

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790984

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞から骨格筋前駆細胞作製の基盤研究開発

研究課題名（英文） Study on generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from human induced pluripotent stem cell.

研究代表者

加藤 竹雄 (KATO TAKEO)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60422945

研究成果の概要（和文）：ヒトES細胞Kh-ES1およびヒトiPS細胞253G4を用いてin vitroで骨格筋細胞を分化誘導することに成功した。これらの細胞はRT-PCRおよび免疫染色の結果から、Myogenin/骨格筋ミオシン陽性の成熟筋線維に分化したと考えられ、一部に自発収縮活動が観察されたことから、機能的にも成熟骨格筋に相当すると考えられた。今後はこれらの成果を発展させ、移植可能な前駆細胞の抽出を目標とする。また既に確立している筋ジストロフィー患者由来iPS細胞を用い、in vitroでの比較実験等を行う予定である。

研究成果の概要（英文）：We developed an efficient system for the generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from human ES cells and human iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：iPS 細胞、骨格筋分化誘導

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーに対する根治療法の一つとして、細胞移植療法がかねてより検討されてきた。骨格筋分化能を有する様々な幹細胞（筋芽細胞、筋衛生細胞、筋由来、脂肪由来、骨髄由来などの間葉系幹細胞等）がその移植ソースとして考慮されてきたが、その骨格筋再生性能、入手可能な細胞数、拒絶反応などの

免疫学的側面などの障壁により実現にはいずれも至っていない。我々は無限の増殖能と万能性を持つとされている胚性幹細胞（ES 細胞）および、それと同等の能力を有し、患者自身からも作製することが可能な誘導多能性幹細胞（iPS 細胞）に着目し、それらを用いた骨格筋再生医療の可能性について検討してきた。ES/iPS 細胞を用いた骨格筋再生医

療のためには、適切な分化誘導法の確立と、有効な骨格筋幹/前駆細胞を抽出する技術が必要であるが、ヒト ES 細胞の骨格筋分化に関する報告は未だ 3 報 (文献 1, 2, 3) のみであり、ヒト iPS 細胞については報告がない。

2. 研究の目的

我々は現在までにマウス ES/iPS 細胞において有効な分化誘導法の確立と移植可能な骨格筋幹/前駆細胞の抽出に成功し、報告してきた (文献 4, 5) が、今回それらの技術がヒト ES/iPS 細胞においても有効であるかを検証し、ヒト ES/iPS 細胞の新たな骨格筋分化誘導系について報告する。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞およびヒト iPS 細胞の維持培養：Kh-ES1 および 253G4 は、マイトマイシン処理した SNL 細胞上で、bFGF 5 ng/mL を添加したヒト ES/iPS 維持培地を用いて維持し、5 日目毎に継代した。

骨格筋分化培養：維持培養 5 日目の ES/iPS 細胞をヒト ES/iPS 細胞解離液で処理し、細胞塊をヒト ES/iPS 維持培地中で 7 日間浮遊培養して胚様体を形成し、形成された胚葉体を 0.1%ゼラチンコートした細胞培養ディッシュに付着培養した。ITS 培地で 14 日間培養した後、0.25% trypsin/EDTA を用いて解離し、I 型コラーゲンコートされた細胞培養ディッシュおよびプレートへ継代した。10% FCS と 5% HS を含む骨格筋分化培地で 28 日間培養した後に再び ITS 培地として 14~21 日間培養すると細胞融合した骨格筋線維が観察された。

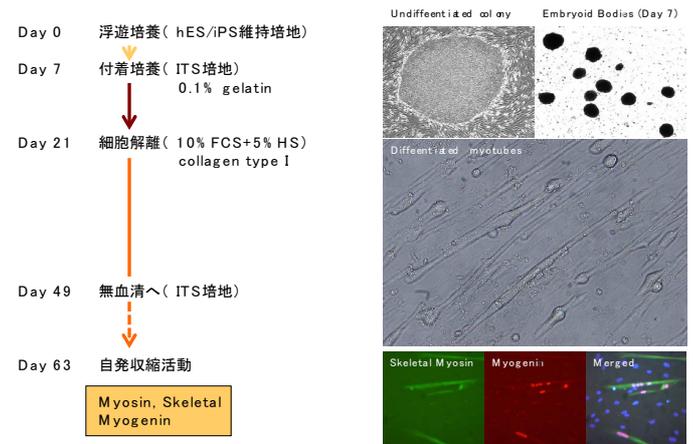
mRNA 解析：分化培養 7、21、49、63 日目の細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製し、Oct3/4、Nanog、Rex1、Pax3、Pax7、MyoD、Myf5、Myogenin、Desmin、MYH2 等に対する RT-PCR を行った。

免疫染色：分化 49、56、63、70 日目に細胞を固定し、Pax3、Pax7、MyoD、Myf5、Myogenin、骨格筋ミオシン等に対する免疫染色を行った。骨格筋分化能は DAPI による核染色に対する Myogenin 陽性細胞の比として計算した。

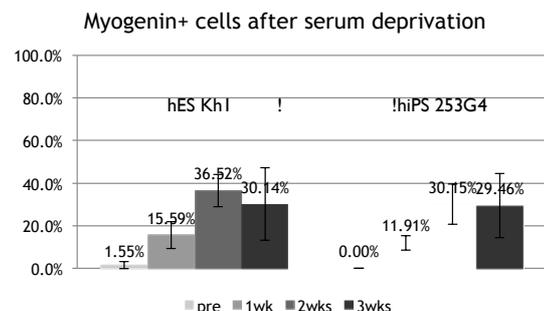
フローサイトメトリー解析：分化培養 42 日目の細胞を PE-conjugated CD73 抗体および APC-conjugated NCAM 抗体を用いて標識し、FACS Calibur および FACS Vantage を用いて解析した。また細胞を分画して I 型コラーゲンコート細胞培養プレート上で継続して培養し、後に免疫染色を行った。

4. 研究成果

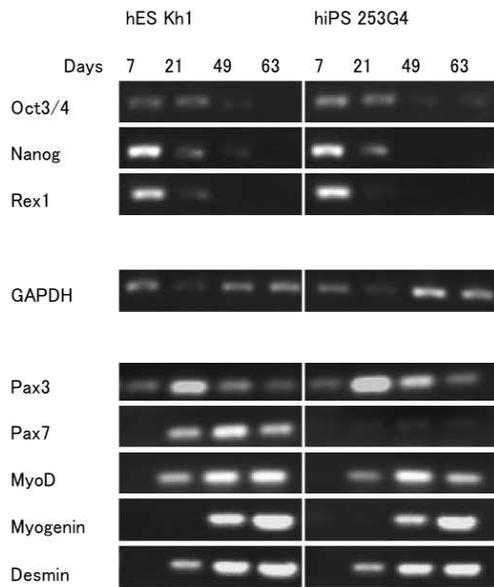
ヒト ES 細胞 (Kh-ES1) およびヒト iPS 細胞 (253G4) いずれからも Myogenin/骨格筋ミオシン陽性となる骨格筋線維を誘導することが出来た。



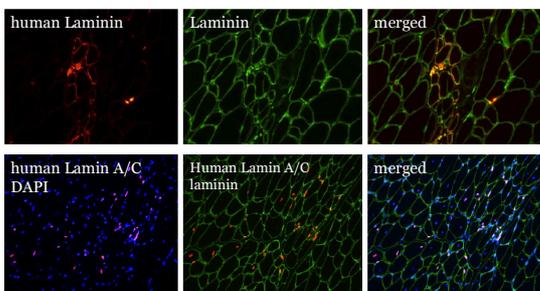
誘導効率は Kh-ES1 で $36.5 \pm 7.6\%$ 、253G4 で $30.1 \pm 9.4\%$ とやや差がみられた。



Kh-ES1では筋線維がより太く融合する傾向があり、一部で不規則な自発収縮活動を認めた。RT-PCR解析では未分化マーカーの低下と共にPax3が早期に上昇し、Pax7、MyoD、Myf5の出現を経てMyogeninが出現し、免疫染色においても同様の結果を示した。



また、生成されたhES細胞、hiPS細胞由来の骨格筋前駆細胞の機能評価として免疫不全マウス (NOG) へ移植実験を行なったところ、移植後4週の段階で、ヒトLaminin、ヒトLamin A/C陽性細胞が観察され、これは期待がもてる結果でした。今回の我々の一番の成果はこのデータで、ヒトES細胞からも蛋白レベルでヒト抗原を発現する、移植可能な骨格筋前駆細胞がin vitroで誘導できることが判明した。



NOG mice: CTX + TBI
Non-sorted cells: 5.0 × 10⁵ cells/site
sacrificed at 4 wks post Tx

分化培養42日目のフローサイトメトリーを用いてCD73+/NCAM+、CD73+/NCAM-細胞群を分画したが、引き続き行った分化培養実験ではCD73+/NCAM+、CD73+/NCAM-細胞分画ともに、骨格筋分化能においてNon-sort細胞群と有意差を認めなかった。

ヒトES細胞およびヒトiPS細胞から胚様体形成を経てin vitroで骨格筋線維と考えられる細胞を誘導することに成功した。これらの細胞はRT-PCRおよび免疫染色の結果から、経時的な筋原性転写因子の発現を経てMyogenin/骨格筋ミオシン陽性の成熟筋線維に分化したと考えられ、一部に自発収縮活動が観察されたことから、機能的にも成熟骨格筋に相当すると考えられた。

本分化系においてもヒトES細胞由来骨格筋前駆細胞マーカーとして報告(文献1)のあったCD73/NCAM陽性細胞分画について検討したが、Non-sort細胞群と有意差なく、少なくとも本分化系においては筋原性細胞マーカーとしては不十分であると考えられた。

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1件)

Mizuno Y, Chang H, Umeda K, Niwa A, Iwasa T, Awaya T, Fukada SI, Yamamoto H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T.; Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent cells. FASEB J. 2010

[学会発表] (計4件)

Awaya T, Chang H, Mizuno Y, Niwa A, Iwasa T, Umeda K, Fukada SI, Yamamoto H, Motohashi N, Suzuki Y, Takeda S, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T.; Derivation of engraftable muscle precursors from murine ES/iPS cells. The

8th French-Japanese Workshop on Muscular Dystrophy. “New developments of therapeutic strategy for muscular dystrophies”, 3rd ~ 4th July 2009, Paris

栗屋智就、水野雄太、張璽、加藤竹雄、丹羽明、中畑龍俊、平家俊男：多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞）を用いた骨格筋幹／前駆細胞の同定およびその臨床応用に関する研究；平成 21 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に応用するための統括的研究」（武田班）班会議，2009 年 12 月 3 日，東京

栗屋智就、加藤竹雄、平家俊男：多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞）を用いた骨格筋幹／前駆細胞の同定およびその臨床応用に関する研究；平成 22 年度精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィーに対するトランスレーショナル・リサーチ」（武田班）班会議，2010 年 12 月 13 日，東京

平家俊男：筋ジストロフィーに対する治療研究の進歩「iPS細胞を用いた筋ジストロフィーの再生移植治療」；平成 22 年度精神・神経疾患研究委託費「筋ジストロフィー研究」合同班会議． 2011 年 1 月 7 日，東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 竹雄 (KATO TAKEO)
京都大学医学研究科 助教
研究者番号：60422945