

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine

研究開発課題名：(日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
(英語) Development of cell transplantation methods for refractory muscle diseases

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人 国立精神・神経医療研究センター
神経研究所 所長 遺伝子疾患治療研究部 部長(併任) 武田 伸一

所属 役職 氏名：(英語) Director general and Director, Department of Molecular Therapy (concurrent post),
National Institute of Neuroscience National Center of Neurology and Psychiatry
Shin'ichi Takeda

実施期間：平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
開発課題名：(英語) Development of cell transplantation methods for refractory muscle diseases

研究開発分担者 (日本語) 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授 櫻井 英俊
所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University Associate Professor,
Hidetoshi Sakurai

分担研究 (日本語) 移植細胞の生着率を向上させる培養法と移植法の検討
開発課題名：(英語) Development of methodology for accomplishment of myogenic stem cell
therapy

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学 招へい准教授 深田 宗一郎
所属 役職 氏名：(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Associate
Prof. So-ichiro Fukada

分担研究 (日本語) 移植細胞の生着率を向上させる培養法の検討
開発課題名: (英語) Culture methods to improve the transplantation efficiency

研究開発分担者 (日本語) 京都府立医科大学大学院医学研究科 特任助教 佐藤 貴彦
所属 役職 氏名: (英語) Kyoto Prefectural University of Medicine, Assistant Professor, Takahiko Sato

実施期間: 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 28 年 12 月 31 日

分担研究 (日本語) 移植細胞の生着率を向上させる培養法と移植法の検討
開発課題名: (英語) Development of methodology for accomplishment of myogenic stem cell therapy

研究開発分担者 (日本語) 藤田保健衛生大学 講師 上住 聡芳
所属 役職 氏名: (英語) Fujita Health University, Senior Assistant Professor, Akiyoshi Uezumi

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本課題では、国立精神・神経医療研究センター (NCNP)、京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)、京都府立医科大学、大阪大学、藤田保健衛生大学の 5 機関の研究者が協力して、Duchenne 型筋ジストロフィーなどの難治性筋疾患の細胞移植治療法の開発を行う。H28 年度の研究項目とその成果は以下に示す。

①発生段階模倣による iPS 細胞からの骨格筋系譜幹細胞誘導法の検討

CiRA の櫻井准教授は京都大学 CiRA で樹立した治療用 iPS 細胞 4 株から、自らが開発した誘導法を用いて、筋前駆細胞を誘導した。誘導された細胞は PAX7、MYF5 を高く発現しており、免疫不全モデルマウスに移植すると、ヒトスペクトリンを発現する再生筋線維が確認された。NCNP 武田部長らは沿軸中胚葉誘導ステップを EZ-Sphere の前に追加して、骨格筋誘導効率を安定化し、誘導期間を短縮した。治療用細胞の大量培養への応用が期待される。

③骨格筋系譜幹細胞分離マーカーの確立と骨格筋系譜幹細胞の純化法の開発

藤田保健衛生大学の 上住講師らは新規筋前駆細胞のマーカー CD82 を同定した (Stem Cell Reports, 2016)。CiRA 櫻井准教授らはヒト iPS 細胞から誘導した細胞でも CD82 陽性分画に、Pax7 陽性細胞が濃縮されることを明らかにした。また NCNP では CD82 以外にもいくつかの細胞表面マーカーを明らかにした。これらのマーカーを組み合わせることで、筋前駆細胞の純化が可能になると期待される。

④移植細胞の生着率を向上させる培養法と移植法の検討

大阪大学深田准教授、京都府立医科大学の佐藤助教らは骨格筋前駆細胞の培養に Notch リガンドを用いることで、通常は培養過程で低下する、PAX7 陽性細胞の割合を、2 倍程度に上げることを明らかにした。CiRA では人工細胞外マトリックスの一つが移植効率を上げることを明らかにした。NCNP 鈴木室長らは TGF- β シグナルを阻害すると、細胞移植効率を上げることを明らかにした。上住講師らは、CD201 がヒト間葉系前駆細胞の良いマーカーであることを報告し (Stem Cell Reports, 2016)、さらにヒト間葉系前駆細胞を 10^8 オーダーまで増殖可能な培養条件を確立した。ヒト間葉系

前駆細胞はヒト iPS 細胞から誘導された細胞と共移植することにより、移植効率を向上させると期待される。

⑤DMD モデルマウスにおける移植評価法の確立と移植による有効性の評価

櫻井准教授らは MYF5 陽性細胞を重度免疫不全マウスと交配した DMD モデルマウスへ移植し、麻酔下で筋張力測定と易疲労性評価試験を定期的実施し、MYF5 陽性細胞移植により筋張力と易疲労性の両方が有意差をもって改善することを示した。しかしレトロウイルスベクターで樹立した iPS 細胞から誘導した MYF5 陽性細胞を移植すると、ほぼ全例で腫瘍の形成を認めた。レトロウイルスベクターで導入した OCT3/4 遺伝子の再活性化が腫瘍組織内で認められ、腫瘍様増殖の原因と考えられた。エピソームベクターで樹立された iPS 細胞株を移植したところ、8 週までは腫瘍形成を認めないことを確認した。今後長期間の解析が必要である。

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is caused by mutations in the *dystrophin* gene, and characterized by progressive muscle loss due to repeated cycles of muscle degeneration and regeneration. Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are expected to be a source of cells for cell therapy to treat DMD and other degenerative diseases. In this project, our team is trying to establish a method for cell transplantation therapy for muscular dystrophy. Progress from April 2016 to March 2017 is briefly summarized below.

1. Induction of skeletal muscle stem cells from iPS

Dr. Sakurai at CiRA successfully induced myogenic progenitors expressing Pax7 and Myf5 from therapeutic iPS stock. Cells were transplanted into immunodeficient DMD mice, and Sakurai et al. confirmed the presence of regenerating human spectrin-positive fibers in transplanted muscles(CiRA). A WNT activator and BMP signal inhibitor combined with sphere culture further increased the efficiency of skeletal muscle induction (NCNP).

2. Purification of skeletal muscle lineage stem cells

Pax7+ myogenic progenitors were enriched in the CD82+ fraction (Fujita Health Univ., CiRA) (Stem Cell Reports, 2016). Dr.Suzuki et al. revealed several cell surface markers which further enrich myogenic progenitors (NCNP).

3. Culture and transplantation methods for efficient engraftment of transplanted cells

A Notch ligand kept the Pax 7+ cells at a higher concentration (20%) after 1-week culture, but did not improve the efficiency of cell engraftment (Osaka Univ., Kyoto Prefecture Univ.). Dr.Sakurai at CiRA found that a synthetic extracellular matrix effectively supports engraftment of injected myogenic pr9ogenitors as Matrigel (CiRA). Our research group at NCNP revealed that a TGF-beta inhibitor remarkably promotes muscle differentiation of muscle progenitors in vitro and enhances efficiency of engraftment in vivo. Dr. Uezumi et al. (Fujita Health Univ.) identified markers specific for human mesenchymal progenitors (Stem Cell Reports, 2016). Culture conditions of mesenchymal progenitors were also established. Co-transplantation of myogenic cells derived from human iPS cells with mesenchymal progenitors is expected to improve transplantation efficiency.

4. Transplantation of induced muscle progenitors into DMD mouse

To obtain proof of concept, Dr. Sakurai at CiRA transplanted Myf5+ cells into immunodeficient DMD model mice, and measured muscle tension and fatigability. Importantly, muscle function and fatigability were significantly improved by cell transplantation. However, when Myf 5+ cells were transplanted, tumors had formed in all mice after 12 weeks. Retroviral reactivation was recognized in the tumor. Myogenic progenitors derived from a human iPS cell line established with episomal vectors did not form tumors until 8 weeks. Analysis for an extended period is needed.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 5 件）

1. Uezumi A, Nakatani M, Ikemoto-Uezumi M, Yamamoto N, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Kasai T, Masuda S, Narita A, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Fukada S, Nishino I, Tsuchida K: Cell-Surface Protein Profiling Identifies Distinctive Markers of Progenitor Cells in Human Skeletal Muscle. *Stem Cell Reports*. 2016, 7: 263-278.
2. Ito N, Shimizu N, Tanaka H, Takeda S: Enhancement of satellite cell transplantation efficiency by leukemia inhibitory factor. *J Neuromuscul Dis*. 2016, 3: 201-207.
3. Miyagoe-Suzuki Y, Nishiyama T, Nakamura M, Narita A, Takemura F, Masuda S, Minami N, Murayama K, Komaki H, Goto Y, Takeda S (2017) Induction of pluripotent stem cells from a manifesting carrier of Duchenne muscular dystrophy and characterization of their X-inactivation status *Stem Cells International* Volume 2017 (2017), Article ID 7906843, 9 pages
4. Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y, Mori-Yoshimura M: Translational Research in Muscular Dystrophy. Springer. Editor, Tokyo, 2016, pp1-199, 2016
5. Miyagoe-Suzuki Y & Takeda S. Skeletal muscle generated from induced pluripotent stem (iPS) cells—induction and application, Invited mini-review, World Journal of Stem Cells, in press
6. 伊藤尚基, 谷端淳, 武田伸一: 骨格筋の表現型解析. 実験医学別冊マウス表現型解析スタンダード, 169-176, 2016
7. 竹村英子, 鈴木友子, 武田伸一: 筋ジストロフィーの遺伝子治療, 細胞移植治療の最前線. 小児内科, 東京医学社, 48: 12, 1910-1914, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 武田伸一: 遺伝性筋疾患に対する治療法開発の現状と展望. 2016 年度日仏会館科学シンポジウム, 東京, 12.3, 2016, 国内.
2. 武田伸一: 筋生物学研究から筋疾患に対する治療法の開発へ. 第3回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス, 東京, 10.14, 2016, 国内.
3. 武田伸一: 筋ジストロフィーの分子病態. Molecular Cardiovascular Conference II, 東京, 9.3, 2016, 国内.
4. 武田伸一: 筋研究者をめざす方へ —実験方法, モデル動物, 臨床への橋渡し研究—. 第2回日本筋学会学術集会, 東京, 8.6, 2016, 国内.
5. Takeda S: Updated Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. 15th Asian and Oceanian Myology Center (AOMC) Annual Scientific Meeting 2016, Hsinchu Taiwan, 5.28, 2016, 国外.
6. Narita A, Masuda S, Wakamatsu T, Suzuki M, Fukada S, Uezumi A, Takeda S, Miyagoe-Suzuki Y: Characterization of skeletal myogenic cells derived from human iPS cells. International Society for Stem Cell Research Annual meeting (ISSCR2016), San Francisco, USA, 6.23, 2016, 国外
6. Miyagoe-Suzuki Y, Narita A, Masuda S, Takemura F, Nishiyama T, Ito N, Takeda S: Derivation of myogenic

cells from human induced pluripotent stem (iPS) cells using a stirred bioreactor. Molecular Mechanisms Modulating Skeletal Muscle, Development and Homeostasis in Health and Disease Society for Muscle Biology Frontiers in Myogenesis, Pacific Grove, USA, 6.7, 2016, 国外

7. 成田麻子, 増田智, 竹村英子, 武田伸一, 鈴木友子: 持続攪持培養法を用いたヒト iPS 細胞からの骨格筋幹・前駆細胞の誘導. 第2回日本筋学会学術集会, 東京, 8.5, 2016 (ポスター発表), 国内

8. 鈴木友子, 成田麻子, 増田智, 竹村英子, 武田伸一: 筋ジストロフィーに対するヒト多能性幹細胞を用いた細胞移植治療法の開発. 第11回筋ジストロフィー治療研究会, 宮城, 10.29, 2016 (口演), 国内

9. 増田智, 成田麻子, 竹村英子, 伊藤国秋, 武田伸一, 鈴木友子: ヒト iPS 由来の骨格筋系譜幹細胞の表面抗原による純化の試み. 第39回日本分子生物学会年会, 横浜, 12.2, 2016 (ポスター発表), (国内)

10. 鈴木友子, 増田智, 成田麻子, 竹村英子, 武田伸一: ヒト iPS 細胞から Sphere 法によって誘導される骨格筋前駆細胞の骨格筋再生能に関する解析. 第16回日本再生医療学会総会 2017年3月7-9日 仙台(口演), (国内)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する治療の開発を目指して. 東京大学教養学部全学自由研究ゼミナール「生命科学の現在」, 国立精神・神経医療研究センター, 東京, 11.8, 2016, 国内.
2. 増田智, 成田麻子, 竹村英子, 鈴木友子, 武田伸一: 患者血液からの iPS 細胞の樹立と骨格筋分化細胞の実際 ~難治性筋疾患に対する創薬と再生医療への応用を目指して~, 世界脳週間 2016 レクチャー&ラボツアー「脳の科学の最前線」, 東京, 7.16, 2016, 国内.
3. 武田伸一: 筋ジストロフィーに対する新たな治療へ. 第18回仙台西多賀病院 筋ジストロフィー病棟合同医療・生活懇談会, 仙台, 7.5, 2016, 国内.
4. 武田伸一: 研究班報告 ジストロフィン欠損モデル動物を基盤とした筋ジストロフィーの新しい治療法開発. 一般社団法人日本筋ジストロフィー協会 第53回全国大会, 東京, 5.21, 2016, 国内.
5. 鈴木友子: 治験報告. 一般社団法人日本筋ジストロフィー協会 第53回全国大会, 東京, 5.21, 2016, 国内.

(4) 特許出願

特になし。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名：(日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Projects for Technological Development

研究開発課題名：(日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
(英語) Development of Cell Therapy for Intractable Muscular Disease

研究開発担当者 (日本語) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
所長・部長 武田 伸一

所属 役職 氏名：(英語) National Institute of Neuroscience National Center of Neurology and Psychiatry
Director general and Director, Department of Molecular Therapy (concurrent
post), Shin'ichi Takeda

実施期間：平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
開発課題名：(英語) Development of Cell Therapy for Intractable Muscular Disease

研究開発分担者 (日本語) iPS 細胞研究所 准教授 櫻井 英俊

所属 役職 氏名：(英語) Center for iPS Cell Research and Application, Associate Professor,
Hidetoshi Sakurai

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 武田伸一 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 1 件)

1. 竹中 (蛭川) 菜々、櫻井英俊. 筋幹細胞疾患としての筋ジストロフィー 実験医学増刊 2016 : 34(17) : 159(2927)-166(2934)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. CELL THERAPY FOR MUSCULAR DYSTROPHY BY HUMAN IPS CELL-DERIVED MUSCLE STEM CELLS. ポスター発表、Hidetoshi Sakurai, Satoru Takayama, Makoto Ikeya, Akitsu Hotta, Mingming Zhao, Nana Takenaka-ninagawa, Masanori Nakasa, Atsutoshi Tazumi, and Takahiko Sato. International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting 2016/6/24, 国外
2. iPS 細胞技術を活用した筋疾患治療法の開発、口頭発表、櫻井英俊、第 2 回日本筋学会シンポジウム、2016/8/5、国内
3. New generation matrix supports efficient myogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. 口頭発表、趙明明、関口清俊、櫻井英俊、第 4 回若手による骨格筋細胞研究会、2016/11/14、国内
4. iPS 細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の開発、口頭発表、櫻井英俊、第 4 回若手による骨格筋細胞研究会、2016/11/15、国内
5. New generation matrix supports efficient myogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. ポスター発表、趙明明、関口清俊、櫻井英俊、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/12/2、国内
6. iPS 細胞を用いた筋ジストロフィーに対する細胞移植治療法の開発、口頭発表、櫻井英俊、高山了、田積充年、竹中菜々、趙明明、池谷真、堀田秋津、佐藤貴彦、伊東佑太、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/8、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. iPS 細胞研究の最前線—その成り立ちと臨床応用への取り組み、櫻井英俊、福知山成美高校特別講演会、2016/8/2、国内
2. iPS 細胞を活用した筋ジストロフィー治療研究、櫻井英俊、お茶の水女子大学附属高校特別講演会、2016/8/24、国内
3. iPS 細胞を活用した筋ジストロフィー治療研究、櫻井英俊、旭丘高校特別講演会、2016/9/27、国内
4. ここまで来た iPS 細胞研究—筋疾患の治療を目指して、櫻井英俊、国立病院機構・八雲病院講演会、2016/10/21、国内
5. iPS 細胞技術を活用した筋疾患治療法の開発、櫻井英俊、第 8 回北海道小児神経研究会、2016/10/22、国内
6. iPS 細胞技術を活用した筋ジストロフィー治療研究の最先端、櫻井英俊、平成 28 年度愛知県筋ジストロフィー協会患者勉強会。2016/11/12、国内

(4) 特許出願

特になし。

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Projects for Technological Development
- 研究開発課題名： (日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
(英語) Development of cell transplantation methods for refractory muscle
diseases
- 研究開発担当者 (日本語) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 遺伝子疾患治療研究部
所長・部長 武田 伸一
- 所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Neuroscience National Center of Neurology and
Psychiatry, Director general and Director, Department of Molecular
Therapy (concurrent post), Shin'ichi Takeda
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 骨格筋系譜幹細胞の培養法の開発
開発課題名： (英語) Development of methodology for muscle-stem cell culture
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人大阪大学 招へい准教授 深田 宗一郎
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,
Associate Prof. So-ichiro Fukada

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 武田伸一 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 1 件）

1. Rodrigues M, Echigoya Y, **Fukada S**, and Yokota T; Current translational research and murine models for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Neuromuscular Disease*, 2016 3(1):29-48.
2. 竹本裕政, **深田宗一郎**: 「筋衛星細胞の維持機構及び加齢性筋萎縮への関与」 *Clinical Calcium* 2017 ;27(3):339-344

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 骨格筋幹細胞の維持メカニズムとその応用 口頭（招待講演）、**深田 宗一郎**、飯田橋メトロポリタンホテル, 2016/9/18, 国内
2. 骨格筋幹細胞と筋の恒常性維持 口頭（招待講演）、**深田 宗一郎**、東京大学 医科学研究所、2016/9/30, 国内
3. 骨格筋の量・質と幹細胞 口頭（招待講演）、**深田 宗一郎**、大阪国際会議場、2016/7/23、国内
4. Molecular regulation of muscle stem cell quiescence, undifferentiation, and survival、口頭（招待講演）、**深田 宗一郎**、ミネソタ大学、2016/8/1、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み 特になし。

(4) 特許出願 特になし。

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 技術開発個別課題
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine
Projects for technology development

研究開発課題名： (日本語) 難治性筋疾患に対する細胞移植治療法の開発
(英語) Development of cell transplantation methods for refractory muscle
diseases

研究開発担当者 (日本語) 国立精神・神経医療研究センター神経研究所 所長 武田 伸一
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Neuroscience National Center of Neurology
and Psychiatry, Director general and Director, Department
of Molecular Therapy (concurrent post), Shin'ichi Takeda
National Conference for Nurse Practitioners National Center of
Neurology and Psychiatry, Director, Shin'ichi Takeda

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 移植細胞の生着率を向上させる培養法の検討
開発課題名： (英語) Culture methods to improve the transplantation efficiency

研究開発分担者 (日本語) 京都府立医科大学大学院医学研究科 特任助教 佐藤 貴彦
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto Prefectural University of Medicine, Assistant Professor,
Takahiko Sato

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 武田伸一 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 1件）

1. Higashioka K, Koizumi N, Sakurai H, Sotozono C, Sato T*. Myogenic differentiation from *MYOGENIN*-mutated human iPS cells by CRISPR/Cas9, *Stem Cells International* 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ヒト iPS 細胞における *MYOGENIN* 欠損による筋分化への影響、ポスター、東岡 航基、佐藤貴彦、日本筋学会、2016/8/6、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
特になし。

(4) 特許出願
特になし。