

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告

骨格筋の老化機序解明を目的とした筋幹細胞維持機構に関する研究（29-47）

主任研究者 細山 徹 国立長寿医療研究センター 細山 徹（室長）

研究要旨

加齢に伴う骨格筋減弱症（サルコペニア）の発症機序は明らかではなく、その予防法や治療法の開発が進んでいない。一方、動物モデルを用いた近年の研究において、個体老化に伴う骨格筋幹細胞数の減少や機能変化がサルコペニア発症の一要因となる可能性が示されており、骨格筋幹細胞を標的とした予防法・治療法の開発が期待されている。本研究では、マウス遺伝学的手法、不死化ヒト筋細胞株、ヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）、を用いて、骨格筋幹細胞の維持制御と骨格筋老化との関連性を明らかにすることを目的としている。研究開始にあたる本年度は、骨格筋幹細胞および筋線維特異的に標的遺伝子を欠損するマウス系統（骨格筋特異的 Cre ドライバーマウス）の導入と維持、ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹・前駆細胞（SMPC）を用いた未分化性維持機構の解析、不死化ヒト筋細胞株の挙動解析、等を行い、特に、ヒト iPS 細胞由来 SMPC を用いた種々の解析により、骨格筋幹細胞の未分化性維持における MAPK 経路の関与を明らかにした。次年度には、本年度にはほぼ立ち上げが終了した骨格筋特異的 Cre ドライバーマウス系統を用いたサテライト細胞特異的な MAPK 欠損マウスを作出し、MAPK 抑制と筋萎縮との関連性について更に解析していくと共に、老齢マウス由来筋サテライト細胞における MAPK 経路に関する解析を行う。また得られた成果について、不死化ヒト筋細胞やヒト iPS 細胞由来 SMPC を用いた解析へと落とし込むことで、ヒトへの応用へとつなげていく。

主任研究者

細山 徹 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

分担研究者

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（部長）

A. 研究目的

超高齢社会を迎えた我が国の長寿医療において、サルコペニア等の加齢性筋疾患の治療法や予防法の開発は極めて重要な課題である。しかし、加齢性筋疾患の発症機序は未だ解明されておらず早期解決が望まれている。近年の研究では、個体老化に伴う骨格筋幹細胞の減少や機能低下がサルコペニア等の加齢性筋疾患の一要因となる可能性が示されており、骨格筋幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発が期待されている。しかし、骨格筋幹細胞維持機構の破綻と高齢者における骨格筋幹細胞の減少や筋萎縮との関連性が推察されているにもかかわらず、現在までのところ両者を結びつける明確な証拠はない。それどころか、「骨格筋幹細胞が成体骨格筋内でどのように維持されているのか」というより根本的な疑問が明らかになっていない。言い換えると、骨格筋幹細胞の維持制御機構を明らかにし、個体老化による影響やその関連性を明らかにすることが出来れば、加齢性筋疾患の本態解明や予防法・治療法の開発につながると言える。

本研究課題の最終目標は、「骨格筋の老化機序を解明し、加齢性筋疾患に対する新たな予防法・治療法を開発すること」であり、本研究期間においては、マウス遺伝学的手法、iPS細胞およびヒト筋細胞、等を用いて、「骨格筋幹細胞の維持制御と骨格筋老化との関連性」を明らかにする。具体的には、ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹・前駆細胞 (SMPC) を用いた幹細胞維持モデルでの骨格筋幹細胞維持関連因子の探索、Cre ドライバーによる骨格筋幹細胞特異的遺伝子欠損マウスの作出とその表現型解析、ヒト筋細胞による検証、を行い、将来的なヒトへの応用へ向けた研究を目指す。初年度にあたる本年度には、①ヒト iPS 細胞由来 SMPC による幹細胞維持関連因子の探索、②骨格筋特異的 Cre ドライバーマウス系統の基盤形成、③不死化ヒト筋細胞株の挙動解析 (分担研究者)、等を行い、次年度以降の足掛かりとすることを目標とする。

