

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462994

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞へのMyoD family 遺伝子導入による筋の再生

研究課題名(英文) Regeneration of muscle by introduction of MyoD family gene into adipose-derived stem cells

研究代表者

坂本 洋右 (SAKAMOTO, Yousuke)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50451745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の手術等で生じた組織欠損を補うために筋皮弁を用いるが、運動制限や筋力低下を伴い、患者の負担になることがある。今回我々は、種々の細胞に筋細胞発現遺伝子群の発現誘導に重要な MyoD family 遺伝子の導入を行い、筋細胞を再生することを考案した。結果、ヒト脂肪由来間幹細胞、ヒト胎児由来線維芽細胞、ヒト骨髄幹細胞に対し、MyoD family 遺伝子導入細胞を作製したところ、 α -actinin および α -SMA の発現亢進を確認した。これらの結果より、筋肉再生の可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myocutaneous flaps are clinically used for reconstruction of tissue defect, which is caused by the operations for oral cancer. However, restricted movement and power reduction of muscle frequently occurred. In this study, we tried to regenerate muscle cells from several kinds of cells, such as human adipose derived stem cell, human fetal fibroblast, and human bone marrow stem cell, by induction of MyoD family and Pax-7 genes, which are important for muscle differentiation. In the transfectants, α -actinin and α -SMA, two specific markers of myogenesis, were detected, suggesting that MyoD family and Pax-7 genes might be important factors of regeneration of muscle.

研究分野：医歯薬学 歯学・外科系歯学

キーワード：MyoD family 遺伝子 脂肪幹細胞 筋再生

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の手術等で生じた組織欠損を補うために、種々の皮弁や筋皮弁を用いる。しかし、患皮部の犠牲は大きく、特に、筋皮弁の場合には運動制限や筋力低下を伴い、患者の負担になっている。また、特に、口唇や頬粘膜欠損の再建では、人工筋肉がないために、組織の伸縮が可能な再建材料が得られず、機能的にも審美的にも不十分な再建に終わらなければならないこともある。このため、厚い筋と皮膚や血管、さらに場合によっては神経がついている再生筋弁/筋皮弁の開発が必要である。また MyoD family 遺伝子 (MyoD, myogenin, Myf5 等)、PAX-7 は筋細胞特異的発現遺伝子群の発現誘導を行う強力な転写因子であり、線維芽細胞などに導入すると筋に分化誘導することが報告されているが、必ずしも、方向通りに筋分化を得ることが出来ず、実用化されていない。医療の現場では、iPS 細胞はまだ実用化されておらず、ES 細胞は使いにくい。このため、日常臨床で簡単に入手可能な細胞種を用いて筋を再生させる必要がある。本研究の結果を基に、再生医療の現場への応用が可能となれば、人工筋肉がないために機能的にも審美的にも不十分な再建に終わらなければならなかった患者にとって朗報となる事は間違いない。

2. 研究の目的

本研究では、口腔外科の日常臨床で採取しやすい種々の細胞を利用し、Gateway システムを用いた MyoD family 遺伝子の導入を行い、筋細胞を再生することを考案し、その有用性の検索を行った。これらの研究は学術的知識を臨床に応用できるように下支えをする実用研究であり、その成果は臨床的にも社会的にも大きな貢献をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 頬脂肪体、顎骨髄からの幹細胞抽出

口腔外科手術を施行する患者で、頬脂肪体が露出する症例から術中に頬脂肪体を採取し、顎骨髄が露出する症例からは骨髄を採取する。その後、遠心法を用いて脂肪由来幹細胞 (adipose derived stem cells、ASCs)、あるいは骨髄由来幹細胞 (bone marrow stem cells、BMSCs) を分離し、培養を行う。5 継代程度にわたり安定した ASCs と BMSCs を実験に用いる。なお、胎児線維芽細胞 (fetal fibroblast、FF) は市販の細胞を購入した。

(2) MyoD family 遺伝子 (MyoD, myogenin, Myf5) PAX-7 の cDNA を発現ベクターに搭載する。

筋細胞特異的発現遺伝子群の発現誘導に重要な MyoD family 遺伝子 (MyoD, Myogenin, Myf5) および Pax-7 の ORF 配列を、Gateway システム (invitrogen) を用いて、レンチウイルスベクター

(CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus(Venus 搭載)) にそれぞれ搭載する。

(3) HEK 細胞を用いて種々の細胞へ感染させ、蛍光タンパク陽性細胞のセレクションを行う。

HEK293T 細胞を用いてウイルス含有培養上清を作成、ウイルスを濃縮する。この濃縮液を用いて、脂肪由来幹細胞 (ASCs)、骨髄由来幹細胞 (BMSCs)、胎児線維芽細胞 (FF) に感染させる。これらの細胞を Flow cytometry (BD Falcon) を用いて蛍光タンパク陽性細胞のセレクションを行うことにより、感染細胞を選別する。

(4) セレクションを行った細胞 (4 因子導入細胞) について培養を行い、導入遺伝子の発現を確認する。

セレクションを行った 4 因子 (MyoD, myogenin, Myf5, PAX-7) を導入した各種細胞 (ASCs, BMSCs, FF) から抽出した cDNA を用いて PCR 法にて導入遺伝子の発現確認を行う。

(5) セレクションを行った 4 因子導入細胞についてタンパクを抽出し、筋細胞のマーカーの発現を確認する。さらに、骨格筋分化誘導培地を用いて培養を行い、筋細胞マーカーの発現を確認する。

4 因子 (MyoD, myogenin, Myf5, PAX-7) 導入した各種細胞 (ASCs, BMSCs, FF) について、Western blot 法を用いて筋細胞マーカーの発現を確認する。さらに、これらの 4 因子 (MyoD, myogenin, Myf5, PAX-7) 導入した各種細胞 (ASCs, BMSCs, FF) を骨格筋分化誘導培地を用いて培養し、それらの細胞について、筋細胞マーカーの発現を確認する。

4. 研究成果

(1) MyoD family 遺伝子 (MyoD, myogenin, Myf5) PAX-7 の cDNA を発現ベクターに搭載する。

種々の細胞に対し、Gateway システム (invitrogen) を用いて、筋細胞特異的発現遺伝子群の発現誘導に重要な MyoD family 遺伝子 (MyoD, Myogenin, Myf5) および Pax-7 の導入を脂肪由来幹細胞 (ASCs)、骨髄由来幹細胞 (BMSCs)、胎児線維芽細胞 (FF) に行った。導入は、以下の Venus 搭載レンチウイルスベクター (CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus) により行った (図 1)。

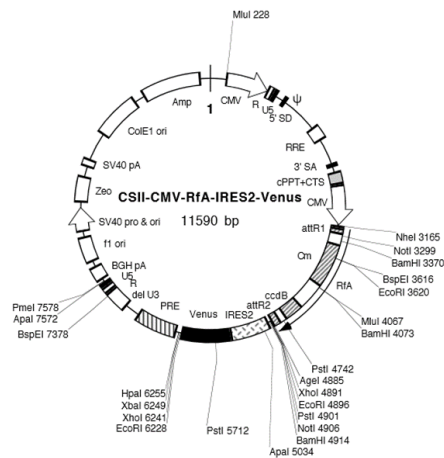


図 1：レンチウイルスベクター (CSII-CMV-RfA-IRES2-Venus)

(2) HEK 細胞を用いて、種々の細胞へ感染させ、蛍光タンパク陽性細胞のセレクションを行う。

高効率でDNA 導入が期待できる HEK293T 細胞を用いてウイルス含有培養上清を作成した。さらに、Lenti-X Concentrator (Clontech) を用いて濃縮させた上清を用いて各種細胞 (ASCs、BMSCs、FF) に感染させた後、Flow cytometry (BD Falcon) を使用し蛍光タンパク陽性細胞のセレクションを行った。(図 2 に代表例を示す。)

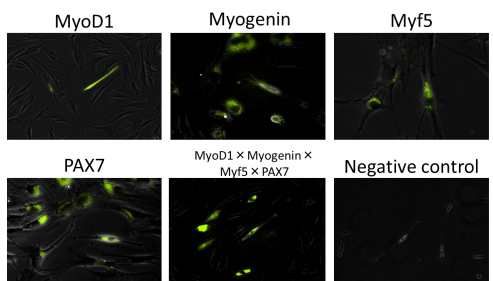


図 2：細胞への遺伝子導入・確認の代表例

なお、本システムによる感染 (遺伝子導入) 効率は、BMSCs と FF で非常に高かったが、ASCs では低かった。この差の原因として、Lenti virus receptor の発現状態が ASCs において低いことが考えられた。

