

サルコペニアに対する治療薬開発のための不死化ヒト筋細胞を用いた検定系の開発

研究分担者 橋本 有弘

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所 再生再建医学研究部長

研究要旨 独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの、ヒト筋細胞に対する直接作用を解析した。アレンドロネートは、ヒト未分化筋細胞の増殖、遊走および筋分化を阻害した。しかし、最終分化した筋管細胞の生存および分化形質の発現には、影響を与えなかった。

A. 研究目的

加齢にともなう筋再生能力の低下は、サルコペニアの発症と密接に関わっていると考えられる。筋再生には、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の働きが必須である。サルコペニアにおける筋幹細胞の役割については、未だ不明の点が多いものの、「骨格筋幹細胞を標的としたサルコペニアに対する新たな予防法」の開発に期待が寄せられている。本分担研究では、独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、サルコペニアにおける治療薬を開発するための検定系を確立する。さらに、当研究班で見いだされた候補薬物の作用機序の解析を通じて、標準となる「ヒト筋細胞の機能検定法」の確立をめざす。

B. 研究方法

不死化ヒト筋細胞の培養

ヒトテロメラーゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺伝子およびヒト cyclin D1 遺伝子を導入・発現させることによって、未分化ヒト筋細胞を、分化能を保持したまま不死化した。本研究では、42 歳女性の骨格筋に由来する不死化ヒト筋細胞クローン Hu5/KD3 を解析に用いた。不死化ヒト筋細胞は、I 型コラーゲンを塗布したプラスチック培養皿に播き、37℃、10%CO₂ の気相下で静置培養した。培養液は、Primary myocyte growth medium (pmGM) [20% FCS, 2% Ultrosor G (Biosepra, PALL) in high-glucose (4.5 g/ml) DMEM] を用いた。筋分化を誘導する場合は、2x10⁵ 細胞を 90-mm 培養皿に播き、2 日後に培地を Primary myocyte differentiation medium (pmDM) [2% FCS, 5 µg/ml holo-transferrin (bovine), 10 µg/ml insulin, 10 nM selenite in hDMEM] に交換し、4-6 日間培養した。

筋分化の誘導および分化マーカーおよび増殖マーカーの検出

細胞を、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)で固定した後、分化マーカー-myosine heavy chain(MyHC)に対するモノクローナル抗体(MF20)あるいはトロポニンTに対する抗体と反応させた後、さらに HRP あるいは FITC 標識二次抗体と反応させた。核は DAPI あるいはヘマトキシリンによって対比染色した。

BrdU の取り込みによる DNA 合成細胞の検出

Hu5/KD3 を 10 µM BrdU を含む培地中で 4 時間標識し、PFA で固定後、塩酸処理、中和処理の後、抗 BrdU 抗体と反応させた。Cy3 標識二次抗体によって BrdU 陽性核を検出し、DAPI 染色による全核数に対する割合を算出した。

イムノプロット解析

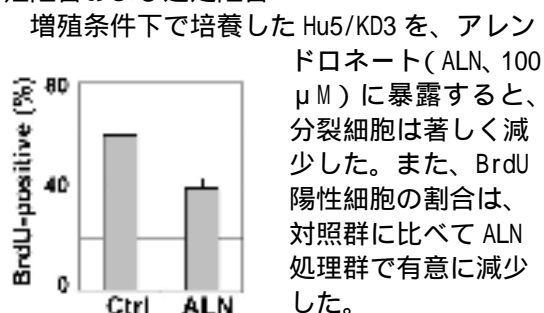
細胞を PBS で洗浄した後、1%SDS in HEPES-buffered saline で溶解した。細胞溶解液を SDS-PAGE (和光純薬、SuperSepAce) で分離後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは、特異抗体と incubation した後、アルカリ性フォスファターゼ標識 2 次抗体と反応させ、BCIP/NBT を基質とした発色法により、特異的タンパク質を検出した。

(倫理面への配慮)

ヒト骨格筋組織の採取に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を受けた。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

アレンドロネートによるヒト筋細胞の増殖阻害および遊走阻害

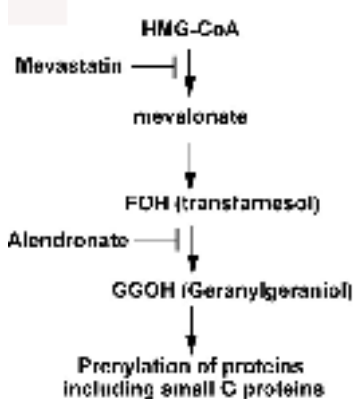


増殖条件下で培養した Hu5/KD3 を、アレンドロネート (ALN, 100 μ M) に暴露すると、分裂細胞は著しく減少した。また、BrdU 陽性細胞の割合は、対照群に比べて ALN 処理群で有意に減少した。

