

iPS 細胞由来骨格筋細胞機能比較に基づく 骨格筋機能変化の探索

順天堂大学 野中里紗
(共同研究者) 同 斉木臣二

Comparison of Skeletal Muscle Function Based on iPS Cell-Derived Skeletal Muscle Cell

by

Risa Nonaka, Shinji Saiki
*Department of Neurology, Juntendo University,
School of Medicine*

ABSTRACT

Skeletal muscle tissue is known to play an important role in not only motor function but also metabolic function in the body. It is considered that the metabolic rate in the female body is estimated about 70% of male, due to skeletal muscle mass difference. However, the mechanism, which causes skeletal muscle mass difference by gender, have not been completely clarified yet. In this study, we hypothesized that such difference in muscle mass by gender is caused by the difference in differentiation ability of muscle cell lineage. Therefore, we differentiated both female and male derived-iPSCs into skeletal muscle cells using a forced expression of h*MyoD1*. Both female and male iPSCs expressed Skeletal Muscle Actin by 9 days after h*MyoD1* overexpression. To evaluate muscle cell differentiation in both iPSCs, we continuously quantified the expression of myosin heavy chain (MHC), a marker of skeletal muscle cells, by western blotting. During the differentiation from iPSCs into muscle cells, male derived-cells began to express MHC earlier and expressed increased amount of MHC

at 9 days after h*MyoD1* overexpression compared to female derived-cells. These data may suggest that the differentiation potential into skeletal muscle might be accelerated in male-derived cells compared to female-derived cells and such characteristics might result in skeletal muscle mass difference by gender.

要 旨

骨格筋組織は、生命活動に重要な役割を果たすことが知られており、骨格筋量低下は運動能力低下のみならず全身性の代謝調節に影響を与える。女性の代謝調節機能は、男性の約70%と少なく、これは骨格筋量に依存すると考えられるが、性別による骨格筋量変化の機構は完全には明らかになっていない。本研究では、性差規定される筋分化能の差異を解析することを目的とし、女性由来および男性由来 iPS 細胞に h*MyoD1* 遺伝子を遺伝子導入し、既報の骨格筋細胞分化誘導法を行った。作製した女性由来および男性由来 iPSCs-MyoD 細胞においても、約9日で骨格筋細胞に発現する Skeletal Muscle Actin の発現を認め、骨格筋細胞への分化が検討可能であった。骨格筋細胞マーカーである Myosin Heavy Chain を指標とし、分化誘導過程における変化を比較検討した。その結果、女性由来細胞と比較し、男性由来細胞は早い段階から Myosin Heavy Chain (MHC) 発現を認め、経時的な増加を認め、骨格筋分化誘導能が高い傾向が示された。iPS 株数および iPS 株種の追加や更なる詳細検討により、骨格筋機能維持・強化の一助となる知見が得られることを期待する。

緒 言

成人の身体重量の約40%を占める骨格筋組織は、関節運動の円滑な動きや姿勢の維持の他に、熱産生による体温維持やインスリン標的組織として血糖調節などの内分泌器官として、生命活動に重要な役割を果たす為、骨格筋量低下は運

動能力低下のみならず細胞内ミトコンドリアによるエネルギー産生や血糖調節などの全身性の代謝調節に影響を与える¹⁾。女性は男性と比較し、筋力やミトコンドリアによる代謝調節機能などが約70%と少ないが、これらは骨格筋量に依存する（一部性ホルモンとの関連が示唆されている）と考えられるものの、性別による骨格筋量変化の分子機構は完全には明らかになっていない。また、女性の骨格筋量が少ない為、加齢による骨格筋量減少とそれに伴う筋力低下を示すサルコペニアの影響を受けやすく、さらに成人期の筋力強化・維持についても男性とは異なる方法論が必要になる可能性がある。近年、骨格筋分化制御因子 *MyoD1* (Myogenic differentiation Differentiation 1) を、ヒト iPS 細胞に遺伝子導入することにより、筋芽細胞・骨格筋細胞を約2週間の培養期間で約90%近くの高効率で再現性よく得る方法が報告され²⁾、この方法を用いた進行性・致死性筋肉変性疾患などの疾患・病態解析が行われている³⁾。また iPS 細胞由来骨格筋細胞を解析に用いることで性ホルモンの影響を受けずに年齢、性差背景に規定される骨格筋細胞機能の差異を解析することが可能であると考えられる。そこで本研究では、女性由来および男性由来 iPS 細胞に h*MyoD1* 遺伝子を遺伝子導入し、骨格筋細胞分化誘導法を行い、その分化誘導過程における骨格筋細胞マーカーの変化を比較検討することで性差背景のみに規定される筋分化能の差異を解析することを目的とした。

1. 研究方法

1. 1 細胞および細胞培養

ヒト iPS 細胞 (hiPSCs) ラインは, 女性皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞として 201B7 ライン, 男性皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞として EKA4 ラインを本研究に使用した. 201B7 は 30 代の女性由来細胞から樹立された細胞で, 京都大学・iPS 研究所 (Cira) より購入した⁴⁾. EKA4 は 40 代男性から樹立された細胞で, 慶應義塾大学医学部・生理学岡野博士より供与された⁵⁾. 全ての hiPSCs は, iMatrix-511 (nippi) コートしたディッシュ上で, Stem Fit[®] AK02N (AK02N) (Ajinomoto) 培地を用いて, 維持培養を行った. iPS 細胞の樹立および使用は慶應義塾大学および順天堂大学の倫理委員会に承認を得ている.

1. 2 hMyoD 遺伝子導入

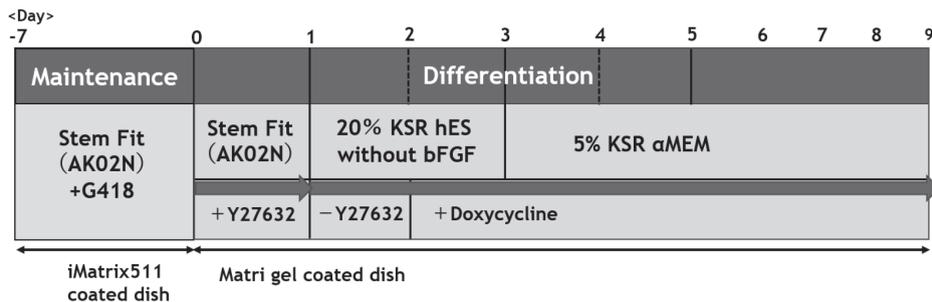
分化誘導法に必要なプラスミド DNA は (PBase および PB-hMyoD-m Cherry) は, それぞれ理研より購入および京都大学 iPS 研究所・櫻井博士より供与された²⁾. 各 hiPSCs は, 遺伝子導入の

2 時間前から 10 μ M Y27632 (Wako) 処理を行った. Y27632 処理を行った各 hiPSCs は, accutase (Nacalai Tesque) を用いてシングルセルにした後, Opti-MEM (Gibco) に 1.0 \times 10⁶ 個 /200ul になるように調整した. プラスミド DNA (各 5 μ g) は, 櫻井らの方法に準じ, NEPA21 electroporator (Nepagene) を用いて遺伝子導入した^{3,6)}. hMyoD 導入した細胞 (hiPSC-MyoD) は, 3 \times 10⁴ 個 /6 well plate の密度で播種し, 100 μ g/mL の G418 (Roche) を含んだ AK02N 培地でセレクションを行い, 維持培養を行った. 作製した hiPSC-MyoD は, 201B7-MyoD を女性由来細胞, EKA4-MyoD を男性由来細胞とし, 以下に用いる.

1. 3 骨格筋細胞分化誘導法

女性由来および男性由来細胞の骨格筋細胞分化誘導法は, 京都大学 iPS 研究所・櫻井博士らの方法に基づいて行った^{2,3,6)}. 本研究で用いた骨格筋分化誘導法の模式図を図 1 に示す. 女性由来および男性由来細胞は, accutase を用いてシングルセルにした後, Matrigel (BD Bioscience) コートしたディッシュ上へ 3 \sim 5 \times 10⁵ 個 /6well

