

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24615005

研究課題名(和文)筋幹細胞の休止期を保つためのメカニズムの解明

研究課題名(英文) arathyroid hormone and parathyroid hormonetype1- receptor accelerate myocyte differentiation

研究代表者

木村 重美(Kimura, Shigemi)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：60284767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、現在のところ根治治療はない。我々の目的は、筋分化を促進して筋ジストロフィーを治療することにある。筋分化の過程で副甲状腺ホルモンレセプタータイプ1(PTH1R)が重要な役割をしていることを示した。PTH1Rは副甲状腺ホルモン(PTH)のレセプターである。そこで、筋ジストロフィーのモデルマウス(mdx)にPTHを投与した。その結果、PTHを投与されたmdxは筋力及び筋組織が回復しているのが分かった。また、PTHが投与されたmdxの骨格筋では、筋収縮に関連する遺伝子の発現量が増えていた。以上の結果よりPTHは筋ジストロフィーなどの筋疾患に有効な治療法の1つである。

研究成果の概要(英文)：The ZHTc6-MyoD ES cell line expresses the myogenic transcriptional factor MyoD under the control of a tetracycline-inducible promoter. Following induction, most of the ZHTc6-MyoD cells differentiate to myotubes. However, a small fraction does not differentiate, instead forming colonies that retain the potential for myocyte differentiation. In our current study, we found that parathyroid hormone type 1 receptor (PTH1R) expression in colony-forming cells at 13 days after differentiation was higher than that in the undifferentiated ZHTc6-MyoD cells. We also found that PTH1R expression was required for myocyte differentiation, and that parathyroid hormone accelerated the differentiation. Our analysis of human and mouse skeletal muscle tissues showed that most cells expressing PTH1R also expressed Pax7 and CD34, which are biomarkers of satellite cells. Furthermore, we found that parathyroid hormone treatment significantly improved muscle weakness in dystrophin-deficient mdx mice.

研究分野：再生医療

キーワード：ES細胞 DNAアレイ 筋分化 筋芽細胞 副甲状腺ホルモンレセプター 副甲状腺ホルモン 筋ジストロフィー 治療

1. 研究開始当初の背景

我々のゴールは、筋ジストロフィーなどの筋疾患に対して筋分化を促進させて、筋力低下を治療することにある。骨格筋内には、筋芽細胞である筋衛星細胞が存在する。この筋衛星細胞は、正常筋内では機能的には大きな役割は演じていない。しかし、一旦、壊死などの損傷が起こると活性化し、MyoD 遺伝子が発現して筋線維に分化が始まる。MyoDとは、未熟な細胞を筋分化に誘導可能な転写因子である。その際、同時に筋衛星細胞も分裂し、その数を増す。そして、損傷治癒が治まると、再びその筋衛星細胞は休止の状態となる(1)。

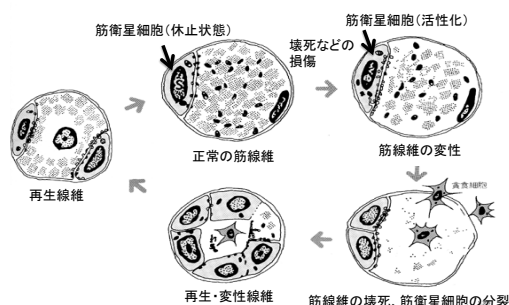


図1 筋線維の壊死、再生(臨床のための筋病理(1)の図71を改変)

健常人では筋肉の崩壊をまねいても、このような再生機構が働いて筋力を維持する。

一方、デュシェンヌ型筋ジストロフィーは一番頻度が高い疾患である。原因遺伝子のジストロフィンが欠損するために筋崩壊が起こる病である。この病気ではこのような再生機構が、壊れる筋線維の数に追いつかず、筋力低下を招いている。例えばこの病気は、2~3歳で転びやすいなどの症状で発症するが、再生機構が働き、その頃は歩行可能である。しかし、10歳になると、壊れる筋線維に再生機構が追いつかず歩行不能となる。よって、筋衛星細胞の筋分化の制御機構を解明して、筋分化を促進すれば、筋ジストロフィーなどの筋疾患の治療が可能となることが期待される。

我々は Tet-Offシステムを利用して、ドキシサイクリン(Dox)を除去することにより、MyoD 遺伝子を発現させることのできるマウスES 細胞(ZHTc6-MyoD)を作製している(2)。この細胞の培養液から Doxを除去することにより、*in vitro* では高率にES 細胞を筋分化させることが出来る。しかし、ZHTc6-MyoDの培養液よりDoxを除去しても、すべての細胞

が筋分化するわけではなく、一部の細胞はコロニーを形成し、未熟な状態を保っている(図2)。先ほど述べた筋衛星細胞の分化と同じような振る舞いをしている。

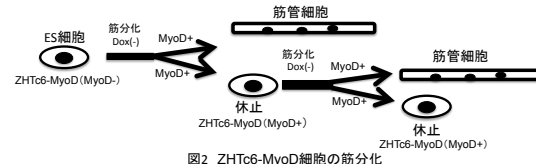


図2 ZHTc6-MyoD細胞の筋分化

2. 研究の目的

ES細胞(ZHTc6-MyoD)が休止の状態から活性化されるメカニズムを解明して、筋分化を促進すれば、筋疾患の治療が可能となる。この機構を人工的に制御することが可能となれば、筋ジストロフィーなどの筋疾患の治療の開発が可能となる。

3. 研究の方法

詳しい方法は既に論文(Kimura, S et al. Sci Rep 4: 5066. 2014) としているのでそちらを参考にされたい(3)。

1) ZHTc6-MyoD(ES-MyoD)細胞の培養法

我々の論文(Ozasa S, Kimura S, Biochem Bioph Res Co 357:957-963. 2007) (2) を参考にされたい。

2) 網羅的DNAアレイ

未分化の ZHTc6-MyoD 細胞を維持培地で培養し、PBS で洗浄後、0.25%トリプシンではがしてPBS で洗浄後、細胞を回収し、RNA を抽出した(未分化ES-myod)。ZHTc6-MyoD 細胞を維持培地から分化培地に変更し、筋細胞に分化誘導をかけ13日後、ピペットでマイチューブに、培養液を直接吹きかけ、マイオチューブをディッシュよりはがした。多くは簡単にこの操作でマイオチューブをはがれていく。その後、コロニーを0.25%トリプシンではがして、PBS で洗浄後、細胞を回収しRNA を抽出した(13d-ZHTc6-MyoD)。網羅的 DNA アレイに関してはフィルジェンに委託した。

3) ZHTc6-Myo を筋分化誘導時の siRNA による PTH1R ブロック

i) siRNA

PTH1R の発現抑のため siRNA は Mn-PTH1-7, Mn-PTH1-8, Mn-PTH1-5, Mn-PTH1-6, (QIAGEN GeneSolution siRNA Cat.No.1027416)を使用した。ネガティブコントロールとして AllStars Neg siRNA AF488 (Cat 1027284 QIAGEN) を使用した。Death control として AllStars Mm/Rn Cell Death Control siRNA

(Cat S104939025)を使用した。

ii) トランスフェクション法

Hiperfect transfection reagent Cat 301704 (QIAGEN) のプロトコルを参考に行った。

ZHTc6-MyD はトランスフェクション2日前に分化培地に変えて分化誘導した。トランスフェクション時に細胞はコラゲンコートされた6well ディッシュの1well に 2×10^5 cell ずつ播種し、siRNA は 1500ng を使用した。Hiperfect transfection reagent は $15 \mu\text{l}$ を使用した。48 時間後にトランスフェクションの高率を蛍光 AF488 で確認し、death control ではほぼすべての細胞が死んでいることを確認した。

4) 初代ヒト筋芽細胞のセルソーティングと筋分化誘導

橋本の方法を用いて初代筋芽細胞を採取した(4)。FACS解析とセルソーティングはリプロセルに委託した。1次抗体として、goat anti-Pax7、rabbit anti-PTH1R、PE-Cy7-labeled anti-human CD34、2次として Alexa-Fluor488-labeled donkey-goat IgG と PE labeled donkey anti rabbit IgG を用いた。

分化培地には 2% house serum, 1% Insulin-Transferrin-Selenium-A を含む DMEM を使用した。ヒト PTH(1-34) を添加する場合は、最終濃度を 2, 5nM とした。

5) マウスの筋組織の免疫組織染色

Pax7/PTH1R と CD34/PTH1R の2重染色を施行した。

筋組織を $10 \mu\text{m}$ の厚さでクライオスタットを使用して切り出し、1時抗体として Rabbit anti-PTH1R (1:400), goat anti-Pax7 (1:300), goat anti-CD34 (1:100), and goat anti-MyoD (1:100) monoclonal antibodies を使用した。2次抗体として Alexa-Fluor-555-labeled anti-rabbit IgG と an Alexa-Fluor-488-labeled anti-goat IgG を使用した。

6) mxマウスへのPTH投与

4週齢の mdx マウス (筋ジストロフィーのモデルマウス、ジストロフィン欠損マウス) にラット PTH (1-34) を $60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 連日皮下注射した。

7) ワイヤハンギングテスト

HARA & CO., LTD. (小原医科産業株式会社) WH-3002を使用して行った。マウスを金網に捕まらせて、逆さまにして、つかまれる時間を計測した。その時に、マウスのしっぽに2.8g

のおもりを負荷した。3回施行し最長時間を示した。

8) トレッドミル

コントロール LE8710 (panlab Harvard) を使用した。B10 マウス (正常マウス) 4匹、生食投与 mdx マウス 3匹、 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ 投与 mdx マウス 4匹を使用した。25cm/sec で、100分走らせた距離を測定した。途中で走れなくなったマウスはその時点での走行距離を走行距離とした。

9) 筋組織における中心角が閉める割合

10, 60, $200 \mu\text{g}/\text{kg}$, 各1匹ずつ連日皮下注射したマウスをジエチルエーテルで麻酔し、頸椎脱臼にて殺し、腓腹筋を採取し、HE染色を行った。写真で撮影し、中心角の率をカウントした。

10) PTH 投与後と非投与群での筋組織における DNA アレイ

それぞれの骨格筋の中の RNA を抽出して、その発現を GneChip mouse Gne 2.0 ST array(フィルジェン)を用いて比較した。

4. 研究成果

分化誘導前の ZHTc6-MyoD と分化誘導した13日後のコロニー (13d-ZHTc6-MyoD) を網羅的 DNA アレイにより 遺伝子の発現を比較検討した結果、副甲状腺ホルモンレセプター 1 (PTH1R) が 13d-ZHTc6-MyoD では高発現を示した (図3)。

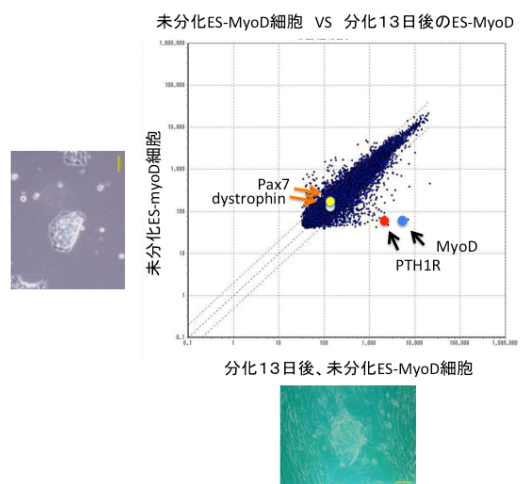


図3 DNAマイクロアレイ

ZHTc6-MyoD の筋分化の過程でsiRNAにより PTH1Rの発現を抑制すると、多くの細胞は死滅した。一方、ZHTc6-MyoDの培地にホルモン (PTH) を入れることにより、マイオチューブになる期間が1日間短縮された。初代ヒト筋芽細胞よりセルソーティングされたCD34+/PTH1R+

細胞はマイオサイトとなり、最終的にはマイチューブがコンプレントとなった。未分化な筋芽細胞ではCD34は陽性を示す。一方、CD34+/PTH1R-細胞は最終的にコンプレントとはならなかった。また、初代ヒト筋芽細胞FACS解析した結果、CD34陽性細胞が68.8%含まれ、PTH1R陽性細胞は29.6%が含まれていた。CD34+/PTH1R+細胞は29.2%であった。筋ジストロフィーのモデルマウス (mdx) と正常マウス (B10) の筋組織では、PTH1Rの発現が筋衛星細胞とほぼ一致して見られた (図4)。

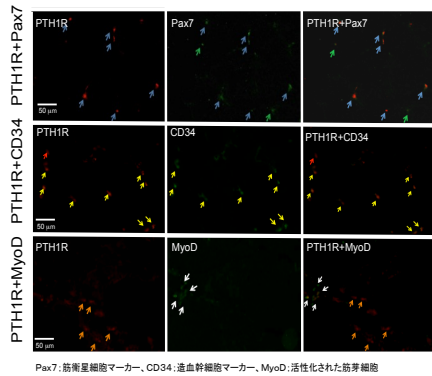


図4. Mdxマウス(筋ジストロフィーのモデルマウス)の筋組織におけるPTH1RとPax7, CD34, MyoDの2重染色

60 μg/kgのPTHをmdxに毎日注射した結果、ハンギングテストでは生食投与mdx (n=7) では49.5 ± 44.9秒、PTH投与mdx (n=6) では132 ± 61.6秒 (図5)、100分間のトレッドミル検査では正常マウス (n=5) で1486 ± 7.4 m、生食投与mdxでは425 ± 190m、PTH投与mdxでは843.6 ± 352 mと、PTH投与群は有意の差をもって筋力の改善をみた (図6)。筋組織も中心核占める率は生食投与群では93.2 ± 2.0%、PTH投与群では83.01 ± 4.0%と減少し、筋線維の径も生食投与群では25.41 ± 10.4 μm、PTH投与群では31.16 ± 12.9 μmと組織の改善も認めた。

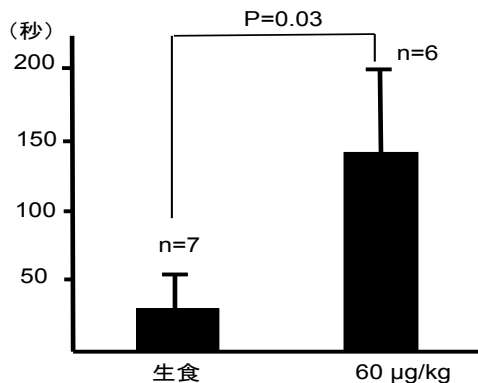


図5 ワイヤハンギングテスト

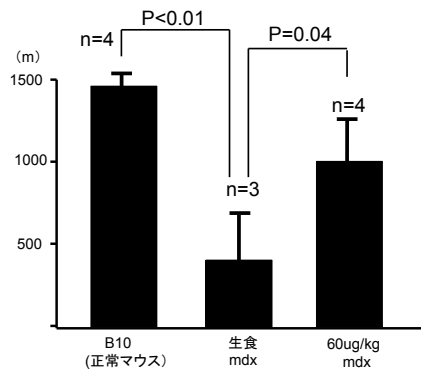


図6. PTH 60μg/kg 投与31日目 (9週齢)トレッドミル結果

そのPTHを投与した骨格筋と投与していない骨格筋よりRNAを抽出して、それぞれの骨格筋の中のRNAの発現を比較した。PTH投与群で、有意の差を持って1.5倍以上増加した発現を認めた遺伝子のpathwayは、骨格筋の収縮に関わる遺伝子でmyosin heavy chainのMyh3, 7, tropomyosinのTpm3, Troponin-TのTnnt1, 2, troponin-1のTnni1, Troponin-CのTnnc1, Myosin light chainのmyl2, 3であった。これらの結果より、PTHが筋の収縮に関するタンパクを増やし筋力を増加させている可能性を示した。しかし、骨格筋の分化に関する遺伝子の増加はmyogenin以外に認めなかった。

考察

PTHの主なレセプターはPTH1Rである。PTHは骨や腎臓で、Caの代謝に大きく関与している。しかし、PTHを投与することにより、虚血性心疾患をモデルにしたマウスでは、血管新生を促進して、心機能を改善させるとの報告もある (5)。PTHは血管平滑筋の分化にも関与が報告されている。筋衛星細胞ではPax7やCD34が陽性である。マウスの筋組織ではPax7やCD34 とほぼ一致してPTH1Rの発現を認めた。PTH1Rは筋芽細胞のマーカーになる可能性を示している。筋ジストロフィーのモデルマウス (mdx) にPTHを投与することにより、トレッドミルやワイヤーハンガーテストが改善した。また、組織学的にも改善している。またPTHを投与すると筋収縮に関するタンパクが増加した。

我々の研究結果より、PTHは筋分化に関与し、筋分化を促進させ、筋ジストロフィーなどの筋疾患やサルコペニアの治療に有効であることが、示唆された。今後、PTH1Rのノックアウトマウスの解析などにより、PTHの骨格筋への影響を調べ、筋ジストロフィーなどの筋力

低下にたいする治療の有効性を検討していきたい。

参考文献

- 1) Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cy.* 9, 493-495, 1961.
- 2) Ozasa S, Kimura S, et al. Efficient Conversion of ES Cells into Myogenic Lineage Using the Gene-Inducible System. *Biochem Biophys Res Commun* 357:957-963, 2007
- 3) Kimura, S. & Yoshioka, K. Parathyroid hormone and parathyroid hormone type-1 receptor accelerate myocyte differentiation. *Sci Rep* 4: 5066, 2014
- 4) Wada, M. R., Inagawa-Ogashiwa, M., Shimizu, S., Yasumoto, S. & Hashimoto, N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development* 129, 2987-2995, 2002.
- 5) Huber, B. C. *et al.* Comparison of parathyroid hormone and G-CSF treatment after myocardial infarction on perfusion and stem cell homing. *Am. J. Physiol.-Heart C.* 298, H1466-1471, 2010.

5. 主な発表論文等

雑誌論文 (査読あり 計4件)

- 1) Soga M., Fusaki N., Hamasaki M., Soejima Y., Yoneda K., Ban H., Hasegawa M., Furuya H., Matsuo M., Yamashita S., Kimura S., Ihn H., Irie T., Nakamura K., Endo F., Era T. Generation, analysis, and banking of transgene-free iPS cells derived from intractable diseases. *PLoS ONE* 10:1371, 2014.
- 2) Kimura, S (C). & Yoshioka, K. Parathyroid hormone and parathyroid hormone type-1 receptor accelerate myocyte differentiation. *Sci Rep* 4:5066, 2014
- 3) Kimura S. (C), Ozasa S., Nomura K., Yoshioka K., Fumio Endo F. Estimation of muscle strength from actigraph data in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Inter* 56:748-52, 2014
- 4) Kimura S. (C), Ozasa S., Nomura K., Kosuge H., Yoshioka K. A Case Report of Congenital Fiber Type Disproportion with an Increased Level of Anti-ACh Receptor Antibodies. *Case Rep Pediatr* Article ID 607678 3:2013

学会発表(計5件)

- 1) 木村重美 他
筋ジストロフィーの筋力低下に対する副甲状腺ホルモン治療 2014年05月29日～2014年5月31日 第56回日本小児神経学会 浜松

- 2) Kimura S & Yoshioka K. Parathyroid hormone and parathyroid hormone type-1 receptor activation accelerate Muscle differentiation and regeneration in Muscular dystrophy. Annual meeting of American society of gene cell therapy, May 21, 2014, Washington DC USA
- 3) Sato Y, Kobayashi H, Higuchi T., Ida H., Minamisawa S., Eto Y, Era T, Kimura S, Ohashi T. Disease Modeling of late-Onset Pompe Disease-Specific induced Pluripotent stem cells. Annual meeting of American society of gene cell therapy, May 21, 2014, Washington DC USA
- 4) 木村重美 他
小児の筋疾患の治療評価としてのアクチグラフ その2 2013年05月30日～2013年6月1日 第55回日本小児神経学会 大分
- 5) Kimura S., Yoshioka K., Ozasa S. An approach for systemic delivery of embryonic stem cells into mouse skeletal muscle, Annual meeting of American society of gene cell therapy, May 18, 2012, Philadelphia PA USA

図書 (計5件)

- 1) 木村重美 鎌田直美 小篠史郎 :
小児皮膚筋炎; 骨格筋症候群 (上)
日本臨床社 (in press) (分担執筆)
- 2) 木村重美 :
今日の小児治療指針; 先天性ミオパチー
医学書院 (in press) (分担執筆)
- 3) 木村重美 :
小児科の治療指針; 先天性ミオパチー
診断と治療社 828-830. 2014 (分担執筆)
- 4) 木村重美 :
ポンペ病症例集; 長期酵素補充療法中の小児型ポンペ病の1例
Medical Tribune 93-97. 2013 (分担執筆)
- 5) 木村重美 :
最新小児科診療ガイド準拠 小児科診断・治療指針; 筋ジストロフィー・筋緊張性ジストロフィー 中山書店 769-775. 2012 (分担執筆)

産業財産権 (1件)

平成25年10月29日出願
特 願 2013-223948
筋疾患の治療または予防のための医薬組成物
現在、PCT国際出願中

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
木村重美 (KIMURA SHIGEMI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：60284767