B. 研究方法

(1) ヒト iPS 細胞の培養

ヒト iPS 細胞株 (201B7 株) は理研バイオリソースセンター (理研 BRC) より購入し、マウス胎児線維芽細胞 (MEF: フィーダー細胞) との共培養により未分化性を維持した。この際、10ng/ml の bFGF (リプロセル社) を添加したリプロステム (リプロセル社) を培地として用いた。培地交換を毎日行い、4~5 日の培養期間中に iPS 細胞コロニーが適切な大きさになったところで継代を行った。

(2) EZ スフィア法によるヒト骨格筋幹・前駆細胞の分化誘導

ヒト iPS 細胞からの骨格筋幹・前駆細胞 (SMPC) の分化誘導には、EZ スフィア法を採用した (Hosoyama *et al.*, Stem Cell Transl Med. 2014)。本法は、iPS 細胞コロニーを浮遊状態で培養する方法であり、6 週間の培養によりおよそ 60% の誘導効率でスフィア内

に SMPC が誘導される。また本法により誘導した SMPC スフィアは、分化誘導後に 1-2 週間はスフィア内に幹細胞集団を維持することができる為、骨格筋幹細胞未分化維持モデルとして種々の研究に用いた。

(2) ヒト骨格筋幹細胞の微小重力培養

ヒト iPS 細胞由来 SMPC スフィアを浮遊状態のまま微小重力培養装置（ゼロモ：北川鉄工所）で培養し、SMPC を $10^{-3}G$ で 2 週間維持した。対照群として、1G 環境で培養（通常の静置浮遊培養）した SMPC スフィアを用いた。

(3) ヒト骨格筋幹細胞未分化維持モデルへの低分子化合物の添加

ヒト iPS 細胞由来 SMPC スフィアへ MEK インヒビター、SHP2 インヒビター、FGFR1 インヒビター等の低分子化合物を添加し、1 週間浮遊培養した。培養終了後、スフィアの凍結切片での免疫組織化学およびウエスタンブロットティングなどにより、骨格筋幹細胞マーカーである Pax7 および分化マーカーである MyoD の発現解析を行った。

(4) Cre ドライバーマウスの導入と維持

骨格筋幹細胞特異的 Cre ドライバーマウス (Pax7CreER) は、国際的な Mouse Repository 機関である米国 National Cancer Institute より凍結胚の状態で購入し、国立長寿医療研究センターにおいて個体復元した。また、その他の Cre ドライバーマウスおよび flox マウスを国内外の研究機関から導入し、その維持およびホモ化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究計画の遂行にあたっては、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターにおける遺伝子組換え実験安全規程に従って行われ、適切な拡散防止措置が取られる。動物実験に際しては国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験規則に従い行う。特に動物実験時の苦痛軽減措置には十分な配慮をもって行った。

C. 研究結果

(1) ヒト骨格筋幹細胞の未分化維持モデルの構築と微小重力培養の未分化性維持に与える影響についての検討

ヒト iPS 細胞から分化誘導した SMPC で構成される細胞塊 (SMPC スフィア) が、筋幹細胞の未分化維持モデルとして有用であるか否かについて検討した。筋幹細胞マーカーである Pax7 の遺伝子発現を指標に、分化誘導 6 週目と 8 週目の SMPC スフィアにおける Pax7 発現を qPCR 法により比較した。その結果、両者において Pax7 発現に有意な差はなく、この結果は、SMPC の分化誘導後の少なくとも 2 週間程度の短期間においてはスフィ

ア内に未分化骨格筋幹細胞が維持されている、すなわち未分化維持モデルとして有用であることを示唆している。続いて本モデルを用いて、微小重力環境がヒト骨格筋幹細胞の未分化性維持に与える影響について検討した。宇宙空間などの微小重力環境下では加齢性筋疾患と同様に筋萎縮が誘導されるが、微小重力環境が幹細胞に与える影響についての報告はない。そこで、加齢性筋疾患の発症のモデルの一つとして微小重力培養を採用し、先に誘導したヒト SMPC スフィアに対する微小重力環境の影響について検討した（尚、本検討の一部は研究代表者の前職からの継続研究となる）。ヒト iPS 細胞由来 SMPC スフィアを微小重力下で 2 週間培養すると、スフィア内の幹細胞集団の消失とそれに伴う Pax7 発現の有意な減少が認められた。さらに、様々なキナーゼに対するアッセイを行ったところ、微小重力環境下では筋幹細胞内の MAPK 経路の活性化阻害が生じていることが明らかとなった。

（2）低分子化合物のヒト iPS 細胞由来 SMPC スフィアの未分化性維持への影響

骨格筋幹細胞未分化維持モデルを用いて、MAPK 経路の未分化性維持への関与を明らかにする為に、MEK インヒビター添加を行った。その結果、先の微小重力培養の結果同様に、MAPK 経路の活性化阻害により、スフィア内に維持されていた Pax7 陽性の筋幹細胞が有意に減少し、その一方で MyoD 陽性細胞数の増加が生じた。また、SHP2 に対するキナーゼインヒビター添加によっても幹細胞プールの減少が誘導された。これらの結果は、骨格筋幹細胞の未分化性維持において SHP2-MAPK 経路が関与していることを示唆している。

（3）骨格筋特異的 Cre ドライバーマウスの導入とその維持

近年の骨格筋幹細胞研究において、骨格筋幹細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Cre ドライバーマウスは必須な研究ツールである（細山・深田 実験医学増刊 2018）。本年度は、National Cancer Institute より骨格筋幹細胞の Cre ドライバーマウスである Pax7CreER マウス（Nishijo, Hosoyama *et al.*, FASEB J. 2009）の凍結胚を輸入し、国立長寿医療研究センターにおいて個体復元を行った。個体復元により、Pax7CreER マウスのヘテロマウスが得られたため、さらに、交配によるホモ化および個体数の増加を行った。また、MAPK 経路関連遺伝子を骨格筋幹細胞特異的に欠損させる為に、国内外の研究機関より flox マウスを導入し、個体維持および Pax7CreER マウスとの交配を行った。

D. 考察と結論

本年度の研究結果から、骨格筋幹細胞の未分化性維持において MAPK 経路が重要な役割を果たしていることが示された。しかし、本年度の成果はあくまでもヒト iPS 細胞由来 SMPC モデルにおけるものであり、成体骨格筋幹細胞（サテライト細胞）における MAPK 経路の解析が必須である。この点については、本年度に研究基盤が整った Cre ドラ

イバーマウスおよび flox マウスを用いた骨格筋幹細胞特異的な遺伝子欠損により、次年度以降にその詳細を明らかにしていく。特に MPAK 経路の上流・下流因子の同定は、サルコペニアの予防法・治療法の開発を行う上で重要であり重点的な検討課題と言えるが、これまでに骨格筋幹細胞維持における bFGF の重要性を示した報告があることから

(Chakkalakal *et al.*, Nature. 2012)、MPAK 経路と bFGF との関わりについても今後検討する必要がある。また、個体老化により骨格筋幹細胞における MAPK 経路がどのような影響を受けるのか、等についても老齢動物や高齢者由来の検体を用いるなどして明らかにしていく必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hosoyama T, Ichida S, Kanno M, Ishihara R, Hatashima T, Ueno K, Hamano K. Microgravity Influences Maintenance of the Human Muscle Stem/Progenitor Cell Pool. **Biochem Biophys Res Commun.** 493: 998-1003. 2017.

2. 学会発表

- 1) 細山 徹、市田春治、神野正嗣、石原玲一、上野耕司、畑島敏勝、濱野公一 微小重力環境がヒト骨格筋前駆細胞維持に与える影響 第3回日本筋学会学術集会 2017年8月 東京
- 2) 細山 徹、橋本有弘 微小重力培養によるヒト骨格筋幹・前駆細胞維持機構の破綻 第5回若手による骨格筋細胞研究会 2017年11月 兵庫
- 3) 細山 徹 微小重力環境によるヒト骨格筋幹細胞維持機構の阻害 第63回日本宇宙航空環境医学会大会 2017年11月 福岡 (シンポジスト)

G. 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