

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（21指-6）

主任研究者 橋本 有弘 国立長寿医療研究センター 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。綿足たちは、前臨床研究において高齢者の骨格筋から、再現性よく筋幹細胞を分離・培養する独自技術を確立した。当該研究期間においては、前臨床研究の成果を臨床応用に発展させるために、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、国立長寿医療研究センターに『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』を構築するための基盤整備を実施した。

治療対象が高齢者であることから、私たち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。移植用筋細胞の安全性を担保し、かつ筋細胞調製の効率化を図るために、ヒト筋細胞の初代培養条件を改良した。さらに、移植用筋細胞の品質評価システムとして、NCAM(CD56)をマーカーとしたフローサイトメトリー法の有用性を明らかにした。また、私たちは、独自に開発した技術によって、不死化ヒト筋細胞を樹立することに成功した。不死化ヒト筋細胞は、ヒト筋細胞固有の性質を解明し、細胞培養および移植法の改良を促進するために有用性が高い。さらに、私たちは「外尿道括約筋細胞」を不死化することにも成功した。この「不死化ヒト外尿道括約筋細胞」は、世界的にも類例のない細胞であり、将来的な創薬開発のためのアッセイ系としてきわめて重要である。

従来研究における「ヒト骨格筋組織の加齢にともなう変化」に関する解析結果は、限定的なものである。そこで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おこない、治療対象である筋組織の特性を反映すると思われる結果を得た。これらの結果は、筋細胞移植治療を補填する治療法開発のための基盤情報となる。

再生医療の実施に必要な施設・設備および臨床研究管理体制を整備するための調査を行った。その成果は、第二研究棟4階に設置された「再生医療用細胞調製施設(Cell Processing System)」の整備計画に反映され、ハード面の整備に関しては、臨床研究実施の条件が整いつつある。

主任研究者

橋本 有弘 国立長寿医療研究センター 部再生再建医学研究部 部長

分担研究者

岡村 菊夫 国立長寿医療研究センター 手術・集中治療部 部長
本山 昇 国立長寿医療研究センター 加齢健康脳科学研究部 室長
宋 時栄 徳島文理大学 神経科学研究所 教授
三股 浩光 大分大学 医学部 教授

研究期間 平成21年6月26日～平成23年3月31日

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・経済的負担が大きいため、解決の望まれる課題である。自己骨格筋幹細胞を用いた再生医療は、腹圧性尿失禁に対する将来性の高い治療法である。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」の実現を目標とする。申請者らは、前臨床研究において高齢者の骨格筋から、再現性よく筋幹細胞を分離・培養する独自の技術を確立した。本研究では、前臨床研究の成果を臨床応用に発展させるために、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、国立長寿医療研究センターに『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。

世界的にみても高齢化の進行が著しいわが国においては、今後、尿失禁に悩む高齢者は、さらに増加するものと考えられる。本研究によって腹圧性尿失禁の再生治療が開発されれば、治癒できる可能性が高まり、高齢者の QOL は向上し、健康長寿社会の実現に大いに貢献できるものと考えられる。

B. 研究方法

【平成21-22年度】

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適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

75歳以上の後期高齢者の骨格筋より、筋幹細胞を分離・培養し、65歳以上75歳未満の前期高齢者および65歳未満の成人由来筋幹細胞との違いを比較検討した。

c) 移植用ヒト筋細胞の安全性（リスク）評価

カルディオトキシンによって筋再生を誘導した免疫不全マウス NOD/Scid の骨格筋に、ヒト筋細胞を移植し、5 週間後に筋組織を分離した。筋再生への寄与および腫瘍形成を組織病理学的に検討した。さらに、移植後のヒト筋細胞が腫瘍マーカーを発現しているか否かを検討するために、マイクロダイセクションによって、組織切片から移植細胞を切り出し、その遺伝子発現パターンを RT-PCR で解析するための条件を確立した。

ヒト筋細胞の造腫瘍性を検討するために、定法に従って *in vitro* におけるソフト・アガー・アッセイをおこなった。

d) 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。

e) 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。さらに、橋本らの確立した新規ヒト筋細胞不死化法 (Shiomi et al., 2011) により、初代培養ヒト外尿道括約筋幹細胞を不死化した。

f) 培養ヒト筋細胞の品質評価法の開発

培養ヒト筋細胞の品質評価するための指標分子を探索するため、定法によりフローサイトメトリ解析および免疫蛍光抗体染色をおこなった。

g) 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

レンチウイルスベクターを用いて、ヒト初代培養筋細胞に hTERT、CDK4R24C および cyclin D1 遺伝子を導入・発現させ、細胞周期関連タンパク質の挙動をイムノブロット解析した。また、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況を調査し、国立長寿医療研究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。それら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。さらに、具体的な機器設備整備（案）を作成した。