<骨格筋細胞分化誘導プロトコールの模式図>



<骨格筋細胞分化誘導法における細胞分化>

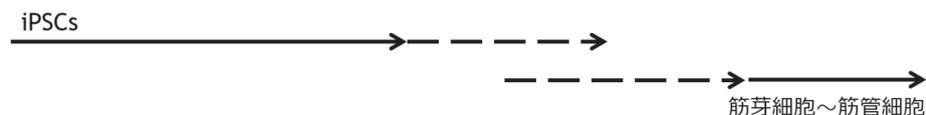


図1 iPS細胞からの骨格筋細胞分化誘導プロトコール

plateの密度で播種した。2日後、*hMyoD* 遺伝子は、テトラサイクリン誘導型である為、1 μ g/mlのDoxycycline (Dox;STEMGENT)を含んだhES培地(20% Knockout serum replacement (KSR; Life Technologies), DMEM/F12 (Wako), 2mM L-Glutamate (Nakalai Tesuque), 0.1 mM non-essential amino acids (Sigma), 0.1 mM, 2-mercaptoethanol (Sigma), and 0.5% Penicillin-Streptomycin Solution)⁴⁾で培地交換した。3日目以降の分化誘導は、Doxを含んだ5% KSR/ α MEM培地で行った。

1. 4 蛍光免疫染色法

分化誘導を行った女性由来および男性由来細胞は、4%パラホルムアルデヒドにて20分間処理し固定した。固定した女性由来および男性由来細胞は、5% BSA/0.3% Triton-X/PBSで10分間ブロッキング処理を行った後、一次抗体を希釈した5% BSA/0.3% Triton-X/PBSで処理し、一晩4 $^{\circ}$ Cで反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体を希釈したPBSで処理し、1時間室温にて反応させた。使用した一次抗体はSkeletal Muscle Actin (SMA)抗体(1:300; Thermo Fisher)、二次抗体は、Alexa Fluor[®] 488 goat Anti-mouse IgM抗体(1:500; Thermo Fisher)であった。

1. 5 ウェスタンブロット法

女性由来および男性由来細胞におけるタンパク質発現解析は、ウェスタンブロット法を用いた。各細胞は、細胞播種時をDay0として3日おきに、RIPAバッファー(50mM Tris-HCl (pH7.2), 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate)を用いて溶解した。細胞溶解液は、ソニケーターにてホモジナイズした後、12000rpmで遠心した後の上清を回収した。回収した上清中のたんぱく質を、Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo)を

用いて濃度測定した後、10 μ g/wellに調整した。調整したサンプルは、Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Gels 4-20%グラジエントゲル(BIO-RAD)で電気泳動を行い、分離したタンパク質は、Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (BIO-RAD)を用いて、Trans-Blot[®] Turbo[™] Mini-size PVDFメンブレン(BIO-RAD)に転写した。PVDFメンブレンは、PVDF Blocking buffer (TOYOBO)で1時間ブロッキング後、一次抗体を希釈した0.1% PVDF Blocking buffer/T-TBSで処理をし、1晩4 $^{\circ}$ Cで反応させた。T-TBSで洗浄後、二次抗体を希釈したT-TBSで室温にて1時間処理をした。T-TBSで10分 \times 3回洗浄し、PVDFメンブレンにSuper Signal[®] WestDura Extended Duration Substrate (Thermo)を用いて発光させた。Fusion Soloを用いて撮影を行った。使用した抗体は、抗Myosin Heavy Chain (MHC)抗体(1:2000; R&D System)、抗 β actin抗体(1:2000; abcam)、Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L) (1:5000; Jackson ImmnoResearch)、Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (1:10000; Jackson ImmnoResearch)であった。

2. 結果

2. 1 作製したhiPS-MyoD細胞の分化誘導

作製した女性由来および男性由来細胞の分化誘導を検討する為、前述した骨格筋分化誘導法にて分化誘導を行った。女性由来および男性由来細胞へ遺伝子導入した*hMyoD-mCherry* 遺伝子導入の確認は、Dox存在・非存在下にて*mCherry*発現により確認を行った。女性由来および男性由来細胞は、Dox非存在下では、*mCherry*の発現は認められなかったが、Dox存在下では、*mCherry*の観察が認められ、*hMyoD-mCherry*の遺伝子の導入が成されたのを確認した(図2-A)。そこで、骨格筋分化誘導法を行った女性由来および男性由

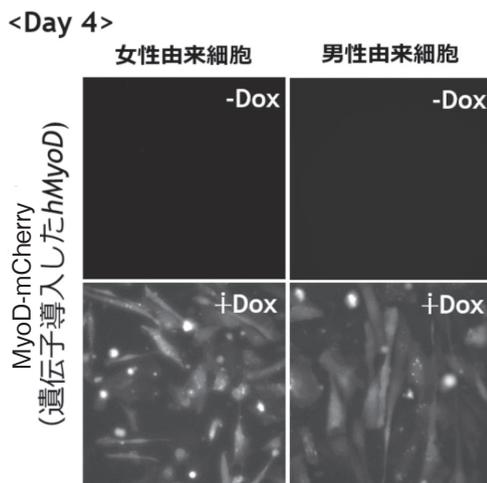


図2-A DoxycyclineによるMyoD強制発現

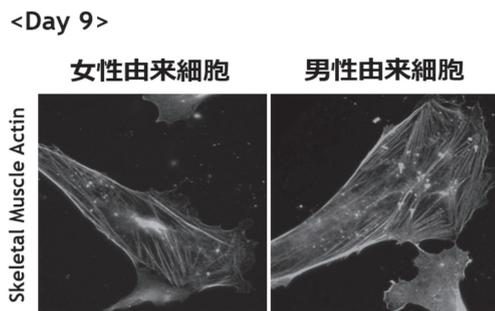


図2-B Skeletal Muscle Actinの発現

来細胞における、骨格筋細胞由来である Skeletal Muscle Actin の発現を免疫染色法にて検討した結果、骨格筋分化誘導法の Day9 において Skeletal Muscle Actin の発現が認められた (図 2-B)。

2. 2 骨格筋分化誘導能の比較検討

作製した女性由来および男性由来細胞の分化誘導能を比較検討する為、骨格筋細胞マーカーである Myosin Heavy Chain (MHC) の発現指標として、ウェスタンブロット法にて、経時的に検討を行った。骨格筋細胞マーカーである Myosin Heavy Chain (MHC) の発現は、女性由来および男性由来細胞どちらにおいても発現が認められたが、女

性由来細胞においては、Day9 (D9) において発現が認められた。一方、男性由来細胞においては、Day6 (D6) から発現が認められ、さらに Day9 (D9) では発現の増加が認められた (図 3)。



図3 Myosin Heavy Chain (MHC) の発現変動

3. 考 察

本研究では、女性由来および男性由来 iPS 細胞に h *MyoD1* 遺伝子を遺伝子導入し、骨格筋細胞分化誘導法を行い、その分化誘導過程における筋細胞マーカーの変化を比較検討することで性差背景のみに規定される筋分化能の差異を解析することを目的として行った。これまでに、ヒト iPS 細胞から筋細胞へ分化誘導する方法はいくつか報告されているが、転写因子の強制発現による中胚葉または間葉系細胞に分化する方法⁷⁾ やウイルス形質導入を用いる方法⁸⁾ などの分化工程の複雑さや、成熟した筋細胞へ分化するのに日数を要するなどの問題点があった。本研究で用いた方法は、筋分化転写因子である h *MyoD1* を Doxycycline (Dox) 誘導型 h *MyoD1* 遺伝子として遺伝子導入した細胞へ Dox を処理し強制発現させることで筋細胞へ分化誘導を行う方法であり、より簡便で、迅速かつ再現性の高いプロトコールとして報告された^{2,3)}。本研究においても同様に、女性由来 iPS 細胞の 201B7 および男性由来 iPS 細胞 EKA4 に対し、Dox 誘導型 h *MyoD1* 遺伝子を遺伝子導入し、分化誘導を行った結果、Dox 存在下のみで mCherry の観察が認められ、どちらの hiPSCs-MyoD 細胞においても、骨格筋分化誘導

法の Day9 には、骨格筋細胞に発現する Skeletal Muscle Actin の発現が認められた。このことは、作製した hiPSCs-MyoD 細胞においても、この骨格筋細胞分化誘導法を用いることで、約 9 日で骨格筋細胞への分化が検討可能であることが示唆された。この骨格筋分化誘導法を用いて、本研究の目的である女性由来細胞と男性由来細胞の骨格筋分化能の差異を比較検討する為、骨格筋細胞に発現する Myosin Heavy Chain (MHC) を指標とし、経時的にその発現をウェスタンブロット法にて検討した結果、男性由来細胞の方が、女性由来細胞と比較し、早い段階から Myosin Heavy Chain (MHC) 発現が認められ、経時的な増加が認められたことから、女性由来細胞と比較し、男性由来細胞の骨格筋分化誘導能が高い傾向が示された。筋発生は、多能性細胞から筋芽細胞、筋芽細胞が融合した多核の筋管細胞へと成熟する。本研究でも使用した iPS 細胞に遺伝子導入した筋分化調節因子の MyoD は、多能性細胞から筋芽細胞への分化決定や筋芽細胞の維持に関与していることが知られている^{9,10)} が、筋芽細胞から筋管細胞への分化は、筋分化調節因子の Myogenin が機能し、正常な筋管細胞の形成に関与していることが知られている^{11,12)}。骨格筋分化誘導過程における筋芽細胞の融合能の比較検討も必要であると考えられ、Myogenin の発現検討も必要であると考える。また本研究では、iPS 細胞株数が 1 ラインずつの比較の為、iPS 細胞株数を増やした検討が必要である。また近年、皮膚生検より侵襲性の少ない末梢血からの iPS 細胞株の樹立が行われており、末梢血由来の iPS 細胞株を用いた検討も必要であると考ええる。

4. 結論

本研究は、女性由来および男性由来 iPS 細胞に *hMyoD1* 遺伝子を遺伝子導入し、骨格筋細胞分化誘導法を行い、その分化誘導過程における骨格筋

筋細胞マーカーの変化を比較検討することで性差背景のみに規定される筋分化能の差異を解析することを目的として行った。その結果、男性由来細胞の方が、女性由来細胞と比較し、早い段階から Myosin Heavy Chain (MHC) 発現を認め、経時的な増加が認められ、骨格筋分化誘導能が高い傾向を示した。今後は、iPS 株数および iPS 株種の追加および更なる詳細検討が必要である。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に厚く御礼申し上げます。また本実験の遂行にあたり、ご協力いただきました京都大学 iPS 研究所、櫻井英俊博士、慶應義塾大学生理学教室、岡野栄之博士、順天堂大学、ゲノム・再生医療センター、赤松和土博士に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) 実験医学 :32 No.9
- 2) Tanaka A., Woltjen K., Miyake K., Hotta A., Ikeya M., Yamamoto T., Nishino T., Shoji E., Sehara-Fujisawa A., Manabe Y., Fujii N., Hanaoka K., Era T., Yamashita S., Isobe K., Kimura E., Sakurai H., Efficient and reproducible myogenic differentiation from human iPS cells: prospects for modeling Miyoshi Myopathy in vitro, *PLoS One.*, 23:8(4) e61540(2013)
- 3) Shoji E., Sakurai H., Nishino T., Nakahata T., Heike T., Awaya T., Fujii N., Manabe Y., Matsuo M., Sehara-Fujisawa A., Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, 5: 12831 (2015)
- 4) Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell.*, 131 (5) :861-72(2007)
- 5) Matsumoto T., Fujimori K., Andoh-Noda T., Ando T., Kuzumaki N., Toyoshima M., Tada H., Imaizumi K., Ishikawa M., Yamaguchi R., Isoda M., Zhou Z., Sato S., Kobayashi T., Ohtaka M., Nishimura

- K., Kurosawa H., Yoshikawa T., Takahashi T., Nakanishi M., Ohyama M., Hattori N., Akamatsu W., Okano H., Functional Neurons Generated from T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells for Neurological Disease Modeling, *Stem. Cell. Reports.*, 6(3) :422-35(2016)
- 6) Shoji E., Woltjen K., Sakurai H., Directed Myogenic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Methods Mol. Biol.*, 1353:89-99(2016)
- 7) Darabi R., Arpke R.W., Irion S., Dimos J.T., Grskovic M., Kyba M., Perlingeiro R.C., Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice, *Cell. Stem. Cell.*, 10(5) :610-9(2012)
- 8) Goudenege S., Lebel C., Huot N.B., Dufour C., Fujii I., Gekas J., Rousseau J., Tremblay J.P., Myoblasts derived from normal hESCs and dystrophic hiPSCs efficiently fuse with existing muscle fibers following transplantation, *Mol. Ther.*, 20(11) :2153-67(2012)
- 9) Rudnicki M.A., Braun T., Hinuma S., Jaenisch R., Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development, *Cell.*, 71(3) :383-90(1992)
- 10) Rudnicki M.A., Schnegelsberg P.N., Stead R.H., Braun T., Arnold H.H., Jaenisch R., MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle, *Cell.*, 75(7) :1351-9(1993)
- 11) Hasty P., Bradley A., Morris J.H., Edmondson D.G., Venuti J.M., Olson E.N., Klein W.H., Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene, *Nature.*, 364(6437) :501-6(1993)
- 12) Nabeshima Y., Hanaoka K., Hayasaka M., Esumi E., Li S., Nonaka I., Nabeshima Y., Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect, *Nature.*, 364(6437) :532-5(1993)