

移植した。この際、移植期間中は免疫抑制剤 Mycophenolate mofetil と Cyclosporine を服用させた。移植3日、10日後に筋生検を行い、eGFP抗体およびCD44抗体による免疫染色にて移植細胞を確認した。さらに移植4週間後の組織でも、移植細胞の生着を確認した。次に、正常犬由来細胞を用いて患犬への同種移植を実施した。筋ジストロフィー犬においても正常犬と同様に免疫抑制剤を服用したが、副作用のため使用を中止した。移植から10日後、移植細胞の生着を確認できたが、IL-10の作用等を応用した安全で有効な免疫制御措置の必要性が示唆された。

D. 考察

増殖効率の高い間葉系幹細胞の調製法とベクター系を利用した分化誘導スイッチを開発した。これを用いて大量の間葉系幹細胞を分化誘導することが可能であり、同種移植にて移植細胞の生着が確認された。現在さらに経過を観察し、移植・分化効率、などについて検討中である。また、*mdx* マウスへの移植実験において、IL-10発現 AAVベクターの使用によって局所的な免疫制御が可能であり、免疫抑制剤の全身投与による副作用を回避できることが示唆された。筋ジストロフィー犬由来間葉系幹細胞への治療遺伝子導入とその移植に関しては、DLAの合致した筋ジストロフィー犬の繁殖計画が遅延したため、今後の検討課題とした。

E. 結論

本研究で開発した骨髄由来間葉系幹細胞の大規模培養および筋分化誘導技術は、移植細胞の調製において極めて有用であり、実用化に向け免疫制御処置の開発が期待される。

F. 健康危険情報 別紙に記載

G. 研究発表

1. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

- Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, Okada T, Takeda S:

Transduction Efficiency and Immune Response Associated With the Administration of AAV8 Vector Into Dog Skeletal Muscle. *Mol Ther* 17: 73-91, 2009

- Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K:
Retroviral Vector-Producing Mesenchymal Stem Cells for Targeted Suicide Cancer Gene Therapy. *J Gene Med*; in press
- Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, Miyagoe-Suzuki Y, Okada T, Takeda S:
Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther* 19: 719-730, 2008
- Liu Y, Okada T, Shimazaki K, Sheykholslami K, Nomoto T, Muramatsu S, Mizukami H, Kume A, Xiao S, Ichimura K, Ozawa K:
Protection against aminoglycoside-induced ototoxicity by regulated AAV vector-mediated GDNF gene transfer into the cochlea. *Mol Ther* 16: 474-480, 2008.
- Nomoto T, Okada T, Shimazaki K, Yoshioka T, Nonaka-Sarukawa M, Ito T, Takeuchi K, Katsura KI, Mizukami H, Kume A, Ookawara S, Ikeda U, Katayama Y, Ozawa K:
Systemic delivery of IL-10 by an AAV vector prevents vascular remodeling and end-organ damage in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Gene Ther* 16: 383-391, 2009
- Nonaka-Sarukawa M, Okada T, Ito T, Yamamoto K, Yoshioka T, Nomoto T, Hojo Y, Shimpo M, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ikeda U, Shimada K, Ozawa K:
Adeno-associated virus vector-mediated systemic interleukin-10 expression ameliorates hypertensive organ damage in Dahl salt-sensitive rats. *J Gene Med* 10: 368-374, 2008

【総説】

- Okada T, Ozawa K:
Vector-producing tumor-tracking multipotent mesenchymal stromal cells for suicide cancer gene therapy. *Front Biosci* 13: 1887-1891, 2008.
- Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A:
Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 30: 121-127, 2008.

【図書】

1. Okada T, Takeda S:
Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. in A Guide to Human Gene Therapy (ed. by Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin), World Scientific, NJ.(in press)

<和文>

【総説】

1. 笠原優子, 岡田尚巳, 武田伸一:
ウイルスベクターを用いた筋ジストフィーの治療法開発 医学のあゆみ226巻5号, 379-383, 2008
2. 岡田尚巳:
間葉系幹細胞を利用した筋遺伝子治療最新医学 63巻12号, 64-71, 2008

II. 学会発表

<国外>

1. Shin J, Ohshima S, Yuko K, Okada T, Takeda S:
Electrocardiographic improvement of *mdx* heart by transduction with rAAV9 *-microdystrophin*. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting, Boston, MA, USA, May 30, 2008.
2. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S:
Effective transduction of dystrophic dogs with rAAV serotype 8. American Society of Gene Therapy 11th Annual Meeting, Boston, MA, USA, June 1, 2008
3. Suzuki Y, Ito M, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K:
Recombinant extracellular matrix protein expressed in a limited number of cells propagates to the target organ throughout the body using its nascent tissue-targeting signal. 13th Congress of the International Federation of Societies for Histochemistry and Cytochemistry, Gdansk, Poland Aug 23-27, 2008
4. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Masuda A, Yoshimura T, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
Adeno-associated virus serotype 8-mediated targeting of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. 38th Annual Meeting, Society for Neuroscience, Washington DC, USA Nov 15-19, 2008
5. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Fukudome T, Yoshimura T, Masuda A, Takeda S, Krejci E, Ohno K:
rAAV8-mediated protein anchoring of asymmetric acetylcholinesterase to the synaptic basal lamina at the neuromuscular junction. The ASCG 48th annual

meeting, San Francisco LA, USA, Dec 13-17, 2008

6. Shin J, Ohshima S, Kasahara Y, Okada T, Takeda S:
Improvement of cardiac conduction abnormalities by rAAV9-mediated *microdystrophin* transduction in *mdx* mice. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 13, 2008
7. Kasahara Y, Nishiyama A, Shin J, Ohshima S, Okada T, Takeda S:
Myogenic differentiation of mesenchymal stem cell and cell therapeutic approach for Duchenne muscular dystrophy. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008
8. Ohshima S, Shin J, Nishiyama A, Yuasa K, Kasahara Y, Okada T, Takeda S:
Transduction efficiency and immune response with rAAV8 in dog skeletal muscle. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008
9. Ito M, Suzuki Y, Okada T, Takeda S, Fukudome T, Yoshimura T, Krejci E, Ohno K:
rAAV8-mediated protein anchoring therapy for congenital defect of collagen Q. The 14th Annual meeting of Japan Society of Gene Therapy, Sapporo, June 14, 2008

<国内>

1. 岡田尚巳:
AAV ベクターの作製と筋疾患遺伝子治療への応用 第14回日本遺伝子治療学会学術集会 平成20年6月13日、札幌
2. 岡田尚巳:
AAV ベクター作製法の工夫と筋疾患遺伝子治療への応用 日本医科大学ハイテクリサーチセンターセミナー 平成20年6月23日、東京
3. 岡田尚巳:
生活習慣病・神経筋疾患に対する細胞遺伝子治療の開発 第12回小児分子内分泌研究会 平成20年7月5日、小樽
4. 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田尚巳, 武田 伸一:
9型 AAV ベクターを用いた *mdx* マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 第3回筋ジストロフィー治療研究合同発表会 平成20年10月25日、山梨

班会議、シンポジウム等

1. 武田 伸一, 辛 鎮洪, 笠原 優子, 喜納 裕美, 岡田尚巳:

9型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーに対する治療研究を臨床に展開するための統括的研究、研究班会議 平成 20 年 12 月 3 日、東京

2. 大野 欽司、伊藤 美佳子、鈴木 優美、岡田 尚巳、武田 伸一、福留 隆泰、吉村 俊朗、Eric Krejci: Protein anchoring therapy による終板 acetylcholinesterase 欠損症治療 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィーおよびその関連疾患の分子病態解明、診断法確立と薬物治療の開発に関する研究、研究班会議 平成 20 年 12 月 15 日、東京
3. 武田 伸一、辛 鎮洪、笠原 優子、喜納 裕美、岡田 尚巳:

9型 AAV ベクターを用いた mdx マウス心筋へのマイクロ・ジストロフィン遺伝子導入と心電図異常の改善 平成 20 年度厚生労働省精神・神経疾患研究委託費、筋ジストロフィー総合班会議 平成 21 年 1 月 9 日、東京

4. 岡田尚巳: 骨髄間質細胞を用いたがん遺伝子治療第 7 回遺伝子治療シンポジウム「幹細胞の機能制御と難病治療への応用」平成 21 年 1 月 30 日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得なし
2. 実用新案登録なし
3. その他、特記事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

骨髄間質細胞からの筋細胞の誘導

分担研究者 出澤 真理
東北大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

骨髄間葉系細胞は患者本人からの採取が可能であり、旺盛な増殖力を有するので細胞移植治療に必要な細胞数確保が可能である。骨髄バンクの利用も展望できることから、再生医療の細胞ソースとして最適である。我々は、ヒトおよびげっ歯類の骨髄間葉系細胞から骨格筋系細胞を、他の要素を含まず特異的に効率よく誘導する方法を開発した。この誘導方法を用いて大型哺乳類での筋変性モデルでの有効性と安全性の検証を行なう。

A. 研究目的

骨髄間葉系細胞は浮遊性の造血系細胞とは異なり接着性があるために、骨髄穿刺で採取した骨髄液を培養すると、この性質の違いによって接着性細胞として容易に採取することが可能である。この細胞は増殖力も旺盛なので細胞数確保が短期間に可能である。たとえば数十 cc の骨髄液を培養することによって2-3週間で約1000万個の骨髄間葉系細胞を得ることが可能である。患者本人からの採取を行えば倫理問題のハードルが低い「自己細胞移植治療」も可能である。さらに既存の骨髄バンクを利用することも出来ることから、安全性などの面で現実性があり、ドナー提供などの観点からも利便性がある。

我々はヒトおよびげっ歯類などの骨髄間葉系細胞から非常に高い効率で骨格筋系細胞を誘導する方法を見いだした(Science, 2005)。誘導された細胞は骨格筋としての性質を示し、移植によって生体への生着も認められた。本方法の安全性と有効性を筋変性モデルへの移植や分子生物学的解析などを駆使して検証し、有効な細胞移植法を目指して研究を進める。

B. 研究方法

ヒト骨髄間葉系細胞（米国 SanBio, Inc.からの提供、および Cambrex 社より購入；東北大学倫理委員会承認済み）、ラット骨髄間葉系細胞、ビーグル犬骨髄間葉系細胞を用いる。高等哺乳類の筋ジストロフィーのモデルにはヒト Duchenne 型筋ジストロフィーと同一症状を呈するビーグル犬があるために、イヌ骨髄間葉系細胞を用いた。いずれも、継代4代目にて誘導を開始する。細胞を 1,700~1,900 cells/cm² の密度で継代し、24時間後に bFGF (10ng/ml), forskloin (FSK) (5μM), neuregulin (200ng/ml) および PDGF (5ng/ml)を含む 15% fetus bovine serum (FBS), alpha-MEM の培地で培養する。3-5日後、PCI-neo vector に mouse Notch1 の細胞質ドメイン(Notch intracellular domain, NICD)を組み込んだ plasmid をリポフェクションによって遺伝子導入し、G418を用いて選択する。細胞数の回復を待ち、ほぼ 100% confluent になった段階で多核の骨格筋細胞を誘導するために、2%ウマ血清培地、ITS serum-free medium、あるいは無処理の骨髄間葉系細胞の培養上清のいずれかを投与

し成熟骨格筋への誘導を開始する。ただし、上記の培養においては、ヒト骨髄間葉系細胞での誘導においてはヒト血清を用いた。

誘導した細胞における骨格筋マーカーの発現を real-time PCR、免疫染色等で検証を行なった。また誘導骨格筋の安全性を確認するために、核型解析によって染色体の変異、欠損等の有無を調べ、さらに、ヌードマウスの大腿筋にヒトからの誘導細胞を注入し、6ヵ月後に全身状態と病理検査を行い、腫瘍形成などの有無を確認した。

犬の骨格筋損傷・変性モデルとして声帯筋の損傷モデルの作成方法を検討した。声帯を動かす筋肉は複雑であるが、外転筋は後輪状披裂筋という喉頭の裏面にある筋肉のみである。これを切断すると声帯は外転しなくなるが、両側の声帯が外転しないと窒息してしまうので、一側のみを切断して、この部位に細胞移植して外転機能が再生するかどうかをファイバーで確認するという実験をおこなう。

(倫理面への配慮)

東北大学の組み換え DNA 実験委員会と動物実験委員会の指針に従って研究計画書を提出し、機関承認を得た後に実験を実施しており、今後も承認を得た計画のみを実行する。

ヒト骨髄間質細胞は SanBio Inc.(米国企業)から提供を受けた細胞を用いるが、実験におけるヒト細胞使用に関しては「東北大学医学部・医学系研究科倫理委員会」より「ヒト骨髄および臍帯組織由来間葉系細胞の解析研究(2008-82号)」で承認をすでに受けている。Notch の遺伝子導入実験は「東北大学 遺伝子組み換え実験計画承認」を得ている(研研 76-2-35号)。また動物実験委員会の承認に関しては神経誘導、骨格筋誘導、サルの実験、犬の実験に関して(20医動-89、20医動-90、20医動-91)の承認を得ている。

C. 研究成果

ヒトおよびラット骨髄間葉系細胞に bFGF、フォルスコリン、neuregulin および PDGF を含んだ培地で培養すると、この段階で筋肉発生の初期に認められる Pax7 が発現しており、筋前駆細胞様に分化したと考えられた。この細胞に NICD を導入すると骨格筋細胞へと分化転換し、MyoD、myogenin などの骨格筋特有のマーカーの発現が認められる。さらに分化培地(2%ウマ血清を含む DMEM 培地、あるいは ITS medium (Insulin-Transferrin-Selenate)) に切り替えることにより、一部の細胞が融合を開始し、成熟した多核の筋管細胞に分化し、Myosin-heavy chain, skeletal myosin, troponin などの細胞骨格蛋白と共に成熟マーカーとして知られている MRF4/Myf6 も発現するようになる。これらのことから、本誘導は筋肉発生と類似した機構によって骨髄間葉系細胞から骨格筋が誘導されているものと思われた。

この分化した最終産物には増殖可能な①単核の筋芽細胞(MyoD 陽性)、②骨格筋の幹細胞である筋衛生細胞(Pax7 陽性)、そして③成熟した多核の骨格筋細胞の3種類の骨格筋系譜の細胞が含まれていた。

健康犬のビーグル犬骨髄液から骨髄間葉系細胞を誘導したところ、ヒトおよびラットと同様に Pax7、MyoD、Myogenin 陽性の骨格筋系細胞群を得ることが出来た。骨格筋マーカーの発現を定量的に調べるためにヒトおよびビーグル犬から誘導した細胞における MyoD、Pax7、Myogenin、MEF2A の発現を real-time PCR にて検討した。その結果、誘導前の無処理の細胞では、ヒト、イヌいずれにおいても MyoD、Pax7、Myogenin の発現は見られず(ただし MEF2A は発現が認められる)、誘導に伴って顕著な定量的上昇が確認された。免疫染色においてもほぼ同様の傾向が見られた。

安全性の確認としてヒトおよびイヌから誘導した細胞の核型検査を行なった。その

結果、いずれのサンプルにおいても染色体の欠損、転座などの変異は認められないことが確認された。

また腫瘍形成の有無をみるために、ヒトから誘導した細胞 (donar #1(n=10), #2(n=7) いずれも 10~50 万細胞)、positive control としてヒト腫瘍性細胞である rhabdomyosarcoma (10~50 万細胞, n=10), negative control として PBS (n=10) を注入し、6 ヶ月間体重推移、全身状態の観察および移植 6 ヶ月後の全身および移植した大腿筋の病理検査を行なった。その結果、rhabdomyosarcoma では 2 匹で死亡、2 匹で腫瘍形成が認められたが PBS では全匹異常がなかった。さらに donar #1, #2 から誘導したヒトの細胞でも全く異常がみられず、病理変化でも腫瘍形成は認められなかった。

ビーグル犬の声帯筋損傷モデルの作成を行った。反回神経や他の組織を傷つけずに選択的に後輪状披裂筋のみを切除できるのか、また、切除したのち外転麻痺がファイバーで確認できるのか、を検証したところ、見事にコントロール実験は成功したことを確認した。

D. 考察

骨髄間葉系細胞は再生医療に用いる候補として多くの利点があるために、本研究で見出された方法は筋ジストロフィーの治療方法につながる可能性が期待される。我々の方法ではヒト、ラットのみならず、イヌなどの高等哺乳類の骨髄間葉系細胞からも誘導されていることから、本誘導法は汎用性の高い方法であると同時に「自己細胞移植治療」への発展が期待される。ただし、筋ジストロフィーは遺伝子変異があるために、おそらく近親者や同じ HLA サブタイプの骨髄間葉系細胞を利用した同種移植が現実的であろうと思われる。

E. 結論

安全性はヒトへの応用において重要な要

点であるが、誘導細胞の核型検査やヌードマウスでの腫瘍化試験の結果、際立った危険性は無いと推察される。さらに犬での有効性・安全性の確認はヒトへの応用に向けて非常に大きな意義があると考えられ、今後の推進すべき課題として認識している。今回声帯筋損傷モデルが片側性に作る事が確認されたので、ビーグル犬の骨髄間葉系細胞から誘導した骨格筋の移動に取り掛かる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Kentaro Nagane, Masaaki Kitada, Shohei Wakao, Mari Dezawa, Yasuhiko Tabata, (5人中4番目: Dezawa=correspondence): Practical induction system for dopamine-producing cells from bone marrow stromal cells by spermine-pullulan-mediated reverse transfection method. *Tissue Eng*; in press
2. Someya Y, Koda M, Dezawa M, Kadota T, Hashimoto M, Kamada T, Nishio Y, Kadota R, Mannoji C, Miyashita T, Okawa A, Yoshinaga K, Yamazaki M: Reduction of cystic cavity, promotion of axonal regeneration and sparing, and functional recovery with transplanted bone marrow stromal cell-derived Schwann cells after contusion injury to the adult rat spinal cord. *J Neurosurg Spine* ;9(6): 600-10, 2008

【欧文総説】

1. Dezawa M: The unexpected discovery of neuronal and muscle induction systems in bone marrow stromal cells; insights into auto-transplantation therapy. *Medical Molecular Morphology* 41(1): 14-19, 2008.

2. Kidata M & Dezawa M:
Differentiation system of neural and muscle lineage cells from bone marrow stromal cells; a new strategy for tissue reconstruction in degenerative diseases. *Histology and Histopathology* : (in press).
3. Dezawa M, Nabeshima Y-I:
Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy. "Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation" in *Research Signpost*, 79-92, 2008

<和文>

【和文著書】

1. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞からの骨格筋細胞の誘導, 田畑泰彦編, 遺伝子医学MOOK : メディカルドゥ社, pp.46-49, 2008.
2. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞からの神経細胞の誘導, 田畑泰彦編, 遺伝子医学MOOK : メディカルドゥ社, pp.54-56, 2008.

【和文総説】

1. 北田容章, 出澤真理:
神経・筋変性疾患における細胞移植治療; 骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植への可能性, *Clin Neurosci* : (in press).
2. 出澤真理:
筋ジストロフィーと細胞移植治療, *医学のあゆみ* 226: 393-396, 2008.
3. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞を用いた神経筋疾患治療の可能性, *最新医学* 63: 55-63, 2008

II. 学会発表

【シンポジウム・特別講演】

1. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞における胚葉を越えた多分化能と自己細胞移植治療への挑戦, 第113回日本解剖学会, 大分, 3月, 2008.
2. Dezawa M:
Insights into autotransplantation: the discovery of specific induction systems in

bone marrow stromal cells. Chicago Neural Repair Club, Children's Memorial Research Center, Northwestern Univ., Chicago, April, 2008.

3. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞の胚葉を超えた分化転換の誘導と自己細胞移植治療への可能性, 第59回東北臨床超微形態懇話会, 仙台, 6月, 2008.
4. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞の神経系細胞・筋細胞への誘導システムと変性・損傷疾患への応用の可能性, 第31回日本神経科学会, 東京, 7月, 2008.
5. 出澤真理:
思わぬ発見のもたらした骨髄間葉系細胞の分化転換システムと自己細胞移植治療の可能性, 女性研究者の現状とこれから. Educational Cardiology in Chiba, 千葉, 9月, 2008.
6. Dezawa M:
A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases, The 21st Chinese SCI Academic Annual Meeting & The 3rd International SCI Treatments & Trials Symposium, Beijing, China, October, 2008.
7. Dezawa M:
A challenge to auto-transplantation in neuro- and muscle-degenerative diseases: the discovery of specific induction systems in bone marrow stromal cells, Adult Stem Cells-Biology and Clinical Applications Conference, Brisbane, Australia, November, 2008.
8. 出澤真理:
自己細胞移植による神経・筋肉変性疾患の根本的治療法の開発, 医薬基盤研究所基礎研究推進事業研究成果発表会, 大阪, 12月, 2008.
9. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞を用いた自己細胞移植による神経・筋変性疾患の根本治療法の開発, シンポジウム「再生医療のブレークスルーを目指して」, 東京工業大学, 1月, 2009.
10. 出澤真理:
骨髄間葉系細胞の胚葉を超えた分化転

換と神経・筋変性疾患への自己細胞移植治療の可能性，第32回仙台BMT懇話会，仙台，1月，2009.

H. 知的所有権の出願・登録状況
なし

骨髄間質細胞から誘導した筋細胞の移植法の確立

分担研究者

鍋島 陽一

京都大学大学院医学研究科・教授

研究要旨

筋ジストロフィなどの筋変成疾患の治療法の開発が大きな課題となっており、薬物の開発、遺伝子治療、細胞移植治療などの多面的な試みが進められている。このような中で、細胞治療に活用できる筋細胞系譜の細胞の樹立とその機能評価、安全性の確認について研究を進めてきた。我々は大量に培養可能な骨髄間質細胞から、骨格筋を極めて高い効率で誘導する画期的な方法を見出し、引き続いてラット、ヒト、サル、イヌの骨髄間質細胞より筋芽細胞、筋衛星細胞を誘導する方法を確立した。次いで、誘導された筋細胞の移植による生着率、効果の確認、ガン化などの安全性の確認を進めると共に、骨髄間質細胞からどのような機構で筋肉細胞が誘導されるかについての理解が細胞治療の可能性を更に発展させると考え、その分化転換機構の解析を進めた。

A. 研究目的

骨髄間葉系細胞は患者の骨髄液から容易に採取可能な接着性の間葉系細胞であり、旺盛な増殖能力を備えているので、細胞移植治療に必要な細胞数確保が可能である。また、免疫拒絶や倫理問題のハードルが低く、更に骨髄バンクがすでに稼動しており、何らかの理由で本人の細胞が利用できない場合でも、骨髄バンクを用いることによって、供給源を広げることができる。

細胞移植治療の目的は、変性過程で失われた細胞を補充することであり、目的とする細胞への分化制御機構の解析と実用化に向けた方法を検討する必要がある。本研究では骨髄間葉系細胞から効率よく安全に骨格筋細胞を誘導する方法の開発を行うことを目的として、分化転換、誘導システムの分子機構を検討する。

B. 研究方法

骨髄間質細胞はラット、ヒトの骨髄穿刺液

から樹立した接着性細胞を用いた。

(1) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導：

骨髄間葉系細胞を特定の密度(1700-2000 cells/cm²)でまいた後、サイトカイン投与(bFGF, Forskolin, PDGF, Neuregulin)を行い、その後 Notch 細胞質ドメイン(Notch intracellular domain; NICD)および、ラムドドメイン、アンキリンドメイン、転写活性化ドメインを持つ plasmid を lipofection を用いて導入し、G418 にて選択する。その後、confluent に達したところで分化培地(ウマ血清 2%)に移すことによって多核の筋細胞を誘導した。

誘導した筋細胞分画には筋芽細胞、筋衛星細胞が含まれている。筋衛星細胞を移植すると繰り返し、再生することになるので、効率よく筋衛星細胞を集める方法の確立を模索した。

(2) Notch 結合蛋白の検索

筋細胞への分化転換の鍵は Notch の役割を解明することであり、その一環として

Notch に結合する蛋白の解析を進めた。

骨格筋誘導に必要な領域がアンキリンドメインであったことから、このドメインと GFP キメラ蛋白を発現させ、結合蛋白の候補を免疫沈降により分離し、質量分析を行った。一方、NICD-GFP キメラタンパクを多量に合成し、アフィニティークラムを作成し、骨髄間質細胞の抽出液を通し、結合タンパクを分離し、質量分析を行った。

NICD に結合する分子についての研究は進展しており、それらの論文で記述されている分子について、我々のシステムにおける NICD の機能との関連を解析する目的で、発現、結合分子等の解析を行った。

(倫理面への配慮) 本プロジェクト全般において組み換え DNA 実験とモデル作成・移植における動物実験は各所属機関の組み換え DNA 実験委員会と動物実験委員会の指針に従って研究計画書を提出し、医学部長、研究所長、委員長等の機関承認を得た後に実施した。

骨髄間質細胞の分化誘導並びに分子生物学的解析は京都大学を中心に行うが、すでに京都大学大学院医学研究科・医学部動物実験委員会の承認を得ている(「骨髄間質細胞の骨格筋細胞への分化誘導と移植応用」承認番号: MedKyo04245)。ヒト骨髄間質細胞は BioWhittaker 社の細胞を用いるので倫理上問題は無い。Notch の遺伝子導入実験は京大の組み換え DNA 実験委員会の了承で行なっている(「体細胞の神経系および骨格筋細胞への分化転換の遺伝子機構について」(承認番号: 研研 2 第 2 2 4-2 号)。

C. 研究成果

(1) 骨髄間質細胞からの骨格筋誘導: ラット、ヒト、サル、イヌから骨格筋細胞を誘導することに成功し、ヒト骨格筋細胞の安全性試験を行い、高い安全性を確認した。

骨髄間質細胞にサイトカイン投与後、;

NICD、ラムドメイン、アンキリンドメイン、転写活性化ドメインを個別に発現させ、筋細胞分化誘導活性を測定したところ、アンキリンドメインに基本的な活性があることが明らかとなった。そこで、NICD-GFP、アンキリン-GFP からなるキメラ蛋白を発現させ、抗 GFP 抗体により免疫沈降を行った。次いで、得られた沈降物を SDS ゲル電気泳動で分離した。また、コントロールサンプルについても同様の処理を行い、SDS ゲル電気泳動で分離した。質量分析技術の感度が大きく上がったことから、全ゲル解析を行い、分化誘導サンプルとコントロールサンプルより得られた結合タンパクの候補をリストした。また、Pathway 解析等により、得られた結果からどのシグナル経路が筋細胞誘導に関わるかを解析しているが、いまだ結論には至っていない。また、別の方法としてアンキリン-GFP キメラ蛋白を多量に合成し、アフィニティークラムを作成し、細胞抽出液をかけて結合する蛋白を回収し、質量分析を進めている。

骨髄間質細胞から分化転換によって誘導された筋細胞分画には多核の筋管細胞、筋芽細胞、筋衛生細胞が含まれており、筋衛生細胞を分離増殖させることが重要と考えており、効率的に精製する方法を検討し、新しい方法の確立にとって重要な点が明らかになりつつある。

NICD の機能を説く上で興味ある報告があり、記述されている分子について、我々のシステムにおける NICD の筋細胞誘導メカニズムとの関連を解析している。

D. 考察

Notch は Hes の発現を誘導して分化を抑えらると思われてきたが、本誘導システムでは Notch が筋細胞、神経細胞への分化を誘導するシグナルとなっており、しかもアンキリンドメインのみでも誘導できる事実は Notch にはこれまで知られていない未知の機能があることを示唆しており、極めて興味深い。また、

筋細胞系の幹細胞である筋衛星細胞についての情報が蓄積され、細胞移植治療の発展に結びつくことを期待している。

E. 結論

我々は大量に培養可能な骨髄間質細胞から、骨格筋を極めて高い効率で誘導する画期的な方法を見出し、引き続いてラット、ヒト、サル、イヌの骨髄間質細胞より筋芽細胞、筋衛星細胞を誘導する方法を確立し、その分化転換機構の解析を進めた。特に Notch の細胞内ドメインの機能について、その結合タンパクを中心に解析を進めたが、結論には至っていない。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

I. 論文発表

<英文>

【欧文原著】

1. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y:
A Vascular-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. **Science** 317, 1722-1726, 2007
2. Nakagawa T, Nabeshima Y, Yoshida S:
Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. **Dev. Cell** 12, 1-12, 2007
3. Shiraishi S, Zhou C, Aoki T, Sato N, Chiba T, Tamura K., Yoshida S, Nabeshima Y, Nabeshima Y, Tamura T:
TBP-interacting protein 120B (TIP120B)/Cullin-associated and Neddylation Dissociated 2 (CAND2) inhibit SCF-dependent ubiquitination of myogenin and accelerates myogenic differentiation. **J. Biol Chem.** 282: 9017-9028, 2007
4. Tokunaga A, Oya T, Ishii Y, Motomura H, Nakamura C, Ishizawa S, Fujimori T, Nabeshima Y, Umezawa A, Kanamori M, Kimura T, Sasahara M:

PDGF receptor beta is a potent regulator of mesenchymal stromal cell function. **J Bone Miner Res.** 23: 1519-28, 2008

【欧文総説】

1. Yoshida S, Nabeshima Y, Nakagawa T:
Stem Cell Heterogeneity: Actual and potential stem cell compartments in the mouse spermatogenesis. **Ann NY Acad Sci** PMID 17: 905-929, 2007

<和文>

【和文総説】

なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Miyagoe-Suzuki Y.</u> , <u>Uezumi A</u> & <u>Takeda S.</u>	Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation	Tsuchida K & <u>Takeda S</u>	Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation	Research Signpost	Fort P.O., Trivandrum-69 5 023, Kerala, India	2008	61-78
<u>Dezawa M.</u> , <u>Nabeshima Y-I</u>	Transdifferentiation systems in bone marrow stromal cells and its application to muscle dystrophy: Insights into cell-based therapy	Tsuchida K & <u>Takeda S</u>	Recent Advances of Skeletal Muscle Differentiation	Research Signpost	Fort P.O., Trivandrum-69 5 023, Kerala, India	2008	79-92
<u>Okada T.</u> , <u>Takeda S</u>	Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy	Roland W. Herzog and Sergei Zolotukhin	A Guide to Human Gene Therapy	World Scientific	NJ, USA	in press	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yokota T, Lu QL, Partridge T, Kobayashi M, <u>Nakamura A.</u> , <u>Takeda S.</u> , Hoffman E.	Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs	<i>Ann Neurol.</i>			in press
<u>Miyagoe-Suzuki Y.</u> , Masubuchi N, Miyamoto K, Wada MR, Yuasa S, Saito F, Matsumura K, Kanesaki H, Kudo A, Many H, Endo T, <u>Takeda S.</u>	Reduced proliferative activity of primary POMGnT1-null myoblasts in vitro	<i>Mech Dev.</i>	126 巻 3-4 号	107-116	2009
Yokota T, <u>Takeda S.</u> , Lu QL, Partridge TA, <u>Nakamura A.</u> , Hoffman EP.	A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground	<i>Arch Neurol.</i>	66 巻 1 号	32-38	2009
Ohshima S, Shin JH, Yuasa K, Nishiyama A, Kira J, <u>Okada T.</u> , <u>Takeda S.</u>	Transduction Efficiency and Immune Response Associated With the Administration of AAV8 Vector Into Dog Skeletal Muscle	<i>Mol Ther.</i>	17 巻 1 号	73-80	2009
Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada S, Fukushima K, Imaizumi K, <u>Miyagoe-Suzuki Y.</u> , <u>Takeda S.</u>	Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts	<i>Am J Pathol.</i>	173 巻 3 号	781-791	2008

Sato K, <u>Yokota T</u> , Ichioka S, Shibata M, <u>Takeda S</u> .	Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNOS expression	<i>Acta Myol.</i>	xxvii	30-36	2008
Nishiyama A, Ampong BN, Ohshima S, Shin JH, Nakai H, Imamura M, <u>Miyagoe-Suzuki Y</u> , <u>Okada T</u> , <u>Takeda S</u> .	Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice	<i>Hum Gene Ther.</i>	19 卷 7 号	719-730	2008
Tanihata J, Suzuki N, <u>Miyagoe-Suzuki Y</u> , Imaizumi K, <u>Takeda S</u> .	Downstream utrophin enhancer is required for expression of utrophin in skeletal muscle	<i>J Gene Med</i>	10 卷 6 号	702-713	2008
Yuasa K, <u>Nakamura A</u> , Hijikata T, <u>Takeda S</u> .	Dystrophin deficiency in canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ) alters myosin heavy chain expression profiles in the diaphragm more markedly than in the tibialis cranialis muscle	<i>BMC Musculoskelet Disord.</i>	9 卷 1 号	1-12	2008
<u>出澤真理</u>	筋ジストロフィーと細胞移植治療	<i>医学のあゆみ</i>	226 卷	393-396	2008



Recent Advances in Skeletal Muscle Differentiation, 2008: 61-78 ISBN: 978-81-308-0232-9
Editors: Kunihiro Tsuchida and Shin'ichi Takeda

4

Side population (SP) cells and skeletal muscle differentiation

Yuko Miyagoe-Suzuki¹, Akiyoshi Uezumi² and Shin'ichi Takeda¹

¹Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira Tokyo 187-8502, Japan; ²Institute for Comprehensive Medical Science Division for Therapies Against Intractable Diseases, Fujita Health University Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

Abstract

Side population (SP) cells are isolated from various tissues by their ability to efficiently exclude the vital DNA dye Hoechst 33342. The clearance of the dye from the cells is thought to be mediated by ABC transporters. Bone marrow SP cells are rich in hematopoietic stem cells and have been demonstrated to participate in muscle fiber repair. Similarly, SP cells from skeletal muscle were shown to reconstitute the bone marrow of lethally irradiated mice and, at the same time, participate in muscle fiber regeneration.

Correspondence/Reprint request: Dr. Shin'ichi Takeda, Department of Molecular Therapy, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawa-higashi, Kodaira, Tokyo 187-8502 Japan. E-mail: takeda@ncnp.go.jp

Several reports, however, suggest that muscle-derived SP cells are heterogeneous in origin, gene expression, and function. To further elucidate their functions and relationships with the other myogenic cells identified to date and their potential as a tool for cell-based therapy of muscular dystrophies, it might be necessary to refine the protocol for SP cell preparation and combine Hoechst staining with identification of several molecular markers.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a progressive, ultimately lethal X-linked muscle disorder, caused by mutations of the DMD gene [1], which encodes a large cytoskeletal protein, named dystrophin. Dystrophin forms the large dystrophin/dystrophin-associated protein complex at the sarcolemma of myofibers, linking the basal lamina and cytoskeleton. Dystrophin deficiency causes structural weakness of the sarcolemma. The defective sarcolemma easily ruptures under mechanical stress, leading to muscle fiber necrosis, and finally results in loss of myofibers and reduced contractile power.

Skeletal muscle regenerates when injured. Muscle satellite cells, which are muscle progenitor cells located between the muscle basal lamina and myofibers, are largely responsible for this activity [2], and were expected to be a cell source for cell-based therapy of DMD. However, transplantation of satellite cells or their progeny (myoblasts) into skeletal muscle showed insufficient regenerative efficiency, and failed to ameliorate the dystrophic phenotypes of animal models and DMD patients (reviewed in [3, 4]).

On the other hand, several reports have suggested that stem cell-like activities are found in non-satellite cell fractions derived from adult skeletal muscle or in non-muscle tissues and participate in muscle fiber regeneration [5-8]. Therefore, stem cells other than satellite cells could be an alternative cell source for cell-based therapy of muscle diseases such as DMD.

Among the myogenic stem cells reported to date are side population (SP) cells. Originally, SP cells were isolated from bone marrow as highly purified hematopoietic stem cells on the basis of their ability to efflux Hoechst 33342 dye [9]. Since then, cells with the SP phenotype have been found in a wide variety of mammalian tissues, cell lines, and tumor cells, some of which have shown to possess stem cell-like properties (reviewed in [10, 11]).

In this chapter, we review papers characterizing the properties of bone marrow SP cells and muscle SP cells. Importantly, many reports show that SP cells are highly heterogeneous. To correctly understand the therapeutic potential of SP cells, it might be necessary to combine Hoechst staining with identification of several cell surface markers and perform functional analysis using a limited number of SP cells.

I. Bone marrow side population cells

1. Discovery of SP cells as hematopoietic stem cells

Side population (SP) cells were discovered as highly purified hematopoietic stem cells [9]. While using Hoechst 33342 vital dye staining to study the cell cycle of bone marrow (BM) cells, Goodell et al. found that simultaneously displaying Hoechst fluorescence at two emission wavelengths (red 675 nm and blue 450 nm) localizes a distinct, small, non-stained cell population (0.1% of the total BM cells) that expresses markers of multipotent hematopoietic stem cells (HSC) (Sca1+lin^{neg/low}). *In vivo* competitive repopulation experiments revealed that HSC activities were enriched at least 1,000-fold in the SP fraction. The majority of BM SP cells were not cycling: only 1-3% of bone marrow SP cells were in S-G₂M stages of the cell cycle, whereas 20% of main population (MP) cells were [9]. Because the SP fraction disappears when staining is performed in the presence of verapamil, Goodell et al. speculated that the exclusion of Hoechst 33342 by SP cells is an active process involving multidrug resistance protein (mdr) or mdr-like transporters [9]. Later, Zhou et al. demonstrated that breast cancer resistance protein (BCRP), also known ABCG2, is the molecular determinant of the SP phenotype [12, 13]. Interestingly, more detailed fractionation studies indicated that the SP tail can be further divided into subregions according to their dye efflux abilities, and that the tip of the SP cells (which have the highest Hoechst efflux activity) shows higher progenitor activity than the distal portion [14-16].

Although BM SP cells are widely accepted as highly enriched hematopoietic stem cells, it seems that not all SP cells possess HSC activities [14]. Further, a recent study showed that hematopoietic stem cells are present in both SP and non-SP fractions [17]. Therefore, the properties of BM SP and HSC cells are not completely identical.

2. Role of bone marrow SP cells in myogenesis

Ferrari et al. reported that BM-derived cells participated in repair of muscle fibers [8], suggesting that at least a fraction of myogenic precursor cells originate in the bone marrow, circulate throughout the body, and are mobilized to damaged muscle to regenerate muscle fibers. Later, Gussoni et al. injected BM SP cells from wild-type male mice intravenously into lethally irradiated *mdx* female mice, and demonstrated that bone marrow SP cells contain both myogenic and hematopoietic precursors, i.e., they are multipotent stem cells with great plasticity [6]. These results gave us hope of recovering dystrophin expression in the whole musculature of patients with DMD by systemic delivery of BM-derived wild-type stem cells. Stimulated by these reports, researchers intensively investigated the properties of side population cells in bone marrow, especially the contribution of BM cells [18, 19] or BM SP cells [20] to muscle

regeneration. BM cells and BM SP cells prepared from GFP-transgenic or LacZ-expressing mice were indeed found to differentiate into muscle fibers *in vivo* after transplantation. Disappointingly, however, the percentage of myofibers formed by donor-derived cells delivered via the circulation was very low (1-2 %) and therapeutically not significant in most skeletal muscles.

Fusion or stepwise myogenic differentiation?

LaBarge and Blau reported that BM cells differentiate stepwise into myogenic precursor cells (e.g. satellite cells) and then, response to muscle injury, proliferate, fuse, and finally develop into mature myofibers [18]. Similarly, several reports suggested that BM-derived cells can differentiate into satellite cells [6, 19]. On the other hand, Sherwood *et al.* demonstrated that cells of bone marrow or hematopoietic origin did not give rise to functional adult myogenic progenitors [21]. Several reports provided evidence that the plasticity of hematopoietic stem cells shown in BM transplantation experiments can be explained simply as fusion events [22, 23]. Further, additional concerns have arisen from studies demonstrating that while BM cells or BM SP cells are able to fuse with myofibers, a large proportion of incorporated cells do not actually enter the myogenic program [24, 25].

II. Muscle SP cells

1. Protocol for isolation of muscle SP cells

Although SP-like cells are found in mononuclear cells prepared from skeletal muscle (Figures 1 and 2), there are often discrepancies among reports in abundance, cell surface markers, and differential potentials of muscle SP cells (Table 1). This may be due to the many variables involved in the preparation and staining for isolation of SP cells by FACS. Montanaro *et al.* investigated the effects of isolation parameters on viability, yield, and phenotype of SP cells [26], and found that 1) the enzymatic dissociation procedure, 2) cell-counting method, 3) Hoechst concentration, and 4) SP gating are important parameters to minimize the heterogeneity of SP cells prepared from bone marrow, skeletal muscle, or skin. They showed that when isolated using stringent criteria, muscle SP cells are CD45-negative and Sca1-positive, and show very low Hoechst uptake. The Hoechst concentration seems to be the most critical. For example, Hoechst 33342 staining at a concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ allows contamination by CD45-positive and Sca-1-negative cells. In contrast, 12.5 $\mu\text{g/ml}$ Hoechst reduces the yield of SP cells and increases the percentage of CD45-negative Sca-1-positive cells. Because the percentage of CD45-positive SP cells tends to decrease at higher concentrations of Hoechst 33342 in both BM and non-hematopoietic tissues, muscle-SP cells seem to

Preparation of SP cells from mouse skeletal muscle

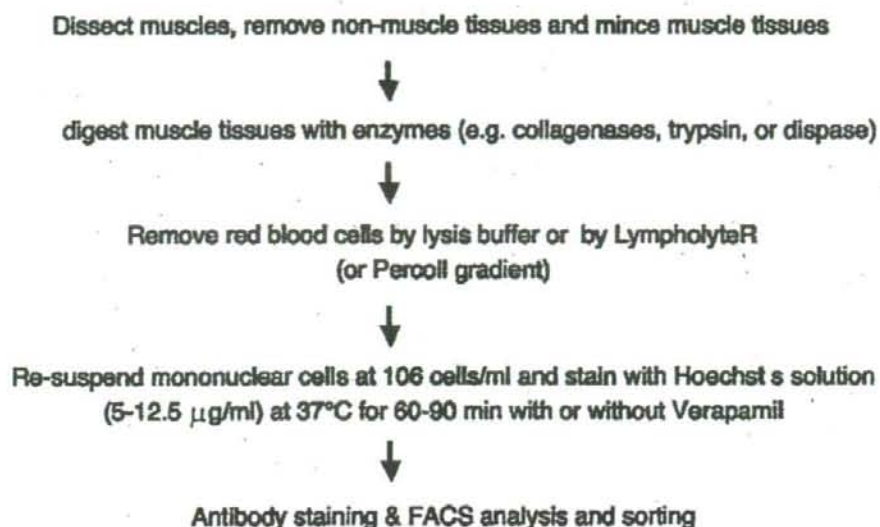


Figure 1. Preparation of SP cells from mouse skeletal muscle.

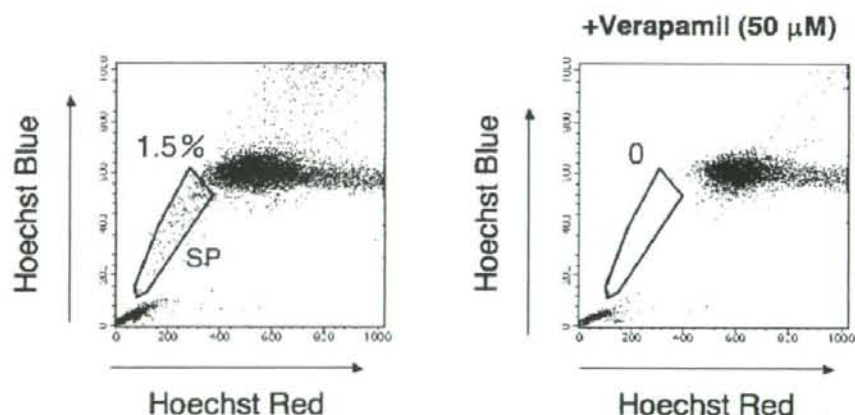


Figure 2. SP cells in adult skeletal muscle. Left panel: Muscle mononuclear cells were isolated from C57BL/6 mice, stained with 5 μg/ml Hoechst 33342 dye, and analyzed on a dual laser FACS Vantage SE (Becton-Dickinson). Right panel: A calcium channel blocker verapamil was added to Hoechst solution to confirm the SP fraction.

Table 1. Variations in isolation protocols and properties of muscle SP cells.

Authors (year)	Preparation	Markers on SP cells	Properties	SP abundance
Gussoni et al., 1999	Hoechst 12.5 µg/ml	Sca-1+, lin-, c-kit-, CD45-, CD43-	hematopoietic stem cell-like activity produce myofibers after i.v. injection	1-1.5%
Jackson et al., 1999	Hoechst 5 µg/ml	Sca1+, c-kit+, CD45-	HSC activity (+)	1%
Asakura et al., 2002	Hoechst 5 µg/ml	Sca1+	CD45+ fraction: hematopoietic differentiate into muscle cells in co-culture differentiate into satellite cells and muscle fibers <i>in vivo</i>	CD45+SP: 0.3-0.5% CD45-SP: 2-3%
Majka et al., 2003	Percoll gradient Hoechst 5 µg/ml	c-met+, CD45+, Sca-1+, PE-CAM4+, Tle-2+	bone marrow-derived vascular progenitor	0.2%
Meeson et al., 2004	Percoll gradient Hoechst 12.5 µg/ml	Sca-1+, c-kit+, CD31-, Abcg2+	increase during muscle regeneration	0.2%
Uezumi et al., 2006	Hoechst 5 µg/ml	heterogeneous	CD31+SP: Bcrp-1+, vessel-associated CD45+SP: bone marrow origin CD31-CD45-SP: differentiate into adipocyte, osteocyte, and myocytin	1-3% < 0.1% < 0.1%

have a much higher ability to exclude Hoechst 33342 than BM SP cells. The study also points out that Hoechst 33342 is toxic to cells. This fact is important, because the cell toxicity of Hoechst dye makes it difficult to directly compare the biological properties of SP and non-SP cells.

In our opinion, one further parameter that has an effect on the heterogeneity of muscle SP cells is pre-fractionation by a Percoll gradient before Hoechst staining [27] (Table 1). In our experience, this procedure eliminates CD45-negative SP cells, resulting in enrichment of CD45-positive SP cells (our unpublished data).

The definition of SP cells for non-hematopoietic tissues is not clear. Therefore, it is difficult to determine which SP cells are the true muscle SP cells. We also think that Hoechst staining alone is insufficient to collect a homogeneous cell population. This approach should be combined with identification of other cell surface markers.

2. SP phenotype and ABC transporters

SP cells are generally defined as a cell population that actively and efficiently expels Hoechst 33342 dye. This property is thought to be mediated mainly by ATP-binding cassette (ABC) transporters. ABC transporters bind ATP as an energy source to transport endogenous or exogenous molecules, in most cases unidirectionally, across the cell membrane. Various tissues and cells express different combinations of ABC transporters, therefore, it is no wonder that SP cells from different tissues are heterogeneous in phenotypes and functions [10].

Muscle SP phenotype is not simply determined by Bcrp-1 expression

The ABCG2/Bcrp1 transporter is most often related to the SP phenotype. Bcrp-1-null mice show reduced numbers of SP cells in bone marrow and

skeletal muscle [13], but expression of this transporter is often found in non-SP cells [12]. Furthermore, isolation of human hematopoietic stem cells using an anti-ABCG2 antibody does not work [28]. These observations suggest that Bcrp-1 expression is not sufficient to endow the cell with the SP phenotype. In addition, it seems that a certain percentage of muscle SP cells are not Bcrp-1-dependent. When stained with an anti-Bcrp-1 antibody, the CD31-positive SP fraction is found to strongly express Bcrp-1, whereas two fractions, CD45-negative CD31-negative SP cells and CD45-positive SP cells reacted weakly with the anti-Bcrp-1 antibody [29]. Thus, transporters other than Bcrp-1 likely efflux Hoechst dye in a subset of muscle SP cells.

On the other hand, Meeson et al. examined the muscle SP fraction on a fluorescence-activated cell sorter (FACS) using both verapamil and fumitremorgin C (FTC), and confirmed that muscle-SP cells are highly sensitive to both of them [30]. Verapamil is a calcium channel blocker widely used to confirm the SP fraction on FACS profile, but shows no specificity toward a single transporter. FTC was shown to be a specific inhibitor of Abcg2, where it functions to inhibit Abcg2-associated ATPase activity [31]. Thus, the study showed that muscle SP cells are dependent on Abcg2/Bcrp-1 for the SP phenotype. SP preparation by Litman et al. employed a pre-fractionation of the muscle mononuclear cells using a Percoll gradient and a high concentration of Hoechst dye (12.5 $\mu\text{g/ml}$) for 90 min. The percentage of SP cells (0.19 %) was low, compared with other reports (see Table 1). Therefore, this result does not exclude the contribution of ABC transporters other than ABCG2/Bcrp-1 to the SP phenotype.

3. Other properties of muscle-derived SP cells

Most muscle SP cells are in quiescent stage

Freshly isolated SP cells from muscle are often reported to be non-adherent in culture, and are characterized by small cell size, stages G0/G1 of the cell cycle, and low metabolic activity, elements common to stem cells. Indeed, small size ($6.6 \pm 0.1 \mu\text{m}$) and a high nucleus-to-cytoplasm ratio were reported for muscle-derived SP cells [30]. However, when we analyzed muscle SP cells during muscle regeneration, they discovered CD31-negative CD45-negative SP cells, which are large in size and Ki-67-positive. Thus, at least one subset of SP cells is not small and is cycling.

Cell surface markers on muscle SP cells

Reflecting the variety of experimental protocols for SP preparation, there are discrepancies in reported cell surface markers of SP cells (Table 1). In 1999, Gussoni et al. described the isolation of SP cells from skeletal muscle for the first time [6]. They used a higher concentration of Hoechst dye (12.5 $\mu\text{g/ml}$) than the original protocol (5 $\mu\text{g/ml}$) described by Goodell et al. [9], and