【平成 22 年度】

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適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

初代培養筋細胞を、低酸素濃度下で培養し、酸化ストレス低減による筋細胞増殖の昂進の可能性を検討した。また、培養ヒト筋細胞の品質評価するための指標分子を、蛍光抗体染色によって探索・検討した。

c) 移植用ヒト筋細胞の安全性（リスク）評価

カルディオトキシンによって筋再生を誘導した免疫不全マウス NOD/Scid の骨格筋に、ヒト筋細胞を移植し、5 週間後に筋組織を分離した。移植後のヒト筋細胞が腫瘍マーカーを発現しているか否かを検討するために、マイクロダイセクションによって、組織切片から移植細胞を切り出し、その遺伝子発現パターンを RT-PCR で解析するための条件を確立した。

培養ヒト筋細胞の造腫瘍性を検討するために、定法に従って in vitro におけるソフト・アガー・アッセイをおこなった。

d) 培養ヒト筋細胞の品質評価法の開発

培養ヒト筋細胞の品質評価するための指標分子を探索するため、定法によりフローサイトメトリ解析および免疫蛍光抗体染色をおこなった。

e) 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 を調製し、トランスクリプトーム解析を行った。また、橋本らの確立した新規ヒト筋細胞不死化法 (Shiomi et al., 2011) により、初代培養ヒト外尿道括約筋細胞を不死化した。

f) 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

レンチウイルスベクターを用いて、ヒト初代培養筋細胞に hTERT、CDK4R24C および cyclin D1 遺伝子を導入・発現させ、細胞周期関連タンパク質の挙動をイムノブロット解析した。また、ヒト繊維芽細胞の SIRT1 遺伝子発現を RNAi によって阻害し、細胞増殖への影響を検討した。

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收拾した。それら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的设计と立案を行った。さらに、具体的な機器設備整備 (案) を作成した。

(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. 研究結果

【平成 21-22 年度】

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

国立長寿医療研究センター泌尿器科で行う開腹手術時に、約 1 g 程度の骨格筋組織を得て、共同研究者の行う後述の研究を進めた。2009-2010 (9 月まで) 年度は、後期高齢者 2 例を含む 9 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である。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。

低酸素濃度下で培養することにより、初代培養ヒト筋細胞の収量が 1.5-2 倍に増大することを見いだした。一方、培養液添加物を牛胎児血清と bFGF (組換えタンパク質) のみにすると、初代培養ヒト筋細胞は得られるものの、収量は低下した。牛胎児血清以外の動物由来成分を用いずに、初代培養ヒト筋細胞を得られることが示された。収量の低下は、複数の培養条件を組み合わせることで至適化することにより、改善できる可能性がある。

c) 移植用ヒト筋細胞の安全性 (リスク) 評価

ヒト筋細胞を免疫不全マウスの骨格筋に移植し、筋再生への寄与を確認するとともに、腫瘍が形成されないことを組織病理学的に検討確認した。さらに、移植後の筋細胞が腫瘍マーカーを発現しているか否かを検討するために、マイクロダイセクションによって、組織切片から移植細胞を切り出し、その遺伝子発現パターンを RT-PCR で解析するための実験系を確立した。

ヒト筋細胞の造腫瘍性についての検討として、*in vitro* におけるソフト・アガー・アッセイをおこなった。不死化ヒト筋細胞ですら、造腫瘍性を示さないことを明らかにした。

d) 高齢者骨格筋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。

e) 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、プロテオーム解析では、外尿道括約筋特異的なタンパク質のスポットを同定したが、回収タンパク量が少なかったため、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。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「不死化ヒト外尿道括約筋細胞」を分離・樹立した。ヒト外尿道括約筋の特性解明のための優れた解析系となる。

f) 培養ヒト筋細胞の品質評価法の開発

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 CD56 (NCAM) の発現と筋分化能との対応関係を検討した。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によって明瞭な細胞集団として検出・分離できた。一方、蛍光抗体法によるシグナルは、細胞密度が高い場合に低下傾向を示し、発現細胞 (NCAM+ve 細胞) を NCAM-ve 細胞と識別することが困難な場合が多くなった。一方、フローサイトメトリー法によって分離した NCAM+ve 細胞を分化条件下で培養すると高い筋分化能を示したが、NCAM-ve 細胞は筋分化しなかった。

g) ヒト細胞の培養下における増殖停止機構の解析

初代培養ヒト筋細胞は、継代数 10 前後で増殖停止する。(1)その増殖停止は、がん抑制遺伝子産物 Rb の活性化によって引き起こされること、(2)Rb の活性化を CDK4R24C および cyclin D1 に

よって抑制すると、初代培養ヒト筋細胞は増殖停止を免れること、が明らかになった。一方、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に関する調査・検討をもとに、再生医療用細胞調製システム (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い、システムの外郭は完成した。さらに、具体的な機器設備整備 (案) を作成した。

【平成 22 年度】

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

国立長寿医療研究センター泌尿器科で行う開腹手術時に、約 1 g 程度の骨格筋組織を得て、共同研究者の行う後述の研究を進めた。

b) ヒト筋細胞調製法の検討

低酸素濃度下で培養することにより、初代培養ヒト筋細胞の収量が 1.5-2 倍に増大することを見いだした。一方、培養液添加物を牛胎児血清と bFGF (組換えタンパク質) のみにすると、収量は低下したものの、初代培養ヒト筋細胞は得られた。牛胎児血清以外の動物由来成分を用いずに、初代培養ヒト筋細胞を得ることは可能であり、収量の低下は、複数の培養条件を組み合わせることで至適化することにより、改善しうることが示された。

c) 移植用ヒト筋細胞の安全性 (リスク) 評価

ヒト筋細胞を免疫不全マウスの骨格筋に移植し、筋再生への寄与を確認した。さらに、移植後の筋細胞が腫瘍マーカーを発現しているか否かを検討するために、マイクロダイセクションによって、組織切片から移植細胞を切り出し、その遺伝子発現パターンを RT-PCR で解析するための実験条件を検討し、至適条件を確立した。

ヒト筋細胞の造腫瘍性についての検討として、in vitro におけるソフト・アガー・アッセイをおこなった。初代培養ヒト筋細胞は、ソフト・アガー中では全く増殖しなかった。不死化ヒト筋細胞を継代し、培養期間を長くした場合でも、ヒト筋細胞は造腫瘍性を示さないことが明らかになった。

d) ヒト外尿道括約筋の特性解明

外尿道括約筋組織と肛門挙筋組織の違いを、タンパク質および遺伝子レベルで、網羅的に解析した。プロテオーム解析では、多数の量的、質的も差のある蛋白質の存在を認めた。一方、トランスクリプトーム解析では、両者における発現量に差のある、多数の遺伝子を同定した。さらに、

遺伝子解析とタンパク質解析で共通して外尿道括約筋に高発現する分子として decorin を同定した。

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「不死化ヒト外尿道括約筋細胞」を分離・樹立した。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、不死化後、フローサイトメトリーによる NCAM+細胞の分離を2回行った結果、不死化後の培養では0.1%以下しか含まれていなかった筋細胞を、ほぼ完全に純化することに成功した。さらに、不死化外尿道括約筋細胞の性質を検討するとともに、細胞クローニングを進めている。不死化外尿道括約筋細胞は、ヒト外尿道括約筋の特性を解明するための優れた解析系となる。

e) 培養ヒト筋細胞の品質評価法の開発

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である CD56 (NCAM) の発現と筋分化能との対応関係を検討した。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によって明瞭な細胞集団として検出・分離できた。一方、蛍光抗体法によるシグナルは、細胞密度が高い場合に低下する傾向を示し、NCAM+ve 細胞であっても、NCAM-ve 細胞と識別することが困難な細胞が目立つようになった。一方、フローサイトメトリー法によって分離した NCAM+ve 細胞は高い筋分化能を示したのに対し、NCAM-ve 細胞は全く筋分化能を示さなかった。

f) ヒト筋細胞の培養下における増殖停止機構の解析

初代培養ヒト筋細胞は、継代 10 前後で増殖を停止する。(1)その増殖停止は、Rb の活性化によって引き起こされること、(2)Rb の活性化を CDK4R24C および cyclin D1 によって抑制すると、増殖停止を免れること、を明らかにした。Rb の活性化を抑制する培養条件を確立することによって、初代培養筋細胞の収量の大幅な増量が期待できる。また、ヒト繊維芽細胞における老化制御因子 NAD⁺依存性脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現を抑制したところ、細胞増殖速度および飽和細胞密度が増大した。

