

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

開発費研究員

永田 有希

塩見 浩介

事務補助員

加藤 記代美

(2) 平成 24 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）。

当研究部は、空っぽの研究室を実験可能な状態にすること、すなわち研究環境（インフラストラクチャー）を整備することからはじめねばならなかった。人力的にも財政的にも厳しい状況であったため、研究部設立後の 2 年間は、研究基盤整備に予想を超える労力を費やす結果となった。平成 18 年度以降は、研究基盤整備を進めつつ、研究活動を軌道に乗せる努力を続けてきた。その結果、新設研究部としての方向性を示す研究成果が得られてきた。平成 22 年の独立法人化を挟んで、論文発表段階での悪戦苦闘は続いているものの、当センター病院および他機関との共同研究を論文として発

表するなど、確実に成果はあがってきた。

平成 24 年度の研究進捗状況は、思うように論文が発表できなかったという点において、満足できるものではなかった。その原因は、複数の研究課題に関して、論文発表段階に近づきながら、最後のところでデータを詰めきれなかった、という点にある。ここはマラソンにたとえるならば「35Km 過ぎ」にあたる、がんばりどころである。所属員一同の奮起を促したい。近道はないので、辛抱強く地道な努力を続けていきたい。

当研究部設立後 2 年間は、一刻も早く研究を本格的に始動させるため、当研究部は、1 研究部 1 研究グループとして活動してきた。しかし、平成 19 年度からは、研究部長の推進する主要研究プロジェクトとは別に、下田室長が萌芽的研究を進めてきた。一方、再生再建医学研究グループと細胞再生研究室は、「筋再生プロジェクト」として実質ひとつの研究グループとして機能してきた。平成 23 年度からは、上住室長が代表研究者として長寿医療研究開発費を獲得するなど、室長レベル研究員の発展的独立を期待できる状況が整ってきた。そこで、研究部としての枠組みは保持しながらも、部室長がそれぞれ責任を持って 3 つの研究プロジェクトを独自に進めることにした。すなわち、研究部長橋本の推進する、筋再生機序の解明とその臨床

研究への発展をめざす「再生再建医学研究」、上住室長の担当する、マウスをモデルとした「筋幹細胞の加齢変化研究」、下田室長が進めてきた、ゼブラフィッシュをモデルとした「加齢に伴うゲノムメチル化研究」である。下田室長、上住室長のプロジェクトは、未だ萌芽的研究段階にあり、平成 24 年度も論文発表に到らなかったのは、たいへん残念である。現時点では、研究者として独立するための「産みの苦しみ」だと理解したい。

平成 24 年度、当研究部は、以下のような研究項目について研究を進めてきた。

- ①不死化ヒト筋細胞を用いたヒト筋細胞の性質解明
- ②遺伝子性筋疾患発症の分子機序の解析
- ③骨格筋細胞融合の分子機構の解析
- ④骨格筋幹細胞の加齢変化の解析
- ⑤加齢に伴うゲノムメチル化の解析

①～④が、本研究部の推進する主要な研究プロジェクト（骨格筋幹細胞に着目した再生治療の開発をめざす研究プロジェクト）であり、今後も研究部の総力を挙げて発展を図る。④は、マウスをモデルとして上住室長が解析を担当し、独自の判断で研究を進めている。⑤については、下田室長の希望に基づき、平成 19 年度以降探索研究として実施してきた。

当センター病院（泌尿器科、整形外科）および外部研究機関（国立がんセンター、理化学研究所、京都大学再生医学研究所、徳島文理大学、熊本大学、神戸学院大学、カリフォルニア大学など）との共同研究については、確実に研究成果が得られているので、論文発表まで結実させたい。

また、基礎（研究所）と臨床（病院）の連携による先端的治療法開発をめざし、当研究センター内に再生医療専用設備の整備を進めた。

再生再建医学研究グループ：
橋本有弘、塩見浩介、永田有希
ヒト未分化筋細胞に対する
グルココルチコイドのストレス防御作用の解明

グルココルチコイドは、ディシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に対して、臨床的な効果が認められている唯一の治療薬である。しかし、グルココルチコイドは、最終分化細胞である筋線維に作用させると、筋萎縮を誘導する (ステロイド・ミオパチー) ことが知られている。すなわち、グルココルチコイドは、骨格筋に対して「筋萎縮の誘導」と「筋萎縮の抑制」という、正反対の作用を示すことが報告されている。前者の機構に関しては、分子レベルでの解析が進んでいる。一方、後者に関しては、未分化筋細胞に対する増殖促進効果および分化促進効果などに関して、相反する結果が報告されるにとどまっている。また、DMD と同じ遺伝子変異を持つモデルマウス mdx には筋萎縮が見られないため、マウスをモデルとした「グルココルチコイドによる筋萎縮抑制機構」の解明は進んでいない。

私たちは、グルココルチコイドの「筋萎縮の進行抑制」効果は、ステロイドが最終分化細胞 (筋線維) ではなく、未分化筋細胞 (筋サテライト細胞および筋前駆細胞) に作用した結果ではないかと想定し、独自に樹立した不死化ヒト未分化筋細胞 Hu5/KD3 を用いて解析を進めてきた。Hu5/KD3 (文献 1, 2, 3, 4) は、高い増殖能と分化能を

保持したクローンであり、従来の初代培養ヒト筋細胞では実現できなかった詳細かつ再現性のある解析が可能になった。

前年度までの解析によって、私たちは以下のことを明らかにした。

(1) Hu5/KD3 の増殖は成長因子依存的であり、成長因子混合物 UltrosorG を培地から除いた場合、20%ウシ胎児血清を含む培地中であっても細胞増殖は著しく低下する。(2) 合成グルココルチコイド methylprednisolone (Mepd) によって Hu5/KD3 の増殖は回復する。

本年度、私たちは、グルココルチコイドのヒト未分化筋細胞に対する作用の生理的意義について検討し、グルココルチコイドが、細胞性ストレスに対する防御作用 (あるいは拮抗作用) を示すことを明らかにした。

Hu5/KD3 を低濃度の過酸化水素に 2 時間暴露すると、濃度依存的に癌抑制遺伝子産物 RB が活性化された。このとき、Hu5/KD3 の細胞増殖は著しく低下した。フローサイトメトリー解析の結果、Hu5/KD3 細胞は、細胞周期の G1 期に蓄積していることが明らかになった。過酸化水素暴露後、培地に Mepd を加えると、RB タンパク質は速やかに不活性化された。さらに、Mepd によって Hu5/KD3 細胞の増殖が回復するか否

かを、フローサイトメトリー解析およびBrdUの取り込みによって検討した。その結果、Mepdによって、酸化ストレスによるHu5/KD3細胞のG1期での停止は解除され、S期（DNA合成期）に進行する細胞の割合が著しく増大することが明らかになった。このとき、細胞増殖マーカーKi67陽性細胞の割合も著しく増加した。以上の結果から、グルココルチコイドが、ヒト未分化筋細胞に対して細胞性ストレスに対する防御作用（あるいは拮抗作用）を示すことが明らかになった。

今回見いだされたグルココルチコイドのストレスに対する防御作用については、①酸化ストレスによるG1期（あるいはG0期）での増殖停止を解除し、細胞周期に復帰させる、②酸化ストレスによって長くなった細胞周期を短縮する、③酸化ストレスによる細胞死を抑制する、などの可能性が考えられる。そこで、私たちは、タイムラップス装置によるビデオ撮影を行い、Hu5/KD3細胞を一細胞ずつ個別に追跡した。これまでにおこなった予備的解析によって、以下の結果が得られた。

(1) 酸化ストレスを受けたHu5/KD3は、細胞増殖を停止する（細胞分裂しなくなる）。

(2) グルココルチコイドは、細胞分裂を誘起する。

DMD筋組織においては、筋線維の壊死が誘因となって、炎症反応が惹起される。浸潤してきた免疫細胞から分泌される炎症性サイトカインおよび活

性酸素に暴露されることによって、未分化筋細胞は、S期に入る前の段階で増殖を停止するのではないかと考えられる。そのような組織環境下におけるグルココルチコイドの作用について、私たちは以下のような仮説を提唱する。

- ① グルココルチコイドは、ヒト未分化筋細胞に作用して、ストレスによる細胞増殖の停止を解除する。
- ② その結果、未分化筋細胞のプールサイズの減少が緩和され、筋再生が促進される。

今後は、タイムラップスを用いた詳細な細胞のトレース解析を行い、グルココルチコイドによる細胞増殖の実体を解明するとともにグルココルチコイド受容体の標的遺伝子を探索する予定である。

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. Wada, MR, et al. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. **Development**, 129(12): 2987-2995, 2002.
3. Hashimoto, N, et al. Osteogenic Properties of Human

Myogenic Progenitor Cells.
Mech Dev, 125 : 257-269, 2008.

4. 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.

細胞再生研究室：上住 円

サルコペニアの予防・治療法の開発を目的とした老化骨格筋の再生環境悪化の原因究明

サルコペニアは高齢者の転倒事故の主要な原因の一つであり、寝たきり人口の増加につながるため、解決すべき重要課題である。サルコペニアの発症には様々な要因が関連するが、加齢に伴う筋再生能力の低下が一因であると考えられている。我々は実際に、老化マウスでは若齢マウスに比べ筋再生能力が顕著に低下していることを認めている。成体筋組織の再生は、骨格筋特異的な幹細胞である筋衛星細胞が担っているが、加齢に伴う筋衛星細胞自体の質の劣化より、骨格筋組織内環境の悪化が筋衛星細胞の筋再生能力低下を引き起こすことを明らかにしている。そこで、本研究では、加齢に伴う筋再生能力低下をもたらす骨格筋内の環境変化を明らかにし、サルコペニアの予防・治療法の開発へと発展させる。

具体的には、骨格筋の再生環境を調節する要素の1つとして、再生過程の骨格筋で作用するタンパク質（骨格筋組織に存在する因子および全身性の因子（血清））に着目し、これらの加齢に伴う変化を明らかにすることにより、老化骨格筋における再生環境悪化の原因を追求する。

前年度に、老化マウス（24ヶ月齢超）と若齢マウス（2-3ヶ月齢）の再生過程骨格筋組織および血清を用いてサイトカイン抗体アレイ解析を実

施し、老化マウスで発現変動するタンパク質を同定した。本年度は、これら同定されたいくつかのサイトカインについて、その発現確認と *in vitro* での機能解析を行った。

再生過程骨格筋組織を用いた抗体アレイ解析結果から老化マウスで発現減少していた IGF-II に着目した。IGF-II は筋損傷後の再生5日目に最も発現が増大し、この再生5日目の筋肉において、老化マウスでは若齢マウスに比べ IGF-II 発現が減少していることを確認した。再生5日目は増殖した筋衛星細胞が分化し、幼若筋線維が形成され始める時期であることから、IGF-II は筋衛星細胞の分化に機能していると予想された。実際、筋衛星細胞の *in vitro* 培養系への添加実験により IGF-II は筋衛星細胞の分化を促進することが明らかになった。老化骨格筋では IGF-II の発現減少によって筋分化能が低下し、これが筋再生能力低下の一因となっている可能性が示唆された。さらに、再生過程骨格筋組織や血清で変動していた他の候補因子についても同様に解析を行っている。

来年度以降、候補因子の *in vivo* での機能解析や老化マウスへの補充、阻害による筋再生能力改善効果の検証を行っていく予定である。

組織再生再建研究室：下田修義 加齢に伴うエピジェネティック変化の研究

はじめに

高齢者に見られる組織・器官の生理的機能の低下の度合いを反映しうるバイオマーカーがあれば高齢者疾患の発症前診断に役立てることができる。さらにそのバイオマーカーを基にして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。しかしこれまで脊椎動物の老化の度合いを測るバイオマーカーは見つかっていなかった。古くにエピジェネティクスの一つ、DNA のメチル化の減少と老化との関連が指摘されていたが、その後研究は進展していなかった。そこで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、遺伝子内、それも最近「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 メチル化が少なくとも魚類においてエイジングのバイオマーカーになり得ることが確認できた。

結果及び考察

もしDNAのメチル化の加齢変化が老化の原因であるならば、その変化は世代ごとにリセットされると考えられる。そこで本年度は、ゼブラフィッシュ

で見られた加齢に伴うメチル化の低下というエピゲノムの変化がゼブラフィッシュの初期発生の段階で元に戻るかどうかを調べた。卵母細胞、1~2 細胞期、128 細胞期のゲノム DNA を抽出し、CpG アイランドショアのメチル化を調べたところ、卵母細胞では低メチル化していた CpG アイランドショアが、受精により直ちに(30 分以内) de novo のメチル化を受けることが明らかになった。この結果はゼブラフィッシュのエピゲノムのリセット(若返り)が受精直後に起こること、具体的には卵母細胞にはエピゲノムをリセットするのに必要な de novo のメチル化酵素の活性が受精まで抑制されていることを示唆する。したがって、もし老化していく個体の体細胞においても、受精直後と同様に特定の de novo メチル化酵素の活性を人為的に高めることができれば、エピゲノムが若返ることで寿命の延長につながる可能性がある。そこで de novo のメチル化酵素と GFP の融合遺伝子を飼育温度変化によって任意に発現誘導できるトランスジェニックフィッシュの作製を開始した。トランスジェニックフィッシュが作製できたら、性成熟後、適当な間隔で de novo メチル化酵素を発現させることで、老化マーカーの発現に変化(遅延)が見られるか否か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

なし。

2. 総説

橋本有弘

骨格筋幹細胞—最新基礎知見を踏まえて。

Bone Joint Nerve 3(1)、21-26 (2013)

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

橋本有弘、岡村菊夫

自己筋幹細胞を用いた高齢者の尿失禁に対する再生治療の開発

第100回日本泌尿器科学会総会シンポジウム

2012年4月22日、横浜

橋本有弘

骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の性質解明

加齢や筋疾患による性質変化から、筋サテライト細胞を標的とした再生医療の可能性を探る

第29回筋肉の会

2012年9月13日、岐阜

橋本有弘

骨格筋幹細胞を標的とした再生医療

整形外科学会基礎学術集会 シンポジウム「筋損傷を科学する」

2012年10月27日、名古屋

橋本有弘

Cell Biological Study on Human Myogenic Stem Cell and Progenitor Cell

第35回日本分子生物学会年会 ワークショップ「骨格筋幹細胞研究の最前線
(Frontiers of muscle stem cell research)」

2012年12月11日、福岡

2. 国際学会発表

Naohiro Hashimoto and Kosuke Shiomi

Glucocorticoids repress Rb-dependent/stress-induced cell cycle arrest of human myogenic cells: a possible mechanism of glucocorticoid therapy for Duchenne muscular dystrophy

Frontiers in Myogenesis Meeting: Development, Function and Repair of the Muscle Cell, Society of Muscle Biology.

New York University June 5, 2012.

Naohiro Hashimoto

Recruitment of M-cadherin/p120 Catenin Complex to Lipid Raft is Critical for Establishing Fusion Competence of Myogenic Cells

the FASEB Science Research Conference on *Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells*

August 16, 2012 at the Il Ciocco, Lucca, Italy.

Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Kunihiro Tsuchida, So-ichiro Fukada, Naohiro Hashimoto

Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia

the FASEB Science Research Conference on *Skeletal Muscle Satellite & Stem Cells*

August 14, 2012 at the Il Ciocco, Lucca, Italy.

Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Kunihiro Tsuchida, So-ichiro Fukada, Naohiro Hashimoto

Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia
Keystone Symposium “Aging and Diseases of Aging”
October 22–27, Tokyo.

Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Kunihiro Tsuchida, So-ichiro Fukada, Naohiro Hashimoto

Search for the environmental factors that contribute to sarcopenia
9th Japanese–French Symposium for muscular dystrophy
September 7–8, Tokyo.

Shimoda N, Izawa T, Yoshizawa I, Yokoi H, Kikuchi Y, Naohiro Hashimoto
Age-related decrease in DNA methylation at CpG island shores and increase in fragmentation of the zebrafish genome
Keystone Symposium “Aging and Diseases of Aging”
October 22–27, Tokyo.

3. 国内学会発表

塩見浩介、橋本有弘

グルココルチコイドは、ヒト筋芽細胞の Rb 依存的な細胞周期の停止を解除する
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 12 日、福岡

永田有希、清野透、後藤雄一、橋本有弘

炎症性サイトカイン IL-1b によるヒト筋細胞の分化阻害
第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月 11 日、福岡

下田修義、井澤俊明、吉澤明生、横井勇人、菊池裕、橋本有弘

ゼブラフィッシュの加齢はゲノミックとエピゲノミックな変化を伴う
日本エピジェネティクス研究会第6回年会，2012年5月14–15日，東京

下田修義、井澤俊明、吉澤明生、横井勇人、菊池裕、橋本有弘

ゼブラフィッシュの加齢はゲノミックとエピゲノミックな変化を伴う

第35回日本基礎老化学会，2012年7月26-27日，東京

4. その他、セミナー等

なし。

III. 公的研究費

1. 厚生労働省

橋本有弘（分担）145 万円

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合）

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

2. 文部科学省

橋本有弘（代表）110 万円

科学研究費助成事業（基盤研究 C）

ヒト骨化性筋炎は、幹細胞病か？：変異ALK2 遺伝子による筋幹細胞の骨分化誘導

3. 財団、その他

橋本有弘（分担）250 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.

筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