

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591508

研究課題名(和文) iPS細胞、及び疾患特異的 iPS細胞からの骨格筋細胞分化誘導に関する基盤研究開発

研究課題名(英文) Selective Development of Myogenic Mesenchymal Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells

研究代表者

加藤 竹雄 (Kato, Takeo)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60422945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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。更に、分化誘導した骨格筋細胞は移植実験のもと、生体内での生着することを確認した。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 a novel stepwise culture method for the selective expansion of mesenchymal cells from cell aggregations called embryoid bodies. These mesenchymal cells, which were obtained by dissociation and re-cultivation of embryoid bodies, uniformly expressed CD56 and the mesenchymal markers CD73, CD105, CD166, and CD29, and finally differentiated into mature myotubes in vitro. Furthermore, these myogenic mesenchymal cells exhibited stable long-term engraftment in injured muscles of immunodeficient mice in vivo

研究分野：小児神経

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

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。骨格筋が侵される疾患として代表的なものとして筋ジストロフィーが挙げられる。その中でも Duchenne 型筋ジストロフィーは Dystrophin 蛋白の欠損により、筋繊維の変性と壊死が起こり、最終的には筋力低下による呼吸循環不全をきたして 20 歳前後で死亡する代表的な筋疾患であり、現時点までに効果的な治療法は確立されていない。これまでに临床上において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、その証左は乏しい。筋ジストロフィーの治療アプローチとしては、筋障害に対する新たな薬剤の開発、遺伝子導入やエキソスキッピング療法、遺伝子や蛋白発現を操作する手法の開発、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が、いずれもその実験的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。これらの問題点の克服、更には治療法(細胞移植治療)の担い手として組織幹細胞、また多能性幹細胞による細胞治療などが注目されており、なかでも 2006 年に山中らにより開発された人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells, iPS 細胞)技術に大きな期待が寄せられている。

iPS 細胞は皮膚線維芽細胞に胚性幹細胞(embryonic stem cells, ES 細胞)の未分化維持・万能性維持に関わる 4 つの遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc、後に c-Myc を除いた 3 因子)を導入することにより作成された誘導幹細胞である。細胞形態、増殖能、三胚葉系への分化万能性において胚性幹細胞と類似した能力を持ち、理論的には無限の増殖能と生体を構成するあらゆる細胞系列への分化が可能とされている。iPS 細胞には(特になん遺伝子である c-Myc を含めた)遺伝子導入という操作を伴っている点で問題が残されているが、ES 細胞の持つ胚操作といった生命倫理的問題を回避できる他、患者自身の細胞を用いて作成することが可能であり、移植治療における免疫学的問題を回避できるという点で、細胞療法の大きなソースとして期待が寄せられている。また、特定の疾患の患者由来の iPS 細胞を細胞レベル、分子レベルで解析することが可能となり、病態解明や薬剤開発に寄与することが期待される他、比較的容易に遺伝子操作が可能であることから、遺伝子治療の発展に大きく役立つと考えられ、大いに期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、当研究室で確立したヒト胚性幹(ES)細胞および誘導多能性幹(iPS)細胞の骨格筋分化誘導系を用いて、筋疾患特異的 iPS 細胞を骨格筋細胞へと分化させ、筋疾患の病態解析を目的とするものである。ここで

は筋疾患モデルとして Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD)を対象とする。具体的な研究項目としては、既に樹立した DMD-iPS 細胞の骨格筋細胞への分化誘導、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析による正常細胞との発生学的差異の検討、DMD-iPS 細胞由来骨格筋細胞の機械刺激への感受性、ステロイド、抗炎症薬剤に対する感受性、エキソスキッピング療法等の新規治療法の実験的検証を目的とする。