アレンドロネートによる BrdU 取り込み阻害

ALN 処理によって、Hu5/KD3 の形態は、平たく、縦に伸びた双極性紡錘形となり、lamellipodia 形成の阻害が認められた。タイムラップス観察の結果、対照群では活発な細胞遊走が見られるのに対し、ALN 処理群では、ヒト筋細胞の遊走は、完全に阻害されることが明らかになった。ALN 処理された細胞は、最終的に培養皿に生着し続けることが出来ず、やがて基質面から剥がれて死滅した。

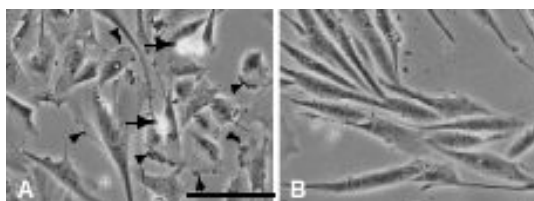
ALN の主な標的分子は、メバロン酸経路の酵素であると考えられている。未分化ヒト筋細胞に対する ALN の影響が、メバロン酸経路の阻害であるか否かを検討するため、mevastatin によってメバロン酸合成を阻害したところ、ALN と同様にヒト未分化筋細胞の形態は、ALN と同様に双極性紡錘形に変化し、細胞の増殖と遊走は、著しく阻害された。



メバロン酸経路におけるメバスタチンおよびアレンドロネートの作用点

この結果から、ALN は、未分化ヒト筋細胞の増殖および遊走を阻害することが示された。この阻害は、メバロン酸経路の阻害によるも

のと考えられる。



アレンドロネートによる、ヒト筋細胞の形態変化 対照群 (A) では分裂細胞 (矢印)、lamellipodia (矢頭) が認められるが、ALN 処理群 (B) では認められない。

アレンドロネートのレチノブラストーマ・タンパク質に対する影響

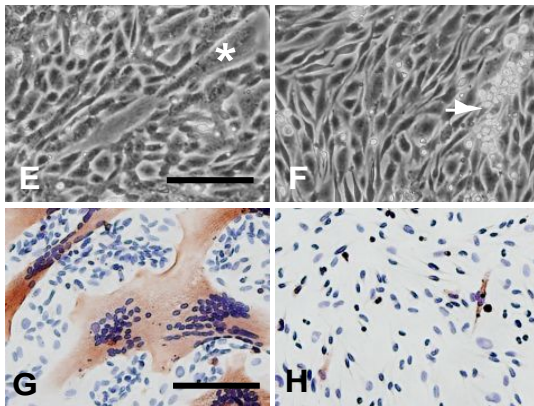
イムノブロット解析の結果、ALN は細胞周期調節因子レチノブラストーマ・タンパク質を活性化しないことが示された。一方、ALN は、低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのタンパク量を増大させることが明らかになった。タンパク量の増大は、特に RhoA で著しく、Rac1 および Cdc42 では、限定的だった。

アレンドロネートによる、未分化ヒト筋細胞の増殖阻害は、細胞周期調節因子に対する直接的な作用ではなく、ファルネシル化阻害による、Rho ファミリー・タンパク質の機能阻害の結果生じた二次的影響であることが示唆された。

アレンドロネートによるヒト筋細胞の分化阻害

未分化筋細胞 Hu5/KD3 を、高細胞密度で培養することによって、ALN による細胞の剥離を抑制できることがわかった。高密度で培養した Hu5/KD3 を、分化条件におくと、対照群では、細胞融合が誘導され、最終分化細胞である筋管細胞が形成された。筋管細胞では、分化マーカーである MyHC およびトロポニン T の発現が確認された。一方、ALN 処理群では、細胞は生存しているものの、筋管細胞形成および分化マーカーの発現は、完全に抑制された。

以上の結果から、ALN は、ヒト未分化筋細胞の最終分化を阻害することが明らかになった。

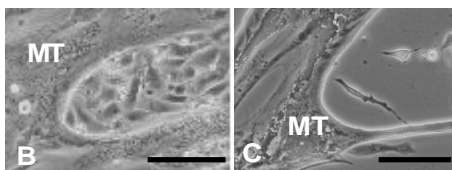


アレンドロネートによる、ヒト筋細胞の分化阻害 対照群 (E, G) では、筋管細胞(*)およびMyHCの発現(茶)が認められるが、ALN処理群(F, H)では認められない。

