

平成22年 6月14日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19790749

研究課題名（和文）筋ジストロフィー疾患への細胞移植戦略 — 膜融合理論に基づく骨格筋再生による治療開発

研究課題名（英文） Development of therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy – Based on cell fusion and myogenic transdifferentiation theory

研究代表者

崔 昌浩 (SAI SYOKO)

国立成育医療センター（研究所）・生殖・細胞医療研究部・流動研究員

研究者番号：80392497

## 研究成果の概要（和文）：

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下と筋萎縮を伴う筋繊維の変成・壊死・再生を主な病理像とする遺伝子性疾患の総称である。その中でジストロフィンの欠損によるDuchenne型筋ジストロフィーは最も高頻度に発生し、かつ最も重症な進行性筋疾患である。Duchenne型筋ジストロフィーの薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。また、ジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子治療法が注目されていたが、いまだ臨床応用には至っていない。これらの問題を解決する打開策として、近年、組織幹細胞を用いた障害組織に対する再生医療が注目されており、筋ジストロフィーにおいても例外ではない。細胞源としては、筋芽細胞、骨髄細胞などがあげられ、筋再生の供給源として期待されている。我々は以前、筋ジストロフィーのモデル(mdx/scidマウス)に対し手術検体から分離した子宮内膜由来の細胞が筋変成を修復することを明らかにした。本研究では、新たな細胞供給源として、ヒト子宮内膜細胞およびその他の細胞リソース(月経血、羊膜、胎盤等)に着目し、現在注目されている『細胞移植』の有効性・安全性のバリデーションシステムを構築し、筋ジストロフィーに対する細胞治療の有効性、安全性の基準を確立する。

## 研究成果の概要（英文）：

Duchenne muscular dystrophy (DMD), the most common lethal genetic disorder in children, is an X-linked recessive muscle disease characterized by the absence of dystrophin at the sarcolemma of muscle fibers. We examined a putative mesenchymal stromal cells obtained from endometrial or placenta tissue samples to determine whether these cells repair muscular degeneration in a murine mdx model of DMD. Implanted cells conferred human dystrophin in degenerated muscle of immunodeficient mdx mice. We then examined endometrial-derived cells, menstrual blood-derived cells, and placenta-derived cell to determine whether primarily cultured nontransformed cells also repair dystrophied muscle. In vivo transfer of these cells into dystrophic muscles of immunodeficient mdx mice restored sarcolemmal expression of dystrophin. Labeling of implanted cells with enhanced green fluorescent protein and differential staining of human and murine nuclei suggest that human dystrophin expression is due to cell fusion between host myocytes and implanted cells. In vitro analysis revealed that cells can efficiently transdifferentiate into myoblasts/myocytes, fuse to C2C12 murine myoblasts by in vitro coculturing, and start to express dystrophin after fusion. These results demonstrate that the endometrial-derived cells, menstrual blood-derived cells, and placenta-derived cell can transfer dystrophin into dystrophied myocytes through cell fusion and transdifferentiation in vitro and in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	660,000	3,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：筋ジストロフィー、周産期幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下と筋萎縮を伴う筋繊維の変成・壊死・再生を主な病理像とする遺伝性疾患の総称である。その中でジストロフィンの欠損による **Duchenne** 型筋ジストロフィーは最も高頻度に発生し、かつ最も重症な進行性筋疾患である。**Duchenne** 型筋ジストロフィーの薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。また、ジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子治療法が注目されていたが、いまだ臨床応用には至っていない。

### 2. 研究の目的

近年、組織幹細胞を用いた障害組織に対する再生医療が注目されており、筋ジストロフィーにおいても例外ではない。細胞源としては、筋芽細胞、骨髄細胞などがあげられ、筋再生の供給源として期待されている。我々は、手術検体から分離した子宮内膜細胞、月経血および羊膜由来の細胞が骨格筋に分化可能であるという作業仮説をたて、筋ジストロフィーのモデル (**mdx/scid** マウス) に対しそれらの細胞が筋変成を修復することを明らかにした。

### 3. 研究の方法

子宮内膜細胞、月経血および羊膜由来の細胞を免疫不全 **NOD/SCID IL-2**レセプターノックアウトマウスに移植することにより **Vimentin** (マウス由来 **Vimentin** と反応しない) 陽性の骨格筋の発現を確認した。これらの結果は子宮内膜由来細胞と羊膜由来の細胞の骨格筋への分化への可能性を強く示唆している。我々の *in vitro* の検討により、培養した子宮内膜細胞、月経血および羊膜由来の細胞は間葉系表面マーカーを発現し、**MyoD**, **Desmin**, **Myogenin**, **Dyst**

**rophin** の発現を認め、これらの子宮内膜細胞、月経血および羊膜由来の細胞は筋前駆細胞としての性格を有していると考えられた (図1、月経血由来細胞を用いた結果)。次にこれらの細胞の骨格筋細胞への分化を確認するため **mdx/scid** マウスを用いた移植細胞の骨格筋再生能を検討した。その結果、マウス骨格筋中にヒト・ジストロフィンの発現を認めた (図2、月経血由来細胞を用いた結果)。この発現は子宮内膜細胞、月経血および羊膜由来の細胞が筋前駆細胞としての性格を有しているだけでなく、細胞融合を引き起こすことも示唆している。

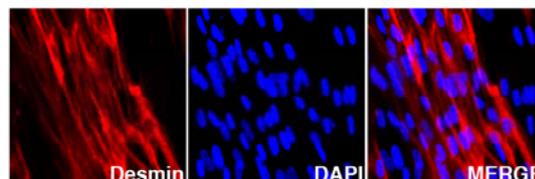


図1

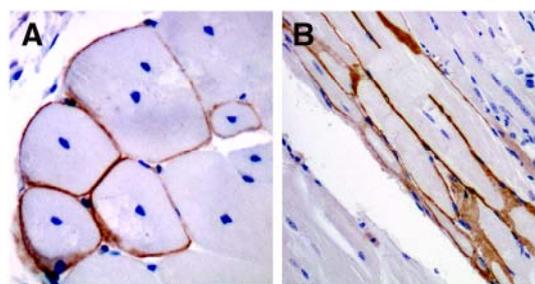


図2

### 4. 研究成果

本研究では、増殖させたヒト体細胞を筋ジストロフィー治療に用いることに関するバリデーションシステムを確立し、細胞治療の安全性、有効性の基準の確立が期待出来る。具

体的には、ヒト細胞の採取・分離・培養について標準化された手順を確立・文書化し、細胞プロファイルの確定後、骨格筋再生の検討を行う。高い安全性を有し、標準化された培養システムによって培養を行うことで、ヒト細胞を用いた細胞治療に関する倫理性および安全性の due process を提示することになる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. Kawamichi Y, Cui CH\*, Yoyoda M, Makino H, Takahashi Y, matsumoto K, Saito H, Ohta H, Saito K, Umezawa A. Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in the mdx model of Duchenne Muscular Dystrophy. J Cell Physiol. 2010 Jun; 223(3):695-702.

\*Co-first author

2. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui CH, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. Stem Cells. 2008 Jul; 26(7):1695-1704.

3. Toyoda M, Cui CH, Umezawa A. Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells. Acta Myol. 2007 Dec; 26(3):176-8.

4. Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, Nishiyama N, Tsuji H, Cui CH, Segawa K, Uyama T, Kami D, Miyado K, Asada H, Matsumoto K, Saito H, Yoshimura Y, Ogawa S, Aeba R, Yozu R, Umezawa A. 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. Exp Cell Res. 2007 Jul; 313(12):2550-2562.

5. Cui CH, Umezawa A. Myogenesis by Endometrium derived Cells. Medical Technology. 35, 10-11, 2007 (in Japanese).

6. Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. Mol Biol Cell. 2007 May; 18(5):1586-1594.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

崔 昌浩 (SAI SHOKO)

国立成育医療センター (研究所)

生殖・細胞医療研究部・流動研究員

研究者番号: 80392497

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし