

令和元年6月18日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08725

研究課題名(和文) 誘導間葉系幹・前駆細胞の筋ジストロフィー治療への応用

研究課題名(英文) application of induced mesenchymal stem cells from human iPS cells to cell therapy in muscular dystrophy

研究代表者

鈴木 友子 (Suzuki, Yuko)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：00342931

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)：間葉系幹細胞(MSC)のマーカーを発現し、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞へ分化する間葉系幹細胞をヒトiPS細胞(2株)から誘導した(iMSC)。iMSCは骨髄由来MSC(BM-MSC)より増殖が速かった。ヒト初代筋芽細胞、Hu5/Kd3株化ヒト筋芽細胞、及びヒトiPS細胞由来筋前駆細胞との共培養を行ったところ、BM-MSCとiMSCはこれらの細胞の筋分化を促進した。免疫不全DMDモデルマウスへiMSCとヒトiPS細胞由来筋前駆細胞を共移植すると、移植細胞は、間質に生着し、筋線維に分化している像はほとんどなかった。in vivoで移植細胞の筋分化が促進されなかった理由を明らかにする必要がある

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋ジストロフィーにおいては骨格筋線維が変性・壊死し、それを再生する組織幹細胞である筋衛星細胞の機能も病気の進行に伴い低下してくる。その一因として、骨格筋の間葉系前駆細胞の機能の低下があると言われている。我々はヒトiPS細胞から誘導した間葉系前駆細胞がヒト多能性幹細胞(iPS細胞)から誘導した筋前駆細胞の筋分化をin vitroにおいて促進することを明らかにした。今後は共移植に用いることで、その治療用細胞としての有用性と安全性を示すとともに、骨格筋の恒常性維持及び筋ジストロフィーの分子病態における間葉系前駆細胞の機能も明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) may improve the efficiency of transplantation of myogenic cells into dystrophic muscle, because they have anti-inflammatory and immunomodulatory properties, protect cells from apoptosis, and secrete factors which support muscle growth. We induced MSCs (iMSC) from hiPSCs. FACS revealed that iMSC express MSC markers, CD73, CD90 and CD105. iMSC could be induced to differentiate into osteogenic, chondrogenic, and adipogenic cells. iMSCs showed higher proliferative potential than human bone marrow-derived MSCs (BM-MSC). Both MSCs promoted the differentiation of human myoblasts, when co-cultured by using the transwell, suggesting that MSCs secrete soluble factors which promote muscle differentiation. Unexpectedly, co-transplantation of iMSC with hiPSC-derived myogenic cells into immuno-deficient DMD model mice did not produce dystrophin-positive myofibers. The factors which inhibit differentiation of hiPSC-derived myogenic cells in vivo remain to be clarified.

研究分野：筋ジストロフィーの再生医療

キーワード：間葉系幹細胞 筋ジストロフィー 再生 移植治療 筋前駆細胞

### 1. 研究開始当初の背景

マウス骨格筋に内在する間葉系幹前駆細胞は筋再生過程で重要な役割を果たす一方、筋ジストロフィーの病態にも深く関与していることが報告されている (Nat Cell Biol. 12:143-52, 2010; J Cell Sci. 124:3654-64, 2011)。我々は、マウスの筋芽細胞と間葉系幹・前駆細胞を共移植すると移植効率が上がることを報告している (Am J Pathol. 173:781-91, 2008)。他研究室からはジストロフィン欠損 mdx マウスへ間葉系幹・前駆細胞を移植すると表現型を改善したという報告がある (Valadares et al., Stem Cell Rev. 2014; Fujita et al., Stem Cells, 2015)。一方、ヒト骨髄由来及び脂肪組織由来間葉系幹・前駆細胞は骨・軟骨疾患、血管障害や心疾患等、多くの疾患で既に移植治療に用いられており、実質細胞に分化する機能に加え、産生する様々な成長因子等によって組織修復を促進する効果 (パラクライン効果) や免疫調整機能が報告されている。

### 2. 研究の目的

難治性筋疾患を代表する Duchenne muscular dystrophy (DMD) の治療戦略としては、アンチセンスオリゴを用いたエクソン・スキッピング療法など、直接ジストロフィンの発現回復を企図するものが中心であるが、今のところ効果は限定的である。間葉系幹・前駆細胞は筋芽細胞の増殖・分化促進、細胞外マトリクスの再構築、免疫反応制御を行うことで筋再生を促進するが、進行した筋ジストロフィー筋では間葉系幹・前駆細胞自体が性質を変化させ、線維化や脂肪化を促進し、筋再生を阻害して、細胞移植の効率を低下させる劣悪な微小環境を構成する。本研究では「筋再生を促進し、炎症・免疫反応を抑制する間葉系幹・前駆細胞」をヒト多能性幹細胞から誘導し、「線維化や脂肪化を促進している内在性間葉系幹・前駆細胞」に拮抗、置換する戦略が筋ジストロフィーの病態の改善に有効であるかどうかを検証する。

### 3. 研究の方法

- 1) ヒト iPS 細胞 (2 株) から間葉系幹・前駆細胞を誘導した。
- 2) 誘導した間葉系幹・前駆細胞の性質を成人骨髄由来の MSC と比較した (マーカー発現、増殖能、分化能)。
- 3) ヒト iPS 細胞から Sphere 培養法を用いてヒト筋前駆細胞誘導した (Sakai-Takemura et al., 2018)。
- 4) 誘導した MSC (iMSC)、骨髄 MSC (BM-MSC) とヒト骨格筋前駆細胞 (初代筋芽細胞、株化ヒト筋芽細胞、誘導ヒト筋前駆細胞) をトランスウェルを用いて *in vitro* で共培養し、筋分化促進作用を MF20 (抗ミオシン抗体) と抗マイオジニン抗体を用いて評価した。 (fusion index)
- 5) iMSC をヒト筋前駆細胞とを免疫不全筋ジストロフィーマウス (*NSG-mdx<sup>4cv</sup>*) の骨格筋へ共移植することで移植効率の向上が認められるかを検討した。

### 4. 研究成果

ヒト iPS 細胞から骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞へ分化する間葉系幹細胞の特徴を持つ細胞を誘導できた (iMSC)。iMSC は骨髄由来の MSC (BM-MSC) と比較して、増殖が速い傾向があった。3 種類の筋前駆細胞 (ヒト初代筋芽細胞、Hu5/Kd3 株化ヒト筋芽細胞、ヒト iPS 細胞由来筋前駆細胞) との共培養を可溶性分子のみが透過できる transwell を用いて行ったところ、BM-MSC と iMSC はこれらの細胞の筋分化を促進したが、BM-MSC の方が筋分化をより促進することが分かった。BM-MSC 及び iMSC をヒト iPS 細胞由来筋前駆細胞と免疫不全 DMD モデルマウス (*NSG-mdx<sup>4cv</sup>*) の骨格筋へ共移植したところ、ヒト核を持つ細胞は間質にとどまり、移植した細胞が筋線維に分化している像はほとんどなかった。iMSC と BM-MSC は *in vitro* ではヒト骨格筋前駆細胞の分化促進作用があるにもかかわらず、*in vivo* では移植細胞の筋分化が促進されなかった原因を明らかにしていく必要がある。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- 1) Motohashi N, Uezumi A, Asakura A, Ikemoto-Uezumi M, Mori S, Mizunoe Y, Takashima R, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Shigemoto K. (2019) Tbx1 Regulates Inherited Metabolic and Myogenic Abilities of Progenitor Cells Derived from Slow- and Fast-type Muscle. *Cell Death Differ.* 26:1024-1036. doi: 10.1038/s41418-018-0186-4. 査読有
- 2) Sakai-Takemura F, Narita A, Masuda S, Wakamatsu W, Watanabe N, Nishiyama T, Nogami K, Blanc M, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y (2018) Premyogenic progenitors derived from human pluripotent stem cells expand in floating culture and differentiate into transplantable myogenic progenitors. *Sci. Rep.* 8, 6555. doi: 10.1155/2017/7906843. 査読有
- 3) Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2017) Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem cells - induction and application. *World J Stem Cells* 9: 89-97 DOI: 10.4252/wjsc.v9.i6.89 査読有

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

- 4) Miyagoe-Suzuki Y, Nishiyama T, Nakamura M, Narita A, Takemura F, Masuda S, Minami N, Murayama K, Komaki H, Goto Y, Takeda S. (2017) Induction of pluripotent stem cells from a manifesting carrier of Duchenne muscular dystrophy and characterization of their X-inactivation status *Stem Cells Int.* 2017:7906843. doi: 10.1155/2017/7906843. 査読有
- 5) 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, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K. (2016) Cell-surface protein profiling identifies distinctive markers of progenitor cells in human skeletal muscle. *Stem Cell Reports.* 7:263-78、doi: 10.1016/j.stemcr.2016.07.004. 査読有
- 6) 竹村英子, 鈴木友子, 武田伸一: 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発. . 化学工業, 68 (7): 19-23, 2017
- 7) 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィー. 神経・筋幹細胞による研究. CLINICAL NEUROSCIENCE, 36 (3): 351-355, 2018
- 8) 竹村英子, 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療, 細胞移植治療の最前線. 小児内科, 東京医学社, 48: 12, 1910-1914, 2016

[学会発表] (計8件)

- 1) Sakai-Takemura F, Nogami K, Matthias Blanc, Ahmed Elhussieny, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y: Stable induction of myogenic progenitors from human iPS cells using modified EZ sphere method. 11th Japanese-French Workshop, Kodaira Tokyo, 6. 15, 2018 (Poster)
- 2) 竹村英子、野上健一郎、Ahmed Elhussieny、武田伸一、鈴木友子: ヒト iPS 細胞由来骨格筋前駆細胞の増殖と分化制御機構の解析 第13回筋ジストロフィー治療研究会、熊本、11. 3, 2018
- 3) 竹村英子, Ahmed Elhussieny, 野上健一郎, 武田伸一, 鈴木友子: ヒト iPS 細胞由来骨格筋前駆細胞の増殖・分化制御機構の解析. 第41回日本分子生物学会年会. 横浜, 11. 30, 2018
- 4) 竹村英子、野上健一郎、Matthias Blanc、Ahmed Elhussieny、川端康太、武田伸一、鈴木友子: ヒト人工多能性幹細胞から誘導される骨格筋前駆細胞の増殖と分化制御機構の解析. 日本筋学会第4回学術集会. 川崎医科大学, 8. 11, 2018
- 5) 鈴木友子: ヒト骨格筋前駆細胞の増殖と分化の制御機構の解析. 第18回日本再生医療学会. 神戸国際会議場: 3. 23, 2019
- 6) 鈴木友子「多能性幹細胞を用いた難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発」 シンポジウム 15「骨格筋維持・再生メカニズムの解明と筋疾患に対する再生医療への応用」第17回日本再生医療学会総会 横浜 3. 21, 2018
- 7) Miyagoe-Suzuki Y, Masuda S, Narita A, Sakai-Takemura F, Suzuki M, Takeda S: Robust derivation of transplantable skeletal muscle progenitor cells from human induced pluripotent stem (iPS) cells using a stirring bioreactor. International Society for Stem Cell Research Annual meeting (ISSCR2017). Boston, MA, USA: 6.14-17, 2017
- 8) Miyagoe-Suzuki Y, Narita A, Masuda S, Takemura F, Nishiyama T, Ito N, Takeda S: Derivation of myogenic cells from human induced pluripotent stem (iPS) cells using a stirred bioreactor. Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle, Development and Homeostasis in Health and Disease Society for Muscle Biology Frontiers in Myogenesis, Pacific Grove, USA, 6.7, 2016

[図書] (計2件)

- 1) Nogami K, Blanc M, Takemura F, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y: Making skeletal muscle from human pluripotent stem cells. Muscle Cell and Tissue, IntechOpen, London, 117-132, 2018
- 2) Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. Stem cell-based cell therapy for Duchenne muscular dystrophy. eBOOK Translational research in muscular dystrophy, SPRINGER. Editors: Takeda, Shin'ichi, Miyagoe-Suzuki, Yuko, Mori-Yoshimura, Madoka (Eds.) 2016

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 武田 伸一

ローマ字氏名: Takeda, Shin'ichi

所属研究機関名: 国立精神・神経医療研究センター神経研究所

部局名: 遺伝子疾患治療研究部

職名: 部長

研究者番号 (8桁): 90171644

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：竹村 英子

ローマ字氏名：Takemura, Fusako

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。