

【総説】

老年性筋疾患研究における iPS 細胞の利用とその有用性

細山 徹

国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部

要約

超高齢社会を迎えた我が国において、加齢性筋萎縮「サルコペニア」に対する予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。しかし、臨床からの概念であるサルコペニアの基礎的な理解は進んでおらず、発症機序を含むサルコペニアの本態解明が強く望まれる。一方で近年、加齢に伴う骨格筋幹細胞の維持機構の破綻とサルコペニア発症との関連性が指摘されており、本態解明の標的の一つとして注目されている。しかしヒトにおいては、バイオプシーによる筋採取では得られる骨格筋幹細胞はごく微量であり、詳細な解析は困難である。自己細胞から作製される iPS 細胞は標的細胞を比較的大量に供給することが可能であり、希少な骨格筋幹細胞の詳細な解析を可能にすると期待されている。本項では、ヒト骨格筋幹細胞の供給源としての iPS 細胞の可能性について概説し、サルコペニアの本態解明における *in vitro* モデルとしての iPS 細胞由来骨格筋細胞の可能性について考察する。

キーワード：sarcopenia, skeletal muscle stem cells, induced pluripotent stem cells, stem cell maintenance

1：骨格筋老化と幹細胞

成人体重の約 40% を占める骨格筋は、最大のエネルギー産生組織であり、高い収縮特性を有することから、歩く、物を運ぶといった日常生活を送るうえで重要である。一方、体内の組織恒常性維持に関与する種々の液性因子(マイオカイン)を産生することが近年明らかになってきており、単なる運動器としての役割だけでなく分泌器官としても重要な役割を果たしている^[1]。

我々の身体は加齢に伴い“成長(成熟)”し、やがて“衰え”ていくが、骨格筋も例外ではなく、加齢という身体的変化に伴って萎縮(量的変化)や収縮能の低下(質的变化)が生じ、運動機能ばかりでなく他臓器(器官)の恒常性維持にも影響を与える。このような加齢に伴う骨格筋の減弱はサルコペニア(ギリシャ語で、サルコは骨格筋、ペニアは喪失を意味する)と呼ばれ、我が国にお

いても診断基準の決定とともに注目されている^[2,3]。特に近年の臨床的検証から、加齢に伴って生じる筋萎縮・筋量低下・筋力低下などを一次性サルコペニア(骨格筋が病態の起点となるもの)、加齢に伴って生じる種々の身体的変化により結果として筋萎縮等が生じる二次性サルコペニア(骨格筋以外の組織・臓器の状態変化が起点となり、結果として筋萎縮などの病態が引き起こされるもの)が提案されている^[4]。しかしながら、サルコペニアは臨床からの概念であり、発症機序を含む詳細な分子機構は不明である^[2,5,6]。すなわち、サルコペニアの予防法や治療法を開発する上では、「サルコペニアの本態」についてその発症の分子機構を明らかにする必要がある。

骨格筋の持つ重要な特性として、先に挙げたエネルギー産生、収縮特性および内分泌能に加えて「高い再生能」も挙げられ、軽微な筋損傷であれば直ちに修復し得る能力を有する。この骨格筋の再生過程において重要な役割を果たすのが筋サテライト細胞である^[7]。筋サテライト細胞は、その名のとおり“衛星”として筋線維に接着している単核の細胞であり、筋損傷や筋成長といった外的刺激を受容すると、休止状態から活性化状態へと移行し、新たな筋細胞を作り出す(図 1)。この筋再生

連絡先：細山徹 〒474-8511
愛知県大府市森岡町 7-430
TEL：0562-46-2311
E-mail：toruhoso@ncgg.go.jp

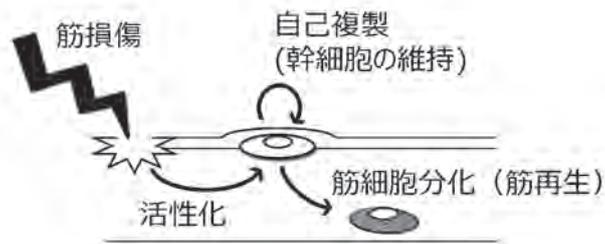


図1. 筋サテライト細胞による骨格筋恒常性維持

休止状態で筋線維の基底膜下に存在する筋サテライト細胞は、筋損傷などの刺激により活性化し、損傷部を修復する為に筋芽細胞へと分化する（筋再生）。一方、自己複製により幹細胞プールを維持し、次の活動に備える（幹細胞の維持）。

の過程は、筋サテライト細胞の活性化→筋芽細胞への分化運命決定・増殖→筋芽細胞の筋線維への融合→筋線維の成熟、を経ると考えられている。また筋サテライト細胞は、一過的に筋細胞へと分化する（筋細胞を供給する）ばかりでなく、自己複製により幹細胞プールを維持し次の動員に備えるために再び眠り（G0期）につく。すなわち筋サテライト細胞は、成体骨格筋における幹細胞として働き、一生涯に渡り我々の骨格筋の恒常性を制御している^[8]。

マウスを用いた近年の報告では、老化に伴い筋サテライト細胞の数と機能が低下（量的・質的な変化）する可能性が指摘されており、サルコペニア発症との関連性が注目されている^[9]。これらの報告では、加齢に伴う筋サテライト細胞におけるオートファジー系の活性化、あるいは、加齢に伴う筋線維と筋サテライト細胞との相互作用の変化、などが示されており、加齢に伴う筋サテライト細胞の内的・外的な変化が要因として指摘されている^[10,11]。また最近、加齢に伴ってヒト筋サテライト細胞のゲノム中に変異が蓄積していくという興味深い知見も報告されており、加齢に伴って骨格筋幹細胞の維持制御機構が破綻し結果としてサルコペニアが発症するという仮説を支持する^[12]。一方、Petersonらは、筋サテライト細胞特異的にジフテリア毒を発現させ生後の骨格筋において幹細胞を枯渇させる手法を用いて、筋サテライト細胞を有する老齢マウスと筋線維径などに差が無いという興味深い結果を報告している^[13]。このことは、筋サテライト細胞がサルコペニア発症に積極的には関与しないことを示唆しており、定説を覆す驚くべき結果である。しかしこの報告は、あくまでもマウスでの結果であり、ヒトに当てはめることが出来るか否かは今のところ不明である。また現在までのところ、別グループによる追試結果や同グループによる続報も出ておらず、加齢に伴う筋萎縮と筋サテライト細胞の質的・量的変化に関するこれまでの研究結果との整合性についても結論が出ていない。いずれにせよ、加齢に伴う筋サテライト細胞の数と質の低下は、複数の研究グループによりコンセンサスが得られている信ぴょう性の高いものであることから、サルコペニア発症との間に何らかの関連性があるのは間違いない。しかし、そもそも若齢期においてさえも骨格筋幹細胞が如何に維持されているかは明らかに

なっており、近年の骨格筋幹細胞研究の大きなトピックとなっている。言い換えれば、成体骨格筋における幹細胞プールの維持制御機構が明らかになれば、老齢個体で生じる筋サテライト細胞の量的・質的变化とサルコペニア発症との関連性について重要な示唆を与えることができる。

しかしながら、成体骨格筋内に存在する筋サテライト細胞は微量であり、また未分化性（幹細胞性）を維持した状態での解析が困難である。すなわち、詳細な解析を行う研究対象として、希少性と扱いづらさの両面において高いハードルが存在する。更にヒトにおいては、筋バイオプシーにより得られる筋サテライト細胞数は極めて限定的であり、解析を行うのはさらに困難になる。それ故に、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の維持制御機構および加齢との関連性について詳細に解析するには、まとまった数の幹細胞を得る方法論を確立する必要がある。

2：骨格筋幹細胞の供給源としての iPS 細胞

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、体細胞を初期化することで樹立される多能性細胞であり、胎盤以外の全ての細胞へと分化することができる^[14]。実際に、神経細胞や心筋細胞といった様々な細胞種へと分化し得ることが報告されており、患者由来 iPS 細胞から分化誘導した網膜色素上皮細胞の滲出性加齢黄斑変性症患者への自家移植は記憶に新しい^[15]。iPS細胞を用いた応用研究としては、失われた細胞を補完する再生医療と in vitro 疾患モデル化（Disease modeling：特に遺伝性疾患が対象となる）による病態解明・薬剤スクリーニングが広く知られているが、他にも骨格筋幹細胞のような希少細胞種の動態解析への応用も期待される。すなわち、iPS細胞由来細胞を供給源として得られた骨格筋幹細胞を用いることで、前項で述べた「ヒト骨格筋幹細胞の維持制御機構」に対する詳細な解析が可能となる。しかし、多能性幹細胞からの骨格筋系譜細胞の分化誘導研究は、神経細胞や心筋細胞ほどは進んでおらず、再現性のある高効率な分化誘導プロトコルの確立が必要である。