アレンドロネートによる未分化ヒト筋細胞の選択的機能阻害

ALNが未分化ヒト筋細胞の増殖と分化を阻害することが明らかになった。そこで、最終分化した筋管細胞に対するALNの影響を比較検討した。Hu5/KD3を分化条件下で培養し、筋管細胞を形成させた後、ALNに4日間暴露した。対照群では、筋管細胞の間に、残存する未分化筋細胞が多数認められた。ALN処理群では、筋管細胞は認められたが、未分化筋細胞は、著しく減少していた。筋管細胞におけるトロポニンTの発現は、ALNによって影響を受けなかった。

以上の結果から、最終分化した筋管細胞は、筋分化過程において、ALNに対する抵抗性を獲得することが示唆された。



アレンドロネートに対するヒト筋管細胞の抵抗性 対照群(B)でも、ALN処理群(C)でも、筋管細胞(MT)は、正常なものに対し、未分化筋細胞は、対照群(B)にのみ認められた。

(倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

D. 考察

骨粗鬆症治療薬アレンドロネートは、破骨

細胞の機能を抑制することによって、骨密度の上昇をもたらすと考えられている。最近、原田らは、ALNを投与した骨粗鬆症患者の筋量が増加傾向を示すことを報告した。

ALNは、速やかに骨基質に取り込まれ、そのままでは、どの細胞にも作用を及ぼさないと考えられている。しかし、破骨細胞による骨吸収の際に骨基質から溶出し、破骨細胞に取り込まれて、その機能を阻害する。

骨格筋は、骨組織に近接しており、ALNを投与中の骨粗鬆症患者では、慢性的に低濃度のALNに曝されている可能性がある。

本研究の結果、ALNが未分化ヒト筋細胞の増殖と遊走を阻害することが明らかになった。一方、アポトーシスの特徴は見いだされなかった。ALNは、ラット筋芽細胞株L6にアポトーシスを誘導すると報告されているが、ALNはヒト未分化筋細胞に直接作用してアポトーシスを誘導することはないと考えられる。L6細胞におけるアポトーシスは、細胞が培養基質面から剥離した結果、二次的に誘導されたanoikisではないかと考えられる。

私たちは、最終分化したヒト筋管細胞が、ALNに対して抵抗性を示すことを明らかにした。従来、ALNは、ラット筋芽細胞に細胞死を誘導するというin vitroでの解析結果と、ラットの筋機能に影響はないとするin vivoの解析結果が報告されており、矛盾する結果の意味は明らかではなかった。私たちの解析結果は、これらの相反する従来の報告に合理的な解釈を与えるものである。

本研究は、ALNの骨格筋に対する作用について、重要な二つの仮説を提示する。

- (1) 長期間ALNを投与された骨粗鬆症患者では、筋再生能力が低下している可能性がある。したがって、ALN投与中の筋組織へ外傷は、禁忌としなければならない。
- (2) 筋線維は、ALNに対して耐性であると考えられるので、筋機能の低下は、ALN治療における制限要因とはならない。

本研究の結果は、ALNを投与中の骨粗鬆症患者ALNに認められた筋量の増加が、筋細胞に対する直接効果ではないことを示唆している。しかし、ALNの二次的作用によって、筋機能が改善される可能性は十分にあり、今後の検討課題のひとつである。

E. 結論

サルコペニアに対する治療薬開発のためのスクリーニングに有用な実験系を確立し、候

補薬物のヒト筋細胞に対する直接作用を明らかにすることができた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiomi K, Nagata Y, Kiyono T, Harada A, Hashimoto N. Differential Impact of the Bisphosphonate Alendronate on Undifferentiated and Terminally Differentiated Human Myogenic Cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 66(3): 418-427, 2014.

2. 学会発表

永田有希、橋本有弘. ディシェンヌ型筋ジストロフィー由来ヒト筋細胞に特異的な「NotchとNF-kappaBのクロストーク」は、増殖・分化能の低下に關与する第27回日本整形第36回日本分子生物学会 2013.12、神戸.

塩見浩介、橋本有弘. グルココルチコイドは、ヒト筋細胞を酸化ストレスから防御する第36回日本分子生物学会 2013.12、神戸.

Naohiro Hashimoto. Glucocorticoid is essential to proliferation of human myogenic cells. Myogenesis Gordon Conference July 7-12, 2013, Lucca, Italy.

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