

再生再建医学研究部

(1) 構成員

部長	橋本 有弘
室長	
組織再生再建研究室	下田 修義
細胞再生研究室	上住 円
流動研究員	大久保 咲 阪口 和弥
事務補助員	加藤 記代美

(2) 平成 27 年度研究活動の概要

平成 17 年 3 月に橋本が部長として着任し、再生再建医学研究部を立ち上げた。その後、平成 17 年 3 月に下田が研究室長として、平成 18 年 1 月に上住（池本）が研究員として着任した（その後、細胞再生室長に昇任）。平成 27 年 4 月からは、大久保咲、阪口和弥が流動研究員として加わり、研究を進めてきた。

平成 27 年度は、再生再建医学研究部設立 11 年目、New decade の幕開けであった。当研究部は、以下の課題を中心に研究を進めた。

- ① ヒト筋前駆細胞の特性解明に関する研究
- ② マウスをモデルとしたサルコペニアの発症または進行に関わる因子の探索
- ③ 加齢に伴うエピジェネティック変化の研究

平成 27 年度の研究進捗状況につい

ては、着実にデータは積み重ねられているものの、論文発表に関しては、満足できるレベルとは言えなかった。しかし、上住室長、下田室長らの積年の研究成果が評価され、着実に研究費が獲得できるようになるなど、各自の研究基盤が強固になったことは、誠に喜ばしい。

平成 27 年度に蓄えられた研究成果が、次年度以降、どのような形で世に出るのか、論文発表が期待される。

当センター病院（泌尿器科、整形外科）および外部研究機関（国立がん研究センター、国立循環器病研究センター、京都大学、徳島文理大学、熊本大学、神戸学院大学、大阪大学、カリフォルニア大学など）との共同研究によって、着実に研究成果が得られており、順調に論文発表につながっている。

特に橋本らが確立した不死化ヒト筋前駆細胞については、その有用性が、国内外の研究者に次第に認められ、多くの分与依頼を受けた。開発者としては、日本発の「ヒト筋前駆細胞の標準株」として、国内外を問わず、広く筋細胞研究に用いられることを望んでいる。次年度中に、公的細胞バンクに寄託し、自由に供与可能な状況を作りたいと考えている。

ヒト筋前駆細胞の特性解明に関する研究：
加齢による性質変化について

骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）は、骨格筋組織に特異的な幹細胞であり、骨格筋の再生及び機能維持に重要な役割を果たしている。しかし、ヒト筋幹細胞の性質については、実験解析に制約があるため、解明が進んでいない。

我々は、ヒト未分化筋細胞の性質を解明するために、成人および高齢者の骨格筋から筋幹細胞を分離培養し、その子孫である未分化筋細胞を高い分化能を保ったまま無限増殖させること（不死化）に成功した（Shiomi, et al., 2011）。

近年、高齢者における生理的な活力低下を「フレイル」と呼び、加齢にもなって生じる筋疾患サルコペニア（筋量減少症）の前段階であるとする概念が、提唱されている。サルコペニアおよびフレイルには、ヒト骨格筋幹細胞の機能低下が関与していると考えられるが、その加齢に伴う性質変化については明らかではない。

そこで、我々は82歳および86歳の女性の骨格筋に由来する筋前駆細胞を不死化し、42歳女性の正常骨格筋由来不死化筋前駆細胞と増殖特性を比較検討した。

増殖因子を豊富に含む増殖培地 pmGM 中で培養すると、高齢者由来ヒト筋前駆細胞は活発に細胞分裂し、成人

由来筋前駆細胞に比べて増殖能の低下は、認められなかった。さらに、細胞増殖に必要な成長因子について、要求性を検討したところ、加齢に伴う顕著な違いは認められなかった。

一方、筋前駆細胞に軽微な酸化ストレスを与えた場合、正常骨格筋由来不死化筋前駆細胞は、G1 期で細胞周期を停止するのに対して、高齢者由来不死化筋前駆細胞は、明瞭な細胞周期の停止を示さなかった。

我々は、マウス筋前駆細胞を酸化ストレスに曝露すると、細胞増殖は著しく抑制されるが、G1 期での停止は誘導されないことを見いだしている。高齢者由来筋前駆細胞の酸化ストレスに対する応答は、マウス筋前駆細胞の応答とも異なっていることが示唆されており、ヒト筋サテライト細胞の加齢に伴う性質変化を反映している可能性がある。

今後は、DNA アレイを用いて、成人筋前駆細胞と高齢者由来筋前駆細胞の遺伝子発現プロファイルを解析し、加齢に伴う筋サテライト細胞の性質変化を明らかにしたい。

不死化ヒト筋前駆細胞は、ヒト筋細胞およびヒト筋再生機構の特性解明に有用な実験系を提供し、ヒト筋疾患に対する予防法および治療法の開発に寄与するものと考えられる。

参考文献

1. Hashimoto, N, et al.
Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality.
Biochem Biophys Res Commun 348(4): 1383-1388, 2006.
2. Hashimoto, N, et al.
Osteogenic Properties of Human Myogenic Progenitor Cells.
Mech Dev, 125 : 257-269, 2008.
3. Shiomi, K., et al.
Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential.
Gene Therapy 18:857-866, 2011.
4. Zeng, W., et al.
Genetic and epigenetic characteristics of FSHD-associated 4q and 10q D4Z4 that are distinct from non-4q/10q D4Z4 homologs.
Hum Mutat, 35(8):998-1010, 2014.
5. Yuko Iwata, Nobuyuki Suzuki, Hitomi Ohtake, Shinya Kamauchi, Naohiro Hashimoto, Tohru Kiyono, Shigeo Wakabayashi (2015)
“Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via transient receptor potential vanilloid 2-independent mechanisms, unlike

muscular dystrophy”

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle ; DOI: 10.1002/jcsm.12067

細胞再生研究室：上住 円

サルコペニアの発症または進行に関わる因子の探索

現在、我が国では平均寿命と健康寿命の間に約 10 年の乖離があり、健康的に老いることの重要性が高まっている。骨格筋は身体活動を司る組織であるため、その機能低下は QOL (quality of life) や ADL (activities of daily living) の低下に直結する。特に、高齢者における筋量や筋機能の低下（サルコペニア）は転倒や骨折を誘発し、それらによって被る長期間の不活動は、さらなる要介護状態や寝たきりを引き起こす要因となる。よって、サルコペニアを予防・治療することは健康長寿実現の鍵となるが、サルコペニアの発症メカニズムはよく分かっておらず、有効な治療法も無いのが現状である。

我々は、サルコペニアの発症や進行に関わる因子を探索するため、老化マウス（25 ヶ月齢）と若齢マウス（3 ヶ月齢）の下肢骨格筋を用いてサイトカイン抗体アレイ解析を実施した。調べた 144 種類のサイトカイン関連因子のうち、老化で 1.5 倍以上発現変動する因子を同定したところ、減少するものは得られず、増加するものだけが得られた。このうち、老化で最も発現増加していた 1 つの因子に着目し、さらに解析を進めた。

まず、ELISA や Western blot により発現の再現性を調べ、老化マウス骨格筋で約 4 倍に発現増加していることを

確認した。さらに、その因子の骨格筋における局在を調べるために、免疫組織染色を行ったところ、老化マウス骨格筋の血管と神経筋接合部で異常に高発現・蓄積していることが分かった。最近の研究から、サルコペニアは筋細胞（筋線維や筋衛星細胞）自体の異常というよりは、むしろ骨格筋を構成する筋細胞以外の要素の異常によって起こることが明らかにされた。特に、血管や神経筋接合部の加齢変化はサルコペニアに強く関与すると考えられているが、その分子メカニズムは不明である。今年度同定したその因子の発現増加・蓄積が、血管や神経筋接合部の機能低下を引き起こしている可能性があり、来年度、さらに解析を進めることで、この因子がサルコペニアの発症や進行に関与するか否かを精査する。

組織再生再建研究室：下田修義、坂口和弥

加齢に伴うエピジェネティック変化の研究

はじめに

高齢者疾患最大のリスクファクターは加齢といわれ、加齢に伴う何らかの生体内分子の構造変化が高齢者疾患の下地を作ると予想される。組織・器官の暦年齢を反映するバイオマーカーの中には高齢者疾患の発症前診断に役立つものが含まれると予想され、またそのようなバイオマーカーから老化メカニズムの一端を解明できれば、高齢者の生理機能低下を予防、回復させることが可能になるかもしれない。その候補の一つが DNA のメチル化で、最近ではヒトの血液 DNA からその人の年齢をかなり正確に算出できるようにまでなった。私は加齢に伴うメチル化レベルの変化をゼブラフィッシュにおいて解析し、これまでの研究からゼブラフィッシュゲノムにおいて「CpG アイランドショア」と名付けられた限られた領域が加齢依存的に低メチル化することがわかり、DNA メチル化が魚類においてもエイジングのバイオマーカーになり得ることを確認した。

結果及び考察

(1) アルツハイマー病のエピジェネティック診断法の開発

加齢変化する DNA メチル化部位の中にはアルツハイマー病の発症とリン

クしたものが含まれるのではないかとこの仮説に基づき、NCGG バイオバンクよりアルツハイマー病患者及び高齢健常人の血液 DNA を 48 名ずつ入手し、アルツハイマー病関連遺伝子の「CpG アイランドショア」領域のメチル化レベルを比較したところ、健常者集団にくらべ罹患者集団の方で、わずかではあるが有意に低下している遺伝子をいくつか同定できた。血液 DNA のメチル化解析によるアルツハイマー病早期診断法の開発への手がかりを見いだせたと期待している。

(2) 老化の一因としてのエピジェネティック異常

加齢に伴うゲノムレベルでの DNA メチル化の減少、あるいは局所的な増加はエピジェネティックドリフト(漂流)と呼ばれ、最近、老化及び老年病の原因として注目されているが、未だこの現象と老化との因果関係は認められていない。私たちはこの点を解明するためのモデルシステムとしてゼブラフィッシュを採用し、ゲノム編集技術を用いて、主要な DNA メチル化酵素遺伝子を破壊することに着手した。今後、作製した変異体を用いて、エピジェネティックドリフトの人為的な促進、あるいは抑制が老化に与える影響を解析する予定である。

研究業績（再生再建医学研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Yuko Iwata, Nobuyuki Suzuki, Hitomi Ohtake, Shinya Kamauchi, Naohiro Hashimoto, Tohru Kiyono, Shigeo Wakabayashi (2015).

“Cancer cachexia causes skeletal muscle damage via transient receptor potential vanilloid 2-independent mechanisms, unlike muscular dystrophy”
Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle ; DOI: 10.1002/jcsm.12067.

Atsushi Nishida, Ayaka Oda, Atsuko Takeuchi, Tomoko Lee, Hiroyuki Awano, Naohiro Hashimoto, Yasuhiro Takeshima, Masafumi Matsuo.

“Staurosporine allows dystrophin expression by skipping of nonsense-encoding exon.”

Brain & Development, *in press*.

Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Tsuchida K, Fukada S, Yamamoto H, Yamamoto N, Shiomi K, Hashimoto N.

Pro-insulin-like growth factor-II ameliorates age-related inefficient regenerative response by orchestrating self-reinforcement mechanism of muscle regeneration.
Stem Cells, 33(8): 2456-2468, 2015.

Yamakoshi K, Katano S, Iida M, Kimura H, Okuma A, Ikemoto-Uezumi M, Ohtani N, Hara E, Maruyama M.

Dysregulation of the Bmi-1/p16^{Ink4a} pathway provokes an aging-associated decline of submandibular gland function.

Aging Cell, 14(4): 616-624, 2015.

2. 総説

上住 円、上住聡芳

筋肉の基礎 update. Orthopaedics—日常診療に役立つサルコペニアの知識—.
原田敦編, 全日本病院出版会, 28(13): 17-22, 2015.

3. 著書

なし

4. その他、新聞・報道等

なし

5. 特許申請、取得状況

なし

II. 学会・研究会等発表

1. シンポジウム、特別講演

なし

2. 国際学会発表

なし

3. 国内学会発表

橋本 有弘、倉谷 麻衣、大久保 咲

酸化ストレスによるマウス筋前駆細胞（筋芽細胞）の細胞増殖抑制機構
日本筋学会第1回学術集会，2015年8月8日，東京

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘

Pro-IGF-IIの補充は老化筋再生不良を改善させる
第1回日本筋学会学術集会，2015年8月8日，東京

橋本有弘

不死化ヒト筋細胞：サルコペニア・フレイルにおけるヒト骨格筋幹細胞の役割解明のための新しい解析系
第2回日本サルコペニア・フレイル研究会，2015年10月4日，東京大学伊東国際学術研究センター

橋本有弘、大久保咲、倉谷麻依

酸化ストレスによってマウス筋前駆細胞（筋芽細胞）に誘導される Mitotic Catastrophe
第38回日本分子生物学会年会，2015年12月2日，神戸ポートアイランド，神戸

大久保咲、橋本有弘

高齢者由来ヒト筋前駆細胞（筋芽細胞）の細胞増殖特性

第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド,
神戸

坂口和弥、新飯田俊平、橋本有弘、下田修義

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発

第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸ポートアイランド,
神戸

坂口和弥、新飯田俊平、橋本有弘、下田修義

Diagnosis of Alzheimer's disease based on genetic and peripheral epigenetic
biomarkers

第 8 回 NAGOYA グローバルリトリート, 2016 年 2 月 9 日、大府市健康プラザ

上住 円

サルコペニアの発症または進行に関与する因子の同定.

第三回若手による骨格筋細胞研究会, 2015 年 11 月 25 日, 福岡

4. その他、セミナー等

なし

III. 競争的資金獲得実績

1. 日本医療研究開発機構

橋本有弘（分担）100 万円

長寿科学研究開発事業

高齢者における加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア）に関する予防対策確立のため
の包括的研究

上住 円（分担）198.9 万円

長寿・障害総合研究事業 障害者対策総合研究開発事業

遺伝性筋疾患に対する新たな高効率細胞移植治療法の開発

下田修義（分担）400 万円

ゲノム医療実用化推進研究事業

メディカル・ゲノムセンター等におけるゲノム医療実施体制の構築と人材育成に関する研究

2. 文部科学省

橋本有弘（代表） 130 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C 一般）

ヒト骨格筋幹細胞の機能は加齢と共に低下するか？：サルコペニア治療のための細胞解析

橋本有弘（分担） 30 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C）

ヒト膀胱平滑筋細胞の不死化に関する研究

上住 円,（代表） 130 万円

科学研究費助成事業（若手研究(B)）

サルコペニアの予防法開発を目指した加齢に伴う骨格筋幹細胞数減少機序の解明

3. 財団、その他

橋本有弘（分担） 100 万円

国立精神・神経疾患医療研究センター

精神・神経疾患研究開発費.

筋ジストロフィーモデル動物を用いた新たな治療法の開発

下田修義、（代表） 360 万円（総額 360 万円）

長寿医療研究開発費

血中 DNA のメチル化を指標としたアルツハイマー病早期診断法の開発