

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590497

研究課題名(和文) 多能性幹細胞からの骨格筋幹・前駆細胞誘導法の確立と移植による有効性・安全性の検証

研究課題名(英文) Induction of transplantable myogenic cells from pluripotent stem cells

研究代表者

鈴木 友子 (Suzuki, Yuko)

独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長

研究者番号：00342931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞は筋ジストロフィーの細胞移植治療の有力な細胞源として期待されている。本研究では(1)ヒト筋芽細胞とヒト線維芽細胞に対して、242種類の細胞表面抗原に対する抗体を反応させ、FACSにて解析し、CD56とCD271がヒト筋芽細胞を特異的に認識すること、(2)sphere形成による誘導(Stem Cells Transl. Med. 3:564-74, 2014)がヒトiPS細胞を筋分化させる方法として有効であること、(3)骨格筋系譜へ誘導した細胞を免疫不全ジストロフィーモデルマウスの骨格筋へ移植すると、ヒトiPS細胞に由来する骨格筋線維が再形成されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Induced pluripotent stem cells are a promising tool for regenerative medicine of muscular dystrophies. Here, we compared the cell surface antigens on human myoblasts and human fibroblasts, and found that CD56 and CD271 specifically recognize human myoblasts. Next, we tested whether EZ-sphere method is effective to induce transplantable muscle stem/progenitor cells by transplantation into immunodeficient mdx mice (DMD model mice) and found that iPS-derived muscle stem/progenitor cells participate in muscle regeneration.

研究分野：筋ジストロフィー

キーワード：幹細胞 再生医療 iPS細胞 ジストロフィン

## 1. 研究開始当初の背景

筋衛星細胞の増殖能・再生能は培養過程で徐々に失われるので、移植用に培養で増やすことで多量に準備することは難しく (*Mol Ther*, 15, 2178-85, 2007)、全身の骨格筋が侵される DMD 患者の幹細胞移植治療には、筋衛星細胞以外の細胞源を探る必要がある。DMD 患者の皮膚細胞からの iPS 細胞作出の報告がなされて以来 (*Cell* 134, 877-86)、DMD-iPS 細胞は筋ジストロフィーの自家細胞移植治療の有力な細胞源として期待されているが、まだ骨格筋幹・前駆細胞の誘導法が確立されていない。

## 2. 研究の目的

ヒト iPS 細胞を用いた筋疾患に対する細胞移植治療法を確立するため基盤的研究として

- (1) 低分子化合物を用いて、マウス ES 細胞・iPS 細胞から骨格筋系譜の幹・前駆細胞を誘導する分化誘導法を樹立する。
- (2) 誘導された筋幹・前駆細胞の増殖を促進する培養条件を明らかにし、筋前駆細胞のセルソーターによる純化法を開発する。
- (3) 誘導された細胞を疾患モデルマウスへ移植して、誘導・純化方法と骨格筋再生能・腫瘍形成能との関係を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) マウス ES 細胞、iPS 細胞の沿軸中胚葉系への分化を促進する 7 つの低分子化合物を利用して、骨格筋幹細胞・前駆細胞の誘導法を確立する。
- (2) 移植のための筋前駆細胞の純化方法を確立する。
- (3) MyoD-iCre/ R26R-EYFP マウスの MEF から、iMyoD-EYFP iPS 細胞を作出する。
- (4) マウス ES 細胞、iPS 細胞から誘導された骨格筋幹・前駆細胞と内在性の骨格筋幹・前駆細胞の遺伝子発現、増殖能、分化能、移植後の生着能を比較する。
- (5) 筋前駆細胞の未分化状態を維持し、増殖を支持する培養条件 (主に成長因子) を決定する。
- (6) 誘導された骨格筋幹・前駆細胞を DMD 型筋ジストロフィーの疾患モデルである NOD/Scid/mdx マウスの骨格筋へ移植し、筋再生能と安全性 (腫瘍形成) を調べる。

## 4. 研究成果

**(1) マウス ES 細胞、iPS 細胞の沿軸中胚葉系への分化を促進する 7 つの低分子化合物を利用した骨格筋幹細胞・前駆細胞の誘導法の確立**

マウス ES 細胞を胚様態形成法によって筋分化を誘導し、7 つの低分子化合物を添加した。レチノイン酸に軽度の筋分化促進作用が認められ

たが、他の 6 つの化合物はその活性は無かった。

## (2) 移植のための筋前駆細胞の純化方法の確立

ヒト筋芽細胞とヒト線維芽細胞に対して、242 種類の表面抗原に対する抗体を反応させ、FACS にて解析し、CD56 と CD271 がヒト筋芽細胞を特異的に認識することを明らかにした。

## (7) iMyoD ES, iPax7 ES (マウス) の作出

MyoD-ER (エストロゲンレセプターのエストロゲン結合ドメイン) と Pax7-ER を EF1alpha プロモーターの下流にそれぞれクローニングし、ires で dsRED (赤色蛍光タンパク質) へ連結したプラスミドをマウス ES 細胞へ導入し、安定細胞株を得た。タモキシフェンにより、MyoD、Pax7 の発現を誘導したが、骨格筋分化の促進効果は観察されなかった。EF1a プロモーターが ES 細胞の分化に伴い不活性化されるためだと考えられた。また ER に連結したものはもとの MyoD に比較して活性が低いこともわかった。

## (4 - 5) (臨床応用を視野に入れて、マウス ES/iPS 細胞からヒト iPS 細胞への研究に切り替え、研究内容を変更した) ヒト iPS 細胞からの骨格筋幹前駆細胞への誘導

ヒト iPS 細胞を筋分化させる方法として EZ-sphere 法 (Hosoyama et al., *Stem Cells Transl. Med.* 3:564-74, 2014) を導入した。ヒト iPS 細胞株によって効率がばらつくものの、高い分化効率を確認した。疾患特異的 iPS 細胞に対しても有効であった。

## (5) 誘導された骨格筋幹・前駆細胞を DMD 型筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋への移植

NOD/Scid/mdx より免疫不全が重い NSG-mdx<sup>4Cv</sup> を入手し、ヒト iPS 細胞から EZ-Sphere 法を用いて骨格筋系譜へ誘導した細胞をその前脛骨筋へ移植した。ヒト・スペクトリン、ヒト・ラミン A/C、及びジストロフィン染色により、移植 3 週間後には、ヒト iPS 細胞に由来する再生骨格筋線維が形成されることを確認した。一部の細胞は未分化なまま塊を作るとどまっていた。移植用の細胞としての有用性は示されたが、細胞の純化が必要であることが明らかになった。

## 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 12 件)

1. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y, Hara M, Ito N, Hashimoto H, Kusumoto D, Seki T, Tohyama S, Kodaira M, Kunitomi A, Kashimura S, Takei M, Saito Y, Okata S, Egashira T, Endo J, Sasaoka T, Takeda S, Fukuda K (2015) G-CSF supports the long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy, *Nat Commun* 6, 6745, doi: 10.1038/ncomms7745. 査読有
2. Hyzewicz J, Tanihata J, Kuraoka M, Ito N, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. (2015) Low intensity training of mdx mice reduces carbonylation and increases expression levels of proteins involved in energy metabolism and muscle contraction. *Free Radic Biol Med*. 2015 82, 122-136.10 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.023. 査読有
3. Yuka Watanabe and Yuko Miyagoe-Suzuki (2015) Possibility of small-molecule-based pharmacotherapy for sarcopenia *J Phys Fitness Sports Med* 4: 73-82. Doi: 10.76000/jpfsm.4.73 査読有
4. Ogawa R, Ma Y, Yamaguchi M, Ito T, Watanabe Y, Ohtani T, Murakami S, Uchida S, De Gaspari P, Uezumi A, Nakamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Hashimoto N, Braun T, Tanaka T, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. (2015) Doublecortin marks a new population of transiently amplifying muscle progenitor cells and is required for myofiber maturation during skeletal muscle regeneration. *Development*. 142:51-61. doi: 10.1242/dev.122317 査読有
5. Morise J, Kizuka Y, Yabuno K, Tonoyama Y, Hashii N, Kawasaki N, Manya H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Maeda N, Takematsu H, Oka S. (2014) Structural and biochemical characterization of O-mannose-linked human natural killer-1 glycan expressed on phosphacan in developing mouse brains. *Glycobiology* 24:314-24. doi: 10.1093/glycob/cwt116. 査読有
6. Yokota T, Miyagoe-Suzuki Y, Ikemoto T, Matsuda R, and Takeda S. (2014) "1-Syntrophin Deficient Mice Exhibit Impaired Muscle Force Recovery after Osmotic Shock" *Muscle Nerve*. 49:728-35. doi: 10.1002/mus.23990. 査読有
7. Ito N, Ruegg UT, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S. (2013) Capsaicin mimics mechanical load-induced intracellular signaling events: Involvement of TRPV1-mediated calcium signaling in induction of skeletal muscle hypertrophy *Channels (Austin)*. 7:221-4. doi: 10.4161/chan.24583. 査読有
8. Kanagawa M, Yu CC, Ito C, Fukada SI, Hozoji-Inada M, Chiyo T, Kuga A, Matsuo M, Sato K, Yamaguchi M, Ito T, Ohtsuka Y, Katanosaka Y, Miyagoe-Suzuki Y, Naruse K, Kobayashi K, Okada T, Takeda S, Toda T. (2013) "Impaired viability of muscle precursor cells in muscular dystrophy with glycosylation defects and amelioration of its severe phenotype by limited gene expression. *Hum Mol Genet*. 22: 3003-3015. doi: 10.1093/hmg/ddt157. 査読有

9. Ito T, Ogawa R, Uezumi A, Ohtani T, Watanabe Y, Tsujikawa K, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S. (2013) Imanitib attenuates severe mouse dystrophy and inhibits proliferation and fibrosis-marker expression in muscle mesenchymal progenitors. *Neuromuscul Disord.* 23:349-56. doi: 10.1016/j.nmd.2012.10.025. 査読有
10. Ito N, Urs R, Kudo A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S (2013) NO/peroxynitrite-induced activation of TRPV1: A pivotal role of calcium signaling in skeletal muscle hypertrophy. *Nat Med.*19: 101-6. doi: 10.1038/nm.3019. 査読有
11. Yamaguchi M, Ogawa R, Watanabe Y, Uezumi A, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Yamamoto H, Takeda S, Fukada S. (2012) Calcitonin receptor and Odz4 are differently expressed in Pax7-positive cells during skeletal muscle regeneration. *J Mol Histol.* 43:581-7. doi: 10.1007/s10735-012-9421-3. 査読有
12. Relucio J, Menezes MJ, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Colognato H. (2012) Laminin regulates postnatal oligodendrocyte production by promoting oligodendrocyte progenitor survival in the subventricular zone. *Glia.* 60:1451-67. doi: 10.1002/glia.22365. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 鈴木友子  
筋ジストロフィーとiPS細胞 筋ジストロフィーの再生医療の実現化を目指して  
第54回 日本小児神経学会総会  
シンポジウム「iPS細胞による再生医療は小児神経疾患の未来の治療となりうるか」  
2012年5月17日 札幌

2. 鈴木友子、成田麻子、鈴木良次、武田伸一「難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発」  
シンポジウム「骨・軟骨・筋肉の再生医療と幹細胞生物学」  
第14回日本再生医療学会総会  
3月20日(金) 横浜

[図書] (計 2 件)

1. Miyagoe-Suzuki Y, Ono Y, Fukada S and Takeda S. 電子書籍「Muscular Dystrophy」(ISBN 979-953-307-200-4) Chapter 18. Muscle satellite cells and muscular dystrophy. InTech、2012年
2. 鈴木友子、武田伸一「疾患特異的iPS細胞を活用した筋疾患治療研究」遺伝子MOOK 中畑 龍俊編 p77-81. ISSN 1349-2527.

6. 研究組織

(1)研究代表者

鈴木友子 (SUZUKI Yuko )  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・室長  
研究者番号:00342931

(2)研究分担者

武田伸一 (TAKEDA Shin'ichi )  
国立精神・神経医療研究センター神経研究所・遺伝子疾患治療研究部・部長  
研究者番号:90171644