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

臨床研究実施に必要な組織体制を整備するため、東京女子医大、名古屋大学を訪問し、担当者、専門家から直接情報を収集した。再生医療に適した細胞調製設備に関する調査・検討をもとに、再生医療用細胞調製システム (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い、クリーンルームは完成した。さらに、具体的な機器設備整備 (案) を作成した。また、これまでの筋生検を基盤として、臨床研究実施のためのプロトコル案を作成した。

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。平成21-22年度に、2名の後期高齢者（75歳男性1名、86歳女性1名）を対象とした筋生検を実施し、75歳未満の男性の場合と同様、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、二例の後期高齢者骨格筋からは、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、まだ少数であり、今後更に検討を重ねる必要がある。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まで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。当初、NCAMはヒト筋幹細胞のマーカーとして報告されてはいるもの、その発現はレベル初代培養ヒト筋細胞では低く、十分信頼度の高い指標とはならないと考えられた。しかし、本研究の結果、(1) ヒト未分化筋細胞におけるNCAM発現レベルは、高細胞密度では低下する傾向が認められるために抗体染色法では適用に難点があるものの、(2) フローサイトメトリー法を用いれば、再現性良く、明瞭に筋細胞を識別できることが明らかになった。その理由として、フローサイトメトリー法では、筋細胞を単一細胞に分散させてから解析するため、細胞密度に依存した発現低下の影響を免れることが考えられる。橋本らは、正常ヒト筋組織をNCAM抗体で免疫染色し、NCAMがヒト筋幹細胞系譜のマーカー分子として妥当であることを支持する結果を得ている。

「移植用ヒト筋細胞の安全性（リスク）評価」は、最も重要な検討課題である。造腫瘍性の評価は、*in vitro*におけるがん関連遺伝子の発現解析と*in vivo*移植後の組織病理学的検索によって判断されてきた。本研究では、マイクロダイセクション法を至適化することによって、より高感度かつ、分子レベルで正確に造腫瘍性を判定できる可能性を示した。この技術によって、従来のアッセイでは困難であった「前がん状態の細胞」をも検出できる可能性があり、より精密に造腫瘍性を評価することが期待できる。

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、私たちは、独自に開発した不死化技術を用いて外尿道括約筋細胞を不死化し、さらに、ほぼ完全に細胞を純化することに成功した。不死化外尿道括約筋細胞は、これまで不明の点が多かったヒト外尿道括約筋の特性を解明するための優れた解析系となるばかりではなく、創薬開発のためにきわめて有用な系を提供するものと期待できる。

E. 結論

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ために必要なバイオアッセイ系を確立するために克服することが必要な課題である。私たちは、独自に開発した不死化技術を用いて外尿道括約筋細胞を不死化し、さらに、ほぼ完全に細胞を純化することに成功した。不死化外尿道括約筋細胞は、これまで不明の点が多かったヒト外尿道括約筋の特性を解明するための優れた解析系となるばかりではなく、創薬開発のためにきわめて有用な系を提供するものと期待できる。

マイクロダイセクション法による高感度造腫瘍性アッセイ法の開発、不死化外尿道括約筋細胞の樹立は、長寿医療研究センターと徳島文理大学、大分大学との綿密な共同研究の成果である。本研究班全体で協力して課題克服に取り組んだ結果、得られた成果であることを強調したい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

平成21年度

- 1) Mukai, A., Kurisaki, T., Sato, A. B., Kobayashi, T., Kondoh, G. and Hashimoto N.: Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. *Exp. Cell Res.* **315**: 3052-3063, 2009.

- 2) Okamura K, Terada J, Kato H. : Lower urinary tract symptoms and quality of life of people consulting general practitioners. *Int J Urol.* **16**:590-591, 2009.
- 3) Okamura K, Nojiri Y, Osuga Y, Tange C. Psychometric analysis of international prostate symptom score for female lower urinary tract symptoms. *Urology* **73**: 1199-1202, 2009.
- 4) Okamura K, Nojiri Y, Osuga Y. : Reliability and validity of the King's Health Questionnaire for lower urinary tract symptoms in both genders. *BJU Int.* **103**: 1673-1678, 2009.
- 5) Nishiyama Y, Yokoyama Y, Tomizawa K, Okamura K, Yamamoto Y, Matsui H, Oguma K, Nagai A, Kumon H. Effects of purified newly developed botulinum neurotoxin type A in rat prostate. *Urology* **74**: 436-439, 2009.
- 6) Liu J, Cao L, Chen J, Song S, Lee IH, Quijano C, Liu H, Keyvanfar K, Chen H, Cao LY, Ahn BH, Kumar NG, Rovira II, Xu XL, van Lohuizen M, Motoyama N, Deng CX, Finkel T. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* **459**: 387-392, 2009.
- 7) Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N, Hirao A. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* **463**: 676-680, 2010.
- 8) Iwashita S, Nakashima K, Sasaki M, Osada N and Song S-Y. Multiple duplication of the *bucentaur* gene family, which recruits the APE-like domain of retrotransposon: identification of a novel homolog and distinct cellular expression. *Gene* **435**:88-9, 2009.
- 9) Yokota A, Takeuchi H, Maeda N, Ohoka Y, Kato C, Song S-Y and Iwata M. GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity. *International Immunol* **21**:361-77, 2009.
- 10) Sumino Y, Hanada M, Hirata Y, Sato F, Mimata H. The effects of hepatocyte growth factor and insulin-like growth factor-1 on the myogenic differentiation of satellite cells in human urethral rhabdosphincter. *Neurourol Urodyn.* **29**:470-475 2010.

平成 22 年度

- 1) Suzuki, Y., Nakayama, K., **Hashimoto, N.** and Yazawa, I: Proteolytic processing regulates pathological accumulation in dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *FEBS J.* **27**:4873-87.
- 2) Yanagisawa, M., Mukai, A., Shiomi, K., Song, Si-Y., and **Hashimoto, N**: Community effect triggers terminal differentiation of myogenic cells derived from muscle satellite cells

- by quenching Smad signaling. *Exp. Cell Res.* 317: 221-233.
- 3) Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., Shimizu, S. and **Hashimoto, N**: Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential. *Gene Therapy* (in press).
 - 4) Okamura K. et al. Perioperative management of transurethral surgery for benign prostatic hyperplasia: A nationwide survey in Japan. *Int J Urol.* 18: 304-311, 2010.
 - 5) 野尻佳克、岡村菊夫：周術期管理の標準化と臨床指標、日本クリニカルパス学会誌第12巻2号 p141-3、2010
 - 6) 野尻佳克、岡村菊夫：全国手な標準化を目指した前立腺手術クリティカルパス研究、MEDICAL QOL May、p24-7、2010
 - 7) 野尻佳克：TURP（経尿道的前立腺切除術）、泌尿器ケア 15号8巻 p14-18、2010
 - 8) Niida H, Murata K, Shimada M, Ogawa K, Ohta K, Suzuki K, Fujigaki H, Khaw AK, Banerjee B, Hande MP, Miyamoto T, Miyoshi I, Shirai T, Motoyama N, Delhase M, Appella E, Nakanishi M: Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. **EMBO J** 29: 3558-3570, 2010.
 - 9) Kim SS, Choo DW, Shin D, Baek HJ, Kim TH, Motoyama N, De Coster BM, Gueulette J, Furusawa Y, Ando K, Cho KH: In vivo radiobiological characterization of proton beam at the National Cancer Center in Korea: Effect of the CHK2 mutation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79: 559-562, 2011.
 - 10) Hanada M, Sumino Y, Hirata Y, Sato F, Mimata H. Growth Inhibition and Apoptosis Induction by TNF- α in Satellite Cells of Human Urethral Rhabdosphincter. *J Urol.* 183: 2445-2450, 2010.
 - 11) Sumino Y, Hirata Y, Hanada M, Akita Y, Sato F, Mimata H.L: Long-term cryopreservation of pyramidalis muscle specimens as a source of striated muscle stem cells for treatment of post-prostatectomy stress urinary incontinence. *Prostate.* 2011 (in press).
 - 12) Hanada M, Sumino Y, Hirata Y, Sato F, Mimata H. Growth Inhibition and Apoptosis Induction by TNF- α in Satellite Cells of Human Urethral Rhabdosphincter. *J Urol.* 183: 2445-2450, 2010.

