

審査の結果の要旨

氏名 竹内 志帆

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 (DMD) では、骨格筋内に脂肪組織や過剰な線維組織の蓄積がみられ、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 (MPC) とされている。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。MPC の分化は DMD の病態形成に大きく影響するため、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。

第一章では MPC の分化機構の可逆性を検討した。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 bFGF により亢進する。2G11 細胞の線維芽細胞分化能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、 α -SMA タンパク質量はともに増加したことから、2G11 細胞は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。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、線維芽細胞マーカーの発現が増加した。すなわち、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。また、2G11 細胞に TGF β を添加して筋線維芽細胞への分化が完了した後に bFGF を作用させたところ、 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。

第二章では MPC の細胞膜表面分子の機能の解析を行った。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 (CSPG4) と同定された。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、CSPG4 陽性細胞の大部分は 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いた。siRNA によって CSPG4 の発現を抑制した 2G11 細胞では bFGF 依存性の脂肪分化能が低下したが、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。CRISPR/Cas 法を用いて 2G11 細胞に CSPG4 の欠損を

導入した 2G11 細胞では FGF シグナルの効果が減弱したが、TGFβ誘導性のα-SMA 発現は増加していた。以上により、CSPG4 は MPC における FGF シグナルを仲介もしくは修飾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、この点については次章でさらに追究した。

第三章では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) における CSPG4 の機能を検証した。CRISPR/Cas 法を用いて CSPG4 欠損ラットを作製し、DMD ラットと掛合せて以降の解析に用いた。速筋である前脛骨筋と遅筋であるヒラメ筋について調べた結果、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、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のに対し、前脛骨筋では違いがみられなかった。また、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が示され、CSPG4 欠損 2G11 細胞でみられた TGFβ依存性のα-SMA 発現の増加に関わ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ことが示唆された。

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考えられ、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。