

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

永田 有希

塩見 浩介

開発費研究員

向 敦史

事務補助員

加藤 記代美

(2) 平成 22 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）。

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、論文発表の段階での悪戦苦闘は続いているものの、棟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。

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。人間的にも財政的にも厳しい状況であったため、設立当初 2 年間の研究進捗状況は、決して満足できるものではなかった。手探りでの船出であったが、「当たり前に行えることを確実に実行できて、はじめて独自の展開が可能になる」と考え、地道な努力を辛抱強く続けてきた。この方針は、今後も堅持したい。

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。今後は、室長レベル研究員の発展的独立を期待したい。そこで、研究部としての枠組みは保持しながらも、部室長が独立研究者として、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を想定し、研究運営に配慮した。すなわち、研究部長橋本の推進する、筋再生研究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、平成 22 年度中に着任後最初の論文発表することはできなかったが、奮起を期待したい。

平成 22 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高齢者および遺伝子性筋疾患患者由来ヒト筋細胞の初代培養および不死化細胞の解析
 - 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
- ①～③が、本研究部の推進する研究プロジェクト（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。①～③の関連研究である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いる。

当センター病院（泌尿器科）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、神戸学院大学など）との共同研究については、確実に研究成果が得られ、その一部は論文発表することができた。

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ている。

再生再建医学研究グループ：
橋本有弘、向敦史、塩見浩介、永田有希
骨格筋細胞の融合制御機構に関する研究

骨格筋の最終分化細胞である筋管細胞は、多数の核を持つ巨大な細胞である。筋管細胞は、筋前駆細胞が互いに融合することによって形成される。自発的細胞融合は、筋細胞に固有な特性のひとつであり、細胞融合の機構の解明は、筋再生を促進する技術の開発、すなわち筋幹細胞を標的とした筋再生治療の開発に必須である。筋細胞の融合過程は、①細胞接触、②細胞認識および接着、③細胞膜の崩壊と再構成（融合）、という多段階に分けられる。しかし、これまで、これらのステップを制御する分子機構に関しては不明の点が多い。

我々は独自に樹立したマウス筋前駆細胞株 Ric10（参考文献 1）の細胞融合過程をタイムラプス装置によって観察し、筋細胞の membrane ruffles および lamellipodia が他の筋細胞の細胞膜と融合すること、即ち、ruffles および lamellipodia が細胞膜の「予定細胞融合領域 (fusion-competent area of plasma membrane)」であることを発見した（文献 1）。さらに、筋細胞の膜融合には、予定融合領域における、（1）細胞接着分子の脂質ラフトへの集積と（2）脂質ラフトの凝集と拡散が必須であることを明らかにした（文献 2）。

平成 22 年度は、（1）細胞接着分子の脂質ラフトへの集積と（2）脂質ラ

フトの凝集と拡散分子機構について解析し、以下のような成果を得た。

①骨格筋特異的細胞接着タンパク質 M-cadherin は、筋分化特異的に脂質ラフトへ集積する。②M-cadherin の脂質ラフトへの集積は、細胞膜上の M-cadherin が、非ラフト領域からラフト領域へ移動することによる。③脂質ラフトの凝集と拡散は、small G protein Rac1 によって制御されている。④分化途上の未分化骨格筋細胞では、接着分子の脂質ラフトへの移動・集積とそれに続く脂質ラフトの凝集・拡散が、秩序だった制御を受けている。

私たちは、現在、接着分子の脂質ラフトへの局在を制御する分子機構について、さらに解析を進めている。

本研究は、筋細胞融合の分子機序に基づいた「筋細胞融合効率を向上させることを目的とした治療法」を開発するための重要な基盤となる。

参考文献

1. Mukai, A, et al.
Exp.Cell Res. **314**: 387-397. 2008.
2. Mukai, a, et al.
Exp.Cell Res. **315**: 3052-3063. 2009
3. Wada, RM, et al.
Development, 129(12): 2987-2995, 2002.

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

加齢に伴う筋量および筋機能の低下（サルコペニア）は、高齢者の身体的自立能力を奪い、QOL を低下させるため、解決すべき重要課題である。サルコペニアの原因には未だ不明な点が多いが、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。骨格筋には筋の再生や成長を担う幹細胞である筋衛星細胞 (muscle satellite cell) が存在する。satellite cell の加齢による影響については、加齢に伴い satellite cell 数が減少するという報告がある一方で、変化しないという報告もあり、未だ結論が得られていない。そこで、我々は筋組織全体の satellite cell の高精度な定量解析を目的として、satellite cell の表面抗原を認識する特異的抗体 (SM/C-2.6 抗体) とフローサイトメーターの技術を駆使し、マウス骨格筋から satellite cell を直接単離する方法を試みた。これにより、老化マウスの骨格筋から高純度で satellite cell を単離することに成功し、老化マウスの筋組織では、satellite cell 数が顕著に減少していることを明らかにした。培養を介さず細胞が得られるこの技術基盤は、生体内における幹細胞の加齢変化をより直接的に解析することを可能とする。

この方法を用いて、若齢マウス (2-3 ヶ月齢) と老化マウス (24-30 ヶ月齢)

の骨格筋から satellite cell を単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、老化マウスの satellite cell では、inflammatory, immune response, extracellular matrix, cell adhesion, apoptosis 等に関わる遺伝子の発現が増加していることがわかった。反対に、老化マウスの satellite cell で減少している遺伝子として、RNA processing, transcription, cell cycle, metabolism 等に関わるものが見出された。

本年度は、老化マウスの satellite cell で発現減少していた 1 つの遺伝子に着目し、詳細な解析を行った。マウス骨格筋の免疫組織学的解析により、satellite cell におけるその発現をタンパクレベルで確認した。また、フローサイトメーターにより定量的にその発現レベルを調べた結果、興味深いことに、その分子は全ての satellite cell で発現しているわけではなく、陽性と陰性の satellite cell が存在し、老化マウスにおいては、陽性の satellite cell の割合が顕著に低下していることが示された。今後、加齢に伴う satellite cell 数減少におけるこの分子の関与についてさらに調べる予定であり、これらの解析を通して、サルコペニアの原因解明と予防法開発に発展させていきたいと考えている。

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。私はこれまでの研究により哺乳動物とは進化上離れた脊椎動物である魚類、ゼブラフィッシュにおいても加齢に伴うメチル化レベルの変化（減少）を明らかにし、DNA メチル化の変動が脊椎動物で共通のバイオマーカーであることを見出した。私はさらに、ゼブラフィッシュの老化個体のゲノム DNA に小さな DNA の断片が含まれていることに気づき、この低分子 DNA の新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。

結果及び考察

30ヶ月齢のゼブラフィッシュ組織からゲノムを抽出後、アガロースゲルで電気泳動をするとエチジウムブ

ロマイド染色により 500 bp に満たないサイズの DNA 断片がかすかに観察された。私はその低分子量 DNA を感度よく検出するための独自の手法を開発し、高濃度アガロースゲルで解析したところ、低分子 DNA は組織にもよるがおよそ1年を過ぎた頃から現れ始めること、さらにその DNA はアポトーシスを起こした細胞で見られる 180 bp 前後の DNA 断片を最小単位とするラダーとして現れることが明らかになった。ゼブラフィッシュの生殖期間がおよそ3ヶ月齢から12ヶ月齢であることから、低分子 DNA 断片は生殖期間の終わり、つまり老化が始まる時期から出現する。哺乳動物では低メチル化を誘導するとアポトーシスが生じることが示されており、ゼブラフィッシュの加齢に伴い出現する DNA 断片は、すでに見出しているゲノム DNA の加齢依存性低メチル化により誘導されるアポトーシスの結果ではないかと考えられた。ヒトやマウスでも老化した組織でアポトーシスが亢進し、DNA ラダーが出現する例が報告されており、DNA 断片の出現が DNA メチル化の変動と同じく、脊椎動物の共通の加齢マーカーであること、ゼブラフィッシュがそれらの老化への関与を解析する上で好適のモデル生物になり得ることが示唆された。

研究業績（再生再建医学研究部）

I. 論文発表

1. 原著

Suzuki, Y., Nakayama, K., Hashimoto, N. and Yazawa, I.
Proteolytic processing regulates pathological accumulation in
dentatorubral-pallidoluysonian atrophy
FEBS J. 27:4873-87, 2010.

Yanagisawa, M., Mukai, A., Shiomi, K., Song, Si-Y., and Naohiro Hashimoto
Community effect triggers terminal differentiation of myogenic cells
derived from muscle satellite cells by quenching Smad signaling
Exp. Cell Res. 317: 221-233, 2011.

2. 総説

橋本有弘

腹圧性尿失禁に対する培養骨格筋細胞を用いた再生医療開発の現状と展望。
排尿障害プラクティス 18:29-35, 2010.

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、塩見浩介、永田有希、向敦史、上住円、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 99 回日本泌尿器科学会総会シンポジウム
2010 年 4 月 25 日、名古屋

橋本有弘

サルコペニア発症における筋再生システムの役割解明をめざして

～骨格筋幹細胞生物学からのアプローチ～

転倒防止研究会 第8回研究集会

2011年10月2日、東京

上住 円

サルコペニアの原因解明を目的とした骨格筋幹細胞の加齢変化の解析.

徳島大学医学部生体栄養学分野特別講演会, 2010年12月1日, 徳島

2. 国際学会発表

Naohiro Hashimoto and Michiko Yanagisawa

Community Effect Triggers Terminal Differentiation of Myogenic Cells by
Quenching Smad Signaling Pathway

FASEB Summer Conferences: Skeletal Muscle Satellite and Stem cells

July 19, 2010. USA.

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

Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells

16th International Conference of the International Society of

Differentiation (From Stem Cells to Organisms)

November 16, 2010. Nara, Japan.

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

Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells

Keystone Symposia, Stem Cells in Development, Tissue Homeostasis and
Disease

January 31, 2011. Santa Fe, New Mexico, USA.

3. 国内学会発表

橋本有弘、柳澤美智子

Community Effect Triggers Terminal Differentiation of Myogenic Cells by
Quenching Smad Signaling Pathway

第43回日本発生生物学会大会 2010年5月19日 京都

橋本有弘、岡村菊夫、塩見浩介

腹圧性尿失禁に対する自己筋細胞移植治療の開発：高齢者由来横紋筋幹細胞の分離および培養下における増殖特性

泌尿器科再建再生研究会 2010 年 6 月 19 日 札幌

橋本有弘、柳澤美智子

Smadシグナルの抑制による細胞密度依存的な筋分化抑制機構（コミュニティー・イフェクト）

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

向敦史、橋本有弘

Crucial role of Rac1 in myogenic cell fusion

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

塩見浩介、橋本有弘

グルココルチコイドによるヒト筋細胞の増殖制御機構

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

永田有希、清野透、後藤雄一、橋本有弘

不死化ヒト筋細胞を用いたディシェンヌ型筋ジストロフィー・筋細胞の特性解明

第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7-10 日 神戸

下田修義、井澤俊明、吉澤明生、菊池裕、橋本有弘

ゼブラフィッシュの体細胞ゲノムに生じる 2 種類の加齢変化

日本エピジェネティクス研究会 平成 22 年 5 月 28 日，米子市文化ホール

下田修義、井澤俊明、吉澤明生、菊池裕、橋本有弘

ゼブラフィッシュの体細胞ゲノムに生じる 2 種類の加齢変化

日本基礎老化学会 平成 22 年 6 月 17 日，名古屋大学

4. その他、セミナー等

III. 公的研究費

1. 厚生労働省

橋本有弘（分担）200 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

橋本有弘（分担）200 万円

厚生労働科学研究費補助金（政策創薬総合）

ヒト組織・細胞の研究資源としての高度化と公共ヒト組織・細胞バンクの利用促進に関する研究

2. 文部科学省

橋本有弘（分担）15 万円

科学研究費補助金（基盤 C）

グリア細胞における脂質代謝が仲介する脳病変制御および修復機構の解明

上住 円,（代表）117 万円

科学研究費補助金（若手研究(B)）

骨格筋幹細胞（筋衛生細胞）の維持機構解明によるサルコペニアの原因究明

3. 財団、その他

国立精神・神経疾患医療研究センター

橋本有弘（分担）250 万円

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