

長寿医療研究委託事業
総括研究報告書

筋再生メカニズムに基づいた高齢者の尿失禁に対する新しい治療法の開発
-横紋筋幹細胞を用いた高齢者の腹圧性尿失禁に対する再生医療の開発-

研究代表者 橋本 有弘 国立長寿医療センター 研究所 再生再建医学研究部長

研究要旨 同意を得た前立腺癌全摘出手術を受ける患者（61歳から70歳）から骨格筋を摘出し、筋幹細胞を分離・培養した。平成20年度に実施した全4例において、筋幹細胞を分離・培養することに成功した。使用する試薬に含まれる動物由来成分の一部を非動物由来成分で代替出来ることが明らかになった。TNF α が外尿道括約筋由来筋幹細胞にアポトーシスを誘導することを見いだした。加齢マウスおよび早期老化症マウスを解析し、横紋筋の加齢変化を病理学的、分子生物学的に検討した。さらに、「自己筋細胞移植治療」の安全性を担保するための手法として copy number variation の有効性について検討した。

研究分担者

橋本 有弘	国立長寿医療センター
岡村 菊夫	国立長寿医療センター
細井 孝之	国立長寿医療センター
宋 時栄	徳島文理大学神経科学研究所
本山 昇	国立長寿医療センター
三股 浩光	大分大学医学部

A. 研究目的

本研究は、「高齢者の尿失禁に対する自己骨格筋幹細胞移植治療」という、新しい再生医療の開発を目的とする。基礎的研究の成果を、高齢者を対象とした臨床研究に発展させるために必要な技術的・制度的基盤を整備することが、当該研究期間内の達成目標である。ヒト筋組織に含まれる再生能維持に関わる因子およびその加齢変化を明らかにし、高齢者に対する筋幹細胞移植治療のための基盤技術を開発するとともに、倫理的裏付けを徹底する制度を整備し、他機関のモデルとなる再生医療システムの構築をめざす。

B. 研究方法

①安全性検定方法の検討

CNV(copy number repeat)の臨床サンプルを用いた解析を外骨症発症における検討を例としておこない、その有効性を検討した。また、筋細胞の代謝に大きく影響を与える液性因子である性ホルモンとその代謝酵素との関連を解析した。

②移植筋細胞の供給源に関する検討

高齢者骨格筋から筋幹細胞を分離・増殖・分化させるための分離・培養条件の安全性を

担保するために、分離・培養に使用する動物由来成分の非動物由来成分への代替を検討した。また、培養による染色体構成変化の有無を核型解析によって検討した。

③筋組織における加齢変化の解析

加齢マウスおよび早期老化症(HGPS)モデルマウスから採取した筋組織を、組織学的および分子生物学的手法を用いて解析し、骨格筋の再生に重要な働きを持つ成長因子、筋萎縮関連因子などの加齢変化を明らかにした。

④外尿道括約筋の特性の解明

前立腺全摘出手術時に尿道組織の摘出を伴う例において、外尿道括約筋由来筋幹細胞を分離し、温度感受性 SV40 large T antigen (T抗原)を導入・発現させ、長寿化した。

(倫理面への配慮)

動物およびヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療センター、徳島文理大学、大分大学の動物実験倫理委員会、生命倫理委員会、生物試料安全委員会の承認を得、規定にしたがって実施する。ヒトからの筋生検に関しては、国立長寿医療センター倫理委員会および大分大学 IRB の承認を受けたうえで、説明と同意に関する所定の手続きを行い、注意深く行う。

C. 結果

1) 安全性検定方法の検討

外骨症患者症例群8例と対照群3例から骨芽細胞の培養が進められた。チップ解析に要するDNA量が確保され、CNVチップによる解析が進行中である。網羅的解析によって口腔

外骨症との有意な関連があるゲノム領域を特定すべく検討中である。

また、性ホルモンとその代謝酵素との関連性については、有意な影響は認められなかった。

2) 移植筋細胞の供給源を確保するための基盤条件の確立

① 高齢者における前立腺全摘出手術時の筋生検実施条件の検討

以下に示す項目 a-e を骨子とする、自己細胞移植治療開発を目的とした研究に適合した説明文書と同意書を作成した。

- a) 前立腺癌のために前立腺全摘除術を受けられる方を対象とする。
- b) 75歳以下で、梅毒、肝炎などの感染症が陰性である方を対象とする。
- c) 手術時に1g程度の腹直筋あるいは錐体筋を切除するが、新たな切り口はできない。
- d) 摘出筋組織は研究目的のみに使用され、被験者に直接的な利益はない。
- e) プライバシー〔個人情報〕に関してはいっさい公表されない(連結可能な匿名化)。

長寿医療センター倫理委員会の承認を受けた後、承諾を得た男性患者からの筋生検を実施した。平成20年4月から平成21年1月までに4例の筋生検を実施した。被験者の年齢は、61歳から75歳、摘出した筋組織重量は約1.0gであった。全ての症例で、筋組織摘出の患者の予後に対する影響は認められず、本摘出法の高い安全性が確認された。

② 初代培養ヒト筋細胞の培養条件の検討

a) 培養液組成の検討

ヒト筋組織由来筋幹細胞の培養液に含まれる、動物由来成長因子を組み換え成長因子に代替しうるか否かを検討した。組み換え成長因子bFGF(10ng/ml)とウシ胎児血清(20%)のみを添加した培地と様々な成長因子および下垂体抽出物を含む培地pmGMを比較した。pmGMあるいは「20%ウシ胎児血清+bFGF」で初代培養を行った場合、いずれの培地を用いても、16-20日の培養(一次培養)後に、約30mgの筋組織から 10^6 細胞が得られた。

b) 細胞培養用ディッシュの検討

I型コラーゲン・コート・ディッシュと非コートディッシュを用いて、初代培養ヒト筋細胞の増殖に対するコーティングの影響を検討した。その結果、一次培養においてはコラーゲン・コート培養皿および非コート培養皿とも、約30mgの筋組織から 10^6 細胞が得ら

れた。

③ 初代培養ヒト筋細胞の核型解析

本研究において分離培養されたヒト筋細胞は、ほぼ全てが正常な染色体構成を保っていることが確かめられた。

3) 筋組織における加齢変化の解明

a) 病理学的解析

加齢マウス筋組織を組織学的に検索した結果、腓腹筋の筋線維の一部に加齢依存的なrimmed vacuoleの形成が認められた。一方、老化マウス筋組織における成長因子、筋萎縮関連因子の加齢変化を検討したところ、加齢に伴って、これらの発現は増大した。さらに、acyl-CoA synthetase 活性を持つlipidosinのKOマウスでは、加齢に伴うrimmed vacuoleの増大が起こりやすくなることが明らかになった。

b) 分子生物学的解析

HGPSモデルマウスにおいては筋量の減少が認められるが、筋萎縮因子であるFOXO転写因子やその標的因子の発現には変化がなかった。

4) 外尿道括約筋の特性の解明

T抗原によって長寿化したヒト外尿道括約筋由来筋細胞にTNF- α を作用させたところ、経時間的および濃度依存性にアポトーシスが誘導された。抗TNF- α 治療薬であるInfliximabやEtanerceptは、濃度依存性にヒト外尿道括約筋衛星細胞におけるTNF- α のアポトーシス誘導を阻害した。

D. 考察

本研究では、以下に示す3つの面から課題の抽出とその解決策の提示を試みてきた。

- ① 制度的基盤の整備
- ② 移植筋細胞供給のための技術基盤の確立
- ③ 宿主筋組織に由来する環境要因の解明
 - a) 加齢変化の解明,
 - b) 尿道括約筋固有の性質解明

高齢者からの移植用筋細胞の調製に関しては、平成20年度に実施した全4例で分離・培養に成功し、移植用筋細胞の供給のために必要な基盤は確立できた。しかし、臨床研究を実現するためには、用いる試薬などについて、高い安全性を担保する必要がある。特に動物由来成分の低減は、大きな課題である。細胞培養液には、多種類の動物由来成長因子が含まれている。これらの代替および低減を図る

ことは、重要な課題である。今回、血清以外の動物由来成長因子（群）を組み換え成長因子 bFGF に置き換えても、一次培養における細胞収量には大きな変化がなかったことは、動物由来成分の低減の可能性を示している。しかし、牛胎児血清と bFGF のみの添加では、従来法に比べて細胞に形態変化が認められること、二次培養での増殖が低下することなどから、さらなる培養液組成の改良が必要であると考えられる。

移植用細胞の安全性に関して、培養下において盛んに細胞分裂を繰り返した後も、ヒト筋細胞の染色体構成が安定に保たれていることが確認された。染色体レベルよりも微細な変異に関しては、他の検出方法が必要であり、CNV 解析は、その有力な候補である。

外尿道括約筋由来筋細胞のアポトーシス機構に関する解析、加齢マウスおよび早期老化症モデルマウス骨格筋に関する解析から、横紋筋組織の加齢に伴う変化が明らかになりつつある。その成果は、自己筋細胞移植治療の効率を向上させるために有効な、移植前後の処置方法の開発につながるものと期待される。

E. 結論

安全性および倫理面に対して十分に配慮したうえで、高齢者から筋組織を摘出し、筋幹細胞の分離・培養を行った。分離・培養方法を改良し、動物由来成分の低減を図った。動物由来成分の完全な代替には至っておらず、今後の課題である。

F. 健康危険情報 特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表（詳細は分担研究報告を参照）

Miyamoto K, Miyamoto T, Kato R, Yoshimura A, Motoyama N, Suda T.

FoxO3a regulates hematopoietic homeostasis through a negative feedback pathway in conditions of stress or aging.

Blood 112: 4485-4493, 2008.

Choo DW, Baek HJ, Motoyama N, Cho KH, Kim HS.

ATM is required for rapid degradation of cyclin D1 in response to gamma-irradiation.

Biochem Biophys Res Commun 378: 847-850, 2009.

2. 学会発表

学会での講演、発表など

橋本有弘 等、7 件；本山昇 等、6 件；三股浩光 等、6 件

（詳細は分担研究報告を参照）

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし。