

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07001

研究課題名(和文) Blastocyst complementation法を用いた骨格筋幹細胞の産生

研究課題名(英文) Generation of myogenic stem cells from iPS cells via blastocyst complementation.

研究代表者

伊藤 日加瑠 (Ito, Hikaru)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・助教

研究者番号：50587392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：未だiPS細胞から骨格筋幹細胞(筋衛星細胞)への効率の良い分化誘導法が確立されていない。そこで、iPS細胞から骨格筋幹細胞への新たな分化誘導法としてBlastocyst complementation法を用いた手法を確立し、骨格筋幹細胞による細胞移植治療の開発を目指している。その結果として、骨格筋欠損マウスの胚盤胞胚にGFP発現iPS細胞を注入したところ、GFPを発現するiPS細胞由来の骨格筋を持つキメラマウスが得られた。また、そのキメラマウスから骨格筋幹細胞を抽出し、筋ジストロフィーモデルマウスに移植したところ、正常な dystrophin 蛋白質が発現していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：One attractive therapy is myogenic stem cell transplantation to provide dystrophin in Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) patients. Recent work has reported the induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived myogenic stem cell transplantation for therapeutic strategy for DMD. However, there is a limitation in this strategy, especially in low differentiation efficiency and poor reproducibility of iPSCs-derived myogenic stem cells. Therefore, in a blastocyst complementation method, the regeneration of an organ can be achieved by utilizing the defect in an organ which can be complemented by injecting patient-derived iPSCs into a non-human blastocyst. In this study, we injected GFP (+) mouse iPSCs into skeletal muscle-less mouse blastocysts. iPSC-derived cells highly contributed to limb muscle of chimera. We also performed intramuscular injection of myogenic stem cells isolated from chimeric mice into mdx mice, and detected GFP (+) muscle fibers which also expressed donor-derived dystrophin.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨格筋幹細胞 胚盤胞胚補完法 発生工学 筋ジストロフィー サルコペニア

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋には、幹細胞として筋衛星細胞（骨格筋幹細胞）が存在し、生後の筋成長・再生に重要な働きをしている（Brack and Rando, Cell Stem Cell, 2012）。この骨格筋幹細胞は、刺激により分裂状態の筋芽細胞に移行し、最終的には細胞増殖を止め、融合することにより多核の筋線維に分化する。

現在、iPS細胞を用いた再生医療の実現へ向けて、様々な臓器について研究が実施されている。多くの場合、iPS細胞を目的の細胞へ分化誘導後、その細胞を移植し治療効果を得るといった細胞移植治療が試みられている。その他にも最近では、iPS細胞を目的の細胞へ分化誘導する際に、3次元培養によって小さな組織片を作り出し移植する組織片移植を試みる研究も報告されている。

骨格筋においても、骨格筋幹細胞の細胞移植や組織片移植に関する実験が行われ、既にその有効性は、筋ジストロフィーモデルマウスやサルコペニア（加齢による筋萎縮）のマウスを使用した実験で報告されている（Darabi et al., Nat. Med., 2008, Hall et al., Sci. Transl. Med., 2010）。

しかし、これまでに報告されてきた手法によるiPS細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導法では、分化効率は低く、生産性に乏しい。また、時間的な煩雑さも伴い、細胞移植後の生着率も良くない。実際に、培養皿で低効率ながら分化誘導した骨格筋幹細胞を移植した治療実験が多数報告されているが、生体から骨格筋幹細胞を抽出後、直ちに移植したほうが格段に生着率は良い。

さらに、骨格筋の3次元培養では、脆弱な骨格筋しか作出できず、移植片の生着率は悪い。また、骨格筋線維自体は分裂しないので移植された組織片は長期間維持されることはない。

## 2. 研究の目的

前述したように、骨格筋組織における再生

医療の実現には、多くの課題が残っており、それらの課題を克服するために、**Blastocyst complementation**法（胚盤胞補完法）を用いた手法を検討し、新たな骨格筋幹細胞の分化誘導法を確立することを目的に実験を行う。その結果として、筋ジストロフィーやサルコペニアなどの筋萎縮を呈する筋疾患における再生医療の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

**Blastocyst complementation**法とは、ある臓器の欠損動物の胚盤胞胚にiPS細胞を移植することで、キメラ動物を作製する。そのキメラ動物では、欠損していた臓器がiPS細胞由来の臓器で補完される。その**Blastocyst complementation**法を用いて作製したiPS細胞由来の細胞や臓器を患者へ移植し、治療を行う新たな再生医療が東京大学・スタンフォード大学の中内啓光教授らによって提唱されている（Kobayashi et al., Cell, 2010, Usui et al., Am. J. Pathol., 2012）。これまで、中内教授らのグループが行ってきた研究では膵臓や腎臓について発表されてきたが、骨格筋については未だ報告がない。そこで、この方法を骨格筋へ応用し、骨格筋幹細胞の産生を行う。

具体的な方法としては以下のように行った。

(1) GFPを発現するマウスの線維芽細胞からiPS細胞を樹立する。

(2) 樹立したGFP発現マウスiPS細胞を骨格筋欠損マウス（遺伝子X変異マウス）の**Blastocyst**（胚盤胞胚）にインジェクションを行い、キメラマウスを作製する。この際に、コントロールとして野生型のマウスの**Blastocyst**（胚盤胞胚）にもインジェクションを行う。

(3) 作製したキメラマウスのiPS細胞由来骨格筋から骨格筋幹細胞を抽出し、筋疾患モデルマウス（筋ジストロフィーモデルマウス）に移植を行い、細胞移植治療の有効性を検討

