

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12675

研究課題名(和文) ヒト骨格筋を持つマウスの創出

研究課題名(英文) Generation of human skeletal muscle in the muscles of immunodeficient mice

研究代表者

上住 聡芳 (Uezumi, Akiyoshi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長

研究者番号：60434594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋には筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在する。筋衛星細胞はin vitroにて分化誘導すると筋管細胞を形成するが、筋管細胞は複雑で動的な骨格筋組織とは大きく異なり、骨格筋組織のモデルとして用いるには限界がある。創薬研究においては臨床有効性予測の観点からヒト細胞の利用が望まれるが、ヒト筋衛星細胞を免疫不全マウスの骨格筋に移植しヒトの筋線維を形成させることが可能である。しかし、ヒト筋衛星細胞の純化法は確立されておらず、移植効率の低さが問題となる。本研究では、ヒト筋衛星細胞の新規マーカーCD82を同定し、本マーカーを用いた細胞純化により、免疫不全マウスに対し高効率な移植を実現した。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle contains stem cell population called satellite cells. Satellite cells can generate myotube in vitro but there is a critical difference between myotube and skeletal muscle tissue. In addition, use of human cells is needed for the medical research. It is possible that making human muscle fibers in vivo by transplanting human satellite cells into the muscles of immunodeficient mice. However, it is difficult to achieve efficient transplantation of human satellite cells because purification method of human satellite cells has not been established. In this study, we discovered novel marker of human satellite cells, CD82. We demonstrated that efficient transplantation of human satellite cells into immunodeficient mice can be done by utilizing CD82 as a positive selection marker. We believe that our results provide useful information for the study of human skeletal muscle cells.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：筋衛星細胞 細胞表面マーカー ヒト細胞 移植

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は収縮によって運動や身体活動を掌る組織であり、液性因子を分泌し全身の代謝調節にも機能している。疫学研究から骨格筋量の多い人は種々の疾病に対する罹患率が低下し、長寿であることが明らかとなり、骨格筋は創薬の標的臓器として大きな注目を浴びている。

骨格筋組織は多核で巨大な筋線維が束をなした構造をしており腱を介して骨に結合している。筋線維の収縮により関節が駆動され、身体運動につながる。このように骨格筋は高度な三次元構造をとり非常に動的な組織である。骨格筋には筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、筋衛星細胞が増殖、分化・融合を経て新しく筋線維を作り出すことで骨格筋は再生する。筋衛星細胞は単離、培養することが可能で、*in vitro* にて分化誘導すると融合し多核の筋管細胞を形成する。しかし、筋管細胞は上述のように複雑で動的な骨格筋組織とは大きく異なり、創薬研究において骨格筋組織のモデルとして用いるには限界がある。

創薬研究においては臨床有効性予測の観点からヒト細胞の利用が望まれるが、ヒト筋衛星細胞を免疫不全マウスの骨格筋に移植しヒトの筋線維を形成させることが可能である。しかし、ヒト筋衛星細胞の純化法は確立されておらず、移植効率の低さが問題となる。CD56 はヒト筋衛星細胞のマーカーとして知られており、申請者らもヒト骨格筋から CD56 陽性細胞の単離・培養を報告しているが (Uezumi et al., Cell Death Dis, 2014)、筋衛星細胞特異的ではなく、さらなるマーカーの探索が望まれる。

### 2. 研究の目的

上述の研究背景を受けて、本研究では、1) ヒト筋衛星細胞の新規マーカー探索を実施し、同定されたマーカーによるヒト筋衛星細胞の純化を試みる。また、2) 新規マーカーの機能についても解析を行う。さらに、3) 新規マーカーを利用した、ヒト筋衛星細胞の免疫不全マウスへの移植を行い、「ヒト骨格筋を持つマウス」の創出を試みる。

### 3. 研究の方法

1) ヒト骨格筋から CD56 陽性細胞を単離・培養し、細胞表面抗原に対する抗体アレイを用いてプロテオーム解析を実施する。筋系譜細胞に特異的なマーカーを絞り込むため、PDGFR $\alpha$ 陽性間葉系前駆細胞についても解析を行い、比較対照とする。同定された新規マーカーの発現をヒト筋組織やヒト筋由来細胞を用いて確認する。新規マーカーを用いて、ヒト筋衛星細胞の純化が可能か検討する。2) 同定された新規マーカーのヒト筋衛星細胞における機能を調べるため、RNAi 法により新規マーカーをノックダウンする。ヒト筋衛星細胞の未分化性維持や分化に及ぼす影

