

平成 29年 5月 10日

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) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare/Intractable Diseases
- 研究開発課題名： (日本語) 遺伝性筋疾患に対する新たな高効率細胞移植治療法の開発  
(英語) Development of efficient stem cell-based therapy for muscular disorder
- 研究開発担当者 (日本語) 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム・専門副部長・  
上住 聡芳
- 所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Research Team for Geriatric Medicine;  
Vice-Chief Researcher; Akiyoshi Uezumi
- 実施期間： 平成27年 7月 1日 ~ 平成30年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) Notch シグナルを応用したヒト筋衛星細胞高効率移植法開発  
開発課題名： (英語) Development of efficient stem cell-based therapy by Notch signal
- 研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院薬学研究科 招へい准教授 深田宗一朗  
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) NGFR を応用したヒト筋衛星細胞高効率移植法開発  
開発課題名： (英語) Development of efficient stem cell-based therapy by utilizing NGFR
- 研究開発分担者 (日本語) 東京都健康長寿医療センター研究所 老年病態研究チーム・研究員・  
上住 円
- 所属 役職 氏名： (英語) Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Research Team for Geriatric Medicine;  
Researcher; Madoka Uezumi

## II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

### 和文

遺伝性筋疾患の代表である Duchenne 型筋ジストロフィー（DMD）は治療法のない難病で、様々な治療研究が行われているが、その中の一つに細胞移植治療がある。骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は筋再生に必須の細胞であり、細胞移植治療の細胞源として最も有力である。しかし、筋衛星細胞本来の筋形成能を維持した状態での培養増幅が困難なため、細胞移植治療の実現には新たな培養・移植法の開発が必要である。本研究では、深田招へい准教授（大阪大学大学院薬学研究科）、上住円研究員（東京都健康長寿医療センター研究所）らとともに、独自に見出したニッチ細胞や筋衛星細胞の機能に重要なシグナル系を応用し、ヒト細胞を用いた高効率な筋衛星細胞移植治療法の開発を行う。

本研究グループは、筋衛星細胞とは異なる間葉系前駆細胞を発見し、本細胞が筋衛星細胞の増殖・分化を支えるニッチ細胞として機能することを明らかにしている。そこで、免疫不全マウスに対しヒト由来の間葉系前駆細胞と筋衛星細胞の共移植を行い、筋衛星細胞の単独移植と比較することで、間葉系前駆細胞が筋衛星細胞の移植効率に及ぼす影響を調べた。その結果、形成されたヒト筋線維数は単独移植群と比較し共移植群で有意に多く、また、筋衛星細胞としての生着も共移植群で有意に多かった。このことから、間葉系前駆細胞との共移植はヒト筋衛星細胞の移植効率向上に非常に有効な手段と考えられる。さらに、形成されたヒト筋線維において、筋収縮タンパク質の発現、および、神経筋接合部の形成が認められたことから、形成された筋線維は機能的であることも確認できた。また、筋衛星細胞の幹細胞性に重要なシグナル系として NOTCH および NGFR シグナルの応用も検討している。ヒト筋衛星細胞に効率的に NOTCH シグナルを誘導可能なリガンドを用い、リガンド刺激した初代ヒト筋衛星細胞と無刺激の細胞を免疫不全マウスに移植し、NOTCH シグナルによりヒト筋衛星細胞移植効率が改善されるかについて検討を行った。その結果、NOTCH 刺激に依存し細胞移植効率が改善する傾向にあったが、劇的な改善効果は得られなかった。NGFR の応用に関しては、初代培養ヒト筋衛星細胞を NGFR 陽性細胞と陰性細胞に分画し、免疫不全マウスへ移植することにより、NGFR による細胞選別が移植効率を改善させるか否か検討した。その結果、NGFR 陽性細胞において、移植効率改善傾向は見られたが、劇的な改善効果は得られなかった。一方、NGFR 陽性細胞培養下に 4 種類のリガンドを加え、筋衛星細胞の増殖や分化に及ぼす影響を比較し、移植効率改善に有効となり得る 2 種類のリガンドを決定した。

### 英文

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most common and severe form of muscular dystrophy. Currently, there is no cure for DMD. There are several therapeutic strategies for muscular dystrophy including stem cell-based therapy. Satellite cells, endogenous muscle stem cells, are the most powerful cells that regenerate damaged muscle, but their muscle reconstitution potential declines during cell culture. The purpose of this project is to develop new culture and transplantation method that enable efficient engraftment of human satellite cells.

We have previously identified mesenchymal progenitors distinct from satellite cells in muscle tissue. Subsequent studies showed that these cells function as niche cells for satellite

cells. In this study, we utilized niche function of mesenchymal progenitors to improve efficiency of satellite cell transplantation. Satellite cells isolated from human muscle were transplanted with or without mesenchymal progenitors into injured muscle of immunodeficient mice. Importantly, muscles that had been transplanted with both satellite cells and mesenchymal progenitors had higher number of human spectrin+ myofibers than muscles that had received single transplantation of satellite cells. Efficiency of engraftment as satellite cells was also improved in co-transplantation group. Thus, co-transplantation of satellite cells and mesenchymal progenitors will be effective means for improving efficiency of satellite cell transplantation. Another attempt is utilization of signaling pathway that play an important role in stemness of satellite cells. NOTCH signal is known to endow satellite cells with stemness. We stimulated human satellite cells using ligands that can elicit NOTCH signaling and transplanted stimulated cells into muscle of immunodeficient mice. Although transplantation efficiency of NOTCH-stimulated cells tended to increase compared with unstimulated cells, the improvement was undramatic. We also utilized NGFR. Human satellite cells were fractionated into NGFR(+) and NGFR(-) fractions, and their transplantation efficiency was compared. Although NGFR(+) satellite cells tended to engraft more effectively compared with NGFR(-) cells, the difference was not significant. We next examined effects of NGFR ligands on human satellite cells in vitro and found that two ligands stimulate both proliferation and differentiation. Therefore, these ligands may be useful to further improve transplantation efficiency of NGFR(+) satellite cells.

- ・ 研究開発分担者による報告の場合

### 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 2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. 7:263-278, 2016.
2. Uezumi A, Kasai T, Tsuchida K. Identification, isolation and characterization of mesenchymal progenitors in mouse and human skeletal muscle. Methods Mol Biol. 1460:241-253, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高品質なヒト骨格筋由来幹・前駆細胞の獲得とその応用 口頭（招待講演）、上住聡芳、第36回日本眼薬理学会・シンポジウム1「眼科研究における薬効評価モデル」、2016/9/10、国内
2. 筋間質の間葉系前駆細胞による骨格筋組織の維持 口頭（招待講演）、上住聡芳、第2回日本筋学会学術集会・シンポジウム4「骨格筋ステムセルバイオロジー」、2016/8/6、国内

3. Roles of interstitial mesenchymal progenitors in skeletal muscle homeostasis. 口頭（招待講演）、上住聡芳、Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School“Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration”、2016/8/1、国外
4. Maintenance of skeletal muscle by interstitial mesenchymal progenitors. ポスター、上住聡芳、FASEB SRC、2016/7/28、国外
5. 筋幹細胞は筋線維の質・量維持に貢献できるのか？ 口頭（招待講演）、深田 宗一郎、愛知医科大学、2016/10/15、国内
6. 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
7. 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
8. Two aspects of skeletal muscle aging -primary sarcopenia and aged muscle regeneration-. 口頭（招待講演）、上住円、Symposium at Stem Cell Institute in University of Minnesota Medical School“Cardiac and Skeletal Muscle Stem Cell and Regeneration”、2016/8/1、国外
9. MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age. ポスター、上住円、FASEB SRC、2016/7/28、国外
10. サルコペニアの発症または進行に関与する因子の探索 ポスター、上住円、第2回日本筋学会学術集会、2016/8/5、国内
11. MFG-E8 aberrantly accumulates at the arteries and the neuromuscular junction with age. ポスター、上住円、第4回若手による骨格筋細胞研究会、2016/11/14、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
なし

(4) 特許出願  
なし