

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

白土 崇輝

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：

Sonic Hedgehog Supplementation Rapidly induces Myogenesis in Human Induced Pluripotent Stem Cells

(SHHはヒトiPS細胞における筋形成を急速に誘導する)

共著者：

Hiroko Misawa, Asako Saito, Jun Shimizu, Masahiro Iinuma, Naruyoshi Fujiwara, Kenji Takai, Nagisa Arimitsu, Yuji Ueda, Sueshige Wakisaka, Tomoko Suzuki, Moroe Beppu, Noboru Suzuki

緒言

骨格筋幹細胞である筋衛星細胞はPax7、MyoD、Myf5、myogeninのような転写因子のMyoDファミリーにより調節される。必須の筋原性因子に加え、insulin-like growth factors(IGF) I や IGF II は phosphoinositol-3 kinase (PI3K) / AKT経路の活性化を介し筋芽細胞の増殖と分化を促進する。本研究室は以前にマウス胚性幹(ES)細胞へのIGF II 遺伝子導入が骨格筋細胞分化につながることを報告した。モルフォゲンのヘッジホッグファミリーは脊椎動物の発生において中心的な役割を果たす。ソニック・ヘッジホッグ (Sonic Hedgehog:SHH) は胚における筋分化を促進させ、筋芽細胞の増殖と分化を制御する。本研究ではSHHの添加によりhuman induced pluripotent stem (hiPS)細胞から骨

格筋細胞の分化誘導を試み、このhiPS細胞由来の筋芽細胞をマウスの前脛骨筋内に移植し、筋肉内で生着が可能であるか検討した。

## 方法・対象

hiPS細胞は253G1株を使用した。4日間(day0～day4)の浮遊培養で未分化のhiPS細胞から胚様細胞塊(embryoid body:EB)を形成し、4日目(day4)にフィブロネクチン(FN)をコートした培養ディッシュに播種した。24時間後(day5)、20%ウシ胎仔血清、50 $\mu$ g/mlウシフェチュイン、10ng/ml組換えヒト上皮成長因子、1ng/ml組換えヒトbFGF、10 $\mu$ g/ml組換えヒトインスリン、および0.4 $\mu$ g/mlのデキサメタゾンを含む骨格筋細胞増殖培地に交換し7日間(day5～day11)培養した。その際に組換えヒトIGFII(200ng/ml)および/または、SHH(2 $\mu$ g/ml)を添加した。5日目(day5)、7日目(day7)、11日目(day11)の細胞を回収後にRNAを抽出し、RT-PCRで筋分化関連遺伝子のmRNA発現を、免疫蛍光染色で筋形成に関連する蛋白質の発現を確認した。また7日目(day7)の培養細胞(5 $\times$ 10<sup>5</sup>個)をマウス[6～8週齢、C57BL6(B6)、n=8]の両側前脛骨筋へ注入した。デキサメタゾン(0.5～1.0mg/kg)を移植3日前から投与し、移植後はシクロスポリン(15-75mg/kg)を毎日投与した。本研究は聖マリアンナ医科大学の動物実験ガイドラインに従って行われ、聖マリアンナ医科大学の実験動物研究施設の動物実験委員会により承認を得たものである(承認番号TG-140514-1)。

## 結果

まず未分化のhiPS細胞と7日目の培養細胞の筋原性遺伝子発現(Myod、myogenin、Mrf4、およびdystrophin)を調べた。未分化のhiPS細胞はMyodとmyogeninのmRNAのみを発現し、Mrf4とdystrophin発現を認めなかつ

た。IGF IIのみを添加した細胞は、myoDとmyogeninを発現、7日目でのMrf4とdystrophin発現を認めなかった。SHHのみ添加した細胞は7日目でのMrf4とdystrophin発現を認めなかった。IGF IIとSHHを添加した細胞はmyoD、myogeninおよびdystrophinの発現を認めた。5、7、および11日目での免疫蛍光染色では、5日目にMyoD、Mrf4を発現、7、11日目にはmyogenin、dystrophin発現を認めた。7日目と11日目のdystrophin陽性細胞の割合は、 $11.3 \pm 2.3\%$ と $12.2 \pm 3.8\%$ であった。次に細胞移植(n=8)から4日後のマウス前脛骨筋(n=3)のhematoxylin and eosin(HE)染色では、シクロスポリンとデキサメタゾンの通常投与量で免疫抑制したマウス前脛骨筋内に移植した細胞は認めず、マウス由来の好酸球性細胞を含む単核細胞が移植部位に浸潤していた。デキサメタゾンのみで免疫抑制した移植部位では移植細胞をびまん性に認め、免疫蛍光染色では局所的にmyoD、myogenin、およびdystrophin陽性ヒト筋芽細胞を認めたが、in vitroの結果と比較し著しく減少した。

## 考察

hiPS細胞をEB化後、筋分化誘導培地にSHHとIGF IIを添加することで、EB化から7日目にdystrophin発現を認め、成熟筋細胞への分化が示唆された。SHHは胚、成体の筋芽細胞に発現し増殖促進に関与する。またSHHはSmoothened (Smo) およびPI3K/Akt経路を同時に活性化する。IGF IとIGF IIはIGF I受容体と結合し、細胞内シグナル伝達を共有し、IGF I受容体はSHHとIGF Iの両者に応答するSmoと機能的に関連をもつことで両者の受容体レベルの統合より筋形成に役割を果たす。以上からSHHとIGF IIの添加が相乗的に作用し、7日間で筋分化誘導したと考える。また移植実験では免疫抑制剤投与にも関わらず、移植部位は宿主免疫応答細胞の大量浸潤を伴う高度な炎症を認めた。シクロスポリンなどのカルシニ

ニューリン阻害剤は臓器移植で拒絶反応を防止する標準的な免疫抑制剤であり、筋芽細胞の同種移植で移植部位の急性炎症を著明に改善する。一方IGFI刺激下で、Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン/カルシニューリンのシグナルが骨格筋の発生と成長に関与する。本研究ではシクロスポリンの投与量増加でマウス免疫応答細胞は減少したが、シクロスポリンを中止しデキサメタゾン単剤投与により生存しているヒト細胞は増加した。このことからシクロスポリン投与が筋修復阻害に関与した可能性が示唆された。デキサメタゾン単独での免疫抑制により、移植部位では筋原性タンパク質の発現が確認されたが、in vitroの結果と比較し細胞数が減少した。今後は宿主免疫応答を軽減する方法の検討が必要である。

## 結論

hiPS細胞をEB形成し筋分化誘導培地にSHHとIGF IIを添加することで、EB化後7日という短期間でdystrophin発現細胞へ分化し、hiPS細胞から安定的かつ速やかに筋細胞が分化誘導できる可能性を示した。今後はこの細胞を移植療法に用いるために移植細胞が生体内で成熟筋細胞を形成するメカニズムを特定し、さらに移植時の免疫応答を軽減する方法の開発が必要である。