

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15119

研究課題名(和文)細胞移植を介したウルリッヒ型筋ジストロフィー症の病態研究

研究課題名(英文) Study of the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy by transplantation of iPSC derived MSC

研究代表者

竹中 菜々 (Takenaka, Nana)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：20792849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：6型コラーゲン(COL6)の欠損は、ウルリッヒ型先天性筋ジストロフィー(UCMD)等の筋疾患の原因となることが分かっている。しかしながら、現時点ではUCMDに対する有効な治療法は存在しない。当該研究では、UCMDモデルマウスに対して、健常者由来ヒトiPS細胞(iPSC)から作製されたMSC(iMSC)を移植する実験を実施し、生着したiMSCから分泌されたCOL6が補充された領域において、筋幹細胞が活性化され、それとともに再生筋の成熟が促進され、結果としてUCMDの病態が改善することを確認した。また、UCMDモデルマウスに由来する筋幹細胞との共培養実験でも、同様の病態改善効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現時点では、UCMDに対する有効な治療法は存在しておらず、COL6の欠損がどのようなメカニズムを介してUCMDの病態を引き起こすかという点も正確には明らかとなっていない。当該研究では、健常者由来iPS細胞から作成したiMSCと、健常者由来iPS細胞に遺伝子操作を加えてCOL6を欠損させたiPS細胞から作成したCOL6KO-iMSCを、それぞれUCMDモデルマウスに移植する実験を介して、細胞移植によりCOL6を補充することで、骨格筋の再生・成熟が促進され、UCMDの病態が改善されることをはじめて明らかとした。この成果は、将来、細胞移植治療法の確立や、創薬開発にもつながると考えている。

研究成果の概要(英文)：Type 6 collagen (COL6) is produced by mesenchymal stromal cells (MSC) in skeletal muscle, and its gene mutation is the cause of Ullrich congenital muscular dystrophy (UCMD). To test whether COL6 supplementation has a therapeutic effect for UCMD, we conducted in vivo and in vitro experiments using healthy induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived MSCs (iMSCs) and COL6-deficient iMSCs (KO-iMSCs). The transplantation of iMSCs into the skeletal muscle of immunodeficient UCMD model mice demonstrated that muscle regeneration and maturation were promoted only in the region supplemented with COL6. In addition, co-culture experiments of skeletal muscle satellite cells derived from UCMD model mice (Col6a1KO-MuSCs) showed iMSCs but not KO-iMSCs could improve the proliferation, differentiation, and maturation of Col6a1KO-MuSCs. These findings indicate that COL6 supplementation improves muscle regeneration and maturation in UCMD model mice.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 6型コラーゲン ウルリッヒ型筋ジストロフィー MSC 骨格筋再生 病態メカニズム

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋組織中には血小板由来増殖因子受容体(PDGFR $\alpha$ )陽性の間葉系間質細胞(MSC)が存在している。MSCが産生し分泌する様々な成長因子や細胞外基質は、骨格筋の恒常性の維持や筋再生にポジティブに働いていることが報告されている。それらMSCが産生する細胞外基質の中でも、6型コラーゲン(COL6)は、筋肉幹細胞(サテライト細胞)の自己複製や骨格筋再生を促進すると報告があり[Urciuolo et al. Nature communications(2013)]、ヒトでは、COL6の欠損はウルリッヒ型筋ジストロフィー症(UCMD)等の筋疾患の原因となることが分かっている。しかしながら、現時点ではUCMDに対する有効な治療法は存在しておらず、そればかりか、COL6の欠損がどのようなメカニズムを介してUCMDの病態を引き起こしているかについても明らかとなっていない。

代表研究者は、当該研究を開始する以前から、UCMDモデルマウス(*Col6a1*KO/NSG)に対して、健常者由来ヒトiPS細胞から作製されたMSC(hiPSC-MSC)を移植する実験を実施しており、移植されたhiPSC-MSCがUCMD筋に生着し、移植部位において正常なCOL6を分泌すること、そして、COL6が補充された領域において、サテライト細胞が活性化され、それとともに再生筋の成熟が促進されることでUCMDの病態が改善することを確認していた。

## 2. 研究の目的

当該研究では、細胞移植によるCOL6欠損UCMDモデルマウス治療メカニズムの解明を通じて、なぜ骨格筋組織においてCOL6が欠損すると、これほどまでに重篤な筋委縮が起きるのか?を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

当該研究では、ゲノム編集技術(CRISPR-Cas9 system)により*COL6A1*遺伝子変異を起こしたCOL6KO-hiPSCMSC(COL6<sup>-/-</sup>)からMSCを誘導し、作製されたCOL6KO-hiPSC-MSCを用いた実験により、hiPSC-MSC移植によるUCMD病態改善のメカニズムを明らかにした。

COL6KO-hiPSCMSCを移植した際には、正常なCOL6遺伝子を持つhiPSC-MSC移植と同等の治療効果が得られなかった場合、hiPSC-MSC移植によるUCMD治療効果は、MSCにより産生されたCOL6を介したものであることを証明できる。

### 実験 COL6の有無による病態改善効果の差を明らかにする

hiPSC-MSC移植によるUCMD治療効果が、移植細胞により産生されたCOL6を介したものであるか否かを明らかとすることを目的とし、COL6産生能力を欠損させたCOL6KO-hiPSCMSCの移植実験を実施し、hiPSC-MSCと比較してUCMDマウスにおける治療効果を検証する。

それと並行して、*in vitro*での解析では、UCMDマウスから分離したprimaryサテライト細胞(*Col6a1*KO-MuSC)をhiPSC-MSCか、もしくはCOL6KO-hiPSC-MSCと共培養し、

共培養 3 日目にはサテライト細胞の活性化状態 (Pax7, myod1, Ki67) を、共培養 10 日後には筋管成熟 (eMHC) を免疫蛍光染色により定量的に比較解析する。

#### 実験 定量的解析を実施し、治療効果のメカニズムの詳細に迫る

MSC は、COL6 に限らず様々な因子を分泌していることでよく知られている。また、研究協力者の野口博士は、UCMD 患者の骨格筋組織に存在する MSC の形態異常や機能障害を指摘している [Noguchi et al. EBio Medicine (2017)]。そのため、仮に COL6 を介した作用が無くとも、移植された hiPSC-MSC それ自身が、機能障害状態にあるホストの MSC に代わって骨格筋の恒常性維持や筋再生促進に働き、それにより UCMD の病態が改善されるという「COL6 を介さない治療メカニズム」も考えられる。そこで、以下の 2 つの治療メカニズム仮説を考え、さらなる検証実験をすすめた。

仮説 : hiPSC-MSC が産生した COL6 を介した作用、

仮説 : MSC が一般的に分泌している COL6 以外の因子による作用

COL6KO-hiPSC-MSC 移植では治療効果が見られなかった場合は、仮説 の COL6 を介した作用が関与している可能性が高い。その場合、COL6 の有無による比較検証を進める。そのために、実験 と同様の UCMD マウスに由来する primary サテライト細胞 (Col6a1KO-MuSC) との共培養実験を、hiPSC-MSC と COL6KO-hiPSC-MSC、それぞれで実施する。そして、共培養 3、6 日目の Col6a1KO-MuSC において高く発現している転写因子の同定を実施することで、COL6 を介した筋再生・筋管の成熟に関わるメカニズムの解明を目指す

#### **4 . 研究成果**

当該研究では、UCMD モデルマウスの骨格筋組織に対して、健常者由来ヒト iPS 細胞 (hiPSC) から作製された MSC (hiPSC-MSC) と、健常者骨格筋組織由来 MSC (primary MSC: pMSC) を移植する実験を実施した。

その結果、移植された hiPSC-MSC と pMSC は UCMD モデルマウスの骨格筋組織中に生着し、最低でも移植後 12 週間は、移植筋内に生存していること、さらに、移植細胞により分泌された COL6 が骨格筋組織中に拡散し、最低でも移植後 24 週間、移植筋組織中に残存することが証明された。さらに、hiPSC-MSC 及び pMSC から分泌された COL6 が補充された領域において、筋幹細胞が活性化され (myoD 陽性細胞数の増加)、それとともに再生筋の成熟が促進され (eMHC 陽性筋線維の肥大、細胞内核数も増加)、その結果として、移植後 12 週後でも、UCMD の病態の一つである筋萎縮が有意に改善していることを証明した。また、UCMD モデルマウスに由来する筋幹細胞 (Col6a1KO-MuSC) との共培養実験でも、同様に、筋幹細胞の増殖・分化と、筋管の成熟が促進されていることを定量的な解析によって示し、筋分化・成熟・筋芽細胞融合に関連した遺伝子発現が有意に上昇していることも示した。

さらには、COL6 産生能力を欠落させた COL6KO-hiPSCMSC と、UCMD 患者に由来する iPSC から MSC (KO-iMSC, UCMD-iMSC) を作製して、同様の移植実験と共培養実験を実施した。その結果、KO-iMSC 及び UCMD-iMSC では、hiPSC-MSC で確認された筋再生促進作用が見られなかったことから、これらの効果は hiPSC-MSC により分泌された COL6 を介したものであることを明確に証明した。

細胞移植によって補充された COL6 を介して、UCMD モデルマウスの病態が軽減もしくは

は完全に治癒するということを証明した当該研究は、世界で始めて達成された成果である。また、COL6 補充による病態改善のメカニズムが明らかとなったために、その現象を遡って解析することで、UCMD の発症メカニズムが明らかとなり、それによって、また新たな治療法の開発や創薬にもつながる。そのため、本研究の成果は UCMD に対する根治療法の確立に向けた非常に大きな一歩となると考える。

これらの成果は、2020 年の国際幹細胞学会 (ISSCR) や日本分子生物学会、日本筋学会等で報告し、ISSCR では travel award を受賞している。現在は、英論文としてまとめたものを、国際誌への投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takenaka-Ninagawa N, Goto M, Ikeda R, Sakurai H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Muscular Dystrophy and Rehabilitation Interventions with Regenerative Treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Physical Medicine and Rehabilitation Reports	6. 最初と最後の頁 17-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s40141-019-00255-2	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 竹中（蛭川） 菜々、後藤 萌、櫻井 英俊	4. 巻 21
2. 論文標題 骨格筋再生における細胞移植とリハビリテーション	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本基礎理学療法学雑誌	6. 最初と最後の頁 33～42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24780/jptf.21.1_33	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nana Takenaka-Ninagawa, Kim Jin Sol, Megumi Goto, Rukia Ikeda, Makoto Ikeya, Akitsu Hotta, Akiyoshi Uezumi, Satoru Noguchi, Hidetoshi Sakurai
2. 発表標題 CELL THERAPY FOR TREATING ULLRICH CONGENITAL MUSCULAR DYSTROPHY (UCMD) MODEL MICE BY USING IPSC-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELL (MSC)
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 竹中（蛭川） 菜々、後藤萌、池田留輝愛、田中碧、伊東佑太、櫻井英俊
2. 発表標題 デュシェンヌ型筋ジストロフィー症モデルマウスに対する運動負荷は、細胞移植による治療効果を促進する
3. 学会等名 第4回 日本筋学会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Nana Takenaka-Ninagawa
2. 発表標題 Muscle-contraction training showed the potential to maximize the efficacy of cell transplantation treatment for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD)
3. 学会等名 第5回 国際組織工学・再生医療学会 世界会議2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Nana Takenaka-Ninagawa, Jinsol Kim, Mingming Zhao, Masae Sato, Tatsuya Jonouchi, Megumi Goto, Rukia Ikeda, Takahiko Sato, Makoto Ikeya, Akiyoshi Uezumi, Satoru Noguchi, Hidetoshi Sakurai
2. 発表標題 Collagen VI supplementation improves pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy by mesenchymal stromal cell transplantation
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (ISSCR 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Nana Takenaka-Ninagawa, Jinsol Kim, Mingming Zhao, Takahiko Sato, Makoto Ikeya, Akiyoshi Uezumi, Satoru Noguchi, Hidetoshi Sakurai
2. 発表標題 健常ヒトiPS細胞由来間葉系間質細胞 (iMSC) による6型コラーゲン補充は、ウルリッヒ型筋ジストロフィー (UCMD) の筋再生不全を改善する
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 竹中 (蜷川) 菜々、後藤萌、池田留輝愛、吉岡クレモンス紀穂、池谷真、櫻井英俊
2. 発表標題 健常ヒトiPS細胞由来間葉系間質細胞 (iMSC) による6型コラーゲン補充は、ウルリッヒ型筋ジストロフィー (UCMD) の病態を改善する
3. 学会等名 第25回 日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 竹中(蜷川) 菜々、KIM JIN SOL、趙明明、佐藤優江、城之内達也、後藤萌、池谷真、上住聡芳、佐藤貴彦、野口悟、櫻井英俊
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来間葉系間質細胞による6型コラーゲン補充は、ウルリッヒ型筋ジストロフィー（UCMD）モデルマウスの筋再生不全を改善する
3. 学会等名 第6回 日本筋学会 学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------