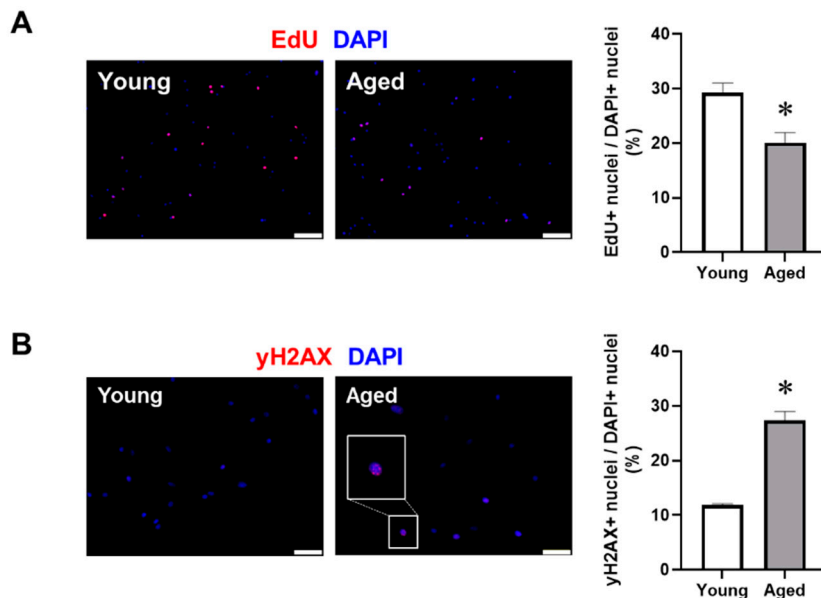


図 1. 加齢に伴うサテライト細胞の機能低下

A) 各群における EdU 陽性細胞数の割合の平均値を示す。スケールバー: 100 μ m。

B) 各群における yH2AX 陽性細胞数の割合の平均値を示す。スケールバー: 50 μ m。

Data are means \pm SE. Student's t test, *P < 0.01.

2. 加齢に伴うサテライト細胞の機能低下を aPKCλ 発現制御によって回復できるか？

老齢マウスから単離したサテライト細胞に CON-RV (CON-RV 群) あるいは aPKCλ-RV (aPKCλ-RV 群) を導入し、加齢に伴うサテライト細胞の機能低下を aPKCλ 発現制御によって回復できるか否かを検討した。CON-RV 群と比較して、aPKCλ-RV 群では aPKCλ 遺伝子発現が有意に増大した (Data not shown)。また、CON-RV 群と比較して、aPKCλ-RV 群では EdU 陽性細胞数が有意に増大し、γH2AX 陽性細胞数が有意に低下した (Data not shown)。

考 察

本研究において、加齢に伴いサテライト細胞の増殖能の低下およびゲノム不安定性が誘発されるが (図 1)、これらの表現型は aPKCλ 発現制御によって回復できることが明らかとなった。したがって、aPKCλ はサテライト細胞の細胞老化を抑制する鍵因子となる可能性が示唆された。今後、老齢マウスから単離したサテライト細胞に aPKCλ を発現制御することで、筋再生能の向上に寄与するか否かを *in vivo* で検討する。また、aPKCλ がサテライト細胞の機能を制御する分子機序をエピゲノム制御の視座から解析する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、熊本大学発生医学研究所筋発生再生分野教授の小野悠介先生、助教の藤巻慎先生にご協力いただき、実施しました。ここに記載して感謝の意を表します。さらに、本研究課題を遂行するにあたり多大なるご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団および関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Sanada K, Iemitsu M, Murakami H, Gando Y, Kawano H, Kawakami R, Tabata I, Miyachi M. Adverse effects of coexistence of sarcopenia and metabolic syndrome in Japanese women. *Eur J Clin Nutr.* 2012 Oct;66(10):1093-8. Epub 2012 May 9. PMID: 22569087 DOI: 10.1038/ejcn.2012.43
- 2) Srikanthan P, Karlamangla AS. Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Sep;96(9):2898-903. Epub 2011 Jul 21. Erratum in: *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 Jun;97(6):2203. PMID: 21778224 DOI: 10.1210/jc.2011-0435
- 3) Blau HM, Cosgrove BD, Ho AT. The central role of muscle stem cells in regenerative failure with aging. *Nat Med.* 2015 Aug;21(8):854-62. PMID: 26248268 DOI: 10.1038/nm.3918
- 4) Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, Rodríguez-Ubreva J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, Jardí M, Ballestar E, González S, Serrano AL, Perdiguero E, Muñoz-Cánoves P. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature.* 2014 Feb 20;506(7488):316-21. Epub 2014 Feb 12. PMID: 24522534 DOI: 10.1038/nature13013
- 5) Ono Y, Urata Y, Goto S, Nakagawa S, Humbert PO, Li TS, Zammit PS. Muscle stem cell fate is controlled by the cell-polarity protein Scrib. *Cell Rep.* 2015 Feb 24;10(7):1135-48. Epub 2015 Feb 19. PMID: 25704816 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.045