

論文要旨

区分	甲	氏 名 堀 尾 福 子
----	---	-------------

論文題名
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

論文の要旨

【目的】

筋ジストロフィーとは筋の変性・壊死を主病変とし、進行性の筋力低下を生じる疾患の総称である。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は X 染色体劣性遺伝病で、ジストロフィン遺伝子の異常が原因となっている。この疾患の治療法として、欠損しているジストロフィタンパク質を筋組織に強制的に発現させる方法が考えられてきた。その一つとして、細胞治療がある。すなわち、ジストロフィタンパク質を発現している正常筋芽細胞を筋組織に移植して融合させることで、欠損しているタンパク質を供給する方法である。しかし、正常筋芽細胞は健常者より採取され、筋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し、ドナーにとって大きな負担となる。本研究ではその正常筋芽細胞の代替移植細胞となる細胞について検討を行った。

【方法】

アデノウイルスベクターを利用して、mMyoD(マウス MyoD)遺伝子を皮膚線維芽細胞へ導入後、筋へ分化誘導した細胞について以下の項目について評価した。

① 筋特異的遺伝子発現の確認

分化誘導開始後、-2, 0, 3, 5, 8, 12 日目に細胞より RNA を抽出し、RT-PCR により筋特異的遺伝子発現の確認を行った。プライマーは、筋分化調節因子である MyoD, Myogenin, Myomaker、筋の骨格を形成する MHC, Dystrophin, CK-M を使用した。外因性の遺伝子と内因性の遺伝子とを区別するために、ヒトおよびマウスの遺伝子を確認した。

② 収縮能の確認

MyoD による分化誘導細胞に対して、電気刺激 (150V, 1Hz) を加え、収縮能を確認した。細胞上の 2 点間の距離を測定し、経過時間と収縮による 2 点間距離の変化をグラフ化した。

③ Ca^{2+} 放出能の確認

MyoD 導入皮膚線維芽細胞に試薬添加時の細胞内カルシウムイオン濃度を測定した。4-CEP および 4-CmC はリアノジン受容体を刺激する試薬、ATP は IP_3 受容体を間接的に刺激する試薬であり、筋小胞体上の受容体を刺激する薬剤を使用した。

④ 遊走能の確認

MyoD 導入細胞について Time-lapse 法を用いて、10 分間隔で写真を撮影し、移動距離および速度を求めた。

⑤ 融合能の確認

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し、融合能を確認した。MyoD 導入細胞はヒトジスフェルリンの免疫染色により標識した Alexa-594 の赤色を観察した。野生型マウス筋芽細胞は EGFP を導入し、緑色を観察した。赤色および緑色蛍光共発現細胞を融合している細胞として評価した。

【結果】

アデノウイルスベクター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複数の筋特異的遺伝子が誘導されていることが確認された。電気刺激を加えると、C2C12 細胞と同様に電気刺激に同調した筋収縮が認められた。さらには、筋小胞体上の受容体刺激により、筋収縮を調節しているとされる Ca^{2+} の細胞内上昇が確認され、筋小胞体形成の可能性が示唆された。

MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞は野生型マウス筋芽細胞の 4 倍の遊走速度を示し、高い遊走性を獲得した。また、MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞と初代培養野生型マウス筋芽細胞との共培養ではドナー細胞とホスト細胞との融合能を確認した。

【考察】

MyoD 導入ヒト皮膚線維芽細胞は、電気刺激による収縮能、筋小胞体上の受容体刺激薬添加による Ca^{2+} 上昇能を示し、筋として必要な特徴を獲得した。また、移植細胞として考える際に必要とされる、遊走能や融合能が認められた。

スタートとなる細胞は線維芽細胞であり、形質導入後の細胞は筋芽細胞であるため、iPS 細胞を利用した方法と今回の方法とは同一のストラテジーとなる。異なるのは、iPS 細胞を利用する方法（インダイレクト・リプログラミング法）では一旦初期化され、未分化細胞（iPS 細胞）へ戻るステップが必要となるが、今回の方法（ダイレクト・リプログラミング法）では初期化する必要がない点である。そのため、移植細胞作製までにかかる時間は短くて済む。また、今回の方法では、元となる細胞も移植細胞も分化細胞であり、iPS 細胞を利用した方法と比較し、未分化の細胞の混入や遺伝子変異による腫瘍形成や癌化のリスクが低い。さらに、アデノウイルスベクターを利用する方法は、簡便で低コストであるメリットがある。

これら、一連の結果より、アデノウイルスベクターを利用した MyoD 導入皮膚線維芽細胞が、デュシェンヌ筋ジストロフィーの細胞治療において、筋芽細胞の代替移植細胞として期待できる細胞であることを示唆するものであった。

[作成要領]

1. 用紙は A4 判上質紙を使用すること。
2. 文字の大きさは 10 ポイント程度とすること。
3. 要旨は、2,000 字程度にまとめること。
4. 本様式によりワープロ浄書すること。