響を精査する。

3) 新規マーカーを用いてヒト筋衛星細胞を純化する。免疫不全マウスの骨格筋に筋再生を誘導し、純化したヒト筋衛星細胞を移植する。ヒトスペクトリン特異的な抗体を利用して、ヒト筋線維の形成効率を精査する。

### 4. 研究成果

1) ヒト骨格筋から CD56 陽性細胞および PDGFR $\alpha$ 陽性細胞を単離・培養後、332 種類の細胞表面抗原に対する抗体からなる抗体アレイを用いて、網羅的に細胞表面マーカーの発現を調べた。その結果、CD56 陽性細胞特異的に高発現する細胞表面抗原として CD82 を同定した (図 1)。

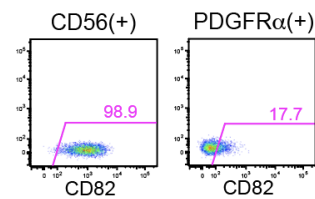


図 1. CD56 陽性細胞特異的に高発現する CD82 の同定

ヒト筋由来細胞やヒト骨格筋組織を用いて、CD82 の発現を確認したところ、筋衛星細胞に特異的な発現パターンが確認できた (図 2)。

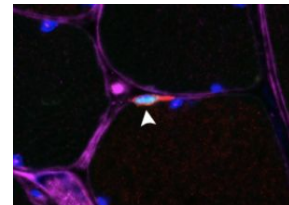


図 2. ヒト筋衛星細胞に発現する CD82 (赤)

ヒト筋由来細胞を CD82 を用いて純化し、分化誘導した結果、CD82 陽性分画のみが高効率に筋分化し、筋衛星細胞を濃縮できることが明らかとなった (図 3)。

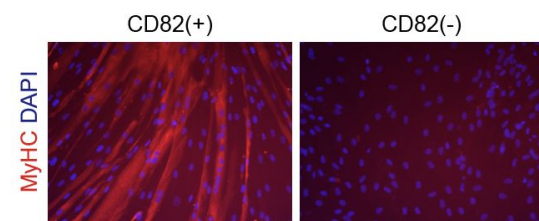


図 3. CD82 によるヒト筋衛星細胞の濃縮

以上から、新たに発見したマーカー CD82 はヒト筋衛星細胞の優れたマーカーであり、ヒト筋衛星細胞の純化に有用と考えられた。

2) ヒト筋衛星細胞の新規マーカーとして同定した CD82 の機能を調べる目的で、ヒト筋衛星細胞において RNAi 法により CD82 のノックダウンを行った。トランスフェクション条件や siRNA の配列を最適化し、95%以上のノックダウン効率を確認した。CD82 のノ

ックダウンにより、増殖条件下においても未分化性のマーカーである Pax7 の発現低下、そして、分化マーカーである MyoD、Myogenin の発現上昇が認められた ( 図 4 )。

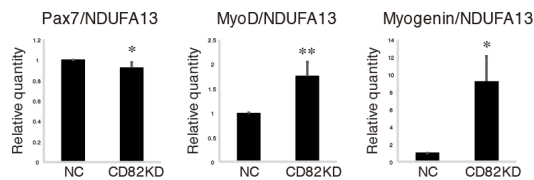


図 4 . CD82 ノックダウンによるヒト筋衛星細胞における筋分化マーカーの発現変化

このことから、CD82 はヒト筋衛星細胞の未分化性維持に機能していることが示唆された。

CD82 によるヒト筋衛星細胞の分化制御機構を理解するための足掛かりとして、筋分化の制御に関与することが知られているシグナル系 p38 について解析を行った。ヒト筋衛星細胞における p38 のリン酸化について調べたところ、CD82 のノックダウンによってリン酸化が亢進することが明らかとなった ( 図 5 )。

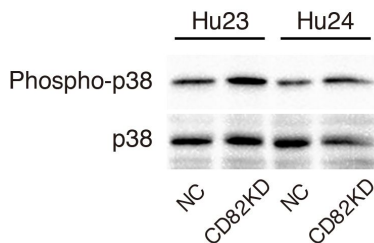


図 5 . CD82 ノックダウンによるヒト筋衛星細胞における p38 シグナルの亢進

そこで、CD82 ノックダウンによる筋分化の亢進と、p38 シグナルの関係を明確にするために、p38 特異的阻害剤 ( p38i ) を用いた検討を行った。その結果、CD82 ノックダウンによる筋分化マーカー MyoD、Myogenin の発現亢進が p38i により抑制された ( 図 6 )。これらから、CD82 によるヒト筋衛星細胞の未分化性の維持には、少なくとも p38 シグナル経路の抑制を介したメカニズムが想定された。

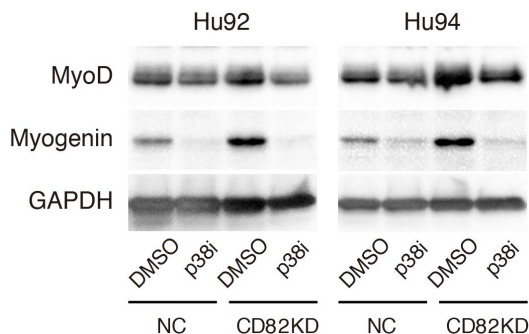


図 6 . CD82 によるヒト筋衛星細胞の分化制御は p38 シグナルを介する

CD82 のノックダウンによる筋分化の亢進

は、分化誘導後により顕著に認められた。CD82 をノックダウン後に分化誘導し 5 日後に解析したところ、CD82 ノックダウン細胞ではコントロールに比べ、筋管細胞の形成が顕著に亢進した ( 図 7 )。

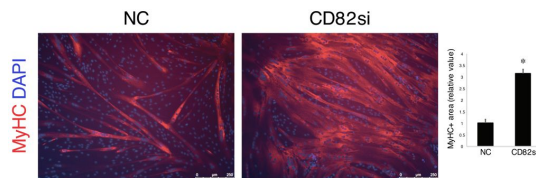


図 7 . CD82 ノックダウンによるヒト筋衛星細胞の分化亢進

筋衛星細胞は分化し再生筋線維を生み出すだけでなく、一部は未分化にとどまり自己複製する。これに似た現象は in vitro でも確認できる。分化誘導後に全ての筋衛星細胞が筋管に分化する訳でなく、Pax7 を発現し静止期に戻った単核細胞が未分化状態で残り、これらはリザーブ細胞と呼ばれる。リザーブ細胞は筋衛星細胞の自己複製の in vitro におけるモデルとして捉えられている。そこで、CD82 のノックダウンがヒト筋衛星細胞のリザーブ細胞形成に及ぼす影響を調べた。リザーブ細胞は分化マーカー  $\alpha$ -actinin 陰性で未分化マーカー Pax7 陽性、細胞周期マーカー Ki67 陰性により同定した。その結果、CD82 のノックダウンによりリザーブ細胞数が顕著に減少し、ヒト筋衛星細胞の自己複製能が低下していることが示唆された ( 図 8 )。

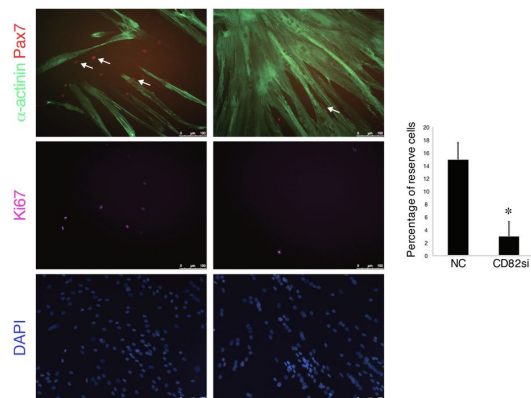


図 8 . CD82 ノックダウンによるリザーブ細胞の減少

以上から、新規マーカー CD82 は単にヒト筋衛星細胞を認識するだけのマーカーではなく、その未分化性維持や自己複製能の付与といった幹細胞機能に重要な役割を果たす機能分子であることが明らかとなった。

3) 新規マーカー CD82 はヒト筋衛星細胞の優れたマーカーというだけでなく、幹細胞性の維持にも重要な機能的分子であることから、CD82 を用いれば高品質なヒト筋衛星細胞が獲得でき、ひいては、高効率な移植の実現につながると期待できる。

そこで、CD82 を用いてヒト骨格筋から筋

衛星細胞を純化し、培養して増幅後、免疫不全マウスの再生筋への移植を行った。培養条件を最適化し、培養・増幅後も CD82 の発現を維持していることを確認した。1 x 10<sup>6</sup> 個の CD82 陽性ヒト筋衛星細胞を、筋損傷を施した免疫不全マウスの前脛骨筋へ移植した。移植後 4 週間の時点で、ヒト特異的なスペクトリン抗体、または、ヒト特異的なラミン抗体を用いてヒト細胞の生着を確認した。その結果、数百本のヒトスペクトリン陽性の筋線維の形成が確認でき、ヒト骨格筋を持つマウスが創出できたと言える（図 9）。

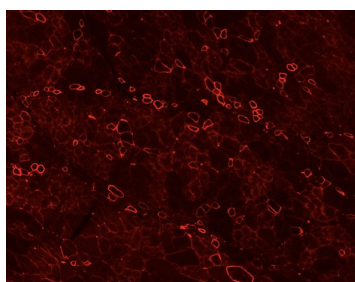


図 9 . 免疫不全マウス骨格筋中に形成されたヒト筋線維（赤）

定量解析の結果、ヒト筋線維が占める割合（移植効率）は 11% に達したことから、高効率な移植が実現できていると言える。

また、ヒトラミン陽性かつ Pax7 陽性で基底膜直下に位置する細胞も観察されたことから、移植されたヒト筋衛星細胞は筋線維としてだけでなく、自己複製し筋衛星細胞としても生着していることが明らかとなった（図 10）。

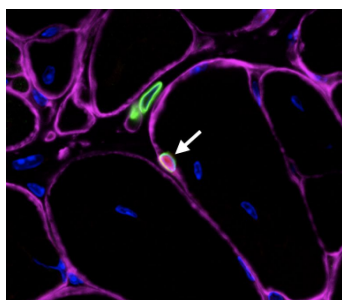


図 10 . 免疫不全マウス骨格筋中での筋衛星細胞としての生着：ヒトラミン（緑）、Pax7（赤）、基底膜（紫）

本研究の結果をまとめると、ヒト筋衛星細胞の網羅的細胞表面プロテオーム解析から、CD82 を新規マーカーとして同定した。CD82 はヒト筋衛星細胞の未分化性維持や自己複製に必要で、CD82 による細胞純化によって高効率なヒト筋衛星細胞の移植が可能となり、ヒト骨格筋を持つマウスが創出できたと言える。現時点で移植効率は 11% であるため、ヒト骨格筋の生理機能を調べる研究にはさらなる移植効率の改善が必要である。一方、筋ジストロフィーなどの筋疾患に対する細胞移植治療においては、移植効率が 5~10% 程度あれば治療効果が得られることが報告されているため、本研究の成果は細胞移植治療

という観点からは極めて有望であると考えられる。

#### 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 3 件）

Sakai H, Fukuda S, Nakamura M, Uezumi A, Noguchi Y, Sato T, Morita M, Yamada H, Tsuchida K, Tajbakhsh S, Fukuda S. Notch ligands regulate the muscle stem-like state ex vivo but are not sufficient for retaining regenerative capacity. *PLoS One*. 12(5):e0177516, 2017. 査読有

Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukuda S, Nishino I, Tsuchida K. Cell surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports*. 7:263-278, 2016. 査読有

Uezumi A, Kasai T, Tsuchida K. Identification, isolation and characterization of mesenchymal progenitors in mouse and human skeletal muscle. *Methods Mol Biol*. 1460:241-253, 2016. 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

上住聡芳、高品質なヒト骨格筋由来幹・前駆細胞の獲得とその応用、第 36 回日本眼薬理学会、2016 年 9 月 10 日、帝京大学（東京都・板橋区）

上住聡芳、筋間質の間葉系前駆細胞による骨格筋組織の維持、第 2 回日本筋学会学術集会、2016 年 8 月 6 日、NCNP（東京都・小平市）

Uezumi A, Roles of interstitial mesenchymal progenitors in skeletal muscle homeostasis, Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School “Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration” 2016 年 8 月 1 日、Minneapolis (USA)

Uezumi A, Maintenance of skeletal muscle by interstitial mesenchymal progenitors, FASEB SRC, 2016 年 7 月 27 日、Keystone (USA)

上住聡芳、ヒト骨格筋由来前駆細胞の新規マーカー探索とその応用、第 15 回日本再生医療学会総会、2016 年 3 月 19 日、大阪国際会議場（大阪府・大阪市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmig.or.jp/eresearch/a15.htm>

l

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上住 聡芳 (UEZUMI Akiyoshi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・専門副部長

研究者番号：60434594