不死化 DMD 筋細胞における分化誘導の難しさ

牧(黒田)由紀子[#1]　住友日香[#1]　瀬尾めぐみ[#1]　大島玲子[#1]　三ツ井貴夫[#1]

＃1　独立行政法人　国立病院機構　とくしま医療センター西病院　臨床研究部　776-8585　徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2026.2.18　受理 2026.2.19　出版受託 2026.3.10

要旨

Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)は、発育とともに筋細胞が変性、壊死する疾患であり、その病態および根本的治療は明らかではない。病態解明には、モデル細胞の樹立が必須である。私達は DMD 研究を進める中で、他施設から DMD 患者生検筋より樹立した不死化 DMD および健常コントロール細胞の供与を受けた。しかしこの細胞がうまくいかず大変な思いをした。今回はその苦労した経験について報告する。供与を受けた不死化 DMD および健常コントロール細胞を推奨培地で起こし培養した後、種々の方法、具体的には分化培地2種類(DMEM＋10ug/mL インスリン, DMEM+2%house serum+1ug/mL インスリン)、誘導試薬 tunicamycin、細胞コート剤(コラーゲン、マトリゲル)、試薬添加時間検討を行い誘導後、筋芽から筋管細胞になるまで培養を行い、抗Dys抗体とDAPIとの2重染色を行った。筋芽細胞は分化誘導後、相互に融合して多核の筋管へと分化し、最終的に筋線維となるが、Dystrophin は筋管へと分化すると細胞膜が染まるようになり、融合前段階の整列状態では染色されなかった。また、マトリゲルを使用した場合はマトリゲルの中に培養され、染色すらできなかった。tunicamycin0.48ug/mL で50分添加後、分化培地 DMEM＋10ug/mL インスリンに交換し4日間培養すると Dystrophin を染色できた。 DMD の病態解明は、治療法発見のため重要であり、モデル細胞が染色できるようになったことで、今後は、DMD に有効な治療法の開発につなげたい。

キーワード：Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)、不死化 DMD 細胞

背景と目的

Duchenne 型筋ジストロフィー症(DMD)は、発育とともに筋細胞が変性、壊死する疾患であり、その病態および根本的治療は明らかではない。病態解明には、モデル細胞の樹立が必須である。私達はDMD研究を進める中で、他施設からDMD患者生検筋より樹立した不死化DMDおよび健常コントロール細胞の供与を受けた。しかしこの細胞がうまくいかず大変な思いをした。今回はその苦労した経験について報告する。

対象と方法

供与を受けた不死化DMDおよび健常コントロール細胞を推奨培地で起こし培養した後、種々の方法、具体的には分化培地 2 種類(DMEM ＋ 10ug/mL インスリン, DMEM+2%house serum+1ug/mL インスリン)、誘導試薬 tunicamycin、細胞コート剤(コラーゲン、マトリゲル)、試薬添加時間検討を行い誘導後、筋芽から筋管細胞になるまで培養を行い、抗 Dys 抗体と DAPI との 2 重染色を行った。(図 1, 図 2)

図 1

Correspondence to: 牧(黒田)　由紀子. 独立行政法人　国立病院機構　とくしま医療センター西病院　臨床研究部　776-8585　徳島県吉野川市鴨島町敷地1354番地 Phone: +81-88-324-2161　Fax：+81-88-324-8661 **e-mail: maki.yukiko.yd@mail.hosp.go.jp**

図2

Pathology	Mutation	Name	Muscle	Age	Gender
Control	none	KM1421	Paravertebral	13 ys	F
	none	AB1190	Paravertebral	16 ys	M
DMD	Del 48-50	AB1096	Paravertebral	14 ys	M
	Del 52	KM1328	Paravertebral	16 ys	M

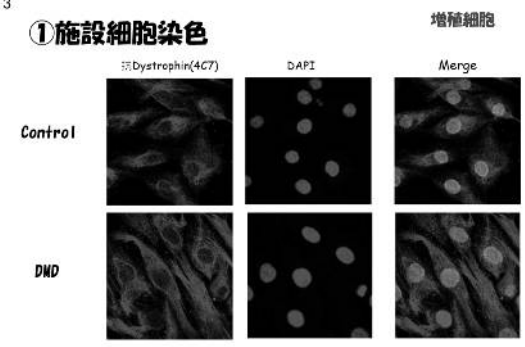
結果

施設①〈MRC Centre for Neuromuscular Diseases (MRC CNMD) Biobank London〉増殖細胞染色

図3に示すように、DMD細胞でもControl同様、抗Dystrophin抗体が染色された。何度かトライしたが、同様の結果だった。①施設に問い合わせてみたが、こちらの手技を疑われただけだった。そこで②施設で供与を受けることになった。

筋芽細胞(Myoblast)は、細胞分裂を繰り返し、相互に融合して多核の筋管細胞(Myotube)へと分化し、最終的に筋線維となる。Dystrophinは分化し筋管細胞になるとはじめて発現するタンパクであることが分かった。そのため、増殖細胞では発現しないはずであり、図3の染色は抗体にも問題があり、Dystrophinが染色されていたのは非特異反応であると考えられた。

図3

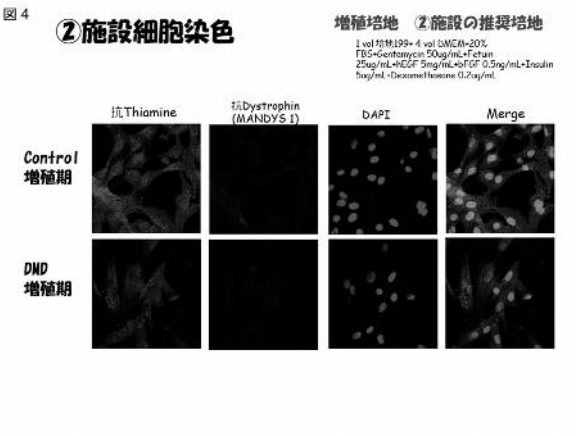


DMD細胞でもControl同様、抗Dystrophin抗体が染色された。何度かトライしたが、同様の結果だった。①施設に問い合わせてみたが、こちらの手技を疑われただけだった。そこで②施設で供与を受けることになった。

施設②〈Institut de Myologie, Paris (Sorbonne Univ France) 〉増殖細胞染色

Dystrophin抗体を変更し、増殖細胞でDystrophinが染色されないことを確認した。そこで分化誘導を開始した（図4)。

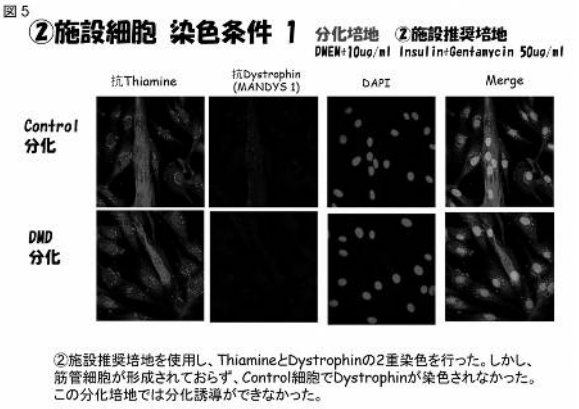
図4



施設② 分化細胞染色

分化培地を②施設推奨培地 DMEM+10ug/ml Insulin+Gentamycin 50ug/ml に変更しThiamineとDystrophinの2重染色を行った。しかし、筋管細胞が形成されておらず、Control細胞でDystrophinが染色されなかった。この分化培地では分化誘導ができなかった（図 5)。分化培地を変更したがControl細胞でDystrophinが染色されなかった（図6)。分化誘導試薬Tyunicamycinやコート剤（マトリゲル）も変更してみたが、いずれも筋管細胞が形成されなかった(図 7)。試行錯誤の末、コラーゲンコートを使用し、増殖培地で 90%コンフレントまで培養し、

図5



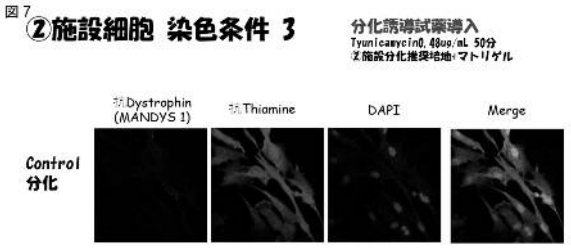
②施設推奨培地を使用し、ThiamineとDystrophinの2重染色を行った。しかし、筋管細胞が形成されておらず、Control細胞でDystrophinが染色されなかった。この分化培地では分化誘導ができなかった。

分化誘導試薬であるtunicamycin0.48ug/mLで50分刺激後、分化培地DMEM＋10ug/mLインスリンに交換し.4日間培養するとDystrophinを染色できた（図8）[1)]。

図6

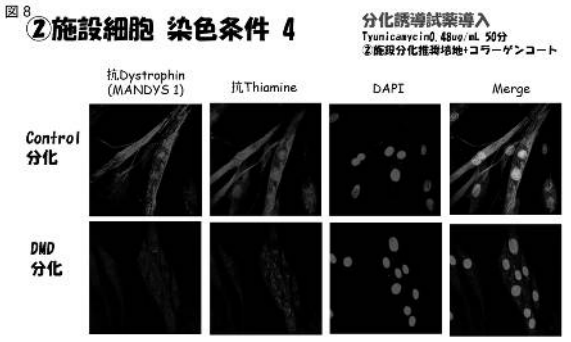
分化培地を変更し4日培養後、コントロール細胞をThiamineとDystrophinの2重染色を行った。しかし、この条件も染色条件 1と同様、筋管細胞が形成されておらず、Control細胞でDystrophinが染色されなかった。分化培地変更だけでは分化させることができなかった。

図7



分化誘導試薬 Tyunicamycin 0.48ug/mlで50分刺激したのちに、②施設分化推奨培地に変更し、さらにマトリゲルコートで培養したが、いずれも筋管細胞が形成されておらず、Control細胞でDystrophinが染色されなかった。

図8



増殖培地で90%ほどコンフレントで培養し、分化誘導試薬 Tyunicamycin で刺激後、②施設推奨分化培地に変更し、コラーゲンコートで培養を行った。その結果、Control細胞でようやく筋管細胞形成が確認され、Dystrophinが細胞膜で染色された。誘導試薬前にコンフレント状態手前まで生育させておくことが重要であることがはじめて分かった。

まとめ

2施設からDMD患者生検筋より樹立した不死化DMDおよび健常コントロール細胞の供与を受けた。Dystrophin は分化し筋管細胞になるとはじめて発現するタンパクであることが分かった。分化誘導は、推奨培地に変更しただけではうまくいかず、試行錯誤の末、どうにか筋管細胞が形成されるようになり、Dystrophin が細胞膜で染色されるようになった。DMD のモデル細胞はモデル動物とともに、病態解明ならびに治療法開発に極めて有用である。しかし、素人にはモデル細胞の作製も簡単ではないことを痛感した。

引用文献

1) Keiko N, Naoshi D, Nobuhiro M Endoplasmic reticulum stress increases myofiber formation in vitro FASEB J. 2007 Sep;21(11):2994-3003.