

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：12602
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2015
課題番号：26670474
研究課題名(和文) iPS 細胞技術を応用した自己免疫性筋炎研究への挑戦

研究課題名(英文) Studies of autoimmune myositis using iPS cells

研究代表者
上阪 等 (Kohsaka, Hitoshi)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：00251554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性筋炎/皮膚筋炎患者では、筋再生に際して遺伝的に自然免疫系サイトカインを産生しやすい可能性がある。これを解析するには、ヒトiPS細胞から筋細胞を分化させて、再生筋線維が産生するサイトカインを産生させる必要がある。そこで、MyoDを発現するMyoD-hiPS細胞を、MyoDを含むドキシサイクリン誘導性ベクターを導入して樹立した。得られた細胞クローンは、分化培地で紡錘状の細胞へと変化し、再生筋線維と同様のサイトカイン産生能を獲得していることが確かめられた。

研究成果の概要(英文)：To investigate pathogenesis of polymyositis and dermatomyositis, intrinsic abnormality of the patient muscles has to be studied. From peripheral blood from the patients, we have established human iPS cells that express the MyoD protein inducible with doxycycline. When doxycycline was added in the culture medium, the cells became spindle-like cells and gained characteristics of muscle cells. They produced a wide variety of inflammatory cytokines that are produced reportedly from regenerating muscle cells.

研究分野：膠原病・リウマチ内科

キーワード：多発性筋炎 皮膚筋炎 iPS 自然免疫

1. 研究開始当初の背景

「なぜ、運動で血清 CK(creatinin kinase)が上昇し易い人がいるのか?」「なぜ、PM/DMでは、MRI 画像上で一部の筋のみが冒されるのか?」「なぜ、DM 皮疹は限局部位に出るのか?」これらは臨床医がもつ長年の疑問である。申請者らは、PM/DM で、この解を提供するものとして、自己免疫疾患の Seed & Soil モデルを提唱した (沖山ら Arthritis Rheum 2012)。これは、申請者らが独創した PM モデルマウス (C タンパク誘導性筋炎: C-protein-induced myositis [CIM]) の研究成果から得たもので、“自己免疫疾患発症には、獲得免疫である自己抗原特異的 T 細胞活性化に加えて筋などの標的組織の自然免疫活性化が種(Seeds)と土壌(Soil)の様にとともに不可欠”とするものである。研究対象である PM/DM の患者数は年々増加しており、重度の筋力低下は時に致命的となる。本来、筋は再生力に富む筈にもかかわらず、治療後の患者の半数以上が筋力低下に悩む。病態解明と新次元の治療法開発が求められる所以である。一方、革命的である iPS 細胞技術は急速進化を続けているが、膠原病研究に福音をもたらさぬままであり、この技術の活用が期待されていた。

2. 研究の目的

Seed & Soil モデルの礎となった CIM では、Soil である筋組織の自然免疫活性化はフロイト完全アジュバント (complete Freund's adjuvant [CFA]) によるマクロファージ活性化が担い、これに応じて Seeds である活性化 T 細胞が筋傷害をきたす。しかし、PM では、Soil 活性化を人工的な CFA が担う筈はなく、内在因子が担う筈である。この点、申請者らは既に、筋芽細胞が分化しながら炎症性サイトカインを出す事を見出した。また、筋収縮

が成熟筋線維からのインターロイキン(IL)-6 放出を促すという報告もある。これらは、筋恒常性維持や運動などが筋自然免疫を活性化しうることを示唆する。一方、運動による CK 上昇個人差は、carnitine palmitoyltransferase 遺伝子を極端な例として筋脆弱性が遺伝支配されることを示す。従って、分化・損傷時の炎症性サイトカイン放出能も含めた筋遺伝的特性が、PM/DM での Soil 活性化に寄与するという作業仮説が成立する。かかる状況下、iPS 細胞技術は進み、今年、ヒト iPS 細胞から筋分化への成功が報告された (Darabi ら Cell Stem Cell 2012)。筋細胞の遺伝特性を in vitro で検証できることになり、さらに、その特性を修復する薬剤投与や修復後筋芽細胞の移植による筋萎縮治療法の開発を期待できる状況となった。

そこで本研究では、患者/健常人由来 iPS 細胞を利用して、幼弱な筋細胞を in vitro に作成し、PM/DM に関与する筋自然免疫活性化現象を再現できることがどうかを検証することを目的とする

3. 研究の方法

健常人の血液中の CD34 陽性の非リンパ球細胞に対し、山中 4 遺伝子(ヒト OCT4、SOX2、KLF4、MYC)を導入して hiPS 細胞を樹立した。次に、既報を基に、hiPS 細胞に MyoD を含む薬剤誘導性ベクターを PiggyBac 法にて導入し、ドキシサイクリン(Dox)存在下でのみ MyoD を発現する MyoD-hiPS 細胞を 2 クローン樹立した。hiPS 細胞維持培地で培養中の MyoD-hiPS 細胞に対して(6×10⁵ cells/6 well dish)、培養培地中に Dox を加え(day 1~7)、MyoD の発現を誘導し、培地を hiPS 細胞維持培地(~day 4)から筋分化培地(day 5~7)、筋成熟培地(day 8~10)へと交換することで筋分化を誘導した(図 1)。培養中の MyoD-hiPS 細胞の形態学的変化を顕微鏡下で観察した。また、

MyoD-hiPS 細胞の培養上清を day 4~10 まで連日回収し、各培地における各種サイトカイン(TNF- α 、CCL2、CXCL8、活性型 TGF β -1)濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にて定量した。

4. 研究成果

培地(Dox(+))にドキシサイクリンを加えて筋細胞への分化誘導を試みた MyoD-hiPS 細胞は、既報と同様に、筋細胞類似の紡錘状の細胞へと分化した。一方、ドキシサイクリンを含まない培地(Dox(-))で培養した MyoD-hiPS 細胞は、細胞に形態学的変化を認めなかった。

培養上清中に放出されるサイトカインでは、Dox(+)群の MyoD-hiPS 細胞では、CCL2 と活性型 TGF β -1 の有意な産生を筋分化培地、筋成熟培地中に認めた。TNF- α と CXCL8 産生は筋成熟培地中で明らかな上昇を認めた。

TNF- α 、CCL2、CXCL8 の産生量は筋分化の進展に伴い増大したのに対し、活性型 TGF β -1 の産生量は筋分化の前半に多かった。Dox(-)群の筋細胞に分化していない MyoD-hiPS 細胞においても、hiPS 細胞維持培地や筋分化培地中に CCL2 や TGF β -1 を産生していたが、両サイトカイン産生は筋分化により増加していた。

また、TNF- α 産生は Dox(-)群の MyoD-hiPS 細胞の筋成熟培地中にも認めたが、Dox(+)群の MyoD-hiPS 細胞からの TNF- α 産生とは時相が異なっていた。

なお、MyoD-hiPS 細胞の形態学的変化や各種サイトカイン産生能は 2 クローンで同様の結果であり、クローン間でのばらつきはなかった。このように、幼弱な筋細胞を *in vitro* に作成し、PM/DM に関与する筋自然免疫活性化現象を再現することができた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 長谷川 久紀、川畑 仁人、高木 春奈、大津 真、上阪 等 ヒト iPS 細胞由来筋細胞は筋芽細胞同様に筋炎を増悪し得るサイトカインを産生する 第59回日本リウマチ学会総会・学術集会(シンポジウム) 平成27年4月23-25日 名古屋
- ② 長谷川 久紀、川畑 仁人、高木 春奈、大津 真、上阪 等 ヒト iPS 細胞由来筋細胞は筋芽細胞同様に筋炎を増悪し得るサイトカインを産生する 第1回日本筋学会学術集会 平成27年8月8日 東京
- ③ 長谷川 久紀、川畑 仁人、高木 春奈、大津 真、上阪 等 ヒト人工多能性幹細胞由来の筋細胞は再生筋線維と同様のサイトカイン産生能をもつ 第43回日本臨床免疫学会 平成27年10月22-24日 神戸

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上阪 等 (KOHSAKA, Hitoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00251554

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし