

令和 3 年 6 月 22 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：18K15449

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞技術を用いたミオチューブラーミオパチーの病態解明

研究課題名(英文) Pathological analysis of XLMTM by using hiPSCs

研究代表者

藤原 慧 (Fujiwara, Kei)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：40817219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：X染色体連鎖性ミオチューブラーミオパチーは骨格筋の3つ組に変化をきたし筋力低下をきたす疾患である。その病態評価には3つ組構造をもった成熟した骨格筋細胞の作製が必要であるが、これまでの技術では困難であった。本研究ではiPS細胞から遺伝子の導入を行わず骨格筋幹細胞を誘導し、これをベースに骨格筋細胞を作成する新たな技術を開発した。本研究で作成された骨格筋細胞は3つ組構造、サルコメア構造を備え、自発収縮するという特徴を持っていた。本技術を用いて、さまざまな疾患のモデルが可能になると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋疾患では生後に表現型が出るものが多く、こういった疾患をヒトiPS細胞を用いて評価するためには、ある程度発達段階の進んだ(すなわち成熟した)骨格筋細胞を作成することが必要である。さらに、本研究で作成した骨格筋細胞は遺伝子導入を用いていないため、疾患の遺伝子レベルでの解析により適したものである可能性がある。

本技術を用いることで、さまざまな骨格筋疾患の病態評価につながっていく可能性があることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：X-linked myotubular myopathy is disease that causes disorganization of triad structure of skeletal muscle followed by muscle weakness. To evaluate the pathophysiology of this disease, it is necessary to make mature skeletal muscle with triad structure. However it was difficult to make mature skeletal muscle from hiPSCs so far. In this research, we had succeeded to make mature hiPSCs by muscle stem cell culture by hiPSCs. This skeletal muscle equips not only well aligned sarcomeric structure but also triad structure. By using this technic, it can be possible to model various skeletal muscle disease.

研究分野：分子生物学

キーワード：骨格筋 X連鎖性ミオチューブラーミオパチー 3つ組

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー (XLMTM)は小児期から筋力低下を呈する予後不良の疾患であり、有効な治療法は存在しない。本疾患に対してはマウスモデルなどを中心に積極的に解析が進められているが、ヒトの細胞を用いた研究は非常に限られているのが現状である。ヒトのサンプルは非常に限られているため、何らかの代替法が必要であった。この代替法となりうるのがヒト iPS 細胞技術であり、今回われわれは iPS 細胞を用いて XLMTM をはじめとする遺伝性骨格筋疾患の解析を行おうと考えた。これまで iPS 細胞から骨格筋細胞を創出する技術には種々のものが報告されている。具体的には転写因子 MyoD を強制発現させたり、また Pax7 を強制発現させて骨格筋細胞を作成する技術である。しかしながらこういった方法で創出される骨格筋は未熟な状態であり、生後に表現型が出る骨格筋疾患の解析には不向きであった。さらに遺伝子の強制発現を用いていることから、細胞内の遺伝子の発現ネットワークが乱れている可能性も考えられる。これらのことから我々は iPS 細胞からより骨格筋特有の内部構造を持つ成熟した骨格筋を、遺伝子強制発現によらない方法で作成することを目指した。実際に XLMTM では骨格筋細胞内の 3 つ組構造 (T 管と筋小胞体) サルコメア構造に乱れがるという先行報告もあり、こういった構造をもつ骨格筋細胞を iPS 細胞から作成することは今後の疾患解析にも非常に有用であるだろうと考えた。

2. 研究の目的

研究の最終的な目標は XLMTM の病態解析、病態モデリングであるが、その前提として成熟した骨格筋細胞をヒト iPS 細胞から作成することを当初の目標とした。こういった骨格筋細胞をめざすかということであるが、まずは骨格筋細胞特有の内部構造を備えていること (3 つ組構造や整列したサルコメア構造) 遺伝子発現パターンが成熟していること (T 管や筋小胞体関連の遺伝子が十分に発現していること、さらにミオシン重鎖遺伝子の発現パターンが成熟したサブタイプとなっていること) を目標とした。さらに骨格筋特有のナトリウムチャンネルを発現していることはナトリウムチャンネル関連の骨格筋疾患解析に有用であるという判断からナトリウムチャンネルのサブタイプ解析、チャンネル電流の測定を行った。将来的にヒト iPS 細胞から作成した骨格筋を用いた病態解析を行う際、最終目標となるのは有効な薬物の発出、ドラッグスクリーニングである。この観点から本研究ではこの骨格筋細胞がドラッグスクリーニングに適した均一な分化を示すか、マルチウェルのプレートを用いてその均一性を評価することを目指した。将来的に行う予定である XLMTM の疾患解析については、健常株、疾患株のそれぞれのクローンの挙動の違いにより難航を極めた経験がある。このことから解析には単一クローンを用いて薬剤選択的に標的たんぱく質をオンオフするシステムが必要であると考えた。具体的には XLMTM の疾患クローンに、責任遺伝子である MTM1 を薬剤依存的に発現させることで表現型が変化するかを見るというシステムを構築することを目指した。

