

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14663

研究課題名（和文）Establishing a non-invasive real-time Ca²⁺ imaging with optogenetics-induced muscle stimulation in skeletal myotubes using DMD patient-derived iPSC研究課題名（英文）Establishing a non-invasive real-time Ca²⁺ imaging with optogenetics-induced muscle stimulation in skeletal myotubes using DMD patient-derived iPSC

研究代表者

内村 智也（Uchimura, Tomoya）

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：50815222

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：Duchenne muscular dystrophyは筋力の低下を伴う筋疾患の1つである。DMD治療薬の開発には、筋収縮に特化した機能性評価モデルの開発及び、他検体同時解析方法が必要である。本研究では、DMD患者由来iPS細胞を用いて、光刺激による筋収縮測定モデルの系の構築をin vitroで行った。従来使用されてきた電気刺激と異なり、光刺激を用いることでスクリーニングに対応する96-well formatでの試験を可能とし、更に筋収縮とカルシウム動態の同時測定も可能になった。今後は、化合物ライブラリーを用いたスクリーニングをする事によって、新規化合物の発見が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Duchenne muscular dystrophyは依然として、有効な治療薬が限られている筋疾患の1つであり、iPS細胞を用いた新規創薬が期待されている。本研究では、従来使用されてきた電気刺激に代わり光遺伝子技術を用いる事で、患者病態を再現している筋収縮力の低下を指標とした創薬スクリーニングをiPS細胞レベルで可能とした。その結果、より多くの化合物を評価する事が可能となり、新規化合物の発見が期待される。

研究成果の概要（英文）：Duchenne muscular dystrophy is characterized by the reduction of contractile performance. For the drug development, it is necessary to establish a disease model that can assay muscle functions as well as many samples in the same plate. In this study, we established an in vitro model evaluating contractile performance using optogenetics and DMD-derived iPSC. Compared to electrical field systems, using optogenetics enables us to assay in high-throughput compatible system as well as measuring calcium mobilization. In the future, it is highly expected to identify new candidates of compounds to treat DMD through performing screening using middle-scale library.

研究分野：骨格筋

キーワード：iPS細胞 骨格筋 収縮 筋疾患 光刺激

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

研究開始当時、DMD 患者由来 iPS 細胞から分化させた骨格筋細胞を電気刺激を用いて刺激する事で、成熟化させたり収縮させたりすることは可能であった。しかし、電気刺激を行うための機器が 6-well 対応とあり、throughput が低いのが limitation であった。そこで、neuroscience の分野で主に用いられていた、光遺伝子技術を用いる事を思いつた。この技術を用いる事で、より毒性が低くかつ簡便に他検体を同時に解析する事が可能になるのではないかと考えた事が背景にある。加えて、カルシウムインジケーターを同時に用いる事で、収縮力とカルシウム動態を同時に解析する事が可能になるのではないかと考えた。

2．研究の目的

研究の目的として、光遺伝子技術を用いて電気刺激と同等の解析が可能になる事、96-well microplate 以上のプレートで系を樹立しスクリーニングへの道筋を作ることである。特に、光遺伝子技術が本当に電気刺激の代替技術となるのか、を焦点に研究を進めてきた。

3．研究の方法

骨格筋細胞の分化には、DMD 患者由来 iPS 細胞を Doxycycline-inducible MyoD overexpression の技術を用いた（図 1 a）。光遺伝子技術学には、Channelrhodopsin-2 を piggy-bac vector を用いて安定的にかつ強制的に細胞に発現させる事で、光刺激により細胞を活性化させる方法を用いた（図 1 a）。プレートには、u-plate angiogenesis 96 well (Ibidi) を用いて、プレートの底面に collagen gel (Nippi) を敷き、その上に細胞を播種し分化させた（図 1 b）。iPS 細胞は最初は、10cm dish 等に播種し培養 4 日目に、96-well plate に replating した。その後、培養 6 日目から光刺激による細胞刺激を開始し、最長 2 8 日目まで連続光刺激下で培養を行った。光刺激下で培養した細胞は、pan-MHC 抗体を用いた免疫染色によって分化効率を解析したり、SI8000 motion imaging system (SONY) を用いて収縮力・収縮速度を解析する事で評価した。

