

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 9 月 7 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10426

研究課題名(和文) 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

研究課題名(英文) The study of aging muscle satellite cell in humans

研究代表者

橋本 有弘 (HASHIMOTO, Naohiro)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・部長

研究者番号：00208456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋には筋サテライト細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、筋機能の維持に貢献している。ヒト筋サテライト細胞の加齢に伴う性質変化を明らかにするため、様々な年齢の被験者のヒト筋サテライト細胞に由来する不死化筋細胞を樹立した。細胞増殖および筋分化能を比較検討したところ、個人差を超えるほどの年齢差による差異は認められず、80歳以上の骨格筋組織も、高い増殖分化能を持った筋幹細胞を含んでいることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The regenerative capacity of skeletal muscle relies largely on the presence of muscle stem cells, called muscle satellite cells. The capacity for proliferation and/or differentiation of muscle satellite cells is assumed to decline in elderly persons because the regenerative capacity of muscle decreases during aging. To reveal the age-dependent changes of muscle satellite cells, we have established immortalized human myogenic cell lines derived from muscle satellite cells of young and elderly persons. Immortalized human myogenic cells preserved high capacity for proliferation and/or differentiation independently of the age. The results suggest that the muscle of elderly persons still reserves functional muscle stem cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア 筋分化 老化 筋細胞 不死化 酸化ストレス 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

高齢者における生理的な活力低下を「フレイル」と呼び、加齢にともなって生じる筋疾患サルコペニアの前段階であるとする概念が提唱された。サルコペニアおよびフレイルには、骨格筋幹細胞の機能低下が深く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。しかし、実験解析に制約があるため、ヒト筋幹細胞の性質については説明が進んでいない。申請者は、ヒト筋幹細胞の性質を解明するために、成人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増殖させること(不死化)に成功し、ヒト筋細胞の特性を解明する解析系を開発した。

2. 研究の目的

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。申請者は、高齢者骨格筋から筋幹細胞を分離し、その子孫である未分化筋細胞を不死化することに成功した。本研究の目的は、高齢者筋幹細胞の性質を解明し、フレイルおよびサルコペニア(筋量減少症)に対する予防・治療法開発のために必要な細胞レベルの研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

申請者が独自に開発した不死化法(Shiomi, et al., 2011)によって樹立した不死化ヒト未分化筋細胞(Nagata, et al, 2017)の特性を培養

下で解析した。

4. 研究成果

(1)若齢成人由来未分化筋細胞の増殖・分化を制御する因子

成人由来未分化筋細胞は、増殖培地 pmGM 中での細胞増殖には、培地添加物 Ultrosor G が必須であることが、明らかになった。グルココルチコイド受容体アンタゴニストを添加すると pmGM 中での細胞増殖は著しく抑制された。培地添加物 Ultrosor G の増殖促進作用は、bFGF, HGF, IGF-1 およびグルココルチコイドによって代替可能であることが示されたが、この4因子の中でもグルココルチコイドがヒト未分化筋細胞の増殖に必須の因子であることが明らかになった。

(2) 若齢成人由来未分化筋細胞のストレス刺激に対する細胞応答

成人由来未分化筋細胞に、高濃度の過酸化水素(0.5-1.0mM)を負荷すると細胞死が誘導された。しかし、軽微な酸化ストレス(50 μ M 過酸化水素、2時間)に曝されると、細胞は細胞周期を G1 で停止し、S 期には入らなかった。この G1 期で停止した細胞を bFGF とグルココルチコイドで刺激すると増殖停止は解除され、DNA 合成を再開した。

(3) 高齢者由来未分化筋細胞の増殖・分化能の解析

細胞増殖に関する成長因子要求性

我々は、先行研究において、健常成人(23

歳女性及び42歳女性)骨格筋由来の不死化筋細胞が対数増殖をするためにはグルコルチコイドが必須であることを明らかにした。そこで、加齢に伴って対数増殖に必要な因子に違いが生じるか否か、すなわち細胞の応答性に差異が生じるか否かを検討した。若齢女性(23歳)、高齢女性(82歳および86歳)の正常骨格筋に由来する不死化ヒト未分化筋細胞3株を比較検討したところ、細胞採取時の年齢に係わらず、いずれの細胞も以下のような性質を示した。

対数増殖をするためにはグルコルチコイドが必須である。

bFGF, HGF, IGF-Iは細胞増殖を促進する。

グルコルチコイドおよび成長因子(bFGF, HGF, IGF-I)は、いずれも単独ではほとんど増殖を促進しない。

グルコルチコイドとbFGFの組み合わせで顕著な増殖促進効果を得られる。

グルコルチコイドとbFGFにHGFおよびIGF-Iを追加すると、細胞増殖はさらに促進される傾向を示す。

高齢者由来の不死化筋細胞では、若齢者由来不死化筋細胞に比べ、成長因子要求性が低下し、むしろ細胞増殖が高進していることを示唆する結果も得られたが、実験データのバラツキが大きく、高齢者由来筋細胞の環境要因に対する脆弱性を反映している可能性が考えられる。

(4) ヒト筋細胞とマウス筋細胞におけるス

トレス応答の比較解析

マウス筋前駆細胞は、酸化ストレスに曝されると、G1期で分裂を停止せず、細胞分裂に異常を生じて死滅することが明らかになった。マウス未分化筋細胞のストレス応答は、ヒト未分化筋細胞とは大きく異なっており、動物実験の結果を安易にヒトに外挿することの危険性が示唆された。

<引用文献>

Shiomi, K., T. Kiyono, K. Okamura, M.

Uezumi, Y. Goto, S. Yasumoto, S.

Shimizu and N. Hashimoto (2011).

"CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential." Gene Ther **18**(9): 857-866."10.1038/gt.2011.44.

Nagata, Y., T. Kiyono, K. Okamura, Y. I.

Goto, M. Matsuo, M. Ikemoto-Uezumi and N. Hashimoto (2017). "Interleukin-

1beta (IL-1beta)-induced Notch ligand Jagged1 suppresses mitogenic action of

IL-1beta on human dystrophic myogenic cells." PLoS One **12**(12):

e0188821."10.1371/journal.pone.0188821.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)すべて査読あり。

Kawada, S., A. Harada and N. Hashimoto

(2017). "Impairment of cold injury-induced muscle regeneration in mice receiving a combination of bone fracture and alendronate treatment." PloS One **12**(7): e0181457."10.1371/journal.pone.0181457.

Nagata, Y., T. Kiyono, K. Okamura, Y. I. Goto, M. Matsuo, M. Ikemoto-Uezumi and N. Hashimoto (2017). "Interleukin-1beta (IL-1beta)-induced Notch ligand Jagged1 suppresses mitogenic action of IL-1beta on human dystrophic myogenic cells." PLoS One **12**(12): e0188821."10.1371/journal.pone.0188821.

Shinohara, M., Y. Sumino, F. Sato, T. Kiyono, N. Hashimoto and H. Mimata (2017). "Tumor necrosis factor-alpha inhibits differentiation of myogenic cells in human urethral rhabdosphincter." Int J Urol **24**(6): 461-467."10.1111/iju.13330.

[学会発表](計5件)

橋本 有弘、上住 円

ヒト骨格筋の特性解明：細胞レベルおよび組織レベルの解析
日本筋学会第3回学術集会、2017年8月4日 東京

橋本 有弘

ヒト筋サテライト細胞の性質解明をめざして-不死化ヒト筋前駆細胞を用いた解析
日本筋学会第2回学術集会、シンポジウム、2016年8月6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、東京

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

[その他]

<http://www.ncgg.go.jp/research/organization/saiseisaiken.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 有弘 (HASHIMOTO, Naohiro)

国立研究開発法人 国立長寿医療研究センタ

ー・再生再建医学研究部・部長

研究者番号：00208456