

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 倉谷 麻依

事務補助員 加藤 記代美

(2) 平成 26 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、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さねばならなかった。以後、在籍したメンバーの不断の努力によって、研究基盤の整備が進んだ。その結果、平成 22 年の独立行政法人化時には、日常的な研究に関する限りは、かなり自由に実施できる環境を整えることができた。

平成 26 年度は、再生再建医学研究部設立 10 年目にあたる、節目の年であった。当研究部は、以下の課題を中心に研究を進めた。

- ① ヒト筋細胞の特性解明：マウス筋細胞との比較解析
- ② 骨格筋の加齢変化に関する解析
- ③ 加齢に伴うゲノムメチル化の解析

平成 26 年度の研究進捗状況は、論文発表に関しては、まだまだ満足できるレベルに達したとは言えない。しかし、上住室長、下田室長らの積年の努力の結果が、着実に論文として目に見える形になったことは、素直に喜ばしい。

上住室長の加齢に伴うマウス骨格筋の研究は、8 年余りに渡るプロジェクトであり、本年度 Stem Cells 誌に掲載が決まった論文の成果は、その一部に過ぎない。その陰には、まだ膨大なデータの蓄積があり、それらについても、今後、続報として発表されることを期待したい。

下田室長の DNA メチル化に関する論文(PLoS ONE 誌)は、有名専門誌(Cell 誌)に報告された論文の結果が、その通りには再現されないことを示したものである。既に百花繚乱の感さえある、エピジェネティック研究であるが、この分野においては、未だ研究基盤に不確定な部分があることを端的に指摘し、警鐘を鳴らしたものと言えよう。

また、下田室長が昨年度から着手した「DNA メチル化を指標としてアルツハイマー病の早期診断法の開発をめざす研究」は、当センター内の認知症研究者から高い評価を受け、平成 26 年度から、開発研究費に採択された。ゲノムのメチル化状態をアルツハイマー病のバイオマーカーとして意義づけることができるか、今後の解析に

期待したい。

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）との共同研究については、確実に研究成果が得られており、一部については、平成 26 年度に論文発表に到った。研究成果は、確実に結実しつつある。特に橋本らが確立した不死化ヒト筋細胞については、その有用性が、国内外の研究者に次第に認められるようになってきた。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。今後は、公的細胞バンクを通じて、世界中の研究者に自由に供与可能な状況を作りたいと考えている。

平成 27 年度は、再生再建医学研究部の次なる 10 年の幕開けになる。研究部員一同、今一度気持ちを引き締め、新たな気概を持ってスタートをきる所存である。

再生再建医学研究グループ：
橋本有弘、倉谷麻依

未分化筋細胞の種特異性に関する研究：
マウス未分化筋細胞の増殖制御機構

代表的な遺伝性筋疾患ディシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋線維に発現するジストロフィン遺伝子の変異を原因とする劣性遺伝病である。DMD における筋萎縮は、筋線維細胞膜が障害を受け、筋線維が壊死することによって生じる。ジストロフィン遺伝子の変異は、ヒトでは重篤な進行性筋萎縮症の発症をもたらすのに対し、同じ遺伝子変異を持つ *mdx* マウスは、全く筋萎縮を示さない。*mdx* マウスの骨格筋を病理学的に解析すると、中心核線維とよばれる再生筋線維が認められることから、*mdx* マウスにおいても筋線維の壊死は起こるものの、筋再生がそれを補う結果、筋萎縮が進行しないものと考えられている。この事実、DMD の発症には、原因である遺伝子変異に加えて、ヒト筋再生機構に固有の性質が深く関わっていることを示唆している。

マウスおよびラットが、ヒトに比べて著しく高い筋再生能力を有することは、経験的に広く認知されている。しかし、ヒトの筋再生能力を実験的に検討することはできないため、ヒトとマウスの筋再生能力の違いが生じる原因および機序については、未だ不明である。我々は、筋再生能力の種間差が生じる機序を分子細胞レベルで解

明することを端緒として、ヒト骨格筋再生機構の特性およびそれに固有の制御機序を明らかにしようと考えた。ヒト骨格筋の特性解明は、DMD のみならず、高齢者におけるサルコペニアなどの筋疾患および身体的フレイルに対する予防法および治療法開発の新たな基盤となることが期待できる。

筋再生は骨格筋特異的組織幹細胞である筋サテライト細胞に依存している。筋サテライト細胞の子孫であるマウス未分化筋細胞（筋前駆細胞、筋芽細胞）の分裂速度は、ヒト未分化筋細胞に比べて速いことが知られており、この高い増殖能力は、マウスにおける筋再生能力を支える要因の一つであると考えられる。

我々は、独自に樹立したマウス未分化筋細胞クローン Ric10 の細胞分裂周期を、Time-Laps ビデオ撮影を用いて、各細胞を追跡し、細胞分裂の間隔を直接計測した。その結果、ヒト未分化筋細胞の細胞分裂周期は 24-28 時間であるのに対し、マウス未分化筋細胞の分裂速度は非常に速く、10-16 時間ごとに細胞分裂を繰り返すことがわかった。このマウス未分化筋細胞の分裂速度は、マウス ES 細胞に匹敵する。

マウス未分化筋細胞の増殖は、市販の増殖因子混合物 (Biosepra,

Ultroser G) に強く依存しており、Ultroser G を培養液に添加しない場合、細胞増殖は著しく低下した。しかし、ヒト未分化筋細胞で見られたような、細胞周期の G1 期における停止(いわゆる G1-arrest) は認められず、全ての細胞が増殖分裂していることが、Time-Laps ビデオ解析および核酸アナログ EdU の長期標識実験から明らかになった。Ultroser G 欠損培養液中で培養すると、細胞周期は約 23 時間に延長した。G1 期から S 期への進行は、G1 チェックポイント機構とよばれる分子機構によって制御されている。上記の結果は、ヒト未分化筋細胞とは異なり、マウス未分化筋細胞では、Ultroser G の作用がなくても G1 チェックポイント機構が活性化されない(されにくい)ことを示している。

ヒト未分化筋細胞および線維芽細胞など、様々な細胞において、酸化ストレスが G1-arrest を誘導することが報告されている。マウス未分化筋細胞に G1-arrest を誘導するため、低濃度の過酸化水素に曝露したところ、細胞増殖は著しく抑制された。しかし、DNA 合成は抑制されず、G1-arrest は誘導されなかった。Time-Laps ビデオ解析の結果、酸化ストレスに曝露されたマウス未分化筋細胞には、明確な細胞周期の停止が認められなかった。しかし、G2 期の遅滞とそれに続く細胞分裂の異常が認められた。これは、mitotic catastrophe とよばれる現象のひとつであり、ヒト未分化筋細胞では全く見られなかった。

以上の結果は、マウス未分化筋細胞では、マウス ES 細胞と同様に、G1 チェックポイント機構が欠けている(あるいは活性化されにくい)ことを示している。ヒトの筋再生能力がマウスに比べて低い原因のひとつは、未分化筋細胞の増殖速度が遅いためであると考えられる。

本研究の結果から、実験動物(マウス)を用いて得られた結果を、ヒト筋疾患に対する予防法および治療法の開発に発展させるためには、ヒト筋細胞およびヒト筋再生機構の特性解明が必須であると考えられる。

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. 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.

5. Shiomi, K., et al.
Differential Impact of the Bisphosphonate Alendronate on Undifferentiated and Terminally Differentiated Human Myogenic Cells.
J Pharmacy Pharmacol. 66:418-427, 2013.

6. 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.

7. Ogawa, R. et al.
Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration
Development 142(1): 51-61, 2014.

細胞再生研究室：上住 円

Pro-IGF-II 補充による老化骨格筋再生能力改善効果の検討

サルコペニア（加齢に伴う筋肉量および筋機能の低下）は高齢者に転倒や骨折のリスクを増加させ、それらに伴う筋損傷からの速やかな回復はフレイルや要介護状態への進行を防ぐために必須である。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、我々は、加齢に伴う筋再生能力の低下が、筋衛星細胞自体の質の劣化より、骨格筋内環境の悪化が原因であることを明らかにしている。そこで、このような環境因子を同定するため、老化マウス（24-30ヶ月齢）と若齢マウス（2-3ヶ月齢）の再生過程骨格筋組織を用いてサイトカイン抗体アレイ解析を実施し、老化で発現減少していたIGF-IIに着目した。ウエスタンブロットによる発現確認から、IGF-IIは筋損傷により誘導され、再生過程骨格筋では mature IGF-IIではなく pro-および big-IGF-IIが発現していることが分かった。そして、老化によりその発現誘導が遅れるだけでなく絶対量も減少していることが明らかとなった。そこで、老化マウスに pro-IGF-II を補充することにより筋再生能力が改善されるかどうか調べた。浸透圧ポンプを用いて筋損傷4日目から7日間 pro-IGF-II を持続投与した。pro-IGF-II 投与老化マウスではコントロール老化マウスに比べ、壊死線維の顕著な減少や再生筋線維数の有意な増加が見られ、組織像の改善が認

められた。また、これらは pro-IGF-II による筋衛星細胞増殖促進や血管新生促進、間葉系前駆細胞の異所性脂肪分化抑制効果のためであることを明らかにしている。さらに、この間葉系前駆細胞の脂肪分化抑制は mature IGF-II では見られず、pro-IGF-II に特異的な効果であることも見出した。以上の結果から、pro-IGF-II の補充は老化骨格筋損傷に対する有効な治療法の一つとなりうることが示唆された。

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

本年度は以下の 2 項目を行った。

(1) ゼブラフィッシュの加齢に伴う DNA メチル化の減少のメカニズム

2008 年の Cell 誌にゼブラフィッシュの脱メチル化に AID、MBD4、GADD45 という三つの因子が協調した脱メチ

ル化機構の報告があり、その再現実験を試みたが予想に反してその論文のほとんどすべての結果が再現できず、その報告が誤りであると結論し、報告した (PLoS ONE, 2014)。したがって加齢に伴う DNA メチル化の減少にはこれらの因子に依らない経路が関与していると考えられた。

(2) 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する仮説に基づき、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 を入手した。今後、二つのサンプル間でのメチル化レベルを比較する予定である。メチル化レベルが、健常人集団にくらべ罹患患者集団の方で有意に変化している領域が同定できれば、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ると期待している。

参考文献

Shimoda, N., et al. No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos. **PLoS ONE**, 9(12):e114816, 2014..

研究業績（再生再建医学研究部）

I. 論文発表

原著

Ogawa, R., Ma, Y. Yamaguchi, M., Ito, T., Watanabe, Y., Ohtani, Satoshi Murakami, Shizuka Uchida, Piera De Gaspari, Akiyoshi Uezumi, Miki Nakamura, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Tsujikawa, H., Hashimoto, N., Braun, T., Tanaka, T., Takeda, S., Yamamoto, H. and So-ichiro Fukada :
Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration
Development 142(1), 51-61, 2015.

Zeng, W., Chen, Y. Y., Newkirk, D. A., Wu, B., Balog, J., Kong, X., Ball, A. R., Jr., Zanotti, S. , Tawil, R. , Hashimoto, N., Mortazavi, A., van der Maarel, S. M., and Yokomori, K.:
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.

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, 2015. *in press*.

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, 2015. online published.

Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K:
Identification and characterization of PDGFR α ⁺ mesenchymal progenitors in

human skeletal muscle.

Cell Death Dis, 5: e1186, 2014.

Shimoda, N., Hirose, K., Kaneto, R., Izawa, T., Yokoi, H., Hashimoto, N., Kikuchi, Y :

No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos.

PLoS ONE, 9(12):e114816, 2014

2. 総説

上住 円、上住 聡芳 :

サルコペニア予防のための骨格筋再生.

Geriat. Med, 52(4): 407-411, 2014 年

3. 著書

橋本有弘

基礎：筋の構造と機能

「ベッドサイドの高齢者運動器の診かた」、48-50, 南山堂, 2014 年

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. 国際学会発表

なし。

3. 国内学会発表

橋本有弘

ヒト骨疾患における骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の役割

第 32 回日本骨代謝学会学術集会、7 月 26 日、大阪

川田茂雄、橋本有弘

骨粗鬆症治療薬 Alendronate がマウス骨格筋再生に及ぼす影響

第 69 回日本体力医学会大会、9 月 20 日、長崎

倉谷麻依、橋本有弘

マウス未分化筋細胞の増殖制御機構：ステロイドおよび成長因子応答性の解析
第 37 回日本分子生物学会年会、11 月 27 日、横浜

川田茂雄、橋本有弘

骨粗鬆症治療薬 Alendronate は、筋再生を阻害する
第 37 回日本分子生物学会年会、11 月 26 日、横浜

上住 円、

Pro-IGF-II は老化筋再生不良を改善させる。

第 2 回 若手による骨格筋細胞研究会、11 月 3-4 日。

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘、

Pro-IGF-II の補充による老化骨格筋再生能力改善効果の検討。

第 14 回 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM)、11 月 22-23 日。

上住 円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘、

Pro-IGF-II 補充による老化骨格筋再生不良改善効果の検討。

第 14 回 日本再生医療学会総会、3 月 19-21 日。

下田修義、廣瀬健太郎、菊池裕、橋本有弘

ゼブラフィッシュ胚で AID と MBD4 がカップルした脱メチル化は起こるのか？

第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、5 月 27 日、東京

下田修義、廣瀬健太郎、井澤俊明、横井勇人、橋本有弘、菊池裕

加齢依存性 DNA 低メチル化における組織再生と 5 ヒドロキシメチルシトシンの関与の可能性

第 37 回日本基礎老化学会年会、6 月 26 日、愛知

4. その他、セミナー等

なし。

III. 競争的資金獲得実績

1. 厚生労働省

橋本有弘（分担）100 万円

厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合）

加齢による運動器への影響に関する研究－サルコペニアに関する包括的検討－

2. 文部科学省

橋本有弘（分担）50 万円（未確定）

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）150 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）400 万円（総額 400 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