

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19380167

研究課題名 (和文) 間葉系幹細胞の分化制御を介した成長ホルモンによる生体恒常性維持機能の解明

研究課題名 (英文) Regulation of mesenchymal stem cell differentiation by growth hormone

研究代表者

山内 啓太郎 (YAMANOUCI KEITARO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：70272440

研究成果の概要 (和文) : 加齢による成長ホルモンの分泌低下は骨格筋量の減少や骨量の減少を招く。本研究課題により、骨格筋や骨髄に存在する間葉系幹細胞の筋細胞や骨細胞への分化能は成長ホルモンにより維持されており、成長ホルモンの分泌低下がこれら間葉系幹細胞の筋分化能や骨分化能の低下を引き起こし、その結果、骨格筋量や骨量の減少を引き起こす可能性を明示することが出来た。

研究成果の概要 (英文) : Age-related decline in growth hormone (GH) secretion results in the loss of skeletal muscle (sarcopenia) and bone mass (osteopenia). The specific aim of the present research was to test, using human GH-transgenic rats whose GH secretion is severely suppressed, whether sarcopenia and osteopenia caused by lowered secretion/action of GH is related to the decrease in the differentiation potential of mesenchymal stem cells (MSC) in skeletal muscle and bone. The results obtained clearly indicated that GH plays a role in the maintenance of MSC function both in skeletal muscle and bone.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 5,700,000 | 1,710,000 | 7,410,000 |
| 2008 年度 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |
| 2009 年度 | 4,000,000 | 1,200,000 | 5,200,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：成長ホルモン、間葉系幹細胞、脂肪細胞、筋衛星細胞、骨芽細胞、骨髄、分化、骨

1. 研究開始当初の背景

(1) 成熟個体における成長ホルモン

成熟した個体で分泌される成長ホルモン (GH) は、タンパク質同化作用や脂肪分解作用を通じて、体構成バランスや代謝能など個

体の恒常性維持を担う。GH 分泌は加齢とともに低下し、これが骨格筋量や骨量の減少、肥満などの大きな発症要因の一つとされている。我々が 1996 年に作出したヒト GH 遺伝子導入トランスジェニックラット (hGH-TG

ラット) (Ikeda et al. Endocrinology 1996) は、導入遺伝子のコピー数が比較的少ないためにヒト GH の分泌は低く維持され、同時に内因性のラット GH の分泌はほぼ完全に抑制されている。このラットは、体成長は正常であるものの、骨格筋量や骨量の減少 (Yamanouchi et al. Exp Gerontol 2004)、肥満といった加齢時にみられる典型的な症状を呈することから、成熟後の個体における GH の役割を解明する上で有用な GH 分泌低下モデルである。

(2) 間葉系幹細胞のもつ生体恒常性維持機能と多分化能

成熟個体のさまざまな組織には、組織特異的幹細胞が存在し、当該組織の修復や生体恒常性の維持を担う。特に骨格筋や骨 (骨髄) には間葉系幹細胞とよばれる細胞が存在し、通常、骨格筋内では筋芽細胞に、骨髄内では骨芽細胞へとそれぞれ分化することにより骨格筋量や骨量を維持している。一方、間葉系幹細胞は多分化能をもつことが示されている。例えば、骨髄由来の間葉系幹細胞は、骨芽細胞以外にも脂肪細胞や筋細胞へと分化できる。また、骨格筋由来の間葉系幹細胞 (筋衛星細胞) も脂肪細胞や骨芽細胞への分化能をもつことが、我々を含む複数のグループにより示されている (Yamanouchi et al. Exp Cell Res 2006; Yada et al. J Vet Med Sci 2006)。

(3) 成長ホルモンによる間葉系幹細胞分化制御機構が存在する可能性

加齢による骨格筋量や骨量の減少と相まって、骨格筋内や骨髄内には脂肪細胞が出現する。これは、通常筋芽細胞や骨芽細胞へと分化する間葉系幹細胞が、脂肪細胞へと分化することによる。このとき GH を投与することにより、骨格筋量や骨量が回復し、同時にこれら組織内での脂肪細胞が減少することから、間葉系幹細胞の分化制御に GH が深く関与していることが推察されるがその制御機構は不明である。

一般に幹細胞の分化制御には細胞周囲の環境を形成する細胞成長因子や細胞外マトリクスが主要な役割を担うとされている。GH は、これまでタンパク質同化作用や脂肪分解作用をもついわゆる内分泌因子 (ホルモン) として位置づけられてきたが、インスリン様成長因子をはじめとする様々な細胞成長因子や細胞外マトリクスの発現調節作用をもつ。従って、GH は骨髄や骨格筋内で細胞周囲の局所環境を形成するような因子の発現調節を介して間葉系幹細胞の分化制御に深く関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

以上の背景から GH には間葉系幹細胞の分

化制御因子としての新たな作用があり、骨髄や骨格筋内で細胞周囲の局所環境を形成する因子の発現調節を通じて間葉系幹細胞がもつ生体恒常性維持機能の発現に貢献するのではないかという着想に至った。本研究ではこの着想に基づき、hGH-TG ラットを利用して GH が骨格筋内や骨髄内の間葉系幹細胞の分化を制御する機構を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) hGH-TG ラットの骨格筋・骨の組織学的解析

正常ラットと hGH-TG ラットの骨格筋・骨 (骨髄) の詳細な組織学的解析を月齢毎に行った。骨格筋については重量を測定すると共に、凍結切片を作成し、HE 染色を行った後に個々の筋線維径を測定した。一方、骨についてはパラフィン切片を作成し、HE 染色を行った後に骨髄内の海綿骨面積・脂肪細胞数を測定した。解析の対象とする骨格筋・骨については、採取のしやすさやこれまでに蓄積した実験結果から、前脛骨筋・大腿骨をそれぞれ用いた。

(2) hGH-TG ラット間葉系幹細胞の分化能の解析

hGH-TG ラットの骨格筋・骨髄より間葉系幹細胞を単離し、*in vitro* で各種細胞 (骨細胞、筋細胞、脂肪細胞) への分化誘導を行い、正常ラット由来の細胞と比較して分化能に違いが見られるか否かについて検討した。骨格筋からの間葉系幹細胞 (筋衛星細胞) の単離はプロナーゼを用いた酵素処理により、骨髄からの間葉系幹細胞の分離はディッシュへの付着性を利用した方法によりそれぞれ行った。筋細胞への分化誘導は低血清培地を、脂肪細胞への分化誘導はインスリン、IBMX、デキサメタゾン、トログリタゾン添加培地を、骨細胞への分化誘導はアスコルビン酸、グリセロールリン酸、デキサメタゾン添加培地を、それぞれ用いた。分化能評価のための各種細胞マーカーとしては、アルカリホスファターゼ染色や Runx2 発現 (骨分化)、オイルレッド染色 (脂肪分化)、筋管形成や MyoD 発現 (筋分化) などを用いた。なお、一部の実験では骨形成タンパク質 (BMP-2) 添加の有無による骨分化能の違いについても検討を加えた。また、BMP-2 に対する反応性の指標として Smad1/5/8 のリン酸化の状態をウェスタンブロットにより調べた。

(3) hGH-TG ラットに対する外生的 GH 投与の効果

hGH-TG ラットに外生的に GH を投与し、骨髄内の海綿骨面積・脂肪細胞数や間葉系幹細胞の *in vitro* での分化能が正常に回復するか否かについて検討を行った。その際、BMP-2

に対する反応性についても調べた。

4. 研究成果

(1) hGH-TG ラット骨格筋の組織学的解析および間葉系幹細胞（筋衛星細胞）の分化能解析

hGH-TG ラット前脛骨筋、長指伸筋、ヒラメ筋の重量は正常ラットに比較して3ヶ月齢以降有意に低値を示し、3ヶ月以降は骨格筋の発達がほとんど見られないことが判明した。一方、前脛骨筋の筋線維数はhGH-TG ラット、正常ラット間で違いはみられず、hGH-TG ラットでは筋線維径が正常ラットに比べて細くなっていることがわかった。興味深いことに、hGH-TG ラットでは月齢が進むにつれ、一部の筋線維径が減少していた。以上のことから、hGH-TG ラットにみられる骨格筋の発達不全は、筋線維の肥大が生じないことに加え、筋線維の萎縮が同時に伴っていることが明らかとなった。

骨格筋量の維持は同化作用と異化作用のバランスに依存する。異化作用としては筋線維核のアポトーシスや骨格筋タンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼ（MuRF1/MAFbx）の発現亢進などがあげられる。hGH-TG ラット骨格筋の発達不全にこれらの異化作用の亢進が関与している可能性を考え、骨格筋における活性型カスパーゼ3やMuRF1/MAFbxの発現を調べたが、正常ラットとの間に違いはみられなかった。このことから、hGH-TG ラット骨格筋の発達不全は異化作用の亢進よりもむしろ、同化作用の低下によるものであることが示唆された。

骨格筋内に存在する筋衛星細胞は、筋分化能をもち、筋線維に融合することで肥大を招く。これは一種の同化作用の一つである。また、近年、筋衛星細胞はある種の条件下では筋分化能が低下し、脂肪分化能を呈することも明らかとなっている。hGH-TG ラットでは筋衛星細胞の筋分化能が低下している可能性を考え、正常ラット由来のものと比較した。その結果、hGH-TG ラット筋衛星細胞のMyoD発現や筋管細胞形成能は正常ラットのものに比べて低下している一方、その脂肪分化能は亢進していた。このことから、hGH-TG ラット骨格筋における同化作用低下の一部は筋衛星細胞の筋分化能が失われ、脂肪分化能が亢進したことによるものであることが判明した。

(2) hGH-TG ラット骨の組織学的解析および間葉系幹細胞の分化能解析

hGH-TG ラット大腿骨骨髄内の海綿骨面積は正常ラットに比較して8週齢以降有意に低値を示した。一方、hGH-TG ラット大腿骨骨髄内の脂肪細胞数は正常ラットに比較して8週齢以降有意に増加していた。このことから

hGH-TG ラットでは正常ラットに比較して骨量（骨密度）の低下が生じていることが明らかとなった。

骨髄内には間葉系幹細胞が存在し、骨分化能・脂肪分化能を示す。hGH-TG ラットにみられた骨髄内海綿骨面積の減少と脂肪細胞数の増加が、間葉系幹細胞の分化能の変化により生じている可能性を考え、hGH-TG ラット、正常ラット骨髄に由来する間葉系幹細胞の分化能を *in vitro* で調べた。その結果、hGH-TG ラット間葉系幹細胞の骨分化能は正常ラットに比べ8週齢以降で低下している一方、脂肪分化能は亢進していた。また、BMP-2存在下における骨分化を調べたところ、hGH-TG ラット間葉系幹細胞ではBMP-2に対する反応性がほぼ消失しており、Smad1/5/8のリン酸化も見られないことが判明した。このことからhGH-TG ラットでは間葉系幹細胞のBMP-2に対する反応性が消失し、それが骨分化能の低下を招き、骨量の減少が生じているものと推察された。

(3) hGH-TG ラットに対する外生的GH投与が骨量、骨髄内間葉系幹細胞の分化能に与える効果

hGH-TG ラットにみられる骨量の減少や間葉系幹細胞の分化能の変化が外生的GHの投与により正常ラットのものに近づくか否かについて検討を行った。通常、ラットではGHは約3時間おきにパルス状の分泌パターンを示す。そこで外生的にGHを6時間おきに2週間連続投与したのちのhGHラットの骨量や間葉系幹細胞の分化能について調べた。その結果、hGH-TG ラット骨髄内の海綿骨面積、脂肪細胞数はともに、正常ラットと同程度になった。一方、間葉系幹細胞の脂肪分化能はGH投与により低下したものの、骨分化能の回復はみられなかった。

(4) 得られた研究成果の位置づけと今後の展望

再生医療の分野では、骨髄や筋肉に存在する間葉系幹細胞の多分化能を利用し、これを *in vitro* で目的の細胞へと分化誘導する試みがなされている。一方、幹細胞の機能は加齢とともに減少することが知られており、これが間葉系幹細胞を再生医療へ応用する際の解決すべき課題の一つとなっている。近年、幹細胞の機能制御に関わる血中循環因子の重要性が再認識されつつある。従って、幹細胞の本来もつ生体恒常性維持機能に着目し、GHのような内分泌因子がどのように関与しているか、という視点から研究を行う本課題はまさに時機を得たものであった。

現在、生活水準の向上による飛躍的な寿命延長の一方、骨格筋減弱症や骨粗鬆症の増加が問題となっている。これは伴侶動物の寿命が延長している獣医学分野でも同様で、筋量

低下は運動性の低下を招き、老齢動物では骨折後の治癒が遅延する。ヒトの医学分野では老化に伴う諸症状の改善や是正を目的とした GH 補充療法が注目されているが、長期にわたる連続投与や大量投与による副作用に対する懸念については未だ検討の余地が残されている。本研究結果は、ヒトにおける GH 補充療法に代わる新たな方法論開発、老齢伴侶動物の QOL の向上など社会的にも大きな波及効果が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

- ① Shibata S, Ueno C, Ito T, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M. Skeletal muscle growth defect in human growth hormone transgenic rat is accompanied by phenotypic changes in progenitor cells. *AGE* 32: 239-253 (2010) 査読有
- ② Yamada M, Tatsumi R, Yamanouchi K, Hosoyama Y, Shiratsuchi S, Sato A, Mizunoya W, Ikeuchi Y, Furuse M, Allen RE. High concentrations of HGF inhibit skeletal muscle satellite cell proliferation in vitro by inducing expression of myostatin: a possible mechanism for re-establishing satellite cell quiescence in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 298: C465-476 (2010) 査読有
- ③ Hosoyama T, Ishiguro N, Yamanouchi K, Nishihara M. Degenerative muscle fiber accelerates adipogenesis of intramuscular cells via RhoA signaling pathway. *Differentiation* 77: 350-359 (2009) 査読有
- ④ Yamanouchi K, Hosoyama T, Murakami Y, Nakano SI, Nishihara M. Satellite cell differentiation in goat skeletal muscle single fiber culture. *J Reprod Dev* 55: 252-255 (2009) 査読有
- ⑤ Ban A, Yamanouchi K, Matsuwaki T, Nishihara M. In vivo gene transfer of PPAR γ is insufficient to induce adipogenesis in skeletal muscle. *J Vet Med Sci* 70: 761-767 (2008) 査読有
- ⑥ Yamanouchi K, Hosoyama T, Murakami Y, Nishihara M. Myogenic and adipogenic properties of goat skeletal muscle stem cells. *J Reprod Dev* 53: 51-58 (2007) 査読有
- ⑦ Yamanouchi K, Ban A, Shibata S, Hosoyama T, Murakami Y, Nishihara M. Both PPAR γ and C/EBP α are sufficient to induce transdifferentiation of goat fetal myoblasts to adipocytes. *J Reprod Dev* 53: 563-572 (2007) 査読有
- ⑧ Yamanouchi K, Yada E, Ishiguro N,

Nishihara M. 18 α -glycyrrhetic acid induces phenotypic changes of skeletal muscle cells to enter adipogenesis. *Cell Physiol Biochem* 20: 781-790 (2007) 査読有

〔学会発表〕 (計 35 件)

- ① 藤井崇博、中野真一、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
骨量低下を示す成長ホルモン (GH) 分泌低下モデルラットに対する GH 投与の効果
第 149 回 日本獣医学会 2010 年 3 月 26 日 東京
- ② 藤井崇博、村上要介、松脇貴志、山内啓太郎、西原真杉
成長ホルモン分泌低下モデルラットにおける骨量低下メカニズムの解析
第 148 回 日本獣医学会 2009 年 9 月 25 日 鳥取
- ③ 山内啓太郎
骨格筋前駆細胞/幹細胞の脂肪分化
第 17 回 日本運動生理学会 2009 年 7 月 26 日 東京
- ④ 藤井崇博、山内啓太郎、松脇貴志、西原真杉
成長ホルモン分泌低下症モデルラットを用いた成長ホルモンによる骨髄間質細胞の分化制御機構の解明
第 27 回 日本骨代謝学会 2009 年 7 月 25 日 大阪
- ⑤ 村上要介、矢田英理香、細山徹、山内啓太郎、西原真杉
骨格筋由来高脂肪分化細胞クローンの樹立と筋・脂肪分化能の解析
第 108 回 日本畜産学会 2007 年 9 月 26 日 岡山
- ⑥ Yamanouchi K
Adipogenic differentiation of skeletal muscle progenitor/stem cells.
University of Wisconsin-Madison, 2007, July 21, Madison WI, USA
- ⑦ Hosoyama T, Ishiguro N, Murakami Y, Yamanouchi K, Nishihara M
Skeletal muscle fibers affect lineage specification of satellite cells through RhoA signaling pathway.
FASEB summer research conference "Skeletal Muscle and Stem Cells", 2007, July 18, Indian Wells CA, USA
- ⑧ Murakami Y, Yada E, Hosoyama T, Yamanouchi K, Nishihara M
Cloning and characterization of highly adipogenic cells derived from rat skeletal muscle.
FASEB summer research conference "Skeletal Muscle and Stem Cells", 2007, July 15, Indian Wells CA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 啓太郎 (YAMAOUCHI KEITARO)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：70272440

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田中 智 (TANAKA SATOSHI)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：90242164