

主論文の要旨

**Transplantation of human iPSC-derived muscle stem
cells in the diaphragm of Duchenne muscular
dystrophy model mice**

〔デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの横隔膜における
ヒトiPS細胞由来骨格筋幹細胞移植に関する検討〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：江畑 智希 教授)

三浦 泰智

【緒言】

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィンの欠損を特徴とする難治性の遺伝性筋疾患である。DMD 患者の主な死因は呼吸不全、呼吸器関連感染症、心不全である。ジストロフィンを発現する筋組織を再生する方法として細胞移植が期待されている。また、骨格筋幹細胞 (サテライト細胞) は完全なジストロフィンを発現する筋線維を再生させることから、移植細胞として注目されている。生体内から骨格筋幹細胞を採取し移植する方法では細胞の供給面で問題があり臨床利用はできない。この問題を解決するため、これまでに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) より骨格筋幹細胞を分化する方法が確立されている。DMD 患者の呼吸機能を改善させるため、横隔膜へ細胞移植を行うことが必要と考えられるが、モデルマウスを用いた実験では、これまで横隔膜への細胞移植の報告はない。

【結果】

本研究グループは、移植方法の確立のため、GFP マウスの筋肉からサテライト細胞を分取し、免疫不全 DMD モデルマウス (NOG-mdx マウス) の横隔膜へサテライト細胞が移植可能か検討した。横隔膜へ細胞を直接投与し 4 週後に蛍光実体顕微鏡で観察した結果、横隔膜に GFP を発現した筋線維を認めた (Fig.1)。また、免疫組織学的染色によりこの筋線維はジストロフィンの発現を確認した (Fig.2)。これらは横隔膜へ細胞移植が可能であることを示した。

次に、異種細胞であるヒト骨格筋細胞が横隔膜に生着が可能か検討した。ヒト不活化細胞株 (Hu5/KD3) は免疫不全マウスの骨格筋に生着し、骨格筋へ分化することが知られている。移植細胞由来の筋線維を識別するため、Hu5/KD3 へ GFP を遺伝子した細胞株を使用した。Hu5/KD3 はマウス由来サテライト細胞と同様に、移植後 4 週において横隔膜への生着と筋線維への分化を認めた (Fig.3)。しかし、移植部位のジストロフィン陽性筋線維数を移植効率として 2 群比較した結果、Hu5/KD3 の移植効率はサテライト細胞に比べ有意に少なく (Fig.4)、横隔膜への異種細胞移植では移植効率を向上させるためプロトコールの再検討が必要であった。

マウスの呼吸数は 150-200 回/分程度と速く、その横隔膜の急速な筋収縮により注入した細胞液が流出する。このため、細胞や細胞液の歩留まりを改善させるために移植基剤を検討した。粘性が高く臨床応用されている、ゼラチン、ヒアルロン酸、アルギン酸に着目し、この 3 種類のポリマーを移植基剤として、NOG-mdx マウスの前脛骨筋へ移植し比較した。移植後 2 週で、移植細胞由来の筋線維をジストロフィンと細胞骨格タンパクであるスペクトリンで標識し、免疫組織学的染色した (Fig.5)。結果、ヒアルロン酸 : ゼラチン = 2:8 (H2G8)、アルギン酸 : ゼラチン = 2:8 (A2G8) の混合比率が有意に移植効率を高めることが示された (Fig.6)。

上記の結果を踏まえ、iPS 細胞から分化誘導した骨格筋幹細胞 (iPS cell-derived muscle stem cell : iMuSC) を H2G8、A2G8 と混合ポリマーなしの 3 条件で NOG-mdx マウスの横隔膜へ移植し、移植効率を比較した。移植後 4 週において、H2G8 ではスペ

クトリン陽性線維数が多く (Fig.7)、また、生着しないサンプルの割合 (細胞移植不成功率) は、ポリマーなしや A2G8 より、H2G8 において少ない傾向であった (Fig.8)。

最後に、移植時の注射針による物理ストレスが細胞に影響について検討した。シリンジや針を通過する際に細胞へ物理的ストレスがかかり、細胞の生存率を下げるということが知られている。この物理的ストレスが移植細胞の増殖に影響を及ぼすか明らかにするため、H2G8 あり、ポリマーなし、処置なしの 3 条件で比較した。iMuSC について H2G8 を混合した条件はポリマーを含まない条件より有意に細胞が増殖し、処置なしで培養した群と同等であった (Fig.9)。同様の検討で、マウス由来サテライト細胞では処置により細胞増殖が抑制されるが、Hu5/KD3 では抑制されなかった (Fig.9)。

【考察】

本研究では、DMD マウスの横隔膜へ骨格筋幹細胞が移植可能であることを示し、更にゼラチンとヒアルロン酸で構成される混合ポリマーにより移植効率が向上することが明らかとなった。

DMD 患者の呼吸機能を改善させるため、横隔膜へ骨格筋幹細胞移植が必要と考える。更には iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導することで、ドナー細胞のストック確保の問題が解消されることが予想される。しかし、現状の iPS 細胞からの骨格筋幹細胞誘導プロトコールは誘導効率が低く、誘導まで長期間の培養を要する。このため、本研究では、移植プロトコールの検討にヒト不死化筋芽細胞株 (Hu5/KD3) を使用した。Hu5/KD3 を横隔膜に移植した結果は、生着後に筋再生することが示されたが、マウス由来サテライト細胞との比較では、移植効率は低い結果であった。筋芽細胞はサテライト細胞と比較し筋再生能が低いこと、また筋組織より分取した細胞と培養細胞では、細胞外マトリックスが異なる環境にあることが原因として考えられる。加えて、マウスの横隔膜の筋収縮が、細胞と細胞液を移植箇所から流出させ、細胞生着を阻害している可能性がある。このため、細胞や細胞液の歩留まりを改善させるために移植基剤の検討を行った。粘性が高く臨床応用されている、ゼラチン、ヒアルロン酸、アルギン酸に着目し、この 3 種類のポリマーを移植基剤として、NOG-mdx マウスの前脛骨筋へ移植した。移植後 2 週で、移植細胞由来の筋線維を免疫組織学的染色で評価した結果、H2G8、A2G8 で有意に移植効率を高めることが示された。

マウス横隔膜への細胞移植はこれまでに報告されていない。加えて、本研究ではマウス由来サテライト細胞と同様の移植プロトコールであっても、iMuSC のみでは半数以上の移植例で生着できないことが分かった。一方で、Hu5/KD3 では移植した結果では少なくとも 1 箇所には生着が見られる。これは、Hu5/KD3 は hTERT、CDK4R24C と cyclin D1 を遺伝子導入した不死化細胞であることが一因と考えられる。シリンジと針を通す処置を加えた培養実験では、Hu5/KD3 では増殖数の低下は見られないが、不死化していない iMuSC とマウス由来サテライト細胞では処置により細胞増殖が低下する結果であった。iMuSC は不死化細胞株ではないことや生体から分取した細胞ではないことが、横隔膜への局所投与による細胞移植では生着を困難にしていると考えられ

る。H2G8 はわずかではあるが横隔膜への移植効率を向上させ、このことは、局所投与の際の物理的負荷を軽減していることを示唆している。以上より、H2G8 は横隔膜への骨格筋幹細胞移植を改善させる 1 つの有効な手段である。

【結論】

マウスの横隔膜へ骨格筋幹細胞移植は可能であり、更に、ヒアルロン酸とゼラチン混合ポリマーを移植基剤として使用することで、マウス横隔膜における細胞移植不成功率を低下させる。この結果は、他の局所投与による細胞移植研究においても有用な方法と考える。