

崇城大学学位論文

ダイレクト・リプログラミング法による  
皮膚線維芽細胞の骨格筋細胞への分化誘導

平成 28 年度

堀 尾 福 子

## 目次

第1章	緒言.....	1
第2章	略語一覧.....	4
第3章	研究の背景.....	6
第1節	デュシェンヌ型筋ジストロフィー.....	6
第2節	ジストロフィン.....	7
第3節	MyoD.....	9
第4節	組換えアデノウイルスベクター.....	10
第4章	組換えアデノウイルスベクター作製.....	12
第1節	序.....	12
第2節	実験方法.....	14
第1項	組換えコスミドの作製.....	14
第2項	1次ウイルス液の作製.....	19
第3項	2次ウイルス液の作製.....	21
第4項	3次ウイルス液の作製.....	21
第5項	組換えウイルスベクターの精製.....	22
第6項	ウイルス力価の測定.....	22
第3節	結果.....	23
第5章	筋分化マーカーの発現確認.....	25
第1節	序.....	25
第2節	実験方法.....	26
第1項	細胞培養.....	26
第2項	細胞の播種.....	26
第3項	組換えウイルスベクターの感染.....	26
第4項	RNA抽出.....	26
第5項	RT-PCR.....	27
第3節	結果.....	29
第6章	電気刺激による収縮能の検討.....	31
第1節	序.....	31
第2節	実験方法.....	33
第1項	細胞培養.....	33

第2項	細胞播種.....	33
第3項	組換えウイルスベクターの感染.....	33
第4項	電気刺激.....	34
第5項	収縮の解析.....	34
第3節	結果.....	34
第7章	カルシウムイオン動態の確認.....	37
第1節	序.....	37
第2節	実験方法.....	39
第1項	細胞培養および組換えウイルスベクターの感染.....	39
第2項	添加薬剤の調製.....	40
第3項	カルシウムイオンの測定.....	40
第3節	結果.....	41
第8章	Time-lapse 法による遊走能の評価.....	44
第1節	序.....	44
第2節	実験方法.....	45
第1項	細胞培養および組換えウイルスベクターの感染.....	45
第2項	Time-lapse 法による観察.....	46
第3項	遊走能の検討.....	46
第3節	結果.....	47
第9章	融合能の評価.....	49
第1節	序.....	49
第2節	実験方法.....	49
第1項	細胞培養および組換えウイルスベクターの感染.....	49
第2項	共培養.....	49
第3項	免疫染色.....	50
第4項	蛍光観察.....	50
第3節	結果.....	50
第10章	考察.....	54
実験の部	.....	59
参考文献	.....	63
謝辞	.....	71

本論文は以下の論文を基礎とするものである。

Horio F. Sakurai H. Ohsawa Y. Nakano S. Matsukura M. Fujii I.

“Functional validation and expression analysis of myotubes converted from skin fibroblasts using a simple direct reprogramming strategy.”

*eNeurologicalSci.* 2017;6:9-15

## 第1章 緒言

筋ジストロフィーの中でも最も発生頻度が高く、かつ重症疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）はX染色体劣性遺伝病で、ジストロフィン遺伝子の変異が原因の疾患である[1]。ジストロフィン蛋白質は細胞外マトリックスと筋の収縮フィラメントの間に作用（存在）し、筋収縮の際の細胞膜の安定化に関与している[2, 3]。DMDではジストロフィン蛋白質が欠損するため、収縮の際に筋線維は容易に損傷し、変性・壊死に陥る。筋線維が壊死に陥ると、近傍に存在していた筋前駆細胞（衛星細胞）が活性化して分裂し、修復にあたる。しかしながら、壊死・再生を繰り返していくうちに、度重なる分裂によって筋前駆細胞のテロメアは短縮するため、筋前駆細胞の分裂能は廃絶してしまい、壊死に陥った筋線維を修復することは不能となる[4]。その結果、次第に筋力低下が進行し、呼吸障害や心機能障害を起こし、死に至る疾患である[5, 6]。

このDMDに対する根本的治療戦略として、ジストロフィンを強制的に発現させる方法が考えられてきた[7-10]。ジストロフィン蛋白質が発現している正常筋芽細胞移植はその一つの方法である。しかし、正常筋芽細胞は健常人より全身麻酔下に採取され、患者で筋肉としての機能を回復させるためには多くの細胞を必要とする。これはドナーにとって大きな負担となるため、これらの問題点を解決する方法が望まれる。本研究では比較的容易に採取でき、培養条件下にて増殖させることが可能である皮膚線維芽細胞を利用した方法について検討した。

現在、多くの遺伝性疾患、難治性疾患の治療戦略として、iPS細胞による初期

化を利用する方法が世界中で広く研究されている[11-14]。iPS 細胞は永久に増殖可能であり、治療に使用するために十分な量の細胞を確保できるというメリットがある[15]。しかしながら、同時にそれは不死化を意味し、培養中あるいは体内で癌化する可能性がある。すなわち、iPS 細胞によるリプログラミングの利点、欠点は表裏一体の関係にある。1987 年に筋分化調節因子である MyoD 遺伝子を線維芽細胞へ導入し、筋芽細胞に分化させるといった方法が始まり[16]、現在では iPS 細胞を経由し、利用した方法を「インダイレクト・リプログラミング法」と呼ぶのに対して、その方法は、分化細胞である皮膚線維芽細胞に直接別の形質導入をする「ダイレクト・リプログラミング法」と呼ばれている。すなわち、A 細胞→iPS 細胞→B 細胞をインダイレクト・リプログラミング、A 細胞→B 細胞をダイレクト・リプログラミングと呼ぶ。本研究ではこのダイレクト・リプログラミング法による分化誘導法を検討した。

さらに、ウイルスベクターによる遺伝子導入は導入持続期間で大きく分類すると持続発現型と一過性発現型の二つに分けられ、その特徴はそれぞれのウイルスベクターのメリットでありデメリットでもある。持続発現型のウイルスベクターでは、長期間遺伝子を発現させたい場合、一旦遺伝子導入すれば発現が継続することが利点となる。しかし、同時にこのことは染色体に導入された遺伝子がランダムに染色体に組み込まれることがほとんどであるため、他領域の遺伝子発現に影響を与えたり、癌化したりする可能性がある点が欠点となる。一過性発現型の場合、遺伝子を継続して発現させたい場合は、繰り返しの投与が必要となり弱点となる。一方で、導入遺伝子が染色体に取り込まれることがないため発がん性などの遺伝子に関連する安全性が高い点は利点である。本研

究で用いたアデノウイルスベクターは、発現効率が非常に高いが遺伝子発現は一過性型であるという特徴をもつベクターである。筋肉組織の発生・分化過程においても MyoD 発現自体が一過性であり、皮膚線維芽細胞から筋分化を誘導するのには MyoD 遺伝子の発現は一過性で充分可能であり、アデノウイルスベクターを用いて MyoD 遺伝子を皮膚線維芽細胞に導入すると形態学的に筋芽細胞から筋管を形成することを、我々は過去に報告している[17]。

本研究ではアデノウイルスベクターAd.CAG-mMyoD によって筋分化誘導された細胞の筋としての特性について報告する。骨格筋は収縮することで、動物の体の動きをコントロールする器官であるが、1) 作成した細胞が実際に筋として収縮能を獲得しているのか、2) また、その収縮をコントロールするためのカルシウムイオンの放出が細胞内で認められるのか、を機能的側面から検討した。さらに、移植する際、筋肉組織の特性として単核筋芽細胞同士の融合の結果の多核細胞となるため、ドナーの細胞がホストの筋組織と融合することが必要であり、融合によりジストロフィン遺伝子が供給されるのでダイレクト・リプログラミング法により分化誘導した細胞が、3) 遊走し、ホストの筋芽細胞に融合するのかについて評価した。

## 第2章 略語一覧

DMD: Duchenne muscular dystrophy; デュシェンヌ型筋ジストロフィー

iPS 細胞: induced pluripotent stem cells; 人工多能性幹細胞

Ad.CAG-mMyoD: CAG プロモーター搭載マウス MyoD 発現組換えアデノウイルスベクター

DAPC: dystrophin-associated glycoprotein complex

$\beta$ DG:  $\beta$ -Dystroglycan

$\alpha$ DG:  $\alpha$ -Dystroglycan

bHLH: basic helix-loop-helix

CAR: coxsackie-adenovirus receptor

EGFP: enhanced green fluorescent protein; 緑色蛍光蛋白質

ires: internal ribosome entry site

cMyoD-ires-EGFP: MyoD および EGFP 共発現組換えコスミド

cMyoD-ires-Cherry: MyoD および Cherry 共発現組換えコスミド

cCherry: Cherry 発現組換えコスミド

Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP: CAG プロモーター搭載マウス MyoD および EGFP 共発現組換えアデノウイルスベクター

Ad.CAG-EGFP: CAG プロモーター搭載 EGFP 発現組換えアデノウイルスベクター

Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry: CAG プロモーター搭載マウス MyoD および Cherry 共発現組換えアデノウイルスベクター



Ad.CAG-Cherry: CAG プロモーター搭載 Cherry 発現組換えアデノウイルスベクター

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

CPE: cytopathic effect; 細胞変性効果

rpm: round per minutes; 毎分回転数

TCID<sub>50</sub>: 50% Tissue Culture Infectious Dose

PFU: plaque-formation unit; プラーク形成単位

FBS: fatal bovine serum; ウシ胎仔血清

MOI: multiplicity of infection; 感染多重度

PBS: phosphate-buffered saline; リン酸緩衝生理食塩水

hCK-M: human creatin kinase muscle isoform

MHC: Myosin Heavy Chain; ミオシン重鎖

IP<sub>3</sub>: inositol trisphosphate; イノシトール三リン酸

ATP: adenosine triphosphate

4-CEP: 4-Chloro-3-ethylphenol

4-CmC: 4-Chloro-m-cresol

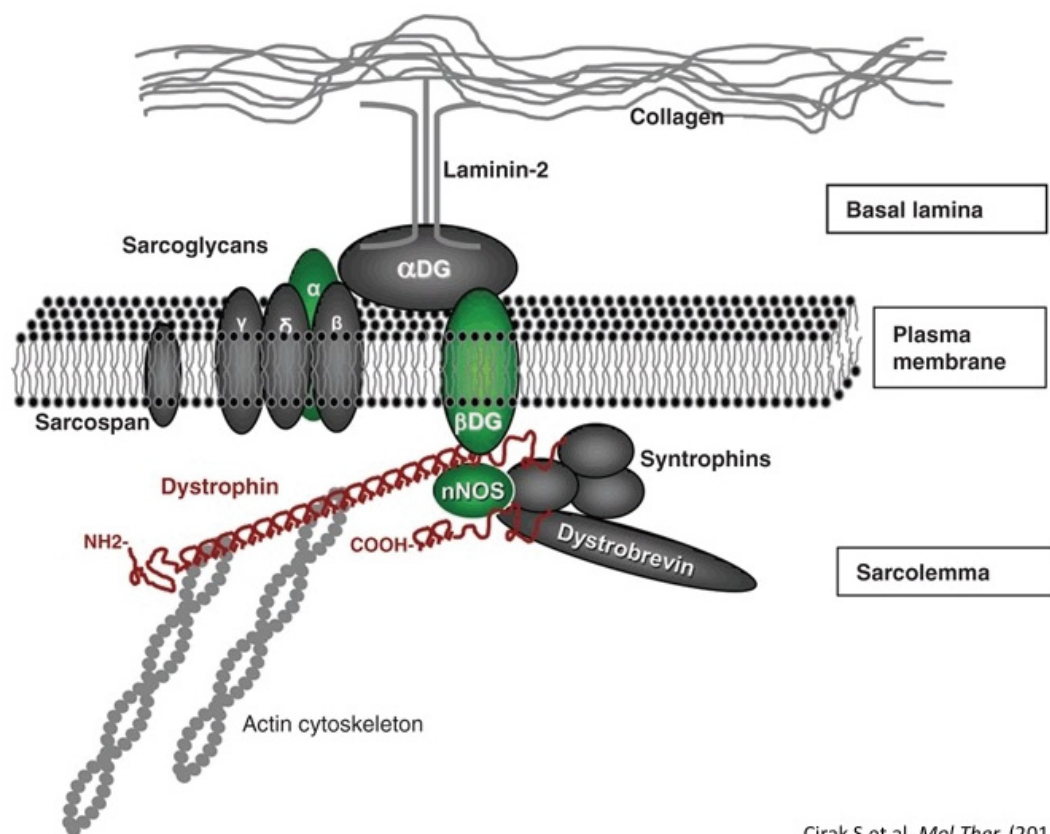
## 第3章 研究の背景

### 第1節 デュシェンヌ型筋ジストロフィー

筋ジストロフィー (muscular dystrophy) とは「筋線維の壊死を主病変とし、進行性の筋力低下をみる遺伝子疾患である」と定義されている。遺伝形式や臨床症状により分類され、その中で最も頻度が高く、重症な疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) である。出生男児 3500～6000 人当たり 1 人の割合で発症する[18, 19]。X 染色体劣性遺伝病で、細胞膜の安定化に関わっているジストロフィン蛋白質をコードする遺伝子 (ジストロフィン遺伝子) の異常が原因である[1]。乳幼児期の運動発達が遅れ、3～4 歳頃より走れない、転びやすい、階段を登れないという症状で気づかれることが多く、次第に筋力が低下していく疾患である。床から立ち上がる際は、床に手をつき、臀部を高く上げ、手を両足に交互につきながら立ち上がる登攀性起立 (Gowers 徴候) が見られる。さらに筋力低下が進行すると、自力での歩行が困難となり、10 歳前後で車椅子生活となる。運動機能の低下により、関節拘縮や側弯が出現する。発症の時期や進行のスピードには個人差があるが、呼吸機能、心機能の低下等により、最終的には死に至る疾患である[20]。筋力を回復させるための様々な治療法に関する研究が試みられているが、現在、根本的治療法は無い。

## 第2節 ジストロフィン

1986年、植物遺伝学者 Kunkel らは DMD 遺伝子を発見し、ジストロフィンと命名した[21]。DMD 遺伝子は X 染色体短腕 (Xp21) にあり、79 のエクソンからなるヒトの遺伝子の中で最も大きな遺伝子である[22]。この遺伝子は分子量 427 kDa[23]のジストロフィン蛋白質をコードする。ジストロフィンは筋細胞膜直下に存在する棒状の蛋白質で、細胞膜の安定化に寄与している。ジストロフィンは、ジストロフィン、 $\beta$  ジストログリカン ( $\beta$ DG)、 $\alpha$  ジストログリカン ( $\alpha$ DG) からなるジストロフィン軸と呼ばれる蛋白質複合体を構成し、これを支えるサルコグリカン複合体とともに、筋線維膜を裏打ちする蛋白質である (図 1)。ジストロフィンは主に 4 つのユニットから構成されており、アクチン結合ドメインの  $\text{NH}_2$  末端、中心ロッドドメイン、 $\beta$  ジストログリカン結合部位のシステインリッチドメイン、シントロフィンおよびジストロブレビン結合部位である  $\text{COOH}$  末端ドメインの 4 つのドメインからなる[2, 22]。この基底膜と細胞骨格とを連結するジストロフィン関連-糖蛋白質複合体の存在が、筋の伸展、収縮における刺激に耐えうる筋細胞膜の強度を維持するために、重要であると考えられている。



