

主論文の要旨

**Efficient and Reproducible Myogenic Differentiation
from Human iPS Cells:
Prospects for Modeling Miyoshi Myopathy *In Vitro***

効率的かつ再現性の高い、ヒト iPS 細胞からの骨格筋分化誘導：
In vitro での三好型筋ジストロフィー再現への見通し

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
微生物・免疫学講座 分子細胞免疫学分野

(指導：磯部 健一 教授)

田中 章仁

【緒言】

ヒト人工多能性幹細胞(human induced pluripotent stem cells; hiPSCs)の確立により、患者由来の幹細胞を得ることが可能となった。患者由来の hiPSCs を、表現型を示す体細胞に分化誘導することで、*in vitro*での疾患再現に利用することが可能となる。現在、患者由来の hiPSCs から、様々な体細胞へ分化誘導することが可能となりつつある。しかし、目標の細胞への分化誘導法が、最も困難を伴っている。

今まで筋疾患研究において、ヒトの幹細胞から骨格筋細胞へ分化誘導するための試みがなされてきた。しかし、複雑な分化誘導法であったり、長期間を要したり、低分化効率であったり、再現性が低いなど、様々な問題があった。

三好型筋ジストロフィー(Miyoshi myopathy; MM)は、DYSFERLIN 蛋白の欠損により、骨格筋細胞膜の修復が困難となり、筋萎縮をきたす先天性の筋疾患である。MMの病因は主にモデルマウスを用いて論じられてきた。そのため、ヒトでの真の病態解明は今まで困難であった。

【方法】

- (1) 山中伸弥氏より hiPSCs の供与を受け、既報に沿った方法で培養した。MM 患者の hiPSCs は、患者の皮膚線維芽細胞からセンダイウィルスを用いて作成された。
- (2) テトラサイクリン応答性遺伝子発現ベクターに、骨格筋分化に関与する転写因子 *MYOD1* を組み込んだ。*MYOD1* と同時に蛍光蛋白 mCherry を同時発現する配列とした。このベクターをトランスポゾンシステム(piggyBac)を用いて、hiPSCs に遺伝子導入した。
- (3) 遺伝子導入した hiPSCs を doxycycline(Dox)を添加して骨格筋細胞へ誘導した。培地や Dox 添加時期、期間などの条件を検討し、最適な分化誘導法を確立した。
- (4) 誘導された細胞が、骨格筋細胞の性質を有しているか詳細に評価した。
- (5) MM 患者由来の hiPSCs でも上記の骨格筋細胞誘導を行い、疾患再現を試みた。更に、レスキュー実験として、MM 患者由来の hiPSCs に、*DYSFERLIN* を恒常的に強制発現させた。この hiPSCs で骨格筋細胞誘導を行い、表現型が回復しているか評価した。

【結果】

(1)薬剤応答性 *MYOD1* 発現 hiPSCs の作成(Figure 1)

Dox 応答性に目的遺伝子を発現するベクターを準備した。目的遺伝子が発現する際には、蛍光蛋白 mCherry も同時に発現するように設計した。目的遺伝子 *MYOD1* をベクターに組み込み、このベクターを hiPSCs に piggyBac を用いて遺伝子導入した(Myod-hiPSCs)。遺伝子導入された細胞は Dox 応答性に mCherry と *MYOD1* 蛋白を発現した。その細胞で分化誘導を試した所、培地による多寡はあるが、骨格筋特異的蛋白である myosin heavy chain (MHC)が発現した。以上より、Myod-hiPSCs は未分化状態から、薬剤応答性に骨格筋細胞を誘導可能であることが示された。

(2) MyoD-hiPSCs の骨格筋細胞誘導法(Figure 2, 3)

維持培地から誘導用の培地へ変更する時期を検討した所、遅い時期では分化誘導効率は下がることが示唆された。培養終盤に 5%ウマ血清含有培地へ培地変更した所、骨格筋細胞が成熟し多核となる傾向が伺えた。また Dox 添加の時期については、早期添加の方が誘導効率は高かった。Dox の添加期間については、少なくとも 5 日間の添加により骨格筋細胞の誘導効率は高い状態が保たれた。これらを踏まえ、最終的に分化誘導法を確立した。この分化誘導法により、様々な細胞株でも MHC 陽性の骨格筋細胞が誘導可能であり、その誘導効率は 70~90%に及んだ。

(3) 誘導された MyoD-hiPSCs が備える成熟骨格筋細胞の性質(Figure 4)

MyoD-hiPSCs から骨格筋細胞へ誘導すると、未分化マーカーの遺伝子発現量は徐々に低下し、分化マーカーのものは速やかに上昇した。誘導された細胞は豊富なミトコンドリアを有し、成熟骨格筋細胞のマーカーとなる蛋白を発現していた。また、すでに報告されているヒト筋芽細胞の cell line である Hu5/E18 株から誘導した細胞や未分化状態の hiPSCs と、網羅的な遺伝子発現を比較した。結果、誘導された MyoD-hiPSCs は、未分化状態の hiPSCs とは大きく異なり、かつ Hu5/E18 由来細胞と類似の遺伝子発現を示した。その中でも骨格筋細胞に特徴的な遺伝子を抜き出して確認したところ、MyoD-hiPSCs 由来細胞は Hu5/E18 由来細胞と同様に高発現を示していた。

(4) 誘導された MyoD-hiPSCs の機能的性質(Figure 5)

誘導された MyoD-hiPSCs は Hu5/E18 から誘導された細胞と同様に、筋繊維や myosin 線維など、電子顕微鏡で確認されるような筋収縮に必要な微小構造を有していた。GFP を恒常的に発現するマウスの筋芽細胞と共培養したところ、融合することもタイムラプスで確認された。また、その共培養した細胞を免疫染色すると、マウス由来の骨格筋細胞内にヒト由来の核が確認され、融合していることが確認された。

(5) 分化誘導法の疾患再現への応用(Figure 6)

三好型筋ジストロフィー(MM)の患者より、MyoD-hiPSCs を作成した。コロニー形態、未分化マーカーの発現、奇形腫形成能などより、品質が問題ないことを確認した。骨格筋細胞への分化誘導能も確認した。次に欠損蛋白である DYSFERLIN をレスキューした細胞を作成し、蛋白が発現することを確認した。通常の MyoD-hiPSCs、MM 患者由来の hiPSCs、レスキュー後の hiPSCs などから骨格筋細胞を誘導し、膜修復アッセイを行なった。MM 患者由来細胞では Dye の流入は多量であったが、通常の MyoD-hiPSCs 由来細胞とレスキュー後の細胞は Dye の流入は少なく、適切に表現型の再現が可能であった。

【考察】

ヒト iPSCs の技術は、患者由来の任意の組織を得ることを可能とした。目標組織が生検困難な部位である、あるいは生検が患者の苦痛を強いるために施行できない場合でも、目標の組織を *in vitro* で作成することが可能となった。今までモデルマウスで

の実験では、種の差により、得られた知見がヒトにも応用できるかどうかは常に議論となってきた。しかし、患者自身の細胞であれば、種差の問題を解決することができる。

我々は hiPSCs からの骨格筋細胞誘導法を確立した。既報では線維芽細胞からの誘導法が示されているが、線維芽細胞は無限かつ均質に増殖するわけではない。そのため常に安定して骨格筋細胞を誘導できるとは限らない。また、胚性幹細胞や hiPSCs からの誘導法も報告されているが、一度間葉系の幹細胞に誘導する段階を経ており、再現性や効率が低いことが問題であった。途中段階を経るため手順が煩雑となり、長期間の培養が必要であった。我々の誘導法はわずか 10 日程度で、しかも非常に簡便な方法で骨格筋細胞を誘導することが可能である。この誘導法では中胚葉を経由せずに誘導している。そのため、誘導期間を短縮することができたと考えられる。また、簡便で短期間の誘導であるため、再現性はかつてないほど高く、しかも高効率であった。骨格筋細胞の性質について詳細に検討した所、我々の誘導した細胞は融合能、収縮能を持ち、成熟骨格筋細胞としての高い品質を備えていた。そのため、疾患再現に適していると思われる。更に、hiPSCs から大量に作成することも可能であり、疾患再現に引き続く薬剤スクリーニングにも応用が期待できる。

MM の病態については膜修復アッセイで表現型の再現が可能であることは知られている。しかし、詳細な病態については不明な点も多い。我々の確立した骨格筋細胞誘導法はその解明に非常に有用であると考えられる。今回は MM の疾患再現にも成功したが、他の難治性筋疾患の再現にも応用が期待できる。難治性筋疾患には効果的な治療法が存在しないものが多く、それらの薬剤スクリーニングから、新しい治療法が発見されることも期待できる。

【結論】

ヒト iPSCs から、高効率かつ短期間に、高い再現性をもって骨格筋細胞を誘導する方法を確立した。誘導された細胞は成熟骨格筋の性質を備えており、高い品質を有する。この誘導法を用いることにより、三好型筋ジストロフィーの疾患再現にも成功した。