

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

三澤 寛子

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：

Pax7 Gene Induction Rapidly Regulates Myocyte Homeostasis in Human Induced Pluripotent Stem(iPS) Cells

(ヒト iPS 細胞において Pax7 遺伝子はミオサイトホメオスタシスの急速な進行を誘導する)

共著者：Asako Saito, Jun Shimizu, Masahiro Inuma, Takaki Shiratsuchi, Naruyoshi Fujiwara, Kenji Takai, Nagisa Arimitsu, Yuji Ueda, Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Moroe Beppu, Noboru Suzuki

緒言

筋線維が傷害されると活性化筋衛星細胞が増殖、分化、癒合し、筋形成に重要な役割を担っている。しかし広範な筋欠損や損傷の場合、これだけでは不十分であることが知られている。

インスリン様成長因子 (IGF) I と IGFII は骨格筋細胞の分化を促進することが知られている。IGFII は、筋芽細胞の自己分泌性の分化誘導因子としての役割の他に、筋芽細胞の増殖から分化までの間の生存因子としても知られている。我々は以前、マウス ES 細胞に IGFII cDNA を導入することで骨格筋細胞の分化誘導が可能であることを示し、その細胞の損傷したマウスの前脛骨筋への移植で運動機能の回復に成功した。

我々は先行研究でヒト骨格筋細胞の分化誘導を目的に hiPS 細胞に IGFII 遺伝子を導入し、IGFII に反応する初期の myocyte の誘導に成功したが、骨格筋分化の後期を示すマーカーは発現せず細胞の生存率も低かった。Pax7 は胚骨格筋発生において転写因子として働き、骨格筋再生において筋衛星細胞の休止期、活動期ともに発現が認められる。本研究で、我々は IGFII の応答を活性化するため hiPS 細胞に Pax7 遺伝子を導入し骨格筋細胞の誘導を試みたので報告する。

方法

Pax7 遺伝子を piggyBac トランスポゾンプロモーターへサブクローニングし、核酸導入試薬によって未分化 hiPS 細胞へ導入した。piggyBac には G418 耐性遺伝子を組み込み、G418 の添加によって細胞のセクションを行った。

IGFII 遺伝子も同様の方法でサブクローニングし、MEF へ導入した。

未分化 hiPS 細胞をマイトマイシン C 処理したマウス胚線維芽細胞 (MEF) 上で、iPS 細胞分化培地を使用して培養した。day1 で Pax7 遺伝子を導入し、day3 以降引き続き iPS 分化培地で培養する群と筋分化誘導培地で培養する群とに分け、IGFII 添加に対する応答を評価した。

day7、14、21 で細胞を回収し、RT-PCR 及び免疫蛍光染色によって筋原性遺伝子及びタンパク質の発現を確認した。

結果

hiPS 細胞分化培地で培養した Pax7 導入細胞は、ヒト MyoD、myogenin、MRF4、IGFIR、IGFII mRNA を発現していたが、MHC2 mRNA は培養期間にわたって発現がなかった。

IGFII 非導入 MEF 上で筋分化誘導培地下に培養した Pax7 導入細胞は、培養期間を通してヒト MyoD、myogenin、IGFIR、IGFII mRNA を発現しており、day7 においては MRF4、MHC2 mRNA も発現していた。

IGFII 導入 MEF 上で筋分化誘導培地下に培養した Pax7 導入細胞は、培養期間を通してヒト MyoD、myogenin、IGFIR、IGFII mRNA を発現していた。day7 では MRF4 mRNA も発現していたが、MHC2 mRNA は発現していなかった。

いずれの培養条件においても dystrophin の発現は確認できなかった。

免疫染色法では、筋分化誘導培地で培養した細胞は day7 で MyoD を発現した。また、同様の条件下で dystrophin の発現が認められたが、day7 移行は著明に減少した。

IGFII の添加の有無は、筋分化関連遺伝子及びタンパク質発現に影響しなかった。

考察

先行研究では、未分化 hiPS 細胞を 4 日間浮遊培養して胚様体 (EB) を作成し、その後 8 日間細胞培養を行うことで dystrophin 遺伝子及びタンパク質の発現を確認した。今回の研究では、Pax7 導入後 6 日目の細胞で dystrophin タンパク質の発現を確認しており、Pax7 遺伝子の導入は hiPS 細胞の myocyte homeostasis を著しく促進する可能性が示唆された。

成熟筋線維へ分化誘導するためには、さらなる未知の因子が必要であると考える。我々は、IGFII の添加が糖新生に関わる PI3K/Akt シグナル経路を通してマウス ES 細胞と hiPS 細胞の筋分化を促すことを確認している。近年糖新生経路であるグリコーゲン合成キナーゼ 3 β 阻害物質とアデニルシクラーゼ活性因子が胚発生における筋形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。Pax7 導入 hiPS 細胞においてこれらにより筋分化の初期段階を調節することで骨格筋細胞分化の成功の可能性が高くなると考えられ、今後の研究課題である。

結論

Pax7 は hiPS 細胞における myocyte homeostasis を強力に調整する可能性を示唆した。また、hiPS 細胞からの安定した機能的な筋形成のために、遺伝子導入後早期の分子力学の更なる解明が必要である。