2. 学会発表

平成21年度

- 1) 向 敦史、栗崎知浩、橋本有弘：骨格筋細胞融合における脂質ラフトの役割 第42回日本発生生物学会、新潟、2009年5月28-31日
- 2) Michiko Yanagisawa and Naohiro Hashimoto: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva as a

- Candidate for Muscle Stem Cell Disease: A Synergistic Induction of Osteogenesis by Inflammatory Cytokine and mutated ALK2. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
- 3) Atsushi Mukai and Naohiro Hashimoto: Dynamic clustering and dispersion of lipid rafts contribute to fusion competence of myogenic cells. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日。
 - 4) 塩見浩介、上住円、清野透、岡村菊夫、橋本有弘 : CDK4/Cyclin D1/hTERTによって不死化されたヒト筋前駆細胞の増殖・分化特性 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 5) Nobuyoshi Shimoda, Toshiaki Izawa, Yutaka Kikuchi and Naohiro Hashimoto: Zebrafish age with localized hypomethylation and extensive fragmentation of the genome. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日
 - 6) Michiko Yanagisawa and Naohiro Hashimoto: Fibrodysplasia Ossificans Progressiva as a Candidate for Muscle Stem Cell Disease: A Synergistic Induction of Osteogenesis by Inflammatory Cytokine and mutated ALK2. The Society for Muscle Biology and FASEB Conference “ Making Muscle in the Embryo and Adult” , New York , USA, May 27-June 2, 2009.
 - 7) 松本 恵、鈴木今日子、大田久美子、新飯田俊平、本山 昇. DNA損傷応答因子Chk2欠損による早期老化症モデルマウスの寿命延長. 日本基礎老化学会第32回大会、2009年6月20日、横浜。
 - 8) Okazaki M, Nakashima K, Fujii Y, Kato, C, Si-Young Song. Expression of Lanosterol 14- α Demethylase in the brain and its changes during myelination and remyelination. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日。
 - 9) Fujii Y, Nakashima K, Okazaki M, Kato C, and Song S-Y. Expression of Stearoyl-CoA desaturase isoforms in the brain and their changes during the processes of experimental demyelination and remyelination. 第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月9-12日。
 - 10) Nakashima K, Iwashita S, Kato, C, and Song S-Y. Functional diversity of Bcnt family genes, and intracellular localization of ancestral BCNT in the nervous system.
 - 11) Mari Hanada. AUA Chicago, USA, April 25-30, 2009.
 - 12) 住野泰弘、秋田泰之、花田麻里、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光. ヒト外尿道括約筋と肛門挙筋のプロテオーム解析. 第16回日本排尿機能学会。
 - 13) 花田麻里、住野泰弘、平田裕二、秋田泰之、平井健一、成松隆弘、井上享、塚本善之、守山正胤、佐藤文憲、三股浩光. ヒト外尿道括約筋および肛門挙筋におけるトランスクリプトー

△解析。第 16 回日本排尿機能学会。

平成 22 年度

- 1) 橋本有弘、柳澤美智子： Community Effect Triggers Terminal Differentiation of Myogenic Cells by Quenching Smad Signaling Pathway. 第 43 回日本発生生物学会大会 2010 年 5 月 19 日 京都
- 2) 橋本有弘、岡村菊夫、塩見浩介： 腹圧性尿失禁に対する自己筋細胞移植治療の開発：高齢者由来横紋筋幹細胞の分離および培養下における増殖特性。泌尿器科再建再生研究会 2010 年 6 月 19 日 札幌
- 3) 橋本有弘、柳澤美智子： Smad シグナルの抑制による細胞密度依存的な筋分化抑制機構（コミュニティ・イフェクト）。 第 33 回日本分子生物学会年会 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸。向敦史、橋本有弘： Crucial role of Rac1 in myogenic cell fusion. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸。
- 4) 塩見浩介、橋本有弘： グルココルチコイドによるヒト筋細胞の増殖制御機構。第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸。
- 5) 永田有希、清野透、後藤雄一、橋本有弘： 不死化ヒト筋細胞を用いたディシェンヌ型筋ジストロフィー・筋細胞の特性解明。第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7-10 日、神戸。
- 6) Hashimoto, N. and Yanagisawa, M. : Community Effect Triggers Terminal Differentiation of Myogenic Cells by Quenching Smad Signaling Pathway. FASEB Summer Conferences: Skeletal Muscle Satellite and Stem cells, Phenix, USA, July 18-23, 2010.
- 7) 野尻佳克、岡村菊夫、荒井陽一、内藤誠二、永江浩史、長谷川友紀、松田公志、服部良平。TURP 周術期合併症の地域格差。第 60 回日本泌尿器科学会中部総会、2010. 12. 1、名古屋
- 8) 北澤健文、長谷川友紀、松本邦愛、伊藤慎也、岡村菊夫。DPC データに基づく経尿道的前立腺手術の周術期管理の標準化に関する研究、第 24 回日本 EE 学会総会、2010. 10. 23、京都
- 9) 北澤健文、長谷川友紀、松本邦愛、伊藤慎也、岡村菊夫。DPC データに基づく前立腺悪性腫瘍手術の周術期管理の標準化に関する研究、第 24 回日本 EE 学会総会、2010. 10. 23、京都
- 10) 橋根勝義、川喜田睦司、荒井陽一、関成人、内藤誠二、長谷川友紀、服部良平、松田公志、矢内原仁、岡村菊夫。「前立腺手術周術期管理の標準化」研究に基づく前立腺癌術後の最適なカテーテル抜去日。第 24 回日本 EE 学会総会、2010. 10. 23、京都
- 11) 津島知靖、新良治、荒井陽一、佐々直人、内藤誠二、野尻佳克、長谷川友紀、服

