

News Release



2021年9月14日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)
理化学研究所
株式会社アイロムグループ

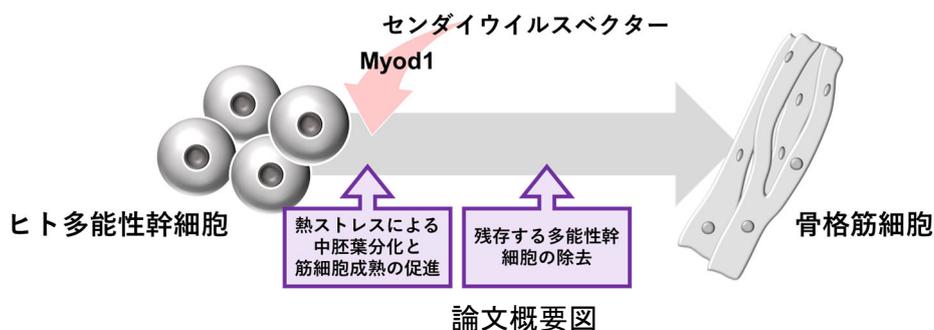
温度感受性センダイウイルスベクターを用いて

ヒト ES 細胞/iPS 細胞から骨格筋細胞を簡便に作製する技術開発

～神経筋疾患病態モデル構築と創薬研究への利用～

ポイント

- Myogenic Differentiation 1 (Myod1) という転写因子^{注1)}を搭載した温度感受性センダイウイルスベクター^{注2)}を用いて、ヒト ES 細胞/iPS 細胞から骨格筋細胞へ分化させる手法を確立しました。
- 一時的な高温環境培養における熱ストレス^{注3)}による骨格筋細胞への分化成熟促進と、残存する多能性幹細胞の除去により、分化誘導効率を高めることができました。
- この手法を用いると、分化開始から 14 日で ES 細胞/iPS 細胞から高純度の骨格筋細胞を調整することができました。



1. 要旨

Tan Ghee Wang 元大学院生（京都大学 CiRA 増殖分化機構研究部門）、近藤孝之特定拠点講師（CiRA 同部門・理化学研究所バイオリソース研究センター（BRC）iPS 創薬基盤開発チーム）、井上治久教授（CiRA 同部門・理化学研究所 BRC 同チームチームリーダー）らの研究チームは、株式会社 ID ファーマ（アイロムグループ 100%子会社）との共同研究で、温度感受性センダイウイルスベクターによる転写因子 Myod1 の外来性強制発現により、ヒト ES 細胞/iPS 細胞から骨格筋細胞を迅速に分化誘導することに成功しました。そして、この分化過程において熱ストレスが骨格筋細胞への分化誘導効率と成熟化を促進することも明らかにしました。今後、さまざまな疾患の患者さんから樹立した iPS 細胞を用いた、病態解明および創薬研究への応用が期待されます。

この研究成果は 2021 年 9 月 13 日午前 7 時(日本時間)に Journal of Cellular and Molecular Medicine 誌でオンライン公開されました。

2. 研究の背景

ES 細胞/iPS 細胞は、その増殖能と多分化能の特性から、再生医療と疾患研究における重要な資源となっています。そして、さまざまな神経筋疾患において障害される骨格筋細胞も、ES 細胞/iPS 細胞から分化誘導する方法が開発されてきました。この中で特に、骨格筋の発生過程において重要な働きをする転写因子である Myogenic Differentiation 1(Myod1)の一過性導入は、ES 細胞/iPS 細胞から骨格筋細胞へと速やかに分化させることができる強力な誘導方法であることが知られています。

本研究では、外来遺伝子の導入がしにくい細胞種である ES 細胞/iPS 細胞であっても、培地中に添加するだけで速やか、かつ強力に目的の遺伝子を発現させることができるセンダイウイルスベクターを用いて、Myod1 を導入しました。このセンダイウイルスベクターは、RNA ウイルスベクターであり、感染した細胞のゲノム配列には組み込まれず、ES 細胞/iPS 細胞から脊髄運動神経細胞の誘導に用いることができるなど実績のあるベクターです。

本研究ではさらに、温度感受性センダイウイルスベクターを 38°C の高温環境培養により除去する過程で、熱ストレスが中胚葉^{注4)}系への分化および骨格筋細胞の成熟にも促進的に働くことを見出しました。最終的に得られた骨格筋細胞は、電気刺激に対して応答し、その機能を有していました。

この技術は、ヒト骨格筋作製を簡便にし、疾患モデル研究の有用な手段となると考えられます。

3. 研究結果

温度感受性センダイウイルスベクターを用いて、ES 細胞/iPS 細胞に転写因子 Myod1 を外来性に強制発現させると、成熟骨格筋細胞のマーカーである Myosin heavy chain(MHC)陽性の骨格筋細胞が誘導されました。本研究で Myod1 の導入に用いた温度感受性センダイウイルスは、高温環境で培養することにより細胞内から除去される特性を持っています。この特性を利用して、分化誘導途中の細胞内にとどまっている温度感受性センダイウイルスベクターを除去するために、38-40°C の高温環境において 5 日間培養しました。この一過性の高温環境培養は、熱ストレスを分化過程にある細胞に加えることで、中胚葉系あるいは骨格筋系細胞への分化誘導効率と成熟化も促進させることを見出しました(図1)。

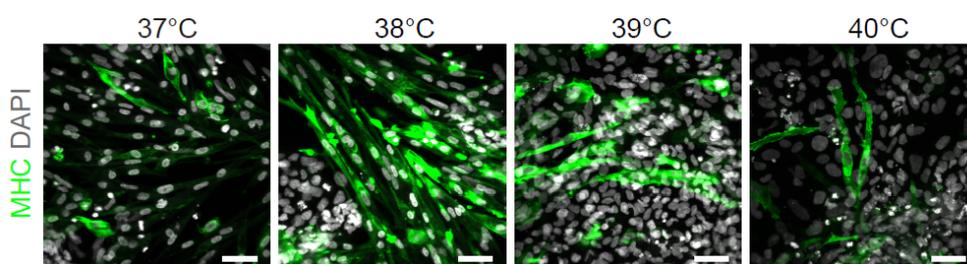


図1: 通常環境(37°C)と高温環境(38-40°C)において 5 日間培養した骨格筋細胞(分化開始から 8 日目)

Myosin heavy chain (MHC)陽性の骨格筋細胞は、通常の培養環境である 37°Cと比較して、より高い温培養温度環境にさらされることで成熟した形態である紡錘形の筋管類似形態を呈する細胞の数が増加する。しかし 39°Cあるいは 40°Cでは細胞数減少と細胞形態の変化など細胞障害が生じた。スケールバーは 100 μ m を示す。

さらに、多能性幹細胞に特異性の高い糖鎖である rBC2LCN を指標として、残存する ES 細胞/iPS 細胞を能動的に除去することで、80-90%を超える高い純度の骨格筋細胞を調整することができました(図2)。

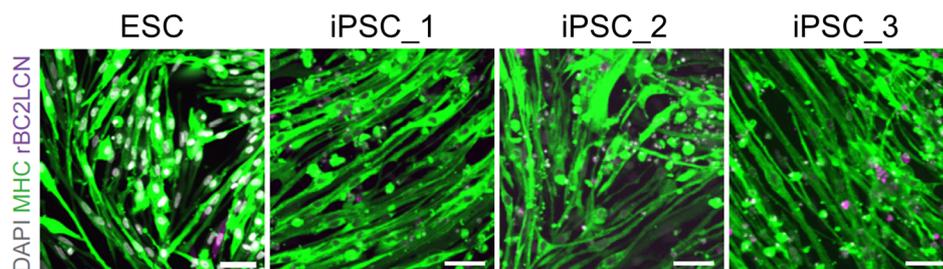


図2: ES 細胞/iPS 細胞から分化誘導した骨格筋細胞(分化開始から 14 日目)

ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞から、Myosin heavy chain (MHC)陽性の骨格筋細胞が誘導された(iPSC-1、iPSC-2、iPSC-3 はサンプルの違いを示す)。その一方で、多能性幹細胞に特性の高い糖鎖である rBC2LCN 陽性細胞は分化過程で除去され、分化開始から 14 日目の時点でほとんど観察されなくなった。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。

最後に、本研究の手法により分化誘導した骨格筋細胞の機能を確認するため、電気刺激への反応性を調べました。結果、ヒト ES 細胞あるいはヒト iPS 細胞から分化誘導した骨格筋細胞すべてにおいて電気刺激への反応性を示していることが確認できました(図3)。