(3) セレクションを行った細胞 (4 因子導入細胞) について培養を行い、導入遺伝子の発現を確認する。

4 因子 (MyoD, myogenin, Myf5, PAX-7) を導入した各種細胞から cDNA の抽出を行い、PCR 法にて導入遺伝子の発現確認を行ない、導入した 4 因子 (MyoD, myogenin, Myf5, PAX-7) が発現している細胞を確認・セレクションした。(図 3 に代表例を示す)

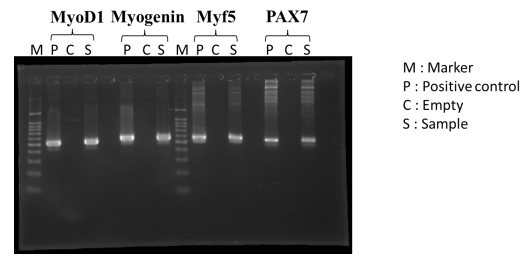


図 3：細胞に導入した 4 因子の発現確認

(4) セレクションを行った細胞 (4 因子導入・発現細胞) についてタンパクを抽出し、筋細胞のマーカーの発現を確認する。

導入した 4 因子の発現が PCR 法で確認された細胞からタンパクの抽出を行い、Western blot 法にて筋細胞マーカー (α-actinin、α-SMA) のタンパク発現を確認した。(図 4 に代表例を示す。)

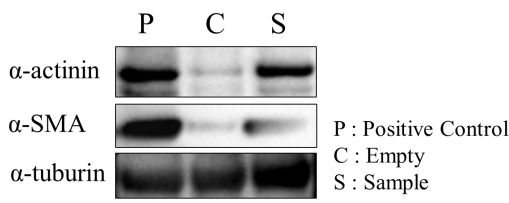


図 4：4 因子導入細胞における筋細胞マーカー・タンパク発現の確認

さらに、4 因子を導入した細胞において骨格筋分化誘導培地を用いて培養したところ、α-actinin の発現亢進を認めた(図 5)

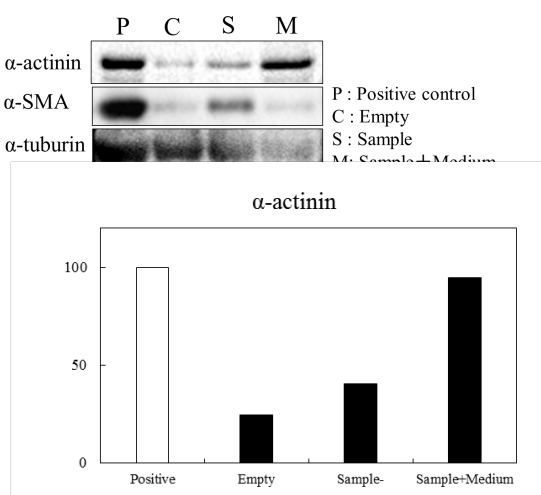


図 5：4 因子を導入細胞における骨格筋分化誘導培地培養後の筋マーカー (α-actinin) の発現亢進

[まとめ]

臨床で入手が簡便な種々の細胞を利用し、レンチウイルスベクターを用いた Gateway システムで MyoD family 遺伝子 (MyoD, myogenin, Myf5)と PAX-7 遺伝子の ORF 配列を導入することにより筋細胞を再生することを考案し、その有用性の検索を行った。使用した細胞は脂肪由来幹細胞 (ASCs)、骨髄由来幹細胞 (BMSCs)、胎児線維芽細胞 (FF)であった。結果として、遺伝子導入・発現により、筋細胞マーカーである α -actinin, α -SMA の発現を亢進させることができ、筋細胞の再生が可能であることが明らかとなった。また、遺伝子導入システムと細胞種により、遺伝子導入効率が異なることも判明し、使用細胞の種類と遺伝子導入システムの相性を事前に検討する必要があることも明らかになった。

本研究の結果を基に、今後、再生医療の現場への実現をめざし、再建材料の供給体制の構築に努力したい。

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 0 件)

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 洋右 (SAKAMOTO, Yousuke)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 50451745

(2)研究分担者

椎葉 正史 (SHIIBA, Masashi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 20301096

鷗澤 一弘 (UZAWA, Katsuhiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号 : 30302558

(3)連携研究者 なし