- 部良平、松田公志、岡村菊夫. 全国クリニカルパス研究における、前立腺癌手術の患者満足度調査、第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都
- 12) 海法康裕、荒井陽一、町田二郎、田中良典、内藤誠二、長谷川友紀、服部良平、松田公志、岡村菊夫. 全国的なパス標準化に基づく前立腺癌手術における周術期管理法とアウトカムの変化、第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都
- 13) 増田朋子、松田公志、荒井陽一、永江浩史、内藤誠二、町田二郎、長谷川友紀、服部良平、矢内原仁、岡村菊夫. 「前立腺手術周術期管理の標準化」研究に基づくHoLEP術後の最適なカテーテル抜去日の解析、第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都
- 14) 佐々直人、荒井陽一、川喜田睦司、津島知靖、内藤誠二、野尻佳克、長谷川友紀、服部良平、松田公志、岡村菊夫. 全国クリニカルパス研究における、経尿道的前立腺手術の患者満足度調査. 第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都
- 15) 柚木貴和、関 成人、荒井陽一、橋根勝義、田中良典、長谷川友紀、服部良平、松田公志、内藤誠二、岡村菊夫. 全国的なパス標準化に基づく経尿道的前立腺手術における周術期管理法とアウトカムの変化. 第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都.
- 16) 野尻佳克、荒井陽一、関 成人、内藤誠二、町田二郎、長谷川友紀、服部良平、松田公志、矢内原仁、岡村菊夫. 「前立腺手術周術期管理の標準化」研究に基づくTURP術後の最適なカテーテル抜去日. 第24回日本EE学会総会、2010.10.23、京都.
- 17) 野尻佳克、岡村菊夫. 「前立腺手術周術期管理の標準化」研究に基づくHoLEPの合併症の検討. 第6回内視鏡的前立腺治療研究会、2010.10.23、京都.
- 18) 橋根勝義、野尻佳克、町田二郎、川喜田睦司、荒井陽一、内藤誠二、長谷川友紀、服部良平、松田公志、岡村菊夫. DPCが前立腺全摘除術の周術期管理に与える影響. 第23回日本老年泌尿器科学会、2010.5.10、東京
- 19) 野尻佳克、荒井陽一、関 成人、内藤誠二、永江浩史、長谷川友紀、服部良平、松田公志、矢内原仁、岡村菊夫「TURP周術期管理の全国調査」第23回日本EE学会総会、2009、東京
- 20) 岡村菊夫、野尻佳克、永江浩史、矢内原仁、佐々直人、荒井陽一、内藤誠二、長谷川友紀、服部良平、松田公志. 岡村菊夫、野尻佳克、永江浩史、矢内原仁、佐々直人、荒井陽一、内藤誠二、長谷川友紀、服部良平、松田公志「TURP周術期管理の全国調査データを用いた術者の経験に基づく様々なアウトカムの解析」第23回日本EE学会総会、第23回日本EE学会総会、2009、東京
- 21) 岡村菊夫. 「前立腺手術周術期の研究」の現状報告・将来展望. 第29回泌尿器科手術研究会. 2010.1.23、京都
- 22) 野尻佳克、岡村菊夫、大菅陽子、残尿量が増加した虚弱高齢者では尿道カテーテルを留置しても膀胱は空虚にならない. 第98回日本泌尿器科学会総会、2010.4.27、盛岡

- 23) 野尻佳克、岡村菊夫、大菅陽子、虚弱高齢者の ADL 低下と尿排出障害、第 23 回日本老年泌尿器科学会、2010. 5. 15、東京
- 24) 野尻佳克、岡村菊夫、大菅陽子、虚弱高齢者の便秘と痩せ、第 52 回日本老年医学会学術集会、2010. 6. 25、神戸
- 25) 本山 昇：DNA 損傷応答と老化。第 52 回日本老年学会学術集会（若手企画シンポジウム 1 基礎研究：老化メカニズムに関する最近の話題）、平成 22 年 6 月 25 日、神戸
- 26) Matsumoto-Ohya M, Suzuki K, Ohta K, Young SG, Motoyama N: Extended lifespan of *Zmpste24^{-/-}* mice, a model mouse for Hutchison-Gilford Progeria Syndrome (HGPS), in a Chk2-null background. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on “Molecular Genetics of Aging”, Sep 30, 2010, Cold Spring Harbor, NY, USA
- 27) 柳野卓也、日比陽子、伊藤雄貴、家村俊一郎、夏目 徹、渡辺研、丸山和佳子、本山 昇：酸化ストレスによるフォークヘッド型転写因子 FOXO の活性化メカニズムの解析。第 33 回日本基礎老化学会、平成 22 年 6 月 18 日、名古屋
- 28) Yanagino T, Furukawa-Hibi Y, Iemura S, Natsume T, Watanabe K, Maruyama W, Motoyama N: Selective dephosphorylation of FOXO by PP2A mediates cellular oxidative stress response. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on “Molecular Genetics of Aging”, Sep 30, 2010, Cold Spring Harbor, NY, USA
- 29) 村松 昌、山本誠士、森脇佐和子、本山 昇、徳田治彦、新飯田俊平：Aging impacts on miRNAs expression in blood。第 2 回日本 RNAi 研究会、平成 22 年 8 月 28 日、広島
- 30) 大矢 恵、鈴木今日子、大田久美子、早川智久、Stephen G Young、丸山和佳子、本山 昇：Hutchison-Gilford Progeria Syndrome モデルマウスの寿命制御における Chk2 を介した DNA 損傷応答の関与。BMB2010（第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会）、平成 22 年 12 月 9、10 日、神戸
- 31) Yanagino T, Hibi Y, Ito Y, Maruyama W, Motoyama N: PP2A protects cells from oxidative stress by selective dephosphorylation of FOXO. BMB2010（第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会）、平成 22 年 12 月 9、10 日、神戸
- 32) 丹伊田 浩行、村田 和大、島田 緑、小川 久美子、鈴木 今日子、藤垣 秀和、Aik Kia Khaw, Birendranath Banerjee, M. Prakash Hande, 宮本 智美, 三好 一郎, 白井 智之, 本山 昇, Mireille Delhase, Ettore Appella, 中西 真：Chk1 と Chk2 の協調的な機能が生体内の発癌を抑制する。BMB2010（第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会）、平成 22 年 12 月 8、9 日、神戸
- 33) 秋田泰之、花田麻里、住野泰弘、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光：ヒト外尿道括約筋における Myostatin の発現と機能解析。第 98 回日本泌尿器科学会総会、2010 年 4 月 27 日-30 盛岡。

- 34) 花田麻里、住野泰弘、平田裕二、秋田泰之、平井健一、井上享、成松隆弘、塚本善之、松浦恵子、守山正胤、佐藤文憲、三股浩光：ヒト外尿道括約筋および肛門挙筋におけるトランスクリプトーム解析. 第98回日本泌尿器科学会総会. 2010年4月27日-30日 盛岡。
- 35) 秋田泰之、花田麻里、住野泰弘、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光：ヒト外尿道括約筋におけるMyostatinの発現と機能解析. 第7回泌尿器科再建再生研究会. 2010年6月9日 札幌。
- 36) 秋田泰之、花田麻里、住野泰弘、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光：IGF-I局所投与はラット外尿道括約筋の肥大を誘導する. 第7回泌尿器科再建再生研究会. 2010年6月9日 札幌。
- 37) 秋田泰之、花田麻里、住野泰弘、平田裕二、佐藤文憲、三股浩光：プロテオミクスによる外尿道括約筋特異蛋白の同定. 第20回泌尿器科分子・細胞研究会. 2011年3月11日-12日 津。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし。
2. 実用新案登録
なし。
3. その他
なし。