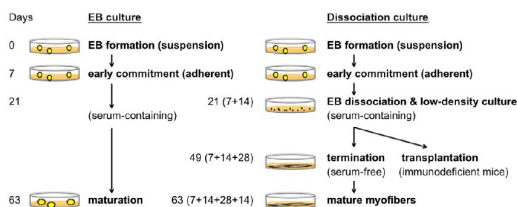
3. 研究の方法

当研究室にて確立したヒト ES 細胞からの骨格筋分化誘導法に準じて、DMD 疾患特異的 iPS 細胞(DMD-iPS 細胞)からの骨格筋分化誘導を行なう。DMD-iPS 細胞を浮遊培養することによって小細胞塊(胚葉体)を形成する(分化培養 0 日~7 日)。形成された胚葉体を COL1 でコートされた培養皿に付着させ、分化培養を開始する。培養に用いる Medium は 10%血清を添加した MEM を用いる。培養 7 日~21 日付着培養させると、胚葉体より細胞が放射状に増殖、分化していき、培養皿ほぼ全体に分化した細胞が分布するようになる。培養 21 日目頃に一端、細胞を分離回収し、以後、細胞を同様の COL1 でコートされた培養皿に付着培養を継続する。この後は培養皿に細胞が充満する前に継代をくり返していき、培養開始 49 日~63 日の段階で骨格筋分化の評価を行う。骨格筋分化の評価には骨格筋細胞の分化を免疫細胞組織染色、細胞表面マーカーをフローサイトメトリーで、また PCR 法により骨格筋細胞特異遺伝子の発現を解析する。成熟骨格筋へ分化した DMD-iPS 細胞の Dystrophine の免疫細胞組織染色を行い、臨床的な病態を in vitro で再現できていることを確認する。また、当研究室では評価時期を早める事によって、ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞からの早期の骨格筋分化(骨髄前駆細胞)の評価を PCR 法、免疫細胞組織染色によって骨格筋前駆細胞(Pax 3、Pax 7、Myf 5、Myo D)を評価することに成功している。従って、DMD-iPS 細胞の骨格筋分化の早期段階での評価も可能となる。平成 23 年度は既に我々が樹立し、保有している DMD 患者由来の iPS 細胞株(DMD-iPS 細胞)を使用する。

我々の骨格筋分化培養系を用いて、DMD 患者の骨格筋を in vitro で形成させる。平成 24 年度以降については形成された DMD-iPS 細胞由来の骨格筋細胞を利用して、正常の iPS 細胞由来の骨格筋細胞との骨格筋分化効率の比較、トランスクリプトーム解析、プロテオーム解析による正常細胞との発生学的差異の検討、ステロイド、抗炎症薬剤に対する感受性の検討、エキソスキッピング療法等の新規治療法の実験的検証などを行なっていくことを計画している。

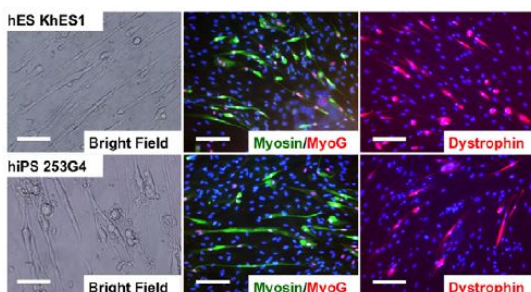
4. 研究成果

我々の研究室では過去にマウス ES 細胞, iPS 細胞から胚様体法によって効率的に骨格筋細胞を誘導し、移植可能な骨格筋幹 / 前駆細胞をフローサイトメトリーにより単離することに成功した。この誘導法を用いて筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞からの骨格筋および骨格筋前駆細胞の分化誘導の基礎検として、正常ヒト ES 細胞および iPS 細胞から骨格筋細胞への分化誘導を行った(図 1)。



(図 1) 筋細胞への分化プロトコール

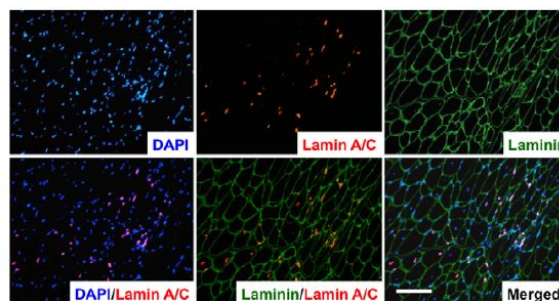
未分化ヒト ES 細胞および iPS 細胞を 7 日間浮遊培養した後、ゼラチンコートした細胞培養ディッシュ上で付着培養とし、無血清培地で 14 日間培養後、ウマ血清を含む骨格筋分化培地で 28 日間培養すると、線維芽細胞様の細胞増殖が観察される。この細胞を再度無血清培地で 14~21 日程度培養すると形態学的に判別可能な骨格筋細胞が出現する(図 2)。



(図 2) 骨格筋細胞分化誘導

また、生体内での骨格筋構成能・再生能を検証するため、骨格筋分化培地で 28 日間培養した段階の細胞を用いて、免疫不全マウス (NOG マウス) への移植実験を行った。移植は前脛骨筋への cardiotoxin による筋傷害と全身放射線照射による前処置を行い、同部位への筋注により行った。評価はヒト ES 細胞由来細胞の免疫染色による同定と、腫瘍形成の有無について評価した。骨格筋分化に関して、ヒト ES 細胞 (Kh1) iPS 細胞 (253G4) とともに in vitro で骨格筋細胞と考えられる Skeletal Myosin 陽性の細胞を誘導することが可能であった(図 3)。

これらの細胞では自発的な収縮活動がみられ、機能的にも成熟骨格筋細胞として矛盾のないものであった。現在、NOG マウスへの移植実験について解析中の状態である。



(図 3) 移植骨格筋細胞の生着

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)

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 . 査読有り、7(12)、2012。pp. e51638, DOI:10.1371/journal.pone.0051638

〔学会発表〕(計 1 件)

粟屋智就. 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 3~4 日 (東京)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 竹雄 (KATO, Takeo)

研究者番号 : 60422945

(2) 研究分担者

粟屋 智就 (AWAYA Tomonari)

研究者番号 : 20589593

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :