

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 尿失禁は、認知症や骨粗鬆症などとともに、高齢者の QOL を著しく損なう原因となる。本研究は、「高齢者の腹圧性尿失禁に対する自己骨格筋幹細胞移植治療」の実現を目的とする。治療対象が高齢者であることから、我々は後期高齢者を対象とした筋生検を実施し、後期高齢者骨格筋から増殖能力の高い筋細胞を得ることに成功した。したがって、加齢に伴う筋幹細胞の機能低下は、本治療の制限要因にはならないと考えられる。一方、凍結保存した細胞の核型が不安定になる例が見いだされた。安全性の高い細胞保存法の確立は、早急に解決すべき新たな重要課題である。また、治療対象である高齢者筋組織の特性を明らかにするため、後期高齢者骨格筋の病理組織学的解析および外尿道括約筋の網羅的発現解析を開始した。さらに、創薬の可能性を左右するアッセイ系として重要な「不死化外尿道括約筋細胞」を樹立にするため、基盤となるヒト筋細胞の不死化技術を確認した。以上のように、初年度にあたる平成 21 年度は、「自己骨格筋幹細胞移植治療」開発のために解決すべき課題を明確化し、基盤となる解析系を整備した。

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
本山 昇	国立長寿医療センター
宋 時榮	徳島文理大学神経科学研究所
三股 浩光	大分大学医学部

A. 研究目的

尿失禁は、認知症や骨粗鬆症などとともに、高齢者の QOL を著しく損なう原因となるうえに、介護者の体力的・経済的負担も大きい。本研究は、腹圧性尿失禁に対する将来性の高い治療法である「高齢者の腹圧性尿失禁に対する自己骨格筋幹細胞移植治療」の実現を目的とする。前臨床研究の成果を臨床応用に発展させるため、当該研究期間内に試薬および細胞などの安全性を担保するとともに、再生医療の実施に必要な施設・設備の改良および臨床研究管理体制の整備を行い、国立長寿医療センターに『安全性と効率性を兼ね備えた再生医療の総合的モデルシステム』を構築する。そのうえで「高齢者の腹圧性尿失禁に対する自己骨格筋幹細胞移植治療」の実施をめ

ざす。

B. 研究方法

① 高齢者由来骨格筋幹細胞供給システムの確立

a) 骨格筋幹細胞の採取

国立長寿医療センターにおいて泌尿器科疾患のため開腹手術を受けられる方で、本人からの同意が可能な方を対象とした。なお、梅毒や肝炎などの感染症に罹患している方および主治医が不相当と認めた方は対象から除外した。同意が得られた方について、全身麻酔下での開腹手術時に、切開部の腹直筋あるいは錐体筋を1 g程度摘出した。

b) ヒト筋細胞調製法の検討

後期高齢者の骨格筋より、筋幹細胞を分離・培養し、前期高齢者由来筋幹細胞との違いを比較検討した。また、凍結保存した高齢者骨格筋由来筋幹細胞を融解し、凍結保存による筋幹細胞の性質変化の有無を、増殖特性の解析および核型を指標として検討した。

また、培養ヒト筋細胞の品質評価するための指標分子を探索した。

c) 高齢者骨格筋の病理組織学的解析

初代培養に供した高齢者骨格筋の凍結切片を作成し、組織病理学的に解析した。特に、後期高齢者骨格筋を含むヒト骨格筋の加齢変化に注目して検討した。

d) ヒト外尿道括約筋の解析

前立腺全摘出手術時に尿道組織の摘出を伴う症例において、外尿道括約筋を含む組織を分離した。外尿道括約筋および肛門挙筋よりRNAおよびタンパク質を調製し、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析を行った。

橋本らの確立した新規ヒト筋細胞不死化法により、初代培養ヒト外尿道括約筋幹細胞の不死化を試みた。

e) ヒト初代培養細胞の培養下における増殖停止機構の解析

ヒト繊維芽細胞に、実験的に増殖停止を誘導し、増殖停止過程における細胞老化関連遺伝子の発現変化を検討した。

② 臨床研究を実現するための施設・設備および制度的基盤の整備

国内他施設における細胞移植治療研究施設の状態を調査し、国立長寿医療センターに再生医療を実施するための施設を整備するための情報を収集した。

(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。ヒト骨格筋組織の採取に関しては、国立長寿医療センターの倫理委員会の承認および大分大学 IRB の承認を受けた。臨床研究に関する倫理指針に則り、患者に対しては、文書を用いて説明し、患者本人より文書にて同意を得た。

C. 結果

① 高齢者由来骨格筋幹細胞供給システムの確立

a) 高齢者を対象とした骨格筋幹細胞の採取

本年度は、後期高齢者を含む5例の筋生検を実施した。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、後期高齢者を対象とした場合でも、本摘出法の高い安全性が確認された。

b) ヒト筋細胞調製法の検討

自己筋細胞移植治療を実現するためには、得られた初代培養筋細胞を凍結保存する技術

を確立する必要がある。筋組織から調製し、培養に供していない細胞 (P0) および継代後に凍結保存した細胞 (P3) を融解-培養した。P0、P3 いずれからも増殖分化能を有する筋細胞が得られ、増殖速度に顕著な差は認められなかった。しかし、核型を解析したところ、P3 細胞由来の筋細胞では90%以上の細胞が正常二倍体を保っているのに対し、P0 細胞由来の筋細胞では、約50%に止まった。異なる対象者由来の細胞を比較したため、核型の異常が凍結時期の違いによるとは結論できないが、凍結保存細胞の核型に異常の生じる場合があることが明らかになった。

75歳以上の後期高齢者の骨格筋2例(75歳男性と86歳女性)から筋細胞を調製し、その性質を検討した。いずれの初代培養においても、より年齢の若い成人筋組織から得られた初代培養筋細胞と同様に、高い増殖性を持つ筋細胞が得られた。この結果は、後期高齢者の筋組織においても、機能的に正常な筋幹細胞が存在することを示している。

培養ヒト筋細胞の品質を評価するための指標分子の候補と考えられる脳-肝臓-腎臓型アルカリ性ホスファターゼ(ALP)およびCD56(NCAM)の発現を検討した。未分化筋細胞におけるNCAMの発現は、フローサイトメトリー法では検出できたが、蛍光抗体法でのシグナルはきわめて微弱だった。一方、ALPは、橋本らが実施した初代培養ヒト筋細胞の全例で検出され、かつ筋分化能と高い相関を示した。ALPは初代培養筋細胞を識別するマーカーとして、有用性が高いと考えられる。

c) 安定性評価のための病理組織学的解析

50歳から86歳までの、前立腺摘出術を受けた患者から手術時に得られた腹直筋生検標本を病理組織学的に検討した。骨格筋の加齢性病変と考えられるrimmed vacuoleの所見は、50歳の患者でも局所的に見いだされたが、高齢の患者では比較的大きなvacuoleを有する筋線維が集簇して見いだされる傾向が認められた。

d) ヒト外尿道括約筋の特性解明

トランスクリプトーム解析の結果、外尿道括約筋組織と肛門挙筋組織では筋成分と間質成分の比率が異なるため、多数の遺伝子発現に差を認めた。また、今回のプロテオーム解析では、回収したタンパク量が少ないため、タンパク同定にはいたらなかった。

ヒト外尿道括約筋由来初代培養細胞への外来遺伝子の導入により、継続的に増殖する

細胞集団を得た。しかし、初代培養の時点で
きわめて大量の非筋細胞が含まれていたため、
不死化筋幹細胞を分離するには到らなかった。

e) ヒト細胞の培養下における老化機構の解析

ヒト繊維芽細胞に細胞老化を誘導したところ、
p53 とその下流因子の発現上昇が認められた。
実験的に p53 および Rb の機能を抑制したところ、
両方を抑制した細胞においてのみ細胞老化が抑制された。

② 臨床研究を実現するための施設・設備および制度的基盤の整備

再生医療に適した細胞調製設備・施設に関する調査検討をもとに、再生医療用細胞調製施設 (Cell Processing System, CPS) およびそれに付随する研究施設の設計と立案を行った。

D. 考察

先行研究において、私たちは、細胞移植治療のメインターゲットを前立腺手術後の腹圧性尿失禁と考えたため、筋生検の対象者を「前立腺全摘除術を受ける男性」に限定してきた。また、後期高齢者にとって筋生検が負担となる可能性に配慮し、対象者の年齢については「75歳以下」という制限を設けた。20例以上の筋生検を実施した結果、「手術・開腹時に切り口の腹壁の横紋筋（腹直筋あるいは錐体筋）を摘出する」という、本筋組織摘出法の高い安全性を明らかにすることができた。そこで、本研究においては、自己筋細胞移植による再生治療の適用範囲を、女性および後期高齢者に拡大するため、性別および年齢を対象者の除外基準から省くことにした。今年度、後期高齢者の女性1名を対象とした筋生検を実施し、他の男性の前期高齢者の場合と同様、術後も筋摘出による合併症は見られず、安全性が確認された。また、後期高齢者骨格筋からも、高い増殖・分化能を有する初代培養筋細胞を得ることができた。後期高齢者および女性の症例数は、まだ少数であるため、今後更に検討例数を増やす必要がある。しかし、本研究の目指す再生治療の対象者を、女性および後期高齢者に拡大できる可能性が示された意義は大きい。

細胞移植治療を前臨床試験から臨床応用へと進めるためには、安全性の担保された移植用細胞凍結保存法を確立する必要がある。今回、筋組織から分離後、培養せずに、直ちに凍結保存した細胞に染色体構成の異常が見いだされたことから、現在の凍結保存法には改

良の余地があると考えられる。今後、核型が不安定化する危険性を低減・排除するための条件を検討し、安全性の担保された凍結保存法を開発する必要がある。

移植用筋細胞の品質評価指標の確立は、臨床応用を実現するうえで、きわめて重要である。ヒト筋幹細胞のマーカーとして用いられている NCAM の発現は、培養筋細胞では低く、十分信頼度の高い指標とはならないと考えられた。一方、脳・肝臓・腎臓型アルカリ性フォスファターゼ BLK-ALP は、ほぼ全ての培養ヒト筋細胞で発現していた。BLK-ALP は、品質評価指標としての要件を充たす可能性の高い有力な候補分子であるが、筋細胞系譜における BLK-ALP の発現については、確立しておらず、培養ヒト筋細胞を特異づけるマーカー分子としての妥当性については、今後科学的証拠を示さなければならない。

高齢者骨格筋組織を病理組織学的に検討し、骨格筋の加齢性病変と考えられる rimmed vacuole の所見を見出した。高齢な患者筋組織では、比較的大きな vacuole を有する筋繊維が集簇して見いだされる傾向が認められ、加齢に伴う筋再生能低下との関連性解明が期待される。

外尿道括約筋の性質については、不明の点が多いものの、その解析には大きな制限がある。今回、トランスクリプトーム解析およびプロテオーム解析によって、外尿道括約筋組織と肛門挙筋組織に差を認めた。このアプローチは、外尿道括約筋の性質解明の突破口となる可能性がある。また、ヒト外尿道括約筋由来初代培養細胞にへの外来遺伝子導入により、継続的に増殖する細胞集団を得た。非筋細胞と筋細胞の選別が今後の課題である。

E. 結論

初年度である平成 21 年度は、克服すべき課題の明確化と必要な解析系の確立を含む研究戦略の検討に重点をおいて研究を行い、2, 3 年目の研究の基盤となる、以下のような成果を得た。

後期高齢者を対象とした筋生検を実施し、私たちの手技の安全性が確認できた。また、後期高齢者の骨格筋から増殖能力の高い筋細胞が得られたことから、筋幹細胞に関する限り、年齢による機能低下は、あるとしても僅かであると考えられる。また、より安全性の高い細胞保存法を確立する必要性が明確に示された。さらに、初代培養ヒト筋細胞の増殖

を制限する要因を排除し、効率的細胞供給を実現するための基盤となる知見が、ヒト繊維芽細胞の細胞老化機構解析から得られた。

後期高齢者の骨格筋を含むヒト骨格筋の病理組織学的解析から、筋組織の加齢変化に関する新たな知見が得られた。今後は、病理学的変化と筋再生能力との関連性を明らかにすることが課題である。

外尿道括約筋の性質については、不明の点が多いため、RNA およびタンパク質の網羅的解析によって、その特性解明の端緒が得られた意義は大きい。また、外尿道括約筋由来筋細胞の不死化は、創薬の可能性を開く重要な鍵となるため、本研究班全体で協力して課題克服に取り組む予定である。

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)

Mukai, A., et al. (2009) Exp. Cell Res. 125 : 257-269.

Okamura et al. (2009) Int J Urol. 16:590-591.

Okamura et al. (2009) Urology 73: 1199-1202.

Okamura et al. (2009) BJU Int. 103: 1673-1678.

Nishiyama t al. (2009) Urology 74: 436-439.

Iwashita S, et al. (2009) Gene 435: 88-95

Yokota A, et al. (2009) International Immunol 21:361-377.

Sumino Y et al. (2009) Neurourol Urodyn

Hanada M et al. (2010) J Urol.

Liu J. et al. (2009) Nature 459: 387-392.

2. 学会発表

学会での講演、発表など

橋本有弘 等、6 件 ; 本山昇 等、1 件 ; 三股浩光 等、1 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。