ヒト多能性幹細胞から特定の細胞を分化誘導する方法論としては、主に積み重ねられてきたマウス発生研究

の情報をもとに、発生段階の転写因子発現パターンを模倣する方法が一般的である。骨格筋の場合は、胚発生初期に発現するペアードボックス型転写因子 (paired-box transcriptional factor: Pax) と筋制御因子 (muscle regulatory factors: MRFs) を起点に筋発生が進行する為、これらの転写因子を指標に多能性幹細胞から筋細胞を誘導していく場合が多い。実際、我が国の iPS 細胞研究の拠点である CiRA (京都大学 iPS 細胞研究所) の研究グループは、ヒト多能性幹細胞に MyoD を導入することで高効率に筋細胞分化を誘導することに成功している^[16]。しかしながら、MyoD 導入により誘導された筋細胞は、骨格筋幹細胞よりもより分化ステージの進んだ筋芽細胞であり、希少な骨格筋幹細胞を得るという目的にはそぐわない。一方、米国ミネソタ大学の研究グループは、マウスやヒトの多能性幹細胞においてドキシサイクリン誘導性に Pax3 もしくは Pax7 を過剰発現させて分化効率を上げる方法を開発し、FACS 技術を組み合わせるなどして高濃度の骨格筋幹細胞 (発生期の前駆細胞も含む) の入手に成功している^[17,18]。また外来遺伝子導入を用いず、マウス発生研究の情報を参考に種々の細胞成長因子を段階的に添加する方法 (胚発生に忠実な方法) も報告されており、Pax7 や MyoD などの骨格筋系譜細胞マーカーの発現も認められることから、外来遺伝子の影響を考慮する必要のないより安全な方法として期待されている^[19,20]。方法論としては、細胞成長因子の添加による中胚葉の誘導を皮切りに、段階的に筋節および骨格筋前駆細胞 (骨格筋幹細胞) を分化誘導していく。CiRA の桜井らは、種々の成長因子の添加によりまず PDGFR- α 陽性の沿軸中胚葉を誘導し、そこから更に骨格筋幹細胞を誘導することに成功している^[21]。しかし、桜井らの方法も含め同様の現行法では分化誘導効率

が低く、また複雑なプロトコルであるために、更なる改善が求められる^[22]。一方、近年では、低分子化合物を添加することにより中胚葉への分化を強力に誘導した後に、種々の細胞成長因子を段階的に加えていくという方法が世界的潮流である。本法は、Pax7 陽性細胞 (骨格筋幹細胞) への高い誘導効率も期待されることから^[23,24]、別の研究グループによる追試により再現性が確認されれば、効率の良い骨格筋幹細胞分化誘導法として定着する可能性がある。

またこれまでに報告されているいくつかの方法においては、筋ジストロフィーなどの患者由来 iPS 細胞から骨格筋細胞を誘導することに成功しており、iPS 細胞技術を用いた遺伝性筋疾患の *in vitro* 疾患モデル化への利用が期待されている^[16,25,26]。

3: EZ スフィア法によるヒト多能性幹細胞からの高効率骨格筋幹細胞の分化誘導

一方、筆者らは、これまでとは異なる方法によりヒト多能性幹細胞から簡便かつ高効率に骨格筋幹細胞様細胞 (厳密には発生期で認められる Pax7 陽性の骨格筋前駆細胞) を誘導することに成功しており、希少な骨格筋幹細胞を得る新たな方法として期待される^[25]。

筆者らが開発した新しい骨格筋幹細胞分化誘導法—EZ スフィア法—は、スフィア培養法 (浮遊培養により細胞塊を形成させる方法) を基盤としており、平均で約 6 週間の浮遊培養により 50 ~ 60% の細胞で骨格筋幹細胞マーカー (CD56⁺/CD82⁺ あるいは Pax7) の発現が認められる (図 2)。同様の浮遊培養形態として胚様体 (Embryoid Body) 形成法が良く知られるが、細胞塊内部で細胞増殖がほとんど起こらない胚様体と比べて、本法ではスフィア内での盛んな細胞増殖が認められる。こ

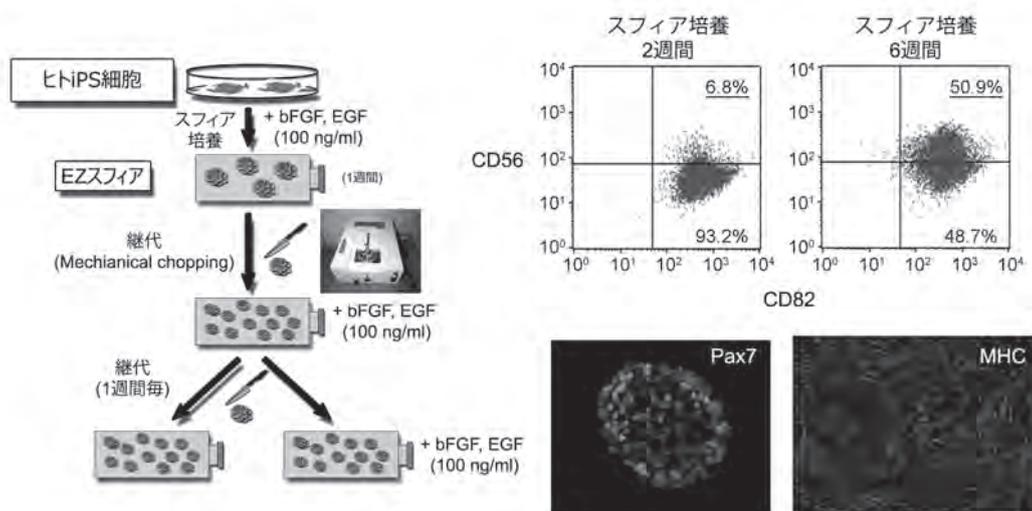


図 2. EZ スフィア法を用いたヒト iPS 細胞からの骨格筋幹細胞の誘導
 (左) EZ スフィア法の流れ。未分化ヒト iPS 細胞を高濃度 bFGF/EGF を含む Stemline 培地中で浮遊培養する。1 週間ごとに機械的裁断法 (Mechanical Chopping) でスフィアを継代する。
 (右上) スフィア培養 2 週間後と 6 週間後の FACS 解析。骨格筋幹細胞マーカーとして CD56 と CD82 を使用。
 (右下) スフィア培養 6 週間後のスフィアにおける Pax7 発現と接着培養に移行後の MHC 発現。

これは、培地に添加した高濃度の bFGF と EGF（通常使用の 5～10 倍高濃度）が未分化多能性幹細胞からの筋細胞系譜への分化を誘導するばかりでなく、細胞増殖も伴うことによると考えられる（形態イメージとしては、胚様体が風船で EZ スフィアが野球の硬球）。それ故に、形成された細胞塊（スフィア）は培養期間中に徐々に成長していき、胚様体法では通常行われない継代が可能である。EZ スフィアの継代は、トリプシンなどの酵素を使わずに機械的裁断法（Mechanical Chopping 法）が用いられる。すなわち、酵素処理により単一細胞の状態にせず、裁断により 10～15 個程度の細胞で構成される小さな細胞塊を作り出して継代する。培養期間中には個々の骨格筋幹細胞から種々の細胞外マトリックスや液性因子が産生され、「幹細胞ニッチ様構造」を形成していることが予想されることから、裁断法を用いることでこの構造を維持した状態で継代することが出来る。幹細胞ニッチは、骨格筋幹細胞の未分化性や休止状態の維持に重要であるとされることから^[27]、裁断法を用いることで未分化維持効果が期待される。また本法で採用している浮遊培養法は接着培養法に比べて細胞の大量培養に適しており、多能性幹細胞から大量の骨格筋幹細胞を得ることも可能である。