図 1

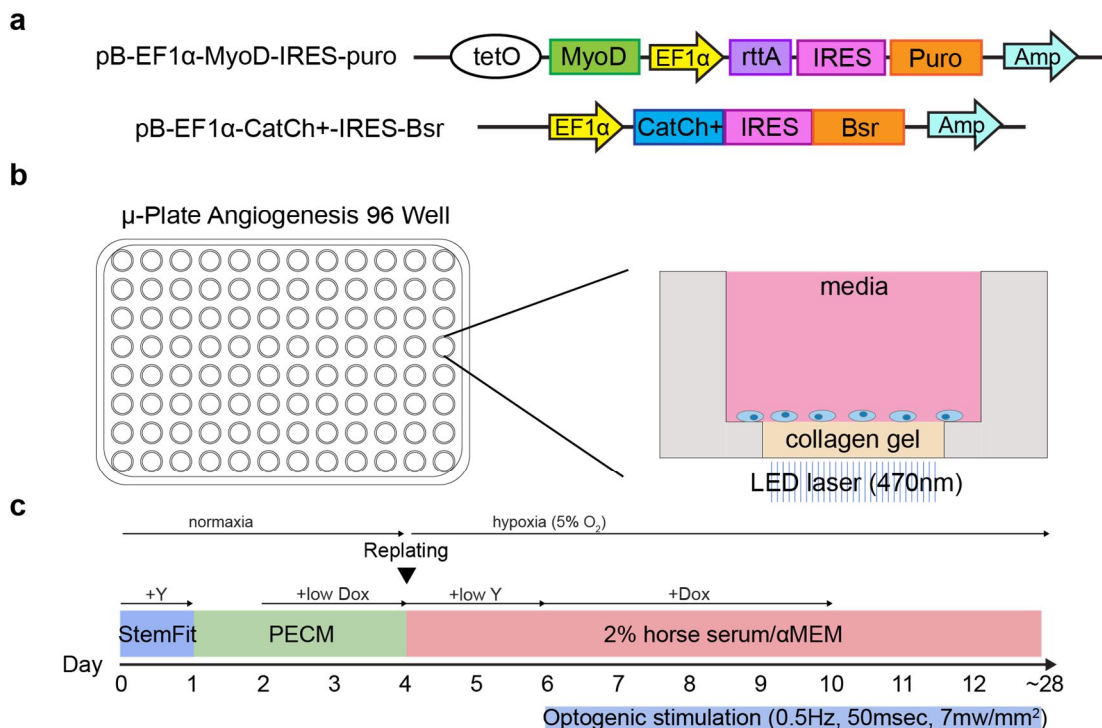


図 1：iPS 細胞の骨格筋分化と光刺激培養の図。(a)Dox-inducible MyoD overexpression system と piggy-bac vector による Channelrhodopsin-2 の発現コンストラクト。(b)96-well plate における、collagen gel と LED laser による光刺激方法。(c) iPS 細胞を用いた Dox-inducible MyoD overexpression による筋分化と光刺激方法。

4．研究成果

まず最初に、96-well plate における光刺激培養下でも、iPS 細胞が安定的に骨格筋細胞へと分化するかどうかを解析した。創薬スクリーニングには、well 間のバラツキを最小限に抑える事が大事であることから、well 間における骨格筋細胞分化度のバラツキの評価を行った。光刺激下培養 17 日目に、骨格筋分化マーカーである、Pan-MHC で免疫染色を行った所、96-well 全ての well でキレイに分化している事が分かった (図 2a)。Well 間のバラツキを解析する為に、各 well の分化度を、全部の核数における pan-MHC が発現している核数を計算する事で計算した。結果として、平均 93 % の核が pan-MHC 陽性細胞であり、バラツキを計算する CV 値 (Coefficient of Variation = 各サンプルの値のバラツキ度を示す指標。10 以下が通常スクリーニング等の解析可能なバラツキの少なさという解釈) も 3.91 とあり、Well 間のバラツキも最小に抑えられている事が分かる。これらの結果から、96-well plate かつ光刺激下においてもバラツキが少なく骨格筋分化誘導が可能な事が判明した。

図 2

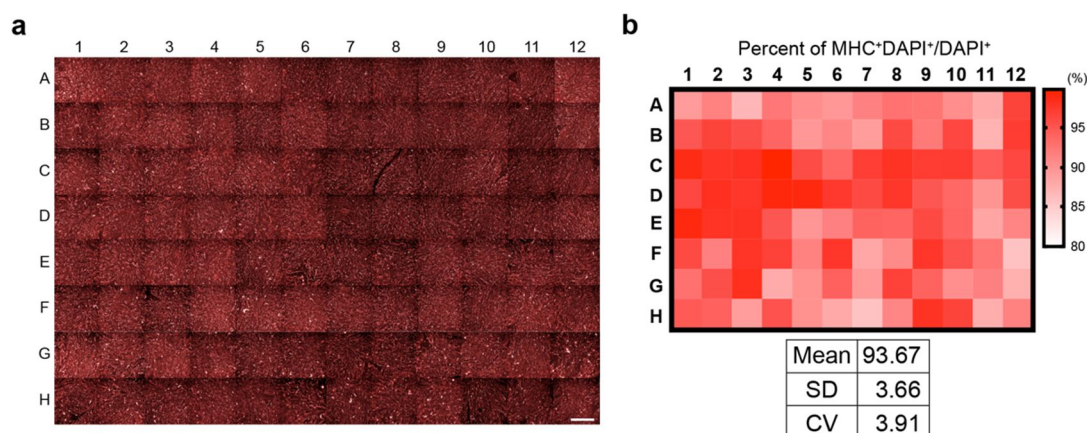


図 2 : 96-well plate かつ光刺激培養 17 日目における MHC 陽性細胞の割合。(a) pan-MHC 抗体を用いた免疫染色画像 (b) 総核数における pan-MHC 陽性細胞の割合

次に、電気刺激培養においては細胞が成熟化する事は知られているが、光刺激培養でも電気刺激同様に成熟化するかは不明である為に、光刺激培養下においても骨格筋が成熟化するかどうかを解析した。上記同様に光刺激培養 17 日目の細胞を、骨格筋マーカーである pan-MHC 抗体と成熟した筋細胞で柵状にキレイに発現する事が知られている α -actinin 抗体を用いて共免疫染色を行った。予想していた通り、光刺激培養でもサルコメア構造に似た染色パターンが α -actinin から見られたことから、光刺激でも骨格筋細胞の成熟化が進む事が認められた (図 3a)。更に定量解析においても約 80 % の筋管がサルコメア構造に似た構造を有している事が認められたことから、光刺激が well 全体の細胞を均一に刺激している事が推測される (図 3b)。

最後に、成熟した筋管が本当に収縮能力を有しているかの解析を行った。通常骨格筋細胞は未成熟な状態だと刺激を与えても収縮しない事が知られている。一方で、収縮するという事が 1 つの成熟化の指標にもなっており、疾患モデルの解析にあたって収縮力評価はとても重要な事である。そこで、光刺激培養 18 日目の細胞の収縮速度を計測した。また比較対象として電気刺激培養 18 日目の細胞も同時に解析した。結果として、光刺激培養の細胞は電気刺激培養の細胞と比較しても同等の収縮力機能を会得していることが認められた。つまり、これらの結果から光刺激培養は電気刺激培養の代替として十分機能する事が推測出来る。また、バラツキも少なく抑えられていることから十分スクリーニング等に用いる事が可能であると考えられる。今後の計画として、いかにスクリーニング系を樹立して実際に化合物評価に用いる事があげられる。

図 3

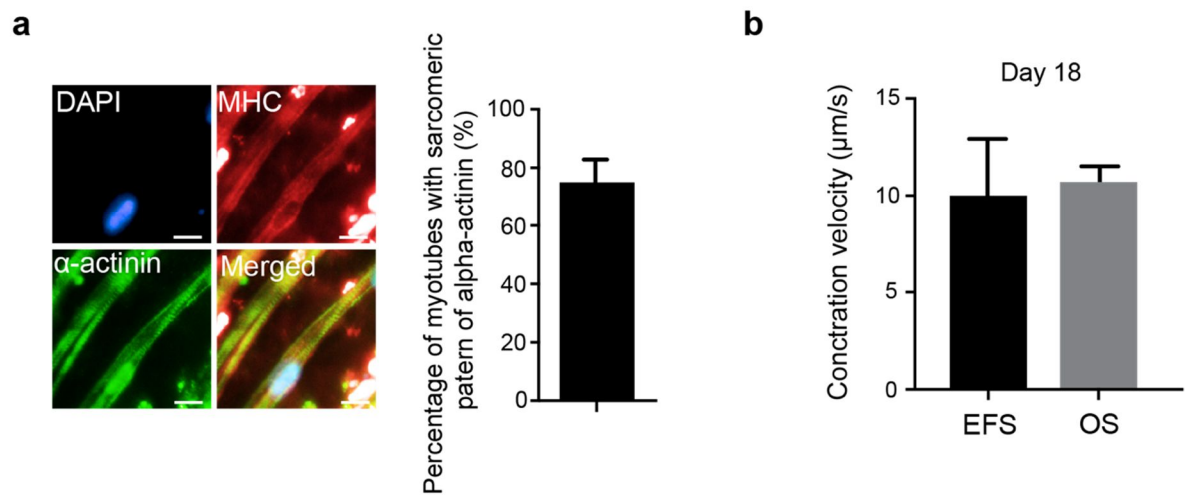


図 3：光刺激培養における骨格筋細胞の成熟度評価と機能評価(a)培養 17 日目における pan-MHC と α -actinin 抗体を用いた免疫染色画像とサルコメア構造に似た染色パターンを持つ骨格筋細胞の割合(b)電気刺激および光刺激培養 18 日目における骨格筋細胞の収縮速度評価。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoya Uchimura, Toshifumi Asano, Takao Nakata, Akitsu Hotta and Hidetoshi Sakurai	4. 巻 -
2. 論文標題 Overused skeletal myotubes from patient-derived iPSCs recapitulate contractile performance declines in Duchenne muscular dystrophy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 光刺激を用いた骨格筋細胞の成熟化と収縮運動を指標としてスクリーニング法の開発	発明者 内村智也、櫻井英俊	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-212997	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------