

細胞融合機構を利用した筋ジストロフィーに対する再生医療

梅澤 明弘¹, 川道 弥生², 齋藤 加代子²

(¹国立成育医療研究センター, ²東京女子医科大学)

1. はじめに

細胞融合を生じることで多核細胞形成は、発生分化過程、生理的反応、病的反応にて認める。骨格筋細胞は発生過程で融合し多核となり、分化過程そのものが融合と切り離すことができない。精子と卵子の受精も、特殊な例かもしれないが異なる細胞間の融合である。胎盤の絨毛で母体血と接触する部分に存在する細胞性栄養細胞は融合し、合体性栄養膜細胞となる。また、マクロファージは融合し異物巨細胞を形成する。造血幹細胞に由来する破骨細胞も多核である。また、再生医療における移植細胞が生着した部位で宿主の細胞と融合することが知られている。さらに、人為的ではあるが、ハイブリドーマ作製、iPS細胞の元となる考えを提示したES細胞と体細胞の融合研究がある¹⁾。このような細胞融合機構を解明することが最も大事であるが、ここでは分子メカニズムではなく、細胞融合が再生医療という分野にとって役立つことを紹介したい。具体的には移植細胞が宿主細胞と融合することで筋ジストロフィーが治療できることを提示する。

2. 筋ジストロフィーとは

筋ジストロフィーは進行性の筋力低下と筋萎縮を伴う筋繊維の変成・壊死・再生を主な病理像とする遺伝子性疾患の総称である。その中でジストロフィンの欠損によるDuchenne (デュシェンヌ) 型筋ジストロフィーは筋ジストロフィーの中で最も頻度が高いX連鎖劣性遺伝性疾患であり、かつ最も重症な進行性筋疾患である。男児のみに発症し、頻度は1/3,500人であり、幼少期に発症し多くは20歳代に心不全、呼吸不全により死亡する。Duchenne型

筋ジストロフィーの薬物療法として最近ステロイドホルモンが使用されているが、症状の進行を遅らす程度の効果しか得られず、対症療法が中心である。また、ジストロフィン遺伝子を導入する遺伝子治療法が注目されていたが、いまだ臨床応用には至っていない。これらの問題を解決する打開策として、近年、組織幹細胞を用いた障害組織に対する再生医療が注目されており、筋ジストロフィーにおいても例外ではない。細胞源としては、筋芽細胞、骨髄細胞などがあげられ、筋再生の供給源として期待されている。

3. 筋ジストロフィー動物に対する細胞融合戦略

近年、組織幹細胞を用いた再生医療が注目されており、細胞源として骨髄に由来する間葉系幹細胞などがあげられている²⁾。骨格筋再生においても、1989年Partridgeらは、正常新生仔マウスの筋から分離した単核細胞をジストロフィン遺伝子欠損mdx/scidマウスに移植することによりジストロフィン陽性細胞が発現する³⁾。細胞移植は従来の臓器移植と異なり、自己の細胞を含め、細胞レベルで臓器の機能を補填、改善することができる。細胞供給源として、骨髄間質細胞が注目されており、臨床応用への可能性が高い²⁻⁴⁾。同時に、子宮内膜、月経血、胎盤が候補にあげられ、これらの細胞は「初期値」の面からも骨格筋へのなりやすさ (preference) を有しており、筋ジストロフィーに対する細胞治療において有力な細胞供給源である⁵⁻⁷⁾。

どのようなメカニズムで移植細胞からジストロフィンが発現されるかは極めて興味深い (図1)。融合後の遺伝子発現で重要な研究のひとつに、多田氏によるES細胞と体細胞の融合研究がある¹⁾。この論文では、融合後にES細胞に存在する転写因子のお陰で、体細胞よりES細胞特異的遺伝子の発現が誘導されるというものである。体細胞の核に存在する特異的なクロマチン構造により、転写因子のみではそのような現象 (体細胞におけるES細胞特異的遺伝子の発現) は起きないと予想されるので、このことはES細胞中にはリプログラミング因子も存在し、体細胞核をリプログラミングしたと考えられる。この現象と同じことが移植細胞と宿主細胞との間の融合によって生じると思われる。

Cell fusion as a key mechanism for cell-based therapy towards Duchenne Muscular Dystrophy
Akihiro Umezawa¹, Yayoi Kawamichi² and Kayoko Saito²
(¹Center for Regenerative Medicine, National Research Institute for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan; ²Tokyo Women's Medical University)

すなわち、宿主細胞である骨格筋細胞に存在するジストロフィンを発現させる転写因子が移植細胞ゲノムに働いてジストロフィンを発現させる。宿主細胞のジストロフィン遺伝子は変異・欠損しているため、ジストロフィンの発現は移植細胞からのものであると結論づけられる。細かいことを言うと、宿主の変異から正常リパータントが生じる可能性は否定できないが、実験の上では使用している抗体・プライマーがヒト特異的であるので正常リパータントの可能性は否定できている。

4. どのような移植細胞が良いか

移植細胞は骨格筋細胞への分化能を有することが必要となる。一方、ジストロフィン遺伝子発現のためには、移植細胞が宿主の骨格筋内で融合することができれば分化能を有していなくても良いという考え方もありえる。分化能がなくとも融合能のみを獲得できれば良いわけであるが、ES細胞とは異なりリプログラミング因子が宿主細胞に存在しない可能性があるため、やはり骨格筋への分化を伴って、核が骨格筋のクロマチン構造になっていることが良い

と予想される。そのような分化能の観点から、子宮内膜、月経血及び胎盤に由来する細胞が移植細胞として好ましい。in vitro の検討では、5-azacytidine (5 mM) で24時間前処理した胎盤由来細胞は Skeletal myosin heavy chain を発現する (図)。また、胎盤由来細胞とマウス骨格筋芽細胞 C2C12 との融合率を試験管の中で検討したところ、高率な融合能を胎盤由来細胞は示した (図)。さらに、生体内における胎盤由来細胞の骨格筋細胞への分化を確認するため mdx/scid マウスを用いた移植細胞の骨格筋再生能を検討すると、マウス骨格筋中にヒト・ジストロフィンの発現を認めることができる (図)。胎盤は部位によって骨格筋への分化能に相違があり、特に胚外中胚葉である羊膜中胚葉、絨毛、絨毛膜、絨毛板には間葉系幹細胞が多く含まれると考えられた。

5. 融合能(分化能)を付与するエピジェネティクス修飾剤

筋ジストロフィーに対する再生医療の前臨床研究として、月経血からの細胞(脱落してきた子宮内膜細胞)を利用し、DNAメチル化阻害剤である5-アザシチジンを用い

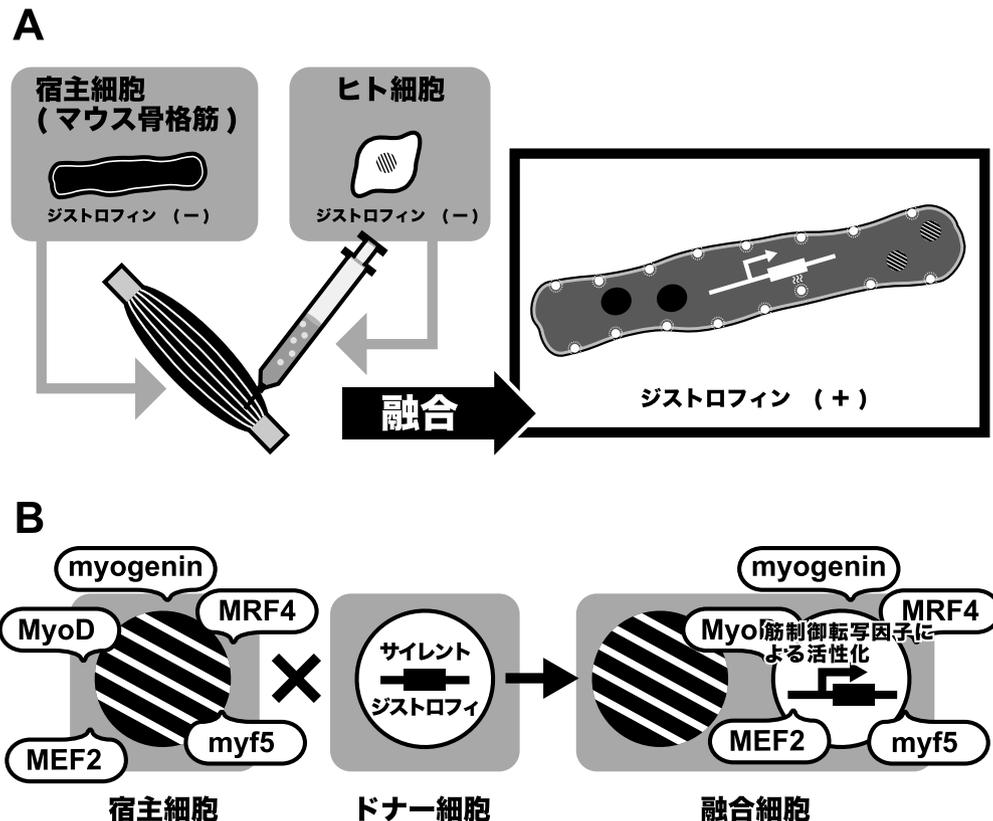


図1 細胞融合によって移植細胞のジストロフィン遺伝子が発現するメカニズム

マウス・筋ジストロフィーモデルでは、正常のジストロフィンタンパク質は発現していない。移植するドナー細胞となるヒト細胞ではジストロフィン遺伝子があり、宿主細胞と融合することで宿主の転写因子を用いてジストロフィン遺伝子は発現することになる。

テクニカルノート

て骨格筋細胞に分化させ、融合能を獲得させる⁵⁾。月経血由来細胞は、免疫不全動物への移植により骨格筋分化を示す。一方、試験管内においては、MyoD, Dystrophin を構成的に発現し、脱メチル化剤である 5-azacytidine 処理により、Desmin 陽性骨格筋線維への分化を示す。また、脱メチル化剤による分化誘導は濃度に依存し、5-azacytidine 濃度 5 μM (24 時間処理) にて最も分化が顕著である¹⁾。

この低分子の脱メチル化剤はランダムな脱メチル化を生じさせる。5-azacytidine は、ゲノムの DNA にとりこまれて DNA のメチル化を阻害するか、または methyltransferase の活性を阻害する。この細胞に特有の DNA メチル化状態を脱メチル化剤で変化させること自体は、細胞が分裂するとその細胞でいられなくなることを意味し、細胞の分化状態のリセットがかかることになる。

6. 高い細胞融合能を示す月経血由来細胞

ヒト子宮内膜は、再生、分化、そして月経周期の一部として剥離 (Shedding) する。その再生過程は月経周期のみならず分娩後にも見られ、閉経後でのエストロゲン投与でも認められる。月経のない種においては、生理的剥離の代わりに増殖とアポトーシスによる周期が存在する。ヒトの内膜における周期では、内膜虚血による剥離があり、月経血となるが、末梢血、臍帯血の「血」とは様相が異なり、月経血は「血」というよりも虚血に陥った内膜が多く存在し、組織と言える。この月経血を利用し、生体外で培養することにより、再生医療の供給源として利用でき、その細胞数は月経初日の塊状物を含む月経血では 10 万を超える。また、そのような月経血由来細胞は試験管内での増殖能は顕著である。月経血中に含まれる細胞は多彩な多分化能を示すというよりも骨格筋、心筋細胞への分化ポテンシャルがあることを強調したい。子宮内膜から発生する癌肉腫や肉腫に、横紋筋肉腫が多いことと関連しているかもしれない。

月経血を初めとするヒト細胞を培養することに関する倫理

月経血は、手術検体とは全く異なり病院を訪れる患者さんからインフォームドコンセントを得る訳ではなく、ボランティアにお願いすることになる。ボランティアは、広く多くの施設にポスター (図 1) を掲示することで自発的な意思によることが要求されることになる。また、個人情報関係から連絡先は、研究コーディネーターとする必要がある。連絡しやすいように、筆者らは研究コーディネーターを女性にお願いしている。同意書は、研究コーディネーターから個人情報管理者に送ることになり、情報は研究者には全く行かないことになる。研究においては、個人

情報は全く必要ないので連結不可能匿名化した状態で研究者に検体が送付される。

月経血からの培養

月経血 21 検体から、培養を開始した^{2,3)}。月経血検体は、ペニシリンとストレプトマイシンを最終濃度 100 U/ml とした 2% ウシ血清を含んだ基礎培地 (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium) を 25 ml 入れた 50 ml プラスチックチューブ (ファルコン) の中にボランティア自身が入れる (図 2: 月経血採取方法の説明文書, 図 3: 注意事項を記載した説明文書)。抗生物質添加は臍、皮膚、手指等々

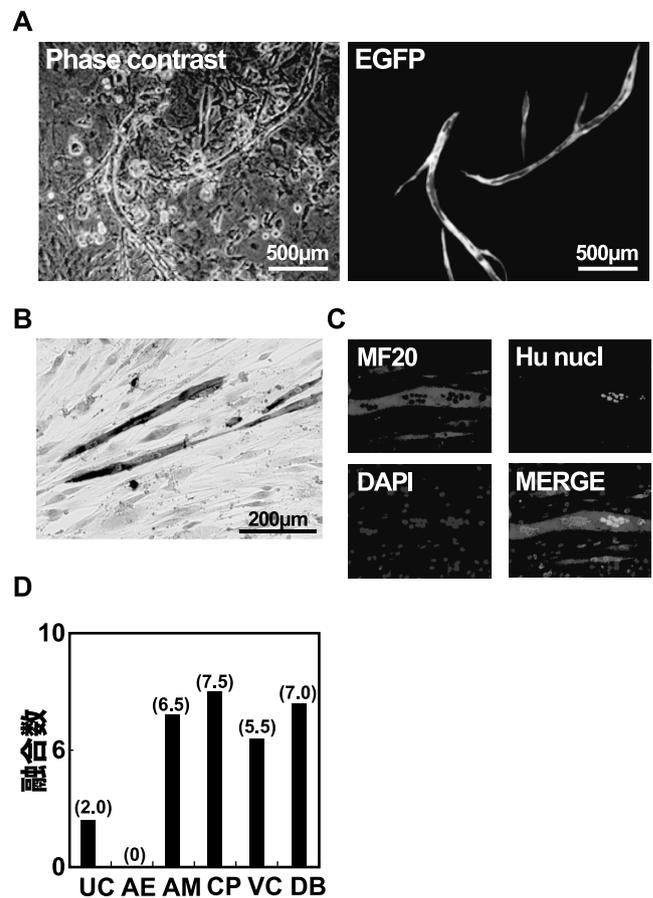


図 2 試験管内 (in vitro) における細胞融合

A. 共培養系における骨格筋分化。左は位相差顕微鏡写真で、右は骨格筋に分化したヒト細胞の蛍光写真。B. 脱メチル化剤によるヒト胎盤細胞の骨格筋へ分化させた。写真は骨格筋ミオシン重鎖に対する抗体を用いた免疫細胞化学。C. マウス由来筋芽細胞 (C2C12 細胞) と共培養を行い、ヒト胎盤細胞とマウス細胞の細胞融合による筋管細胞の形成。写真はヒト骨格筋ミオシン重鎖に対する抗体を用いた免疫細胞化学。D. 胎盤由来細胞の融合数 (1,000 個の細胞に認められる融合細胞の数)。UC: 臍帯血由来細胞, AE: 羊膜上皮細胞, AM: 羊膜由来線維芽細胞, CP: 絨毛板由来細胞, VC: 繁茂絨毛由来細胞, DB: 脱落膜由来細胞。

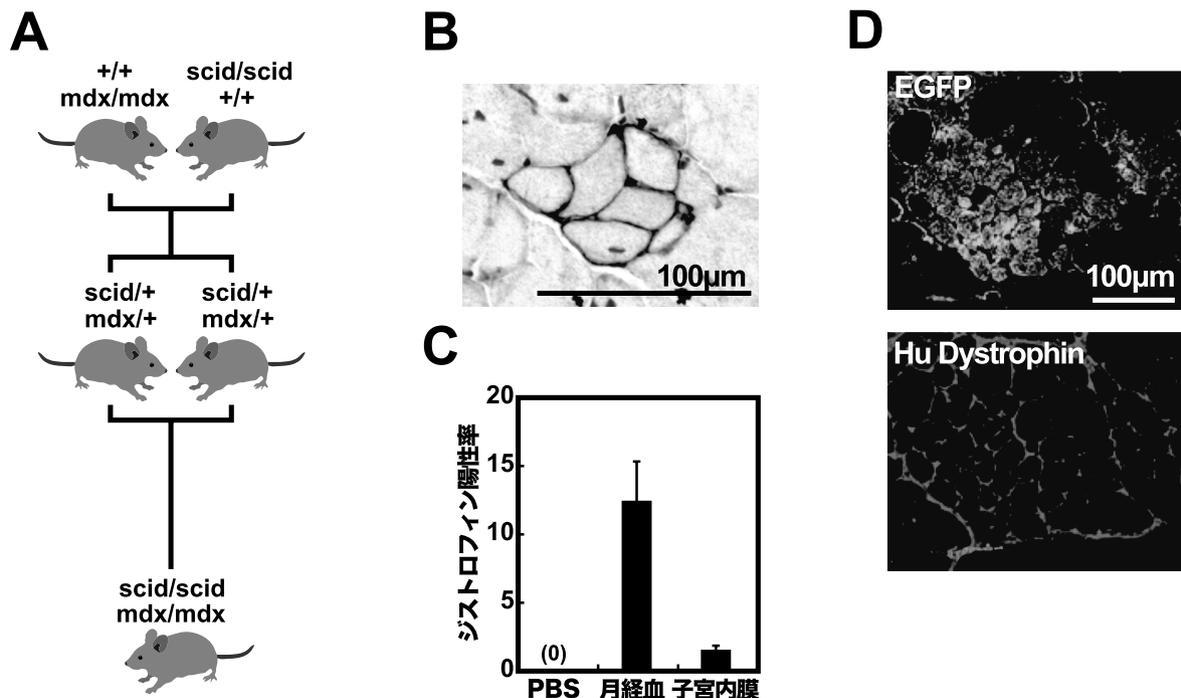


図3 生体内 (in vivo) における細胞融合

- A. mdx/mdx scid/scid マウスの作成。
 B. 羊膜細胞の mdx モデルマウス筋修復への寄与. 免疫不全 mdx モデルマウスの骨格筋に Amniotic mesoderm-derived cells を移植し, 3 週間後マウス骨格筋中にヒト・ジストロフィンの発現を認めた。
 C. ヒト月経血及び子宮内膜に由来する細胞を移植することによって出現するジストロフィン陽性率。
 D. 移植細胞 (EGFP でラベル) とヒト・ジストロフィンの免疫組織化学. DAPI 染色と Merge を同時に示す。
 E. 移植部位におけるヒト特異的のビメンチン抗体を用いた免疫組織化学. 間葉系細胞の場合, マウス細胞とヒト細胞を区別するのに, ビメンチン抗体はたいへん有効である。

からの細菌混入への対策であり, 実際に培養過程で細菌が増殖してくることはない. 抗真菌剤は使用していないが, 酵母, 真菌の増殖も認められない. マイコプラズマの検査は行っていない. 月経血は, 月経開始後初日から3日目の間になるべく採取をお願いしている. 月経血は説明文書に記載するように, 組織塊を含む場合と含まずに「さらさら」状態の場合がある. 組織塊が含まれた場合に多くの細胞が採取されているのではないかと類推するが, 実際のところは不明であり, いずれの検体からも多くの細胞が採取されている. 検体を受け取ってから24時間以内に培養を開始しているが, 壁付着細胞が存在し, 増殖する. なお, 郵送過程は常温としているが問題にならない. 夏場で気温が37度Cを超える場合も否定できないが, そのような場合は少ないと考えている. 逆に凍結されてしまうと細胞が死滅してしまうので, 常温としているところがある. なお, 当初は, このような手続きのために, 研究者に月経血が入った50mlチューブが届くまでに時間がかかるのが問題となるのではないかと心配していたが, 実際には月経血由来細胞はチューブ内の培地にて二日くらいは問題なく生存

していると思われ, 実質的に問題にならないので細かい検討は行われていない.

7. 細胞融合の効率を上昇させるためには

細胞移植は従来の臓器移植と異なり, 自己の細胞を含め, 細胞レベルで本来の臓器の機能を補填, 改善することができ, 組織幹細胞を用いた骨格筋の再生の細胞源として筋芽細胞, 骨髄細胞などがあげられている. しかしながらこれらの細胞は, 移植に必要な充分な量の細胞数の獲得と細胞移植後 in vivo での生存率限界がある. 子宮内膜由来細胞の分離培養, 細胞のプロファイルの確定後, 遺伝子導入による細胞寿命延長の検討を行ったところ, 筋ジストロフィーモデルマウスにおいてヒト・ジストロフィン発現を認めた. 細胞供給源として, 骨髄間質細胞が注目されており, 臨床応用への可能性が高い.

- 1) Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001) *Curr Biol.*, 11, 1553-1558.
- 2) Dezawa, M., Ishikawa, H., Itokazu, Y., Yoshihara, T., Hoshino,

テクニカルノート

-
-
- M., Takeda, S., Ide, C., & Nabeshima, Y. (2005) *Science*, **309**, 314–317.
- 3) Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., & Kunkel, L.M. (1989) *Nature*, **337**, 176–179.
- 4) Umezawa, A., Maruyama, T., Segawa, K., Shaddock, R.K., Waheed, A., & Hata, J-I. (1992) *J. Cell Physiol.*, **151**, 197–205.
- 5) Cui, C.H., Uyama, T., Miyado, K., Terai, M., Kyo, S., Kiyono, T., Umezawa, A. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 1586–1594.
- 6) Kawamichi, Y., Cui, C.H., Toyoda, M., Makino, H., Horie, A., Takahashi, Y., Matsumoto, K., Saito, H., Ohta, H., Saito, K., & Umezawa, A. (2010) *J. Cell Physiol.*, **223**, 695–702.
- 7) Cui, C.H., Miyoshi, S., Tsuji, H., Makino, H., Kanzaki, S., Kami, D., Terai, M., Suzuki, H., & Umezawa, A. (2011) *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 235–244.
- 8) Hida, N., Nishiyama, N., Miyoshi, S., Kira, S., Segawa, K., Uyama, T., Mori, T., Miyado, K., Ikegami, Y., Cui, C., Kiyono, T., Kyo, S., Shimizu, T., Okano, T., Sakamoto, M., Ogawa, S., & Umezawa, A. (2008) *Stem Cells*, **26**, 1695–1704.
-