

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 次世代型マトリックスによる高効率骨格筋幹細胞分化誘導法の開発
(英語) Development of robust differentiation system for muscle stem cells using
new generation extracellular matrix

研究開発実施期間: 令和2年8月25日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 関口 清俊
(英語) Kiyotoshi SEKIGUCHI

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人大阪大学・蛋白質研究所・寄附研究部門教授
(英語) Osaka University, Institute for Protein Research, Endowed Chair Professor

II 研究開発の概要

【研究開発の背景と目標】

筋疾患は多くが遺伝子異常に基づいて発症し、ほぼすべての疾患で有効な治療法がないのが現状である。ヒト iPS 細胞由来骨格筋幹細胞は、筋疾患に対する創薬スクリーニングでの利用が期待されているが、既存の分化誘導プロトコルでは筋疾患患者由来 iPS 細胞から骨格筋幹細胞を再現性よく分化誘導することが難しく、スクリーニングに利用可能なロバストな骨格筋幹細胞分化誘導法の開発が強く望まれている。代表研究者は、骨格筋幹細胞のニッチを構成する基底膜に着目し、そのニッチ活性を担うラミニン（接着分子）とパールカン（増殖因子捕捉分子）の活性部位を連結した次世代型ラミニン E8 フラグメントの開発に成功している（図 1）。分担研究者は、ラミニン 421 の次世代型 E8 フラグメントをコーティングした培養器を使うことにより、従来法よりも高効率でヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を分化誘導できることを見いだしている。本課題では、これらの予備的研究成果を踏まえ、骨格筋幹細胞の分化誘導時の足場を分化誘導の進行に合わせて最適化することにより、創薬スクリーニングにも使用可能な骨格筋幹細胞を筋疾患患者由来 iPS 細胞から高効率かつ再現性よく作製する分化誘導プロトコルの確立を目指した。

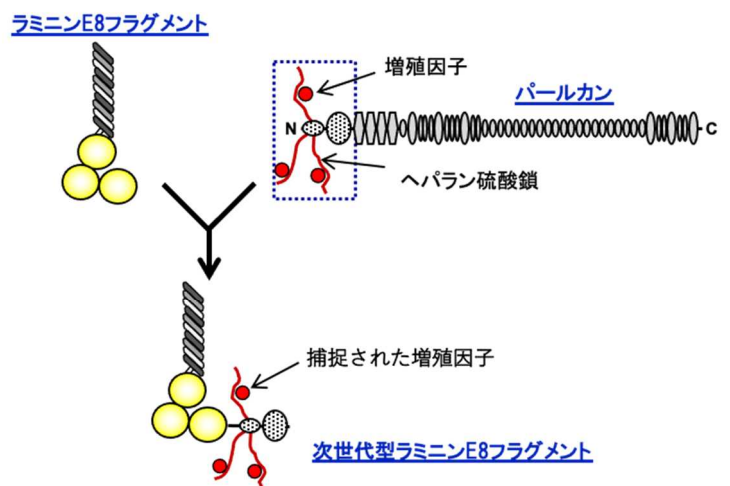


図 1 パールカンの増殖因子結合部位（ヘパラン硫酸鎖）を連結した次世代ラミニンE8フラグメント

具体的には、以下の 4 項目を達成目標として設定した。

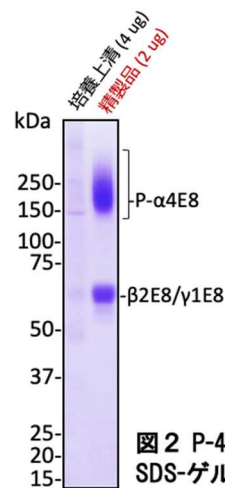
- ・骨格筋幹細胞誘導の初期段階である沿軸中胚葉誘導に有用な次世代型ラミニン 421E8 フラグメントを高発現する CHO 細胞株を取得し、組換え蛋白質の精製法を確立して安定供給体制を確立する。
- ・沿軸中胚葉から皮筋節細胞を誘導する工程および筋分化を進め成熟化させる工程に最適なマトリックス（次世代型ラミニン E8 フラグメント）を検索し、選定された組換え蛋白質を高発現する CHO 細胞株を取得して、その安定供給体制を確立する。
- ・マトリックスの最適化や自動培養装置の導入のみならず、画像データ・RNAseq データと誘導成功・不成功の結果を AI に学習させ、最適な培養条件および誘導効率に最も関連する遺伝子発現マーカーを同定する。
- ・以上を踏まえ、コントロール細胞株および 5 つの疾患株（デュシェンヌ型筋ジストロフィー [DMD]、筋強直性ジストロフィー [DM1]、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー [FSHD]、先天性筋無力症、先天性ミオパチー）について、CDH13 陽性で規定される骨格筋幹細胞集団の誘導効率が独立した 3 回の実験全てで 40% を超えることを目指す。また、拠点 I での実施委託により、全ての細胞株で分化誘導を 2 機関以上で実施し、同様に誘導効率 40% 以上を達成する。

【成果の概要】

研究開発項目 1：次世代型ラミニン 421E8 フラグメントの安定供給体制の整備

代表研究者と分担研究者は、骨格筋幹細胞の誘導の第一段階である沿軸中胚葉の誘導において、次世代型ラミニン 421E8 フラグメント（以下、P-421E8）が有効であることを見いだしている。実際、P-421E8 をコーティングした培養器を用いると、骨格筋幹細胞の分化誘導効率が格段に増加することを確認している。有用性が確認された P-421E8 を研究者に安定的に供給する体制を確立するため、P-421E8 を安定的に高発現する CHO 細胞株を取得した（令和 2 年度）。今後の医療応用も視野に入れて、安定高発現株の取得にあたっては cGMP 規格の CHO 細胞を用いた。続いて、培地中に分泌された P-421E8 を高純度精製するための精製工程を検討した。具体的に

は、P-421E8 がパールカン由来のヘパラン硫酸鎖を担持していることに着目し、陰イオン交換クロマトグラフィーを基軸とした精製プロトコルを確立した（令和3年度）。また、精製したP-421E8の足場活性と増殖因子結合活性を測定し、設計通りの構造を持つ組換え蛋白質が調製されていることを確認した（図2）。足場活性はインテグリン結合活性を指標とし、増殖因子結合活性はbFGFの結合活性を指標としてそれぞれ測定し、各精製品のバリデーションをおこなった（令和3年度）。バリデーションはSPRを用いる活性測定に加えて、固相結合アッセイによる活性測定を採用した。また、精製プロトコルのファインチューニングにより、1リットルの培養上清から>20 mgの精製蛋白質を安定的に調製できる精製プロトコルを整備した（令和4年度）。現在、P-421E8の製品化に向け、企業との協議を進めている。



研究開発項目2：筋管成熟を促進するマトリックスの選定とその安定供給体制の確立

《皮筋節細胞への分化誘導および筋成熟化を促進するマトリックスの探索》 さまざまなラミニンアイソフォームの次世代型 E8 フラグメントをヒト 293F 細胞での一過的強制発現系を用いて試験製造し、ヒト iPS 細胞から骨格筋幹細胞を誘導する各工程に最適な足場材の選定を進めた。本研究開発では、骨格筋幹細胞への分化誘導工程を (1) 沿軸中胚葉細胞の誘導 (Day 0-7)、(2) 皮筋節細胞の誘導 (Day 7-14)、(3) 筋成熟化 (Day 14-80) の3段階に分け（図3）、それぞれの工程で有効な足場材を選定した。その結果、皮筋節細胞の誘導工程には、引き続き P-421E8 が有効であることがわかった（令和2年度）。一方、筋成熟化の工程 (Day 14以降) ではどのラミニン E8 フラグメントでも骨格筋幹細胞の誘導効率に有意差が認められなかった。

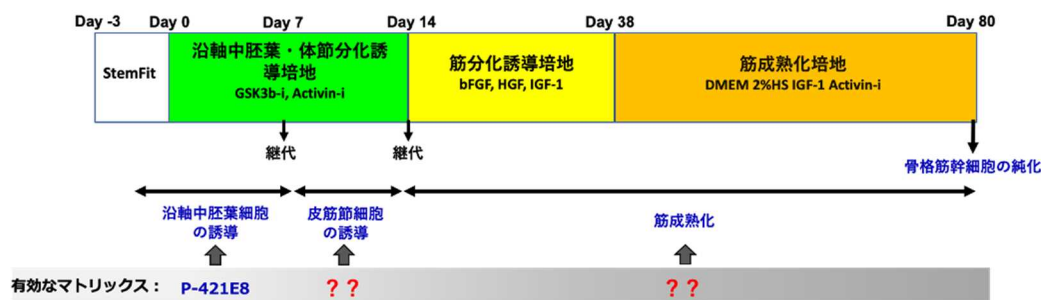


図3 ヒトiPS細胞から骨格筋幹細胞への分化誘導

《ラミニン 221 の次世代型フラグメントの調製と安定供給体制の整備》 骨格筋細胞の主要な基底膜成分であるラミニンは、筋管の成熟にともなって発現するアイソフォームが変化することが知られている。成熟した筋管基底膜を構成するラミニンアイソフォームがラミニン 211/221 であることに着目し、次世代型ラミニン 221E8 フラグメント (P-221E8) を安定に高発現する CHO 細胞株の取得を進めた。P-221E8 安定高発現株は P-421E8 の場合に準じた方法で取得した（令和3年度）。培養上清に分泌された P-221E8 は、P-421E8 の精製で確立したプロトコルを準用して精製した。1リットルの培養上清から>40 mgの精製蛋白質が安定的に得られている（令和4年度）。また、P-421E8 に準じて、精製蛋白質のインテグリン結合活性と bFGF 結合活性を測定し、設計通りの活性を持つ P-221E8 が得られていることを確認した（令和4年度）。

研究開発項目3：次世代型ラミニンフラグメントを用いる分化誘導条件の至適化

Day 0-7 および Day 7-14 の分化誘導工程では P-421E8 が有効である一方、Day 14 以降はどのラミニンフラグメントでもほぼ同じ分化誘導効率を得られたため、市販品が入手可能な 511E8 フラグメントを Day 14 以降で使

用するプロトコルを策定した。次に分化誘導開始時の細胞播種密度の至適化に向けて、拠点 I で対象としている 5 疾患（デュシェンヌ型筋ジストロフィー [DMD]、筋強直性ジストロフィー 1 型 [DM1]、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー [FSHD]、先天性筋無力症候群 [CMS]、および先天性ミオパチーの一種である laminopathy）の疾患特異的 iPS 細胞の分化誘導に着手し、 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 /well の播種密度のいずれかで至適密度が得られることを見いだした。そこでこの 3 種類の細胞播種密度で分化誘導を行い、Day 38 のミオシン重鎖の免疫染色にて筋分化誘導効率を確認し、最もミオシン重鎖陽性細胞面積が大きい細胞播種密度を選択するというプロトコルを策定した。

上記プロトコルを用いて 5 疾患の疾患特異的 iPS 細胞の分化誘導効率の検証を実施し、各クローン 2 回ずつ計 10 回の解析を triplicate にて実施した。分化誘導 80 日前後で細胞を回収し、骨格筋幹細胞マーカーである CDH13 で染色後、FACS 解析および骨格筋幹細胞の純化を行った。結果を図 4 にまとめた。

疾患特異的細胞株		DMD		DM1		FSHD		CMS		Laminopathy	
		1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目	1回目	2回目
マトリゲル	well #1	37.6	35.2	67	(61.2**)	65.3	39.1	28.5	54.1	46.1	52.5
	well #2	35.9	32.9	67.4	(60.4**)	65.4	43	22.2	50.3	42.5	47.9
	well #3	36.9	34.1	64.5	(55.7**)	64.3	44.1	25.2	49.9	40.2	49.8
	平均	36.8	34.1	66.3*	(59.1**)	65.0*	42.1*	25.3	51.4*	42.9*	50.1*
P-421E8	well #1	47.5	52	48.7	40.7	55.4	45	44.5	59.3	46.8	32.2
	well #2	45.2	52.2	40.6	40.9	55.8	45.1	52	63.4	46.2	31.2
	well #3	41.6	52.9	44.5	39	59.4	41.4	47.3	66.2	48.3	30.7
	平均	44.8*	52.4*	44.6*	40.2*	56.9*	43.8*	47.9*	63.0*	47.1*	31.4

* 誘導効率が40%を超えたもの

** CDH13陽性細胞のバリデーションとして実施した免疫染色がPAX7 52.5%、MYOD 32.1%であり、どちらも70%に届かず、PAX7とMYF5の遺伝子発現レベルも陰性分画の3倍に満たなかったため、解析から除外。

図 4 疾患特異的iPS細胞クローンの骨格筋幹細胞誘導効率（まとめ）

CDH13 陽性細胞が骨格筋幹細胞であることのバリデーションとしては、①免疫染色で CDH13 陽性分画における Pax7 and/or MyoD の陽性率が 70%以上、②CDH13 陽性分画における Pax7, Myf5, MyoD の遺伝子発現が陰性分画の 3 倍以上という基準を設定した。従来法で使用しているマトリゲルを足場とした場合、誘導効率 40%を超えた成功確率は 66.7% (6/9) であったが、P-421E8 を足場に使うと分化誘導の成功確率は 90% (9/10) に上昇した。また、誘導効率のばらつきを示す CV 値は、マトリゲル上での誘導では 0.470 とかなり高値であり、ばらつきが大きいのに対して、P-421E8 上では CV 値が 0.186 まで改善していた。以上より、P-421E8 を足場に使うプロトコルが疾患特異的 iPS 細胞にも適用可能なロバストな骨格筋幹細胞分化誘導法であることが確認された。

研究開発項目 4 : かけ流し培養装置の導入と有効性の検証

かけ流し培養装置は、マイクロポンプを用いて微量の培養液を循環させることにより、シェアストレスがかからずに持続的な培養液の交換が可能な培養装置である (図 5)。細胞外環境を一定に保つことによ

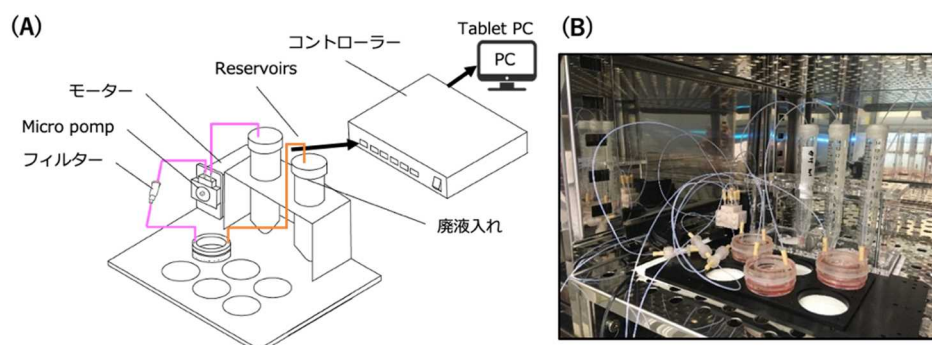


図 5 かけ流し培養装置の模式図 (A) および実際の装着の様子 (B)

り、安定した分化誘導効率が期待される。

本項目では、分化誘導のどの時期にかけ流し培養装置を用いることが効果的かをはじめに検証した。分化誘導初期 (Day 0~14) の沿軸中胚葉~皮筋節誘導期に用いると、骨格筋幹細胞の誘導効率が上昇するクローンもあったが、細胞増殖が抑制されるクローンもあり、再現性が乏しいことから、この時期には手動培養が望ましいと考えられた。筋分化誘導期である Day 14~38 に用いた場合は、骨格筋幹細胞の誘導効率は変化しないか若干の上昇が認められる程度であった。最後に筋成熟化が進む Day 38 以降に用いると、Myf5 陽性の骨格筋幹細胞の誘導効率が 1.5 倍程度上昇することがわかった。しかし、当初使用した装置 (アイカムス・ラボ社製) は回路の組み立てが複雑で、まとまった N 数の実験が困難である上、チューブとディッシュの接続部が脆弱で液漏れが発生するという問題があった。そこでデバイスの改良を依頼し、6-well plate が使用できる特製アタッチメントがアイカムス・ラボ社により開発された。6-well plate アタッチメントは装着の手間が減少し、液漏れも発生しない構造となっていた。Myf5-tdTomato レポーターをノックインしたコントロール iPS 細胞を用い、この新装置の有用性を検証した結果、Day 38 以降でこの装置を使用すると Myf5 陽性の骨格筋幹細胞の誘導効率が 1.5 倍程度に上昇することが再現性をもって確認された。かけ流し培養装置は、筋成熟化工程で使用するにより、分化誘導効率の向上に有効であると考えられる。

II 研究開発の概要 (英語)

Human iPS cell (hiPSC)-derived skeletal muscle stem cells are expected to promote drug discovery screening for muscle diseases, many of which develop due to genetic mutations. However, it is difficult to reproducibly induce skeletal muscle stem cells from the hiPSCs derived from muscle disease patients using existing protocols. It is therefore strongly desired to develop a robust method to induce skeletal muscle stem cells from the patient-derived hiPSCs. Kiyotoshi Sekiguchi, the principal investigator, has focused on the basement membrane that constitutes the niche for skeletal muscle stem cells and developed a next-generation laminin fragment, i.e., a chimeric laminin E8 fragment conjugated to the growth factor binding domain of perlecan, which harbors heparan sulfate chains that capture a variety of growth factors including basic FGF (**Fig. 1**). Hidetoshi Sakurai, the co-principal investigator, found that the differentiation efficiency of skeletal muscle stem cells from hiPSCs is significantly enhanced when hiPSCs are induced to differentiate on the plate

precoated with the next-generation laminin-421 E8 fragment. In the present investigation, we sought to develop a robust protocol for inducing skeletal muscle stem cells from hiPSCs derived from muscle disease patients, by optimizing the cell-adhesive matrix for individual stages in inducing skeletal muscle stem cells. To achieve this goal, we divided the entire process of skeletal muscle development into the following three stages: (1) induction of paraxial mesoderm, (2) induction of dermomyotome, and (3) myocyte maturation, for each of which we optimized the cell-adhesive matrix. In addition, we

sought to enhance the differentiation efficiency on the next-generation laminin fragments by utilizing AI technology and robotics. The major results and achievements obtained in this study are as follows. First, a CHO clone that stably expresses the highest level of next-generation laminin-421 E8 fragment (P-421E8) was successfully isolated to ensure the large-scale production of P-421E8. A protocol for purification of the recombinant P-421E8 secreted by the CHO cells was also streamlined. Second, P-421E8 was found effective in inducing not only paraxial mesoderm but also dermomyotome. We also found that the cells committed to skeletal muscle lineage could be enriched by replating on the plate precoated with the next-generation fragment of laminin-221, the laminin isoform comprising the basement membrane of mature skeletal muscle cells. We also isolated a CHO cell clone that expresses the highest level of next-generation laminin-221 E8 fragment (P-221E8) to enable large-scale production of P-221E8. Third, the five kinds of patient-derived hiPSCs, i.e., those from Duchenne muscular dystrophy, myotonic dystrophy type 1, facioscapulohumeral muscular dystrophy, congenital myasthenia, and laminopathy, were induced to differentiate into skeletal muscle stem cells on either P-421E8 or Matrigel using the protocol we optimized. The differentiation efficiency was assessed in ten trials (two independent trials for each patient-derived hiPSCs). The differentiation efficiency exceeded 40% in 9 trials on P-421E8, achieving 90% success rate with 18% of CV, while only 6 trials achieved >40% of differentiation efficiency on Matrigel with 47% of CV, endorsing the advantage of P-421E8 as the matrix for skeletal muscle stem cell differentiation over Matrigel. Finally, it was confirmed that differentiation efficiency increased approximately 50% by using an automated medium feeding device adapted to 6-well plates when employed at Day 38 after induction of skeletal muscle stem cell differentiation.

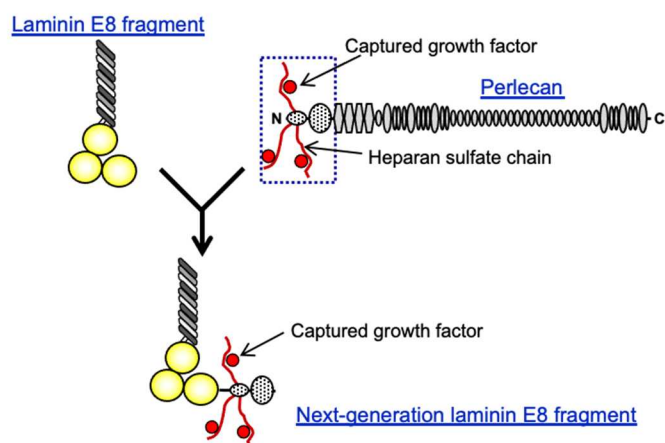


Figure 1. Construction of the next-generation laminin E8 fragment by conjugating the heparan sulfate-attached domain of perlecan to the integrin-binding E8 region of laminin.