

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659687

研究課題名(和文)骨格筋内に形成される異所性骨細胞の起源の探索

研究課題名(英文)Origin of cells that contribute to heterotopic ossification in skeletal muscle

研究代表者

上住 聡芳(Uezumi, Akiyoshi)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：60434594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋に存在する2種類の前駆細胞、筋衛星細胞と間葉系前駆細胞(MPC)、が進行性骨化性線維異形成症(FOP)で見られる異所性骨細胞の起源となり得るか調べる目的で研究を行った。ヒト骨格筋から2種類の前駆細胞を単離、培養することに成功した。ヒトMPCはヒト筋衛星細胞に比べ高い骨分化能を有していることが明らかとなった。さらにFOP患者で見られる変異ALK-2遺伝子をヒトMPCに導入し、免疫不全マウスに移植したところ、骨様組織の形成が確認された。以上から、骨格筋に存在するMPCが異所性骨化の起源となる細胞である可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP) is a severely disabling heritable disorder of connective tissue characterized by progressive extraskeletal ossification in skeletal muscle. Mutation of the ALK-2 gene, a BMP type I receptor, was identified in FOP patients and has been shown to contribute to the pathogenesis of FOP. Skeletal muscle contains two types of progenitor cells: satellite cells and mesenchymal progenitor cells (MPC). In this study, we investigated possible involvement of these progenitors in the pathogenesis of FOP. We established techniques for isolating and culturing satellite cells and MPC from human skeletal muscle. Human MPC showed much higher osteogenic potential than human satellite cells and MPC transduced with mutant ALK-2 contributed heterotopic ossification when transplanted into immunodeficient mice. Our results strongly suggest that MPC represents best possible candidate for cellular origin of heterotopic ossification in skeletal muscle.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：異所性骨化 骨格筋 間葉系前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

FOP は全身の骨格筋等に異所性骨化を認める進行性の疾患である。およそ2～5歳の小児期に発症し、徐々に骨化が進行するに伴い全身の関節に強直が起り、運動が極めて困難になる。原因は解明されていないが、家族性と孤発性の発症様式が確認されている。最近、家族性と孤発性の患者に共通して BMP 受容体である ALK-2 に変異(R206H: 206 番目のアミノ酸アルギニンがヒスチジンに変異)が同定された (Shore et al., Nat. Genet., 2006)。このことから、BMP シグナルの調節異常が FOP の病態の背景にあると考えられる。

骨格筋に存在し、異所性骨細胞の起源となる細胞の候補として、筋衛星細胞と間葉系前駆細胞が挙げられる。筋衛星細胞とは、筋線維の細胞膜と基底膜の間に存在する単核の細胞で、成体において再生筋線維を生み出す骨格筋前駆細胞として機能する。一方、我々は骨格筋に内在し筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞 (mesenchymal progenitor cell, MPC) の同定に成功している (Uezumi et al., Nat. Cell Biol., 2010)。この MPC は病態下において、脂肪細胞や線維芽細胞へ分化することで骨格筋の脂肪化や線維化に寄与する (Uezumi et al., Nat. Cell Biol., 2010; Uezumi et al., J. Cell Sci., 2011)。興味深いことに、筋衛星細胞と MPC は共に筋損傷時に盛んに増殖する細胞で、in vitro で BMP 依存性の骨分化を示す。すなわち、これら2種類の前駆細胞は、FOP において異所性骨細胞を生み出す細胞の候補と考えられる。

2. 研究の目的

筋衛星細胞と MPC の2種類の前駆細胞に注目し、どちらの細胞が FOP において見られる異所性骨細胞の起源となり得るか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 筋衛星細胞および MPC を特異的に標識するマウスの作製

Pax7-CreER^{T2} を利用し筋衛星細胞特異的に遺伝子組換えを誘導する。また、PDGFR α -CreER^{T2} を利用し MPC 特異的に遺伝子組換えを誘導する。

Pax7-CreER^{T2} と R26R-EYFP、PDGFR α -CreER^{T2} と R26R-EYFP を交配し、Pax7-CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスと PDGFR α -CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスを作製する。

タモキシフェンを投与し、Cre を作動させる。

Pax7-CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスにおいて Pax7 と EYFP の発現を調べ、筋衛星細胞が標識されたか確認する。

PDGFR α -CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスにおいて PDGFR α と EYFP の発現を調べ、MPC が標識されたか確認する。

(2) ヒト骨格筋から前駆細胞の単離・培養法の確立

医学・臨床的観点からヒト細胞を用いて研究することは重要である。そこでヒト骨格筋からの前駆細胞の単離・培養に取り組む。

ヒト骨格筋を酵素処理し、単核細胞を調整する。

細胞表面マーカーを用い FACS によって前駆細胞を単離する。

単離した前駆細胞を培養、維持し、分化誘導系にて分化能を精査する。

(3) ヒト骨格筋由来前駆細胞の骨分化能の解析

ヒト骨格筋由来前駆細胞の骨分化能を調べる。

ヒト骨格筋由来前駆細胞を in vitro で骨分化誘導し、分化能を解析する。

ヒト骨格筋由来前駆細胞を PLGA-ハイドロキシアパタイトの足場とともに免疫不全マウスの皮下に移植し、in vivo の骨形成能を調べる。

(4) 変異 ALK-2 発現レンチウイルスベクターの作製

ヒト MPC の FOP 病態への関連を追究するため、変異 ALK-2 と Venus を発現するレンチウイルスベクターを作製する。

ヒト ALK-2 遺伝子に変異を導入し、作製された変異 ALK-2 遺伝子を IRES-Venus の上流に組み込んだレンチウイルス発現ベクターを作製する。

作製したレンチウイルスベクターをヒト MPC に感染させ、Venus の発現により遺伝子導入を確認する。

(5) 変異 ALK-2 導入ヒト MPC の移植実験

作製した変異 ALK-2 導入ヒト MPC の異所性骨形成への関与を明らかにするため、免疫不全マウスへの移植を行う。

ヒト MPC に (4) で作製したレンチウイルスベクターを感染させ、変異 ALK-2 を導入する。

変異 ALK-2 導入ヒト MPC を免疫不全マウスに移植する。

移植片の組織学的を行い異所性骨形成への寄与を精査する。

4. 研究成果

(1) 筋衛星細胞および MPC を特異的に標識するマウスの作製

Pax7-CreER^{T2} と R26R-EYFP、PDGFR α -CreER^{T2} と R26R-EYFP を交配し、Pax7-CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスと PDGFR α -CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスを作製した。作製されたマウスにタモキシフェンを投与し、組換えを誘導したところ、Pax7-CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスでは既に報告されているように高効率に筋衛星細胞特異的な EYFP の発現が確認できたが、PDGFR α

-CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスでは MPC の 1%程度にしか EYFP の発現が見られず、PDGFR α -CreER^{T2}/R26R-EYFP マウスによる MPC での組換え効率が非常に低いことが明らかになった。

(2) ヒト骨格筋から前駆細胞の単離・培養法の確立

PDGFR α -CreER^{T2} マウスによる MPC での組換え効率の低さの問題から、遺伝子改変マウスを利用した研究計画を見直すことにした。代わりに、医学・臨床的観点を考慮しヒト骨格筋由来前駆細胞を用いた研究を実施することとした。ヒト骨格筋から PDGFR α と CD56 をマーカーに、MPC および筋衛星細胞の単離を試みた。単離した細胞を培養後、分化試験を行ったところ、脂肪分化能は PDGFR α 陽性細胞に高度に濃縮され、筋分化は CD56 陽性細胞にのみ見られ、それぞれ MPC および筋衛星細胞が高純度に単離されていることが確認できた。以上のように、ヒト骨格筋から前駆細胞を単離・培養する方法を確立し、論文発表した (Uezumi et al., Cell Death Dis, 2014)。

(3) ヒト骨格筋由来前駆細胞の骨分化能の解析

ヒト骨格筋から前駆細胞を単離し、in vitro の骨分化能をアルカリフォスファターゼ活性、アリザリンレッド染色により評価した。その結果、MPC および筋衛星細胞ともに同等の in vitro 骨分化能を示した。

ヒト骨格筋由来前駆細胞を PLGA-ハイドロキシアパタイトの足場とともに免疫不全マウスの皮下に移植し、in vivo の骨形成能を評価した。その結果、MPC は骨様組織を形成したが、筋衛星細胞は骨様組織形成を示さず、in vivo の骨形成能に明らかな違いがあった (図 1)。これらから異所性骨細胞の起源は筋衛星細胞ではなく MPC であることが示唆され、これらの成果を論文発表した (Oishi et al., PLoS One, 2013)。

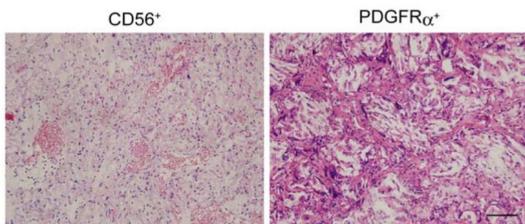


図1. ヒト骨格筋由来前駆細胞の in vivo 骨分化能

(4) 変異 ALK-2 発現レンチウイルスベクターの作製

ヒト MPC の FOP 病態への関連を追究するため、変異 ALK-2 と Venus を発現するレンチウイルスベクターを作製した。ヒト ALK-2 遺伝子に変異を導入し、FOP で見られる変異 ALK-2 遺伝子 (R206H) を作製した。シークエンスによって変異を確認した (図 2)。

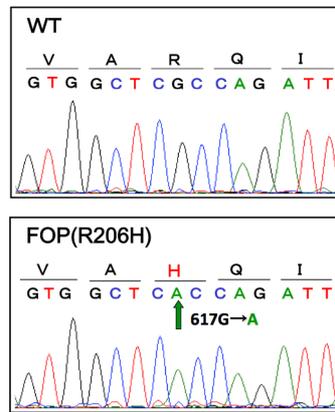


図2. 変異ALK-2遺伝子の作製

作製した変異 ALK-2 遺伝子を IRES-Venus の上流に組み込んだレンチウイルス発現ベクターを作製した。

(5) 変異 ALK-2 導入ヒト MPC の移植実験
変異 ALK-2 導入ヒト MPC の異所性骨形成への関与を明らかにするため、免疫不全マウスへの移植実験を行った。ヒト MPC に変異 ALK-2 発現レンチウイルスベクターを感染させ、Venus の発現を調べたところ、高効率な遺伝子導入が確認できた (図 3)。

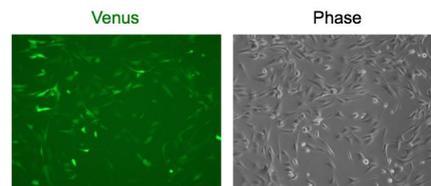


図3. ヒトMPCへのレンチウイルスベクターによる遺伝子導入

変異 ALK-2 導入ヒト MPC を免疫不全マウスに移植し、移植片の組織学的解析を行ったところ、変異 ALK-2 発現ヒト MPC による骨様組織の形成が認められた (図 4)。

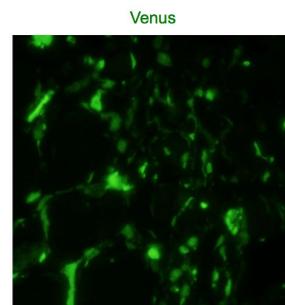


図4. 変異ALK-2発現ヒトMPCの移植実験

以上から、骨格筋に存在する MPC が FOP で見られる異所性骨化の起源となる細胞である可能性が強く示唆された。本研究において、ヒト骨格筋から MPC を単離・培養する方法を確立しており、これを利用すればヒト MPC を標的とした創薬研究への発展も可能となり、その意義は大きい。

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 6件)

Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K. Identification and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. Cell Death Dis. 査読有 5:e1186. 2014 doi: 10.1038/cddis.2014.161.

Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Tsuchida K. Roles of nonmyogenic mesenchymal progenitors in pathogenesis and regeneration of skeletal muscle. Front Physiol. 査読有 5:68. 2014 <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fphys.2014.00068/abstract>

Oishi T, Uezumi A, Kanaji A, Yamamoto N, Yamaguchi A, Yamada H, Tsuchida K. Osteogenic differentiation capacity of human skeletal muscle-derived progenitor cells. PLoS One. 査読有 8(2):e56641. 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0056641.

[学会発表](計 4件)

上住聡芳. 霜降りの起源となる細胞の表現型を制御するメカニズム. 第118回日本畜産学会 2014年3月26日 つくば

上住聡芳. 骨格筋内在性間葉系前駆細胞による筋再生促進機構の解析. 第13回日本再生医療学会総会 2014年3月4日 京都

Uezumi A. Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. 9th Japanese-French Symposium for 'muscular dystrophy', 2012年9月7日 東京

Uezumi A. Roles for nonmyogenic mesenchymal progenitors in skeletal muscle regeneration. FASEB Science Research Conference: Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells, 2012年8月15日 Lucca, Italy

[図書](計 2件)

上住聡芳 他、金原出版、整形・災害外科、2013、695

上住聡芳 他、医学書院、生体の科学、2013、192

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上住 聡芳 (UEZUMI, Akiyoshi)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教
研究者番号：60434594

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：