

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 27 年度博士課程 入学

氏名 竹内 志帆

指導教員名 西原 眞杉

論文題目 骨格筋内在性間葉系前駆細胞の分化制御機構に関する研究

炎症性筋原性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (Duchenne muscular dystrophy ; DMD) では、骨格筋内に脂肪組織や過剰な線維組織の蓄積 (線維化) がみられ、これらは筋再生能や筋機能の低下を招く。その起源は線維芽細胞や脂肪細胞への両分化能をもつ間葉系前駆細胞 (mesenchymal progenitor cell ; MPC) とされており、MPC は TGF β により線維芽細胞へと分化し、さらに活性化して筋線維芽細胞となることで、コラーゲンを主成分とする過剰な細胞外基質成分を産生する。病態末期には MPC に由来する脂肪細胞が出現し骨格筋内脂肪組織を形成する。一方、未分化な MPC は筋再生を促す。このように、MPC の分化は DMD の病態形成に大きく影響を与えるため、生体内における線維芽細胞、脂肪細胞それぞれへの分化制御機構の解明は重要である。本研究では骨格筋内在性の MPC の分化制御機構の解明を目的とした。

第一章 MPC の分化機構の可逆性の検討

当研究室でラット骨格筋より樹立された脂肪前駆細胞クローン 2G11 細胞の脂肪分化能は、増殖期の bFGF により亢進する (FGF シグナルのプライミング効果)。2G11 細胞は MPC と同様に筋分化を促すことから、MPC クローンである可能性が考えられる。2G11 細胞の線維芽細胞分化能の有無について検討したところ、TGF β により線維芽細胞マーカー遺伝子 (*Colla1*, *Ctgf*,

Acta2) 発現量、 α -SMA タンパク質量はともに増加した。この時、筋線維芽細胞の特徴であるストレスファイバーが形成されていたことから、2G11 細胞は活性型の筋線維芽細胞にまで分化でき、MPC としての性質をもつことがわかった。

2G11 細胞の脂肪分化能は FGF シグナルの入力がなくなると低下する。bFGF 除去によって脂肪分化能が低下した 2G11 細胞に再度 bFGF を添加して培養後、脂肪分化を誘導すると、bFGF を持続的に添加して培養した細胞と同等の脂肪分化能を示した。このことから、2G11 細胞の脂肪分化能は可逆的に変化することが判明した。

次に、FGF シグナルにより亢進した 2G11 細胞の脂肪分化能に対する TGF β シグナルの影響を調べた。bFGF に続けて TGF β を添加したところ 2G11 細胞の脂肪分化能は低下した。同様の処理をした細胞では線維芽細胞マーカーの発現が増加していたことから、脂肪分化能の低下は線維芽細胞分化の誘導によるものであることがわかった。この時ストレスファイバーはみられなかったため、筋線維芽細胞までは分化していないと考えられた。同様の結果は、先に TGF β を添加し、続けて bFGF を添加した場合でも観察された。これらのことから、FGF シグナルを受けた 2G11 細胞は、TGF β シグナルの入力により脂肪分化能を失い、同時に線維芽細胞分化を開始することがわかった。

最後に、2G11 細胞から筋線維芽細胞への分化が可逆的であるかどうかについて検証した。2G11 細胞に TGF β を添加し、筋線維芽細胞への分化が完了した後に細胞密度を変えて継代した。bFGF を作用させたところ、より低密度で継代した細胞で α -SMA 発現が低下し、脂肪分化能が回復する傾向がみられた。

以上により、骨格筋内 MPC の線維芽細胞、脂肪細胞への分化は TGF β シグナルや FGF シグナルのクロストークにより制御され、ひとたび線維芽細胞を経て筋線維芽細胞にまで分化した細胞であっても、未分化状態を経て脂肪分化能を再獲得できるという新たな機構が示された。

第二章 MPC の骨格筋における動態と MPC 細胞膜表面分子の機能の解析

当研究室で作製した 2G11 細胞の細胞膜表面分子を認識するモノクローナル抗体 (5C12 抗体) が認識する抗原分子を LC-MS/MS 解析により調べたところ、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 (chondroitin sulfate proteoglycan 4 ; CSPG4) と同定された。以降は 5C12 抗体を抗ラット CSPG4 抗体として用いることとした。

CSPG4 陽性細胞の特性を調べるため、骨格筋から CSPG4 陽性細胞を FACS により単離し、各種細胞マーカーの発現を調べたところ、間葉系細胞、筋系譜細胞、血球系細胞などの細胞マーカーの発現がみられた。一方、骨格筋初代培養細胞から樹立した CSPG4 陽性細胞クローンのうち約 7 割は線維芽細胞、脂肪細胞両者への分化能を示した。これらのことから、骨格筋内在性の CSPG4 陽性細胞の一部は筋系譜細胞マーカーや血球系細胞マーカーを発現するものの、その大

部分は MPC であることがわかった。

CSPG4 の免疫染色を行ったところ、正常骨格筋では CSPG4 陽性細胞は筋基底膜外側の間質に存在しており、CSPG4 陽性細胞の大部分が MPC であるという結果と合致していた。ジストロフィンタンパク質を欠損した DMD モデルラット (DMD ラット) 骨格筋では、間質の CSPG4 陽性細胞数が正常骨格筋に比べて増加するとともに、中心核をもつ再生筋線維周囲に CSPG4 が集積していた。そこで、筋損傷とそれに続く筋再生を誘導したラット骨格筋間質における CSPG4 陽性細胞および CSPG4 集積再生筋線維を定量したところ、CSPG4 陽性細胞は損傷 3-5 日目をピークとする一過的な増加を示した一方、CSPG4 集積再生筋線維は筋損傷から 5-7 日目に一時的に観察された。損傷 3-5 日目は再生筋線維が形成される時期であり、MPC の筋分化促進作用を鑑みれば、CSPG4 陽性細胞の増減は MPC のそれを反映していると考えられた。一方、再生筋線維周囲に CSPG4 が一時的に集積していたことから、筋再生への CSPG4 の関与が示唆された。

最後に、CSPG4 が MPC の増殖や分化に関わる可能性について検討した。siRNA によって CSPG4 の発現を抑制した 2G11 細胞では bFGF 依存性の増殖が低下した。そこで CSPG4 が FGF シグナルを仲介もしくは修飾する可能性を考え、FGF シグナルのプライミング効果への関与について調べた。その結果、CSPG4 発現抑制によりプライミング効果が減弱した。一方、CSPG4 発現抑制により TGF β 誘導性の線維芽細胞マーカー発現は依然としてみられたが、 α -SMA の発現やストレスファイバー形成が低下していたことから、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が阻害されたと考えられた。これらの結果をさらに検証するため、CRISPR/Cas 法を用いて 2G11 細胞に CSPG4 の欠損を導入した。得られた 2 種類の CSPG4 欠損 2G11 細胞クローンの両方で FGF シグナルのプライミング効果が減弱した一方で、TGF β 誘導性の α -SMA 発現は増加していた。

以上により、筋再生時の CSPG4 陽性細胞の動態は MPC のそれを反映することがわかった。また、CSPG4 は MPC における FGF シグナルを仲介もしくは修飾するだけでなく、筋再生にも関与する可能性が示された。一方、線維芽細胞分化における CSPG4 の役割については siRNA による発現抑制実験と CRISPR/Cas 法による発現欠損実験で結果に相違がみられた。この点については次章でさらに追究した。

第三章 DMD ラットにおける CSPG4 の機能の検証

In vivo における CSPG4 の機能について検証するため、CRISPR/Cas 法を用いて CSPG4 欠損ラットを作製した。CSPG4 遺伝子に変異をもち、CSPG4 タンパク質を欠損する 3 系統 (+2 bp、-7 bp (A)、-7 bp (B)) が得られた。そのうち得られた産仔の遺伝子型比率が理論値に近かった-7 bp (B)系統を DMD ラットと掛合せ、以降の解析に用いた。14 週齢以降で CSPG4 欠損に

よる体重低下がみられた。筋力については、CSPG4 欠損による明確な違いはみられなかった。

DMD ラットで筋損傷と再生、線維化および脂肪組織の出現がみられる 20-24 週齢において、骨格筋の重量測定および組織学的解析を行った。その際、速筋である前脛骨筋と遅筋であるヒラメ筋についてそれぞれ調べた。いずれにおいても筋損傷や再生および脂肪組織蓄積について CSPG4 欠損の影響はみられなかった。一方、前脛骨筋では重量と線維化について違いがみられなかったのに対し、ヒラメ筋では CSPG4 欠損により重量の低下と線維化の亢進がみられた。この時、1 型コラーゲン遺伝子 (*Col1a1*) 発現量に違いはない一方、1 型コラーゲンタンパク質量は CSPG4 欠損により低下していた。このことは CSPG4 欠損 DMD ラットヒラメ筋では 1 型コラーゲンタンパク質の総量が減少する一方で、線維化に寄与する 1 型コラーゲンタンパク質はむしろ増加していることを示しており、CSPG4 欠損 2G11 細胞でみられた TGF β 依存性の α -SMA 発現の増加に関与することが示唆された。

以上により、MPC 由来の筋線維芽細胞により生じる線維化の機序に CSPG4 が関与し、その作用は周囲に存在する筋線維タイプにより影響を受ける可能性が示された。

本研究のまとめ

本研究では、従来、線維芽細胞、脂肪細胞への分化という一方向で捉えられてきた MPC の分化機構の一部が可逆的であることを新たに示した。また、MPC の分化制御に深く関与する新たな因子 CSPG4 を同定し、その機能の一端を明らかにした。本研究で得られた知見は DMD をはじめとする炎症性筋原性疾患の病態形成機構の理解に大きく貢献し、その治療法の確立にも寄与するものと思われる。