

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

遠藤（齋藤）亜沙子

専攻分野：再生医学・免疫病態医学

コース：

指導教授：鈴木 登

主論文の題目：

IGF II /Akt Signaling Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem(iPS) Cells

(ヒト iPS 細胞における筋分化には IGF II /Akt シグナル伝達経路が重要である)

共著者：

Jun Shimizu, Naruyoshi Fujiwara, Kenji Takai,  
Nagisa Arimitsu, Tasuku Umehara,  
Takao Kono, Hiroko Misawa, Yuji Ueda,  
Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Moroe Beppu ,  
Noboru Suzuki

緒言

骨格筋細胞はサテライト細胞の働きで修復されるが、その再生能は筋疾患や多量の筋損傷、加齢的变化による筋肉減少等において限りがある。Insulin growth factor I (IGFI) と IGF II は骨格筋分化に関与する因子で、特に IGF II は筋芽細胞において自己分泌される分化因子である。以前、我々はマウス ES 細胞に IGF II 遺伝子を導入することで骨格筋細胞分化誘導に成功した。患者から採取した細胞から iPS 細胞を樹立し再生医療へ応用することは拒絶反応の抑制や、ES 細胞利用時に問題となる倫理的な問題のハードルの低さの観点から有効な治療ソースの1つと考えられる。iPS 細胞に特定の遺伝子を導入し、治療の目的に対応した細胞を樹立することは、均質な筋細胞を大量に増殖させられることから今後の細胞移植療法において極めて有用な方法である。従って本実験においてヒト iPS 細胞に IGF II 遺伝子を導入し骨格筋細胞への誘導を試みた。

## 方法・対象

ヒト iPS 細胞は 253G1 株と 201B7 株を使用した。まず遺伝子導入実験では、IGF II 遺伝子を iPS 細胞に導入し 14 日間培養を行ったのち、RNA を抽出、RT-PCR した。また細胞免疫染色も行った。

次に、胚様細胞塊 (embryoid body : EB)、筋分化培地を用いた筋細胞誘導を試みた。ヒト iPS 細胞を培養ディッシュから解離した後、bFGF を除いた培地に懸濁し、4 日間の浮遊培養によって EB を作製しフィブロネクチンコートした培養ディッシュに播種した。24 時間後に分化培地に交換し、同時にインスリン、デキサメタゾン、EGF、bFGF を加えた。分化誘導後 24 時間後、72 時間後、7 日、14 日細胞を回収し、RNA を抽出した。RT-PCR を行い筋分化関連遺伝子の mRNA の発現量を検討した。さらに遺伝子導入実験と同様に細胞免疫染色も実施した。また、PI3K/Akt シグナル伝達経路の抑制因子 (LY294002, Calbiochem, La Jolla, CA) を使用した実験も行った。

## 結果

ヒト iPS 細胞へ IGF II 遺伝子を導入した結果、IGF II、Insulin growth factor 1 receptor (IGF1R)、MyoD、myogenin の発現は見られたが、myogenic regulatory factor 4 (MRF4) と dystrophin の発現はみられなかった。MyoD は rhIGF II の添加の有無にかかわらず 15 日目で発現していた。遺伝子導入後の細胞は生存率が低く、安定した細胞株を樹立することが困難であり最終分化までの観察が出来なかった。

EB 形成後筋誘導を試みた実験では、細胞を回収し mRNA を抽出し RT-PCR を行ったところ 5 日目で myoD と myogenin の発現が、12 日目と 19 日目では MRF4 と dystrophin の発現が確認された。結果はヒト iPS 細胞 253G1 株と 201B7 株ともに同様であった。ヒト iPS 細胞由来のヒト核蛋白抗体陽性かつ IGFIR 陽性細胞は、7 日目で  $62.0 \pm 15.0\%$  であった。また、12 日目では  $20.6 \pm 0.6\%$  の細胞が dystrophin 陽性となった。LY294002 を添加すると IGFIR 下流のシグナルである IGF II、myoD、MRF4 の発現は見られなくなり、これらの遺伝子発現は同経路を介することが明らかとなった。分化誘導後 3 日目の細胞で抗 myoD 抗体の免疫染色を行ったところ、myoD 陽性細胞は  $33.7 \pm 9.3\%$  であった。同様に Akt 陽性細胞は 3 日目、7 日目でそれぞれ  $79.6 \pm 0.9\%$ 、 $96.8 \pm 3.3\%$  であった。この細胞で組み換えヒト IGF II (rhIGF II) の添加実験を実施したところ、添加後 20 分でリン酸化 Akt 陽性細胞は 3 日目、7 日目でそれぞれ  $32.7 \pm 0.8\%$ 、 $17.5 \pm 2.6\%$  であり、IGF II /Akt シグナル伝達経路が十分入力されていることを確認した。

## 考察

ヒト iPS 細胞に IGF II 遺伝子を導入し培養した細胞で MyoD と myogenin の発現を確認したが、成熟骨格筋マーカーである MRF4 や dystrophin の発現は見られなかった。これは IGF II 遺伝子の導入だけでは分化誘導が不十分であり、さらなる増殖因子が必要な場合や、マウス ES 細胞との違いや、アザシチジンという DNA メチル化阻害剤の筋分化誘導に及ぼす影響の実験結果が二分されていることよりこの 2 つのヒト iPS 株特有の遺伝的背景の可能性が考えられる。

EB は胎生期における 3 胚葉系を模倣した細胞塊であり、様々な細胞を分化誘導するために前駆細胞として広く用いられている。これまで骨格筋細胞の分化誘導の試みにおいてもマウスやヒト ES 細胞から誘導する際に用いられているが、ヒトでは十分な結果は得られていない。今回の実験で EB の形成のみで IGF II および IGFIR 遺伝子の発現増強が認められた。同細胞の IGF II 発現は PI3K/Akt シグナルに依存していることを併せ考えると少なくとも EB 形成～初期分化培養期間内ではこの IGF II 発現にオートクライン/パラクライン機序が働いている可能性がある。

bFGF は MAPK/Erk、PI3K/Akt シグナル伝達経路を介する Oct4 の発現上昇によって ES 細胞や iPS 細胞の多能性を維持するのに使用されている。IGF II/IGFIR 経路を阻害することは細胞数とクローン形成を減少させる。また、bFGF の阻害をすることで細胞の分化誘導を間接的に促す。実際、MAPK/Erk 伝達経路の阻害は筋芽細胞において myoD と myosin heavy chain の発現を増強し、細胞融合を促進する。EB を作成することで、bFGF から IGF II へのスイッチングと筋細胞分化への刺激となったと考えられる。IGF II 存在下に培養することで筋肉分化誘導に成功したが、筋細胞融合はこの分化誘導培養条件ではほとんど認められなかった。今後はさらに dystrophin 発現を誘導する培養条件や導入遺伝子の追求が必要である。

## 結論

ヒト iPS 細胞からの骨格筋細胞の分化誘導において IGF II と IGFIR/PI3K/Akt 経路が重要であることを示した。また EB を介した方法では遺伝子マーカー上は筋細胞分化の初期誘導が可能であることを示した。