このように、EZ スフィア法は極めて簡便な方法であり、特別な技術や経験を必要としない（ヒト多能性幹細胞の適切なハンドリング技術は必要）。そのため誰にでも比較的容易に使いこなせると予想される。実際、我々とは別の研究グループによって再現性が確認されており^[28]、骨格筋幹細胞の供給およびその応用研究を行う上で有力な選択肢となり得る。また最近、本法に低分子化合物添加を組み合わせるにより iPS 細胞株間での分化誘導効率のバラツキを抑え得ることが報告され^[29]、EZ スフィア法がよりロバストな骨格筋幹細胞の分化誘導法となり得ることを示している。

4：骨格筋幹細胞の短期間未分化維持モデルとしての EZ スフィア法

前述のように、様々な方法によりヒト iPS 細胞から骨

格筋幹細胞を分化誘導することが可能になりつつあり、希少な骨格筋幹細胞の維持制御機構を明らかにする上で iPS 細胞が有用な細胞供給源として認識されつつある。その一方で、骨格筋幹細胞を未分化状態のまま維持する方法は確立されていないという課題もある^[30]。すなわち、ヒト多能性幹細胞からの骨格筋幹細胞の分化誘導は一過性であり、培養期間中に分化が進行（＝筋芽細胞へ分化）し幹細胞プールを維持することができない。これは、解析に必要な骨格筋幹細胞をその都度ヒト iPS 細胞から分化誘導する必要があることを意味しており、手間やコスト面などにおいて大きなハードルとなり得る。近年の報告では、細胞培養時に筋線維膜や幹細胞ニッチの構成成分である細胞外マトリックス（あるいはその代用物）を利用することで、単離した筋サテライト細胞の未分化状態を維持できる可能性が示されている^[31,32]。現状、これら細胞外マトリックス成分のヒト多能性幹細胞由来骨格筋幹細胞における有用性は確認されておらず、また、誰にでも手軽に検討できる実用段階のものはないが、細胞を取り巻く環境（ニッチ）を調節することにより、骨格筋幹細胞の未分化性をある程度までは維持できることを示唆しており、より汎用性の高い新たな培養法あるいはデバイスの開発が期待される。

骨格筋幹細胞は、細胞外マトリックスを自己分泌し幹細胞ニッチを形成することから^[27]、EZ スフィア法によって形成された骨格筋幹細胞スフィアにおいても最低限の幹細胞ニッチが形成され、幹細胞の未分化状態が維持できる環境にあると予想される。そこで、EZ スフィア法を用いてヒト iPS 細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞スフィアを、同じ培養条件でさらに 6 週間培養（12 週間の培養期間）し、長期スフィア培養の未分化幹細胞に与える影響について検討した。しかしながら、予想に反し、培養 6 週間にピークを迎えていたヒト iPS 細胞由来骨格筋幹細胞は、培養期間の延長に伴いスフィア内部で筋分化が進行してしまい、培養 12 週の時点では骨格筋幹細胞がほとんど確認できなくなった（図 3A）。このことは、分化誘導後の骨格筋幹細胞を長期間維持する上では EZ スフィア法が不十分な方法であることを示

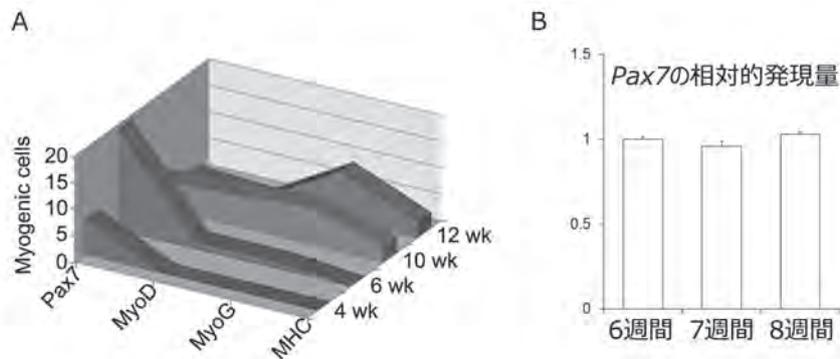


図 3. EZ スフィア法による培養時の Pax7 発現量の変化

(A) EZ スフィア培養 4～12 週間の細胞分布の変遷。Pax7 は骨格筋幹細胞を示す。

培養期間の延長により筋分化が進行してしまい、幹細胞プールは枯渇する。

(B) EZ スフィア培養 6～8 週間の Pax7 遺伝子の発現変化。幹細胞の分化誘導後 2 週間はスフィア内に幹細胞集団が保たれることを示唆している。

している。しかし一方で、EZ スフィア法の培養6週～8週の間は、一度分化誘導された骨格筋幹細胞がスフィア内に維持されることも確認した(図3B)。現在までのところそのメカニズムは明らかではないが、この結果は、ヒトiPS細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞を短期間であればスフィア内部に維持できることを示しており、EZ スフィア法が骨格筋幹細胞の維持制御機構を明らかにするための短期間培養モデル系になり得ることを示唆している^[33]。ミネソタ大学の研究グループによるPax7過剰発現系による骨格筋幹細胞分化誘導法に関する報告では、分化誘導24日目には出現したPax7陽性骨格筋幹細胞が誘導30日には筋細胞分化のステージに入ると述べられており^[34]、EZ スフィア法は幾分か長い間幹細胞プールを維持できるものと思われる。

5: 高齢者由来iPS細胞を用いたサルコペニア研究の可能性

これまで述べてきたように、iPS細胞技術は希少なヒト骨格筋幹細胞の供給源として有用であり、iPS細胞由来ヒト骨格筋幹細胞をモデル系として、サルコペニア患者において破綻するとされる「幹細胞プールの維持制御機構」の解明を進めることも可能である。しかし、この研究アプローチは、あくまでも「一般的な」骨格筋幹細胞の維持制御に関するものであり、高齢者iPS細胞を用いた同様の検証が有効であるか否かは不明である。この点は、遺伝性疾患研究において最もその効力を発揮するiPS細胞技術が、遺伝的要因が少ないと考えられるサルコペニアの研究に不向きであると危惧されてきた点でもある。しかし近年、「高齢者由来筋サテライト細胞におけるゲノム変異の蓄積」といった新たな事象も報告されたことから、今後、高齢者iPS細胞から誘導した骨格筋幹細胞を用いた研究にも応用の幅が広がる可能性が出てきた。この報告では、高齢者から単離した筋サテライト細胞クロンの全ゲノムシーケンス解析により、ゲノム当たり年間で13か所に変異が蓄積していくことが示されており、これらの変異部位にはエクソンやプロモーター領域も含まれるとされる^[13]。このことは、骨格筋幹細胞のゲノムにおける変異が、骨格筋幹細胞の性質に影響を及ぼす可能性を示しているが、現在までのところその関連性は不明である。

骨格筋幹細胞の希少性(高齢者では尚更採取は困難)がゲノム変異蓄積に対する研究を難しくしている一要因であると考えられるが、iPS細胞の樹立は年齢に関係なく可能であり、EZ スフィア法を含めiPS細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導方法も確立されつつある現在であれば、高齢者iPS細胞から誘導したヒト骨格筋幹細胞を用いたゲノム変異研究は十分可能である(ただし、高齢者iPS細胞ではゲノム不安定性の惹起などの異常が頻発すると言われており、これら背景因子に対する対策が必要)^[35]。また、体細胞におけるゲノム(あるいはエピゲノム)レベルでの変異がiPS細胞化しても持ち込まれることは、多くの遺伝性疾患研究で証明されており^[36,37]、

高齢者骨格筋幹細胞で見られるゲノム変異蓄積の表現型についても再現されると予想される。

6: おわりに

骨格筋老化研究におけるiPS細胞技術の位置づけは、互いに相反する関係のように思われる。しかし、幹細胞レベルで加齢に伴うゲノム変化(変異)が生じる可能性が示されたことから、今後その状況は変化していくと予想される。本項で述べてきたように、iPS細胞からの骨格筋幹細胞の分化誘導は確立されつつある為、幹細胞でのゲノム変異の蓄積という「病態」の再現が確認されれば、高齢者iPS細胞由来の骨格筋幹細胞は一種の「in vitroサルコペニア疾患モデル」となる可能性がある。このモデルを用いることで、骨格筋幹細胞ゲノムに蓄積される変異の挿入機序やそれに伴う幹細胞への影響の一端が明らかになり、さらに筋サテライト細胞特異的な遺伝子改変マウスなどによる発生工学やEZ スフィア法による短期間骨格筋幹細胞未分化維持モデルとの併用により、サルコペニアの本態解明およびその予防法の開発へ大きく前進するものと期待される。

参考文献

- 1) Karstoft K, Pedersen BK. Skeletal muscle as a gene regulatory endocrine organ. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 19: 270-275. 2016.
- 2) Rosenberg I. Summary comments: epidemiological and methodological problems in determining nutritional status of older persons. *Am J Clin Nutr.* 50:1231-1233. 1989.
- 3) Arai H et al., Clinical guidelines for sarcopenia. *Geriatr Gerontol Int.* 18 Suppl 1: 5-44. 2018.
- 4) Shimokata H, Shimada H, Satake S, Endo N, Shibasaki K, Ogawa S, Arai H. Chapter 2 Epidemiology of sarcopenia. *Geriatr Gerontol Int.* 18 Suppl 1:13-22. 2018.
- 5) Rosenberg IH. Sarcopenia: origins and clinical relevance. *J Nutr.* 127: 990S-991S. 1997.
- 6) Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *J Lab Clin Med.* 137: 231-243. 2001.
- 7) Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9: 493-495. 1961.
- 8) Chargé S, Rudnicki MA. Fusion with the fused: a new role for interleukin-4 in the building of muscle. *Cell.* 113: 422-423. 2003.
- 9) Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Regenerative decline of stem cells in sarcopenia. *Mol Aspects Med.* 50: 109-117. 2016.
- 10) Roza M, Li L, Fan CM. Targeting β 1-integrin signaling enhances regeneration in aged and dystrophic muscle in mice. *Nat Med.* 22: 889-896. 2016.
- 11) García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero

- E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, Ruiz-Bonilla V, Gutarra S, Ballestar E, Serrano AL, Sandri M, Muñoz-Cánoves P. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 529: 37-42. 2016.
- 12) Franco I, Johansson A, Olsson K, Vrtačnik P, Lundin P, Helgadottir HT, Larsson M, Revêchon G, Bosia C, Pagnani A, Provero P, Gustafsson T, Fischer H, Eriksson M. Somatic mutagenesis in satellite cells associates with human skeletal muscle aging. *Nat Commun*. 9: 800. 2018.
 - 13) Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat Med*. 21: 76-80. 2015.
 - 14) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-676. 2006.
 - 15) Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiya Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 376: 1038-1046. 2017.
 - 16) Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, Fujii N, Hanaoka K, Era T, Yamashita S, Isobe K, Kimura E, Sakurai H. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One*. 8: e61540. 2013.
 - 17) Darabi R, Gehlbach K, Bachoo RM, Kamath S, Osawa M, Kamm KE, Kyba M, Perlingeiro RC. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med*. 14: 134-143. 2008.
 - 18) Darabi R, Arpke RW, Irion S, Dimos JT, Grskovic M, Kyba M, Perlingeiro RC. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell*. 10: 610-619. 2012.
 - 19) Barberi T, Bradbury M, Dincer Z, Panagiotakos G, Socci ND, Studer L. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med*. 13: 642-648. 2007.
 - 20) Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada S, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 24: 2245-2253. 2010.
 - 21) Sakurai H, Sakaguchi Y, Shoji E, Nishino T, Maki I, Sakai H, Hanaoka K, Kakizuka A, Sehara-Fujisawa A. In vitro modeling of paraxial mesodermal progenitors derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 7: e47078. 2012.
 - 22) Awaya T, Kato T, Mizuno Y, Chang H, Niwa A, Umeda K, Nakahata T, Heike T. Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 7: e51638. 2012.
 - 23) Shelton M, Metz J, Liu J, Carpenedo RL, Demers SP, Stanford WL, Skerjanc IS. Derivation and expansion of PAX7-positive muscle progenitors from human and mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*. 3: 516-29. 2014.
 - 24) Chal J, Oginuma M, Al Tanoury Z, Gobert B, Sumara O, Hick A, Bousson F, Zidouni Y, Mursch C, Moncuquet P, Tassy O, Vincent S, Miyanari A, Bera A, Garnier JM, Guevara G, Hestin M, Kennedy L, Hayashi S, Drayton B, Cherrier T, Gayraud-Morel B, Gussoni E, Relaix F, Tajbakhsh S, Pourquié O. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nat Biotechnol*. 33: 962-969. 2015.
 - 25) Hosoyama T, McGivern JV, Van Dyke JM, Ebert AD, Suzuki M. Derivation of myogenic progenitors directly from human pluripotent stem cells using a sphere-based culture. *Stem Cells Transl Med*. 3: 564-574. 2014.
 - 26) Shoji E, Sakurai H, Nishino T, Nakahata T, Heike T, Awaya T, Fujii N, Manabe Y, Matsuo M, Sehara-Fujisawa A. Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 5: 12831. 2015.
 - 27) Baghdadi MB, Castel D, Machado L, Fukada SI, Birk DE, Relaix F, Tajbakhsh S, Mourikis P. Reciprocal signalling by Notch-Collagen V-CALCR retains muscle stem cells in their niche. *Nature*. 557: 714-718. 2018.
 - 28) Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H,

- Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Reports*. 7: 263-278. 2016.
- 29) Sakai-Takemura F, Narita A, Masuda S, Wakamatsu T, Watanabe N, Nishiyama T, Nogami K, Blanc M, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y. Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci Rep*. 8: 6555. 2018.
- 30) Montarras D, Morgan J, Collins C, Relaix F, Zaffran S, Cumano A, Partridge T, Buckingham M. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*. 309: 2064-2067. 2005.
- 31) Gilbert PM, Havenstrite KL, Magnusson KE, Sacco A, Leonardi NA, Kraft P, Nguyen NK, Thrun S, Lutolf MP, Blau HM. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*. 329:1078-1081. 2010.
- 32) Ishii K, Sakurai H, Suzuki N, Mabuchi Y, Sekiya I, Sekiguchi K, Akazawa C. Recapitulation of Extracellular LAMININ Environment Maintains Stemness of Satellite Cells In Vitro. *Stem Cell Reports*. 10: 568-582. 2018.
- 33) 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.
- 34) Magli A, Incitti T, Kiley J, Swanson SA, Darabi R, Rinaldi F, Selvaraj S, Yamamoto A, Tolar J, Yuan C, Stewart R, Thomson JA, Perlingeiro RCR. PAX7 Targets, CD54, Integrin $\alpha 9\beta 1$, and SDC2, Allow Isolation of Human ESC/iPSC-Derived Myogenic Progenitors. *Cell Rep*. 19: 2867-2877. 2017.
- 35) Strässler ET, Aalto-Setälä K, Kiamehr M, Landmesser U, Kränkel N. Age Is Relative-Impact of Donor Age on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cell Functionality. *Front Cardiovasc Med*. 5:4. 2018.
- 36) Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457: 277-280. 2009.
- 37) Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 143: 527-539. 2010.

Applications of induced pluripotent stem cells for age-related muscle diseases

Tohru Hosoyama

Department of Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology.

Abstract

Development of prevention and treatment for age-related muscular atrophy "sarcopenia" is an urgent issue in Japan, which has entered a super-aging society. However, the basic understanding of sarcopenia, which is a concept from clinical practice, has not progressed, and elucidation of the essential status of sarcopenia including disease onset mechanism is strongly desired. On the other hand, in recent years, the relationship between dysregulation of maintenance mechanism of skeletal muscle stem cells accompanying aging and the occurrence of sarcopenia has been pointed out and attracted attention as one of the targets to elucidate sarcopenia. However, in humans, skeletal muscle stem cells obtained by muscle biopsy are very rare and detailed analysis is difficult. Induced pluripotent stem (iPS) cells developed from autologous somatic cells can supply target cells in a relatively large amount and are expected to enable detailed analysis of rare skeletal muscle stem cells. This section outlines the possibility of iPS cells as a source of human skeletal muscle stem cells and discusses the possibility of iPS cell-derived skeletal muscle cells as an *in vitro* model in the elucidation of sarcopenia.

Keywords : sarcopenia, skeletal muscle stem cells, induced pluripotent stem cells, stem cell maintenance