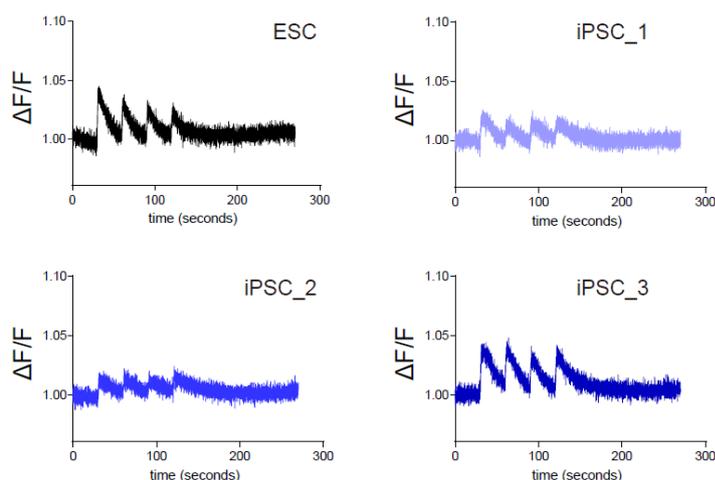


図3: 骨格筋細胞の電気刺激反応性

縦軸はカルシウム指示薬が呈する蛍光の、基底状態からの強度変化率 ($\Delta F/F$)、横軸は経過時間を示す。(iPSC-1、iPSC-2、iPSC-3 はサンプルの違いを示す。) 30 秒おきに電気刺激を加えると、電気刺激応答性に蛍光強度が増強することから、本研究で調整された骨格筋細胞は電気刺激に応答し、その機能を有することが示された。

4. まとめ

本研究では、温度感受性センダイウイルスベクターを用いて、ヒト ES 細胞/iPS 細胞から骨格筋細胞を簡便に作製する技術を開発しました。本手法は、分化誘導効率が高いこと、また骨格筋細胞の純度が高いことから、さまざまな患者さんの iPS 細胞からの分化誘導が必要とされる神経筋疾患の病態モデル構築や創薬研究に利用されることが期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Simple derivation of skeletal muscle from human pluripotent stem cells using temperature-sensitive Sendai virus vector”

○ ジャーナル名

Journal of Cellular and Molecular Medicine

○ 著者

Ghee Wan Tan¹, Takayuki Kondo^{1,2,3*}, Keiko Imamura^{1,2,3}, Mika Suga^{1,2}, Takako Enami^{1,3}, Ayako Nagahashi^{1,3}, Kayoko Tsukita^{1,2}, Ikuyo Inoue^{1,3}, Jitsutaro Kawaguchi⁴, Tsugumine Shu⁴, Haruhisa Inoue^{1,2,3*}

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所
 2. 理化学研究所バイオリソース研究センター(BRC) iPS 創薬基盤開発チーム
 3. 理化学研究所革新知能統合研究センター(AIP) iPS 細胞連携医学的リスク回避チーム
 4. 株式会社 ID ファーマ 研究開発センター
- * 責任著者

6. 本研究への支援

本研究は、AMED 再生医療実現拠点ネットワークプログラム(iPS 細胞研究中核拠点)により支援されました。

7. 用語説明

注1) 転写因子

DNA に結合し、DNA から RNA への転写に関わる因子。タンパク質合成は、DNA 上の遺伝子を鋳型に mRNA が転写され、この mRNA が核外のリボソーム上で翻訳される過程で成り立っている。転写因子は、転写開始に関わる因子で、DNA に結合して働くものや因子間の相互作用によって機能するものがある。

注2) 温度感受性センダイウイルスベクター

ベクターとは遺伝子の「運び手」で、生体内外において核酸物質を細胞内へ導入し細胞の機能を改変する能力を持つ。ウイルス法は、一般的に遺伝子導入効率は高いものの、その細胞毒性やゲノム障害性に問題があったが、センダイウイルスベクターは、遺伝子が標的細胞の核内に侵入せず染色体に組み込まれないという特長を持ち、安全性や効率の面で優れている。さらに本研究で用いたセンダイウイルスベクターは遺伝子配列に工夫がなされており、高温培養を経ることで細胞内から除去される性質を獲得しています。

注3) 熱ストレス

熱環境をはじめとする多様な外環境に起因する細胞ストレスが、個体では炎症応答など、あるいは細胞レベルでは細胞応答機能などに影響を及ぼすことが知られ、ほとんどの生物が持つ普遍的生命現象の一つ。

注4) 中胚葉

受精後の胚からできる細胞の塊はまず、内胚葉、中胚葉、外胚葉に分けられる。その後、内胚葉は、消化器官や呼吸器官を形成する。

本件担当: 京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA) 国際広報室
TEL: 075-366-7005
FAX: 075-366-7185
Email: media@cira.kyoto-u.ac.jp

理化学研究所 広報室 報道担当
E-mail: ex-press@riken.jp

株式会社アイロムグループ
社長室(広報担当)
TEL: 03-3264-3148
E-mail: web-info@iromgroup.co.jp