

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790284

研究課題名（和文） ヒト iPS 細胞を用いた骨格筋前駆細胞誘導と
筋ジストロフィー治療への応用研究課題名（英文） Cell therapy for Muscular Dystrophy using myogenic progenitor cells
derived from human iPS cells

研究代表者

櫻井 英俊（SAKURAI HIDETOSHI）

京都大学・iPS 細胞研究所・講師

研究者番号：80528745

研究成果の概要（和文）：ヒト iPS 細胞からの骨格筋前駆細胞の誘導を目指し、発生学的に上位にある沿軸中胚葉前駆細胞の誘導を試みた。マウス iPS 細胞でマーカーとして使用された PDGFRa を用いることで、ヒト iPS 細胞からも同様に沿軸中胚葉前駆細胞を得ることに成功した。しかし骨格筋細胞への分化能は極めて乏しく、筋ジストロフィーモデルマウスへの移植実験においても、骨格筋再生能力はないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To obtain myogenic progenitors from human iPS cells, we firstly tried to induce the paraxial mesodermal progenitors which are mother cell lineage of myogenic cells. We used PDGFRa as a marker for paraxial mesoderm in human iPS cell differentiation culture. Although, the PDGFRa positive cells had paraxial mesodermal character, they could not differentiate into myogenic cell types and did not contribute muscle regeneration by engraftment into muscular dystrophy medel mice.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：再生医学

科研費の分科・細目：基礎研究・ライフサイエンス（共通基盤研究）

キーワード：iPS 細胞、筋ジストロフィー、再生医療、骨格筋前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは根本的な治療法のない難病であり、その新規治療法として細胞移植治療が期待されている。我々はこれまでマウス iPS 細胞から骨格筋前駆細胞を得ることに成功し、治療への応用が期待された。

2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞から PDGFRa 陽性沿軸中胚葉を経由し、骨格筋前駆細胞を分化誘導および純化する。筋ジストロフィーモデルマウスへ

の移植により、移植治療がヒト由来の細胞で可能かどうかを検証する。

3. 研究の方法

マウス iPS 細胞で得られた知見から、無血清培地に発生の段階で必要とされる成長因子を添加することで、PDGFRa 陽性の沿軸中胚葉細胞を誘導する。得られた細胞をさらに骨格筋細胞へと分化誘導する培養条件を検討する。骨格筋細胞が得られる条件が分かれば、その過程で骨格筋前駆細胞が存在すると考

えられるので、分化途中の段階の細胞を筋ジストロフィーモデルマウスに筋注にて移植し、1か月後に組織を評価することで、移植による治療効果を検証する。

4. 研究成果

(1) ヒト iPS 細胞からの沿軸中胚葉前駆細胞の分化誘導に成功

①ヒト iPS 細胞からの分化誘導法は大きく分けて胚葉体(Embryoid Body, EB)を形成させる方法と、二次元のディッシュで培養する方法とがある。我々は成長因子の作用が比較的現れやすいとされる二次元培養系での条件検討を試みた。

まずマウス iPS 細胞を誘導した時と同一の培地、成長因子を用いたが、全く細胞が生存しなかった。次に Knockout Serum Replacement (KSR) を培地に添加したところ、3日目より PDGFRa の発現を認め、6日後にはピークになった。分化6日後の細胞をフローサイトメトリーで解析すると、約20%程度が PDGFRa 陽性であった。

その後、至適細胞密度を検討し、培養ディッシュのコートニングもコラーゲンIにするなど改良を加え、約50%程度が PDGFRa へと分化する誘導法を開発した。(図1、Q1およびQ2)

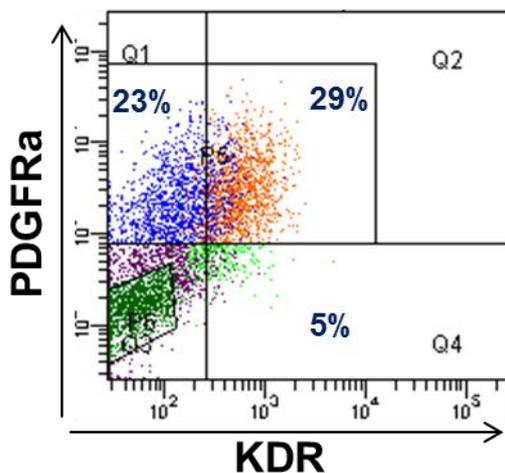


図1. 分化6日目のヒト iPS 細胞におけるマーカー分子の発現解析

②さらに上記で得られた PDGFRa 陽性細胞が、本当に沿軸中胚葉前駆細胞かどうかを、細胞をソーティングして遺伝子発現解析にて検証した。

我々はマウス iPS 細胞においてマーカーとして Flk1 陰性分画を加えることで、PDGFRa+/Flk1-分画に多く沿軸中胚葉前駆細胞を得ることに成功している。

ヒト iPS 細胞においても、Flk1 がマーカーとして活用できるかどうかを考え、ヒト Flk1 ホモログである KDR をマーカーとして加えてソーティングを行った。図1に示される4つ

の分画を FACS ソーティングにて回収し、RNA を抽出の後 cDNA を合成して、定量的 PCR 法により遺伝子発現レベルを解析した。分画の名称は PDGFRa+/KDR+ (Double positive; DP, 図1のQ2)、PDGFRa-/KDR- (Double negative; DN, 図1のQ3)、PDGFRa+/KDR- (PDGFRs single positive; PSP, 図1のQ1)、PDGFRa-/KDR+ (KDR single positive; KSP, 図1のQ4)の4つである。定量的 PCR の結果のうち代表的な沿軸中胚葉マーカーである、Tbx6 と Mesp2 の発現解析の結果を図2に示す。

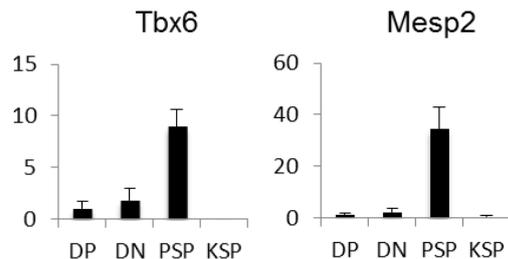


図2. 分化6日目のヒト iPS 細胞分画における、沿軸中胚葉マーカー遺伝子の発現

マウス iPS 細胞で得られた知見と同様に、やはり PDGFRa+/KDR-分画(PSP分画)において、沿軸中胚葉マーカーの極めて高い発現が認められた。この結果より我々が用いた PDGFRa および KDR の2つのマーカーを用いて、沿軸中胚葉前駆細胞を純化することに成功した。

(2) 筋ジストロフィーモデルマウスへの移植に関する予備実験

次にヒト iPS 細胞の移植実験を行うため、免疫拒絶に関する予備実験を行った。未分化ヒト iPS 細胞は免疫不全マウスに移植することで奇形腫を形成する。しかし筋ジストロフィーモデルマウスは免疫不全ではないため、移植しても拒絶反応により細胞は生着しない。そこでサイクロスポリンAの連日腹腔内投与によって、未分化ヒト iPS 細胞がモデルマウスにおいても奇形腫を形成するかどうかを検証した。しかし、様々な投与量で解析したが奇形腫を形成することなく、異種移植においてはT細胞系の抑制だけでは生着が困難であることが分かった。

(3) 免疫不全マウスへの移植実験

そこで、免疫不全マウスの骨格筋損傷モデルを使った移植実験により、ヒト iPS 細胞由来沿軸中胚葉前駆細胞の骨格筋再生能を評価する実験を行った。NOD/Scid マウスの前脛骨筋にカルディオトキシンを筋注で投与し、筋損傷による筋再生を促す。カルディオトキシン投与一日後にヒト iPS 細胞から分化誘導した PDGFRa+/KDR-分画を200,000細胞筋注にて移植した。移植28日後にマウスを安楽死させたのち筋組織を解析した。ヒト核抗体によ

る免疫染色によって、移植された細胞を追跡することができる。免疫染色の結果を図3に示す。

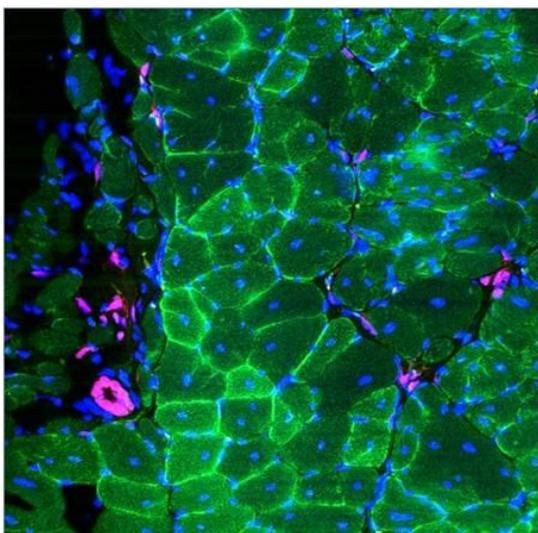


図 3. PDGFRα+/KDR-分画移植後の筋組織。紫のシグナルがヒト由来の核である

ヒト核抗体陽性の細胞は、全て筋組織の外側の間質組織に存在し、筋線維と融合して筋再生に寄与していると考えられる細胞は無かった。

(4) 沿軸中胚葉前駆細胞群 PDGFRα+/KDR-分画の in vitro での分化能評価

また同時に得られた沿軸中胚葉前駆細胞が、試験管内で骨格筋へと分化しうるかどうかを評価した。骨格筋分化誘導培地は、筋芽細胞培養で用いられるウマ血清を用いた方法と、マウス細胞で用いられる無血清培地誘導の2種類を試した。

しかしながら、いずれの方法においても沿軸中胚葉前駆細胞から Myogenin 陽性の骨格筋へと分化した細胞は誘導されなかった。

(5) 筋ジストロフィーモデル/免疫不全マウスの作出と移植実験

モデルマウスでの評価を行うため、NOD/Scid マウスと筋ジストロフィーモデルマウスを交配させ、筋ジストロフィーモデル/免疫不全マウスを作出した。

このマウスに (3) と同様に沿軸中胚葉前駆細胞を移植したが、やはり細胞の生着は間質に限られ、ジストロフィンの発現回復は認められなかった。

(6) 本研究の意義と今後の展望

本研究では、ヒト iPS 細胞研究の困難さが改めて浮き彫りになったと言える。

マウス iPS 細胞では成果のあった細胞移植による筋再生が、ヒト iPS 細胞においては認められなかった。その中で、PDGFRα と KDR の組

み合わせによって、マウス細胞と同様に遠く中胚葉が純化できることを示した点は意義のあることである。今後、この細胞を起点にしての分化誘導法の改良が行われ、骨格筋への分化研究も進むと考えられる。

また移植する細胞の時期についても、なるべく早期の細胞が良いのか、十分に成熟した後期の細胞が良いのか議論のある部分である。我々の結果より、あまりに早期の骨格筋前駆細胞は移植によっても骨格筋に分化せず、再生には寄与しないことが明らかとなった。マウスでうまくいったとしても、必ずしもヒトではうまくいかないという事象が問題となる中で、やはりヒト細胞を使った基礎研究を積み重ねることでは、治療への応用は成しえないと考える。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

発表者：櫻井英俊

演題名：iPS 細胞からの中胚葉前駆細胞誘導と、細胞移植治療に向けた研究開発

学会名：「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」班・班会議

発表年月日：2010年12月13日

発表場所：東京

発表者：櫻井英俊

演題名：Transplantation of mouse iPS cell-derived mesodermal progenitors improves structure and function of skeletal muscle in Duchenne Muscular Dystrophy model mice

学会名：8th International Society for Stem Cell Research Annual Meeting

発表年月日：2010年6月18日

発表場所：トロント(カナダ)

〔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://www.cira.kyoto-u.ac.jp/sakurai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 英俊 (SAKURAI HIDETOSHI)

京都大学・iPS細胞研究所・講師

研究者番号：80528745

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし