

論 文 要 旨

TGF- β signaling Accelerates Senescence of Human Bone-derived CD271 and SSEA-4

Double-positive mesenchymal stromal cells

(TGF- β シグナルはヒト骨組織由来 CD271、SSEA4 共陽性間葉系幹細胞の
細胞老化を促進する)

関西医科大学整形外科学講座

(紹介：齋藤貴徳教授)

関西医科大学衛生学講座

(指導：藺田精昭教授)

河 村 孟

【研究目的】

間葉系幹細胞 (MSC) や造血幹細胞 (HSC) などの組織幹細胞の増殖能や分化能は、加齢により低下すると考えられている。MSC は HSC の未分化性を維持する骨髄微小環境 (HSC ニッチ) の構成細胞と考えられている。このことから HSC ニッチの老化は、HSC の分化・増殖能に影響すると考えられる。機能的にみると老化した MSC は骨形成能が低下し脂肪分化能が亢進する。加えて、老化した MSC では炎症性サイトカインなどを分泌する現象 (Senescence-Associated Secretory Phenotype, SASP) が知られている。しかし、MSC の細胞老化と加齢との関係、HSC のニッチ機能への影響は明らかにされていなかった。

Sonoda らはヒト骨髄に含まれる 11 種類の血球系 Lineage 陰性 (11Lin⁻)、CD45 陰性 (CD45⁻) 細胞から CD271, SSEA-4 共陽性 MSC (Double-positive MSC, DP MSC) を予期的に分離し、DP MSC が *in vitro* で高い HSC 支持能を有することを報告した (Matsuoka, et al. Stem Cells, 2015)。今回、我々は若齢者、高齢者から得られたヒト骨組織由来 DP MSC を用いて、MSC の細胞老化と、老化した MSC による HSC への影響について解析を行った。

【方法】

人工股関節置換術の際に摘出された大腿骨頸部の骨組織を酵素処理し、得られた細胞を用いて研究を行った。骨提供者の年齢により分類した 2 群 (若齢者: 28~31 歳、高齢者: 80~91 歳) の骨由来 11Lin⁻CD45⁻細胞について、CD271 と SSEA-4 を発現する MSC の存在頻度を比較した。さらに、老化が骨組織由来 DP MSC にもたらす影響について、以下の解析を行った。

- ① 若齢者、高齢者 DP MSC の細胞表面マーカーと、mRNA 発現解析。
- ② 各群の DP MSC の細胞増殖能と senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) 活性の測定、*P16*、*P21* の発現解析による細胞老化の評価。
- ③ 老化細胞に対する骨、脂肪、軟骨分化能の解析。
- ④ 両群の DP MSC とヒト臍帯血由来 18Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD133⁺未分化造血細胞 (Takahashi, et al. Leukemia, 2014) との共培養実験。
(共培養後の血球細胞の FCM 解析、造血細胞由来コロニー形成能試験、重症免疫不全マウスへの 1 次及び 2 次移植実験、Transwell による細胞間接着の障害下での共培養実験)
- ⑤ Microarray による、若齢者、高齢者由来 DP MSC における mRNA 発現の比較解析。
- ⑥ TGF- β 2 または抗 TGF- β 抗体 (1D11) による若齢者、高齢者 DP MSC への影響の解析。

【結果】

骨組織由来細胞中の DP MSC の存在頻度は、加齢に伴い有意に低下した。

DPMSCはMSCマーカーやperivascular cellマーカーを発現していたが、高齢者DPMSCではCD271の発現が低下する傾向が見られた。高齢者DPMSCは若齢者DPMSCに比べ早期の増殖能低下、SA- β -gal陽性率の上昇とP16とP21の高い発現を認め、細胞老化形質を示した。若齢者、高齢者DPMSCは共に骨、脂肪、軟骨分化能を示した。一方、高齢者DPMSCは低い骨分化能と高い脂肪分化能を示した。高齢者DPMSCとの共培養群で18Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD133⁺細胞由来の血球細胞の増殖率、CD34陽性率、CD34陽性細胞数は若齢者DPMSC群に比べ有意に低下していた。HSCとDPMSCの接着阻害により若齢者、高齢者どちらの共培養群でも血球細胞の増殖率は低下傾向を示したが、若齢者と高齢者DPMSC間で見られた傾向は維持された。若齢者DPMSCと共培養された血球細胞は高齢者DPMSC群より多くのコロニー形成を示したが、*in vivo*移植実験では若齢者、高齢者どちらの共培養群も長期の骨髄再構築能を示した。Microarrayを用いたmRNA発現の比較解析では、Gene set enrichment analysis (GSEA)により、高齢者DPMSCで脂肪分化促進や細胞周期の停止、TGF- β シグナルなどの特徴的遺伝子群が変動していた。さらに、高齢者DPMSCではTGF- β 2がmRNA、タンパクともに有意に高く発現していた。DPMSCはTGF- β 2の添加により、容量依存的な細胞増殖能の抑制と骨分化能の抑制傾向を示したが、脂肪分化能には影響しなかった。さらにTGF- β 2はDPMSCと血球細胞の共培養系において血球細胞の増殖を抑制する傾向を示した。また、抗TGF- β 抗体(1D11)は高齢者DPMSCにおいて骨分化能を改善した。

【考察】

MSCは*in vitro*で骨芽細胞や脂肪細胞に分化するが、老化により骨分化が抑制され、脂肪分化が亢進する。骨芽細胞は骨髄内でHSCニッチの主要な構成細胞と考えられている。一方、脂肪細胞はHSCの支持能を抑制することが報告されている。以上より、MSCの老化は造血に影響すると考えられる。DPMSCは高い造血細胞支持能を有しているが、高齢者由来のDPMSCは細胞老化形質と骨分化能の低下および脂肪分化能の亢進を示した。造血細胞支持能において、DPMSCの老化は共培養系でのCD34⁺細胞の維持能の低下など造血前駆細胞(HPC)の支持能に影響したが、重症免疫不全マウスへの異種移植による長期造血再構築能への影響、すなわちHSCへの影響は認められなかった。一方、骨内のDPMSCは加齢により減少しており、加齢によるDPMSCの減少が高齢者の造血異常に関与している可能性が示唆された。老化細胞が産生する因子には、細胞の増殖や分化能など幹細胞機能を負に制御するものが存在する。老化したDPMSCが産生するTGF- β 2はDPMSC自身の細胞増殖を抑制し、さらに骨分化能の低下、脂肪分化能の亢進を引き起こした。TGF- β 2による細胞老化の促進は、p16あるいはp21経路の活性化によるものと考えられた。高齢者DPMSCにおける骨分化能の抑制はTGF- β 阻害抗体により改善傾向を示した。このことから、高齢者DPMSCにおいてTGF- β シグナルの制御により細胞の機能を若返らせることができる可能性が示唆された。

本研究により、高齢者 DP MSC は若齢者 DP MSC に比べ早期の細胞老化を示し、そのプロセスには TGF- β 2 が関与することが明らかとなった。今後、TGF- β シグナルの制御が骨粗鬆症や、その他の加齢性疾患治療に応用されることが期待される。