Cirak S et al. *Mol Ther.* (2012)

図 1. ジストロフィン関連-糖蛋白質複合体

ジストロフィン関連-糖蛋白質複合体（DAPC）の模式図を示す。DAPC は基底膜と細胞骨格を連結している。

$\alpha$ DG ;  $\alpha$  ジストログリカン,  $\beta$ DG ;  $\beta$  ジストログリカン, nNOS ; 神経性一酸化窒素合成酵素

### 第3節            MyoD

1979年、Taylor と Jones は 10T1/2 細胞を 5-アザシチジン処理して DNA のメチル化を阻害すると筋芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞に誘導されることを発見した[24]。この結果より、Weintraub らは 5-アザシチジン処理により脱メチル化された遺伝子のうち 1 つあるいはほんの少数の遺伝子が 10T1/2 細胞から筋芽細胞への分化を調節していると仮説を立てた。この仮説に基づき候補となる遺伝子を選定し、一つずつ 10T1/2 細胞へ形質導入したところ、ある遺伝子を導入した時に、10T1/2 細胞が安定的に筋芽細胞に分化誘導されることを発見した[16]。それが現在、骨格筋分化を調節するマスター遺伝子として知られている MyoD である。

MyoD は bHLH (basic helix-loop-helix) 構造を持つ転写因子で、塩基性の DNA 結合領域と二量体形成に必要な HLH 領域で構成される[25]。bHLH 転写因子である E 蛋白質と HLH 領域を介して二量体を形成した後、塩基性アミノ酸領域を介して DNA 上の遺伝子群の制御領域である E ボックス配列に結合して、下流の遺伝子発現を制御する。MyoD は一旦遺伝子が活性化されると、ポジティブフィードバックにより MyoD 蛋白質が増加し続け、筋分化を誘導する。一方で、Id は現在 4 種類が知られている分化抑制因子であり、bHLH モチーフを持つ転写因子の機能阻害因子である[26]。HLH モチーフを持つ Id は、bHLH 型転写因子と二量体を形成するが、DNA の結合に必要な塩基性アミノ酸に富む領域が無いため、Id を含む二量体は DNA に結合できない。Id と E 蛋白質の結合能は高く、Id の共存下では組織特異的な bHLH 型転写因子と E 蛋白質が二量体を形成できなくなってしまう、結果的に組織特異的な

bHLH 型転写因子が関わる細胞分化が阻害されることになる。そこで問題となるのが、Id の存在である。筋分化を誘導するためには、その Id の存在を凌駕するだけの MyoD を発現させることが必要となる。

#### 第4節 組換えアデノウイルスベクター

アデノウイルスは 1953 年に Rowe らによって発見された。2 本鎖 DNA をウイルスゲノムとして持ち、直径 80~110 nm のエンベロープを持たないウイルスである[27]。252 個の蛋白質から構成される正二十面体構造のカプシドで、各頂点 12 ヶ所にはペントンと呼ばれる蛋白質複合体が存在する。ペントンはペントンベースとファイバーから成る。ウイルス粒子から突出しているファイバー蛋白質の先端のノブ領域が細胞表面のレセプター (coxsackie-adenovirus receptor (CAR)) に吸着し、細胞表面のインテグリンとペントンベース部分が結合し細胞内に侵入し感染する[28, 29]。人に感染するアデノウイルスは現在 50 種類ほどが知られており、ウイルスベクターとして利用されているのは主にヒトアデノウイルス 5 型由来のもので、E1 および E3 領域が欠失されている。E1 領域は増殖に関わる遺伝子で、欠失していることで、通常の細胞では増殖できず、E1 遺伝子が持続的に発現している 293 細胞 (ヒト胎児腎細胞樹立株) でのみ増殖可能である。293 細胞内で増殖させた組換えアデノウイルスベクターは遠心による濃縮が可能であり、高力価のウイルス液を簡便に調製することができる。また、高い遺伝子導入効率を示し、導入できる細胞種も広く、増殖細胞のみならず静止期の細胞への遺伝子導入が可能であり、

遺伝子治療の分野において広く用いられる組換えウイルスベクターである。

さらに、染色体へ取り込まれることが無く、遺伝子発現は一過性であるため安全性が高いとされている。

## 第4章 組換えアデノウイルスベクター作製

### 第1節 序

遺伝子導入法として、強力な遺伝子導入効率を示す組換えアデノウイルスベクターを利用することとした。筋分化調節因子である MyoD 遺伝子を組み込んだ組換えアデノウイルスベクターを作製した。また、導入された MyoD 遺伝子を蛍光顕微鏡下に視覚的に確認するために、緑色蛍光蛋白質または赤色蛍光蛋白質をコードする遺伝子、EGFP または Cherry を共発現する組換えアデノウイルスベクターを作製した。2 種類の遺伝子を共発現させるために internal ribosome entry site (ires) 配列を利用し、CAG プロモーターの下流および ires 配列の下流にそれぞれの遺伝子を組み込んだ。組換えアデノウイルスベクターは主となるベクター Ad.CAG-mMyoD、EGFP あるいは Cherry を共発現させるベクター Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP、Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry、そのコントロールベクターである Ad.CAG-EGFP、Ad.CAG-Cherry の 5 種類のコンストラクトで作製した (図 2)。Ad.CAG-mMyoD および Ad.CAG-EGFP は以前報告したものを使用した[17, 30]。これらの発現遺伝子はヒトアデノウイルス 5 型の E1, E3 領域を欠損させたベクターの E1 領域に組み込んだ。その後、それぞれのベクターは 293 細胞中で増殖させ、塩化セシウム濃度勾配法[31]にて精製・濃縮した。



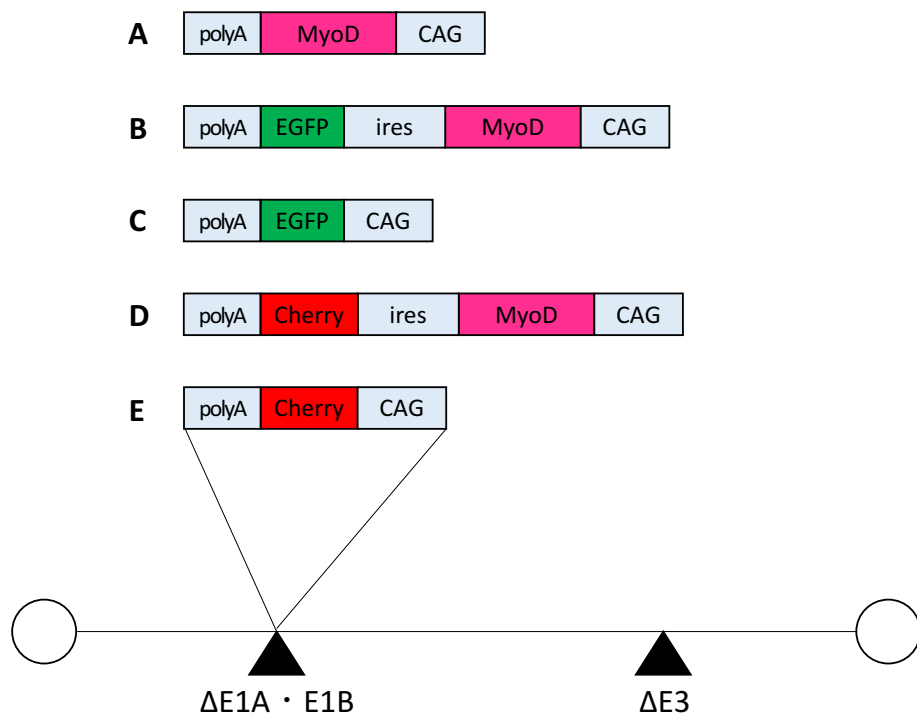


図 2. 組換えアデノウイルスベクターのコンストラクト

- (A) Ad.CAG-mMyoD
- (B) Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP
- (C) Ad.CAG-EGFP
- (D) Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry
- (E) Ad.CAG-Cherry

## 第2節 実験方法

### 第1項 組換えコスミドの作製

#### ① cMyoD-ires-EGFP

プラスミドベクターpEB6SRGFPを制限酵素EcoR I（タカラバイオ，東京，日本）で処理後、切断した末端をKlenow（タカラバイオ，東京，日本）処理にて平滑化した。別のプラスミドベクターpCAG-ires-Cherryよりires配列を制限酵素EcoRV（ロシュ・ダイアグノスティックス，東京，日本）およびSma I（タカラバイオ，東京，日本）で切り出し、前述の平滑化したサイトにires配列を挿入し、pires-EGFPを作製した。さらに、pCAG-MyoDよりEcoR I処理によりMyoDを切り出し、pires-EGFPのEcoR Iサイトに挿入し、pMyoD-ires-EGFPとした。その後、pMyoD-ires-EGFPよりMyoD-ires-EGFPフラグメントを制限酵素Not I（タカラバイオ，東京，日本）処理にて切り出し、切断した末端をKlenow処理にて平滑化したものをpAxCawit（Adenovirus Expression Vector Kit）のSmi I（タカラバイオ，東京，日本）サイトに挿入した（図3）。

#### ② cMyoD-ires-Cherry

cMyoD-ires-EGFPを制限酵素EcoR IおよびBamH I（タカラバイオ，東京，日本）で処理し、MyoDフラグメントを切り出し、pMXs-MRF4-ires-CherryのEcoR I ,BamH I処理したサイトに挿入し、pMyoD-MRF4-ires-Cherryとした。さらに、pMyoD-MRF4-ires-CherryよりEcoR I ,Xho I（タカラバイオ，東京，日本）処理でMRF4フラグメントを切り出し、EcoR IサイトとXho I

サイトを Klenow 処理した上で平滑末端同士を連結させ、pMyoD-ires-Cherry とした。その後、pMyoD-ires-Cherry より MyoD-ires-Cherry フラグメントを制限酵素 BamH I および Sal I (タカラバイオ, 東京, 日本) にて切り出し、Mungbean (タカラバイオ, 東京, 日本) 処理にて末端を平滑化したものを pAxCAwit の Sma I サイトに挿入し cMyoD-ires-Cherry とした (図 4)。

### ③cCherry

pCAG-ires-Cherry より制限酵素 BamH I にて Cherry 配列を切り出し、pGEM-11zf の BamH I サイトに組み込んだ pCherry とした。その後、p11zf-Cherry より Cherry フラグメントを制限酵素 Sca I (タカラバイオ, 東京, 日本) と HindIII (タカラバイオ, 東京, 日本) で切り出し、Mungbean 処理にて末端を平滑化したものを pAxCAwit の Sma I サイトに挿入し cCherry とした (図 5)。

すべての過程における制限酵素処理は 37℃ブロックインキュベーターにて 1 時間～オーバーナイト静置することで、プラスミドおよびコスミドを切断した。また、各ステップで制限酵素処理したフラグメントは、1% アガロースゲル電気泳動にて分離した。分離後、必要フラグメント部分のバンドをゲルごと切り出し、GENECLEAN® III Kit (MP Biomedicals, 東京, 日本) を使用して、ゲルから DNA を抽出した。DNA の精製はフェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿にて行った。突出末端を平滑末端にする必要のあるものについては、その後のステップで Klenow 処理および Mungbean 処理を行い、DNA Ligation Kit (Mighty Mix) (タカラバイオ, 東京, 日本) を使用して DNA を連結させた。

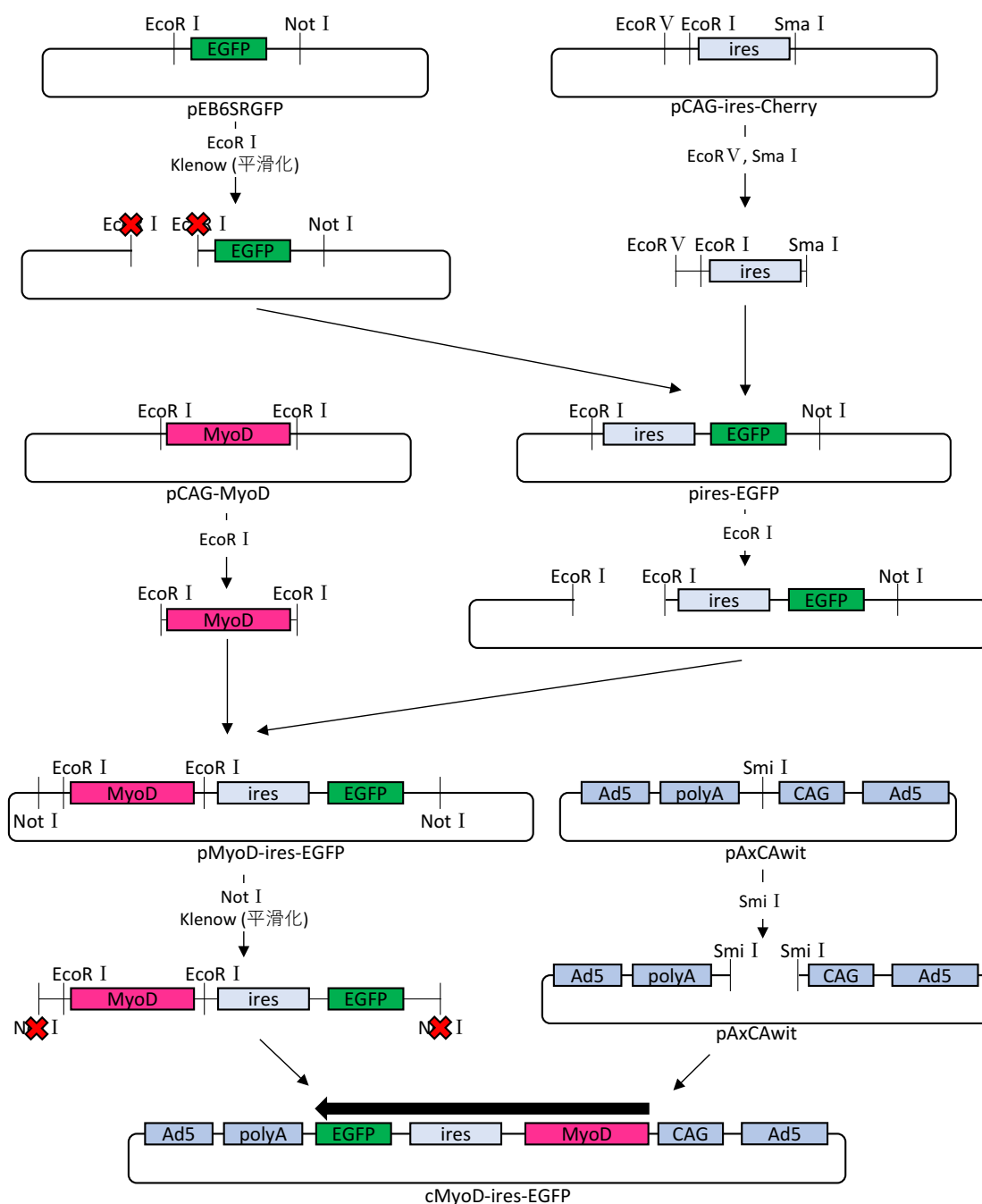


図 3. cMyoD-ires-EGFP の作製

cMyoD-ires-EGFP 作製のためのコンストラクト組み換え手順の概略を示す。pCAG-ires-Cherry より ires 配列を切り出し、pEB6SRGFP に組み込むことで、pires-EGFP を作製した。このプラスミドに pCAG-MyoD より切り出した MyoD 配列を組み込むことで pMyoD-ires-EGFP を作製した。さらに MyoD-ires-EGFP 配列を、アデノウイルスゲノムをもつコスミドベクターに組み込み cMyoD-ires-EGFP とした。

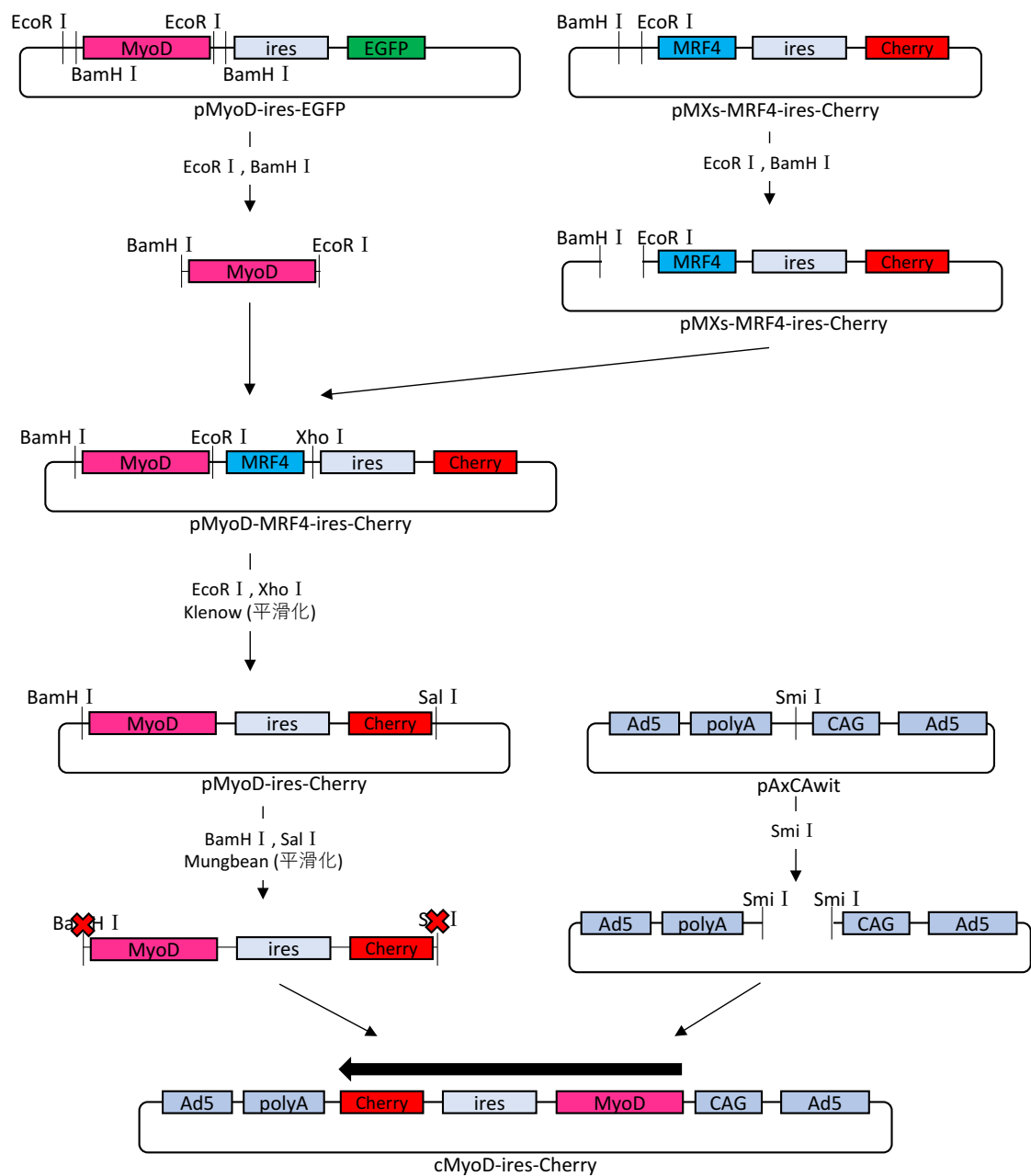


図 4. cMyoD-ires-Cherry の作製

cMyoD-ires-Cherry 作製のためのコンストラクト組み換え手順の概略を示す。

pMyoD-ires-EGFP より MyoD 配列を切り出し、pMXs-MRF4-ires-Cherry に組み込み pMyoD-MRF4-ires-Cherry を作製した。その後、MRF4 配列を取り除き連結させたものを pMyoD-ires-Cherry とした。pMyoD-ires-Cherry から MyoD-ires-Cherry 配列を切り出し、アデノウイルスゲノムをもつコスミドベクターに組み込み、cMyoD-ires-Cherry とした。

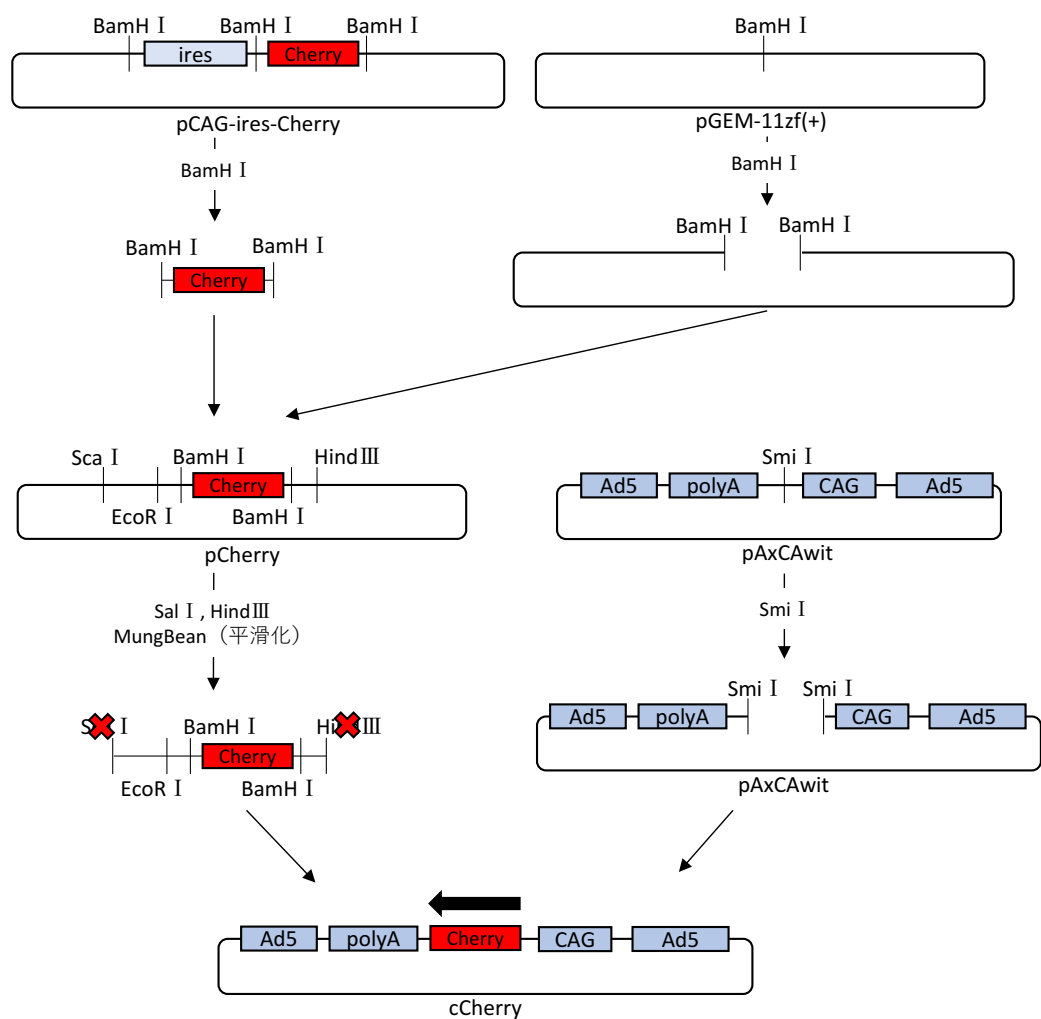


図 5. cCherry の作製

cCherry 作製のためのコンストラクト組み換え手順の概略を示す。pCAG-ires-Cherry より切り出した Cherry 配列を pGEM-11zf (+) に組み込み、pCherry とした。pCherry より切り出した Cherry 配列を、アデノウイルスゲノムをもつコスミドベクターに組み込み、cCherry とした。

## 第2項 1次ウイルス液の作製

細胞培養用の培養液は DMEM (High Glucose) (和光純薬工業, 大阪, 日本) にペニシリン／ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, 東京, 日本) 100U/mL、1% GlutaMax supplement (Invitrogen, 東京, 日本) を添加し、FBS は最終濃度が 10% となるように加えた (10% FBS-DMEM)。293 細胞 (ATCC, Manassas, USA) は 10% FBS-DMEM 中で 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。293 細胞は 6 cm ディッシュに 100%コンフルエントとなるように 2 枚用意した。作製した組換えコスミドは制限酵素 BspT I (タカラバイオ, 東京, 日本) 処理した後、フェノール抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製し、Hily Max (同仁化学, 熊本, 日本) を用いて 6 cm ディッシュに準備した 293 細胞 1 枚にトランスフェクションを行い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、細胞内で組換えアデノウイルスベクターを増殖させた (図 6)。翌日、トランスフェクションした 293 細胞とトランスフェクションしていない 293 細胞を剥がし、それぞれ 11 mL の 10% FBS-DMEM に懸濁した。2 つの懸濁液を利用し、トランスフェクションした細胞懸濁液の原液と 10 倍希釈液を調製した。原液と 10 倍希釈液を 2 枚のコラーゲンコート 96 ウェルプレートに 100  $\mu$ L/ウェルですべてのウェルに播種し、培養した。5 日後、10 日後にはすべてのウェルに 10% FBS-DMEM を 50  $\mu$ L ずつ添加した。7～15 日後に CPE (細胞変性効果) を起こした細胞を培養液ごと回収した。回収した細胞液は凍結融解を繰り返し、4°C、5000 rpm、5 分遠心し、上清を 1 次ウイルス液とした。

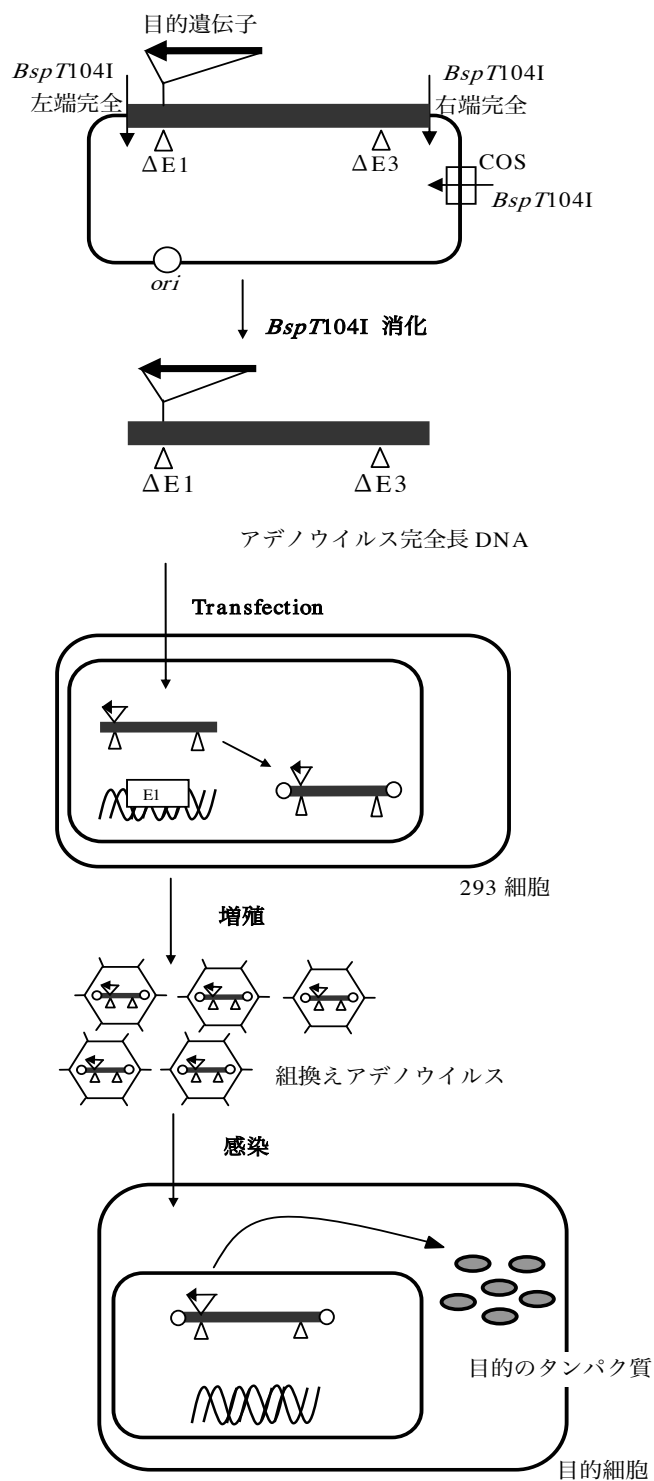


図 6. 組換えアデノウイルスベクター作製

組換えアデノウイルスベクター作製の原理を示す。制限酵素処理した組換えコスミドを 293 細胞にトランスフェクションすることで、細胞内で組換えアデノウイルスベクターを作製し、増殖させる。(Adenovirus Expression Vector Kit (Dual Version) プロトコル参照)



### 第3項      2次ウイルス液の作製

293 細胞および HeLa 細胞は 10% FBS-DMEM 中で 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。1 次ウイルス液 10 μL を 70～100%コンフルエントまで培養した 24 プレーットの 293 細胞および HeLa 細胞に 5% FBS-DMEM 100 μL と共に添加し、15 分ごとにウイルス溶液を細胞全体に行き渡るようにプレートを傾けながら、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。1 時間の感染後、5% FBS-DMEM を 500 μL 添加し、培養を継続した。3 日後、HeLa 細胞では CPE を起こさず、293 細胞で CPE を起こしたクローンの 293 細胞を培養液ごと回収し、凍結融解を 6 回行い、4℃、5000 rpm、5 分遠心し、上清を 2 次ウイルス液とした。

### 第4項      3次ウイルス液の作製

2 次ウイルス液 100 μL を、15 cm ディッシュに 70～100%コンフルエントまで培養した 293 細胞に 5% FBS-DMEM 5 mL と共に添加し、15 分ごとにウイルス溶液を細胞全体に行き渡るようにプレートを傾けながら、37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。1 時間の感染後、5% FBS-DMEM を 15 mL 添加し、培養を継続した。3 日後、すべての 293 細胞が CPE を起こしているのを確認し、細胞を培養液ごと回収し、凍結融解を 6 回行い、4℃、3000 rpm、10 分遠心し、上清を 3 次ウイルス液とした。

## 第5項 組換えウイルスベクターの精製

組換えアデノウイルスベクター3次ウイルス 50  $\mu$ L を 293 細胞に感染させ、3 日後完全に CPE が起こった後に培養液ごと細胞を全て回収した。その後、凍結・融解を 6 回繰り返して細胞を破壊し、細胞内で増殖した組換えウイルスベクターを培養液中に放出させた。4°C、3000 rpm、15 分遠心し、その上清を以降の検討に用いた。超遠心用チューブに 4.0 M, 2.2 M の塩化セシウム-10 mM HEPES (ナカライテスク, 京都, 日本) 溶液 (pH 7.4)、ウイルスサンプルの順に重層し、4°C、25000 rpm、120 分遠心 (Beckman SW28 rotor) し、ウイルスバンドを 5 mL シリンジ、21G 針を用いて回収した。さらに、抽出したウイルスサンプルと飽和塩化セシウム-10 mM HEPES 溶液の混合液、4.0 M, 2.2 M の塩化セシウム-10 mM HEPES 溶液 (pH 7.4) を新しい超遠心用チューブに重層し、4°C、35000 rpm、180 分、遠心 (Beckman SW41 rotor) し、ウイルスバンドを 5 mL シリンジ、21G 針で回収した[31]。回収して得られたウイルス溶液は透析チューブに移し (18G 針を使用) 一晩かけて透析 (透析液は 1 M HEPES 50 mL, 0.5 M EDTA (ナカライテスク, 京都, 日本) 10 mL, Glycerol (ナカライテスク, 京都, 日本) 50 mL を混合し、H<sub>2</sub>O にて全量を 5 L とした) を行った。

## 第6項 ウイルス力価の測定

精製した組換えアデノウイルスベクター溶液を 5% FBS-DMEM で 10 倍ずつ段階希釈し、10<sup>4</sup> 倍希釈溶液を調製した。96 ウェルプレートの全ウェル

に 5% FBS-DMEM を 50  $\mu$ L ずつ添加し、1 列目のウェルに  $10^4$  希釈した組換えアデノウイルスベクター溶液を 25  $\mu$ L ずつ添加した。次に、ピペッティングにて混合した 1 列目の溶液 25  $\mu$ L を 2 列目のウェルに移し、溶液を混合した 2 列目の溶液 25  $\mu$ L を 3 列目のウェルに移した。この操作を 11 列目のウェルまで繰り返し、11 列目の混合液 25  $\mu$ L は廃棄した。12 列目のウェルは非感染細胞のコントロールとした。その後、6 cm ディッシュにコンフルエント状態の 293 細胞を剥がし、チューブに集め、6 mL の 5% FBS-DMEM にて懸濁した細胞溶液を各ウェルに 50  $\mu$ L 添加した。4, 7 日後には、各ウェルに 50  $\mu$ L の 10% FBS-DMEM を添加し、11~13 日目に細胞変性の終末点を判定した。判定結果より、以下の Karber の式を用いて TCID<sub>50</sub> を算出した。本法で求める TCID<sub>50</sub> はプラーク法で求めた PFU の値と一致するため TCID<sub>50</sub>=PFU として、算出した値をウイルス容量で割ることで力価 (PFU/mL) とした。

Karber の式:  $TCID_{50} = (1 \text{ 列目の希釈倍率}) \times (\text{希釈倍率})^{\Sigma-0.5}$

### 第 3 節 結果

作製および精製した組換えアデノウイルスベクターの力価は表 1 に示す。すべての組換えウイルスベクターにおいて、 $10^9$  PFU/mL レベルの高い力価のウイルス液が得られた (表 1)。

表 1. 組換えアデノウイルスベクターの力価

Adenovirus vector	Titer
Ad.CAG-mMyoD	$1.0 \times 10^9$ PFU/mL
Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP	$1.0 \times 10^9$ PFU/mL
Ad.CAG-EGFP	$1.0 \times 10^9$ PFU/mL
Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry	$2.5 \times 10^9$ PFU/mL
Ad.CAG-Cherry	$1.0 \times 10^9$ PFU/mL

## 第5章 筋分化マーカーの発現確認

### 第1節 序

皮膚線維芽細胞から筋への分化を評価するために、ヒト皮膚線維芽細胞へ Ad.CAG-mMyoD 感染後の筋特異的遺伝子発現について RT-PCR 法を用いて確認した。組換えアデノウイルスベクター感染後 2 日目、分化誘導のために培養液を分化誘導培養液 (2% FBS-DMEM) に変更した日を 0 日目とし、-2 (非感染細胞), 0, 3, 5, 8, 12 日目に行った (図 7)。

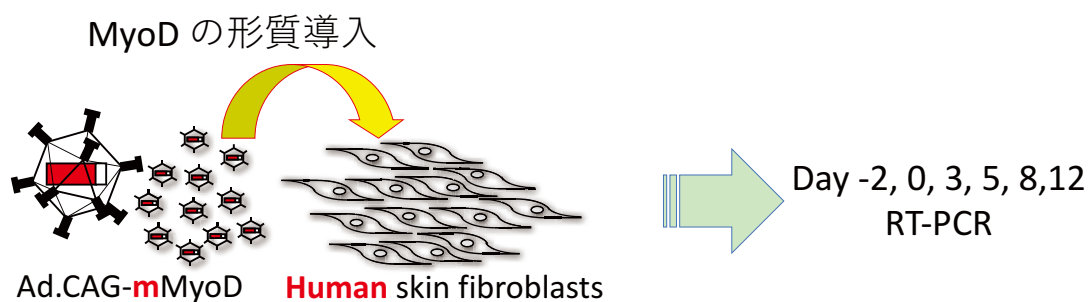


図 7. 筋分化マーカーの確認

筋分化マーカー確認の手順の概略を示す。Ad.CAG-mMyoD 感染皮膚線維芽細胞より RNA を抽出し、逆転写、PCR にて筋特異的遺伝子発現を確認した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞は Cell System Corporation (Kirkland, WA, USA) より入手した。細胞は 10% FBS-DMEM 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 第2項 細胞の播種

組換えアデノウイルスベクター感染の前日に、100 倍希釈 Matrigel 溶液でコーティングした 12 ウェルプレートに、ヒト皮膚線維芽細胞を  $2 \times 10^5$  個/ウェルで播種した。

### 第3項 組換えウイルスベクターの感染

組換えアデノウイルスベクターは MOI (Multiplicity of infection) 30 にて 2% FBS-DMEM 200  $\mu$ L 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間感染させた。1 時間の感染中、15 分ごとにプレートを傾け、ウイルス溶液が細胞全体に行き渡るようにした。1 時間の感染後、新しい 2% FBS-DMEM を加え 1 mL とし、さらに 3 時間後、10% FBS-DMEM 1 mL で培養液を交換し、2 日間培養した。その後、培養液を分化誘導培養液 1 mL に交換した (0 日目)。

### 第4項 RNA 抽出

RNA の抽出は分化誘導培養液に変更した日を 0 日目とし、-2, 0, 3, 5, 8, 12 日目に行った。抽出には NucleoSpin<sup>®</sup> RNA (タカラバイオ, 東京, 日本) を

用いて、添付のプロトコルに従い行った。

## 第5項            RT-PCR

抽出した RNA は PrimeScript<sup>TM</sup> reagent Kit (Perfect Real Time) (タカラバイオ, 東京, 日本) を使用して逆転写し、cDNA を得た。PCR は Takara Ex Taq<sup>®</sup> (タカラバイオ, 東京, 日本) を用いた。反応条件は 94°C 2 分 (熱変性) の後、94°C 30 秒 (熱変性)、それぞれのアニーリング温度 30 秒 (アニーリング)、72°C 1 分 (伸長反応) の 3 ステップを 30 サイクル、72°C 10 分 (伸長反応)、4°C (冷却) で行った。使用したプライマーの情報は表 2 に示した。内部コントロールとして、h $\beta$ -actin を使用した。

表 2. PCR に使用したプライマー

Gene name	Number Cycle	Ann. Temp.	Sequence
h $\beta$ -actin	30	55	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT CACCTTCACCGTTCCAGTTT
mMyoD	30	55	CTTCTATGACCCGTGTTTCGAC CTGGGTTCCTGTTCTGTGT
hMyoD	30	61	CACTCCGGTCCCAAATGTAG TTCCCTGTAGCACACACAC
hCK-M	30	55	ACATGGCCAAGGTACTGACC TGATGGGGTCAAAGAGTTCC
hMyogenin	30	64	TAAGGTGTGTAAGGGAAGTCG CCACAGACACATCTTCCACTGT
hMHC	30	61	CTGCTGAAGGAGAGGGAGCT TGATTAGCTGGTCACACCTT
hDystrophin	30	61	GATGCACGAATGGATGACAC TGTGCTACAGGTGGAGCTTG
hMyomaker	30	61	GAAGGAGAAGAAGGGCCTGT CCTTCTTGTTGACCTTGGGC



### 第3節 結果

筋分化を評価するために、Ad.CAG-mMyoD 感染後、培養液を分化誘導培養液に変更した日を 0 日目とし、-2, 0, 3, 5, 8, 12 日目の筋特異的遺伝子発現を RT-PCR にて確認した (図 8)。マウス遺伝子 (m) を外因性遺伝子、ヒト遺伝子 (h) を内因性遺伝子の指標とし評価した。-2 日目は組換えアデノウイルスベクター感染直前、0 日目は分化誘導培養液に変更する直前の検体の遺伝子発現を検討した。図 8 で見られるように、mMyoD は mMyoD 遺伝子導入後、速やかに発現が認められ、組換えアデノウイルスベクターを利用した遺伝子導入が問題なく行われていることを確認した。h $\beta$ -actin は内部コントロールとして使用しており、非感染ヒト皮膚線維芽細胞 (-2 日目)、Ad.CAG-mMyoD 感染ヒト皮膚線維芽細胞分化誘導後 0, 3, 5, 8, 12 日目の全ての細胞において発現を確認した。筋分化マーカーには一般的に使用されている筋特異的遺伝子を使用した[32, 33]。ヒト内部筋特異的分化調節因子である hMyoD は、外部から導入されたマウス遺伝子である mMyoD 発現より少し遅れて、3 日目以降に発現が確認された。また、MyoD 同様に筋分化調節因子 MyoD ファミリーの 1 種である hMyogenin[34, 35]は 5 日目以降に発現が認められた。hMyomaker は筋芽細胞の融合の際に発現する因子であるが[36, 37]、この遺伝子も 3 日目以降に発現することが確認できた。これらの結果より、外因性 mMyoD のヒト皮膚線維芽細胞への強制発現により、筋分化の過程を調節する複数の内因性の因子が誘導されたことが示唆された。さらに、hCK-M [38], hMHC [39], hDystrophin [1, 40, 41]も 3 日目あるいは 5 日目以降より発現が確認されており、外因性 MyoD 導入により、骨格筋の構成因子がもたらさ

れた。以上の種々の遺伝子発現実験結果より、Ad.CAG-mMyoDにより強制的にマウス MyoD 遺伝子を導入したヒト皮膚線維芽細胞には内因性の様々な筋特異的調節遺伝子が誘導され、それに次いで構造遺伝子発現が認められ、筋細胞への形質転換を示唆した。

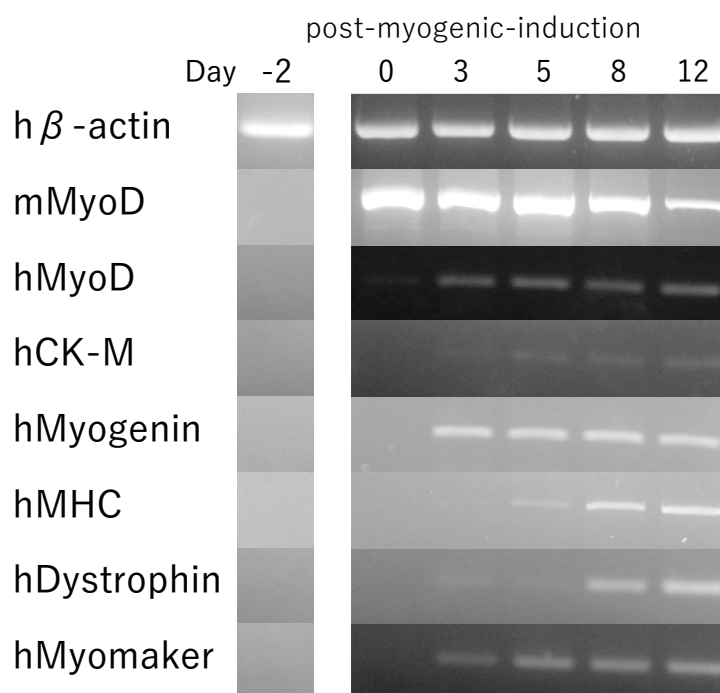


図 8. Ad.CAG-MyoD 感染皮膚線維芽細胞における筋分化マーカー

Ad.CAG-MyoD 感染皮膚線維芽細胞における経過日数と筋分化マーカーの発現を示す。筋分化誘導後、-2, 0, 3, 5, 8, 12 日目の RT-PCR による分析結果を示す。

CK-M ; creatin kinase muscle isoform, MHC ; myosin heavy chain

## 第6章 電気刺激による収縮能の検討

### 第1節 序

筋の最も重要なはたらきの一つに筋収縮がある。筋収縮を調節する因子にカルシウムイオンが知られており、カルシウムイオンは主に筋小胞体に蓄えられている。筋小胞体は筋線維の内側を取り囲むように発達している袋状の器官で、横行小管（T 管）と接して存在する。筋小胞体からカルシウムイオンを放出する受容体は主にリアノジン受容体[42, 43]が知られており、筋細胞の活動電位が T 管を通して筋小胞体に伝わると、筋小胞体からカルシウムイオンが放出され、細胞内のカルシウムイオン濃度が高まる。そのカルシウムイオンがトロポニンと結合すると、アクチンとミオシンの結合を阻害していたトロポミオシンがずれ、アクチン上のミオシン結合部位が露出する。そこへミオシンが結合し、アクチンとミオシンによる滑り込みにより収縮が起こる[44]。筋の重要な働きである収縮能が、MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞で獲得できるのかを評価するため、細胞に電気刺激を加え、経過観察した（図 9）。観察した細胞は Ad.CAG-mMyoD 感染細胞およびコントロール細胞としてマウス筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。

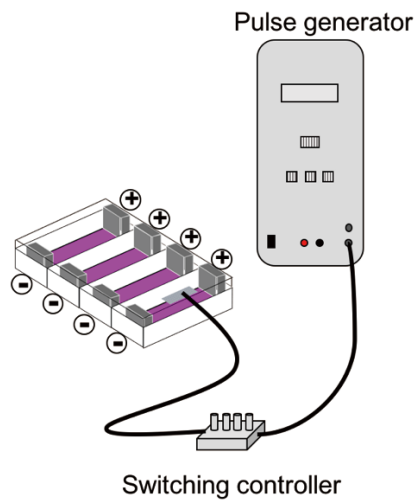


図 9. 電気刺激実験の概略図

電気刺激実験の概略図を示す。パルス発生装置、スイッチ切り替えコントローラー、MyoD 導入皮膚線維芽細胞を培養したディッシュを連結した状態で顕微鏡にセッティングし、電気刺激を加えた時の細胞を観察した。

## 第2節 実験方法

### 第1項 細胞培養

第5章-第2節-第1項参照。

マウス筋芽細胞である C2C12 細胞 (ATCC, Manassas, USA) も同様の方法にて培養した。

### 第2項 細胞播種

組換えアデノウイルスベクター感染の前日に、Matrigel<sup>®</sup> (Corning, 東京, 日本) でコーティングした 4 ウェル C ディッシュに皮膚線維芽細胞を  $1 \times 10^6$  個/ウェル播種した。

C2C12 細胞は  $2.5 \times 10^6$  個/ウェルを上記の 4 ウェル C ディッシュに播種し、コンフルエントになるまで 10% FBS-DMEM 中で培養した。コンフルエントになった時点で、培養液を分化誘導培養液 4 mL に交換した (1 日目)。

### 第3項 組換えウイルスベクターの感染

MOI 30 の組換えアデノウイルスベクター Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry および Ad.CAG-Cherry をそれぞれヒト皮膚線維芽細胞に 2% FBS 添加 DMEM 1 mL 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 1 時間感染させた。15 分ごとにウイルス溶液が細胞全体に行き渡るように、プレートを傾けながら感染させた。感染後、新しい 2% FBS-DMEM 4 mL に培養液交換し、さらに 3 時間後、10% FBS-DMEM 4 mL で交換し、2 日間培養した。その後、培養液を分化誘導培

養液 4 mL に交換した。非感染皮膚線維芽細胞は、組換えウイルスベクター感染細胞と同様に培養液の交換のみ行った。

#### 第 4 項 電気刺激

電気刺激の直前にそれぞれの培養液は新しい 2% FBS-DMEM に交換した。Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染皮膚線維芽細胞、Ad.CAG-Cherry 感染皮膚線維芽細胞、非感染皮膚線維芽細胞、C2C12 細胞は、分化誘導開始後に電気刺激を加えた。電気刺激は電気刺激装置（ウチダ電子, 八王子, 日本）を用いて 150 V, 1 Hz にて 3 msec 刺激、997 msec インターバル（1 秒に 1 回の間隔で刺激）で実施した。

#### 第 5 項 収縮の解析

細胞の収縮能の評価は、筋管細胞上の特定の 2 点間の収縮距離にて評価を行った。細胞上の 2 点を取り、収縮による 2 点間距離をモーションアナライザー（BZ-H1M）（Keyence, 大阪, 日本）にて測定し、経過時間と細胞間の距離をグラフ化した。

### 第 3 節 結果

細胞の収縮についての評価は、真鍋らの報告した方法に従い行った[32, 45]。コントロール細胞であるマウス筋芽細胞の C2C12 細胞は、コンフルエントになった状態で、培養液を分化誘導培養液へ変更し、その日を 0 日目とした。

C2C12 細胞は徐々に筋管を形成し、形態学的に紡錘状の細胞となった。分化誘導開始から 5 日目より 1 秒間に 1 回の電気刺激（150 V, on 3 msec, off 997 msec）に応じて、1 秒間に 1 回の収縮が認められた（図 10A）。Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染皮膚線維芽細胞でも紡錘状の形態学的変化が確認され、12 日目より C2C12 と同様に電気刺激に応じた収縮が認められた（図 10B）。1 秒間に 1 回の収縮が確認された Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染皮膚線維芽細胞では、電気刺激開始後 10 秒から 20 秒に電気刺激を中断すると、それに合わせて収縮も停止した（図 10C）。Ad.CAG-Cherry 感染皮膚線維芽細胞および、非感染皮膚線維芽細胞では電気刺激による収縮は認められなかった。これらの結果より、MyoD 導入皮膚線維芽細胞は電気刺激に同調して収縮していることが確認された。尚、収縮実験中に細胞の位置が多少のずれを生じるために、基線が右上がりであったり、右下がりであったりしている。

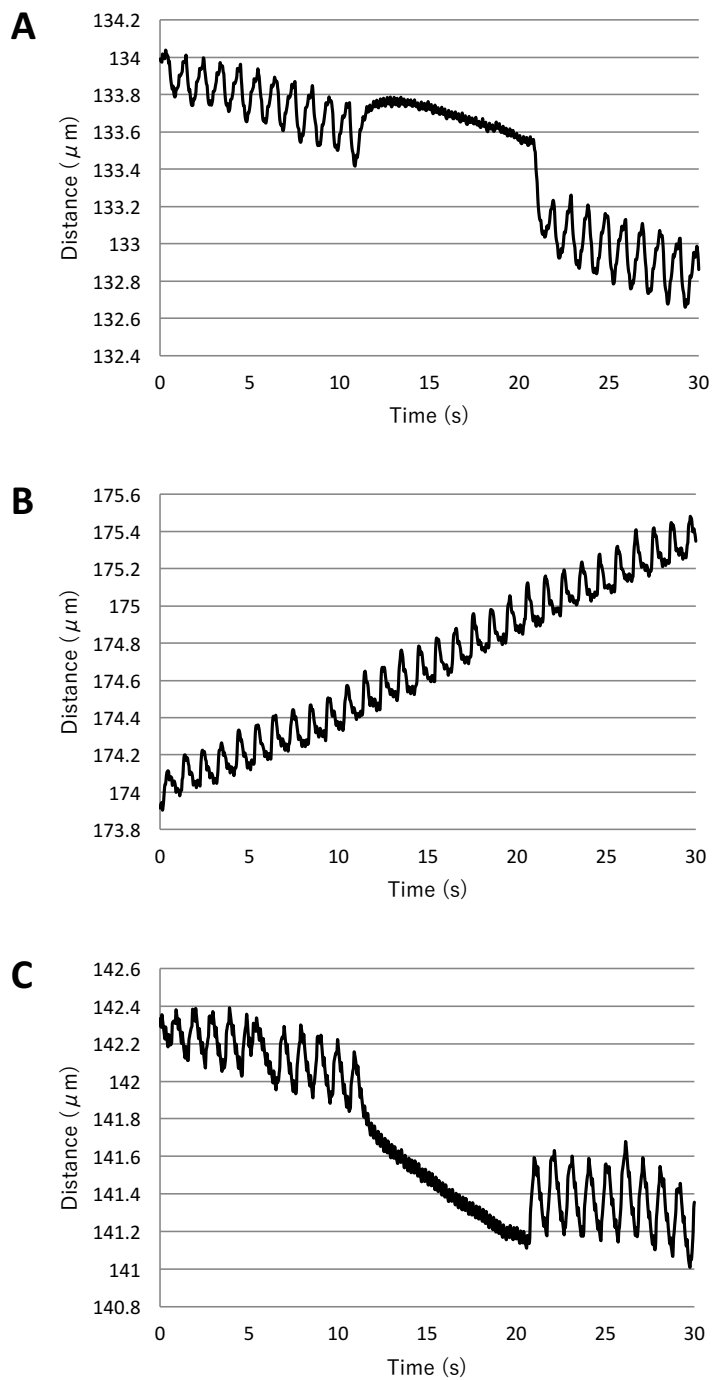


図 10. 電気刺激による筋収縮

(A) C2C12 細胞分化誘導 5 日目。10-20 秒は電気刺激を停止。

(B) Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染皮膚線維芽細胞分化誘導 14 日目。

(C) Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染皮膚線維芽細胞分化誘導 14 日目。10-20 秒は電気刺激を停止。



## 第7章 カルシウムイオン動態の確認

### 第1節 序

MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞では筋小胞体が形成されているのか評価するために、カルシウムイメージング法を用いて検討を行った。カルシウムイメージング法とは、カルシウムイオンと結合すると蛍光を発するプローブ（カルシウム蛍光プローブ）を使用して、細胞内でのカルシウムイオンの動態を画像として観測可能とする方法である。カルシウムプローブは細胞内のカルシウムイオン濃度に応じて蛍光強度が変わるため、その蛍光強度の度合いによりカルシウムイオンの濃度を観察することができる。今回使用したカルシウム蛍光プローブ Fluo 4-AM は照射光の励起波長 495 nm において、518 nm 付近で蛍光が観察される。Fluo 4-AM の AM はアセトキシメチル基（AM 基）を表し、カルシウムイオンをキレートする部分（カルボキシル基）がアセトメチル基で保護されている。これにより細胞透過性を持たせている。さらに、プローブは細胞内に入ると、AM 基が細胞内エステラーゼによって加水分解を受け、カルシウムイオンをキレートできる構造となり、かつ細胞外へ漏れ出しにくくなるという特徴を持つ（「はじめての細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  測定プロトコル」同仁化学研究所, 熊本, 日本）。細胞内でのカルシウムイオンの放出を観察するために、筋小胞体上の受容体を刺激する薬剤、すなわち ATP およびクロロフェノール誘導体（図 11）に対する反応を評価した。細胞外 ATP は G 蛋白質共役型 ATP 受容体に結合し、ホスホリパーゼ C を活性化させる。その結果ホスファチジルイノシトール二リン酸がジアシルグリセロールとイノシトール

ル三リン酸 ( $\text{IP}_3$ ) に分解され、細胞内で  $\text{IP}_3$  濃度が上昇する。濃度が上昇した  $\text{IP}_3$  が筋小胞体上の  $\text{IP}_3$  受容体を刺激し、筋小胞体内に蓄えられているカルシウムイオンが細胞質内に放出される[46,47]。4-クロロ-3-エチルフェノール (4-CEP) および 4-クロロ-m-クレゾール (4-CmC) は筋小胞体上のリアノジン受容体を刺激し、カルシウムイオンを放出させる (図 12) [48]。これらの試薬を Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染後 16 日目の皮膚線維芽細胞と非感染皮膚線維芽細胞へ添加し、比較検討した。

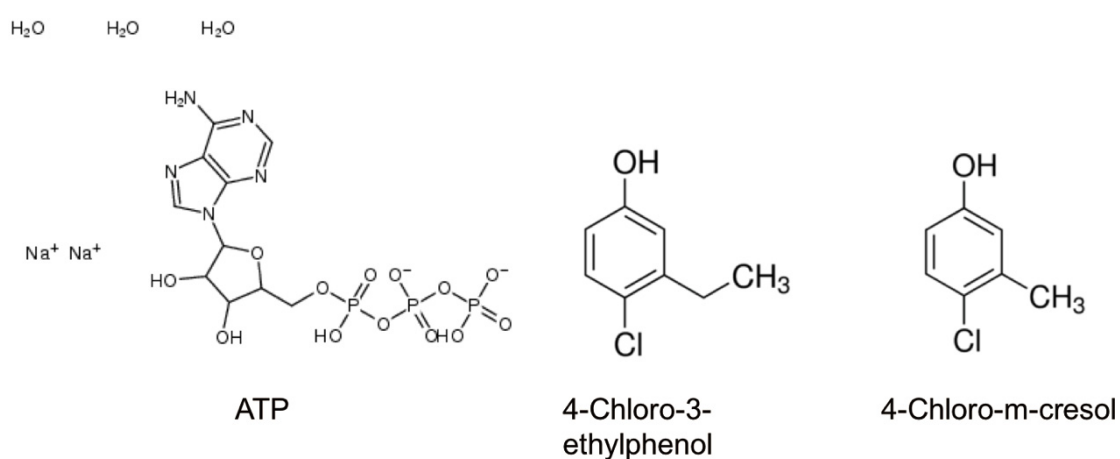


図 11. 筋小胞体上の受容体刺激薬

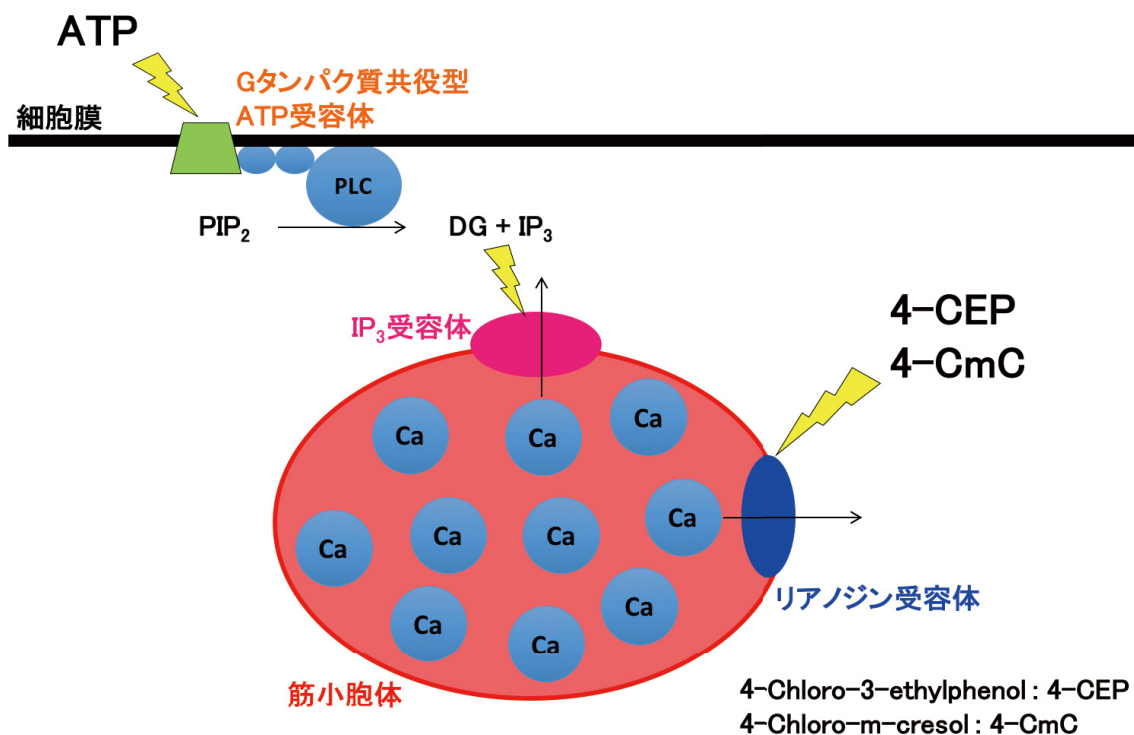


図 12. 筋小胞体上の受容体

筋小胞体上の受容体について示す。使用した薬剤 ATP、4-CEP、4-CmC は筋小胞体上の受容体を刺激する。ATP は IP<sub>3</sub> 受容体を間接的に刺激することで、4-CEP および 4-CmC はリアノジン受容体を刺激することで筋小胞体よりカルシウムイオンを放出させる。

## 第 2 節 実験方法

### 第 1 項 細胞培養および組換えウイルスベクターの感染

第 5 章-第 2 節-第 1 項および第 2 項参照。

## 第2項 添加薬剤の調製

### ① 500 $\mu$ M 4-chloro-3-ethylphenol (4-CEP) 溶液

0.783 g の 4-CEP (Sigma-Aldrich, 東京, 日本) を 200  $\mu$ L の DMSO (ナカライテスク, 京都, 日本) で溶解し、溶解液を Recording Medium (Fluo 4-AM special packaging<sup>®</sup> kit (同仁化学, 熊本, 日本)) に混合し、全量を 10 mL とした。

### ② 500 $\mu$ M 4-chloro-m-cresol (4-CmC) 溶液

0.71 g の 4-CmC (Sigma-Aldrich, 東京, 日本) を 200  $\mu$ L の DMSO で溶解し、溶解液を Recording Medium (Fluo 4-AM special packaging<sup>®</sup> kit) に混合し、全量を 10 mL とした。

### ③ 100 $\mu$ M ATP 溶液

ATP (MP Biomedicals, 東京, 日本) 60.5 mg を Recording Medium で溶解し全量を 10 mL とし、10 mM ATP 溶液を調製した。10 mM ATP 溶液 50  $\mu$ L を Recording Medium (Fluo 4-AM special packaging<sup>®</sup> kit) と混合し、全量 5 mL として、100  $\mu$ M ATP 溶液とした。

## 第3項 カルシウムイオンの測定

カルシウムイメージングは Fluo4-AM special packaging<sup>®</sup> kit を用いて、添付のプロトコルに従って行った。細胞内カルシウムイオン濃度を測定するために、Fluo4-AM を添加し 37°C で 1 時間静置して、細胞内に取り込ませた。そ

の後、細胞を洗い、付属の Recording Medium に交換し、観察を行った。観察開始後 10 秒後にそれぞれの薬剤を添加した。使用した薬剤は 500  $\mu$ M 4-CEP, 500  $\mu$ M 4-CmC, 100  $\mu$ M ATP である。蛍光強度は BZ-X Analyzer (Keyence, 大阪, 日本) にて計測した。同一ディッシュより 15 個の細胞を選択し、蛍光強度の最大値を数値化した。各グループの蛍光強度の差を Student's *t*-test にて比較した。 $P < 0.05$  のとき、統計学的に有意であるとした。

### 第 3 節                      結果

Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry 感染ヒト皮膚線維芽細胞と非感染皮膚線維芽細胞における、クロロフェノール誘導体および ATP 添加時の細胞内カルシウムイオン濃度の変化を評価した。100  $\mu$ M ATP、500  $\mu$ M 4-CEP、500  $\mu$ M 4-CmC 添加時の結果を図 13 に示す。写真は各試薬添加後の蛍光強度最小時（試薬添加前）および蛍光強度最大時を示している（図 13A）。細胞外 ATP は  $IP_3$  受容体の間接的刺激剤であるが、薬剤添加後、MyoD 非導入皮膚線維芽細胞では蛍光強度の増大は観測できなかったのに対し、MyoD 導入皮膚線維芽細胞では蛍光強度の増大が確認された。リアノジン受容体を刺激する 4-CEP および 4-CmC 添加後、MyoD 非導入皮膚線維芽細胞に比べ、MyoD 導入皮膚線維芽細胞では蛍光強度のより大きな増大が観察された。グラフは経過時間と蛍光強度を示している（図 13B）。観察開始後 10 秒の時点で試薬を添加しているが、それぞれの試薬添加後に MyoD 導入細胞において蛍光強度の増大が観測された。また、MyoD 導入皮膚線維芽細胞（MyoD (+））と非導入皮膚線維

芽細胞 (MyoD (-)) とで、最大時の蛍光強度の差を比較すると、MyoD (+) 細胞で明らかな蛍光強度の増大が観察された ( $P < 0.05$ ) (図 13C)。以上の結果より、筋小胞体上に存在する  $IP_3$  受容体およびリアノジン受容体の存在の可能性が示唆され、MyoD 導入皮膚線維芽細胞に筋小胞体が形成されている可能性が強く示唆された。

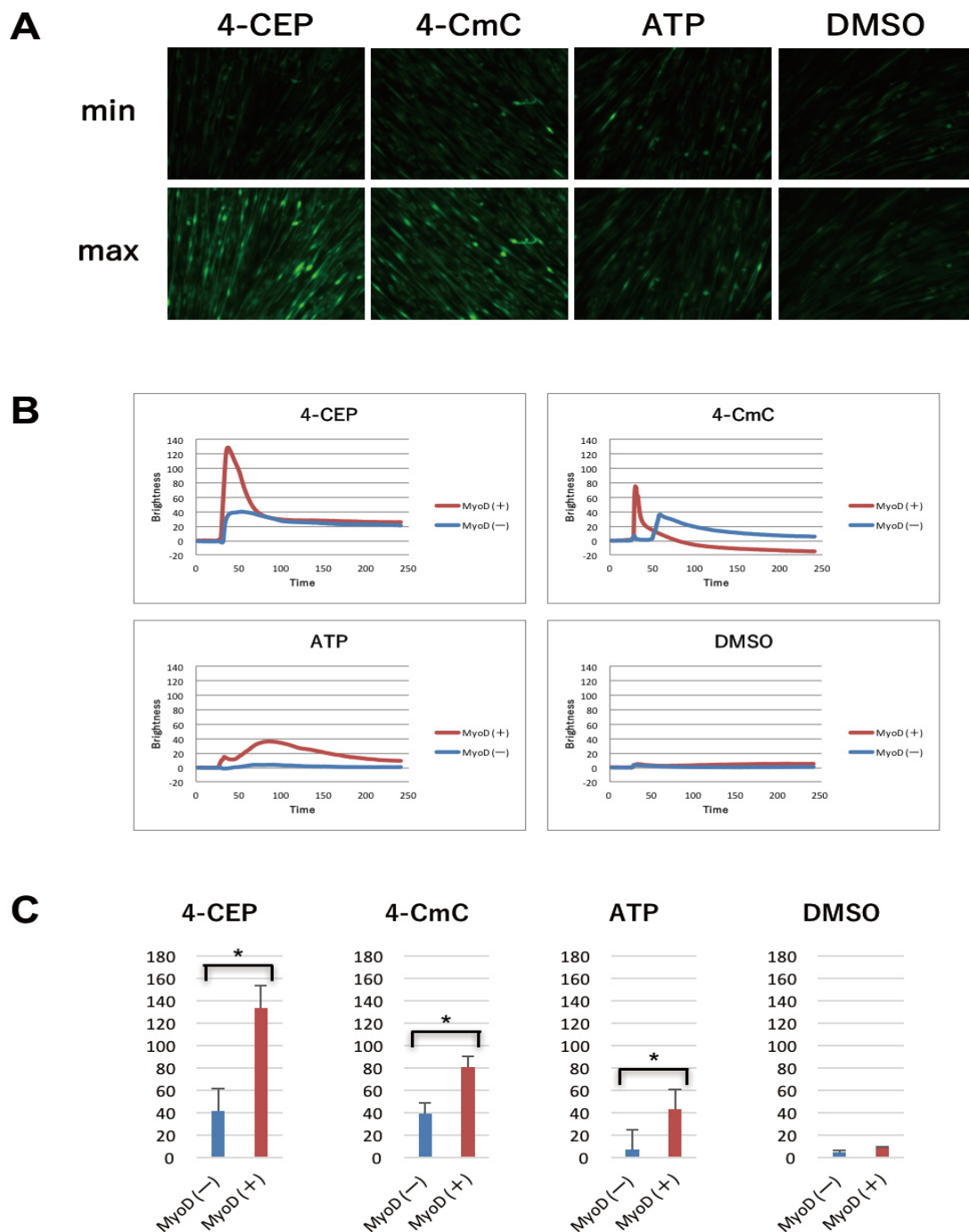


図 13. カルシウムイメージング

(A) 蛍光強度最小（試薬添加前）（上段）および最大時（下段）。Scale bar = 100  $\mu$ m。

(B) 経過時間と蛍光強度（カルシウムイオン濃度）。同一ディッシュより 15 個の細胞を選択し、平均した。

(C) 最大蛍光強度の比較。N=15。\* $P < 0.05$ 。

MyoD (+) : MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞, MyoD (-) : 非導入ヒト皮膚線維芽細胞

## 第8章 Time-lapse 法による遊走能の評価

### 第1節 序

MyoD 導入皮膚線維芽細胞を筋の移植細胞として考えた際、移植細胞には損傷部位に移動し、複数の筋芽細胞が集合しあって多核の筋管を形成する必要がある。本研究では MyoD 導入皮膚線維芽細胞の遊走性を確認するために、野生型マウス筋芽細胞（図 15A）との比較を行った。今回は MyoD の導入を視覚的に確認するために、緑色蛍光蛋白質をコードする EGFP を共発現させた Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP を皮膚線維芽細胞に感染させた（図 15B）。そのコントロールとして EGFP のみを発現させた組換えアデノウイルスベクター Ad.CAG-EGFP 感染皮膚線維芽細胞を使用した（図 15C）。各組換えアデノウイルスベクター感染ヒト皮膚線維芽細胞と野生型マウス筋芽細胞について、Time-lapse 法にて 10 分間隔で経時的に観察を行った。



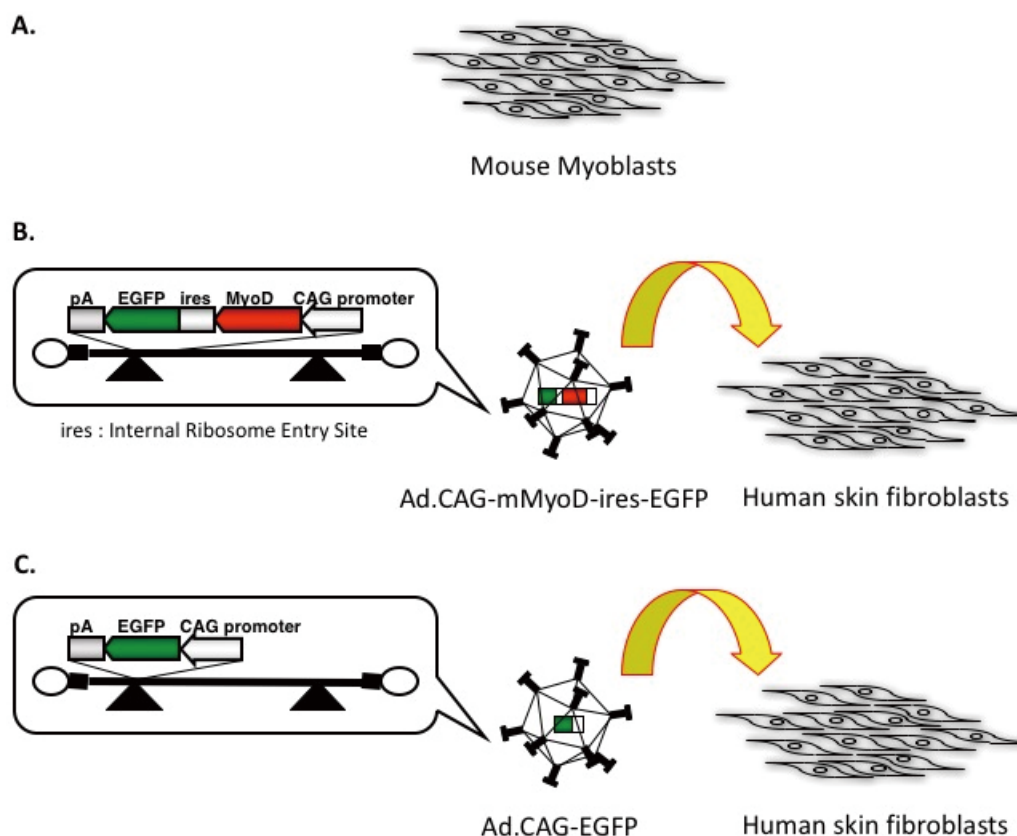


図 14. 遊走実験

遊走実験に使用した細胞を示す。3種類の細胞について観察を行った。

(A) 野生型マウス筋芽細胞

(B) Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染ヒト皮膚線維芽細胞

(C) Ad.CAG-EGFP 感染ヒト皮膚線維芽細胞

## 第2節 実験方法

### 第1項 細胞培養および組換えウイルスベクターの感染

第5章-第2節-第1項および第2項参照。

初代培養マウス筋芽細胞と Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 導入ヒト皮膚線維芽細胞は 35 mm のペトリディッシュに、 $5 \times 10^5$  個/ディッシュで播種し、分

化誘導培養液中で培養した。

## 第2項 Time-lapse 法による観察

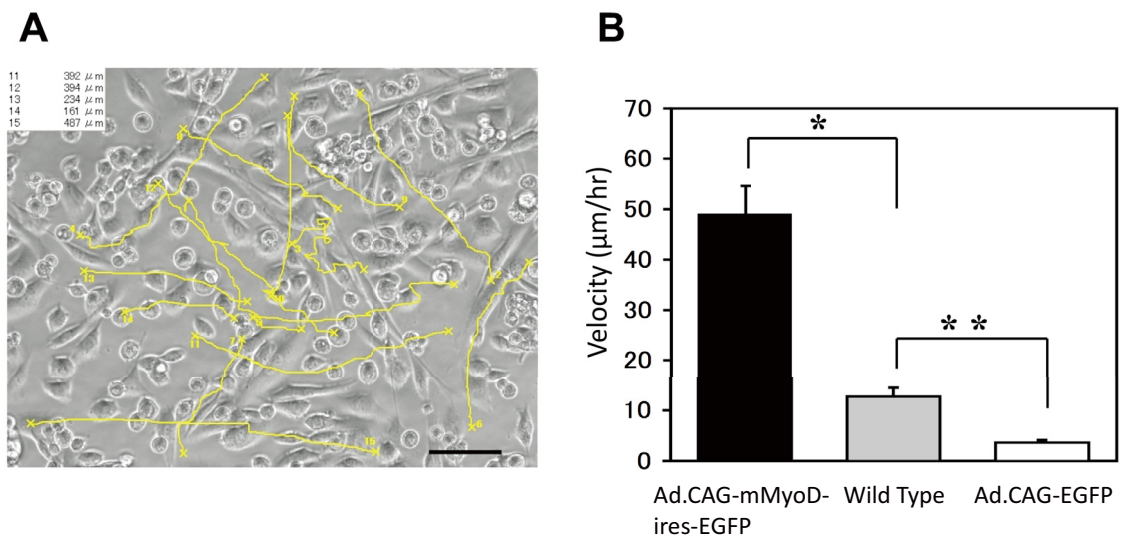
培養ディッシュは顕微鏡のディッシュホルダーで固定し、石英ガラスでカバーして行ったため、長時間の観察もコンタミネーションを起こすことなくできた。チャンバー内は 5% CO<sub>2</sub> を維持して観察を行った。細胞の形態学的変化は蛍光顕微鏡 Keyence BZ-8000 (Keyence, 大阪, 日本) で観察した。10 分間隔で 1 枚の写真を撮影し、2～5 日間かけて行った。

## 第3項 遊走能の検討

上記、Time-lapse 法で撮影した写真を、1 秒あたり 10 枚ずつをつなぎ合わせ、ムービーとした。細胞の遊走については BZ-H1M ソフトウェア (Keyence, 大阪, 日本) を用いて、同一ディッシュより 15 個の細胞をランダムに選び、個々の細胞を追跡し、移動距離と時間から細胞の速度を求めた。Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染皮膚線維芽細胞、Ad.CAG-EGFP 感染皮膚線維芽細胞、野生型マウス筋芽細胞、それぞれの細胞における速度の差は Student's *t*-test にて比較検討した。  $P < 0.05$  を統計学的に有意であるとした。

### 第3節                      結果

Ad.CAG-mMyoD 導入細胞と野生型マウス筋芽細胞での遊走性を比較するため Time-lapse imaging 法を用いて解析を行った。マウス筋芽細胞では筋芽細胞が移動する遊走能が見られる。Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染ヒト皮膚線維芽細胞でも遊走性が認められた (図 15A) 。個々の細胞の軌跡を追って、移動距離を計測すると Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 導入皮膚線維芽細胞はコントロールのマウス筋芽細胞に比べ、高い遊走性が確認された。その平均速度は Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染皮膚線維芽細胞では野生型マウス筋芽細胞に比べ、約 4 倍を示した (図 15B) 。さらに MyoD 導入細胞では形態学的にも形が変わり、筋管に似た紡錘状の形態を示すことが観測された。また、コントロール細胞である Ad.CAG-EGFP 感染皮膚線維芽細胞では有為な遊走性は確認できなかったことより、Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP で見られた遊走性は MyoD 遺伝子導入によって誘導された遊走性であると考えられる。これらの結果より、MyoD 遺伝子の皮膚線維芽細胞への導入により、高い遊走性を獲得したことが示唆された。



**図 15. 遊走能の評価**

(A) Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染皮膚線維芽細胞の移動経路（黄色ライン）。15 細胞を選択し、その軌跡を追跡した。各細胞の総移動距離を左上に示す。Scale bar = 100  $\mu\text{m}$

(B) Ad.CAG-mMyoD-ires-EGFP 感染皮膚線維芽細胞、野生型マウス筋芽細胞、Ad.CAG-EGFP 感染皮膚線維芽細胞の平均速度。値は $\pm\text{SE}$ 。n=15。\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.05$ 。

## 第9章 融合能の評価

### 第1節 序

MyoD 導入皮膚線維芽細胞を移植細胞後、筋として機能するためには、ホストとなる MyoD 導入細胞はドナーの細胞に融合し、多核の筋管を形成し融合する必要がある。本研究では MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞と野生型マウス筋芽細胞を共培養することで、これらの細胞の融合能について評価した。

MyoD 導入皮膚線維芽細胞と野生型マウス筋芽細胞とを区別するために、野生型筋芽細胞には EGFP を導入し緑色蛍光を発するようにした。MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞はジスフェルリン蛋白質の免疫染色を行った。抗ジスフェルリン抗体には Alexa-594 を結合させ、赤色蛍光で標識した。2 種類の細胞を共培養し、蛍光顕微鏡下に観察を行った。

### 第2節 実験方法

#### 第1項 細胞培養および組換えウイルスベクターの感染

第5章-第2節-第1項および第2項参照。

#### 第2項 共培養

Ad.CAG-EGFP 導入初代培養マウス筋芽細胞と Ad.CAG-mMyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞はコラーゲン 1 コートのカバーガラスを置いた培養プレートにそれぞれ  $1 \times 10^5$  個の細胞を播種し、共培養した。

### 第3項 免疫染色

共培養後7日に、抗ヒトジスフェルリン染色を行った。カバーガラス上で培養した細胞をPBSで洗い、2%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク, 京都, 日本) および0.1%トリトン-X (ナカライテスク, 京都, 日本) にて固定した。PBSで洗浄後、2% FBS-PBSでブロッキングした。さらにPBSで洗浄後、モノクローナル抗ジスフェルリン抗体 (Leica Microsystems, Newcastle Upon Tyne, UK) を Can Get Signal immunostain solution A (東洋紡, 大阪, 日本) で希釈した溶液中 (抗体:solution=1:200) に1時間静置した。1時間の反応後、PBSで洗浄し、Alexa-594 結合ヤギ抗マウス抗体 (Invitrogen, 東京, 日本) を solution A で希釈した溶液 (抗体:solution A=1:2000) 中に1時間静置した。PBSで洗浄後、カバーガラスをスライドに被せ、観察用スライドを作成した。

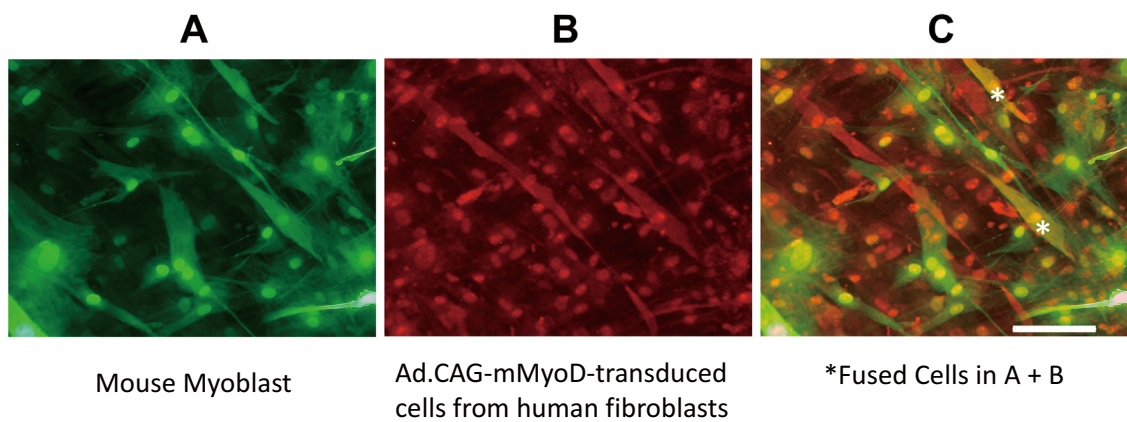
### 第4項 蛍光観察

蛍光顕微鏡 Keyence BZ-8000 にて観察を行った。マウス筋芽細胞由来の細胞は緑色蛍光を、MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞由来の細胞は赤色蛍光を観察することで判定した。

## 第3節 結果

Ad.CAG-mMyoD 導入細胞が筋として回復させる特性を持つのか評価するために、Ad.CAG-mMyoD 導入皮膚線維芽細胞と緑色蛍光蛋白質 EGFP で標識した野生型マウス筋芽細胞を共培養し、融合能の観察を行った。EGFP はマウ

ス筋芽細胞由来の細胞を示している（図 16A）。ジスフェルリンは筋特異的蛋白質である。今回は抗ヒトジスフェルリン抗体 NCL-Hamlet-2 を使用したため、ヒト由来のジスフェルリンが染色されている。すなわち、MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞由来のジスフェルリン発現を示している。共培養後 7 日目に、ジスフェルリンが複数の筋管（紡錘状の細胞）で観察された（図 16B）。ジスフェルリンおよび、EGFP の発現を比較すると、同一の細胞でジスフェルリンおよび EGFP が共発現している細胞（オレンジ色）が観察された（図 16C）。このことより MyoD 導入皮膚線維芽細胞とマウス筋芽細胞が融合して、筋管を形成していることが示された。すなわち、Ad.CAG-mMyoD 導入細胞はホストのマウス筋芽細胞と融合することで、ヒトジスフェルリンがマウスの筋管へ供給されていることが確認された。



**図 16. 融合能の評価**

- (A) EGFP（緑）の発現。EGFP 陽性筋管はマウス筋芽細胞由来の筋管であることを示す。
- (B) ジスフェルリン（赤）の免疫染色結果を示す。ジスフェルリン陽性筋管は Ad.CAG-mMyoD 感染皮膚線維芽細胞由来の筋管であることを示す。
- (C) (A)および(B)のマージ写真。\*EGFP およびジスフェルリンを発現している細胞（オレンジ）は融合している細胞を示す。



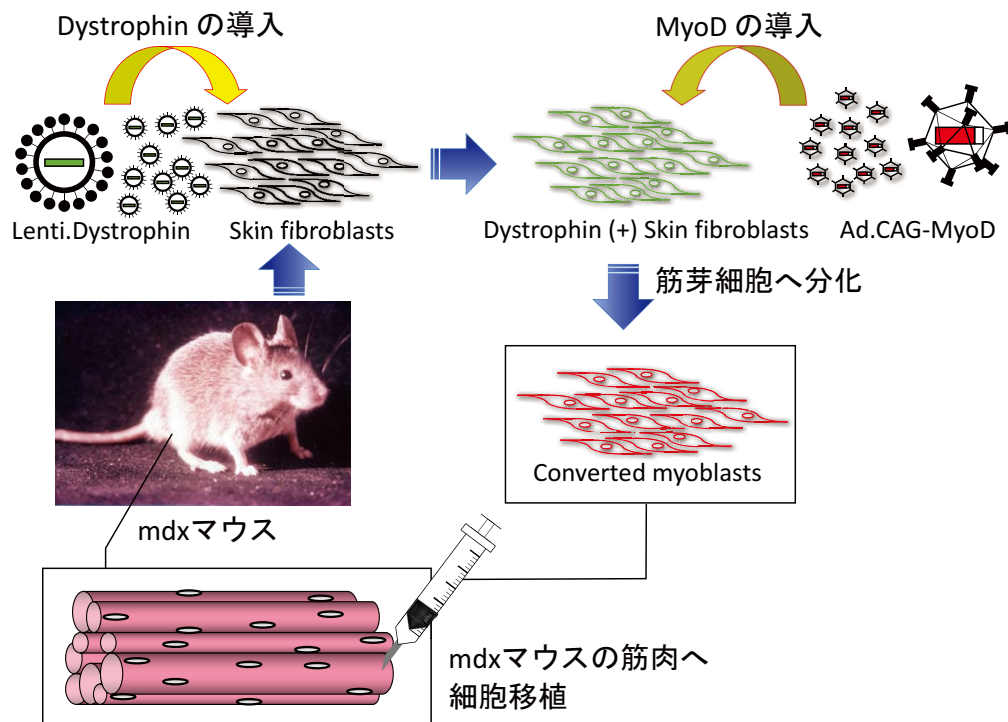


図 17. 目標とするストラテジー

目標とするストラテジーの概略を示す。DMD のモデルマウスである mdx マウスの皮膚を採取し、ジストロフィンを発現させる。その後、ジストロフィンが発現した皮膚線維芽細胞に MyoD を導入することで筋分化誘導を行い、その細胞を mdx マウスへ戻す自家移植法を目標とする。

## 第10章 考察

疾病の治療法の一つとして細胞移植治療を考慮する際、効果的な臓器再生のためには様々な因子が関わっていることを理解することが重要である。分化誘導細胞を用いたリプログラミング法は、1987年に線維芽細胞へMyoD遺伝子を導入することで筋芽細胞へ分化誘導できることの発見より始まった[16]。その後、ES細胞が肝臓細胞、心筋細胞、筋芽細胞、神経細胞等、様々な細胞へ分化誘導できる細胞であることが報告され、それ以降、多くの研究者はES細胞のような多能性細胞の作製法を同定することを目的としてきた。その結果、iPS細胞がES細胞と同様に様々な種の細胞へ分化誘導できる多能性細胞として発見された。筋肉の場合、ヒトES細胞やヒトiPS細胞においてもMyoD発現組換えアデノウイルスベクターが用いられている[30]。最近では、損傷を受けた臓器・器官のリプログラミング法として、iPS細胞を用いた方法が世界中で広く研究されている。他の分化細胞（例えば線維芽細胞）からiPS細胞を経由して分化細胞を誘導する方法は「インダイレクト・リプログラミング」として知られている。一方で、ある分化細胞から別の分化細胞へ直接分化誘導する方法は「ダイレクト・リプログラミング」と呼ばれている[49, 50]。本研究ではiPS細胞を経由しないダイレクト・リプログラミングの可能性について検討した。

「インダイレクト・リプログラミング」の利点は、1) iPS細胞は豊富な増殖能を持つこと、2) iPS細胞から多くの組織や器官へ分化誘導できることである。しかしながら、この利点は欠点としても考えられ、1) *in vivo*および*in vitro*において発癌性の可能性があること、2) 分化誘導の効率が100%でなく、目的細胞内に未

分化のままの細胞や、意図しない方向への分化した細胞が混入してしまうことが挙げられる。その可能性を考慮し、筋疾患におけるリプログラミング法を考えた場合、ダイレクト・リプログラミング法は安全、簡便であり、かつ低コストであるため、有用な方法であると考えられる。皮膚線維芽細胞は元々皮膚に大量に存在し、分化した細胞であるにもかかわらず、増殖能が非常に高く、培養するのに特別の栄養素が必要でない。特に若年者での皮膚線維芽細胞は、よりいっそう高い増殖能を持つ。皮膚は体表面に大量に存在し、患者さんからの初代皮膚線維芽細胞の樹立は容易である。また、皮膚は形質導入のための線維芽細胞を豊富に供給でき、費用対効果が極めて高い。さらに、患者さん自身の皮膚線維芽細胞に必要遺伝子を導入後利用する方法は免疫拒否反応のリスクを低下できる[51]。

組換えウイルスベクターを用いたリプログラミング法は、ウイルスの種類により導入遺伝子の発現が一過性あるいは持続的であるという特徴を持ち合わせている。ダイレクト・リプログラミング法における細胞の形質転換では挿入する遺伝子の種類により持続的な遺伝子発現が求められているとは限らない。本研究では、組換えアデノウイルスベクターを利用した方法において、外因性マウスMyoD遺伝子の非常に高い発現が得られ、さまざまな筋分化マーカー(hMyoD, hCK-M, hMyogenin, hMHC, hDystrophin) [1, 32-41]が誘導されることが確認された。これらの遺伝子は初代培養線維芽細胞には発現していないにもかかわらず、組換えウイルスベクターの感染後には発現が確認されたことより、マウスMyoDの導入により、筋特異的遺伝子の発現が誘導されたと考えられる(図8)。骨格筋の変性と再生を繰り返す過程の中で、筋分化細胞の広範な遊走性は

筋前駆細胞の移植において重要である。しかしながら、移植されたマウス筋芽細胞は、ほんの0.1 mm（およそ二つの筋線維の直径）程度しか遊走しない[52]。本研究において、MyoD導入皮膚線維芽細胞は*in vitro*にて線維芽細胞から筋芽細胞に形質転換する際に高い遊走性を示した。

細胞内でのカルシウムイオンの放出や細胞の収縮は筋細胞の特性であるため[53]、本研究では細胞内でのカルシウムイオン濃度の変化や電気刺激に対する反応について評価した。図13に示すように、リアノジン受容体刺激薬である4-CEPおよび4-CmC存在時には、MyoD導入皮膚線維芽細胞では明らかなカルシウムイオンの上昇が観測された。それに加え、間接的にIP<sub>3</sub>受容体を刺激するATP添加時にも、細胞内カルシウムイオン濃度の増大が認められた。また、マウス筋芽細胞株C2C12は電気刺激により収縮が観察された（図10A）。それと同様に、Ad.CAG-mMyoD-ires-Cherry感染（MOI 30）ヒト皮膚線維芽細胞でも電気刺激に同調した収縮が観察された（図10B, C）。これらの結果より、Ad.CAG-mMyoDによるヒト皮膚線維芽細胞の形質転換で得られた細胞は*in vitro*にて骨格筋の特性を獲得していることが示唆された。

骨格筋はヒトの体において、大きな組織であるため、ホスト細胞をドナー細胞で入れ替えようとする場合、大量のドナーの細胞を要するので、大量の培養細胞を必要とする。一方、DMDのような遺伝性筋疾患では、ドナー細胞はホスト細胞群へ遺伝子を供給し、ジストロフィン蛋白質をドナー筋線維束内に供給すれば、ホスト筋線維が壊れにくくなり、症状の改善も期待できる。この目的を達するためには、ドナー細胞はホストの筋線維束内で生き、ホストの細胞と融合し、融合体を形成する必要がある。そこで、本研究では遊走能とホスト細

胞とドナー細胞との融合能に注目し、今回の手法がホストの細胞に必要な遺伝子を十分に供給できるのか評価した。

まず、個々の細胞の移動経路を追跡することで遊走能を評価した。Cardiotoxinを筋へ投与し、その後形質転換して得られた筋芽細胞を含む筋細胞を投与する実験において、注入後の細胞が広範囲に移動することは重要である。したがって、今回、*in vitro*にて細胞自体の遊走能について評価したが、Ad.CAG-mMyoD感染皮膚線維芽細胞は少なくとも培養条件下では非常に高い遊走能を示すことが確認された。*In vitro*にて確認された遊走能が*in vivo*でも認められれば、Ad.CAG-mMyoD感染皮膚線維芽細胞は他の筋再生手段と比較しても、大きな利点を獲得することとなる。今回、遺伝子発現と細胞遊走の関係については検討できていないが、これまでにマンノースレセプターやCD44等の膜内外の蛋白質が筋分化細胞の遊走性に関わっているという報告がある[54, 55]。今後、細胞の遊走に関わる因子については、さらなる検討が必要であると考えられる。

次に、Ad.CAG-EGFP感染マウス筋芽細胞（緑）とAd.CAG-mMyoD感染皮膚線維芽細胞（赤）の共培養による融合実験を行った。Ad.CAG-mMyoD感染皮膚線維芽細胞はヒトジスフェルリンをNCK-Hamlet-2 抗ヒトジスフェルリン抗体により免疫染色し、検出を行った[56]。緑色および赤色の両方が陽性となる細胞が検出され、これは*in vitro*においてマウス筋芽細胞（レシピエント）と形質転換細胞（ドナー）が融合していることを示す。また、Myomakerは融合に必要とされる因子として知られているが[36, 37]、MyoDにより形質転換された細胞で発現が確認された。さらに、ジスフェルリンは骨格筋特異的蛋白質であり、この発現により、皮膚線維芽細胞が筋管へ形質転換されていることも示している。

以上より、MyoD導入皮膚線維芽細胞はhESやhiPS細胞と同様に[30]、治療法の候補として可能性のある手段であり、かつMyoD導入皮膚線維芽細胞は安全性が高い方法であるという利点を持つ。本研究室では自家移植法のモデルとして、マウスを利用し、形質転換した皮膚線維芽細胞を自己の筋線維へ移植する *in vivo*での検討を進めている。最終的に、DMDのモデルマウスであるmdxマウスの皮膚に修飾したジストロフィン遺伝子を導入し（組換えレンチウイルスベクターによりミニジストロフィンを導入）、その細胞にAd.CAG-mMyoDを感染させ、形質転換させた細胞をmdxマウスに戻す治療を目標としている（図17）。

今後さらなる検討が必要ではあるものの、Ad.CAG-MyoD を使用してヒト皮膚線維芽細胞を筋分化誘導した細胞を移植する方法は、筋疾患の治療のための細胞治療の戦略として期待される方法であると考えられる。

## 実験の部

### 1. 試薬

#### 制限酵素

EcoR I	タカラバイオ
EcoRV	ロシュ・ダイアグノスティックス
Sma I	タカラバイオ
Not I	タカラバイオ
Smi I	タカラバイオ
BamH I	タカラバイオ
Xho I	タカラバイオ
Sal I	タカラバイオ
Sca I	タカラバイオ
HindIII	タカラバイオ
BspT I	タカラバイオ

#### 電気泳動関連

アガロース粉末	ナカライテスク
分子量マーカー	タカラバイオ

#### DNA 精製

GENECLEAN <sup>®</sup> III Kit	MP Biomedicals
TE 飽和フェノール	ナカライテスク
フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール	ナカライテスク
クロロホルム	ナカライテスク
エタノール	ナカライテスク

#### アデノウイルスベクターコンストラクト作製

Klenow Fragment	タカラバイオ
Mung Bean Nuclease	タカラバイオ
DNA Ligation Kit 〈Mighty Mix〉	タカラバイオ
Adenovirus Expression Vector Kit	タカラバイオ

#### 細胞培養

ヒト初代培養皮膚線維芽細胞	Cell System Corporation
C2C12 細胞	ATCC
HEK-293 細胞	ATCC
DMEM(High Glucose)	和光純薬工業
Fetal bovine serum	Biowest
ペニシリン／ストレプトマイシン	Sigma-Aldrich
GlutaMax™ supplement	Invitrogen
Matrigel	Corning

#### ウイルスベクター作製

Hily Max	同仁化学
塩化セシウム	ナカライテスク
HEPES	ナカライテスク
EDTA	ナカライテスク
Glycerol	ナカライテスク

#### RT-PCR

Nucleo Spin® RNA	タカラバイオ
PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time)	タカラバイオ
Takara Ex Taq®	タカラバイオ



## カルシウムイメージング

Fluo 4-AM special packaging kit	同仁化学
ATP	MP Biomedicals
4-chloro-3-ethylphenol	Sigma-Aldrich
4-chloro-m-cresol	Sigma-Aldrich
DMSO	ナカライテスク

## 免疫染色

パラホルムアルデヒド	ナカライテスク
トリトン-X	ナカライテスク
抗ヒトジスフェルリン抗体 NCL-Hamlet-2	Leica Microsystems
Alexa-594 結合ヤギ抗マウス抗体	Invitrogen
Can Get Signal <sup>®</sup>	東洋紡

## 2. 使用機器

機器名	メーカー	形式
ブロックインキュベーター	ASTEC	Bl-516
電気泳動槽	Mupid	Mupid-2x
CO <sub>2</sub> インキュベーター	Thermo	Forma シリーズ II 3110
電気泳動ゲル撮影装置	UVP	DigDog-It System
遠心機	KUBOTA	5220
超遠心機	Beckman Coulter	L-80XP
サーマルサイクラー	ASTEC	PC320
pH メーター	HORIBA	D-51
倒立顕微鏡	OLYMPUS	IX71
電気刺激装置	ウチダ電子	EPS-1001

蛍光顕微鏡

KEYENCE

BZ-8000

計測ソフト

KEYENCE

BZ-H1M

## 参考文献

- [1] Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*. 1987;51(6):919-28.
- [2] Cirak S, Feng L, Anthony K, Arechavala-Gomez V, Torelli S, Sewry C, Morgan JE, Muntoni F. Restoration of the Dystrophin-associated Glycoprotein Complex After Exon Skipping Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 2012;20(2):462-7.
- [3] Ohlendieck K, Matsumura K, Ionasescu VV, Towbin JA, Bosch EP, Weinstein SL, Sernett SW, Campbell KP. Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma. *Neurology*. 1993;43(4):795-800.
- [4] Decary S, Hamida CB, Mouly V, Barbet JP, Hentati F, Butler-Browne GS. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord*. 2000;10(2):113-20.
- [5] Mourkioti F, Kustan J, Kraft P, Day JW, Zhao MM, Kost-Alimova M, Protopopov A, DePinho RA, Bernstein D, Meeker AK, Blau HM. Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. *Nat Cell Biol*. 2013;15(8):895-904.
- [6] Chang AC, Ong SG, LaGory EL, Kraft PE, Giaccia AJ, Wu JC, Blau HM. Telomere shortening and metabolic compromise underlie dystrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(46):13120-13125.
- [7] Pramono ZA, Wee KB, Wang JL, Chen YJ, Xiong QB, Lai PS, Yee WC. A

- prospective study in the rational design of efficient antisense oligonucleotides for exon skipping in the DMD gene. *Hum Gene Ther*. 2012;23(7):781-90.
- [8] Dick E, Kalra S, Anderson D, George V, Ritso M, Laval SH, Barresi R, Aartsma-Rus A, Lochmüller H, Denning C. Exon skipping and gene transfer restore dystrophin expression in human induced pluripotent stem cells-cardiomyocytes harboring DMD mutations. *Stem Cells Dev*. 2013;22(20):2714-24.
- [9] Malik V, Rodino-Klapac LR, Viollet L, Mendell JR. Aminoglycoside-induced mutation suppression (stop codon readthrough) as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Ther Adv Neurol Disord*. 2010;3(6):379-89.
- [10] Kole R, Krieg AM. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:104-7.
- [11] Matsuno K, Mae SI, Okada C, Nakamura M, Watanabe A, Toyoda T, Uchida E, Osafune K. Redefining definitive endoderm subtypes by robust induction of human induced pluripotent stem cells. *Differentiation*. 2016;92(5):281-290.
- [12] Toyohara T, Mae S, Sueta S, Inoue T, Yamagishi Y, Kawamoto T, Kasahara T, Hoshina A, Toyoda T, Tanaka H, et al. Cell Therapy Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Renal Progenitors Ameliorates Acute Kidney Injury in Mice. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(9):980-92.
- [13] Chatterjee I, Li F, Kohler EE, Rehman J, Malik AB, Wary KK. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Culture Methods and Induction of Differentiation into Endothelial Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1357:311-27.

- [14] Li K, Javed E, Scura D, Hala TJ, Seetharam S, Falnkar A, Richard JP, Chorath A, Maragakis NJ, Wright MC, et al. Human iPS cell-derived astrocyte transplants preserve respiratory function after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;271:479-92.
- [15] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
- [16] Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 1987;51(6):987-1000.
- [17] Fujii I, Matsukura M, Ikezawa M, Suzuki S, Shimada T, Miike T. Adenoviral mediated MyoD gene transfer into fibroblasts: Myogenic disease diagnosis. *Brain Dev*. 2006;28(7):420-5.
- [18] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. 2010;9(1):77–93.
- [19] Mah JK, Korngut L, Dykeman J, Day L, Pringsheim T, Jette N. A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*. 2014;24(6):482-91.
- [20] Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health*. 2015;51(8):759-64.
- [21] Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM.

- Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*. 1986;323(6089):646-50.
- [22] Lavidor KA, Kakkar R, McNally EM. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*. 2004;94(8):1023-31.
- [23] Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 1988;53(2):219-28.
- [24] Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*. 1979;17(4):771-9.
- [25] Weintraub H, Davis R, Tapscott S, Thayer M, Krause M, Benzer R, Blackwell TK, Turner D, Rupp R, Hollenberg S, et al. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science*. 1991;251(4995):761-6.
- [26] Benzer R1, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*. 1990;61(1):49-59.
- [27] Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, Ward TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1953;84(3):570-3.
- [28] Schoggins JW, Falck-Pedersen E. Fiber and penton base capsid modifications yield diminished adenovirus type 5 transduction and proinflammatory gene expression with retention of antigen-specific humoral immunity. *J Virol*. 2006;80(21):10634-44.

- [29] McConnell MJ, Imperiale MJ. Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2004;15(11):1022-33.
- [30] Goudenege S, Lebel C, Huot NB, Dufour C, Fujii I, Gekas J, Rousseau J, Tremblay JP. Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation. *Mol Ther.* 2012;20(11):2153-67.
- [31] Kanegae Y, Makimura M, Saito I. A simple and efficient method for purification of infectious recombinant adenovirus. *Jpn J Med Sci Biol.* 1994;47(3):157-66.
- [32] Tanaka A, Woltjen K, Miyake K, Hotta A, Ikeya M, Yamamoto T, Nishino T, Shoji E, Sehara-Fujisawa A, Manabe Y, et al. Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro. *PLoS One.* 2013;8(4):e61540.
- [33] Fakhfakh R, Lee SJ, Tremblay JP. Administration of a soluble activin type IIB receptor promotes the transplantation of human myoblasts in dystrophic mice. *Cell Transplant.* 2012;21(7):1419-30.
- [34] Trapecar M, Kelc R, Gradisnik L, Vogrin M, Rupnik MS. Myogenic progenitors and imaging single-cell flow analysis: a model to study commitment of adult muscle stem cells. *J Muscle Res Cell Motil.* 2014;35(5-6):249-57.
- [35] Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 2008;14(2):82-91.
- [36] Millay DP, O'Rourke JR, Sutherland LB, Bezprozvannaya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN. Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion

- and muscle formation. *Nature*. 2013;499(7458):301-5.
- [37] Millay DP, Gamage DG, Quinn ME, Min YL, Mitani Y, Bassel-Duby R, Olson EN. Structure-function analysis of myomaker domains required for myoblast fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(8):2116-21.
- [38] Tai PW, Fisher-Aylor KI, Himeda CL, Smith CL, Mackenzie AP, Helterline DL, Angello JC, Welikson RE, Wold BJ, Hauschka SD. Differentiation and fiber type-specific activity of a muscle creatine kinase intronic enhancer. *Skelet Muscle*. 2011;1:25.
- [39] Miller JB. Myogenic programs of mouse muscle cell lines: expression of myosin heavy chain isoforms, MyoD1, and myogenin. *J Cell Biol*. 1990;111(3):1149-59.
- [40] Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 2002;82(2):291-329.
- [41] James ME, Kevin PC. Dystrophin and membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5(1):82-7.
- [42] Inui M, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J Biol Chem*. 1987;262(32):15637-42.
- [43] Ozawa T. Modulation of ryanodine receptor  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Mol Med Rep*. 2010;3(2):199-204.
- [44] Huxley AF. Muscle structure and theories of contraction. *Prog Biophys Biophys Chem*. 1957;7:255-318.



- [45] Manabe Y, Miyatake S, Takagi M, Nakamura M, Okeda A, Nakano T, Hirshman MF, Goodyear LJ, Fujii NL. Characterization of an acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes. *PLoS One*. 2012;7(12):e52592.
- [46] Buvinic S, Almarza G, Bustamante M, Casas M, López J, Riquelme M, Sáez JC, Huidobro-Toro JP, Jaimovich E. ATP released by electrical stimuli elicits calcium transients and gene expression in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2009;284(50):34490-505.
- [47] May C, Weigl L, Karel A, Hohenegger M. Extracellular ATP activates ERK1/ERK2 via a metabotropic P2Y1 receptor in a  $\text{Ca}^{2+}$  independent manner in differentiated human skeletal muscle cells. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(10):1497-509.
- [48] Zeng B, Chen GL, Daskoulidou N, Xu SZ. The ryanodine receptor agonist 4-chloro-3-ethylphenol blocks ORAI store-operated channels. *Br J Pharmacol*. 2014;171(5):1250-9.
- [49] Han YC, Lim Y, Duffield MD, Li H, Liu J, Abdul Manaph NP, Yang M, Keating DJ, Zhou XF. Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts to Neural Stem Cells by Small Molecules. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4304916.
- [50] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 2010;142(3):375-86.
- [51] Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*. 2007;15(5):867-77.

- [52] Benabdallah BF, Bouchentouf M, Rousseau J, Bigey P, Michaud A, Chapdelaine P, Scherman D, Tremblay JP. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant.* 2008;17(3):337-50.
- [53] Wakabayashi T. Mechanism of the calcium-regulation of muscle contraction--in pursuit of its structural basis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2015;91(7):321-50.
- [54] Mylona E, Jones KA, Mills ST, Pavlath GK. CD44 regulates myoblast migration and differentiation. *J Cell Physiol.* 2006;209(2):314-21.
- [55] Jansen KM, Pavlath GK. Mannose receptor regulates myoblast motility and muscle growth. *J Cell Biol.* 2006;174(3):403-13.
- [56] Leriche-Guerin K, Anderson LVB, Wrogemann K, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. Dysferlin expression after normal myoblast transplantation in SCID and in SJL mice. *Neuromuscul Disord.* 2002;12(2):167-73.

## 謝辞

本研究を行うに際し、御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学大学院薬学研究科 薬物治療学研究室 松倉 誠 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の実施において、終始、懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 藤井 績 准教授、元助手 中野 志保 先生に深く感謝の意を表します。

ウイルスベクター作製において、御指導、ご協力頂きました川崎医科大学神経内科 大澤 裕 先生に深く感謝申し上げます。

筋収縮実験において、御懇篤なる御指導とご協力を賜りました京都大学 iPS 研究所 櫻井 英俊 講師 に深く感謝の意を表します。

本論作成にあたり、有益なる助言と御校閲を賜りました崇城大学大学院薬学研究科 國安 昭彦 教授、内田 友二 准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、ご協力頂きました崇城大学薬学部 薬物治療学研究室の皆様感謝申し上げます。

最後に、ここまで私を支えてくれた家族、友人に心より感謝致します。

平成 29 年 3 月