

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11710

研究課題名(和文) 高品質な培養ヒト筋細胞を用いたサルコペニアの予防・治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a method for the prevention and treatment of sarcopenia using high-quality cultured human muscle cells.

研究代表者

周 赫英 (Zhou, Heying)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：50750080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの筋衛星細胞を用いてIn vitroで筋管細胞を作成し、280種類の天然由来生理活性物質を筋管細胞に直接作用させた結果、筋肥大効果のある化合物35種類を見出した。これらの化合物は今後サルコペニアに対する予防・治療に有効な物質であると期待される。また、細胞表面マーカーCD82発現は筋衛星細胞の筋管形成能力を反映することを確認し、CD82陽性細胞をさらに細分画することで高品質なヒト筋衛星細胞を濃縮することが可能になる。免疫不全筋ジストロフィーマウスに移植をしたところ、CD82高発現細胞を移植したマウス骨格筋にヒト由来の筋線維が、CD82低発現細胞を移植した骨格筋より多く再生された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は運動や身体活動を司る組織であり、その機能低下はQOLやADLの低下に直結する。健康長寿を実現するためにはサルコペニアの予防・治療が極めて重要となる。天然由来栄養素をヒト骨格筋細胞に直接作用させ、35種類の筋肥大効果がある化合物を特定し、これらの物質を用いて今後ヒトに適用される予防・治療法開発に研究を進める。

また、骨格筋の優れた再生能力を利用し、より高品質なヒト筋幹細胞を濃縮し、in vitroおよび生体内での骨格筋再生に対する効果を検証した。ヒト筋幹細胞の品質を反映する細胞表面マーカーを指標に高品質な幹細胞を濃縮することで、高効率な細胞移植治療の実現につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：We generated myotubular cells in vitro using human myosatellite cells, and directly applied 280 naturally occurring bioactive compounds to the myotubular cells. As a result, we found 35 compounds with muscle hypertrophic effects. These 35 compounds are highly expected to be effective substances for prevention and treatment of sarcopenia in the future.

In addition, we confirmed that the cell surface marker CD82 expression reflects the myotube-forming ability of muscle satellite cells. Taking advantage of this feature, they were able to enrich high-quality human muscle satellite cells by further fractionating CD82-positive cells. When transplanted into immunodeficient muscular dystrophy mice, more human-derived myofibers (human-specific spectrin-positive myofibers) were regenerated in the skeletal muscles of mice transplanted with CD82 high-expressing cells than in those transplanted with CD82 low-expressing cells.

研究分野：骨格筋

キーワード：筋再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

健康寿命を延伸するため、日常的な身体活動を担う骨格筋が鍵を握っている。加齢に伴い筋肉量の減少や筋機能の低下はサルコペニアと呼ばれ、OOL や ADL の低下に直結し、死亡や要介護化のリスクが高まる。超高齢社会を迎えた日本国において、健康長寿を実現するためには筋萎縮の抑制、筋量・筋機能回復は一つ大きな課題となっている。そのため、サルコペニアに対する有効な予防・治療法の開発は国民の健康の維持・増進のために極めて重要である。サルコペニアの要因の一つは栄養不足である。高齢者における低栄養によって、低体重、サルコペニアが顕在化してくる。臨床への早期展開および高齢者への早期適用の観点から、サルコペニアの予防・治療には栄養素などの天然由来成分の効果に期待している。栄養素による筋肥大・抗萎縮効果を観察するには、株化細胞や動物細胞はヒト細胞と生理活性物質に対する応答性や有効濃度が異なるため、ヒト細胞を用いる研究が求められる。

一方、骨格筋は優れた再生能力を有してある。基底膜と筋細胞膜の間に、通常静止状態の筋衛星細胞と呼ばれる筋幹細胞が局在し、損傷が生じると活性化され、増殖、分化、融合を経て新しい筋線維を形成することで骨格筋を再生する。加齢によるサルコペニアの病態においては、筋衛星細胞数の減少や機能の低下がみられる。骨格筋に再生する方法として、細胞移植治療が期待されている。細胞レベルで十分な筋分化能力を持つ、純化された筋衛星細胞（もしくは筋芽細胞）を体内に移植することで、骨格筋に関する細胞移植医療の実現につながると期待する。

2. 研究の目的

本研究は、ヒトに適用されるサルコペニアに対して効果的な予防・治療法の開発を目指している。ヒトの筋衛星細胞を用いて筋管細胞を作製し、天然由来生理活性物質の筋肥大効果または抗萎縮効果を検証し、サルコペニアに対する予防・治療に有効な物質を見出す。

同時に、骨格筋の優れた再生能力を利用し、ヒト由来の筋幹細胞を移植再生医療への応用も視野に、ヒト筋幹細胞の質に比例した発現をする細胞表面マーカーCD82を用いて、より高品質なヒト筋幹細胞を濃縮する方法の開発も試みる。

3. 研究の方法

①高品質ヒト筋衛星細胞の確定

ヒト骨格筋から筋幹細胞を単離、培養する技術は既に確立され、in vitro で筋管細胞に分化誘導することは可能である。倫理委員会承認の下で提供を受けたヒト骨格筋から細胞を増幅培養する。セルソーターを用いて、ヒト筋衛星細胞に特異的なマーカーであるCD56とCD82に対する抗体染色を行い、細胞を純化・分取する。品質管理(これらの細胞を増殖させ、分化誘導し、分化能の評価を行った後)を経て、品質が保証された筋衛星細胞を研究に供する。

②筋肥大応答の確認および高品質ヒト筋管細胞を用いた天然生理活性物質ライブラリーのスクリーニング

上記の高品質株を増殖、筋管細胞へ分化誘導し、形成された筋管細胞に、まず既知の筋肥大作用を有する薬剤を作用させ、筋肥大効果を確認する。その後、ヒト筋管細胞を96-wellプレートで培養し、食品成分を含む280種類の天然由来生理活性物質を添加し、3日間直接作用させる。ミオシン重鎖の免疫蛍光染色を行い、筋管細胞の面積をハイスループットイメージングシステムで定量し、化合物による筋肥大効果を評価する。

③細胞表面マーカーCD82の遺伝子発現レベルにより、ヒト筋衛星細胞の分化能を確認する。さらにFACSを用いて、CD82高発現のロットを、CD82発現に応じて、高発現分画と低発現分画に更に分離し、高品質なヒト骨格筋幹細胞を濃縮する。これらの細胞を継代培養観察し、継代培養によるCD82遺伝子発現の変化と分化能との関連性を調べる。

④In vitroにおいてCD82遺伝子機能と筋分化能との関連性を検討するため、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト筋衛星細胞においてのCD82遺伝子過剰発現を行う。レンチウイルスベクターにヒトCD82遺伝子を導入し、ヒト細胞にそのCD82遺伝子強制発現したレンチウイルスを感染させる。感染した細胞を単離し、CD82遺伝子強制発現による筋分化関連遺伝子の変化、細胞増殖および分化能への影響を解析する。

⑤CD82遺伝子発現レベルと筋分化能との関連性を生体内で検証する。CD82発現レベルの異なるヒト筋衛星細胞由来の筋芽細胞を、免疫不全筋ジストロフィーマウスの骨格筋に移植し、ヒト特異的ラミン、ヒト特異的スペクトリン抗体免疫染色を行い、CD82シグナルの強弱による筋再生能力の相違を検討する。

4. 研究成果

①栄養素をヒト筋細胞に直接作用し、筋管細胞の面積を比較検討した結果、筋肥大効果がある 35 種類の天然物由来化合物を特定した (表 1)。中には、筋管を肥大させた作用を持つ物質だけではなく、筋管の数を増加させた効果を持つ物質も含まれた (図 1)。

