

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 B

研究期間：2008～2009

課題番号：20790317

研究課題名（和文）細胞遺伝子治療を目指した骨格筋分化誘導システムの開発

研究課題名（英文）Development of myogenic differentiation for cell therapeutic approach

研究代表者 笠原 優子 (KASAHARA YUKO)

国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・外来研究員

研究者番号：90391911

## 研究成果の概要（和文）：

骨髄間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells:MSCs)に骨格筋分化誘導因子 MyoD を分化スイッチとして一過性発現することで、簡便な筋分化誘導方法の確立に成功した。この MSCs の筋分化能を利用した、Duchenne 型筋ジストロフィーに対する細胞移植治療への応用の可能性をモデル動物を用いた移植実験により検証した。

## 研究成果の概要（英文）：

We could successfully achieve effective myogenic differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) by MyoD overexpression. This study suggests that MSCs would be a promising therapeutic tool for the treatment of Duchenne muscular dystrophy with allogenic transplantation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理

キーワード：細胞

## 1. 研究開始当初の背景

細胞遺伝子治療法の実用化においては、標的組織に高い効率で生着させる技術の開発が必要である。現時点では、細胞移植治療に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells:MSCs)を用いる手法が最も臨床応用に近い段階にあると考えられる。重症の遺伝性筋疾患である

Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)に対する根本的治療法としては、細胞移植治療法が注目されている。

## 2. 研究の目的

従来の MSCs の筋分化誘導は、大変複雑で長期間の培養が必要であるため、本研究課題

では、骨格筋分化誘導因子 MyoD 発現アデノウイルスベクターを用いた簡便な MSCs の筋分化誘導方法を確立する。さらに、MSCs の筋分化能を利用した Duchenne 型筋ジストロフィーへの移植治療の応用の可能性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) MSCs の MyoD 発現による骨格筋分化誘導方法の確立

イヌ骨髄液(2ml)から増殖力の高い CD271 陽性分画を磁気マイクロビーズにより濃縮し、移植に必要な量の MSCs を調製した。大量調整した MSCs に一過性の遺伝子発現を行うため、組換えアデノウイルスベクター Ad.MyoD を構築した。MSCs に Ad.MyoD およびマーカー遺伝子 GFP あるいは Luciferase 発現レトロウイルスベクターを感染させ、効果的な筋芽細胞への誘導条件の検討を行った。その際、アデノウイルスによる感染効率を上げるためヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FK228 を使用し、さらに筋分化誘導を促進するためにバルプロ酸を用いて、効率の高い筋分化誘導方法を確立した。

#### (2) MSCs の筋分化能を利用した移植実験

筋ジストロフィーモデル *mdx* マウスの大腿および下腿 ( $2 \times 10^5$  細胞)、あるいはイヌの左右前脛骨筋 ( $5 \times 10^6$  細胞) への局所移植を行った。イヌへの移植においては dog leukocyte antigen (DLA) の合致したペアより得られた個体間でドナーとレシピエントを選出した。

### 4. 研究成果

#### (1) MSCs の MyoD 発現による骨格筋分化誘導方法の確立

イヌの骨髄液を搾取し、増殖培地中で培養を行いコロニー形成能を有する細胞群の単離を試みたが、増殖能が低く誘導実験を行うには不十分であった。そこで、マウス MSCs では CD271 陽性細胞の増殖能が非常に高いことが知られていることから、イヌの骨髄細胞より CD271 陽性 MSCs を調製する新たな方法を確立した。

イヌ骨髄由来 CD271 陽性細胞では、陰性細胞に比べ培養開始後 20 日前後で約 25 倍の増殖が認められた。この際、両細胞間

で形態の差異は認められず、CD271 陽性分画の MSCs の増殖能は、陰性分画に比べ有意に高いことが確認された (図. 1)。

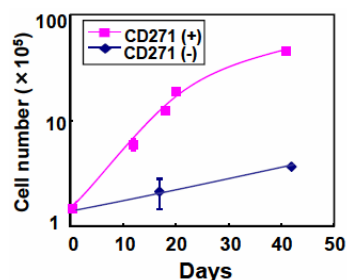


図. 1 細胞増殖能

CD271 陽性細胞は約 40 日間継代培養を行うことができ、移植に十分な細胞数を調整したが可能となった。なお、CD271 陽性細胞は特異的分化培地で培養する事により、MSCs に特徴的な骨芽細胞、軟骨細胞および脂肪細胞への多分化能を有していた。

MyoD 遺伝子導入したイヌ CD271 陽性 MSCs は myogenin、 $\alpha$ -actinin の発現を認め、かつ形態的に多核の筋管細胞が形成されることが確認された (図. 2)。また、アデノウイルスベクター感染前に FK228 を処理することにより感染効率が約 10 倍以上上がり、分化培地にはバルプロ酸を添加することで筋分化様細胞数が増加した。

したがって、MSCs に筋分化誘導スイッチとして MyoD を一過性強制発現することにより、従来法に比べて短期間で簡便な筋分化誘導方法を確立できた。

$\alpha$ -actinin (緑) + 核 (青)

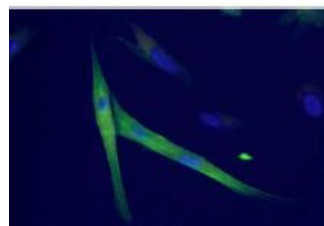


図. 2 筋分化した MSCs

#### (2) MSCs の筋分化能を利用した移植実験

次に、MyoD による MSCs の筋分化誘導能を利用して、*mdx* マウスへの局所的移植を行った。移植から 4 週間後、免疫染色による解析を行った結果、移植した筋組織において MSCs の生着が認められた。そこでこの移植条件を基に、イヌへの

同種移植を試みた。DLAの一致した正常犬よりCD271陽性MSCsを移植した結果、移植領域に2ヶ月間の長期間にわたりMSCsが生存・生着していることが確認できた。生着したMSCsは筋線維様の形態を示しており、筋分化マーカーMyosin heavy chainの発現を認めたため、筋再生過程であることが示唆された。

以上の研究成果より、① CD271陽性細胞の分画を行うことで、簡便かつ大量に増殖能の高い細胞を調製できた。② 筋分化誘導スイッチとしてMyoDを強制発現することにより、従来法に比べて短時間で簡便に大量のMSCsを効率良く筋分化の誘導ができた。③ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤は分化誘導効率を促進することが明らかとなった。④さらに、MyoD遺伝子導入MSCsをモデルマウスおよびイヌの筋肉内へ局所移植を行ったところ、長期間生存・生着し、筋線維の再生を促すことが明らかとなった。この事実より、MSCsの筋分化能を利用したDuchenne型筋ジストロフィーに対する移植治療の可能性が示唆された。

将来的には、MyoD遺伝子導入MSCsの移植により、筋組織の広範囲でのジストロフィンの発現回復、さらには運動機能の回復が期待できる。

#### 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)

- ① Yuko Nitahara-Kasahara, Masayoshi Fukasawa, Fumiko Shinkai-Ouchi, Shigeo Sato, Tetsuro Suzuki, Kyoko Murakami, Takaji Wakita, Kentaro Hanada, Tatsuo Miyamura and Masahiro Nishijima. Cellular vimentin content affects the protein level of Hepatitis C virus core protein and the activity of Hepatitis C virus production in cultured cells. *Virology*. (2009) Vol. 383, pp319-327. 査読あり
- ② Takashi Okada, Mutsuko Nonaka-Sarukawa, Ryosuke Uchibori, Kazue Kinoshita, Hiromi Hayashita-Kinoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Shin'ichi Takeda, Keiya Ozawa. Scalable Purification of Adeno-associated Virus Serotype 1 (AAV1) and AAV8 Vectors,

Using Dual Ion-Exchange Adsorptive Membranes. (2009) *Human Gene Therapy*, Vol.20, No.9, pp1013-1021. 査読あり

- ③ Jin-Hong Shin, Hiromi Hayashita-Kinoh, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, Shin'ichi Takeda. Improvement of ECG abnormalities and cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. (in submission)

[学会発表] (計7件)

- ① Yuko Nitahara-Kasahara, Akiyo Nishiyama, Jin-Hong Shin, Sachiko Ohshima-Hosoyama, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda. Myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cell and cell therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy. Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting, 6.14, 2008, Sapporo, 札幌医科大学
- ② Sachiko Ohshima-Hosoyama, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Yuasa Katsutoshi, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda. Effective transduction of Dystrophic dogs with rAAV Serotype 8. The 11th Annual Meeting, American Society of Gene Therapy, 6.1, 2008, Boston, MA, USA, John B. Hynes Convention Center
- ③ Jin-Hong Shin, Sachiko Ohshima-Hosoyama, Yuko Nitahara-Kasahara, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda. Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV-9-mediated microdystrophin transduction in mdx. Japan Society of Gene Therapy The 15th Annual Meeting, 6.13, 2008, Sapporo, 札幌医科大学
- ④ Yuko Nitahara-Kasahara, Hiromi Hayashita-Kinoh, Jin-Hong Shin, Akiyo Nishiyama, Sachiko Ohshima-Hosoyama, Michiko Wada-Maeda, Akinori Nakamura, Takashi Okada, and Shin'ichi Takeda. Cell therapeutic approach to duchenne muscular dystrophy using myogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells in dog,

Japan Society of Gene Therapy The  
15<sup>th</sup> Annual Meeting 2009, 7.11, 2009,  
Osaka, 大阪大学

- ⑤ 岡田尚巳, 喜納裕美, 笠原優子, 岡田浩典, 武田伸一: AAV ベクターを用いた筋ジストロフィーに対する遺伝子治療, 日本人類遺伝学会第 54 回大会, 9.24, 2009, 東京, グランドプリンスホテル高輪
- ⑥ 笠原 (仁田原) 優子, 喜納 (早下) 裕美, 西山章代, Jin-Hong Shin, 大島幸子, 岡田尚巳, 武田伸一: MyoD 発現アデノウイルスベクターによる骨髄間葉系幹細胞の骨格筋分化誘導と細胞移植治療, 第 57 回日本ウイルス学会学術集会, 10.26, 2009, 東京, 都市センターホテル
- ⑦ 喜納 裕美, 岡田浩典, 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一: 9 型 AAV ベクターを用いた筋ジストロフィー犬胎児・新生児への遺伝子導入 第 4 回筋ジストロフィー研究合同発表会, 10.31, 2009, 岡山, 倉敷由加温泉ホテル桃花

[図書] (計 1 件)

笠原 優子, 岡田 尚巳, 武田 伸一, ウイルスベクターを用いた筋ジストロフィーの治療法開発 医学の歩み (2008, 8.2) Vol.226, No.5, pp379-383.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

笠原 優子 (KASAHARA YUKO)

国立精神・神経センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部・外来研究員

研究者番号: 90391911