3. 研究の方法

まずはヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を誘導し、この細胞を用いて成熟骨格筋細胞を作成することとした。この中で無血清培地を用い、さらにはマトリゲルを 3 次的に重層してやることで従来のものより格段に成熟した骨格筋の作成を目指した。またさらに、XLMTM 疾患株にドキシサイクリン依存性に MTM1 遺伝子を発現させる (MTM1 遺伝子は本疾患の原因遺伝子で、本遺伝子の欠失でこの疾患が起こると考えられている) ことで、本疾患の表現型である 3 つ組の形成が促進されるかを評価した。

4. 研究成果

まずは、ヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を誘導した。この方法は当研究室の他の研究員により s 既に確立された方法であり、80 日の誘導で骨格筋幹細胞を得ることができる。ここでは、Pax7 のレポーターの下 Venus を発光する 201B7-Pax7-Venus というラインを使用し、フローサイトメトリーを用いることで純度の高い骨格筋幹細胞を得ることができた。一方で、種々の疾患 iPS 細胞の表現型解析をする際には Pax7-Venus のラインが入っていない細胞を用いることが十分に考えられ、レポーター以外の何らかの方法で骨格筋幹細胞を単離する必要が考えられた。ここで用いたのが CD57 CD82 の 2 種類のマーカーであり、これらの marker を用いることで、比較的純度の高い骨格筋幹細胞を得ることに成功した。抗体を使用した場合も骨格筋幹細胞のマーカーである Pax7 を発現していることを免疫染色ならびに mRNA 定量で確認

している。

次に、これらの骨格筋幹細胞を用いて筋分化させることを試みた。

まずは 96well dish に 5000 細胞となるように播種し、stemfit AK02 培地で 5 日培養すると、confluent となることがわかった。さらにここから分化培地の検討を行った。従来から使用していたウマ血清を使用した分化培地では骨格筋細胞以外の細胞が増殖し、非常に純度が低い培養系となった。これを克服するために、培地の添加成分を血清の代わりに N2 サプリメントに変え実験を行ったところ、純度の著名な改善を得た。

したがってここからの分化実験は N2 サプリメントを用いた分化培地にて行っていくことになる。生体内の骨格筋は周囲を結合組織に囲まれた環境で存在するため、疑似結合組織環境を再現すべく、dish の底にマトリゲルの重層を行った。具体的にはマトリゲルと分化培地を 2:1 の分量になるように冷却した状態を保ったまま混合した。そしてこの混合物を dish の底に重層し、より生体内に近い環境を *in vitro* で再現することとした。さらに骨格筋の成熟を促すといわれているアグリニンという物質を加えることで、さらなる骨格筋の成熟化をはかろうとした。

上記方法を用いて作成した骨格筋は、培養 14 日目ころから自発収縮し、サルコメア構造肉眼的に観察できるようになった。14 日目から 28 日目ころにかけては筋細胞の融合が大きく進み、この傾向はマトリゲル重層した群でより著名に観察された。42 日間培養した骨格筋細胞はマトリゲルを重層した群でより太くなっていた。さらに 42 日間培養した骨格筋細胞を電子顕微鏡で観察すると 3 つ組構造を備えており、本法により非常に成熟した骨格筋細胞が得られたことを示唆する結果と考えられる。

さらにミオシン重鎖遺伝子の発現パターン (MYH2 3 4 7 8)、T 管筋小胞体関連遺伝子 (DHPR Casq) の発現パターン、ナトリウムチャンネルのサブタイプいずれも極めて成熟した骨格筋であることを裏付ける結果であった。全体的な傾向として、マトリゲル重層により遺伝子発現パターンもより成熟したものとなっていることがわかった。

また multi well system でのスクリーニングにも適するきわめて均一な分化系であることも確認できた。

この骨格筋幹細胞は今後の iPS 骨格筋細胞研究のリソースとなりうることが考えられ、実際に -80 °C での保存で安定であり、適切な細胞保存液を用いることで凍結融解に耐え増殖、分化をはじめることが明らかとなった。

最後に XLMTM の病態評価ということに関して、XLMTM の疾患クローンにドキシサイクリン依存性に MTM1 遺伝子を発現するクローンの作成に成功した。すなわち、XLMTM クローン自体では MTM1 の発現がほぼゼロであるのに対し、ドキシサイクリンを入れることで MTM1 の発現が著名に上昇することを確認し、系としての有用性が確認された。この方法は他の疾患の解析においても有用であることが示唆され、クローン間の違いによらない均一な解析システムを構築できたと考えている。今後は、本クローンを用いることで、XLMTM 疾患クローン株での 3 つ組の形成を正確に評価することができるようになると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原慧
2. 発表標題 ヒトiPS細胞からの成熟筋細胞誘導
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原慧
2. 発表標題 ヒト iPS 細胞を用いた X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー (XLMTM) の病態再現 ~ 2D 筋成熟化の現状と取り組み
3. 学会等名 若手のための骨格筋研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヒトiPS細胞から成熟骨格筋細胞の作出	発明者 藤原慧	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、K 2 9 J 6 4 5 1	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ヒトiPS細胞からの成熟筋管細胞の誘導	発明者 藤原慧	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6504	出願年 2019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
---------	---------