

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 9日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791170

研究課題名（和文）ヒト ES/iPS 細胞に由来する骨格筋幹・前駆細胞の分離技術の確立

研究課題名（英文）Isolation of myogenic stem/progenitors from human ES/iPS cells.

研究代表者

栗屋 智就（AWAYA TOMONARI）

京都大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：20589593

研究成果の概要（和文）：ヒト ES 細胞及び iPS 細胞を用いて *in vitro* で骨格筋細胞を分化誘導する実験系を開発し、そこから選択した間葉系細胞が筋障害モデル免疫不全マウスに生着することを示した。それらのヒト由来細胞の一部は骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞分画へ寄与し、筋障害を長期にわたり持続的に修復することを示した。これによりヒト ES 細胞及び iPS 細胞を用いた再生医療の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We developed a novel skeletal myogenic differentiation protocol for human embryonic stem (ES) and induced pluripotent stem (iPS) cells *in vitro*. We also demonstrated the *in vivo* engraftment capacity of the generated cells in pre-damaged muscles of immunodeficient mice. These cells partially committed to muscle satellite cells as well, exhibiting long-term sustainable muscle reconstruction. These observations encourage the further use of human ES and iPS cells in regenerative medicine.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：小児神経学

キーワード：ES 細胞・iPS 細胞・骨格筋・筋疾患・筋ジストロフィー・サテライト細胞・細胞治療・再生医療

1. 研究開始当初の背景

小児期発症の筋疾患の多くは骨格筋の構成蛋白の異常に基づいて起こり、現時点で有効とされる治療はほとんどない。小児期の代表的筋疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、骨格筋細胞膜の裏打ち蛋白である dystrophin の欠損により、筋線維の壊死・再生が起こり、進行性の筋力低下をきたす疾患である。ステロイドホルモン投与が若干進行を遅らせるという報告はあるが、その証左は乏しく、人工呼吸管理を行わない場合、患者は20歳前後で死亡する。

筋ジストロフィーの治療アプローチとしては、①筋障害に対する新たな薬剤の開発、

②遺伝子導入やエキソンスキッピング療法などの遺伝子や蛋白発現を操作する手法の開発、③細胞移植療法などが考えられ、精力的な研究が行われている。しかしながら、いずれもその実験的な検証の困難さや限定的な効果のため、実現に至っていない。

申請者らは特に細胞移植療法を念頭に置き、マウス ES 細胞及び iPS 細胞、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞における予備実験を行い、マウス ES 細胞及び iPS 細胞から *in vitro* で質のよい骨格筋線維を産生し、*in vivo* で有効に生着する前駆細胞を抽出する系を既に確立してきた（Mizuno Y, et al. FASEB J 2010）。また、その方法を応用し、ヒト ES

細胞及びiPS細胞を骨格筋系譜の細胞へ分化誘導する系の構築に取り組んでおり、実験的に成熟骨格筋マーカーである MYH2 及び Myogenin を発現する骨格筋細胞を誘導することに成功し、それらの細胞が免疫不全マウス内で生着し、骨格筋細胞にヒト由来蛋白を発現することを示すことが出来た。

これらの成果を基盤とし、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞から、生体へ移植可能で、自己増殖能と骨格筋再構成能を併せ持つ、骨格筋幹／前駆細胞の単離が可能となれば、今後の細胞移植療法・再生医療における ES 細胞及び iPS 細胞の利用の可能性を大きく広げることが出来る。

研究開始時点では、ヒト ES 細胞を用いた骨格筋分化誘導の報告はわずかに3報のみであり、iPS 細胞に関しては報告がなかった。本研究により、ES 細胞及び iPS 細胞の、骨格筋研究及び筋疾患研究における有用性の有無について検討することは、今後の骨格筋研究及び筋疾患研究において大きな意味を持つと考えられる。

2. 研究の目的

ヒト ES 細胞及び iPS 細胞から生体へ移植可能で、自己増殖能と骨格筋再構成能を併せ持つ、骨格筋幹／前駆細胞を単離することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト ES 細胞及び iPS 細胞から *in vitro* で効率的に骨格筋細胞を誘導する方法を作出し、そこから筋衛星細胞や筋芽細胞等に発現する表面抗原を用いてフローサイトメーター・セルソーターを用いて細胞を分画し、骨格筋幹／前駆細胞の純化の可能性を検討する。また、それらの細胞を用いて免疫不全マウスを用いた筋障害モデルにおける骨格筋再構成能を検証し、*in vivo* での再生医療応用の可能性について検討する。

具体的には、未分化ヒト ES 細胞及び iPS 細胞を、ヒト ES 細胞/iPS 細胞維持培地で7日間浮遊培養した後、0.1%ゼラチンコートしたプラスチック培養容器上に付着させる。無血清 ITS 培地で14日間培養した後、10%ウシ胎仔血清、5%ウマ血清を含む骨格筋分化誘導培地 (SkIM: Skeletal muscle Induction Medium) を用いて継続して培養し、免疫染色により骨格筋系列細胞、及び他系列細胞への分化について検討した。

誘導された細胞集団からの骨格筋系列細胞の分離においては、間葉系幹細胞マーカー

である CD73, CD105, CD166, CD29 等、筋衛星細胞等の骨格筋前駆細胞マーカーとして提唱されている CD56, CD106, CD184, CD29 等を用い、経時的に評価を行った。また、CD73/CD56 発現細胞等をセルソーターを用いて分画し、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン等の細胞外マトリクス上で培養し、免疫染色等を用いて評価した。

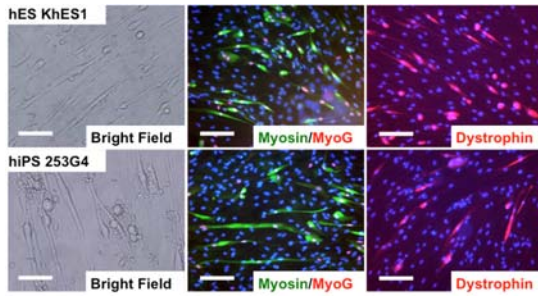
生体内におけるヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来骨格筋前駆細胞の評価においては、Cardiotoxin の筋肉内投与によりあらかじめ筋障害を与え、内因性の筋再生を抑制するため全身放射線照射した免疫不全 NOG マウスの前脛骨筋に、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞から誘導した候補分画を様々な細胞数で筋肉内投与し、経時的に解析した。解析にあたっては液体窒素内で冷却したイソペンタンを用いて作成した急速凍結標本を用い、免疫染色等を用いて評価した。一部のマウスに対しては移植筋に同量の Cardiotoxin を用いて再障害を与え、生体内での増殖能・骨格筋再生能について評価した。

4. 研究成果

本研究では、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞を用いた骨格筋前駆細胞の分離同定とその移植における効果の検証を目的とした。具体的には、(1)ヒト ES/iPS 細胞の *in vitro* での骨格筋細胞への分化誘導系からの骨格筋幹/前駆細胞の表面抗原による分離同定、(2)抽出した骨格筋幹/前駆細胞の免疫不全マウスへの移植による *in vivo* での挙動の解析と組織再構成能の評価、を目標とした。

【平成 23 年度】

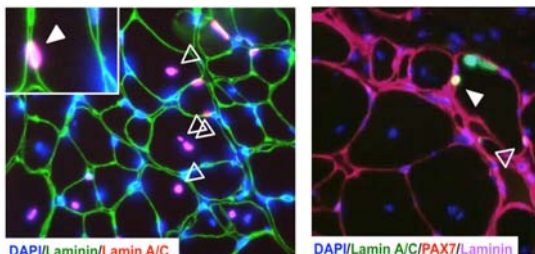
平成 23 年度は主に(1)の項目について検討した。未分化ヒト ES/iPS 細胞を胚様体と呼ばれる細胞塊として浮遊培養した後、特定条件下で付着培養すると、7週から16週程度で成熟骨格筋マーカーである MYH2 を発現した。この条件下では神経系列細胞や心筋系列細胞などの高率な混入がみられたが、胚様体を解離し、特定条件下で再培養を行うことにより、間葉系細胞が選択的に誘導可能であった。この細胞集団は、間葉系幹細胞マーカーである CD73, CD105, CD166 及び CD29 を一様に発現していることに加え、骨格筋前駆細胞マーカーのひとつである CD56 を強発現しており、最終的に *in vitro* で MYH2 と dystrophin を発現する多核成熟筋管へと分化した。



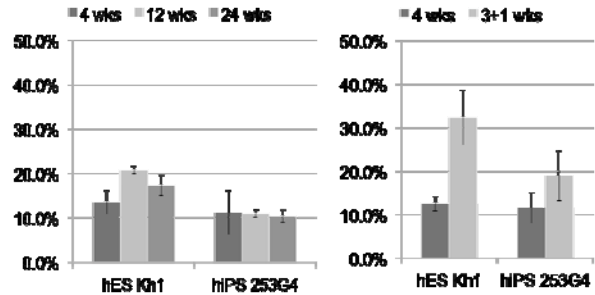
図：ヒト ES 細胞及び iPS 細胞からの骨格筋分化誘導において、最終分化した骨格筋線維を示す。(左：明視野、中：緑が骨格筋ミオシン・赤が Myogenin・青が細胞核、右：赤が dystrophin・青が細胞核)

【平成 24 年度】

平成 24 年度はそれらの細胞を用いて主として(2)の項目について検討した。これらの筋原性間葉系細胞は免疫不全マウスの傷害筋内に移植すると、*in vivo* で観察期間 6 ヶ月にわたり安定して生着し、マウス骨格筋線維にヒト特異的のラミニン抗原等のヒト蛋白を発現した。移植された細胞の一部は筋衛星細胞と同様に PAX7 を発現し基底膜直下に存在し、二次的筋傷害に引き続いて再増殖し、持続的な筋修復を行いうることが示され、今後の骨格筋再生医療への応用が期待できる結果であった。



図：筋障害を与えた免疫不全マウス前脛骨筋に筋肉内投与したヒト由来細胞の筋線維内及び骨格筋衛星細胞分画への生着を示す。(左：緑が基底膜ラミニン・赤がヒト由来細胞を示すヒト特異的核ラミニン A/C・青が細胞核、△でヒト由来の内在核を、▲で基底膜直下に存在する筋衛星細胞と考えられるヒト由来細胞を示す。右：緑がヒト由来細胞を示すヒト特異的核ラミニン A/C・赤が骨格筋衛星細胞マーカーのひとつである転写因子 PAX7・紫が基底膜ラミニン・青が細胞核、△は Pax7 陽性で基底膜直下に存在するマウス由来の筋衛星細胞、▲は Pax7 陽性で基底膜直下に存在し、ヒト特異的核ラミニン A/C で標識される移植されたヒト細胞由来の筋衛星細胞を示す。)



グラフ：NOG マウス傷害筋内に投与したヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来骨格筋前駆細胞の生着率。(ヒト特異的核ラミニン A/C 陽性核/総核数) で示した。左：移植後 4、12、24 週におけるヒト由来細胞割合。右：移植後 4 週における解析と 3 週で二次的筋障害を与えた 3+1 週における解析とを比較。二次的筋障害を加えた場合、追加の細胞投与が内にもかかわらず、ヒト由来細胞割合が増加している。

【考察】

本研究では、ヒト ES 細胞及び iPS 細胞を *in vitro* で骨格筋細胞へ誘導させることが可能であることを示し、筋原性を有する間葉系細胞集団が比較的容易に分離できることを発見した。これらの細胞群は間葉系幹細胞マーカーと同時に筋衛星細胞マーカー・筋芽細胞マーカーと考えられている CD56 を強発現し、骨格筋前駆細胞として矛盾しないものであった。

また、*in vivo* の実験においてはそれらの細胞群に、長期にわたって免疫不全マウスに生着を維持できる細胞が内在し、骨格筋線維にヒト蛋白を発現することを示した。またそれらの移植細胞は、二次的筋障害に引き続いて再増殖し、筋修復を行うことを示した。さらに、免疫染色において、図に示すように、移植されたヒト細胞由来の細胞が、筋衛星細胞と同様に Pax7 を発現し基底膜直下に存在し、移植細胞が単にマウス傷害筋内に生着するのみならず、長期にわたって持続的な筋修復を行いうる筋衛星細胞分画に寄与していることが証明された。

今までにヒト ES 細胞及び iPS 細胞由来の骨格筋幹/前駆細胞の生体内での骨格筋再生能は十分に検討されてこなかったが、本研究において誘導された筋原性細胞は、*in vitro* において骨格筋細胞への分化能が示されたのみならず、*in vivo* での筋衛星細胞分画への生着能と、長期にわたる骨格筋再生能が証明された。細胞移植療法を念頭においた場合、より有用な細胞集団であり、ヒト ES 細胞および iPS 細胞を用いた今後の筋疾患治療開発に資するものと考えられた。

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)

1. Awaya T, Kato T, Mizuno Y, Chang H, Niwa A, Umeda K, Nakahata T, Heike T. “Selective development of myogenic mesenchymal cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells.” PLoS One 2012;7(12):e51638. (DOI: 10.1371/journal.pone.0051638.)

[学会発表] (計 4 件)

1. 栗屋智就他 『多能性幹細胞を用いた筋ジストロフィーに対する治療基盤開発』平成 24 年度精神・神経疾患研究開発費「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」班班会議・2011 年 12 月 5 日～6 日・東京

2. Awaya T, et al. “Skeletal myogenesis from hES and hiPS cells.” The 11th Annual Scientific Meeting of the Asian Oceanian Myology Center, 6 June 2012 – 8 June 2012, Kyoto, Japan

3. 栗屋智就他 『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 23 年度精神・神経疾患研究開発費「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」班班会議・2011 年 12 月 1 日～2 日・東京

4. 栗屋智就他 『ヒト ES/ iPS 細胞から骨格筋への分化誘導と筋疾患への応用』第 114 回日本小児科学会学術集会・2011 年 8 月 12 日～14 日・東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

栗屋 智就 (AWAYA TOMONARI)

京都大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：20589593

(2)研究協力者

加藤 竹雄 (TAKEO KATO)

京都大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：60422945

平家 俊男 (TOSHIO HEIKE)

京都大学大学院医学研究科・教授

研究者番号：90190173

(3)連携研究者

なし