Area - pixel	Nuc count in Myotube	CHEM_NAME
15015922	3727.5	Demecolcine
14003026	2906.5	Luteolin
13841601	3693.5	Colchicine
13490701	2355.5	1alpha 25-Dihydroxyvitamin D3
13439689.5	2866.5	Pristimerin
12240196.5	2791.5	Podophyllotoxin
11539809.5	2185.5	20-Hydroxyecdysone
11094731	1929	ACACETIN
10478573	1913	Dihydromyricetin
10443211	1977	Psoralen
10409873	1879	APIGENIN
10115174.5	2098.5	Auraptene
9892549	1843	(-)-Arctigenin
9813204.5	2146.5	Ergosterol
9779065	1933.5	GLYCERYL LAURATE
9661883.5	1956.5	Lupeol
9646572	1889	STREPTOZOTOCIN
9603446	1939.5	D-alpha-Tocopherol succinate
9565810	2233.5	Maslinic
9520936	2196.5	Ellagic
9494582	1471	Hypericin
9455081	1796.5	Esculin hydrate
9438484	1951	L-THEANINE
9426839	2087.5	Forskolin
9384429	2213.5	Kinetin
9349154.5	2036.5	Ergocalciferol
9334259.5	1782	Papaverine hydrochloride
9183043.5	1723.5	Fusidic acid sodium salt
9182007.5	2070	Resveratrol
9166545.5	1829.5	Cyclopiazonic acid
9162537.5	2190	Rosmarinic
9144145	2011.5	Hesperidin
8957506.5	2048	Chrysin

8917997	1986.5	Melatonin
8750245.5	1963.5	Shikonin
8705504.5	1986	(+/-)-Catechin
8465154.5	1994.5	(-)-Epicatechin
8401179	1813.5	Caffeine
6292013.6	1179.4	Negative Control (SR1-DMEM)
8063282.9	1374.5	Positive Control Clenbuterol; 10uM

表1. 筋肥大効果が確認された化合物リスト

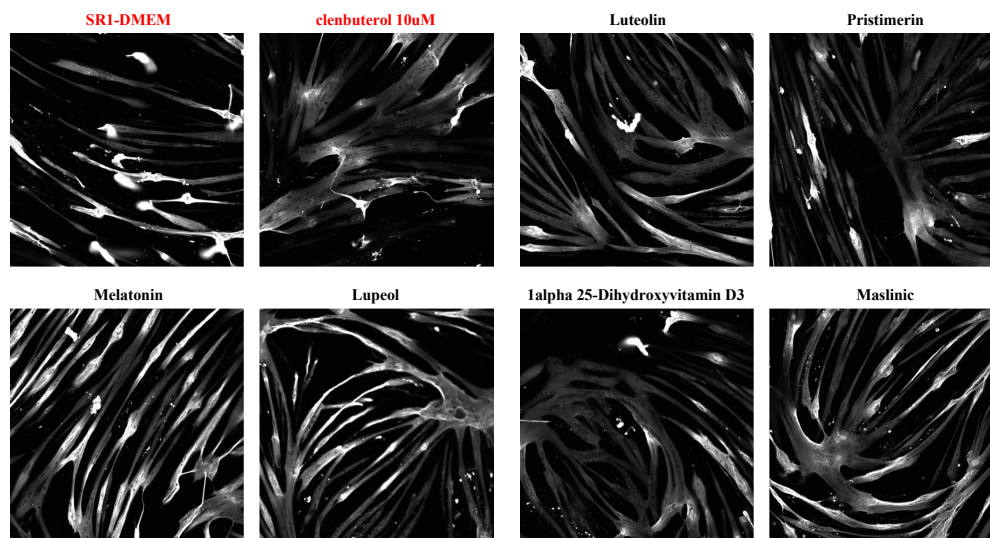


図1. 化合物添加により筋肥大効果 (一部データ)

②CD82 遺伝子発現は幹細胞性の指標である Pax7 の発現レベルとよく相関する(図2)。CD82 高発現細胞の分化がよく、巨大な筋管細胞が形成され、CD82 の発現は筋形成能を反映する。CD82 の発現が元々高い高品質ロットを、CD82 の発現レベルに応じて高発現分画と低発現分画にさらに分離したところ、高発現分画で Pax7、MyoG 遺伝子の発現がより高く、分化能も高かったことが確認された。

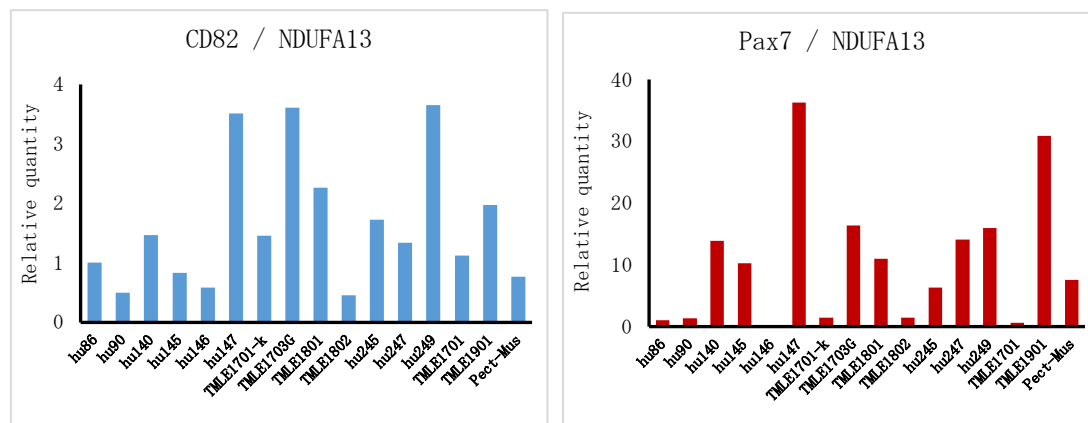


図2. 異なる分化能を持つヒト筋衛星細胞における CD82、Pax7 遺伝子発現。

CD82 高発現分画細胞を分離し、継代培養したところ、高発現分画細胞は一定の割合で維持されたが、低発現へと転ずる細胞が出現した。一方、CD82 低発現分画細胞を継代培養しても、高発現分画が出現することはなかった。CD82 の発現は継代培養を重ねると不可逆的に低下するが、継代培養による幹細胞の品質低下を反映している(図3)。

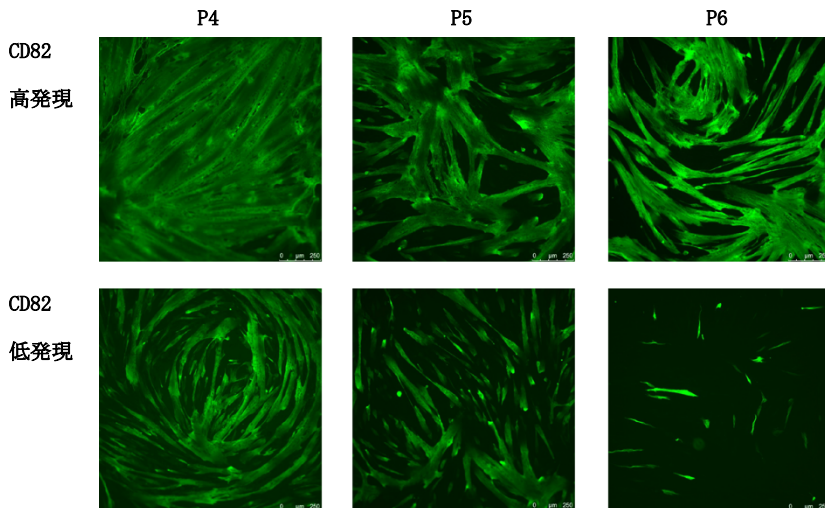


図3. CD82 高発現分画細胞と低発現分画細胞を継代培養した筋管写真

③CD82 遺伝子を約 20 倍過剰発現させたが、Pax7、MyoD 遺伝子発現の連動は認められなかった。一方、CD82 遺伝子強発現細胞における MyoG 遺伝子発現は大きく上昇した。細胞増殖アッセイの結果、CD82 を過剰発現させると、細胞増殖が促進された。また、分化した筋管細胞の面積をハイスループットイメージングシステムで定量比較したところ、CD82 強制発現した細胞から形成された筋管面積はコントロール群と比べ、有意に増加した。

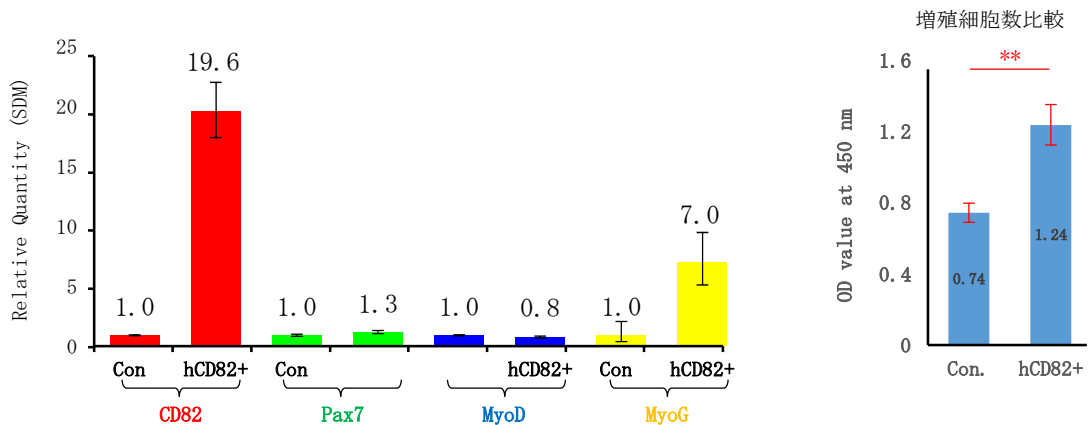


図4. CD82 遺伝子強制発現による筋分化関連遺伝子の発現変化と細胞増殖の違い

④マウス生体内移植の解析結果、CD82 発現が異なるヒト細胞を移植したマウスの筋重量に有意な差はなかった。移植した骨格筋組織を、ヒト特異的ラミン抗体とヒト特異的スペクトリン抗体で免疫染色をした結果、CD82 発現が低いヒト細胞は移植されたマウス骨格筋の間質や筋細胞の外に生着し、筋線維に形成することは殆どなかった。一方、CD82 高発現のヒト筋細胞を移植したマウス骨格筋に、ヒト由来の筋線維は多数確認された (図5)。

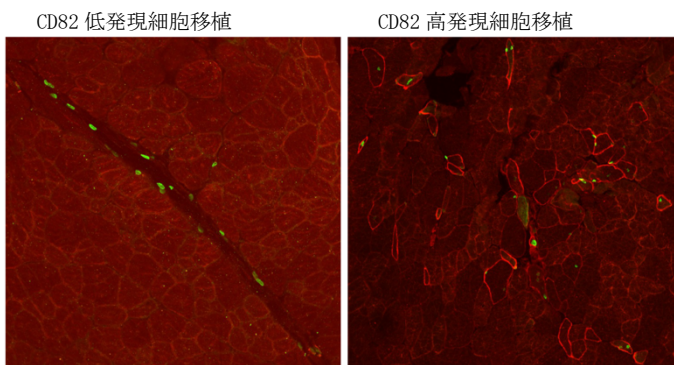


図5. 免疫不全筋ジストロフィーマウス骨格筋中のヒト筋衛星細胞 (緑) とヒト筋線維 (赤)

まとめると、35 種類の筋肥大効果がある栄養素について、今後マウスを用いて生体内での効果と安全性を確認し、ヒトに適用できるよう慎重に検討する必要がある。また、CD82 高発現ヒト筋衛星細胞は増殖能も分化能も優れているが、生体内で形成されたヒト筋線維数は移植された細胞数に比例しないことから、細胞移植治療の実現に向けて、更なる研究が必要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikemoto Uezumi Madoka, Zhou Heying, Kurosawa Tamaki, Yoshimoto Yuki, Toyoda Masashi, Kanazawa Nobuo, Nakazawa Tatsu, Morita Mitsuhiro, Tsuchida Kunihiro, Uezumi Akiyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Increased MFG E8 at neuromuscular junctions is an exacerbating factor for sarcopenia associated denervation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/accel.13536	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uezumi Akiyoshi, Ikemoto-Uezumi Madoka, Zhou Heying, Kurosawa Tamaki, Yoshimoto Yuki, Nakatani Masashi, Hitachi Keisuke, Yamaguchi Hisateru, Wakatsuki Shuji, Araki Toshiyuki, Morita Mitsuhiro, Yamada Harumoto, Toyoda Masashi, Kanazawa Nobuo, Nakazawa Tatsu, Hino Jun, Fukada So-ichiro, Tsuchida Kunihiro	4. 巻 131
2. 論文標題 Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI139617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Madoka Ikemoto-Uezumi, Akiyoshi Uezumi, Lidan Zhang, Heying Zhou, Naohiro Hashimoto, Kikuo Okamura, Yasumoto Matsui, Koji Tsukazaki, Tohru Hosoyama, Masashi Nakatani, Mitsuhiro Morita, Harumoto Yamada, Kunihiro Tsuchida, So-ichiro Fukada	4. 巻 2
2. 論文標題 Reduced expression of calcitonin receptor is closely associated with age-related loss of the muscle stem cell pool.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JSCM Rapid Communications	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/j.2617-1619.2019.tb00012.x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒澤珠希、梶典幸、上住円、周赫英、吉本由紀、湊圭太郎、堀正敏、上住聡芳
2. 発表標題 様々な臓器に存在するPDGFR 陽性間質細胞の比較解析
3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒澤 珠希、梶 典幸、上住 円、周 赫英、湊 圭太郎、上住 聡芳、堀 正敏
2. 発表標題 Muscle specific aging signature of PDGFR ⁺ -positive stromal cells underlies the development of age-related sarcopenia PDGFR ⁺ 陽性間質細胞の臓器特異性から探るサルコペニアのメカニズム
3. 学会等名 第94回日本薬理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 周赫英、上住円、黒澤珠希、豊田雅士、吉本由紀、上住聡芳
2. 発表標題 高品質なヒト骨格筋前駆細胞の濃縮方法
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上住円、周赫英、吉本由紀、黒澤珠希、湊圭太郎、上住聡芳
2. 発表標題 神経筋結合部におけるMFG-E8の蓄積は加齢性脱神経の一因となる
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤珠希、梶典幸、上住円、周赫英、湊圭太郎、堀正敏、上住聡芳
2. 発表標題 PDGFR ⁺ 陽性間質細胞の臓器特異性から探るサルコペニアのメカニズム
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉本由紀、黒澤珠希、周赫英、上住円、外丸祐介、宿南知佐、上住聡芳
2. 発表標題 ScxGFP iPS細胞を用いたin vitro腱・靭帯細胞分化誘導システムの確立
3. 学会等名 第6回日本筋学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒澤 珠希、梶 典幸、上住 円、周 赫英、湊 圭太郎、上住 聡芳、堀 正敏
2. 発表標題 Characteristics of PDGFR positive mesenchymal stromal cells in various tissues 様々な臓器に存在するPDGFR 陽性間質細胞の比較解析
3. 学会等名 第93回日本薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 周赫英、上住円、黒澤珠希、豊田雅士、吉本由紀、上住聡芳
2. 発表標題 ヒト骨格筋由来前駆細胞の品質に関する因子の同定
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上住円、上住聡芳、張礪丹、周赫英、橋下有弘、岡村菊夫、松井康素、塚崎晃士、細山徹、中谷直史、森田充浩、山田治基、土田邦博、深田宗一朗
2. 発表標題 カルシトニン受容体の発現低下は加齢性の骨格筋幹細胞減少に寄与する
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒澤珠希、梶典幸、上住円、周赫英、堀正敏、上住聡芳
2. 発表標題 様々な臓器に存在するPDGFR 陽性間質細胞の比較解析
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p><プレスリリース> 筋間質の間葉系前駆細胞の加齢変化がサルコペニアに寄与する https://www.tmghig.jp/research/release/2020/1120.html</p> <p><プレスリリース> カルシトニン受容体の発現低下は加齢性の骨格筋幹細胞減少に寄与する https://www.tmghig.jp/research/release/2019/0426.html</p>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------