する。

#### 4. 研究成果

(1) GFP 発現マウス iPS 細胞を樹立し、骨格筋欠損マウス (遺伝子 X 変異マウス) の胚盤胞胚にインジェクションを行い、キメラマウスを作製した。その結果として、X 変異マウスでは四肢の骨格筋がみられないのに対し、X 変異 iPS キメラマウスでは四肢の骨格筋が観察できた (図 1)。さらに GFP の発現を確認すると X 変異 iPS キメラマウスでは四肢の骨格筋領域で強く GFP の発現がみられた (図 2)。

図 1 四肢の HE 染色像

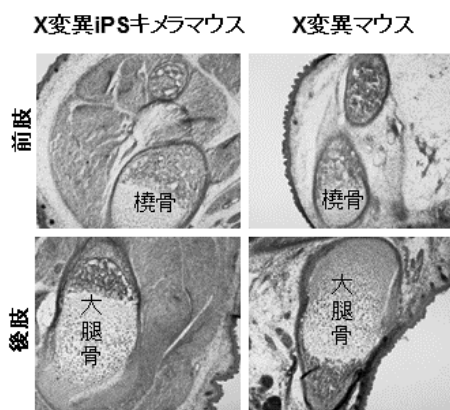
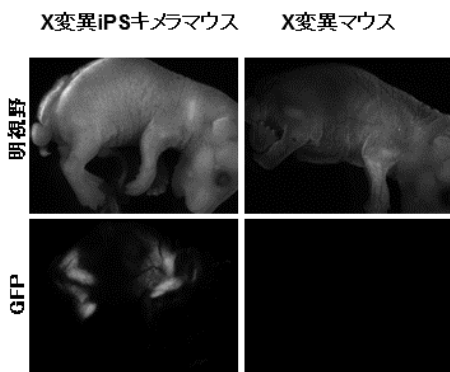


図 2



(2) 作製したキメラマウスの iPS 細胞由来骨格筋から骨格筋幹細胞を抽出し、疾患モデルマウス (筋ジストロフィーモデル mdx マウス) の前脛骨筋に移植を行い、細胞移植治療の有効性を検討した。その結果として、①作製した X 変異 iPS キメラマウスから抽出した骨格

筋幹細胞は、ほぼすべて iPS 細胞由来 (92%) であることを確認した (図 3 左)。その際に、血管内皮細胞においても同様の解析を行ったが、X 変異 iPS キメラマウスの血管内皮細胞では、およそ 45% が iPS 細胞由来の細胞であり、野生型 iPS キメラマウスと同程度の割合だった (図 3 右)。

② 移植した 8 週間後に、骨格筋の組織切片を作製し、形態学的な評価を行ったところ、GFP を発現する iPS 細胞由来の骨格筋幹細胞と骨格筋線維が観察された。また、移植領域では正常な dystrophin 蛋白質が発現していることも確認した (図 4)。さらに、握力測定などの運動機能解析も実施しており、治療効果が十分期待できる結果が得られている。

図 3

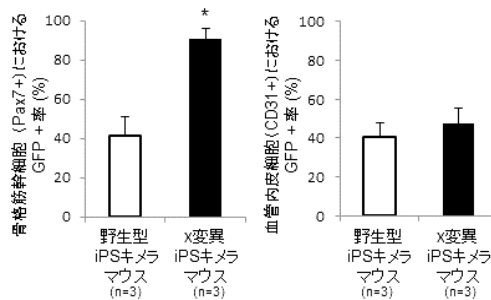
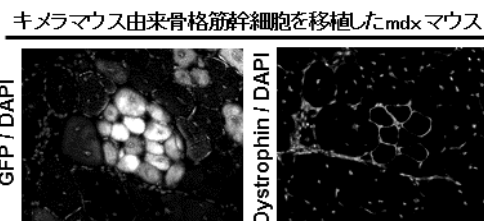


図 4



(3) その他として、骨格筋特異的なキメラマウスの作製を試みたが、現在のところ、期待しているようなキメラマウスを得ることはできていない。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Fujita K, Mao Y, Uchida S, Chen X, Shiwaku H, Tamura T, Ito H, Watase K, Homma H, Tagawa K, Sudol M,

Okazawa H. Developmental YAPdeltaC determines adult pathology in a model of spinocerebellar ataxia type 1, Nat Commun. 2017 Nov 30;8(1):1864. doi: 10.1038/s41467-017-01790-z. 査読有

- ② Yamawaki Y, Yoshioka N, Nozaki K, Ito H, Oda K, Harada K, Shirawachi S, Asano S, Aizawa H, Yamawaki S, Kanematsu T, Akagi H. Sodium butyrate abolishes lipopolysaccharide-induced depression-like behaviors and hippocampal microglial activation in mice. Brain Res. 2018 Feb 1;1680:13-38. doi: 10.1016/j.brainres.2017.12.004. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ito H, Asakura Y, Asakura A. Generation of myogenic stem cells from iPS cells via blastocyst complementation. 日本分子生物学会総会 (conbio2017), 2017
- ② 伊藤日加瑠、朝倉よう子、朝倉淳 Blastocyst complementation 法を用いた骨格筋幹細胞の産生、第 160 回日本獣医学会学術集会、2017
- ③ 伊藤日加瑠、朝倉よう子、朝倉淳 Blastocyst complementation 法を用いた骨格筋幹細胞の産生、日本解剖学会第 72 回中国・四国支部学術集会、2017

[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

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/neurobio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 日加瑠 (Ito, Hikaru)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科  
(医)・助教

研究者番号：50587392

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

朝倉 淳 (Asakura, Atsushi)

Department of Neurology, Stem Cell  
Institute, University of Minnesota,  
Associate Professor

朝倉 よう子 (Asakura, Yoko)

Department of Neurology, Stem Cell  
Institute, University of Minnesota,  
Technical staff (Researcher2)