

# 学位論文抄録

ES細胞を用いたDuchenne型筋ジストロフィーの再生医療の開発  
(Development of an embryonic stem cell based therapy to treat Duchenne  
muscular dystrophy)

小 篠 史 郎

Shiro Ozasa

指導教員

三池 輝久 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児発達科学

紹介教授

遠藤 文夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学

## 学位論文抄録

### 【目的】

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) のモデル動物である mdx マウスに骨髄や骨格筋より分離した幹細胞 (SP cell) を経静脈的にマウスに投与したところ、全身の骨格筋へ移行し筋線維になることが解明され、こうした幹細胞移植により筋ジストロフィーの治療が可能であることが示唆された。一方、ES 細胞 (embryonic stem cell) は SP cell と異なり多分化能を保ったまま長期大量培養が可能であることが優れている点として挙げられる。ES 細胞を筋細胞に分化させ、その細胞を用いて Duchenne 型筋ジストロフィー治療に応用することを目的とした。

### 【方法】

Homologous Targeting によって ES 細胞の genome を改変し、MyoD 遺伝子が Tet-Off System に従う ES 細胞 (ZHTc6-MyoD) を作成した。この ES 細胞は doxycycline 存在下では未分化状態を保持するが doxycycline を除去すると筋分化特異的転写因子である MyoD が発現し筋細胞へ分化する。この細胞の性質を Western blotting、免疫染色、マウスを用いて in vitro および in vivo で解析した。

### 【結果】

ZHTc6-MyoD 細胞は in vitro で doxycycline 除去後 5 日目には細長い形態を示し、経過とともに細長い細胞が増えていった。7 日目には癒合を開始し、10 日目で自発的に収縮する細胞が観察された。Western blotting では、doxycycline 除去後 2 日目から MyoD の発現が認められた。4 日目以降には desmin と myogenin が発現し、そして 8 日目以降に dystrophin の発現が確認された。免疫染色では分化誘導後 3-5 日目に一過性に Pax7 の発現が認められた。MyoD は 3 日目以降に核に限局した発現が認められた。desmin は 5 日目以降、fast myosin heavy chain および dystrophin は 10 日目以降に発現が認められた。Flowcytometry による解析では、未分化な ZHTc6-MyoD 細胞では CD34 陰性、Sca-1 陽性、c-kit 陽性であったが、doxycycline を除去することにより Sca-1 および c-kit も陰性となった。ZHTc6-MyoD を mdx マウスの腓腹筋に筋注したところ、14 日目に dystrophin 陽性の筋線維のクラスターを認め、dystrophin の RNA 解析にて ES 細胞由来の dystrophin が発現していることが確認された。mdx-nude マウスに筋注したところ腫瘍形成した。

### 【考察】

doxycycline の有無によって制御可能なプロモーターで MyoD の発現を調節することで、未分化状態を保ったまま ES 細胞を増殖させ、任意に骨格筋分化を促すことが可能になったと考えられる。

### 【結論】

doxycycline の有無によって筋分化を制御できる ES 細胞を確立した。in vitro では高率に分化するが in vivo では高い分化効率は得られず腫瘍形成するなど臨床応用には問題点が多い。