

博士論文（要約）

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

竹内 志帆

## 目次

序論.....	3
図表.....	11
第一章 MPC の分化機構の可逆性の検討	
緒言.....	14
材料と方法.....	16
結果.....	23
考察.....	30
図表.....	33
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	
緒言.....	52
材料と方法.....	54
結果.....	66
考察.....	75
図表.....	79
第三章 DMD ラットにおける CSPG4 の機能の検証	
緒言.....	116
材料と方法.....	117
結果.....	123
考察.....	128
図表.....	131
総括.....	153
図表.....	159
参考文献.....	160
謝辞.....	178

## 序論

### 骨格筋の構造

骨格筋は身体の 30~40%を占める生体最大の組織である。骨格筋は一つの骨に起始し、関節を跨いで別の骨に終始しており、骨格筋が収縮することで関節の屈曲や伸展、姿勢の保持といった運動機能が果たされる。骨格筋を構成するのは、骨格筋の収縮を担う多核の細長い細胞である筋線維、神経細胞、血管および結合組織である。筋線維の一本一本は筋基底膜と筋内膜によって囲まれている。筋線維は集まって筋周膜につつまれた筋束を作る。さらに筋束が集まったものが骨格筋であり、骨格筋の全体は筋外膜によって包まれている。正常な骨格筋はほとんど筋線維によって構成されており、結合組織が占める割合は骨格筋全体の約 5%に過ぎない (Fig. 0-1A) (Lieber and Ward, 2013)。

筋線維の大部分は収縮装置をなす筋原線維によって占められている。筋原線維は、太いミオシンフィラメントと細いアクチンフィラメントで構成されるサルコメアが多数連続してつながることで形成される。アクチン線維は隣り合ったサルコメア同士が共有する Z 線からサルコメアの中心に向かって伸び、ミオシンフィラメントはサルコメアの中心にある M 線から Z 線に向かって伸びている。ミオシンフィラメントが伸びている領域を暗帯 (A 帯)、Z 線を挟んでアクチンフィラメントがミオシンフィラメントと重ならない領域を明帯 (I 帯) と呼ぶ。ミオシンは 2 本のミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; MHC)、2 本のミオシン調節軽鎖 (regulatory myosin light chain ; regulatory MLC) および 2 本のミオシン必須軽鎖 (essential myosin light chain ; essential MLC) から構成される。骨格筋筋線維において発現がみられる MHC は 6 種類あり、発現する MHC によって収縮力が決まる。1 型 MHC (遅筋型 MHC) を発現した筋線維は張力が比較的弱い収縮時間が持続する遅筋線維となる。2A 型、2B 型、2X 型 MHC (速筋型 MHC) を発現した筋線維は、収縮速度が速いが収縮時間が短い速筋線維となる。一本の筋線維は一本の神経に支配され (単神経支配)、筋線維が発現する MHC の型は筋線維を支配する神経の型に依存して決まる。胎児型 MHC (embryonic MHC ; eMHC)、新生児型 MHC は後述する筋発生や筋再生時に発現がみられる。

### 骨格筋の発生

骨格筋の発生は、体節背内側に存在する paired box 3 (Pax3) を発現する筋前駆細胞で筋分化制御因子 myogenic factor 5 (Myf5) が発現することで始まる (Ott et al., 1991)。Myf5 を発現した筋芽細胞は続いて myogenic differentiation (MyoD)、myogenin、myogenic regulatory factor 4 (Mrf4) を順に発現するようになる (Bentzinger et al.,

2012)。myogenin が発現することで、単核の筋芽細胞が互いに融合し、多核の筋管細胞が形成される (Hasty et al., 1993 ; Nabeshima et al., 1993 ; Venuti et al., 1995)。次に Pax3 陽性の筋前駆細胞の一部が Pax3 の発現を失い、Pax7 を発現するようになる。Pax7 陽性の筋前駆細胞も Pax3 陽性細胞と同様に筋管細胞形成に参画する。また、Pax7 陽性細胞の一部は次項に述べる筋衛星細胞となり、生体内に留まる (Gros et al., 2005 ; Kassar-Duchossoy et al., 2005)。

筋管細胞が形成されるとまもなく神経支配が始まる。初めは一本の筋管細胞に多くの運動神経が入力する多神経支配である。筋管細胞内の筋原線維形成が進行し、筋管の中心にあった核が筋細胞膜の直下に移動した筋線維まで分化すると、運動神経が脱落し単神経支配が成立する。

### 筋衛星細胞 (satellite cell) と幹細胞ニッチ

筋衛星細胞は正常な骨格筋では筋線維と筋基底膜の間に分裂も分化もしない休止状態で存在する筋幹細胞である (Mauro, 1961 ; Schultz et al., 1978)。筋衛星細胞の休止状態の維持に大きく関わるのが、筋衛星細胞周囲の微小環境 “ニッチ” である。ニッチは幹細胞が存在する場であるとともに、幹細胞が細胞外シグナルを受けてその挙動を決める場でもある (Ferraro and Celso, 2010)。筋衛星細胞のニッチは細胞外基質、血管網、神経網、周囲に存在する細胞および肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; bFGF)、インスリン様成長因子 1 (insulin-like growth factor-1 ; IGF-1) などの成長因子を含む拡散性の因子によって構成される。筋衛星細胞自身もニッチ構成要素として細胞同士の接触や自己分泌、傍分泌シグナルによって影響を与える。筋衛星細胞のニッチに存在する多くの成長因子は、休止状態の筋衛星細胞の細胞膜上に発現するプロテオグリカンに結合した不活性型として存在する (Yin et al., 2013)。骨格筋の損傷によってマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloprotease ; MMP) などのプロテアーゼが活性化すると、不活性型の成長因子が活性型になる。活性型の HGF によって休止状態の筋衛星細胞が細胞周期に入り、筋芽細胞の増殖が促進される (Tatsumi et al., 1998)。筋芽細胞の増殖は bFGF によっても促進される (Yablonka-Reuveni and Rivera, 1997)。IGF-1 は筋衛星細胞の増殖と分化の両方を促進する (Allen and Boxhorn, 1989)。これらの成長因子によって筋衛星細胞の増殖・分化は制御されている。

### 骨格筋の再生

骨格筋の再生は、損傷を受けた骨格筋において筋衛星細胞が活性化することから始まる。筋衛星細胞からの筋線維の分化は骨格筋の発生とよく似た経過をたどる。筋線維の

壊死や損傷によって活性化した筋衛星細胞は、MyoD および Myf5 を発現する筋芽細胞へと分化する (Cornelison and Wold, 1997 ; Cooper et al., 1999)。筋芽細胞は増殖することでその数を増やし、myogenin および Mrf4 の発現により互いに融合して MHC を発現した筋管細胞を形成する (Cornelison and Wold, 1997 ; Chargé and Rudnicki, 2004)。初期の筋管細胞は中心に核を持ち、eMHC および新生児型 MHC を発現している。筋再生の進行とともに核が筋線維の辺縁に移動するとともに、神経支配によって速筋型 MHC または遅筋型 MHC を発現した成熟筋線維となり、骨格筋の再生は完了する (Jerkovic et al., 1997)。

### 筋ジストロフィー

ここまで述べてきたように、正常な骨格筋であれば損傷を受けても再生することができるため、運動機能が低下することはない。しかし、骨格筋に発現する遺伝子の変異・発現調節異常がある場合、その遺伝子から転写されるタンパク質の喪失または機能異常が生じ、筋線維の変性・壊死が繰り返されることで運動機能が低下する。筋ジストロフィーと呼ばれるこの疾患の原因となる遺伝子やタンパク質の同定は分子遺伝学の進歩とともに進み、現在では 50 以上の原因遺伝子が明らかになっている。病理学的には、壊死筋線維、中心核を持つ再生筋線維、筋線維の大小不同、円形化、結合組織の過剰蓄積 (線維化)、間質内脂肪組織が観察される (Fig. 0-1B)。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (Duchenne muscular dystrophy ; DMD) は、新生男児の約 3,500 人に 1 人の割合で発症し、筋ジストロフィー患者の 60%程度を占める。DMD は X 染色体上に存在する *DMD* 遺伝子から転写されるジストロフィンタンパク質が欠損することで生じる。筋線維に発現するジストロフィンタンパク質は筋細胞膜直下に存在し、細胞骨格と筋基底膜をつなぐことで筋細胞膜の安定性を高める機能を有するため (Koenig et al., 1988)、ジストロフィンタンパク質が欠損すると、筋線維の安定性が失われ、筋線維が破壊されやすくなると考えられる。その結果、筋線維の損傷・壊死とそれに続く筋再生が繰り返される。病態初期の病理像では筋線維の壊死像と再生筋線維が多く観察されるが、病態の進行に伴って線維化が進行し、病態末期には間質内に脂肪組織もみられるようになる (Gaeta et al., 2012)。これらの伸展性に乏しい組織が骨格筋内に出現することは筋機能の低下につながる。また、脂肪細胞は筋芽細胞同士の融合を抑制すること (Takegahara et al., 2014) や、過剰な線維組織は筋再生に必要な血液の供給を妨げると考えられること (Järvinen et al., 2002) から、これらの組織は筋再生に対しても抑制的に作用する。現在、正常な筋再生時には筋分化を促進する骨格筋内在性間葉系前駆細胞 (mesenchymal progenitor cell ; MPC) が脂肪細胞に分化

することで骨格筋内脂肪組織が、筋線維芽細胞に分化することで過剰な骨格筋内線維組織が形成されると考えられている。

DMD のモデル動物として、*Dmd* 遺伝子に変異を有しジストロフィンタンパク質が欠損した *mdx* マウスが広く用いられている。*mdx* マウスは骨格筋の損傷・壊死・再生と骨格筋内線維組織の増加が観察されるものの、重度の線維化は 18 ヶ月齢以降の老齢にならないと生じず (Pessina et al., 2014)、骨格筋内脂肪組織もほとんど出現しない (Banks and Chamberlain, 2008)。当研究室で作出された *Dmd* 遺伝子に変異を持ち、ジストロフィンタンパク質を欠損したラットは *mdx* マウスと同様に骨格筋の損傷・再生がみられるだけでなく、ヒト DMD 患者でみられるような著しい線維化と骨格筋内脂肪組織の蓄積が観察される (Nakamura et al., 2014)。このことから、DMD 遺伝子変異ラット (DMD ラット) は、MPC が分化することで形成される骨格筋内線維組織および脂肪組織の出現機序を生体内で調べる上で有用なモデル動物であると考えられる。

#### 骨格筋内在性間葉系前駆細胞 (mesenchymal progenitor cell ; MPC)

筋再生、骨格筋の線維化および脂肪組織の蓄積の全てに関わる MPC は骨格筋内在性の細胞であり、細胞表面マーカーを用いて単離できることが報告されている。マウス骨格筋においては、CD31/CD45/血小板由来成長因子受容体 $\alpha$  (platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  ; PDGFR $\alpha$ ) (-/+ ) 細胞、または、CD31/CD45/Sca-1/CD34 (-/+ /+) (もしくは CD31/CD45/Integrin  $\alpha$ 7/Sca1 (-/+ /+)) 細胞が MPC とされる (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010, 2011)。ヒト骨格筋においても、PDGFR $\alpha$  に陽性を示す細胞が筋線維芽細胞と脂肪細胞の両方への分化能を持つことが報告されている (Uezumi et al., 2014)。一方で、*mdx* マウスから単離した PDGFR $\alpha$  陽性細胞は筋線維芽細胞マーカーを強く発現していることから (Uezumi et al., 2011)、PDGFR $\alpha$  陽性細胞には MPC だけでなく筋線維芽細胞も含まれている。

正常骨格筋の再生過程では筋衛星細胞が活性化し、筋芽細胞、さらに筋管細胞への分化を経て、新たな筋線維を形成することは先に述べたが、MPC も骨格筋再生時に一過的に増殖し (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010)、筋再生を促進することが示されている (Joe et al., 2010)。一過的に増加した MPC は、筋損傷に伴って浸潤したマクロファージから分泌される腫瘍壊死因子 $\alpha$  (tissue necrosis factor  $\alpha$  ; TNF $\alpha$ ) 誘導性のアポトーシスによって除去され、骨格筋の再生完了時には損傷前の状態に戻る (Lemos et al., 2015)。

MPC の筋線維芽細胞への分化は、損傷骨格筋や DMD 状態の骨格筋で発現が上昇する transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Bernasconi et al., 1995 ; Zhou et al., 2006 ;

杉原、卒業論文) によって誘導される (Fig. 0-2) (Uezumi et al., 2011)。TGF $\beta$ は細胞膜上に発現する TGF $\beta$ 受容体に結合し、TGF $\beta$ 受容体をリン酸化する。リン酸化された TGF $\beta$ 受容体は受容体調節 SMAD (SMAD1、2、3、5、8) をリン酸化し、受容体調節 SMAD はコメディエーター SMAD である SMAD4 と複合体を形成し、核内に移行した後、標的遺伝子の転写を促進または抑制する。以上の古典的な TGF $\beta$ シグナル経路である SMAD 介在性のシグナルに加えて、SMAD に依存しない非古典的なシグナルとして、MAP kinase (MAPK) 経路、Rho-like GTPase 経路、PI3K-AKT 経路がある (Zhang 2009)。さらに、Cdc42 と RhoA を介するシグナルもあり、これはストレスファイバーの形成に関わる (Edlund et al., 2002)。TGF $\beta$ シグナルの活性化は TNF $\alpha$ によって誘導される MPC のアポトーシスも阻害する (Lemos et al., 2015)。

MPC の脂肪分化については、骨格筋損傷刺激によって脂肪分化能が亢進し、その後インスリン、デキサメタゾン (dexamethasone ; DEX)、3-イソブチル-1-メチルキサンチン (3-isobutyl-1-methylxanthine ; IBMX) および troglitazone を含む培地 (脂肪分化誘導培地) で培養することで脂肪分化が誘導されることが骨格筋初代培養細胞を用いた実験で明らかにされている (Fig. 0-2) (Yamanouchi et al., 2013)。MPC の脂肪分化機構は、3T3L1 や 3T3-F442A といった脂肪前駆細胞クローンを用いた研究によって明らかにされてきた機構と共通すると考えられている。脂肪分化誘導刺激の入力を受けた脂肪前駆細胞では、脂肪分化転写因子である CCAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ) と C/EBP $\delta$  の発現量が一時的に増加する (Cao et al., 1991)。続いて、C/EBP $\alpha$  と peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) の発現量が増加する (Cao et al., 1991; Tontonoz et al., 1994)。PPAR $\gamma$  と C/EBP $\alpha$  は互いに発現を促進しあう (Wu et al., 1999)。PPAR $\gamma$  はトリアシルグリセロールの取り込みや貯蔵に関わる脂肪分化関連遺伝子の発現を誘導し (Tontonoz and Spiegelman, 2008)、最終的に細胞内に脂肪滴を蓄積した脂肪細胞へと分化する。

### 筋線維芽細胞と線維化

筋線維芽細胞は、骨格筋を含む多くの組織でコラーゲンなどの細胞外基質を過剰産生し線維化の原因と考えられている細胞である (Zhang et al., 1994)。筋線維芽細胞は細胞外基質のリモデリングに関わるプロテアーゼ (Sorrell and Caplan, 2009) や、TGF $\beta$ 、connective tissue growth factor (CTGF) といった線維芽細胞分化誘導因子を発現することが明らかになっている (Needleman et al., 1990 ; Masur et al., 1996 ; Uezumi et al., 2011 ; Bruno et al., 2015)。一般的には、筋線維芽細胞は $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) 陽性のストレスファイバーを形成し、収縮能を持つとされている (Honda et

al., 2013)。骨格筋においては、 $\alpha$ -SMA の発現が筋芽細胞でも線維芽細胞と比較すると少ないもののみられるため、この定義に基づく筋線維芽細胞が存在するかどうかは議論されている (Mann et al., 2011)。

ひとたび筋線維芽細胞に分化した細胞は再び他の細胞に分化することのない終末分化細胞と考えられてきた。しかし、培養細胞を用いた実験によって、TGF $\beta$ によって線維芽細胞から誘導した筋線維芽細胞が prostaglandin E2 (PGE2) や FGF-1 の作用によって $\alpha$ -SMA の発現が低下し、分化前の線維芽細胞に脱分化することが示されている (Ramos et al., 2006 ; Garrison et al., 2013)。生体においても、心臓の線維芽細胞が血管内皮細胞に転換すること (Ubil et al., 2014) や皮膚の筋線維芽細胞が脂肪細胞に転換すること (Plikus et al., 2017) が報告されており、筋線維芽細胞や線維芽細胞が他の細胞に分化もしくは転換することが示されている。これらのことから、骨格筋 MPC から分化する筋線維芽細胞もその分化の途中や分化完了後に脂肪細胞へと分化もしくは転換する可能性が考えられる。

筋線維芽細胞によって合成される細胞外基質のうち、線維化でみられる結合組織の主要成分は 1 型コラーゲンである。1 型コラーゲンは 3 本のコラーゲン分子で構成されたプロコラーゲンとして分泌される。プロコラーゲンは N 端と C 端が切断されたのち、コラーゲン分子同士が架橋されることでコラーゲン線維を形成する (Canty and Kadler, 2005)。その一方で、コラーゲンは MMP による分解を受ける。すなわち、線維化とはコラーゲンの産生速度が分解速度を上回り、組織内に蓄積するコラーゲン量が増加した状態のことを指す (Wynn, 2008)。

### 骨格筋内の脂肪組織の蓄積

骨格筋内の脂肪組織は筋ジストロフィーの病態だけでなく、霜降り肉として知られる骨格筋の脂肪交雑でもみられる。実験的には、骨格筋内脂肪組織はマウス骨格筋内にグリセロールを注射することで誘導される (Arsic et al., 2004 ; Uezumi et al., 2010)。生体内で骨格筋内脂肪組織の形成を誘導する因子は不明であるが、好酸球から分泌される IL-4 や筋系譜細胞からの Notch シグナルが脂肪組織形成に対し抑制的に働くこと (Heredia et al., 2013 ; Marinkovic et al., 2017) が明らかになっている。

### ラット骨格筋由来脂肪前駆細胞クローン 2G11 細胞

当研究室では、骨格筋内脂肪細胞の出現機構を調べるためにラットヒラメ筋から高度な脂肪分化能を有する細胞クローン、2G11 細胞を樹立した (Murakami et al., 2011 ; 矢田、博士論文)。さらに、2G11 細胞は増殖期に bFGF の作用を受けると脂肪分化能



が著しく亢進することが判明し、この現象を FGF のプライミング効果と呼んでいる (Nakano et al., 2016)。bFGF が FGF 受容体 (FGFR) と結合することで細胞内にシグナルが伝達される。2G11 細胞に発現する FGFR は FGFR-1、FGFR-1c、FGFR-2b、FGFR-2c、FGFR-3 の 5 つである。このうち、FGFR-1 および FGFR-2c が FGF のプライミング効果に関与している (Nakano et al., 2016)。FGFR1 と FGFR2c の下流には少なくとも Erk1/2-MAPK 経路、Akt 経路、PLC $\gamma$ 1 経路が存在するが、いずれも FGF のプライミング効果には関与しないことが示されている (中野、博士論文)。一方で、bFGF を除去して維持した 2G11 細胞の脂肪分化能は低下することが見出されている (村上、未発表)。

2G11 細胞は脂肪分化能を示すだけでなく、筋芽細胞の分化融合を促進する液性因子を分泌する (Takegahara et al., 2014)。以上のように、脂肪分化能と筋分化促進作用の両方を示すという特徴が骨格筋 MPC の特徴と共通するため、2G11 細胞は骨格筋 MPC クローンである可能性が考えられる。

### 2G11 細胞を特異的に認識するモノクローナル抗体 (5C12 抗体)

当研究室では、骨格筋内に存在する脂肪前駆細胞の探索のために 2G11 細胞の細胞膜表面分子を認識するマウスモノクローナル抗体 (5C12 抗体) を作製した。これまでに、この抗体は骨格筋初代培養細胞において筋衛星細胞とは異なる細胞集団を認識し、この抗体に陽性を示す細胞のほとんどが脂肪細胞に分化することが明らかになっている (中野、博士論文)。また、この抗体が認識する抗原の分子量は約 350 kDa であることが判明している (中野、博士論文)。

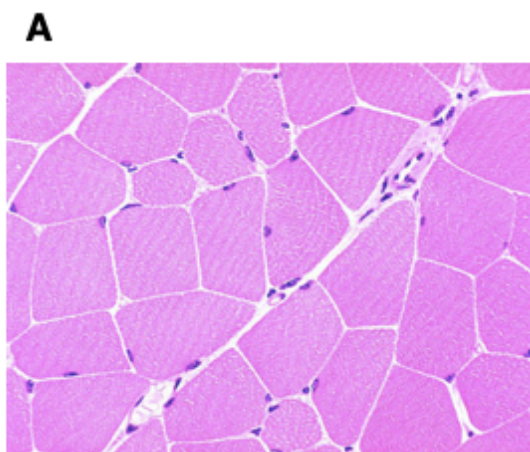
### 本研究の目的

これまでに述べてきたように、MPC は骨格筋内の線維組織および脂肪組織の起源と考えられている。しかし、DMD の病態では線維化が脂肪組織の出現より先にみられること (Gaeta et al., 2012) や、DMD のモデル動物である mdx マウスから単離した PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は線維芽細胞マーカーを強く発現していること (Uezumi et al., 2011) から、DMD などの病態でみられる骨格筋内脂肪細胞は MPC から直接分化したのではなく、MPC から筋線維芽細胞や線維芽細胞への分化を一度経てから脂肪細胞に分化したものである可能性が考えられる。このように、MPC の分化機構やその制御については未だ不明な点がある。未分化状態の MPC が筋再生を促進する一方で、分化後の線維芽細胞や脂肪細胞は筋機能や筋分化に対し抑制的に働くことを踏まえると、MPC の

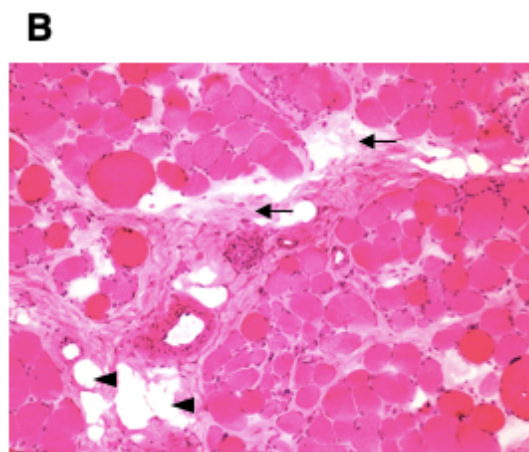
分化制御機構を明らかにすることは、DMD の病態形成機構を理解し、その治療法開発をしていく上で必要である。

前述の通り、当研究室で樹立した脂肪前駆細胞クローン 2G11 細胞は脂肪分化能を示すとともに、筋分化を促進する作用を持つ。このことから、2G11 細胞が骨格筋 MPC クローンであり、MPC の分化制御機構を解明する上で有用なモデルになる可能性が考えられる。

以上のことから、本研究では骨格筋 MPC の分化制御機構の解明を目的として、まず、第一章で 2G11 細胞が骨格筋 MPC クローンである可能性を検討した上で、MPC の分化機構の可逆性を検討した。第一章において 2G11 細胞が骨格筋 MPC クローンであることが示されたことから、第二章では 5C12 抗体を用いて MPC の骨格筋における動態を調べるとともに、5C12 抗体が認識する MPC 細胞膜表面に発現する分子であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 (CSPG4) の MPC 分化制御における機能解析を行った。第二章で CSPG4 が脂肪分化制御と筋線維芽細胞の活性化に関わる可能性が示されたことから、第三章ではこの可能性について DMD ラットを用いて検証を行った。



[http://medcell.med.yale.edu/histology/muscle\\_lab.php](http://medcell.med.yale.edu/histology/muscle_lab.php)

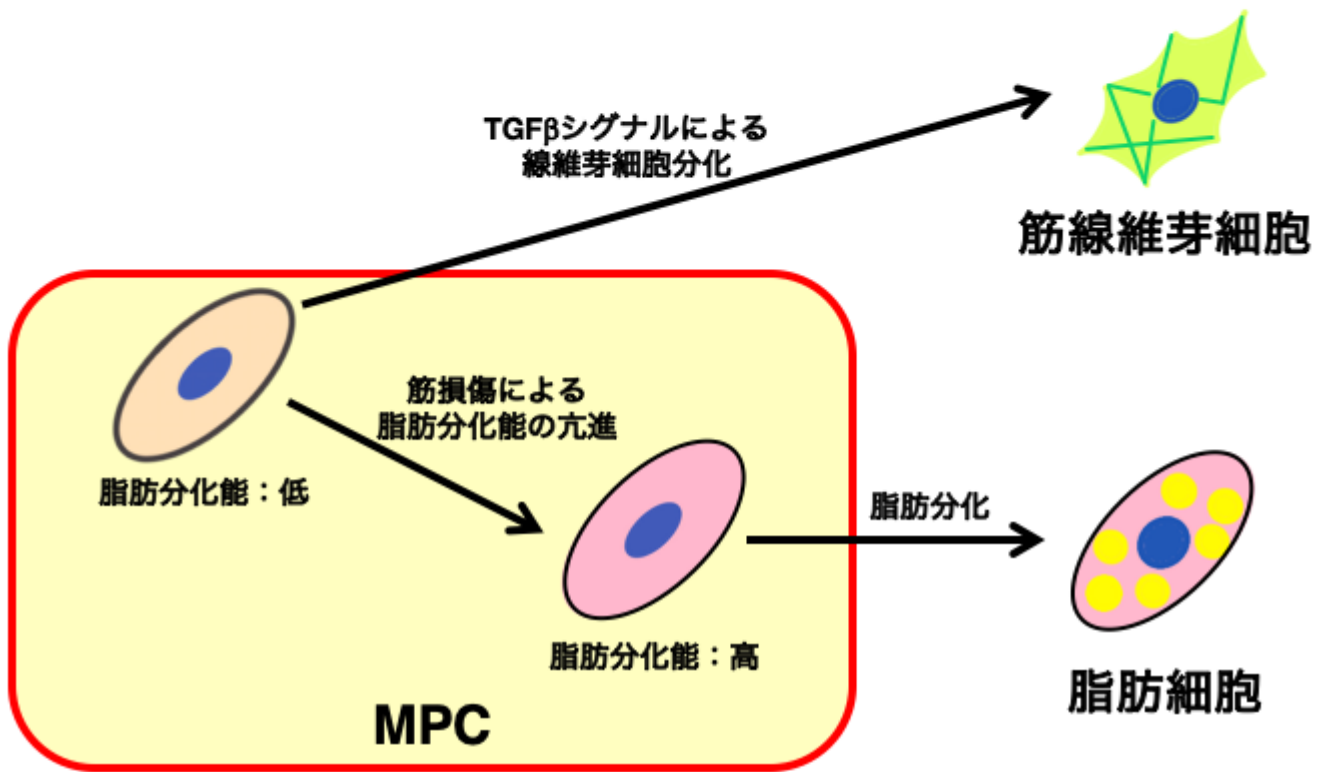


Copyright © 2002, William McDonald, M.D. Revised: 21 April 2002

**Fig. 0-1 正常および筋ジストロフィー患者骨格筋組織像**

**A**：正常な骨格筋はほとんど筋線維から構成されており、結合組織が占める割合は骨格筋全体の約 5%に過ぎない。

**B**：筋ジストロフィー患者の骨格筋では過剰な結合組織の蓄積（黒矢印）や間質内脂肪組織（黒矢頭）がみられる。



**Fig. 0-2 骨格筋 MPC の分化**

MPC の筋線維芽細胞分化は TGFβによって誘導される。

MPC の脂肪分化能は筋損傷によって亢進し、その後の脂肪分化誘導刺激によって脂肪細胞へと分化する。

## 第一章

### MPC の分化機構の可逆性の検討

本章の内容については学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。  
5年以内に出版予定。

## 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

## 緒言

2010年に Uezumi らのグループと Joe らのグループが骨格筋内の PDGFR $\alpha$ 陽性を示す細胞集団が脂肪分化能および線維芽細胞分化能を有することを示して以来 (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010, 2011)、PDGFR $\alpha$ が骨格筋内の MPC 細胞マーカーとして広く使われている。PDGFR $\alpha$ を細胞マーカーとして用いることで、PDGFR $\alpha$ 陽性の細胞分画に脂肪分化能を示す細胞、PDGFR $\alpha$ 陰性を示す細胞分画に筋衛星細胞を含む筋分化能を示す細胞というように明確に分けることが可能になった (Uezumi et al., 2010, 2011)。しかしながら、線維化のみられる mdx マウス骨格筋から単離した PDGFR $\alpha$ 陽性細胞は線維芽細胞マーカーを強く発現していること (Uezumi et al., 2011) から、PDGFR $\alpha$ 陽性細胞には未分化 MPC だけでなく線維芽細胞も含まれると考えられる。本研究の第一章でも、PDGFR $\alpha$ の発現が未分化 2G11 細胞と分化後の筋線維芽細胞の両方でみられることが示された。反対に、線維芽細胞マーカーとして知られている分子の中にも MPC においても発現が認められるものが存在する。実際、線維芽細胞マーカーのうち、Tcf4 (Mathew et al., 2011) や CTGF (Uezumi et al., 2011) は 2G11 細胞と筋線維芽細胞の両方で発現していることが第一章で確認された。 $\alpha$ -SMA についても未分化 2G11 細胞、筋線維芽細胞の両者ともに免疫染色では陽性を示すことから、MPC と筋線維芽細胞を区別する細胞マーカーとしての利用は難しいと考えられる。また、いずれも細胞内タンパク質や分泌性タンパク質であることから、これらのタンパク質に対する抗体を用いて骨格筋組織から生きた状態の細胞を単離することはできない。したがって、従来の MPC マーカーや線維芽細胞マーカーに代わる新たな細胞表面マーカーを見出すことは、MPC の単離や MPC と線維芽細胞・筋線維芽細胞の関係解明のために必要である。

当研究室では、未分化 MPC の探索および単離のため、未分化 2G11 細胞の細胞膜表面分子を認識する抗体、5C12 抗体を作製している (中野、博士論文)。これまでに、5C12 抗体が認識する分子は筋衛星細胞には発現していないこと、また、骨格筋初代培養細胞由来の 5C12 抗体陽性細胞は、ほぼ全て脂肪分化能を示すことがわかっている。したがって、5C12 抗体によって認識される分子は MPC に特異的に発現する分子である可能性が考えられる。この分子を同定し、骨格筋における局在や機能を知ることは、骨格筋の損傷・再生および線維化・脂肪組織蓄積機構を明らかにする上で役に立つと考えられる。

そこで、第二章では、5C12 抗体が認識する抗原の同定を行い、この分子を発現する細胞の特性を調べることで、5C12 抗体を MPC の細胞マーカーとして利用できるかど



うかを検討した。また、骨格筋内の 5C12 抗体陽性細胞の局在や損傷骨格筋における動態を調べるとともに、5C12 抗体が認識する分子の MPC の分化における機能を調べることとした。

## 材料と方法

### 動物と飼育条件

8~16 週齢の Wistar-Imamichi ラットのオスを用いた。これらは動物繁殖研究所（茨城、日本）から購入した。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）モデルを用いた解析には、東京大学獣医生理学教室において作出された *Dmd* 遺伝子変異ラット（DMD ラット）（Nakamura et al., 2014）、およびその同腹の野生型ラット（WT）のオスを用いた。

動物は、温度  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 60%、明暗条件：明期 12 時間、暗期 12 時間（明期：8:00-20:00）の条件下で飼育し、固形飼料（ラボ MR スタンダード；日本農産工業、神奈川、日本）および水は自由に摂取させた。全ての動物実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づいて行い、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部実験動物委員会の承認を得た。

### 2G11 細胞の維持培養、脂肪分化誘導、線維芽細胞分化誘導

第一章と同様の材料・方法で行った。

### ラット骨格筋からの骨格筋初代培養細胞の単離および培養

上記の条件下で飼育したラットを  $\text{CO}_2$  ガスにて安楽死させ、70%エタノールに 5 分間浸け、全身を消毒した。その後、全身の骨格筋を採取し PBS に浸した。付着している脂肪および神経、結合組織を取り除いた後、10 cm シャーレに骨格筋を移し、鉗で細切した。細切した骨格筋重量を測定し、プロテアーゼ（1.25 mg/mL；Sigma-Aldrich）を含む 40 mL の PBS につき 8~10 g となるように加え、 $37^\circ\text{C}$  で 1 時間酵素処理した。酵素処理終了後、 $2,150 \times g$  で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。再び  $37^\circ\text{C}$  の PBS を加え攪拌し、 $600 \times g$  の遠心分離を行い、単核細胞を含む上清を回収した。この操作を遠心分離の時間を 10 分、8 分、5 分と短くしながら合計 3 回繰り返し、回収した上清を  $2,150 \times g$  で 3 分間遠心分離した。沈殿した細胞を通常培地にて浮遊させ、孔径 70  $\mu\text{m}$  の cell strainer（BD Falcon）を用いて濾過した。

得られた単核細胞は、poly-L-lysine と human plasma fibronectin でコートした 10 cm シャーレに、その細胞が由来する筋組織の重量が 30~40 g となるように播種した。細胞は通常培地にて  $37^\circ\text{C}$ 、湿度飽和、5% $\text{CO}_2$ -95%空気条件下で培養した。培養開始 24 時間後に、通常培地で 2 回から 3 回洗うことにより非付着性の細胞や結合組織などを取り除いた。

## siRNA (short interference RNA) の導入

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(chondroitin sulfate proteoglycan 4; CSPG4) に対する siRNA の配列を以下に sense 鎖、antisense 鎖の順に示した。

#1	5'-gugauucagggccggaagatt-3'	5'-ucuuccggcccugaaucactt-3'
#2	5'-gcaacauagucuauguccatt-3'	5'-uggacauagacuauguugctt-3'
#3	5'-cauagaggaugauauccatt-3'	5'-ugggauaucauccucuaugtt-3'

最終濃度 50 nM となるように調製した CSPG4 に対する siRNA、およびネガティブコントロールとして MISSION siRNA Universal Negative Controls (Sigma-Aldrich) を導入に用いた。2G11 細胞を、24 well プレートに 1 well あたり  $1 \times 10^4$  個となるように、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびゲンタマイシンを含まない通常培地に懸濁し、播種した。siRNA 導入開始から 24 時間後に通常培地に培地交換を行うことで siRNA を除いた。siRNA 導入から 48 時間後に RNA 抽出を行い、リアルタイム RT-PCR を用いて siRNA 導入による発現抑制を評価した。

## コンドロイチナーゼ処理

コンドロイチン硫酸鎖を除去するため、2G11 細胞を 0.1 U/mL のコンドロイチナーゼ ABC (C36667、Sigma-Aldrich) を含む通常培地で一晩培養した。

## セルソーティング

培養開始から 5 日経過した骨格筋初代培養細胞を 10 mM の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (同仁科学研究所、熊本、日本) /PBS とセルスクレーパー (SARSTEDT AG. Co、Nümbrecht、Germany) を用いて剥がした。剥がした細胞を回収し、2.5% FBS/PBS を加え、 $2,150 \times g$  で 3 分間遠心分離を行い、沈殿した細胞を 2.5% FBS/PBS で再懸濁した。15 mL 遠沈管 (Corning) 1 本あたり細胞数が  $1 \times 10^6$  個以上になるように分注した。再度 2.5% FBS/PBS を加え、 $2,150 \times g$  で 3 分間遠心分離を行い、一次抗体を  $2 \mu\text{g/mL}$  となるように入れ、氷上で 30 分間反応させた。一次抗体には標的抗体として 5C12 抗体を用い、ネガティブコントロールとしてマウス IgG<sub>1</sub> アイソタイプコントロール (clone no. G3A1、Cell Signaling Technology) を用いた。2.5% FBS/PBS で攪拌洗浄したのち、二次抗体と氷上で 30 分間反応させた。二次抗体には、抗マウス Alexa 488 ヤギ抗体 (Invitrogen (Life Technologies、Carlsbad、CA、USA)) を 500 倍希釈で用いた。さらに 2.5% FBS/PBS で攪拌洗浄したのち、最

終密度  $1\sim 5\times 10^6$  個となるように通常培地で懸濁した。さらに死細胞除去のため propidium iodide (Sigma-Aldrich) を加えた。

上記のように調製したサンプルから Beckman coulter MoFlo XDP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) で細胞を分取した。分取した細胞は通常培地に回収後、 $2,150\times g$  で 6 分間遠心し、沈殿させた。

### 免疫沈降

2G11 細胞を 10 cm シャーレで培養し、Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.8)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、100 mM NaF、10% glycerol、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、1% p-nitrophenyl phosphate、0.55% aprotinin、0.2% Protease Inhibitor Cocktail、1% Triton X-100) を入れてタンパク質を抽出した。タンパク質抽出液を、 $31,200\times g$  で 5 分間遠心分離した後に上清を回収し、5C12 抗体で免疫沈降を行った。ネガティブコントロールとしてマウス IgG<sub>1</sub> アイソタイプコントロール (clone no. G3A1、Cell Signaling Technology; 以下、アイソタイプコントロールとする) を使用した。25  $\mu\text{L}$  の磁気ビーズ (Protein G Mag Sepharose; GE Healthcare Life Sciences) を TBS で平衡化したのち、タンパク質抽出液を 1 mL 加え、 $4^\circ\text{C}$  で 1 時間転倒混和した。その後上清を回収し、5C12 抗体またはアイソタイプコントロールを 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  になるように加え、 $4^\circ\text{C}$  で一晩転倒混和した。一次抗体反応後、平衡化した磁気ビーズの入ったチューブにサンプルを回収した。懸濁した後、再び  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間転倒混和した。反応終了後、上清をチューブに回収し、磁気ビーズを TBS で 3 回洗浄した。次に Laemmli サンプルバッファー (BIO-RAD) を加え、よく懸濁後、 $100^\circ\text{C}$  で 5 分間加熱した。磁気ビーズを取り除き、これをサンプルとして用いた。

### 培養細胞からのタンパク質抽出

CSPG4、 $\alpha$ -SMA のタンパク質発現解析に供するサンプルのタンパク抽出については第一章と同様の材料・方法で行った。

### ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE)

免疫沈降により得られたサンプルは 4-20% のグラジエントゲル (BIO-RAD) を、CSPG4 および  $\alpha$ -SMA のタンパク質発現解析に供するサンプルはそれぞれ 6% または 10% のゲルを用いて電気泳動により分離した。サンプルを各レーンにアプライし、泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM glycine、0.1% SDS; BIO-RAD) 中で 100~200 V の定電圧下にて泳動した。

## ウェスタンブロッティング

5C12抗体（最終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で使用）を一次抗体に用いる場合は 5% BSA/TBS-T でブロッキングを行い、1% BSA/TBS-T で一次抗体の希釈を行った。抗 $\alpha$ -SMA マウスモノクローナル抗体（希釈倍率 4,000 倍；clone1A4、A254、SIGMA）を一次抗体に用いる場合は、5%スキムミルク/0.1% TBS-T でブロッキングを行い、1%スキムミルク/0.1% TBS-T で一次抗体の希釈を行った。ローディングコントロールとして、抗 $\beta$ -actin マウスモノクローナル抗体（希釈倍率 4000 倍；AC-15、A1978、Sigma-Aldrich）、抗 vinculin ウサギモノクローナル抗体（希釈倍率 50,000 倍；EPR8185、ab129002、abcam）、抗 Syp/SHPTP2 ウサギモノクローナル抗体（希釈倍率 1000 倍；06-118、Upstate Biotechnology）、抗 $\alpha$ -tubulin（希釈倍率 660 倍；ab4074、abcam）抗体を用いた。

転写、二次抗体反応、発光および現像については第一章と同様の材料と方法で行った。

## 質量分析

SDS-PAGE終了後、Silver quest（Invitrogen（Life Technologies））を用いて、製造元の推奨する方法に従って銀染色を行った。5C12抗体でバンドが検出される領域のゲルを切り出し、1 mm四方程度に細切後、低吸着エッペンドルフチューブ（LoBindチューブ；Eppendorf, Hamburg, Germany）に回収した。30%アセトニトリル（acetonitrile；ACN）、50 mM炭酸水素アンモニウム（ammonium bicarbonate；AMBC）溶液（30% ACN-50 mM AMBC溶液）を1 mL添加し、最低1時間攪拌した後、30% ACN-50 mM AMBC溶液を除去した。次に、50% ACN-50 mM AMBC溶液を1 mL添加し、最低1時間攪拌した後、溶液を同様に除去した。さらに、100% ACNを100  $\mu\text{L}$ 添加し、5分間攪拌した後、ACNを除去し、5分間風乾させた。ゲル片がすべて浸かる量のトリプシン溶液（20 ng/ $\mu\text{L}$  trypsin、5% ACN、50 mM AMBC）を添加し、37°Cで12~15時間反応させた。ここまでの操作は、すべてクリーンベンチ内で行った。続いて、ゲル片に50% ACN、0.1% trifluoroacetic acid（TFA）溶液を50  $\mu\text{L}$ 添加し、1時間攪拌した後、上清を回収した。さらに、ゲル片に70% ACN/0.1% TFA溶液を50  $\mu\text{L}$ 添加し、30分間攪拌した後、上清を回収した。回収した上清を混合し、遠心濃縮により9  $\mu\text{L}$ 以下まで濃縮後、超純水で希釈した。終濃度0.1%となるよう1% TFAを添加したものを質量分析用のサンプルとした。

液体クロマトグラフィー（Easy nLC 1000；Thermo Fisher Scientific）をQ Exactive MS（Thermo Fisher Scientific）に接続し、ナノスプレー（EASY-Spray Sources；Thermo Fisher Scientific）を用いたエレクトロスプレーイオン化法によりイオン化を行った。液体クロマトグラフィーのカラムにはC18 analytical column（Reprosil-Pur 3  $\mu\text{m}$ 、75

$\mu\text{m id} \times 12 \text{ cm packed tip column}$  ; 日京テクノス、東京、日本) を用い、溶媒として 0.1% ぎ酸と 100% ACN/0.1% ぎ酸の 2 種類を流速 300 nL/min で用いた。イオン化は 1.8 kV、250 °C の条件で行った。ペプチドの開裂は、高エネルギー衝突解離により行った。

ペプチド測定に適した設定で MS および MS/MS スペクトルの測定を行った。具体的には、装置にイオンが飛んできた際に MS スペクトルを測定するトリガーとして、イオンの量 (AGC target) を  $3 \times 10^6$  に、経過時間 (Maximum IT) を 60 ms に設定した。これにより、装置にイオンが  $3 \times 10^6$  たまる、あるいは、60 ms 経過すると MS スペクトルを測定するようにした。分解能 (Resolution) を 70,000 とし、測定する質量電荷比 (Scan range) は 350 ~ 1,300 とした。また、MS/MS スペクトルの測定 (loop count) は、MS の測定ごとに存在量の最も多い 10 種類のイオンを MS/MS に供する設定にした (top10)。

MS/MS スペクトル測定は、AGC target を  $1 \times 10^5$ 、Maximum IT を 60 ms に設定した。また、一度 MS/MS スペクトルを測定したプレカーサーイオンに関しては、10 秒間 MS/MS スペクトルの測定は行わないようにした (Dynamic exclusion)。Resolution を 17,500 とし、プレカーサーイオンを単離する質量幅 (Isolation window) を 2.0 m/z、電荷 (Charge excl unassigned) が 2 ~ 4、質量電荷比 (Fixed first mass) が 100.0 以上のイオンのみを測定、開裂させる際のエネルギー (normalized collision energy ; NCE) を 28.0 に設定した。これらの設定により、理論上、最低でも 1 秒間に一度、MS スペクトル測定とそれに続く 10 回の MS/MS スペクトル測定が行えるようにした。

MS スペクトルの質量電荷比と電荷を設定し、その設定に合致する MS スペクトルのみの MS/MS スペクトルを測定した。MS/MS スペクトル測定は、AGC target を  $1 \times 10^6$ 、Maximum IT を 200 ms に設定した。Resolution を 70,000 とし、Isolation window を 2.0 m/z、Fixed first mass は 120.0、NCE を 27 に設定した。

タンパク質、ペプチドの同定を目的とした測定の結果解析には、解析ソフトとして Protein Discoverer version 1.3 (Thermo Fisher Scientific) を、データベースとして Mascot を用いた。ペプチド同定の際の偽陽性率は 1% 以下とした。また、ユビキチン化ペプチドの同定を目的とした結果解析には、Protein Discoverer に加えて、Protein Pilot (AB SCIEX, Framingham, MA, USA) も用いた。ペプチドの定量を目的とした測定の結果解析には、解析ソフトとして Pinpoint version 1.1 (Thermo Fisher Scientific Framingham, Waltham, MA, USA) を用いた。

## RNA の抽出、逆転写反応

TRIzol reagent (Invitrogen) を 24 well プレートで培養した細胞に 500  $\mu\text{L}$ 、セルソーティング後  $2.150 \times g$  で 6 分間遠心分離し、沈殿させた細胞には 1 mL 加え、攪

拌後、室温で5分間静置した。以降の手順については第一章と同様の材料と方法で行った。

### 半定量的 RT-PCR

逆転写反応によって得た cDNA 溶液を用いて半定量的 PCR を行った。以下に各遺伝子に用いたプライマーを forward、reverse の順に示した。

<i>CD34</i>	5'-tgtgctcacacatcatcttctg-3'	5'-tttgctggaaagtctgtgcta-3'
<i>CD45</i>	5'-caaatttacctgcgacattcaa-3'	5'-tcacatttttctgaaggggtct-3'
<i>Pax7</i>	5'-acgatgaggaaggagacaaaaa-3'	5'-ggttactgaaccagacctggac-3'
<i>MyoD1</i>	5'-aagtgaacgaggccttcgag-3'	5'-gccgctgtaatccatcatgc-3'
<i>Myogenin</i>	5'- aagtctgtgtctgtggaccg-3'	5'- caaatgatctcctgggttggga-3'
<i>PDGFR<math>\alpha</math></i>	5'- cttgcaatccgtcagtagca-3'	5'- acgtcctcggctagggttat-3'
<i>PDGFR<math>\beta</math></i>	5'- tggcctctaagaactgtgttca-3'	5'- tgatggcattgtagaactggtc-3'
<i>HPRT</i>	5'- gctggtgaaaaggacctct-3'	5'- cacaggactagaacryctgc-3'

(y : c または t)

PCR に用いた試薬と組成は以下に示した。

滅菌超純水	9 $\mu$ L
2 $\times$ PCR buffer	25 $\mu$ L
2 mM dNTP	10 $\mu$ L
Forward Primer	1.5 $\mu$ L
Reverse Primer	1.5 $\mu$ L
KOD FX	0.5 $\mu$ L
cDNA	1 $\mu$ L
<hr/>	
Total Volume	48.5 $\mu$ L

以下に示す反応条件で PCR を行った。サイクル数は *CD34*、*Pax7*、*MyoD1* については 35 回、その他については 30 回とした。

### PCR 反応条件

95°C	2分	30~35回
95°C	1分	
60°C	1分	
72°C	1分	
72°C	10分	

得られた PCR 産物は 3%のアガロースゲル (Invitrogen (Life Technologies)) を用いた電気泳動により分離した。試料を各レーンにアプライし、Tris Acetate EDTA 緩衝液 (TAE 緩衝液 ; 40 mM Tris、20 mM 酢酸、1 mM EDTA (pH 8.0)) 中で泳動した。泳動が終了したゲルをエチジウムブロマイドで染色し、撮影を行った。

### 定量的 RT-PCR (リアルタイム RT-PCR)

第一章と同様の材料と方法で行った。*chondroitin sulfate proteoglycan 4 (Cspg4)*、*α-actin 2 (Acta2)*、*collagen 1a1 (Colla1)*、*connective tissue growth factor (Ctgf)* および内部標準遺伝子である *hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)* の定量に用いたプライマーは forward、reverse の順に以下に示した。

<i>CSPG4</i>	5'-cttggccttgttggtcagat-3'	5'-cacctccaggtggttctcc-3'
<i>Acta2</i>	5'-tgccatgtatgtggctattca-3'	5'-accagttgtacgtccagaagc-3'
<i>Colla1</i>	5'-tgcttgaagacctatgtgggta-3'	5'-aaaggcagcatttgggggat-3'
<i>Ctgf</i>	5'-ggtgacctagaggaaaacattaaga-3'	5'-ccggtaggtcttcacactgg-3'
<i>HPRT</i>	5'-gaccggttctgtcatgtcg-3'	5'-acctggttcatcatcaactaacac-3'

### 骨格筋の損傷

人工的なラット骨格筋の壊死とそれに続く再生の誘導には、0.85%生理食塩水にて溶解した 0.75%塩酸ブピバカイン (Sigma-Aldrich) を用いた。BPVC はフィルター (Millex GP25 (孔径 0.22 μm) ; Millipore) で濾過滅菌後、23 ゲージの注射針を用いて片側の前脛骨筋あたり 200 μL 注入した。

### 骨格筋の採取

*Dmd* 遺伝子変異ラットおよび野生型ラット (WT) は 13 週齢で、BPVC 投与群は BPVC 投与から 0、2、3、5、7、14 日後に頸椎脱臼屠殺し、前脛骨筋を採取した。採取した前脛骨筋は結合組織を取り除いた後、液体窒素で冷却したイソペンタン (和光純



薬工業) 中で急速凍結した。その後ドライアイス上で静置し、組織周辺のイソペンタンを蒸発させ、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

採取した前脛骨筋を O.C.T コンパウンド (Tissue-Tec ; Sakura Finetek USA, Torrance, CA, USA) でクリオスタット (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) に固定し、厚さ  $7\ \mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。切片は筋線維に対して垂直な面となるように作製した。切片は MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) 上に貼付けた後に風乾し、使用時まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

### 骨格筋の免疫染色

脂肪滴の膜に存在する perilipin の免疫染色には抗ヒト・マウス perilipin ウサギモノクローナル抗体 (希釈倍率 500 倍 : clone D1D8, #9349, Cell Signaling Technology) を、筋基底膜のマーカーである laminin の免疫染色には抗マウス laminin ウサギポリクローナル抗体 (希釈倍率 200 倍 : L9393, SIGMA) を、筋細胞膜のマーカーであるジストロフィンの免疫染色には抗ヒトジストロフィンウサギポリクローナル抗体 (希釈倍率 100 倍 : clone H-300, sc-15376, Santa Cruz Biotechnology) を、再生筋線維のマーカーである胎児型ミオシン重鎖 (embryonic myosin heavy chain ; eMHC) の免疫染色には抗ヒト eMHC マウスモノクローナル抗体 (希釈倍率 100 倍 : clone F1.652, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA) を、間質内線維組織のマーカーである 1 型コラーゲンの免疫染色には抗ヒト collagen I ウサギポリクローナル抗体 (希釈倍率 200 倍 : ab34710, abcam) を用いた。5C12 抗体は 50 倍希釈で使用した。5C12 抗体を用いた染色と perilipin, laminin の染色には、室温において、4% PFA/PBS にて 15 分間固定した切片を用いた。ジストロフィンの染色には、4% PFA/PBS を用いて室温で 15 分間固定した後、メタノールを用いて室温で 20 分間再固定した切片を用いた。PBS により 3 回洗浄後、5% 正常ロバ血清 (normal donkey serum ; NDS, MERCK, Darmstadt, Germany) を含む PBS (5% NDS/PBS) にて 20 分間ブロッキングした。各一次抗体は 5% NDS/PBS に希釈し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させた。5% NDS/PBS に抗ウサギ Alexa Fluor 488 ロバ抗体と抗マウス Alexa Fluor 594 ロバ抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratory) を 500 倍希釈し、室温にて 1 時間、二次抗体反応を行った。対比染色として核を Hoechst 33258 Dye を用いて染色した。Zenon Alexa Fluor 488 マウス IgG<sub>1</sub> ラベリングキット (Molecular probe (Life Technologies, Palo Alto, CA, USA)) を用いて、抗ヒト eMHC マウスモノクローナル抗体、抗ウサギ速筋型 MHC マウスモノクローナル抗体 (clone MY-32, M 4276, SIGMA)、抗ヒト遅筋型 MHC マウスモノクローナル抗体 (NOQ7.5.4D, M 8421, SIGMA) に Alexa

Fluor 488 を標識し、5C12 抗体との二重染色に使用した。封入には水溶性蛍光退色防止封入剤 (Fluoro Mount、Diagnostic BioSystems、Pleasanton、CA、USA) を用い、蛍光を正立蛍光顕微鏡 (BX53、オリンパス) にて観察、写真撮影を行った。

### 細胞の免疫染色

5C12 抗体は 50 倍希釈で使用した。脂肪分化誘導転写因子である PPAR $\gamma$  の免疫染色には抗 PPAR $\gamma$  マウスモノクローナル抗体 (希釈倍率 100 倍 : clone E-8、sc-7273、Santa Cruz Biotechnology) を、 $\alpha$ -SMA の免疫染色には抗  $\alpha$ -SMA マウスモノクローナル抗体 (希釈倍率 400 倍 : clone 1A4、A254、SIGMA) を用いた。

室温において、4% PFA/PBS にて 15 分間、細胞を固定した。PBS により 3 回洗浄後、5% NGS/PBS にて 20 分間ブロッキングした。PPAR $\gamma$  および  $\alpha$ -SMA を染色する際は、細胞膜の透過処理のため、Triton X-100 を最終濃度 0.1% となるように加えた。一次抗体は 5% NGS/PBS に希釈し、4°C で一晩反応させた。5% NGS/PBS に抗マウス Alexa Fluor 488 ヤギ抗体または抗マウス Alexa Fluor 594 ヤギ抗体 (Life Technologies) を 500 倍希釈し、室温にて 1 時間、二次抗体反応を行った。対比染色として核を Hoechst 33258 Dye を用いて染色した。撮影は蛍光顕微鏡 (BX50、オリンパス) の 10 倍対物レンズを用いて行い、Hoechst 陽性細胞数、PPAR $\gamma$  陽性細胞数を算出した。

### Oil Red O 染色

第一章と同様の材料と方法で行った。

### CRISPR/Cas 法による CSPG4 欠損変異を持つ 2G11 細胞クローンの作製

CRISPR/Cas 法による CSPG4 欠損変異を持つ 2G11 細胞クローンの作製については、東京大学大学院農学生命科学研究科・農学部遺伝子組換え生物等委員会により、第二種使用等拡散防止措置 (区分 P1A) の機関承認を得て行った。

### プラスミドの作製

Addgene (Watertown, MA, USA) を介して Berlin Institute of Health の Ralf Kuehn 氏より分与された pU6-(BbsI)-CBh-Cas9-T2A-mCherry (Addgene plasmid # 64324) を用いて、Cas9 mRNA および CSPG4 gRNA を発現するプラスミドベクターを作製した。Bbs I で制限酵素処理したプラスミドベクターと U6 プロモーター下流に rat CSPG4 exon1 に存在するターゲット配列と gRNA の scaffold RNA 配列をつないだ 70 塩基の一本鎖 DNA (配列は以下に示す) を NEBuilder HiFi DNA

Assembly MasterMix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いライゲーションした。

U6 promoter-CSPG4 target-gRNA scaffold 配列 :

5'-atcttggtgaaaggacgaaacaccggccagggtggagctgacaggttttagagctagaaatagcaagtt-3'

ライゲーションしたベクターを、大腸菌コンピテントセル (DH5  $\alpha$ 、ニッポンジーン、富山、日本) に導入し、50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンナトリウム (和光純薬工業) を含む LB 寒天培地 (LB 培地 (1% bacto trypton、0.5% bacto yeast extract、1% NaCl) に bacto agar を 1.5% となるように加えたもの) を用いて 37°C で一晩培養した。翌日に形成された大腸菌コロニーを 1 クローンあたり 1 mL の 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のアンピシリンナトリウムを含む LB 培地を用いて 37°C で振盪培養した。翌日に、FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いてプラスミドの精製を行った。精製したプラスミドの配列を BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシークエンスした。なお、シークエンスには ABI3130xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。シークエンスに用いたプライマー配列は以下に示した。

hU6 5'-gagggcctatttcccatgatt-3'

## 2G11 細胞へのプラスミドの導入と細胞のクローニング

CSPG4 のターゲット配列が正しく導入されていたプラスミド溶液の濃度を GeneQuant II (GE Healthcare Life Sciences) にて測定し、2G11 細胞への導入に用いた。プラスミドの導入は、リポフェクタミン 3000 (Thermo Fisher Scientific) を製造元の推奨する方法で用いて行った。

プラスミドの導入から 3 日後に細胞を PBS で洗浄し、0.25% Trypsin/EDTA を用いて剥がした。続いて、細胞を含む 0.25% Trypsin/EDTA 溶液を予め等量の通常培地を入れた遠沈管に移し、2,150  $\times g$  で 3 分間遠心した。遠心終了後、上清を吸引除去し、1 mL の通常培地で懸濁した。細胞懸濁液は Falcon® セルストレーナーキャップ付 12  $\times$  75 mm チューブ (352235、CORNING) に付属の 35  $\mu\text{m}$  のセルストレーナーに通し、BD FACS Aria (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) で細胞を分取した。分取した細胞は通常培地に回収した。

分取した細胞は 96 well プレート 2 枚に 1 well あたり 10 個となるように播種し、bFGF を 10 ng/mL となるように添加した通常培地で培養した。コンフルエントになった well の細胞の一部は 48 well プレートに継代し、5C12 抗体による免疫染色を行った。5C12 陰性の細胞が多かった 3 well から、それぞれ 96 個の細胞を 96 well プレートに 1 well あたり 1-2 個となるように播種した。翌日に 1 well あたり 1 個の細胞を含む well を選抜し、さらに 4 日後に 1 well に 1 コロニーのみ含む well を選抜した。選抜された well のうち、コンフルエントになったものは、1/3 ずつ 2 枚の 48 well プレートに継代するとともに、残りはシーケンスのためにゲノム抽出を行った。細胞を継代し 2 枚の 48 well プレートのうち 1 枚は 5C12 抗体による免疫染色を行った。残りの 1 枚はコンフルエントになるたびに 12 well プレート、続いて 6 well プレートに継代することで細胞数を増やした。

### ゲノムシーケンス

培地を吸引除去した細胞を PBS で洗浄し、180  $\mu$ L の 50 mM NaOH を加え、95°C、10 分間熱処理した後、20  $\mu$ L の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え、中和した。これを 1  $\mu$ L 用い、KOD FX (東洋紡) を用いて以下のプライマー配列 (forward、reverse の順に示した)、温度、時間にて PCR 反応を行った。

*CSPG4* 5'-gacttgcgacttgacttgtgac-3'      5'-ttcactcaccaggagctgtaga-3'

#### PCR 反応条件

94°C	2 分	40 回
98°C	10 秒	
60°C	30 秒	
68°C	1 分	

PCR 産物はアガロースゲル電気泳動をした後、目的の産物のバンドを含むゲルを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス) を用いて PCR 産物を抽出した。この PCR 産物を、直接 BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてシーケンスした。なお、シーケンスには ABI3130xl (Applied Biosystems) を用いた。

### 統計処理

数値データは平均値±標準誤差で示した。平均値の比較を、Unpaired Student's *t* test を用いて行った。3 群以上の場合は ANOVA で解析した後、断りのない限り、Tukey-Kramer's test を用いた検定を行った。危険率 5%未満をもって有意な差があると判定した。

## 結果

### 5C12 抗体が認識する抗原の同定

2G11 細胞タンパク質抽出液を用いて、5C12 抗体が認識する抗原の免疫沈降を行った。ウェスタンブロッティングで確認すると、5C12 抗体を用いた免疫沈降物中にも、分子量約 310 kDa のスメア状のバンドが検出された。このバンドはネガティブコントロールの免疫沈降物では検出されなかった (Fig. 2-1)。

免疫沈降物を SDS-PAGE によって分離し、銀染色を行った。ウェスタンブロッティングで 5C12 抗体によって認識されるバンドが検出される領域 (Fig. 2-2A、B) を切り出し、LC-MS/MS 解析を行った。その結果、5C12 抗体の免疫沈降物に特異的に含まれるタンパク質としてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 (chondroitin sulfate proteoglycan 4 ; CSPG4) が同定された (Fig. 2-3、Table 2-1、2-2)。

CSPG4 が 5C12 抗体によって認識される抗原であることを確認するため、2G11 細胞に CSPG4 に対する siRNA (siCSPG4) を導入し、CSPG4 の発現抑制を行った。siCSPG4 の導入によって CSPG4 遺伝子の発現量が有意に低下することをリアルタイム PCR による CSPG4 の発現解析によって確認した (Fig. 2-4A)。siCSPG4 を導入した 2G11 細胞からタンパク質を抽出し、5C12 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行ったところ、対照群 (siControl) と比較して、5C12 抗体によって認識されるバンド強度が低下していた (Fig. 2-4B、C)。5C12 抗体を用いた免疫染色でも siCSPG4 を導入した 2G11 細胞ではほとんどシグナルがみられなかった (Fig. 2-4D)。以上の結果より、5C12 抗体によって認識される分子が CSPG4 であることが確認された。CSPG4 は、2225 アミノ酸からなる細胞外ドメイン、25 アミノ酸からなる細胞膜通過ドメイン、76 アミノ酸からなる細胞内ドメインの 3 つのドメインに分けられる細胞膜表面分子である (Fig. 2-5 ; Nishiyama et al., 1991; Tillet et al., 1997 ; Price et al., 2011)。さらに、CSPG4 の細胞外ドメインは 2 つの laminin-G ドメインを持つ D1 ドメイン、15 個の CSPG リピートからなる D2 ドメイン、マトリックスメタロプロテアーゼによる切断を受ける箇所を 2 つ持つ D3 ドメインの 3 つに分けられる。D2 ドメインに位置する 999 番目のセリン残基はコンドロイチン硫酸鎖による修飾を受けるため、ウェスタンブロッティングにおいて CSPG4 のバンドがスメア状に検出される (Stallcup, 2002)。このコンドロイチン硫酸鎖はコンドロチナーゼ ABC 処理によって除去することができる。そこで、5C12 抗体が認識する部位がコンドロイチン硫酸鎖なのか、CSPG4 のコアプロテインなのかを調べるため、コンドロチナーゼ ABC 処理した 2G11 細胞からタンパク質を抽出し、5C12 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、

コンドロイチナーゼ ABC 処理を行った 2G11 細胞では、一本に凝縮されたバンドが 5C12 抗体で検出された (Fig. 2-4E)。このことから、5C12 抗体が認識するのは CSPG4 の硫酸鎖ではなく、コアプロテインであることがわかった。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。

#### **bFGF 処理または TGF $\beta$ 処理時の 2G11 細胞における CSPG4 発現の比較**

CSPG4 の発現が FGF シグナルや TGF $\beta$ シグナルによって変化するかどうかを調べるため、2G11 細胞を bFGF または TGF $\beta$ を添加して培養し、5C12 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって CSPG4 のタンパク質発現を調べた。その結果、どの細胞においても CSPG4 のタンパク質発現は認められたが、bFGF を添加した 2G11 細胞で発現量が増加していた。また、bFGF を添加した 2G11 細胞において約 120 kDa の位置にも 5C12 抗体によって検出されるバンドがみられた (Fig. 2-6A, B)。免疫染色においても、bFGF を添加した 2G11 細胞で CSPG4 の強いシグナルがみられた (Fig. 2-6C)。このことから、CSPG4 は FGF シグナルによって発現量が増加する因子であることがわかった。また、新たに 5C12 抗体によって検出される約 120 kDa の分子が存在することが判明した。

#### **骨格筋間葉系初代培養細胞における CSPG4 陽性細胞の特性解析**

CSPG4 はマウスの骨格筋においては周皮細胞のマーカーとして用いられており (Birbrair et al., 2013a, b)、周皮細胞には脂肪分化能と線維芽細胞分化能を示す 1 型周皮細胞と筋分化能を示す 2 型周皮細胞が含まれること (Birbrair et al., 2013a, b) から、ラット骨格筋の CSPG4 陽性細胞にも間葉系細胞と筋系譜細胞の両方が含まれると考えられる。

ラット骨格筋に存在する CSPG4 陽性細胞の性質を調べるため、5C12 抗体を用いたセルソーティングにより、骨格筋初代培養細胞から、5C12 抗体陽性細胞の単離を行った (Fig. 2-7A)。幹細胞マーカーである CD34、血球系細胞マーカーである CD45、間葉系細胞マーカーである PDGFR $\alpha$ および $\beta$ 、筋系譜細胞マーカーである Pax7、MyoD、myogenin の遺伝子発現について、2G11 細胞、セルソーティング前の骨格筋初代培養細胞、5C12 抗体陰性細胞との比較を行った (Fig. 2-7B)。CSPG4 の発現が 5C12 抗体陽性細胞で認められ、5C12 抗体陰性細胞で認められなかったことから、セルソーティングが正確に行われていることが確認された。2G11 細胞は CD34、PDGFR $\alpha$ および $\beta$ を発現していたが、Pax7、MyoD、myogenin は発現していなかったことから、2G11 細胞が筋系譜ではなく間葉系細胞であることが確認された。CSPG4 陽性細胞には幹細胞

マーカー、間葉系細胞マーカーに加えて、筋系譜細胞マーカーと血球系細胞マーカーの発現がみられた。このことは、CSPG4 陽性細胞には 2G11 細胞のような間葉系の細胞だけでなく、筋系譜の細胞や血球系細胞も含まれていることを示している。一方、CSPG4 陰性細胞も間葉系細胞マーカー、筋系譜細胞マーカー、幹細胞マーカーの発現がみられたが CD45 の発現はほとんどみられなかった (Fig. 2-7B)。以上の結果から、骨格筋初代培養細胞の CSPG4 陽性細胞には間葉系細胞、筋系譜細胞、血球系細胞が含まれていると考えられた。

### 骨格筋初代培養細胞における CSPG4 陽性細胞の脂肪分化能および線維芽細胞分化能の解析

CSPG4 陽性細胞に含まれると考えられる間葉系細胞、筋系譜細胞および血球系細胞の割合を調べるために、当研究室で骨格筋初代培養細胞から樹立した CSPG4 陽性細胞クローン (中野、博士論文) を用いて、脂肪分化能および線維芽細胞分化能を調べた。その結果、2G11 細胞を含めて調べた CSPG4 陽性細胞クローン 19 クローンのうち、14 クローン (73.7%) は TGF $\beta$  依存性に  $\alpha$ -SMA を発現した一方で、5 クローン (26.3%) は TGF $\beta$  が未添加でも  $\alpha$ -SMA を発現していた。このことは、前者の 14 クローンは線維芽細胞の前駆細胞であり、5 クローンは分化した線維芽細胞であることを示している。脂肪分化能を調べると、線維芽細胞の前駆細胞である 14 クローンのうち 13 クローン (92.9% ; 全体の 68.4%) は脂肪細胞に分化することが判明した。5 つの線維芽細胞クローンのうち 3 クローンはほとんど脂肪細胞に分化しなかったが、2 クローンは脂肪細胞に分化した (Fig. 2-8, Table 2-3)。培養期間中に筋管形成を示すクローンはみられなかった。以上の結果から、CSPG4 陽性細胞には一部分化した線維芽細胞が含まれているものの、大部分の細胞は線維芽細胞と脂肪細胞への分化能を有する MPC であることが明らかになった。

### DMD ラットと正常ラットにおける CSPG4 陽性細胞の分布と数の比較

MPC は筋基底膜の外側の間質に存在する (Uezumi et al., 2010)。CSPG4 陽性細胞を構成する細胞の多くが MPC であるならば、CSPG4 陽性細胞は間質に存在すると考えられる。そこで、5C12 抗体を用いて骨格筋組織内の CSPG4 陽性細胞の局在を調べた。

まず、正常骨格筋組織における CSPG4 陽性細胞の局在について 5C12 抗体を用いた免疫染色によって調べた。5C12 抗体のシグナルは、間質に存在する血管、神経周膜で



みられるとともに (Fig. 2-9A)、laminin 陽性の筋基底膜で囲まれた筋線維の外側、すなわち間質の単核の細胞でみられた (Fig. 2-9B)。

当研究室で作出された *Dmd* 遺伝子変異ラット (DMD ラット) は骨格筋の壊死・再生像および骨格筋の線維化・脂肪化がみられ、ヒト DMD の有用なモデル動物である (Nakamura et al., 2014)。このラットの骨格筋における CSPG4 陽性細胞の局在を調べるため、5C12 抗体による免疫染色を行い、野生型ラットと比較した (Fig. 2-10A、B)。その結果、DMD ラットでは一視野あたりの CSPG4 陽性細胞数の有意な増加が見られた (Fig. 2-10C)。DMD ラットの骨格筋組織では、正常部位、中心核を有する筋線維がみられる再生部位、炎症細胞が集積した炎症部位が同時に観察される。それぞれの部位について CSPG4 陽性細胞の局在を調べると、正常部位と再生部位では筋基底膜の外側のみに CSPG4 陽性細胞が存在したが、炎症部位では筋基底膜内側にも CSPG4 陽性細胞がみられた (Fig. 2-10B)。筋基底膜内側と外側それぞれの CSPG4 陽性細胞数について野生型ラットと比較すると、ともに有意に増加していた (Fig. 2-10C)。CSPG4 を発現する細胞の種類を調べるために脂肪細胞マーカーである *perilipin* と二重染色を行ったところ、CSPG4 のシグナルが *perilipin* のシグナルと重なったことから、CSPG4 陽性細胞の一部は脂肪細胞であることが明らかになった (Fig. 2-11A、B)。さらに、DMD ラットでは CSPG4 のシグナルが単核の細胞だけでなく、再生筋線維周囲にも観察された (Fig. 2-12A、B)。再生筋線維周囲の CSPG4 は筋線維周囲の 1 型コラーゲンの局在と一致していた。また、CSPG4 陽性細胞は 1 型コラーゲンを発現していた (Fig. 2-13A、B)。

骨格筋の種類によって CSPG4 陽性細胞数や CSPG4 が集積した再生筋線維数に違いがあるかどうかを調べるため、速筋線維で構成される前脛骨筋と遅筋線維で構成されるヒラメ筋で CSPG4 陽性細胞数や CSPG4 集積筋線維数を調べた (Fig. 2-14A)。その結果、前脛骨筋とヒラメ筋のどちらでも CSPG4 陽性細胞、CSPG4 陽性筋線維は観察され、その数に差はみられなかった (Fig. 2-14B、C)。

以上の結果から、正常骨格筋では CSPG4 陽性細胞は間質に局在すること、また、DMD の病態下では、正常部位と再生部位では間質に、炎症部位では間質に加えて筋基底膜内側に CSPG4 陽性細胞がみられることが判明した。さらに、DMD の病態下では CSPG4 陽性細胞が増加しており、その一部は脂肪細胞や 1 型コラーゲン陽性細胞であることがわかった。また、再生筋線維の周囲に CSPG4 が集積していることも判明した。さらに、CSPG4 陽性細胞数と再生筋線維周囲の CSPG4 の集積には筋線維タイプによる違いはみられないことも明らかになった。

## 正常ラット骨格筋損傷・再生誘導時の CSPG4 発現の変化

DMD ラットでみられた CSPG4 陽性細胞の増加や CSPG4 集積筋線維の出現が *Dmd* 遺伝子の欠損に伴うものか、または骨格筋の損傷・再生に伴うものかを明らかにするため、正常ラット骨格筋に塩酸ブピバカインを用いて実験的に筋損傷・再生を誘導し、継続的に CSPG4 陽性細胞数および CSPG4 集積筋線維数の変化を調べた。その結果、単核の CSPG4 陽性細胞数は損傷から 3 日目にピークを迎える、一過的な増加がみられた。筋基底膜内側の CSPG4 陽性細胞は損傷 2 日目から出現し、3 日目に最大となった後、損傷 5 日目にはほとんどみられなくなった。このような細胞動態と、Fig. 2-7B で示したように CSPG4 陽性細胞では血球系細胞マーカーの発現がみられること (Fig. 2-7B) を考え合わせると、筋基底膜内側の CSPG4 陽性細胞はマクロファージなどの炎症細胞であると考えられる。筋基底膜外側の CSPG4 陽性細胞は損傷 5 日目に最大となった後、再生の進行とともに減少した (Fig. 2-15A, B)。損傷 3 日目は筋芽細胞が融合して胎児型ミオシン重鎖 (eMHC) を発現する再生筋線維が形成される時期である。CSPG4 と eMHC の二重免疫染色を行ったところ、eMHC 陽性筋線維には CSPG4 のシグナルはみられなかった (Fig. 2-16)。CSPG4 集積筋線維については、損傷から 3 日目までは観察されなかったが、損傷 5 日目と 7 日目に観察され、その数は損傷 5 日目の方が多かった。筋再生がほとんど完了した損傷 14 日目には CSPG4 集積筋線維は観察されなかった (Fig. 2-17A, B)。これらのことから、骨格筋の損傷・再生の過程において、筋基底膜外側の CSPG4 陽性細胞の増加および筋線維周囲の CSPG4 の分布は一過的にみられることが明らかになった。

筋線維周囲の CSPG4 と筋線維細胞膜の直下に存在するジストロフィンの発現変化に関連がある可能性を考え、CSPG4 とジストロフィンの二重染色を行った。ジストロフィンの発現は、損傷から 2 日後、3 日後は消失していたが 5 日後には再生筋線維で発現がみられるようになった。これは、筋線維周囲に CSPG4 が分布し始める時期と重なっていた (Fig. 2-18)。

再生筋線維は再生の進行に応じて発現する MHC のタイプが変わる。再生初期の筋線維は eMHC を発現し、続いて遅筋型 MHC、最終的には速筋型 MHC を発現する。再生筋線維周囲の CSPG4 のシグナルには強弱がみられた (Fig. 2-19)。この CSPG4 の再生筋線維周囲のシグナル強度と発現する MHC タイプに関連がある可能性を考え、損傷 5 日目の骨格筋切片について CSPG4 と速筋型 MHC、遅筋型 MHC、eMHC の発現パターンを調べた。損傷 5 日目の再生筋線維は全て速筋型 MHC を発現していた。遅筋型 MHC を発現する筋線維はみられなかったが、一部の筋線維では eMHC の発現がみられた。したがって、再生筋線維周囲に CSPG4 の集積が起こるのは線維型タイプが切

り替わる時期であることがわかった。また、再生筋線維周囲の CSPG4 のシグナル強度と発現している MHC のタイプに関連はみられなかった。このことから、CSPG4 の再生筋線維周囲への分布が筋線維型の決定に関与している可能性は低いと考えられた。

## 2G11 細胞の増殖における CSPG4 の作用

骨格筋の損傷・再生の過程において、CSPG4 陽性細胞は一過的な増加を示す。ここまで MPC の細胞マーカーとして用いてきた CSPG4 はそれ自身、細胞増殖を促進する機能を持つ (Grako and Stallcup, 1995; Nishiyama et al., 1996; Ozerdem and Stallcup, 2004; Cattaruzza et al., 2013; You et al., 2014)。2G11 細胞の増殖能は bFGF によって亢進するが (村上、未発表)、CSPG4 は bFGF と結合能があり (Goretzki et al., 1999; Cattaruzza et al., 2013)、細胞膜上に bFGF を捕捉し、FGFR に提示することで bFGF の増殖促進作用を仲介することが報告されている (Cattaruzza et al., 2013)。そこで、2G11 細胞の増殖に CSPG4 が関わるかどうかを調べた。bFGF を添加して培養した 2G11 細胞における CSPG4 の発現を siRNA によって抑制し、細胞数の変化を継時的に観察した (Fig. 2-20A)。CSPG4 の免疫染色によって、siRNA による CSPG4 の発現抑制が siRNA の導入から 3 日後でも持続していることが確認された (Fig. 2-20B)。細胞数は、発現抑制の開始から 2 日後までは siControl 群と差がなかったが、3 日目には有意な低下が見られた (Fig. 2-20B, C)。同様のタイムコースに基づいて、bFGF 無添加状態で 2G11 細胞を培養し、細胞数の変化を継時的に調べたところ、CSPG4 の発現が siRNA の導入から 3 日後まで抑制されていたが、細胞数には siControl 群との差はみられなかった (Fig. 2-21A, B, C)。以上の結果から、2G11 細胞において、CSPG4 は bFGF の細胞増殖促進作用を亢進させることが明らかになった。

## 2G11 細胞の脂肪分化における CSPG4 の機能

bFGF 依存性の細胞増殖を CSPG4 が亢進していたことから、CSPG4 が FGF シグナルを仲介もしくは修飾することで FGF シグナルのプライミング効果を制御する可能性が考えられる。CSPG4 発現抑制時の FGF シグナルのプライミング効果を検証するのに先立ち、リアルタイム PCR によって脂肪分化誘導に伴う CSPG4 の発現変化を継時的に調べたところ、CSPG4 の発現は脂肪分化の進行に伴って徐々に低下していくことが明らかになった (Fig. 2-22A)。このことは、CSPG4 の発現量が増殖期の bFGF に反応して増加すること (Fig. 2-6) と合わせて、CSPG4 が脂肪分化誘導期ではなく、増殖期に機能する可能性が高いことを示すものである。そこで、Fig. 2-22B に示したタイムコースに基づいて、増殖期の CSPG4 の発現抑制が 2G11 細胞における FGF のプライ

ミング効果に与える影響を検討した (Fig. 2-22B)。siControl 群では bFGF 処理により、Oil Red O 陽性面積および PPAR $\gamma$ 陽性細胞数の割合が増加していたことから、FGF のプライミング効果が確認された。CSPG4 の発現を抑制した siCSPG4 群では、bFGF 反応性の Oil Red O 陽性面積と PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合の増加がみられなかった (Fig. 2-22C、E、F)。細胞数は bFGF 反応性に増加するものの、CSPG4 の発現抑制に伴う変化はみられなかった (Fig. 2-22D)。以上の結果から、CSPG4 が FGF のプライミング効果に関わることがわかった。前述したように siRNA による発現抑制は導入から 3 日後でも継続している。そこで、脂肪分化誘導期に CSPG4 の発現が低下していることによって脂肪分化が抑制された可能性を考え、Fig. 2-23A のタイムコースに基づいて、脂肪分化誘導開始と同時に CSPG4 の発現抑制を行い、脂肪分化への影響を調べた (Fig. 2-23A)。その結果、細胞数の減少はみられたものの (Fig. 2-23B、C)、Oil Red O 陽性面積や PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合に差はみられなかった (Fig. 2-23B、D、E)。これらのことから、CSPG4 は FGF のプライミング効果に必要な因子であると考えられた。

## 2G11 細胞の線維芽細胞分化における CSPG4 の機能

続いて、線維芽細胞分化における CSPG4 の機能を検討するため、CSPG4 の発現を抑制した 2G11 細胞に TGF $\beta$ の添加を行った。TGF $\beta$ 添加によって発現が誘導される線維芽細胞マーカーのうち、*Colla1*、*Ctgf* の発現量は CSPG4 発現抑制の影響を受けなかった。*Acta2* の発現量も TGF $\beta$ 添加によって増加していたが、CSPG4 抑制によって siControl 群と比較すると発現量が低下していた (Fig. 2-24A)。ウェスタンブロッティングを用いた $\alpha$ -SMA の発現解析の結果でも、CSPG4 を抑制することで TGF $\beta$ 添加による $\alpha$ -SMA の発現上昇が抑制されていた (Fig. 2-24B、C)。細胞形態を調べると、線維芽細胞で形成されるストレスファイバーが CSPG4 発現抑制によってみられなくなっていた (Fig. 2-24D、E)。以上の結果から、CSPG4 の発現抑制は MPC から線維芽細胞への分化には影響しないものの、筋線維芽細胞の特徴である $\alpha$ -SMA の発現やストレスファイバー形成が低下したことから、CSPG4 は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に関わる因子であると考えられた。

## CSPG4 を欠損した 2G11 細胞の作製

ここまでの siRNA による CSPG4 の発現抑制実験により、CSPG4 が FGF のプライミング効果と線維芽細胞から筋線維芽細胞への活性化を促進する機能を持つ可能性が示された。しかしながら、siRNA による発現抑制では CSPG4 の発現が一部残り、結果に影響を与えている可能性が否定できない。そこで、CRISPR/Cas 法を用いて CSPG4

欠損 2G11 細胞を作製し、改めて MPC の分化における CSPG4 の機能を検討することとした。CSPG4 に対する免疫染色で陰性を示すクローンを選別し、B2G9、C1B3、C1G9 の 3 クローンを得た (Fig. 2-25)。これらの 3 クローンの CSPG4 ゲノムのターゲット配列をシーケンスしたところ、B2G9 と C1B3 は変異パターンが一つだったのに対し、C1G9 は二つの変異パターンが検出された (Fig. 2-26A)。C1G9 には異なる変異を持つ 2 種類の細胞が混在している可能性が考えられるため、これ以降、一種類の変異パターンがみられた B2G9 と C1B3 の 2 クローンをを用いることにした。B2G9 と C1B3 のゲノム配列から変異 CSPG4 タンパク質のアミノ酸配列を予測したところ、B2G9 は 14 アミノ酸、C1B3 は 92 アミノ酸まで翻訳されたところで終始コドンが生じることがわかった (Fig. 2-26B)。5C12 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、各クローンの CSPG4 の発現を調べたところ、B2G9、C1B3 の両クローンにおいて 2G11 細胞で検出される CSPG4 のバンドが消失していた (Fig. 2-27)。この時、5C12 抗体で認識される新たなバンドはみられなかった。

以上の結果から、5C12 抗体で検出される CSPG4 の発現を欠損した 2G11 細胞クローン B2G9、C1B3 が樹立できたと判断した。

### CSPG4 欠損が脂肪分化能に与える影響

作製した CSPG4 欠損 2G11 細胞クローン B2G9、C1B3 において FGF のプライミング効果が減弱しているかどうかを調べた。bFGF を添加して維持した 2G11 細胞および CSPG4 欠損細胞クローンを播種し、Fig. 2-28A に示したタイムコースに基づいて脂肪分化誘導を行った (Fig. 2-28A)。脂肪分化誘導期に bFGF を添加し、bFGF のプライミング効果を誘導した細胞では 2G11 細胞と比べて、クローン B2G9 では Oil Red O 陽性面積の減少がみられた。クローン C1B3 では 2G11 細胞との間に有意な差はみられなかった (Fig. 2-28B、D)。細胞数と PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合に細胞間の差はみられなかった (Fig. 2-28B、C、E)。FGF のプライミング効果を誘導しなかった細胞では 2G11 細胞と比較して、クローン B2G9 において PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合の増加がみられたが、C1B3 では 2G11 細胞との間に差はみられなかった (Fig. 2-28B、E)。細胞数はクローン B2G9、C1B3 とともに 2G11 細胞より増加していた (Fig. 2-28B、C)。Oil Red O 陽性面積については細胞間に差はみられなかった (Fig. 2-28B、D)。細胞数、Oil Red O 陽性面積、PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合について、bFGF を添加した細胞の bFGF 未添加の細胞に対する比を取ると、どのクローンでも 1 より大きい数値を示したことから、bFGF の増殖促進作用や bFGF のプライミング効果は CSPG4 欠損に関係なくみられることがわかった。しかし、いずれの指標も 2G11 細胞より CSPG4 欠損細胞クローンで小さ

い値を示した (Fig. 2-29)。以上の結果から、CSPG4 欠損によって FGF のプライミング効果が減弱することが明らかになった。

#### **CSPG4 欠損が線維芽細胞分化に与える影響**

線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が CSPG4 を欠損したクローン B2G9 および C1B3 において抑制されるかどうかを調べるため、TGF $\beta$ 処理を行い、2G11 細胞から誘導した筋線維芽細胞と $\alpha$ -SMA 発現量を比較した。その結果、発現抑制した場合は反対に、CSPG4 を欠損した 2 つの細胞クローンの両方で $\alpha$ -SMA の発現量が増加していた (Fig. 2-30A、B)。このことから、CSPG4 を欠損した 2G11 細胞クローンは、TGF $\beta$  によって筋線維芽細胞へ分化し、さらにその活性状態が高くなっていると考えられた。

## 考察

第二章の結果から、5C12 抗体が認識する抗原分子が CSPG4 であること、また、CSPG4 の発現は bFGF によって増加することが明らかになった。また、骨格筋由来 CSPG4 陽性細胞の大部分が、脂肪分化能と線維芽細胞分化能を併せ持つ MPC であり、筋損傷・再生の過程において一過的に増加することが判明した。さらに、CSPG4 は FGF のプライミング効果を仲介もしくは修飾することで脂肪分化能を制御する可能性が示されるとともに、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違いがみられた。第二章で明らかになった MPC の分化機構における CSPG4 の機能については Fig. 2-31 に示した (Fig. 2-31)。

本研究によって 2G11 細胞の細胞膜表面に発現していることが明らかになった CSPG4 は、マウス骨格筋においては周皮細胞に発現している。周皮細胞には脂肪細胞および線維芽細胞に分化する 1 型周皮細胞と筋分化する 2 型周皮細胞の 2 種類が含まれる (Birbrair et al., 2013 a, b)。骨格筋初代培養細胞から単離した CSPG4 陽性細胞では、間葉系細胞マーカー、筋系譜細胞マーカーの発現がみられたことから、マウスと同様にラット骨格筋由来の CSPG4 陽性細胞にも間葉系細胞と筋系譜細胞の両方が含まれていると考えられる。CSPG4 陽性細胞に占める細胞の種類は、ラット骨格筋初代培養細胞から樹立した CSPG4 陽性細胞クローンでは MPC が 68% と大部分を占め、また筋管を形成する細胞がみられなかったのに対し、マウス骨格筋由来の CSPG4 陽性細胞では MPC 様細胞と筋系譜細胞の割合はほとんど同じである (Birbrair et al., 2013 a, b)。この違いが生じた理由として、ラット骨格筋初代培養細胞から細胞クローンを樹立する過程での筋系譜細胞の脱落や培養条件、培養期間の影響が考えられる。骨格筋 MPC の特徴として、損傷に反応して間質内で増殖することが挙げられる (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010)。ラット骨格筋間質内の CSPG4 陽性細胞も骨格筋損傷後 3-5 日目をピークに一過的に増加していた。したがって、ラット骨格筋間質内 CSPG4 陽性細胞に一部筋系譜細胞が含まれる可能性は残るものの、その大部分は MPC であると考えられ、筋再生時の CSPG4 陽性細胞の動態は MPC の動態を反映したものであると考えられる。

線維芽細胞の分化や機能の多様性については、皮膚の線維芽細胞を用いた研究で多くのことが明らかになっている。皮膚の線維芽細胞は生後 2 日目までに、共通の前駆細胞から真皮乳頭層、真皮網状層および皮下組織に存在するそれぞれ機能や分化能、発現す

る細胞マーカーの異なる 3 系統の線維芽細胞に分化する (Lynch and Watt, 2018)。本研究では、正常骨格筋から樹立した CSPG4 陽性の線維芽細胞クローンには脂肪分化能を示すものと示さないものの両方が含まれることが明らかになった。このことは皮膚と同様に、正常骨格筋内の線維芽細胞も様々な性質を持つ細胞が含まれていることを示すものである。皮膚の線維芽細胞がその存在する場所によって性質が異なるように、正常骨格筋内の線維芽細胞も存在部位によって異なる性質を示すことが考えられる。

CSPG4 の再生筋線維周囲への集積は、DMD、ベッカー型筋ジストロフィー、 $\gamma$ サルコグリカノパチー、カルパキノパチーといった様々な筋ジストロフィー患者の再生筋線維で観察されている。(Petrini et al., 2003)。今回行った実験的筋損傷・再生を誘導した骨格筋において、再生筋線維周囲への CSPG4 の集積が損傷 5-7 日でみられたため、再生筋線維周囲に集積した CSPG4 は筋ジストロフィーの原因遺伝子に関係なく、筋再生時になんらかの機能を担うと考えられる。CSPG4 が再生筋線維周囲に出現する時期には筋線維細胞膜の直下にジストロフィンが発現していることから、筋線維細胞膜の構造は再生が完了しているものと考えられる。しかしながら、この時期の筋線維の内部構造については、正常な骨格筋では揃った配置をとる筋原線維が乱れており、横紋構造は乱れている。この乱れは損傷から 10-15 日経過した頃に正常な構造に戻る (Jirmanová and Thesleff., 1972)。以上の筋損傷後の筋線維の成熟過程から、本研究で観察された再生筋線維周囲に CSPG4 の集積がみられる時期は、筋原線維の配置が整列し、横紋構造が形成される時期であると考えられる。CSPG4 と筋原線維形成に関しては、ショウジョウバエにおける CSPG4 の相同分子である *Perdido/Kontiki* が筋原線維の Z 線に沿って筋線維細胞膜上に発現し、筋原線維形成とサルコメア構造に必要であるという報告がある (Perez-Moreno et al., 2014)。この報告と CSPG4 の発現時期を合わせて考えると、哺乳類の再生筋線維周囲の CSPG4 が筋原線維のサルコメア構造形成に関わる可能性が考えられる。

CSPG4 と 1 型コラーゲンの関係については、株化メラノーマ細胞において、CSPG4 が membrane type 3 (MT3) -MMP および pro-MMP2 と複合体を形成し、pro-MMP2 を活性型 MMP2 にすることで 1 型コラーゲンの分解を促進し、細胞浸潤していくことが示されている (Iida et al., 2001 ; Iida et al., 2007)。MMP2 は筋ジストロフィーの病態で発現や活性の増加が認められている (Kherif et al., 1999 ; Fukushima et al., 2007)。DMD ラットにおいて、再生筋線維周囲の CSPG4 が 1 型コラーゲンの局在と一致していたことから、再生筋線維周囲の CSPG4 が MMP2 を活性化することで 1 型コラーゲンの分解を促進し、過剰な線維化を抑制している可能性が考えられる。



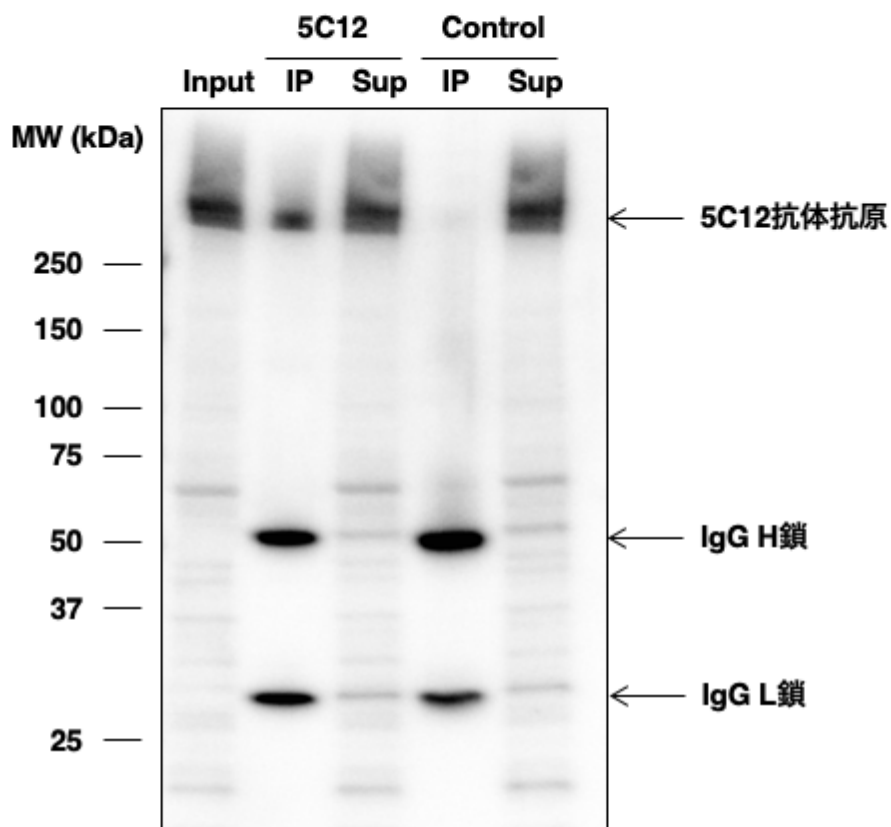
本研究で用いた 5C12 抗体は 2G11 細胞をマウスに投与することで作製されたことから、CSPG4 の細胞外ドメインを認識する抗体であることは明らかである。CSPG4 は細胞膜表面に発現する分子であるが、MMP による切断を受けて細胞膜表面から遊離することも報告されている (Nishiyama et al., 1995 ; Muir et al., 2002 ; Larsen et al., 2003 ; Morgenstern et al., 2003 ; Joo et al., 2014 ; Nishihara et al., 2014 ; Sakry et al., 2014)。bFGF を添加して培養した 2G11 細胞において、約 310 kDa の全長の CSPG4 分子だけでなく、約 120 kDa の分子が 5C12 抗体によって検出されたことは、bFGF 反応性に活性化する MMP によって CSPG4 分子が切断され、遊離型 CSPG4 が産生されている可能性を示すものである。CSPG4 の切断に関わる MMP として MMP-9 や MMP-13 (Larsen et al., 2003 ; Joo et al., 2014) が報告されているが、bFGF はこれらの発現量を増加させる (Taraboletti et al., 2002 ; Nummenmaa et al., 2015)。また、筋損傷・再生時には骨格筋間質内の bFGF が増加すること (Dimario et al., 1989 ; Anderson et al., 1991 ; Do et al., 2012)、MMP-9 および MMP-13 は筋損傷・再生時に活性化すること (Lei et al., 2013) が報告されている。これらのことから、再生筋線維周囲の CSPG4 は、筋損傷・再生時に活性化する FGF シグナル依存性に活性化した MMP によって切断され、MPC 細胞膜表面から遊離した CSPG4 が集積したものである可能性が考えられる。また、前述した CSPG4 の相同分子 Perdido/Kontiki と同様、筋線維自身が全長の CSPG4 を発現している可能性も考えられる (Perez-Moreno et al., 2014)。このように、再生筋線維周囲に集積した CSPG4 の由来によって CSPG4 の構造が異なると考えられるため、再生筋線維周囲の CSPG4 の機能を調べていく上では、その由来および構造についても考慮する必要がある。

CSPG4 が bFGF の作用を仲介もしくは修飾し、細胞増殖や遊走を調節することは以前から知られている (Makagiansar et al., 2007 ; Cattaruzza et al., 2013)。CSPG4 は細胞膜上に bFGF を捕捉し、FGFR への bFGF のシグナル入力を仲介する (Cattaruzza et al., 2013)。また、細胞内 FGF シグナルと CSPG4 の関係については、CSPG4 の細胞内ドメインに位置する 2314 番目のスレオニン残基は FGF シグナルの下流にある ERK 経路によってリン酸化されることがわかっている (Makagiansar et al., 2007)。2G11 細胞には FGFR1、FGFR1c、FGFR2b、FGFR2c、FGFR3 の 5 種類が発現しており、このうち bFGF のプライミング効果を担うのは FGFR1 と 2c である (Nakano et al., 2016)。FGFR1 と FGFR2c の下流には少なくとも Erk1/2-MAPK 経路、Akt 経路、PLC $\gamma$ 1 経路が存在するが、いずれも bFGF のプライミング効果には関与しないことが示されている (中野、博士論文)。このことから、2G11 細胞における bFGF のプライミング効果における CSPG4 の機能として、細胞膜上に bFGF を捕捉し、FGFR へ

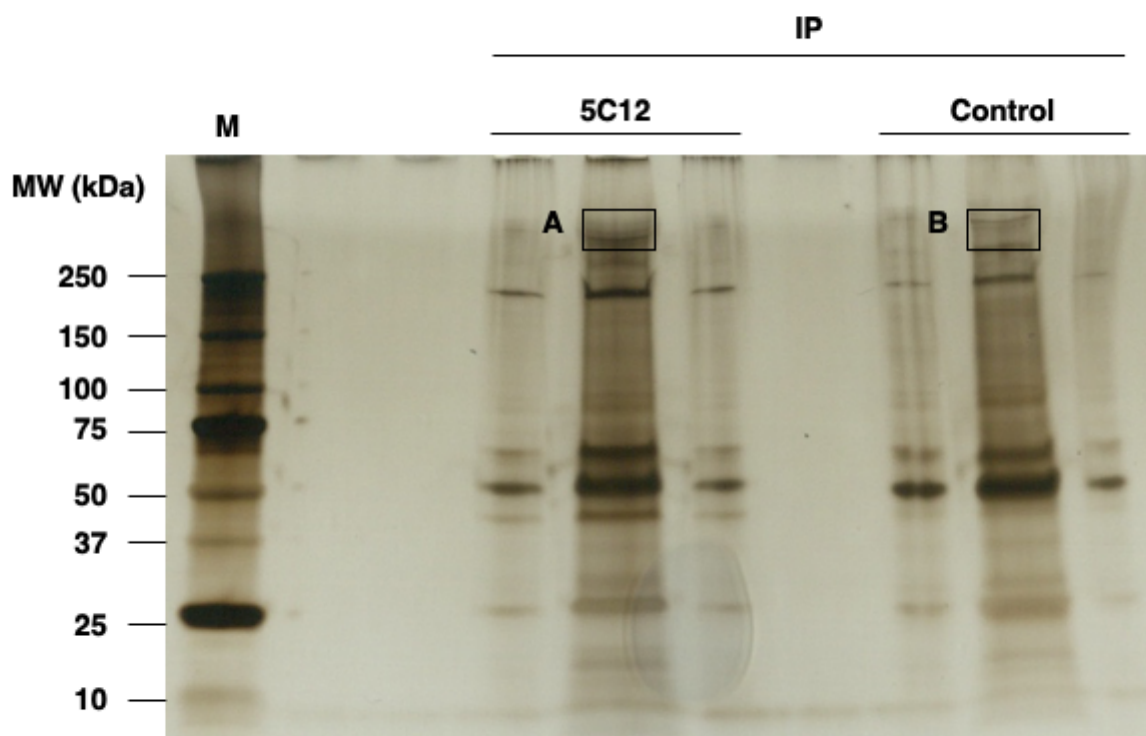
の提示を調節することが考えられる。bFGF の細胞増殖促進作用については、関わる FGF シグナル経路が不明であるが、CSPG4 の 2314 番目のスレオニン残基のリン酸化されることもその作用発現に関わる可能性もある。

TGF $\beta$ 誘導性の線維芽細胞分化における CSPG4 の役割について検討を行ったが、siRNA による CSPG4 の発現抑制実験の結果と、CRISPR/Cas 法によって作製した CSPG4 発現欠損実験の結果に相違がみられた。CSPG4 の発現が完全に欠損したクローンでは $\alpha$ -SMA 発現が増加していたことから、CSPG4 分子そのものは TGF $\beta$ シグナルに対して抑制的に働くことで筋線維芽細胞の活性状態を抑制すると考えられる。CSPG4 と TGF $\beta$ には親和性がないが (Goretzki et al., 1999)、CSPG4 の細胞内ドメインに存在する PDZ 結合領域に結合するタンパク質の一つであるシンテニン (Chatterjee et al., 2008) は 1 型 TGF $\beta$ 受容体 (T $\beta$ R1) と結合し、TGF $\beta$ シグナルに対し促進的に働くことが報告されている (Hwangbo et al., 2015)。したがって、CSPG4 とシンテニンの結合によってシンテニンと T $\beta$ R1 の結合が阻害され細胞内 TGF $\beta$ シグナルを抑制する可能性が考えられるが、CSPG4 がシンテニン以外の結合タンパク質を介して TGF $\beta$ シグナルを制御する可能性も考えられる。CSPG4 の発現抑制実験では欠損実験とは反対に $\alpha$ -SMA の発現低下やストレスファイバー形成の低下がみられたことも含めて、CSPG4 による TGF $\beta$ シグナルの制御および筋線維芽細胞の活性状態の制御機構の解明は今後の課題である。

以上、第二章では MPC の細胞膜表面に発現する分子として CSPG4 を見出した。CSPG4 陽性細胞の動態は MPC の動態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ことで脂肪分化を制御するだけでなく、筋再生にも関与する可能性が示された。さらに、CSPG4 は筋線維芽細胞の活性状態を抑制的に制御する可能性が考えられた。CSPG4 による FGF シグナルの仲介もしくは修飾による MPC の脂肪分化制御の可能性と筋線維芽細胞の活性状態制御の可能性については第三章でさらに検討することとした。

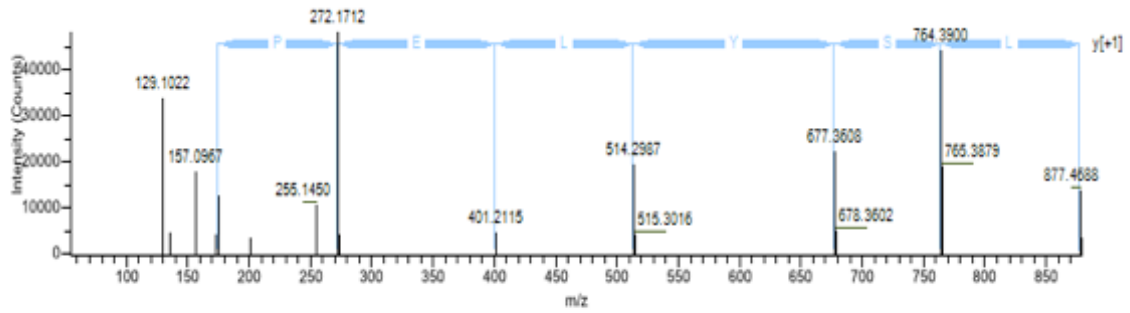


**Fig. 2-1 2G11 細胞タンパク質抽出液を用いた 5C12 抗体抗原の免疫沈降**  
 2G11 細胞からタンパク質を抽出し、5C12 抗体およびマウス IgG<sub>1</sub> アイソタイプコントロール (Control) により免疫沈降した後、5C12 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。Input : 2G11 細胞タンパク質抽出液、IP : 免疫沈降物、Sup : 免疫沈降後の上清

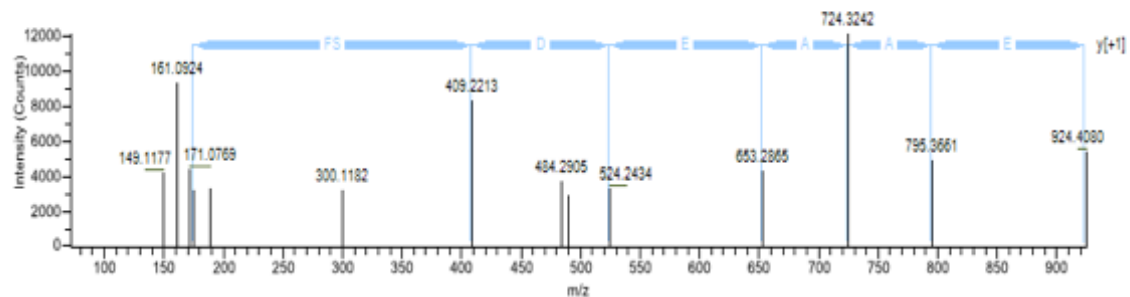


**Fig. 2-2 2G11細胞タンパク質抽出液を用いた5C12抗体の抗原同定**

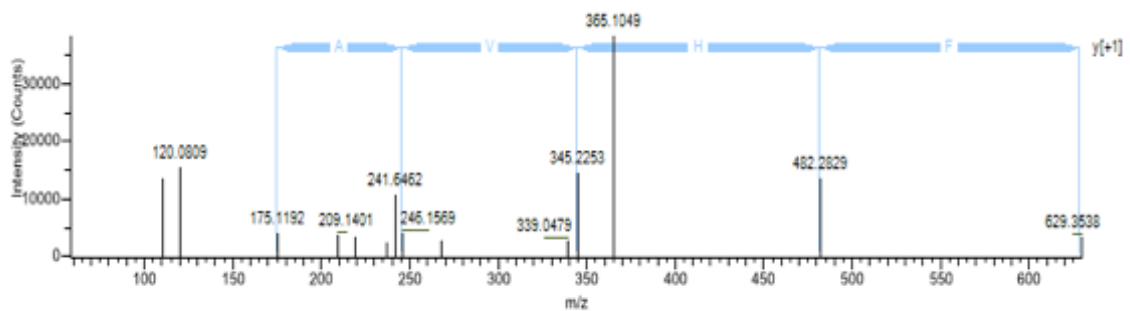
2G11細胞のタンパク質抽出液を5C12抗体およびマウスIgG<sub>1</sub>アイソタイプコントロール (Control) により免疫沈降 (IP) した後、電気泳動および銀染色を行った。MS解析に用いた領域をA、Bで示した。M：分子量マーカー

**A**

該当するアミノ酸配列: G V L R S Y L R E P R

**B**

該当するアミノ酸配列: T S E R A R E D S F R

**C**

該当するアミノ酸配列: V F H V A R

**Fig. 2-3** 5C12 抗体免疫沈降物で検出されたペプチド断片のイオンスペクトルの例  
 検出されたイオンスペクトルと該当するラット Chondroitin sulfate proteoglycan 4  
 (CSPG4) のアミノ酸配列を示した。

**A** : 312-320 番に相当する配列を示した。

**B** : 869-878 番に相当する配列を示した。

**C** : 1,030-1,035 番に相当する配列を示した。

Table 2-1 2G11細胞タンパク質抽出液のMS解析結果 (A)

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q6P6Q2	[K2C5_RAT]	1503.43	30.38	2	7	26	102	576	61.8	7.80
Q4FZU2	[K2C6A_RAT]	1337.31	20.65	2	2	16	83	552	59.2	7.94
Q10758	[K2C8_RAT]	1260.18	14.29	3	2	11	55	483	54.0	6.00
Q6IFW6	[K1C10_RAT]	1216.53	22.81	5	9	16	65	526	56.5	5.15
Q6IG02	[K22E_RAT]	1109.72	7.15	1	3	8	53	685	69.1	7.69
Q6IG05	[K2C75_RAT]	1038.79	15.13	1	1	11	58	542	59.0	8.07
P00762	[TRY1_RAT]	674.79	8.13	1	1	1	26	246	25.9	4.89
Q6IMF3	[K2C1_RAT]	604.37	11.20	1	6	9	39	625	64.8	7.87
Q6IFV1	[K1C14_RAT]	517.30	37.53	7	2	18	40	485	52.7	5.16
Q00657	[CSPG4_RAT]	497.57	16.25	1	15	33	47	2326	251.8	5.48
Q6IFU7	[K1C42_RAT]	438.34	28.10	6	2	15	29	452	50.2	5.16
Q6IFU8	[K1C17_RAT]	426.80	27.94	5	2	17	30	433	48.1	5.02
Q00715	[H2B1_RAT]	106.79	45.60	2	3	6	8	125	14.0	10.36
P62804	[H4_RAT]	88.16	38.83	1	2	4	7	103	11.4	11.36
Q6P0K8	[PLAK_RAT]	76.34	12.62	1	2	8	8	745	81.7	6.14
P0C0S7	[H2AZ_RAT]	57.97	12.50	9	2	2	5	128	13.5	10.58
P22509	[FBRL_RAT]	48.06	2.45	1	1	1	2	327	34.2	10.24
D4A7T3	[BRDT_RAT]	47.79	0.63	1	1	1	2	952	106.7	9.10
Q64716	[INSRR_RAT]	43.04	0.62	1	1	2	3	1300	144.8	6.60
P84245	[H33_RAT]	38.64	21.32	2	1	4	5	136	15.3	11.27
P0CG51	[UBB_RAT]	37.21	43.28	4	1	3	3	305	34.3	7.53

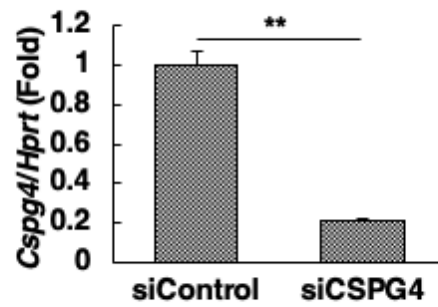
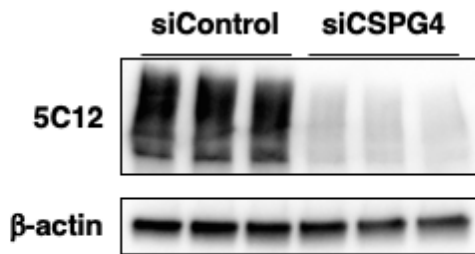
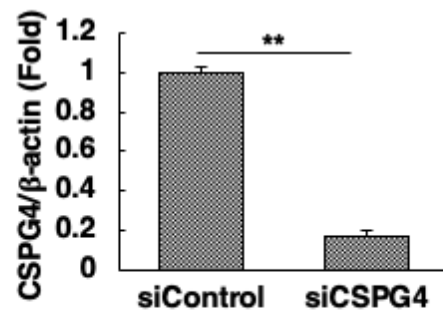
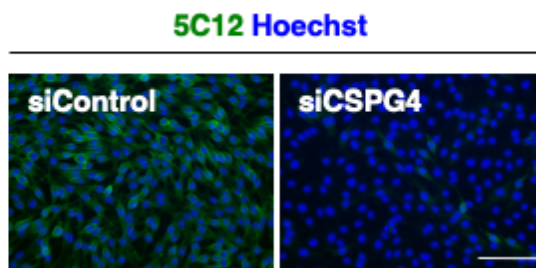
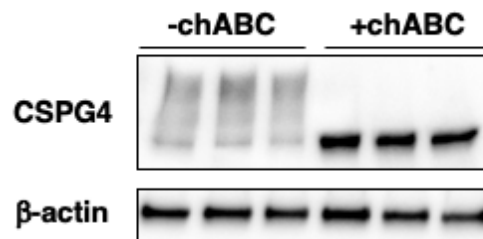
Table 2-2 2G11細胞タンパク質抽出液のMS解析結果 (B)

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
Q6P6Q2	[K2C5_RAT]	2185.61	38.19	3	10	32	122	576	61.8	7.80
Q4FZU2	[K2C6A_RAT]	1919.47	26.45	3	3	22	97	552	59.2	7.94
Q6IG05	[K2C75_RAT]	1808.43	19.74	3	1	14	75	542	59.0	8.07
Q10758	[K2C8_RAT]	1172.91	14.70	4	2	10	53	483	54.0	6.00
Q6IG02	[K22E_RAT]	1172.55	8.47	1	1	7	43	685	69.1	7.69
Q6IFV1	[K1C14_RAT]	1108.60	44.54	6	5	26	70	485	52.7	5.16
Q6IFW6	[K1C10_RAT]	1015.98	20.91	5	8	15	55	526	56.5	5.15
Q6IFU7	[K1C42_RAT]	947.74	31.19	4	3	19	52	452	50.2	5.16
Q6IFU8	[K1C17_RAT]	863.41	51.73	6	4	28	72	433	48.1	5.02
P00762	[TRY1_RAT]	561.71	8.13	1	1	1	24	246	25.9	4.89
Q6IFV3	[K1C15_RAT]	498.05	11.86	6	1	8	26	447	48.8	4.86
Q6IMF3	[K2C1_RAT]	447.94	11.52	1	7	10	24	625	64.8	7.87
P60711	[ACTB_RAT]	330.08	39.47	8	7	14	32	375	41.7	5.48
P02262	[H2A1_RAT]	125.64	20.00	9	2	3	8	130	14.1	10.90
Q6P0K8	[PLAK_RAT]	121.71	9.40	2	4	8	9	745	81.7	6.14
Q6IG04	[K2C72_RAT]	120.47	8.08	1	1	6	13	520	56.8	7.36
Q6IFW5	[K1C12_RAT]	116.86	6.36	1	1	3	7	456	48.8	4.77
Q6AYZ1	[TBA1C_RAT]	109.22	9.80	5	2	3	6	449	49.9	5.10
P62804	[H4_RAT]	100.33	38.83	1	2	4	5	103	11.4	11.36
P82995	[HS90A_RAT]	99.51	3.68	3	2	3	4	733	84.8	5.01

Table 2-2 2G11細胞タンパク質抽出液のMS解析結果 (B) (続き)

Accession	Description	Score	Coverage	# Proteins	# Unique Peptides	# Peptides	# PSMs	# AAs	MW [kDa]	calc. pI
P07150	[ANXA1_RAT]	98.76	17.05	1	2	6	7	346	38.8	7.34
P68255	[1433T_RAT]	73.87	17.96	6	2	6	10	245	27.8	4.78
P62630	[EF1A1_RAT]	67.37	8.44	2	1	4	9	462	50.1	9.01
P42930	[HSPB1_RAT]	62.53	8.74	1	1	3	5	206	22.9	6.55
Q00729	[H2B1A_RAT]	61.11	28.35	2	1	5	7	127	14.2	10.29
Q9QXQ0	[ACTN4_RAT]	44.52	3.51	2	1	3	3	911	104.8	5.44
Q6IMF1	[K2C80_RAT]	42.54	7.08	1	1	4	4	452	50.5	6.20
P21533	[RL6_RAT]	41.24	6.38	1	1	2	3	298	33.5	10.74
P11980	[KPYM_RAT]	38.93	11.30	1	1	5	5	531	57.8	7.06
P09495	[TPM4_RAT]	37.99	6.45	4	1	2	2	248	28.5	4.69
Q9QZR6	[SEPT9_RAT]	34.57	1.24	1	1	1	3	564	63.8	8.47
Q4KLN8	[RNF8_RAT]	34.44	3.08	1	1	2	5	487	55.6	8.07
P22509	[FBRL_RAT]	29.64	2.45	1	1	1	1	327	34.2	10.24
Q6P9T8	[TBB4B_RAT]	28.90	10.11	5	1	4	7	445	49.8	4.89
Q5GH61	[XK_RAT]	26.91	1.35	2	1	1	3	445	51.0	8.25



**A****B****C****D****E****Fig. 2-4 5C12 抗体が認識する抗原が CSPG4 であることの確認**

2G11 細胞における CSPG4 発現を siRNA によって抑制し、ウェスタンブロッティングと免疫染色において 5C12 抗体で検出されるシグナルの変化を調べた。

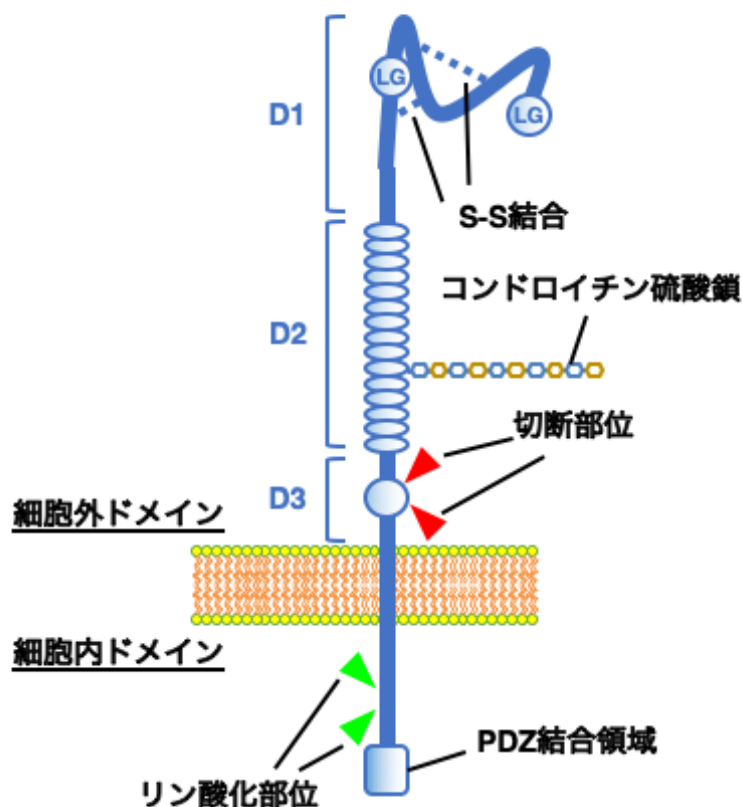
**A** : リアルタイム RT-PCR による siRNA 導入後の CSPG4 の発現解析結果を示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3) 。\*\* ;  $p < 0.01$  ( $t$ -test)

**B** : 5C12 抗体を用いたウェスタンブロッティング像を示した。ローディングコントロールとして $\beta$ -actin を用いた。

**C** : B をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3) 。\*\* ;  $p < 0.05$  ( $t$ -test)

**D** : siRNA 導入後の 2G11 細胞の 5C12 抗体免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

**E** : コンドロイチナーゼ ABC (chABC) 処理した細胞の CSPG4 のウェスタンブロッティング像を示した。ローディングコントロールとして $\beta$ -actin を用いた。



**Fig. 2-5 CSPG4 の構造**

CSPG4 は 2225 アミノ酸からなる細胞外ドメイン、25 アミノ酸からなる細胞膜通過ドメイン、76 アミノ酸からなる細胞内ドメインの 3 つのドメインに分けられる。細胞外ドメインはさらに 2 つの laminin-G ドメイン (LG) を持つ D1 ドメイン、15 個の CSPG リピートからなり、コンドロイチン硫酸鎖によって修飾される 999 番目のセリン残基が存在する D2 ドメイン、マトリックスメタロプロテアーゼによる切断を受ける箇所を 2 つ持つ D3 ドメインの 3 つに分けられる。細胞内ドメインには 2 箇所のリン酸化を受けるチロシン残基が存在し、C 末端には PDZ 結合タンパク質が結合するアミノ酸配列 (QYWV ; PDZ 結合領域) がある。

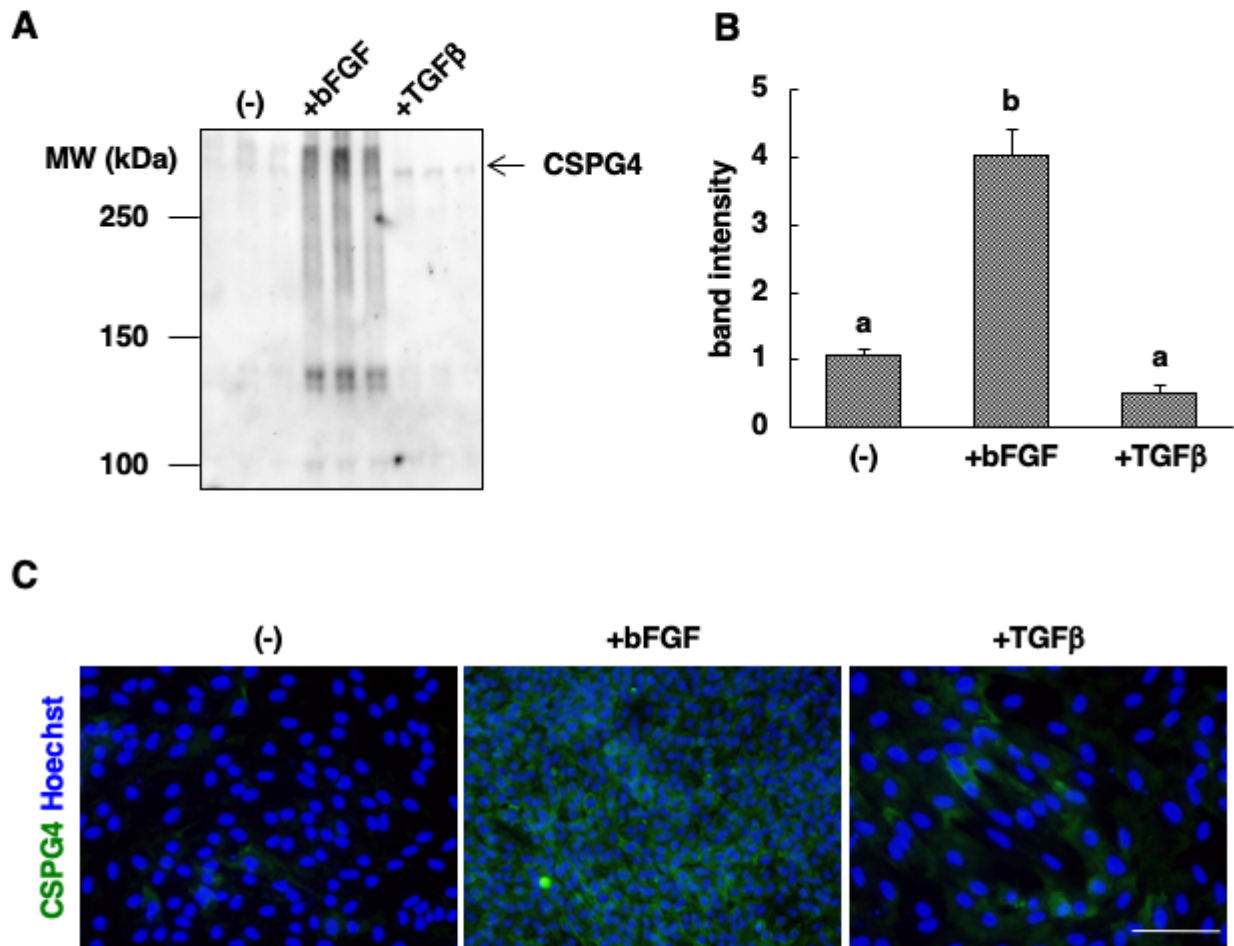
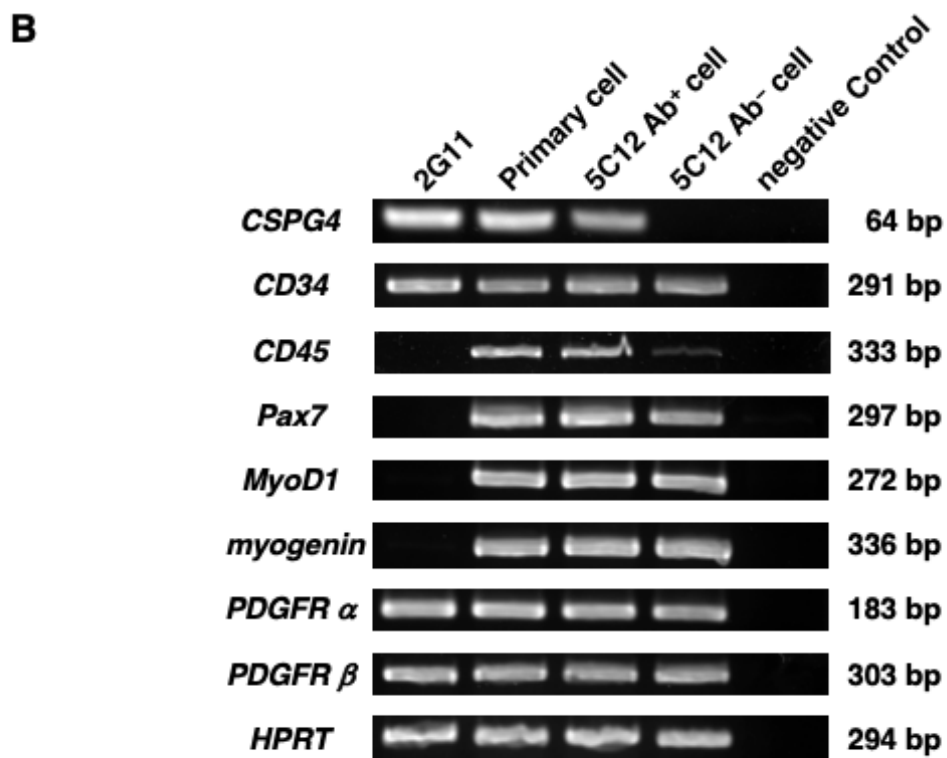
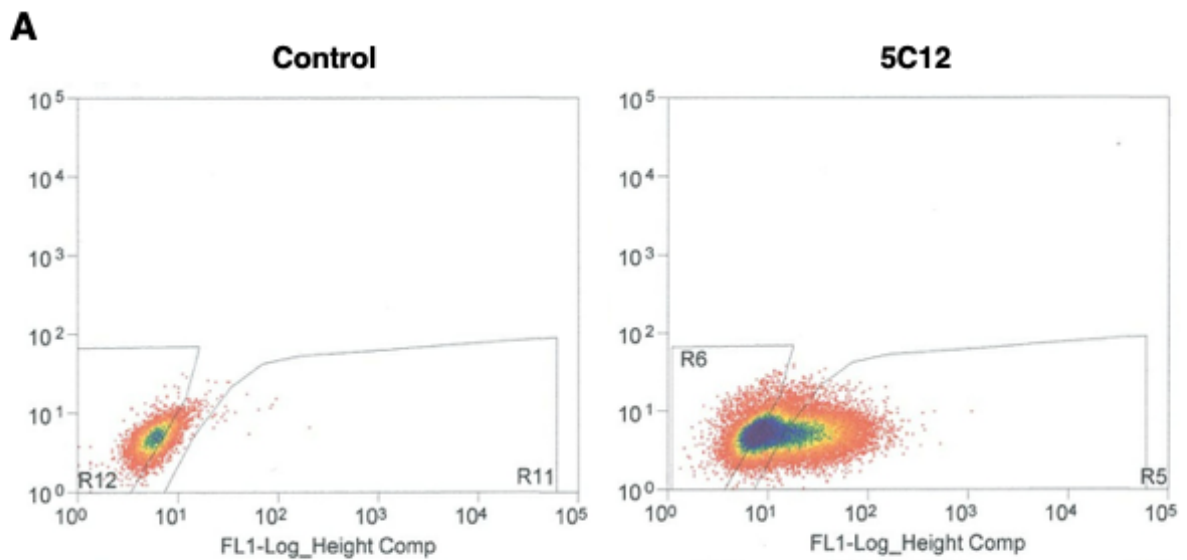


Fig. 2-6 bFGF 処理または線維芽細胞分化誘導後の CSPG4 の発現変化

A : CSPG4 のウェスタンブロッティング像を示した。

B : A をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。異なるアルファベット間には有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

C : CSPG4 の免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu\text{m}$



**Fig. 2-7** 5C12 抗体によりセルソーティングした骨格筋初代培養細胞の遺伝子発現解析

**A** : CSPG4 陰性および CSPG4 陽性の細胞集団をそれぞれ R6、R5 で示した。各分画に含まれる細胞を回収した。

**B** : 各細胞系譜マーカー遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR で調べた。

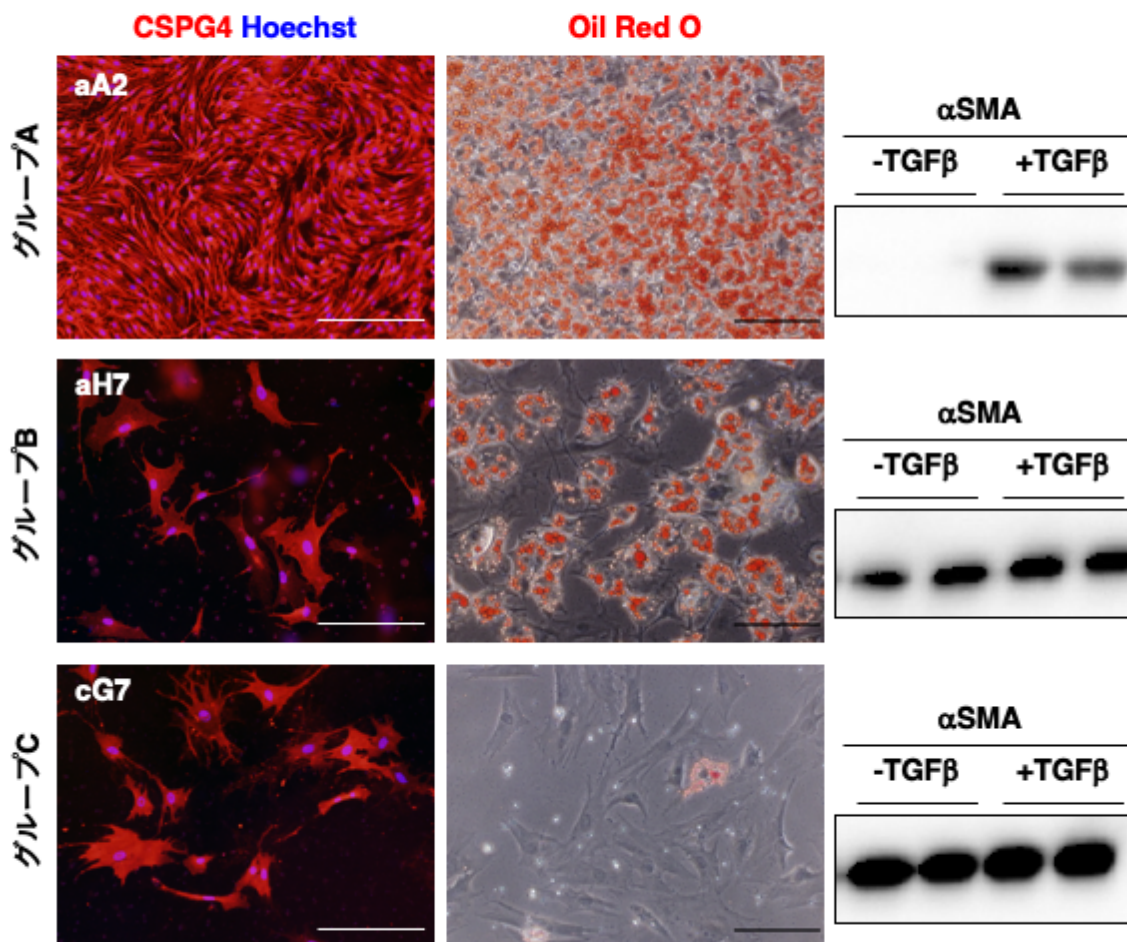
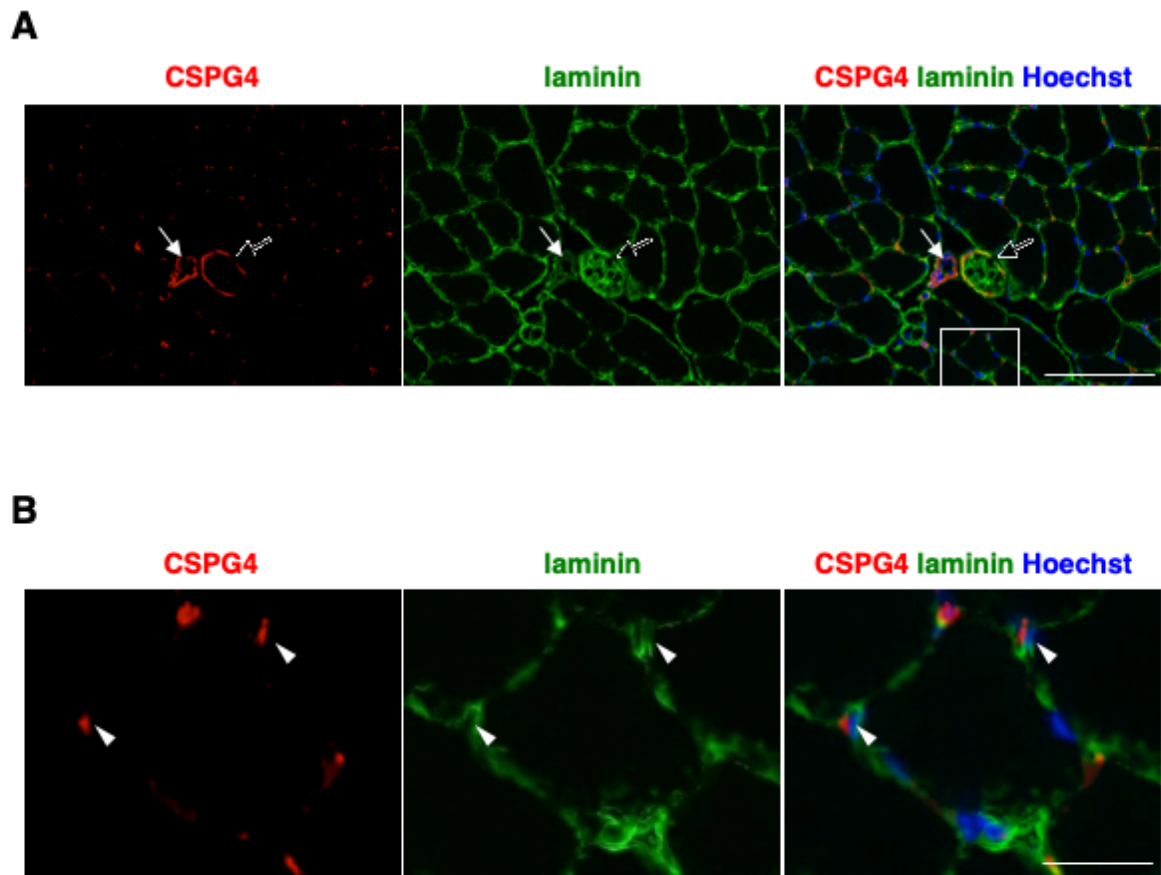


Fig. 2-8 骨格筋初代培養細胞から作製したクローン細胞における CSPG4 の発現、脂肪分化能、線維芽細胞分化能の解析  
 19 クローンのうち 3 クローンについて、CSPG4 免疫染色像 (左)、脂肪分化誘導後の Oil Red O 染色像 (中央)、 $\alpha$ -SMA ウェスタンブロッティング像 (右) を示した。  
 Scale bar = 200  $\mu$ m

Table 2-3 CSPG4陽性細胞クローン（全19クローン）の  
脂肪分化能および線維芽細胞分化能の解析結果

	脂肪分化能		合計
	+	-	
線維芽細胞の前駆細胞	13 <sup>A</sup> (68.4)	1 (5.3)	14 (73.7)
線維芽細胞	2 <sup>B</sup> (10.5)	3 <sup>C</sup> (15.8)	5 (26.3)
合計	15 (78.9)	4 (21.1)	19 (100)

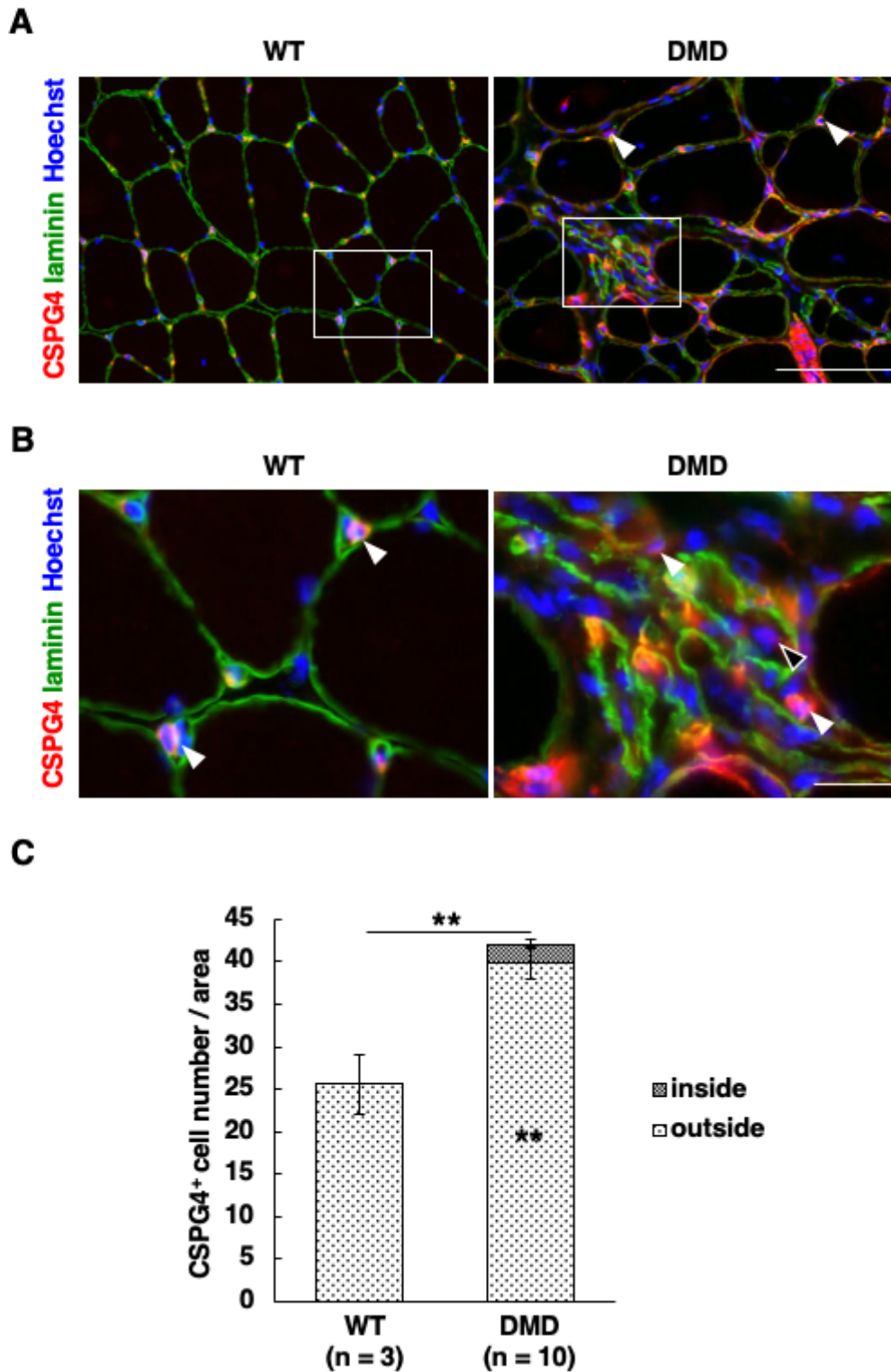
\*アルファベットはFig. 2-8に示したグループを示す  
上段：クローン数、下段：全体に占める割合（%）



**Fig. 2-9** 正常ラット骨格筋組織における CSPG4 免疫染色像

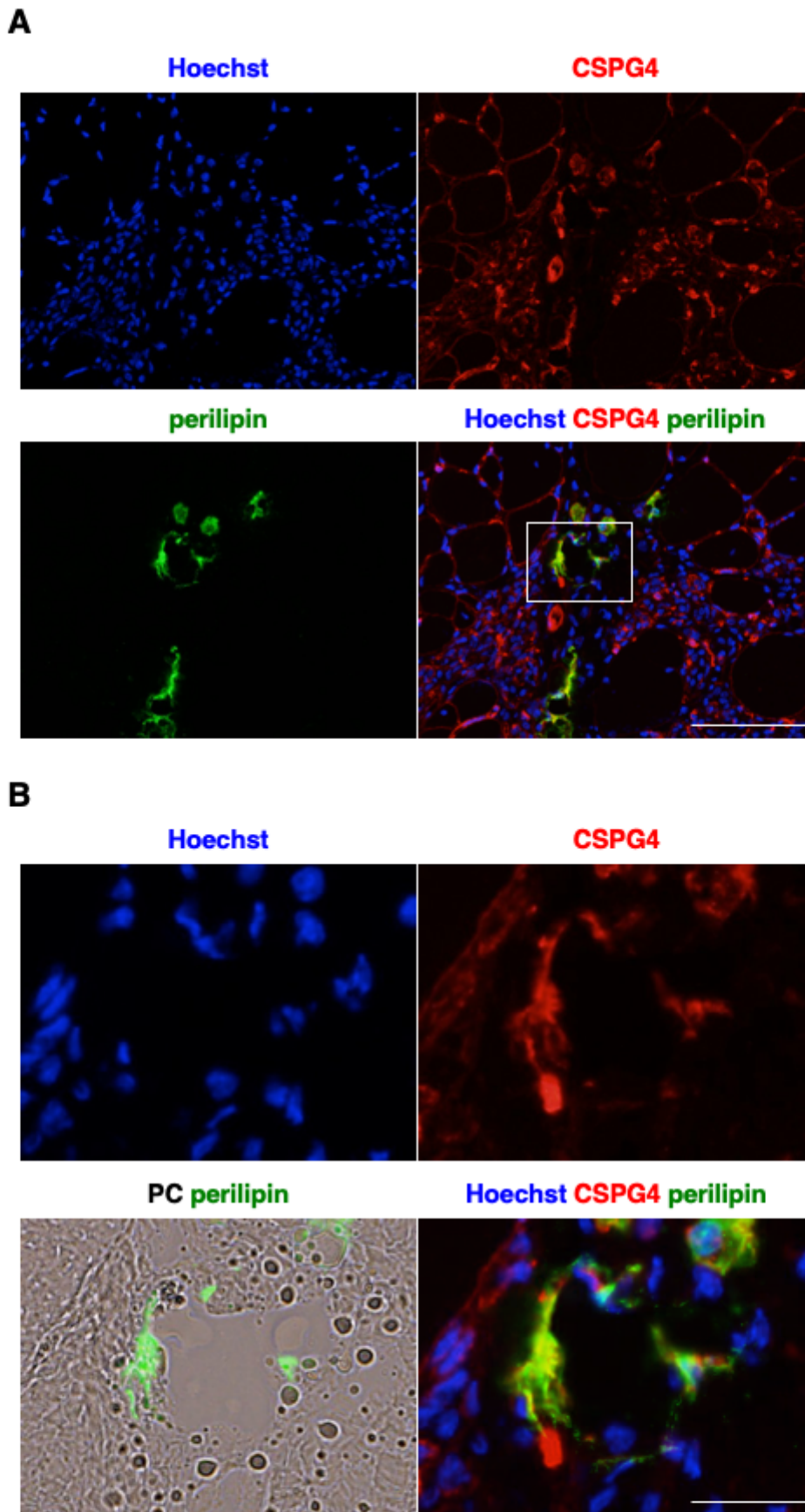
**A** : 白矢印 : 血管 黒矢印 : 神経周膜 Scale bar, 100  $\mu\text{m}$

**B** : A の四角の範囲の拡大像を示した。白矢頭 : CSPG4 陽性細胞  
Scale bar, 20  $\mu\text{m}$

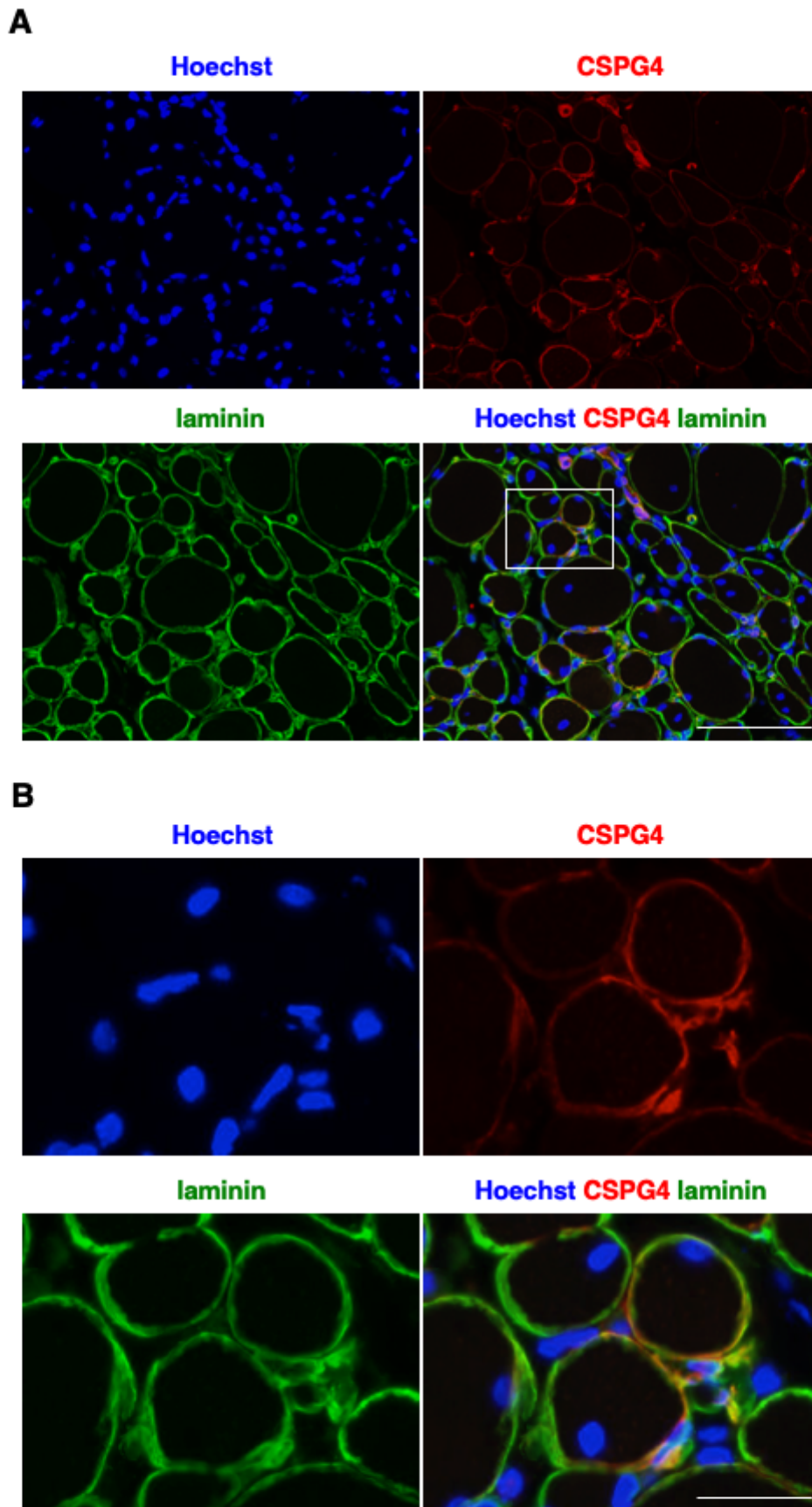


**Fig. 2-10** DMD ラットと正常ラット (WT) 骨格筋組織における CSPG4 陽性細胞数の比較  
**A:** CSPG4 とラミニンの免疫染色像を示した。白矢頭: 基底膜外側の CSPG4 陽性細胞 Scale bar, 100  $\mu$ m  
**B:** A の四角の範囲の拡大像を示した。白矢頭: 基底膜外側の CSPG4 陽性細胞 黒矢頭: 基底膜内側の CSPG4 陽性細胞 Scale bar, 20  $\mu$ m  
**C:** CSPG4 陽性細胞数をグラフで示した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。inside: 基底膜内側の CSPG4 陽性細胞 outside: 基底膜外側の CSPG4 陽性細胞 \*\*;  $p < 0.01$  ( $t$ -test)

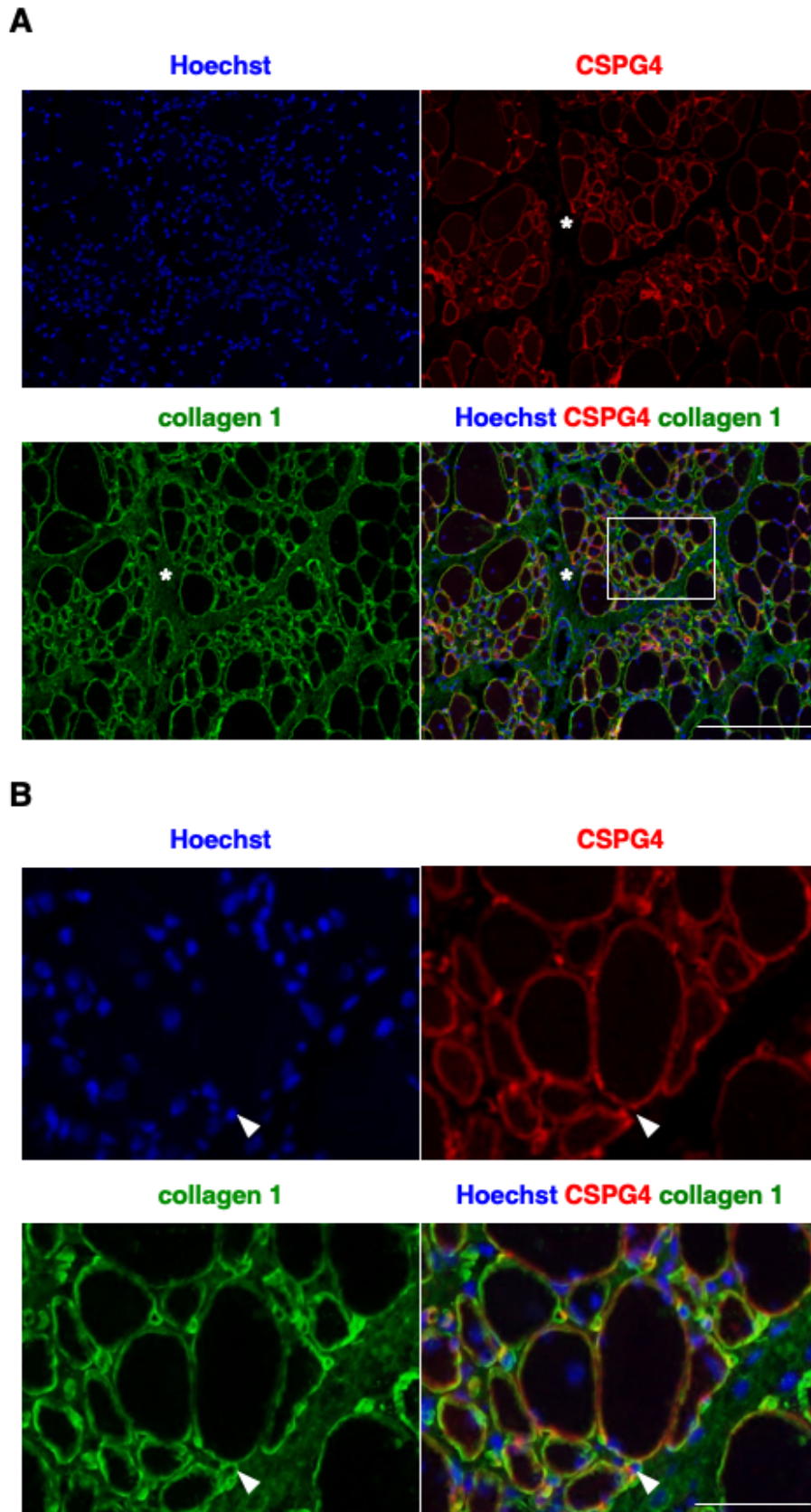




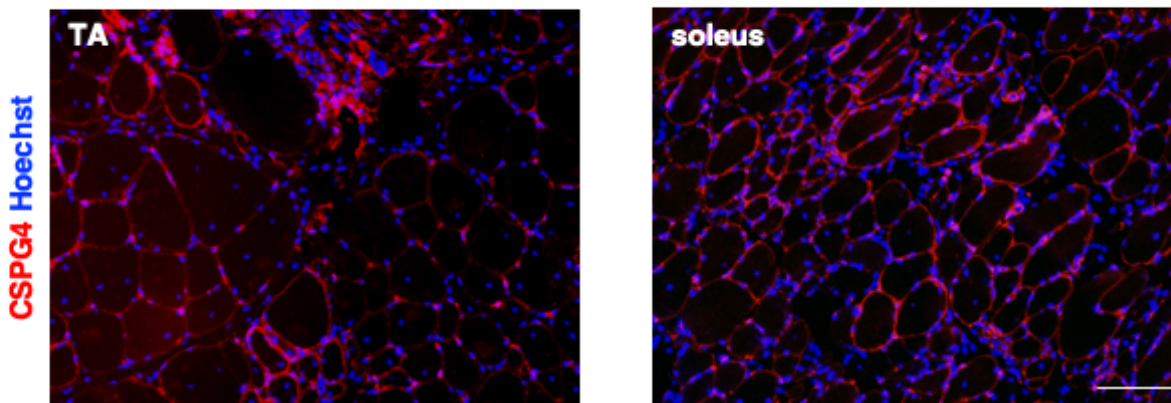
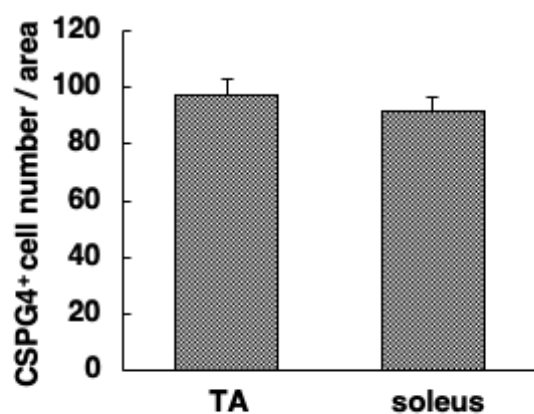
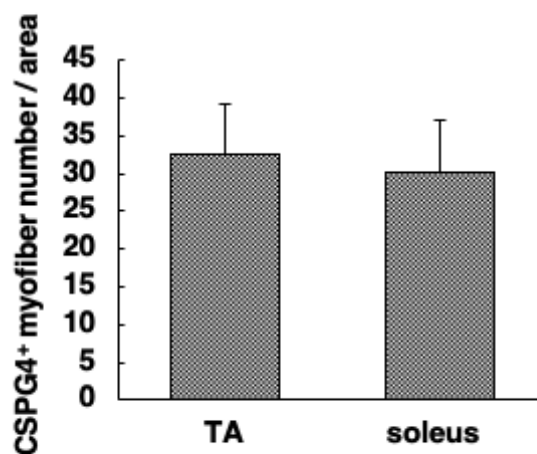
**Fig. 2-11** DMD ラットの骨格筋組織内脂肪細胞の CSPG4 免疫染色像  
**A** : 脂肪浸潤部位の CSPG4 免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu$ m  
**B** : A の四角の範囲の拡大像を示した。PC : 位相差像 (明視野) Scale bar, 25  $\mu$ m



**Fig. 2-12** DMD ラットの再生筋線維の CSPG4 とラミニンの二重免疫染色像  
**A** : 筋再生部位の CSPG4 とラミニンの免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu\text{m}$   
**B** : A の四角の範囲の拡大像を示した。Scale bar, 25  $\mu\text{m}$



**Fig. 2-13** DMD ラットの再生筋線維の CSPG4 と 1 型コラーゲンの二重免疫染色像  
**A** : 筋再生部位の CSPG4 と 1 型コラーゲンの免疫染色像を示した。\* : 線維組織  
 Scale bar, 100  $\mu$ m  
**B** : A の四角の範囲の拡大像を示した。白矢頭 : CSPG4 陽性細胞 Scale bar, 25  $\mu$ m

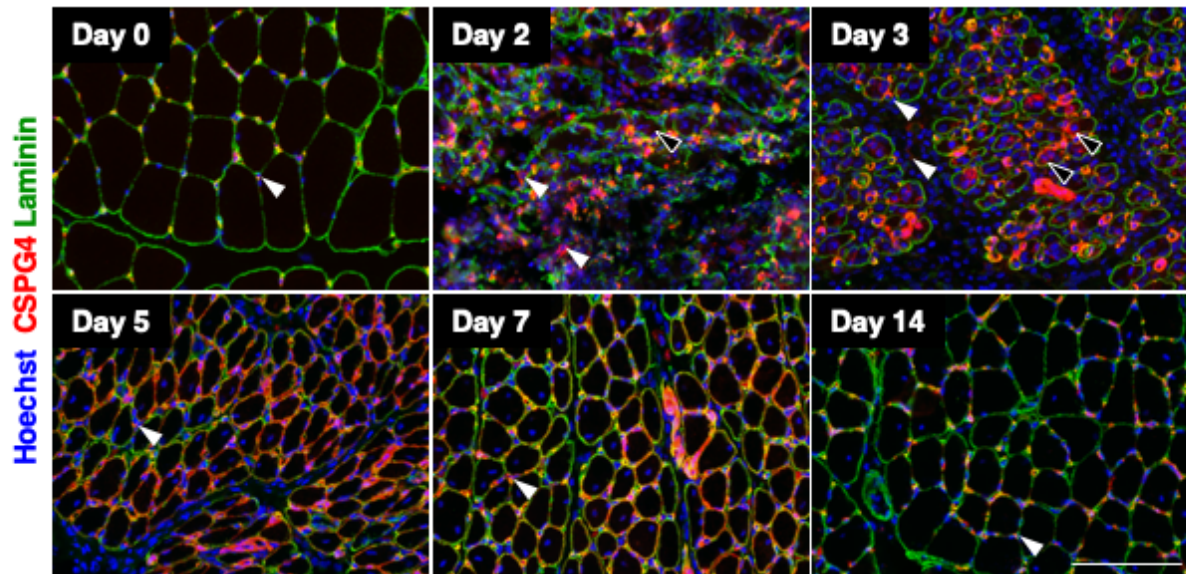
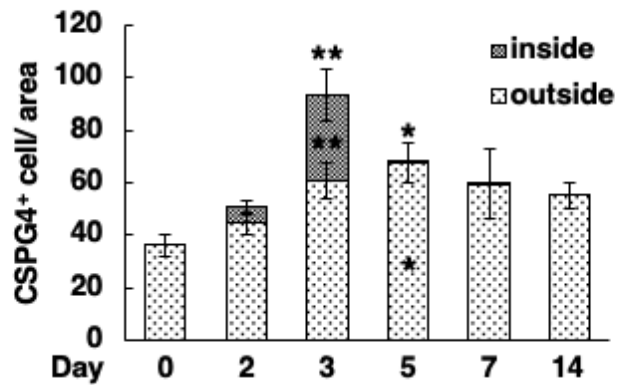
**A****B****C**

**Fig. 2-14 DMD ラット前脛骨筋 (tibialis anterior muscle ; TA)、ヒラメ筋 (soleus) における CSPG4 陽性細胞数および CSPG4 集積筋線維数の比較**

**A** : CSPG4 の免疫染色像を示した。 Scale bar, 100  $\mu$ m

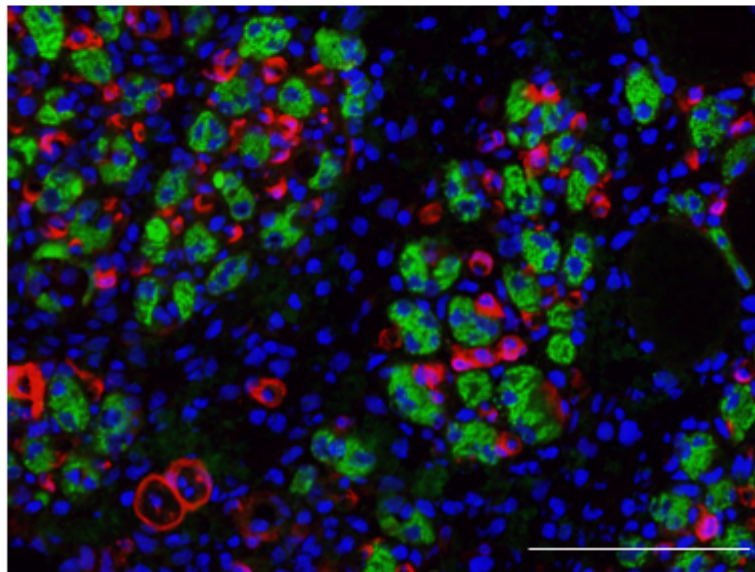
**B** : CSPG4 陽性細胞数をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。

**C** : CSPG4 集積筋線維数をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n = 5)。

**A****B**

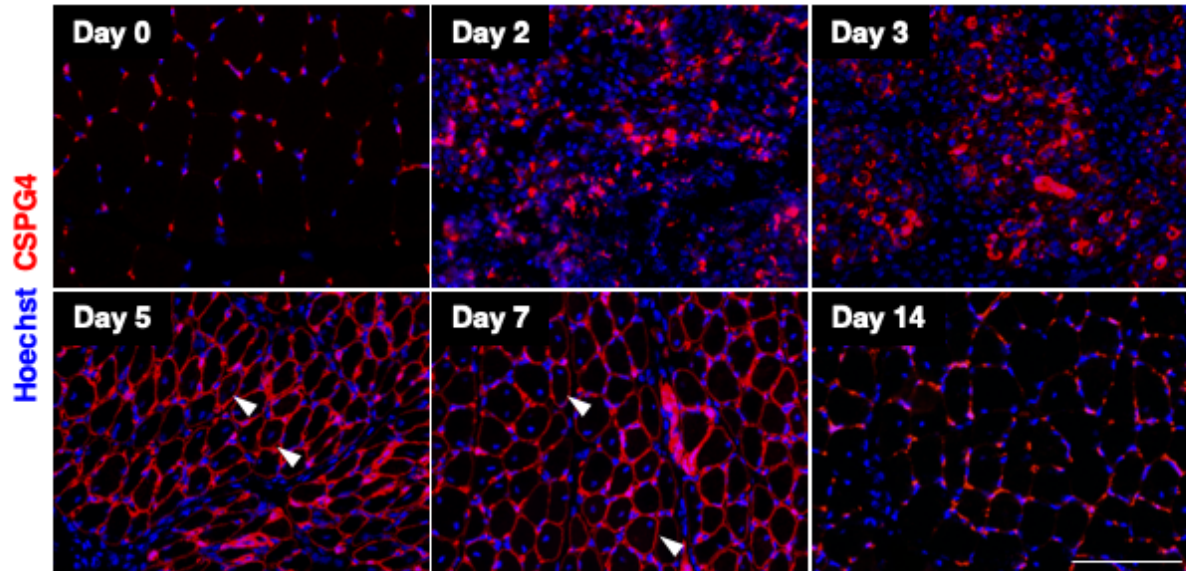
**Fig. 2-15** 正常ラット骨格筋損傷・再生誘導時の CSPG4 陽性細胞の経時的な変化  
**A** : CSPG4 とラミニンの免疫染色像を示した。白矢頭 : 基底膜外側の CSPG4 陽性細胞 黒矢頭 : 基底膜内側の CSPG4 陽性細胞 Scale bar, 100  $\mu$ m  
**B** : CSPG4 陽性細胞数の経時的な変化をグラフで示した。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した (n = 4)。inside : 基底膜内側の CSPG4 陽性細胞 outside : 基底膜外側の CSPG4 陽性細胞 \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$  (Dunnnett test)

Hoechst CSPG4 eMHC

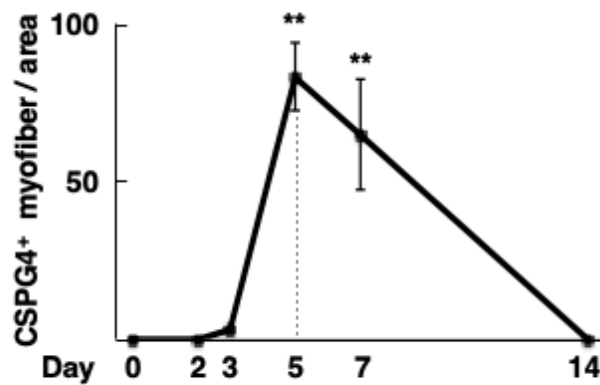


**Fig. 2-16** 損傷 3 日目の骨格筋における CSPG4 と eMHC の二重免疫染色像  
Scale bar, 100  $\mu$ m

**A**



**B**



**Fig. 2-17** 正常ラット骨格筋損傷・再生誘導時の CSPG4 集積筋線維数の経時的な変化  
**A** : CSPG4 の免疫染色像を示した。CSPG4 集積筋線維を白矢頭で示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

**B** : CSPG4 集積筋線維数の経時的な変化をグラフで示した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n = 4) 。\*\* ;  $p < 0.01$  (Dunnett test)

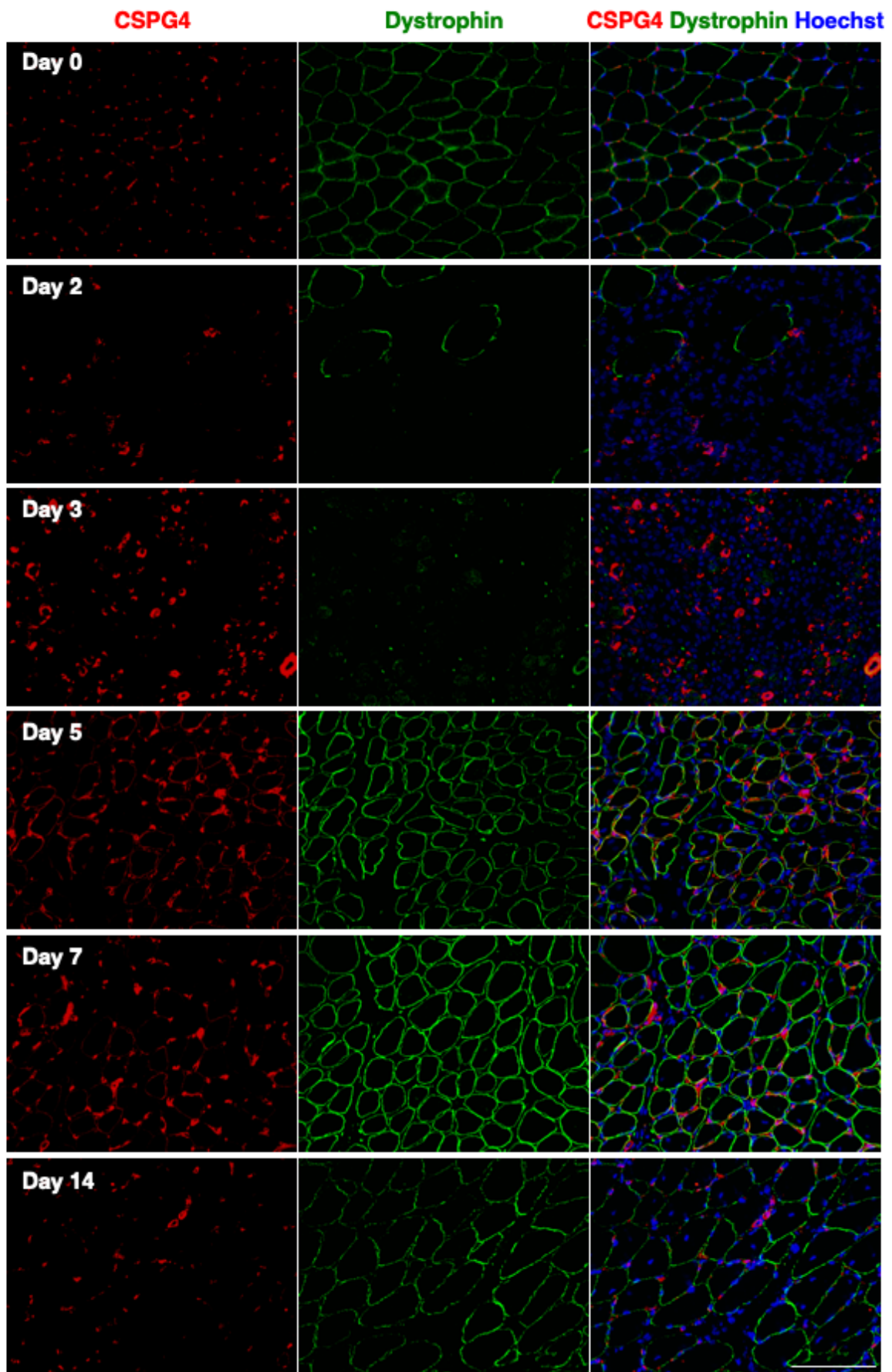
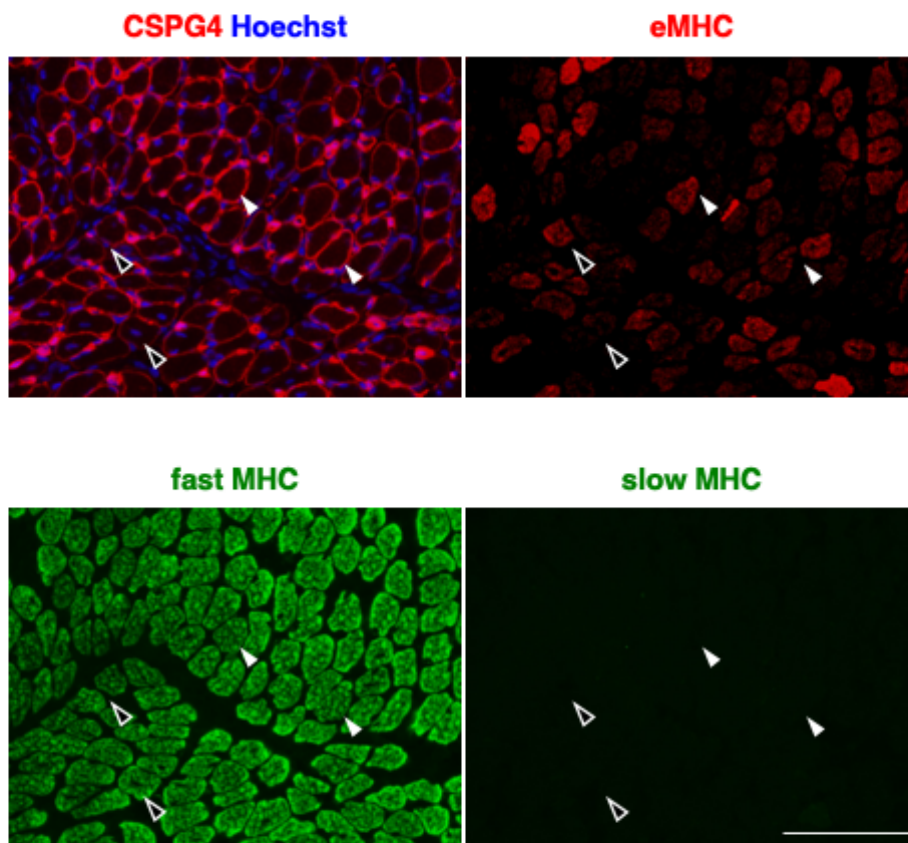


Fig. 2-18 損傷・再生誘導した正常ラット骨格筋組織の CSPG4 とジストロフィンの二重免疫染色像  
Scale bar, 100  $\mu$ m





**Fig. 2-19** 損傷から 5 日目の正常ラット骨格筋組織における CSPG4 と各ミオシン重鎖 (MHC) の免疫染色像  
 CSPG4 の集積が強い筋線維を白矢頭で、CSPG4 の集積が弱い筋線維を黒矢頭で示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

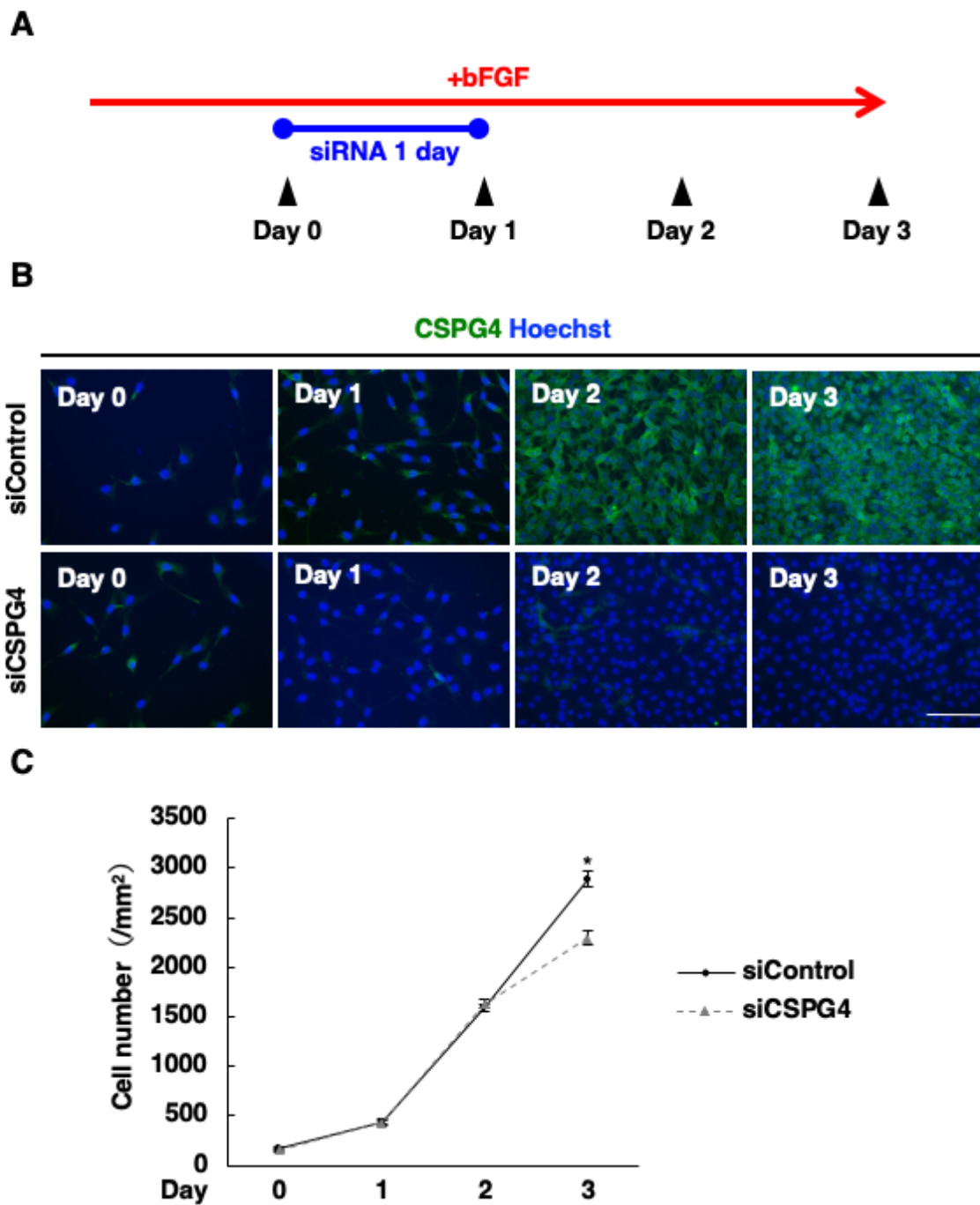
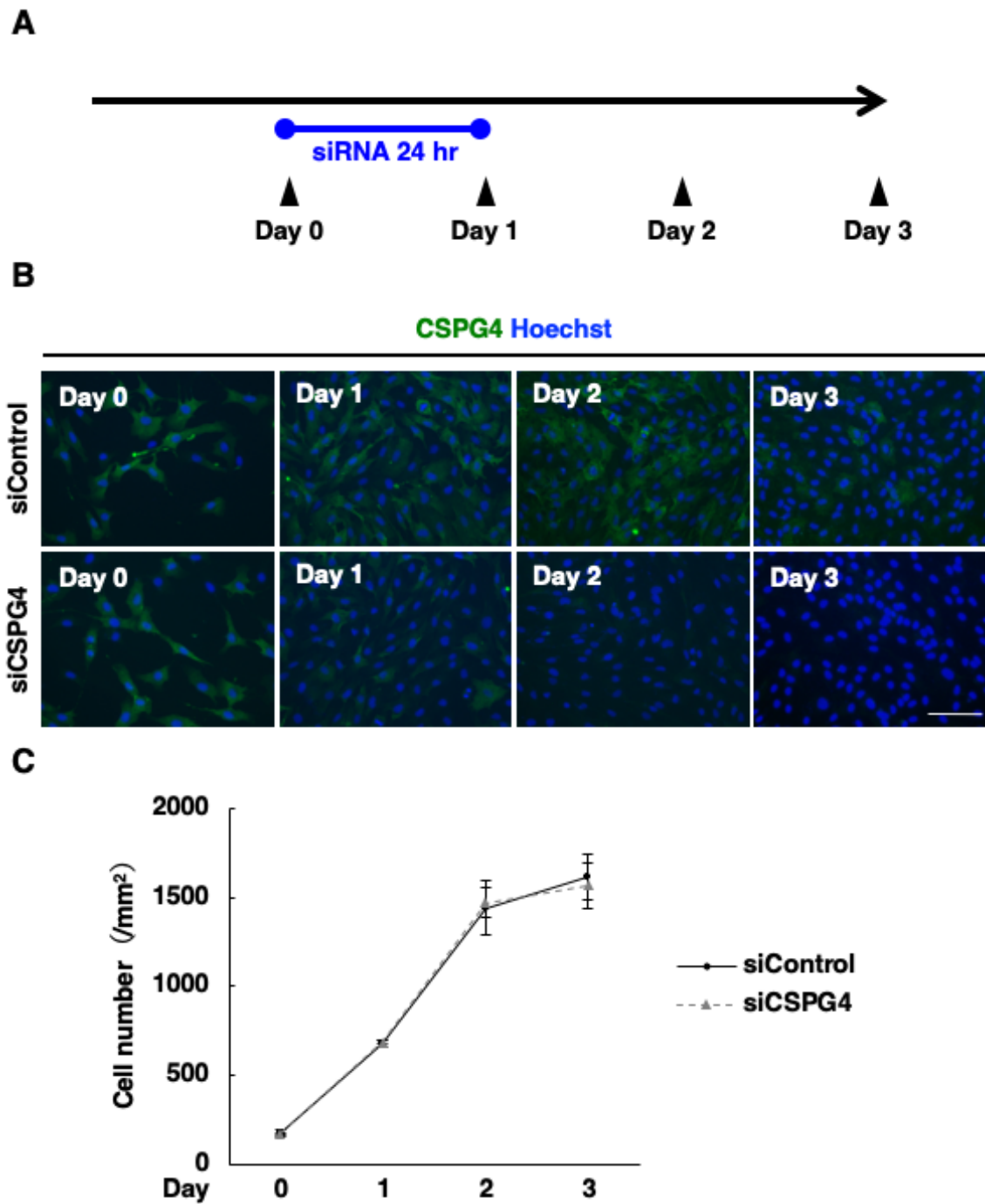


Fig. 2-20 CSPG4 発現抑制が bFGF 存在下での 2G11 細胞の増殖に与える影響

A: 実験のタイムコースを示した。

B: CSPG4 の免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

C: 細胞数をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。\*;  $p < 0.05$  ( $t$ -test)



**Fig. 2-21** CSPG4 発現抑制が bFGF 非存在下での 2G11 細胞の増殖に与える影響  
**A** : 実験のタイムコースを示した。  
**B** : CSPG4 の免疫染色像を示した。 Scale bar, 100  $\mu$ m  
**C** : 細胞数をグラフで示した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した (n=3)。

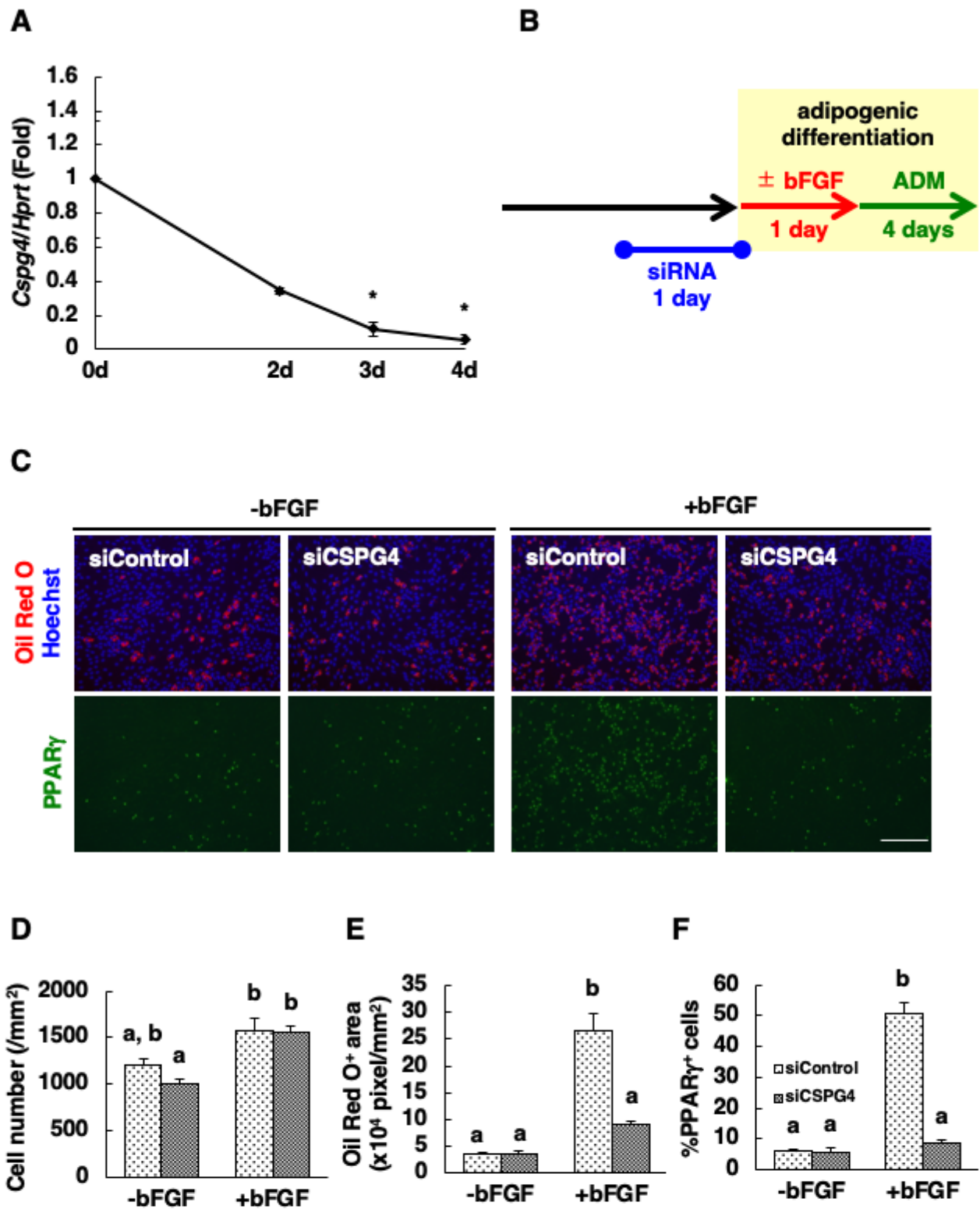


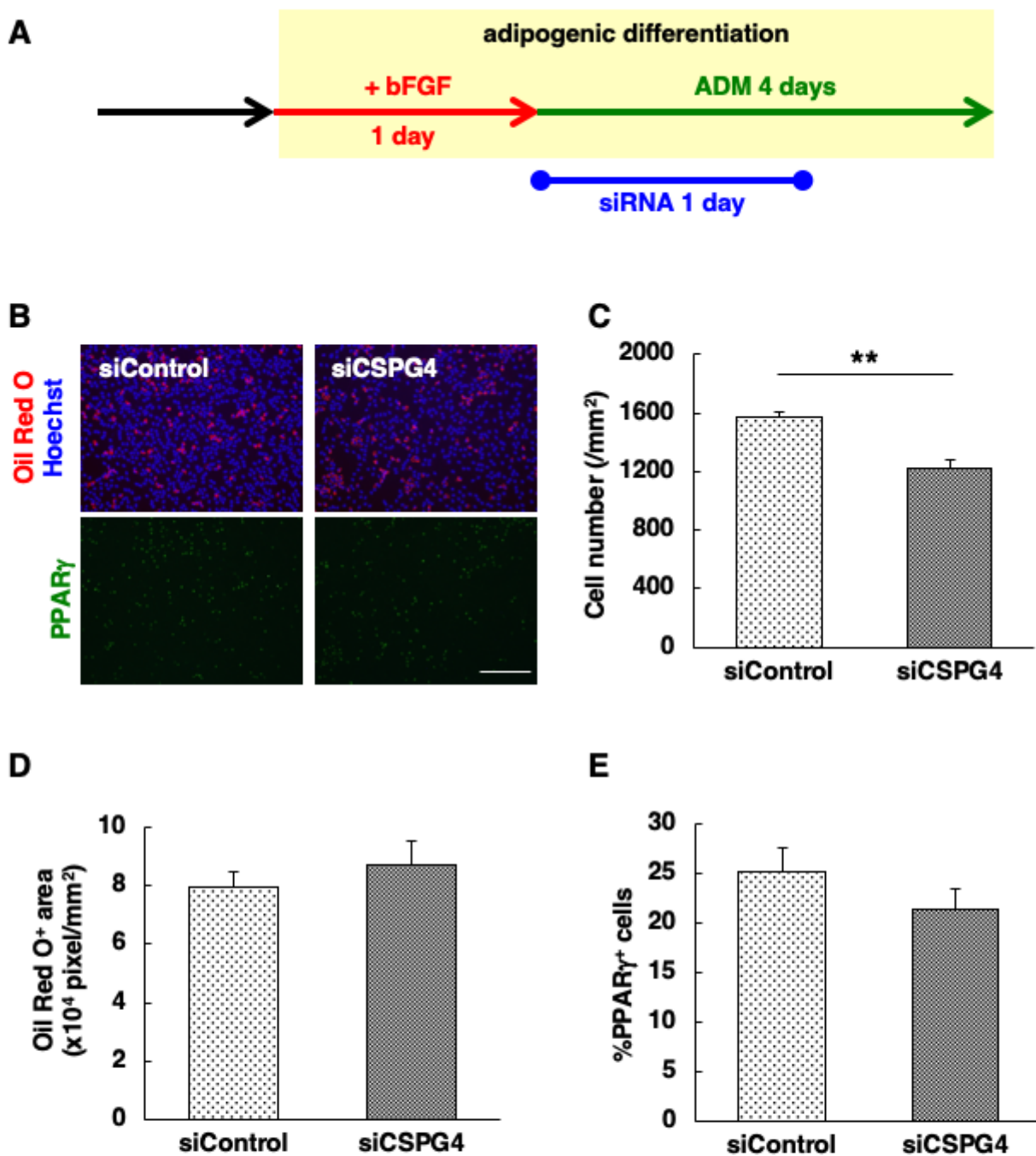
Fig. 2-22 増殖期の CSPG4 発現抑制が 2G11 細胞の脂肪分化能に与える影響

A: リアルタイム RT-PCR による脂肪分化誘導期の継時的な CSPG4 の発現解析結果をグラフで示した。\*;  $p < 0.05$  (Dunnett test)

B: 実験のタイムコースを示した。ADM; adipogenic differentiation medium (脂肪分化誘導培地)

C: 脂肪分化誘導後の Oil Red O 染色と PPAR $\gamma$  の免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

D-F: C における細胞数 (D)、Oil Red O 陽性面積 (E)、PPAR $\gamma$  陽性細胞の割合 (F) をグラフで示した。データは平均値  $\pm$  標準誤差で示した ( $n = 3$ )。異なるアルファベット間には有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。



**Fig. 2-23** 脂肪分化誘導期の CSPG4 発現抑制が 2G11 細胞の脂肪分化能に与える影響  
**A** : 実験のタイムコースを示した。 ADM ; adipogenic differentiation medium (脂肪分化誘導培地)  
**B** : 脂肪分化誘導後の Oil Red O 染色と PPAR $\gamma$  の免疫染色像を示した。 Scale bar, 100  $\mu$ m  
**C-E** : B における細胞数 (C)、Oil Red O 陽性面積 (D)、PPAR $\gamma$  陽性細胞の割合 (E) をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。\*\* ;  $p < 0.01$  ( $t$ -test)

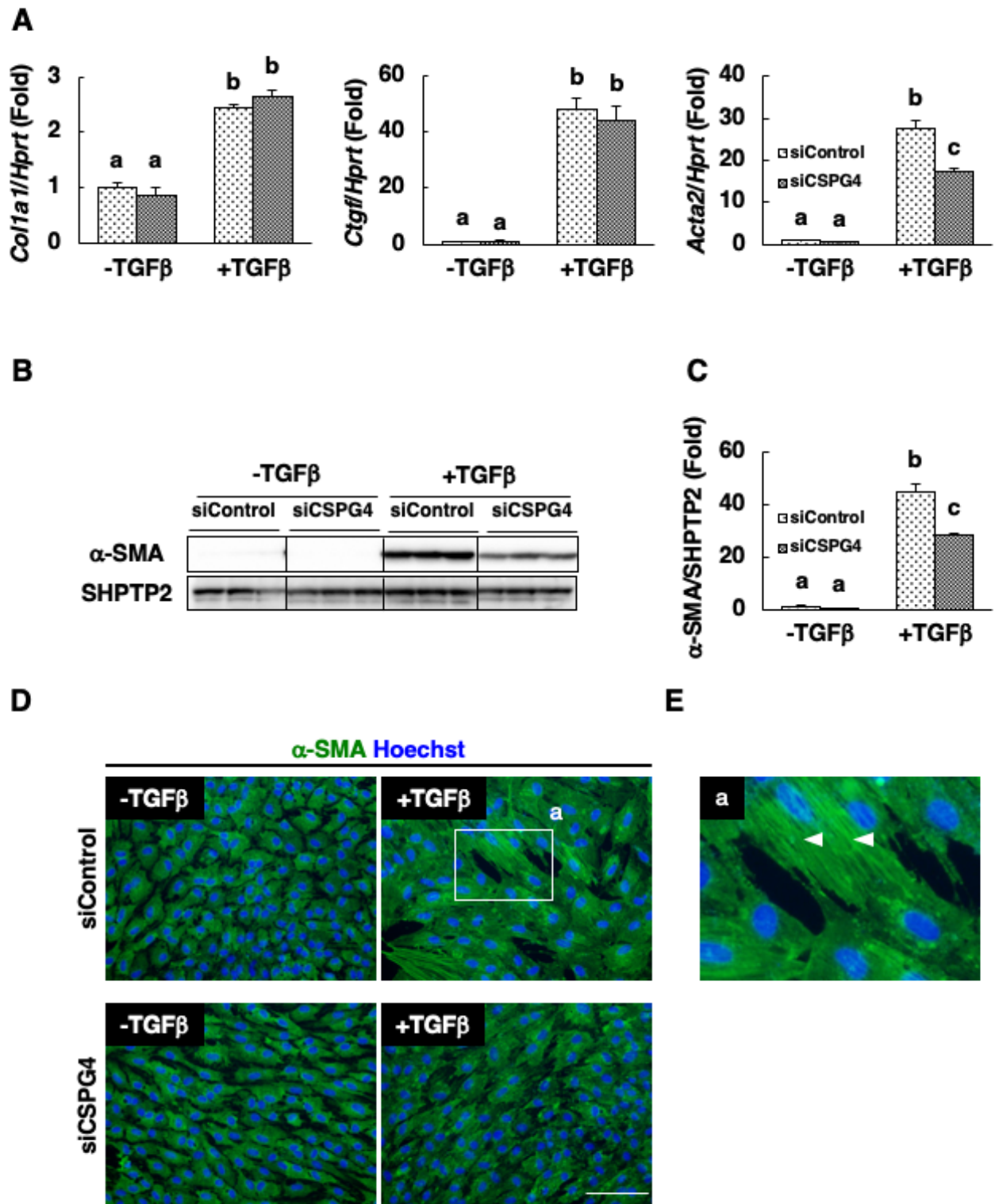


Fig. 2-24 線維芽細胞分化誘導期の CSPG4 発現抑制が 2G11 細胞の線維芽細胞分化に与える影響

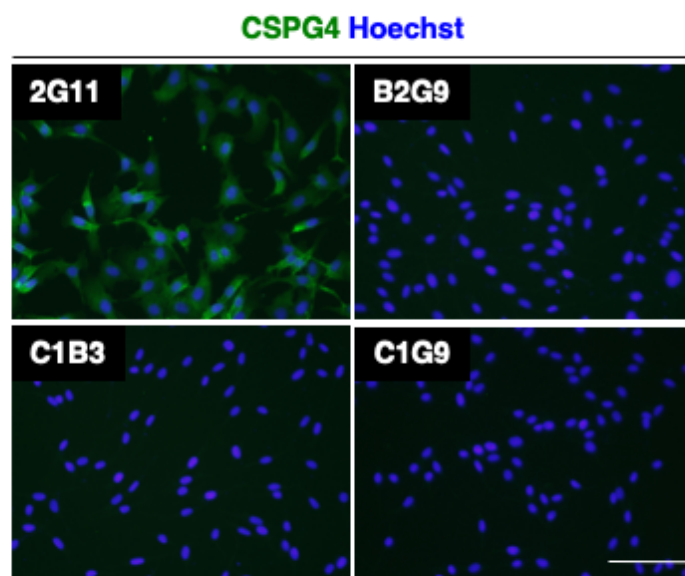
**A** : リアルタイム RT-PCR による、線維芽細胞マーカーの発現解析結果をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した ( $n = 3$ )。異なるアルファベット間には有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

**B** :  $\alpha$ -SMA のウェスタンブロッティング像を示した。ローディングコントロールとして SHPTP2 を用いた。

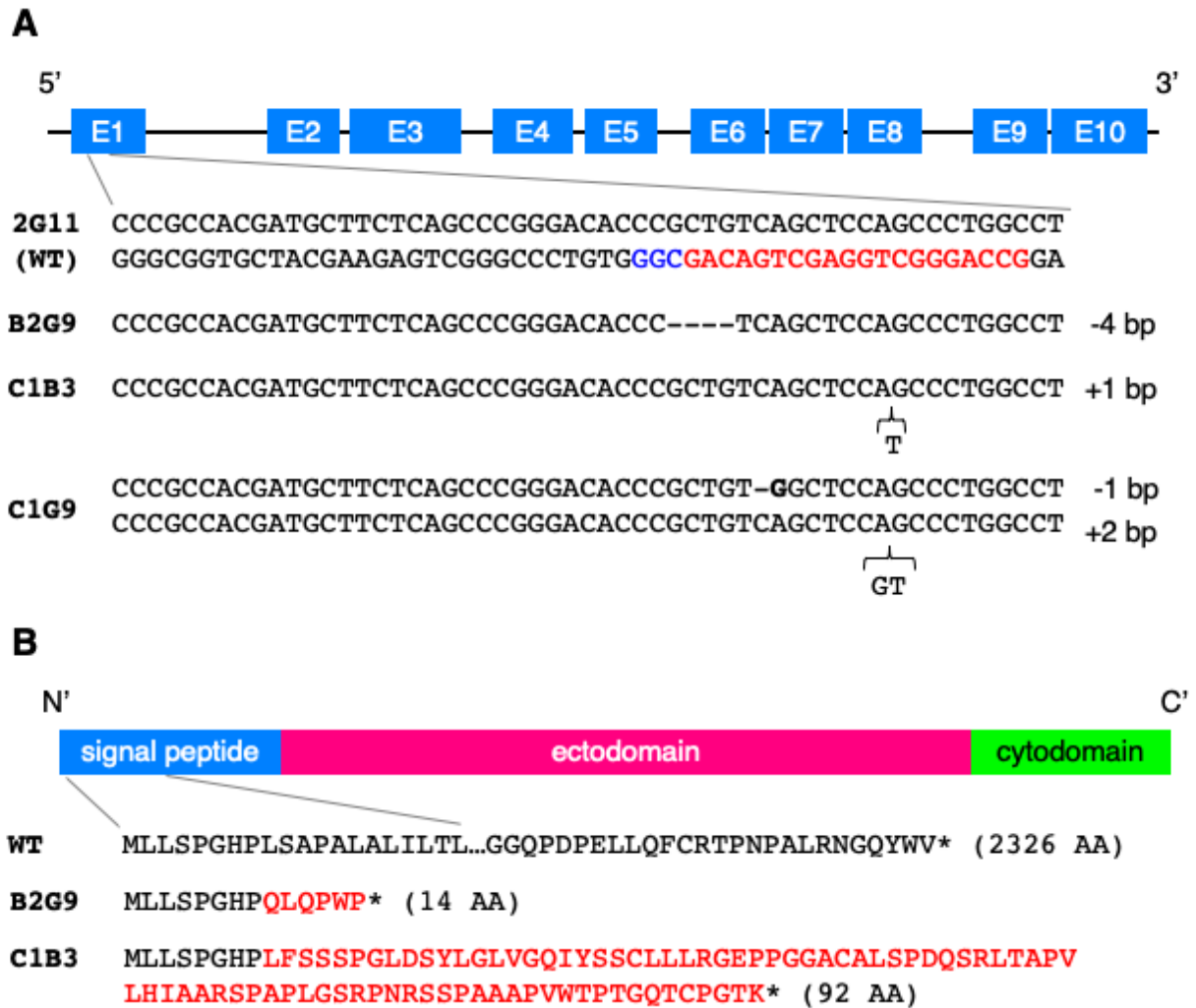
**C** : B をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した ( $n = 3$ )。異なるアルファベット間には有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。

**D** :  $\alpha$ -SMA の免疫染色像を示した。 Scale bar, 100  $\mu$ m

**E** : D の四角の範囲 (a) の拡大像を示した。ストレスファイバーは白矢頭で示した。



**Fig. 2-25** 作製した CSPG4 欠損 2G11 細胞における CSPG4 の発現  
CSPG4 の免疫染色像を示した。 Scale bar, 100  $\mu$ m

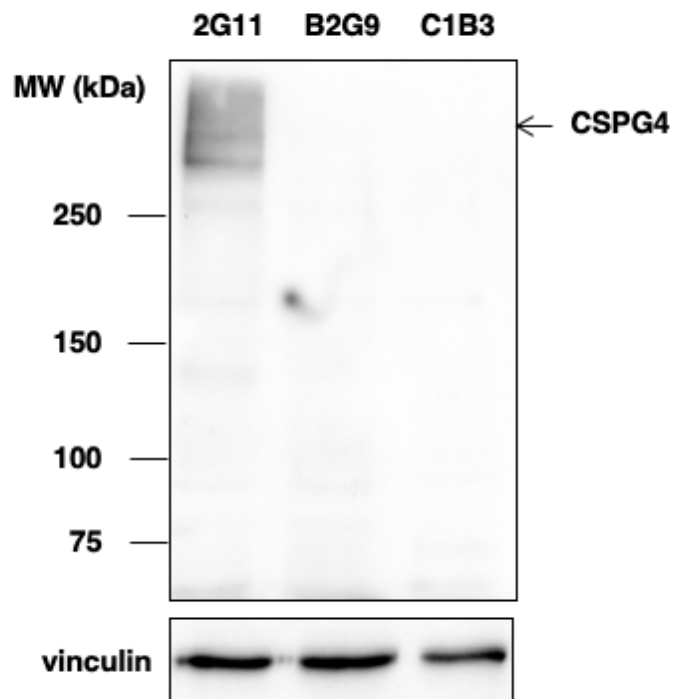


**Fig. 2-26** 作製した CSPG4 欠損 2G11 細胞の CSPG4 遺伝子のゲノム配列および予測されるアミノ酸配列

**A:** 得られた細胞クローンより抽出したゲノムにおいてターゲット領域をシーケンスした結果を示した。E: エキソン

**B:** A の結果から予測される変異タンパク質のアミノ酸配列を示した。





**Fig. 2-27** 2G11 細胞、クローン B2G9 およびクローン C1B3 における CSPG4 の発現  
 2G11 細胞、クローン B2G9、クローン C1B3 における CSPG4 のウェスタンブロッテ  
 イング像を示した。ローディングコントロールとして vinculin を用いた。

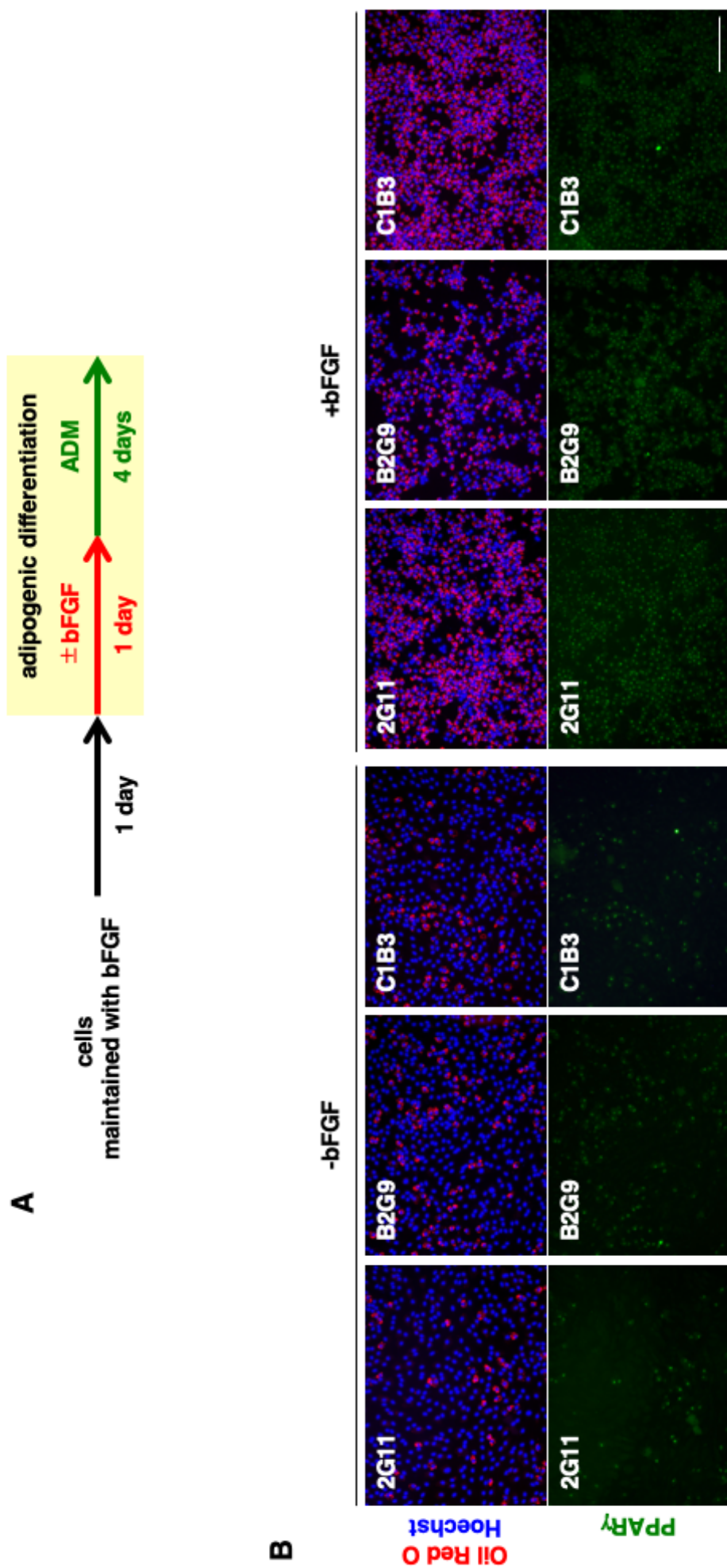
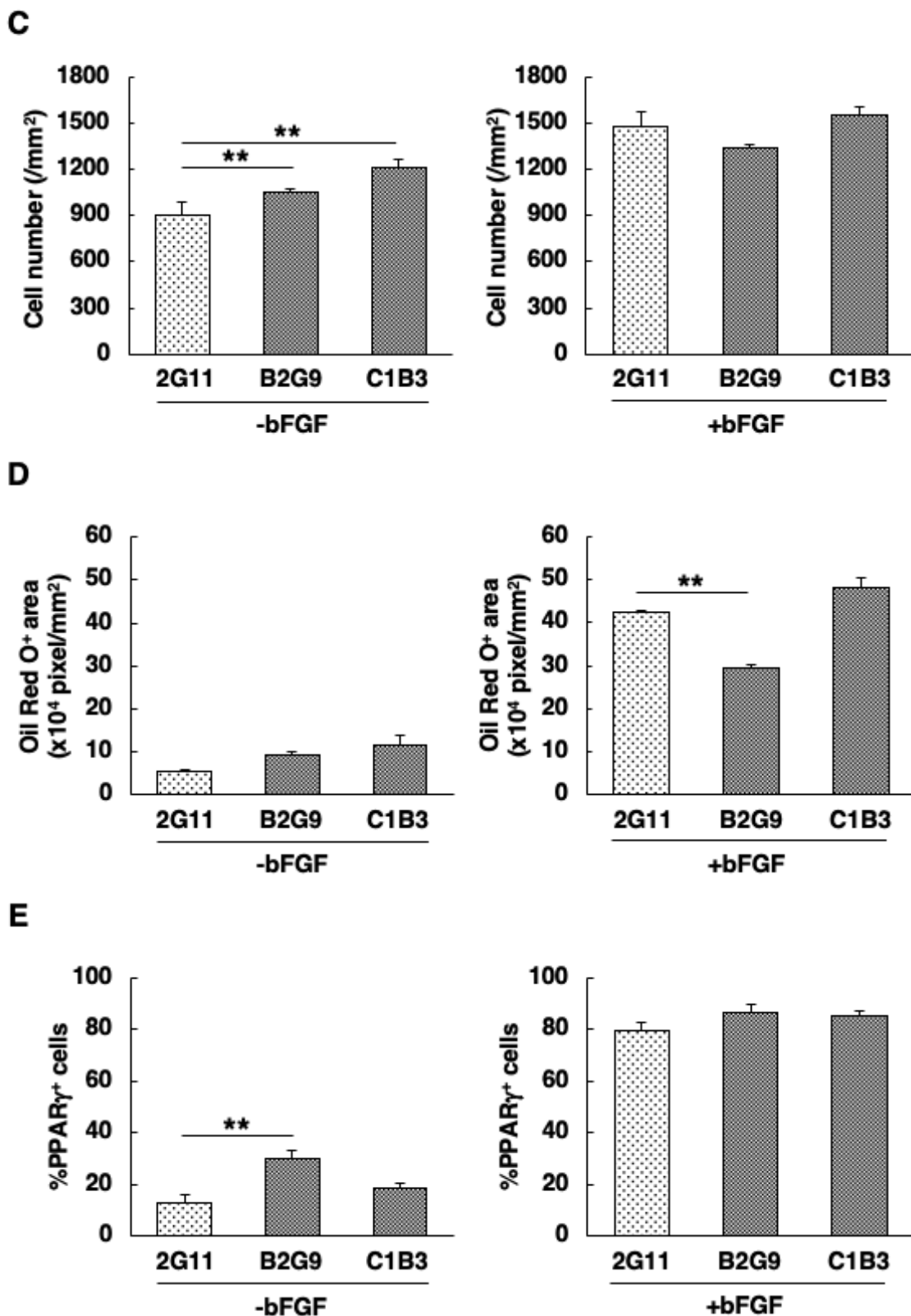


Fig. 2-28 CSPG4 欠損 2G11 細胞クローンの脂肪分化能  
次ページに続く

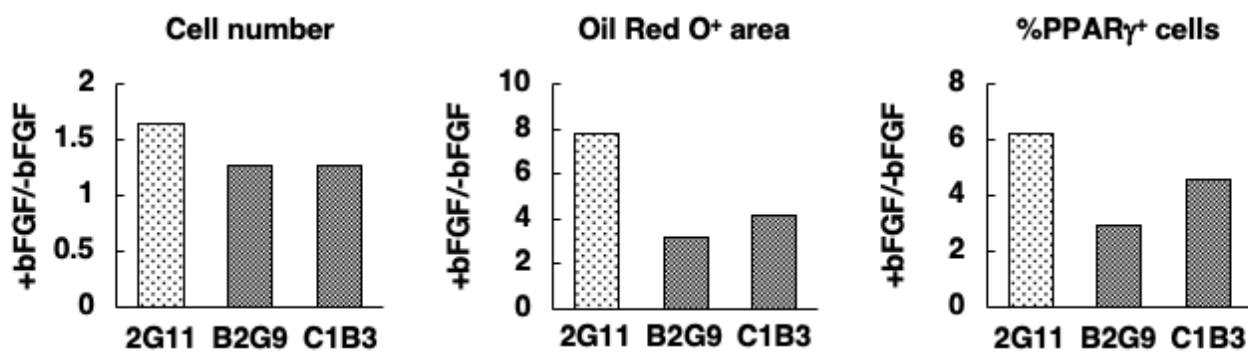


**Fig. 2-28** CSPG4 欠損 2G11 細胞クローンの脂肪分化能 (続き)

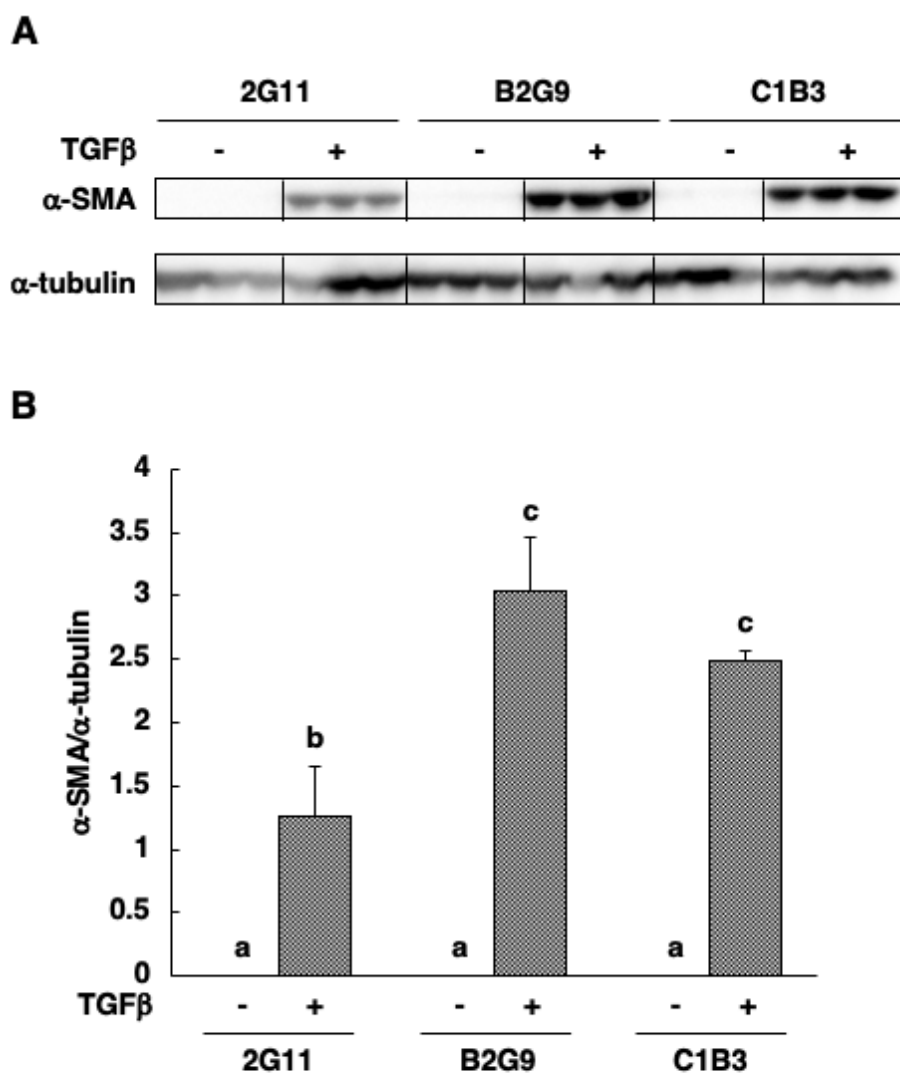
**A**: 実験のタイムコースを示した。ADM; adipogenic differentiation medium (脂肪分化誘導培地)

**B**: 脂肪分化誘導後の Oil Red O 染色と PPAR $\gamma$ の免疫染色像を示した。Scale bar, 100  $\mu$ m

**C-E**: Bにおける細胞数 (C)、Oil Red O 陽性面積 (D)、PPAR $\gamma$ 陽性細胞の割合 (E) をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。\*\* ;  $p < 0.01$  (Dunnett test)



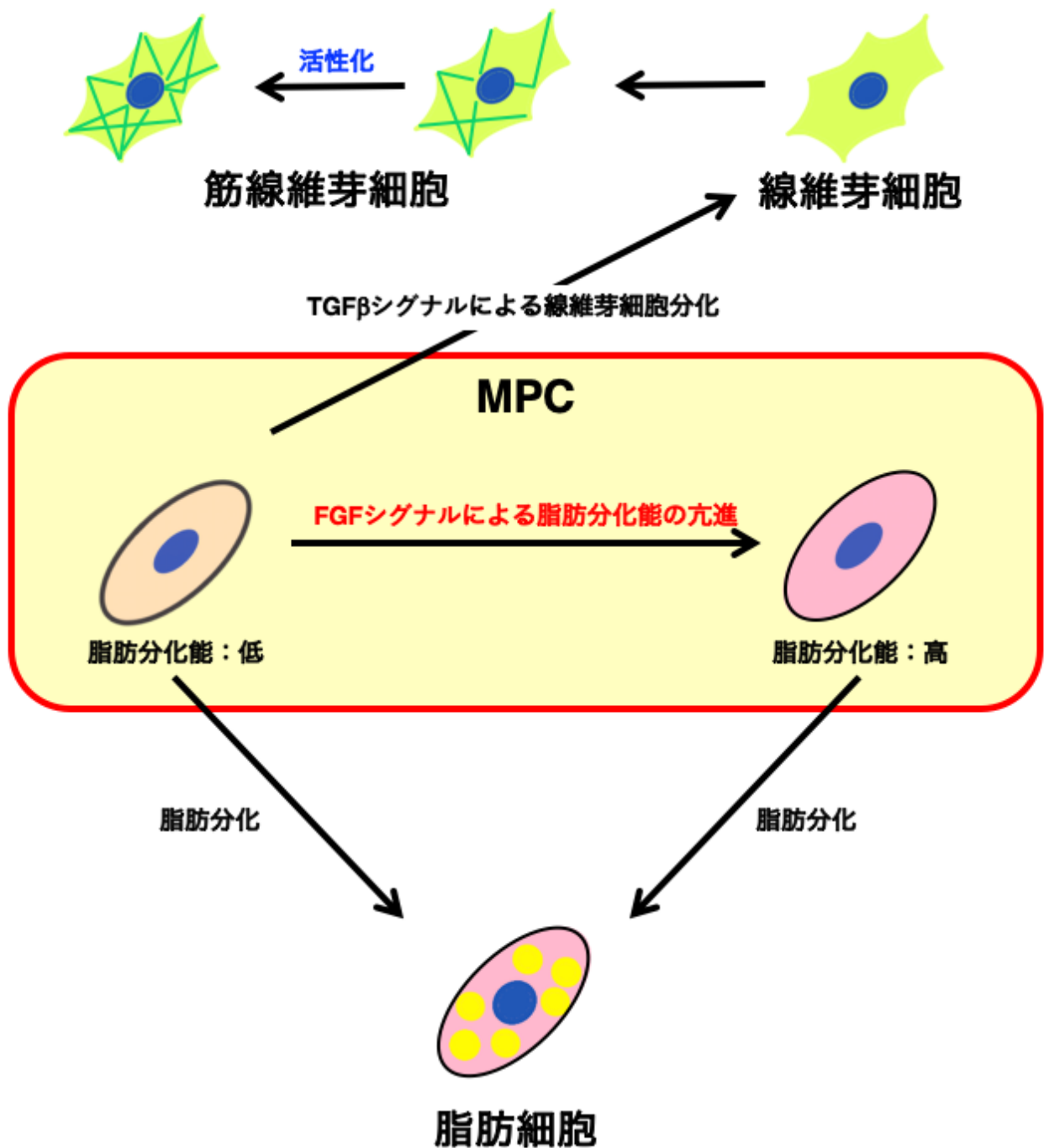
**Fig. 2-29** bFGF 添加による細胞数 (A)、Oil Red O 陽性面積 (B)、PPAR $\gamma$ 陽性細胞 (C) の増加量の比較  
 それぞれの指標について bFGF を添加した細胞の bFGF 未添加の細胞に対する比を取り、グラフで示した。



**Fig. 2-30** CSPG4 欠損 2G11 細胞クローンの線維芽細胞分化能

**A** : 線維芽細胞分化誘導後の細胞におけるα-SMA のウェスタンブロッティング像を示した。ローディングコントロールとしてα-tubulin を用いた。

**B** : A をグラフで示した。データは平均値±標準誤差で示した (n=3)。異なるアルファベット間には有意差があることを示す ( $p < 0.05$ )。



**Fig. 2-31 MPC の線維芽細胞分化と脂肪分化における CSPG4 の機能**  
 CSPG4 は FGF シグナルによる脂肪分化能の亢進に対し、促進的に働く。TGFβシグナルによる線維芽細胞分化については、CSPG4 は筋線維芽細胞の過剰活性化を抑制する方向に働く。

### 第三章

#### DMD ラットにおける CSPG4 の機能の検証

本章の内容については学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。  
5年以内に出版予定。



## 総括

正常な骨格筋は主として筋線維で構成されている。正常な骨格筋が損傷を受けた場合は、骨格筋内に存在する筋衛星細胞が活性化することで筋芽細胞に分化し、さらに筋管細胞へと分化する。筋管細胞は神経支配を受けることでさらに成熟した筋線維となり、骨格筋は損傷前の状態に再生することができる。デュシェンヌ型筋ジストロフィー症 (DMD) では、筋基底膜直下に存在するジストロフィンタンパク質の欠損により筋線維細胞膜と筋基底膜の結合が脆弱になることで、筋線維の損傷・壊死が繰り返され、過剰な線維組織の蓄積(線維化)が進行し、病態末期には脂肪組織が骨格筋内にみられる。これらの組織は筋再生能および筋機能の低下を招くことから、その起源となる細胞や関与するシグナル経路に関する研究が広く行われてきた。2010年に同定された骨格筋内在性間葉系前駆細胞 (mesenchymal progenitor cell ; MPC) (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010, 2011) は、線維芽細胞と脂肪細胞の両者に分化することができるだけでなく、未分化状態では筋再生促進作用を示す (Joe et al., 2010)。当研究室でラットヒラメ筋より樹立した脂肪前駆細胞クローン 2G11 細胞 (Murakami et al., 2011) は、FGF シグナルによるプライミング効果を受けて著しく脂肪分化能が亢進する脂肪前駆細胞クローンである (Nakano et al., 2016)。本研究では、未分化状態の 2G11 細胞も MPC と同様に筋分化促進作用を持つことから (Takegahara et al., 2014)、2G11 細胞が MPC クローンである可能性を考え、線維芽細胞分化誘導因子である TGF $\beta$ を用いて 2G11 細胞が線維芽細胞に分化するかどうかを調べた。その上で、DMD の病態形成に大きな影響を与える MPC の分化制御機構を明らかにするため、MPC の分化機構の可逆性および MPC の細胞膜表面に発現する分子による MPC の分化制御に着目して研究を行った。以下に、本研究で得られた知見から考えられる、骨格筋 MPC の分化制御機構およびその制御に関わる因子に関する考察を述べたい。

### 骨格筋 MPC の分化機構

骨格筋 MPC の分化は筋損傷に伴う細胞外環境の変化によって制御されている。正常な骨格筋ではほとんど増殖しない MPC は筋損傷に反応して増殖するようになる (Joe et al., 2010 ; Uezumi et al., 2010)。増殖した MPC は筋分化を促進する一方で (Joe et al., 2010)、脂肪分化能が亢進している (Yamanouchi et al., 2013)。筋再生が正常に進行した場合、筋芽細胞の脂肪分化抑制作用 (Uezumi et al., 2010 ; Yamanouchi et al., 未発表) や IL-4 シグナルによる脂肪分化抑制作用 (Heredia et al., 2013) によって、MPC は脂肪細胞に分化することなく、アポトーシスによって除去もしくは損傷前の静

止状態に戻る (Lemos et al., 2015)。本研究では、MPC の脂肪分化能が FGF の有無によって可逆的に変化することを示した。一過的な筋損傷では、骨格筋間質内に蓄積された bFGF が一過的に増加し、筋再生の進行とともに減少すること (Do et al., 2012) から、筋損傷によって一過的に亢進した脂肪分化能は筋再生の進行とともに低下すると考えられる (Fig. 4)。

一方、筋損傷が慢性的に繰り返される DMD のような筋原性疾患では、TGF $\beta$ シグナルが活性化しているためにアポトーシスによる MPC の除去が起こらず、骨格筋内に MPC が増加した状態が維持される (Lemos et al., 2015)。これに加えて、TGF $\beta$ シグナルによって筋線維芽細胞への分化が誘導される (Uezumi et al., 2011 ; Lemos et al., 2015)。また、筋再生の破綻や IL-4 シグナルの低下によって、骨格筋内に脂肪細胞が出現しやすい環境が形成されている。本研究では、MPC クローン 2G11 細胞から TGF $\beta$ によって分化誘導した筋線維芽細胞は脂肪分化能を失っているが、bFGF 添加および低密度条件におくことで、脂肪分化能を回復することが示された。このことから、線維化した骨格筋に出現する脂肪細胞は、MPC から直接分化したものだけでなく、一度分化した筋線維芽細胞が FGF シグナルの亢進や筋線維芽細胞間のシグナル減少などの条件によって未分化状態に戻り、さらに脂肪細胞に分化したものである可能性が考えられる (Fig. 4)。

DMD のように線維化した骨格筋に存在する筋線維芽細胞が未分化 MPC 状態に戻り、さらに脂肪細胞に分化する可能性については、今後、in vivo で検討することが求められる。そのためには、未分化 MPC、線維芽細胞および筋線維芽細胞を明確に区別する必要がある。MPC の細胞マーカーとして用いられている PDGFR $\alpha$  (Uezumi et al., 2011) や本研究で MPC に発現していることが明らかになった CSPG4 は、筋線維芽細胞にも発現しており、三者を区別する用途に用いることはできない。遺伝子発現プロファイル解析などで三者の特性を明らかにし新たな細胞マーカーを見いだすことや、既知の細胞マーカーを組み合わせるといった三者を区別する手法の確立が必要である。

現在、骨格筋線維化の治療は線維化の抑制と筋再生の促進に主眼が置かれている (Cholok et al., 2017)。本研究で見出した、骨格筋 MPC から一度分化した筋線維芽細胞が再び MPC に戻るという性質は、一度過剰に蓄積された線維組織を減少させ、筋再生を促進する MPC を増やすという新たな骨格筋線維化治療の開発につながるものである。本研究では FGF シグナルを亢進させることと低密度条件に置くことで、筋線維芽細胞が MPC 状態に戻ること示したが、治療法開発につなげていくためにはより詳細な分子機構の解明が必要である。特に、細胞密度依存性に脂肪分化能が回復する分子機構については、本研究で調べた筋線維芽細胞が分泌する液性因子だけでなく、細胞密

度に応じて転写活性化補助因子の局在を変化させる Hippo シグナル (Zhao et al., 2007) や、細胞密度変化によるコラーゲン合成量や組成の変化 (Aumailley et al., 1982) といった細胞外基質の変化なども考慮に入れて解明すべき課題である。

### CSPG4 による MPC の分化制御

本研究において未分化 MPC の細胞膜表面分子として同定された CSPG4 は、細胞の増殖や遊走に関わることが多くの細胞で報告されている分子である (Makagiansar et al., 2007 ; Cattaruzza et al., 2013)。またその多くは bFGF や PDGF のアイソフォームの一つである PDGF-AA の作用を仲介もしくは修飾するものである (Grako and Stallcup, 1995; Nishiyama et al., 1996; Goretzki et al., 1999; Grako et al., 1999 ; Stallcup 2002 ; Biname et al., 2013 ; Cattaruzza et al., 2013)。本研究では、MPC クローンである 2G11 細胞における FGF シグナルによる増殖促進効果やプライミング効果においても CSPG4 が機能することが示された。また、TGF $\beta$ によって誘導される線維芽細胞分化においては、CSPG4 は線維芽細胞から筋線維芽細胞への活性化に対し抑制的に働く可能性が示された (Fig. 4)。FGF シグナルについては CSPG4 と bFGF が結合することで FGFR への入力が増進されること (Cattaruzza et al., 2013) や CSPG4 の細胞内ドメインに FGF シグナルによってリン酸化されるチロシン残基があること (Makagiansar et al., 2007) から、CSPG4 が FGF の作用発現を修飾もしくは仲介する可能性が考えられる。一方で、TGF $\beta$ については、CSPG4 との親和性がないことが報告されている (Goretzki et al., 1999)。したがって、CSPG4 の TGF $\beta$ シグナルに対する抑制的な機能は主に CSPG4 の細胞内ドメインが担っているものと考えられる。CSPG4 の細胞内ドメインは細胞外ドメインと比べると短いものの、末端のアミノ酸配列 (QYWV) が PDZ 結合領域であり (Fang et al., 1999)、MUPP1 やシンテニンといった PDZ ドメインを持つタンパク質が結合する (Barritt et al., 2000 ; Chatterjee et al., 2008)。シンテニンは 1 型 TGF $\beta$ 受容体 (T $\beta$ R1) と結合し、細胞膜上の受容体の発現を安定化させることで、SMAD の活性化を促進する (Hwangbo et al., 2015)。このことから、CSPG4 による TGF $\beta$ シグナル抑制機構として、CSPG4 とシンテニンが結合することでシンテニンと T $\beta$ R1 の結合を弱め細胞内 TGF $\beta$ シグナルを弱めていることが考えられる。これ以外にも CSPG4 と結合するタンパク質が細胞内の FGF シグナルおよび TGF $\beta$ シグナルを制御する可能性が考えられるため、FGF および TGF $\beta$ シグナル入力時の結合タンパク質の動態にも着目する必要があるだろう。

DMD モデルラットに CSPG4 欠損を導入することで、線維化面積が増加したことから、CSPG4 が線維化に対し抑制的に機能することが示された。線維化の進行は細胞外

基質の硬さの増加を伴うものである (Georges et al., 2007 ; Liu et al., 2010)。骨髄由来の間葉系間質細胞において細胞外基質が硬いほど筋線維芽細胞への分化が進行し、脂肪分化能が低下することが示されているように (Talele et al., 2011)、細胞外基質の硬さは細胞の分化能を制御する要素の一つである。したがって、CSPG4 は成長因子の作用を仲介もしくは修飾するだけでなく、線維化を抑制することで MPC 周囲の細胞外基質の硬さを制御し、間接的にも MPC の分化制御に関わることが考えられる。

### 筋分化・筋再生における CSPG4 の機能

筋系譜細胞は MPC の脂肪分化能を抑制する (Joe et al., 2010 ; Yamanouchi et al., 未発表)。すなわち、筋系譜細胞の動態は MPC の分化を制御する一つの要素であることから、CSPG4 と筋分化・筋再生の関係について本研究の結果から考えられることを以下に述べる。

ショウジョウバエでは CSPG4 の相同分子である *Perdido/Kon-Tiki* の発現が胚筋肉の筋腱接合部で観察される (Estrada et al., 2007)。蛹期の筋線維形成時には筋腱接合部に加えて、筋線維全体で筋原線維の Z 線の位置に一致するように *Perdido/Kon-Tiki* が分布する (Perez-Moreno et al., 2014)。この *Perdido/Kon-Tiki* の発現を抑制すると、胚筋肉が表皮の腱細胞と結合ができなくなり、発生が止まってしまう (Estrada et al., 2007)。成虫の筋線維形成時には、胚筋肉と同様の筋腱接合部の形成不全に加えて、筋原線維同士の接着が弱まり、サルコメア構造にずれがみられるとともに、A 帯の中心部のアクチン線維とミオシン線維が重ならない H 帯の消失といったサルコメア構造の異常がみられ、羽化できない (Perez-Moreno et al., 2014)。本研究で作出した CSPG4 欠損ラットは、胎生致死や骨格筋の形態や筋力の異常がみられず、得られた産仔の遺伝子型比率も WT : Hz : KO で約 1 : 2 : 1 と理論値に近かったことから、CSPG4 は哺乳類の発生の成否に関わるような機能を担うわけではないと考えられる。しかしながら、DMD を始めとする多くの筋原性疾患の再生筋線維周囲に、疾患によってその発現量に増減はあるものの、CSPG4 が観察されていること (Petrini et al., 2006) は、哺乳類においても筋再生時に CSPG4 が何かしらの機能を持つことを示すものであると考えられる。本研究において、CSPG4 が筋再生過程において筋線維細胞膜直下にジストロフィンタンパク質の局在が見られ始める時期に一過的に再生筋線維周囲に集積する様子が観察された。この時期の再生筋線維の構造的な特徴としては、筋原線維のサルコメア構造はすでに構成されているものの、その配置が不規則なことが挙げられる (Jirmanová and Thesleff., 1972)。このことから、ショウジョウバエの蛹期の

Perdido/Kon-Tiki が筋原線維形成に関わるのと同様に、哺乳類においても筋原線維の形成に CSPG4 が関与する可能性が考えられる。

筋原線維形成とともに、再生筋線維の成熟に必要なのが神経再支配である。神経と CSPG4 の関係については、脊髄損傷後に CSPG4 陽性を示す細胞が損傷部位に集積し (Jones et al., 2003 ; Tan et al., 2006)、神経軸索の伸長が CSPG4 陽性細胞集積部位の手前で止まることが示されている。CSPG4 の細胞外ドメインに対する中和抗体を投与することで、神経軸索が CSPG4 陽性細胞集積領域を通過して伸長できるようになる (Tan et al., 2006)。一方で、CSPG4 陽性線維芽細胞に沿って神経軸索が伸長する様子も観察されている (Jones et al., 2003)。このように CSPG4 が神経軸索に与える影響については議論の余地がある。したがって、筋再生時に一過的に増加する MPC の細胞膜上の CSPG4 と再生筋線維周囲の CSPG4 が運動神経線維の軸索伸長に与える影響を調べることは、CSPG4 による神経軸索伸長制御機構の解明に役立つとともに、筋損傷・再生に伴う神経支配の再形成機構の解明につながるものと考えられる。

#### 筋線維タイプの違いが MPC の分化および CSPG4 の機能に与える影響

DMD においては、骨格筋内脂肪組織の蓄積や線維化の進行は骨格筋の種類によって差がみられる (Kinali et al., 2011 ; Torriani et al., 2012 ; Gutpell et al., 2015)。この理由の一つとして、MPC の分化能の違いが考えられている。脂肪分化能の違いについては、遅筋線維が主体のヒラメ筋に由来する MPC の方が速筋線維主体の前脛骨筋由来の MPC より脂肪分化能が高いことが示されている (矢田、博士論文)。線維芽細胞分化能の違いがあるかどうかは不明だが、本研究において、ヒラメ筋と前脛骨筋では CSPG4 欠損が骨格筋線維化に与える影響が異なったことを考えると、少なくとも筋線維タイプの違いによって CSPG4 が異なる制御を受け、筋線維芽細胞および線維芽細胞による線維組織形成過程に違いが生じる可能性を考えることができる。

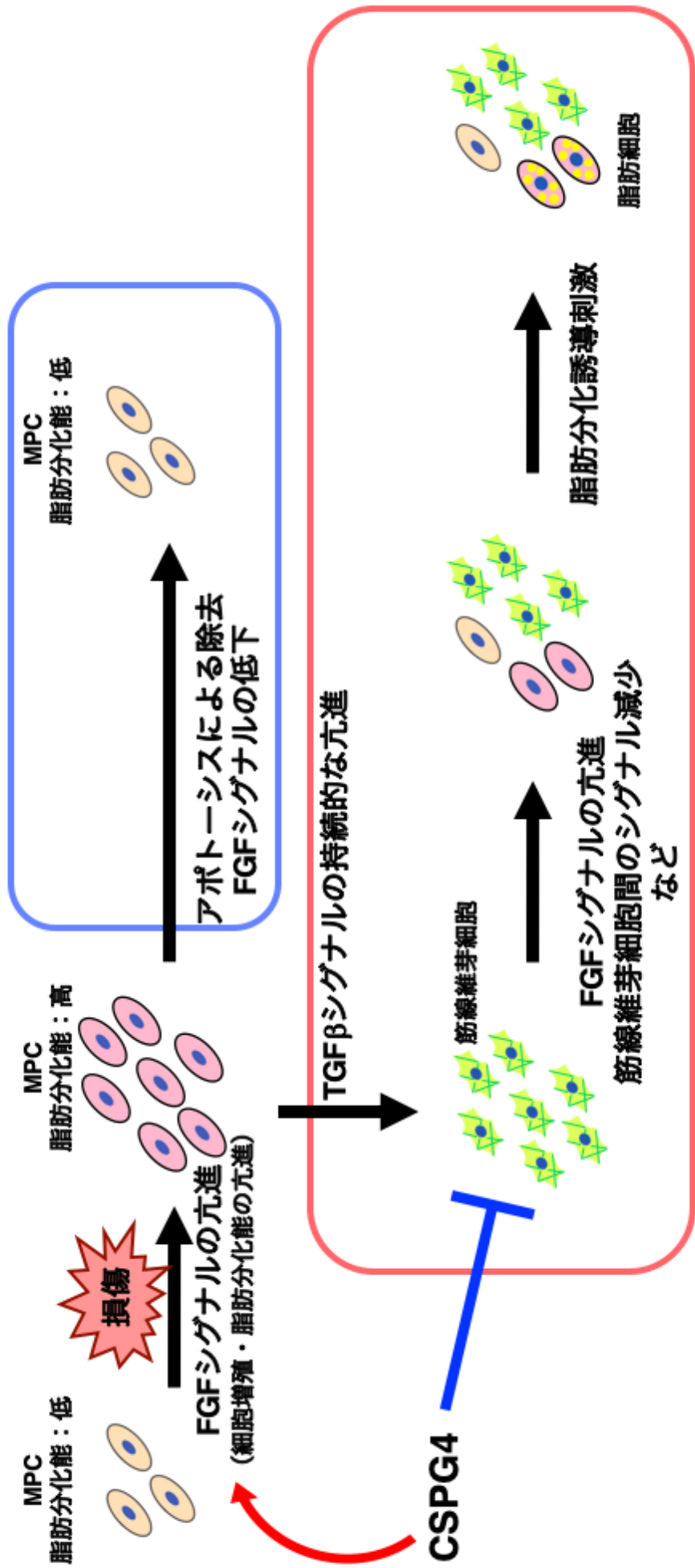
MPC の周囲にある筋線維タイプによって MPC の細胞膜表面に発現する CSPG4 の機能が変わる機序としてまず考えられる可能性は、CSPG4 と結合する分子の発現量が筋線維タイプの違いによって異なることである。これまでに CSPG4 分子と結合することが知られている分子では、bFGF が速筋よりも遅筋で発現が多いことが報告されている (Anderson et al., 1991)。また、筋線維タイプの違いによって CSPG4 分子の構造に違いが生じ、CSPG4 の機能が変化する可能性も考えられる。CSPG4 は MMP による切断を受け、細胞膜表面から遊離することが報告されている (Nishiyama et al., 1995 ; Muir et al., 2002 ; Morgenstern et al., 2003 ; Joo et al., 2014 ; Nishihara et al., 2014 ; Sakry et al., 2014)。速筋線維と遅筋線維では、発現する MMP の種類や活性状

態に違いがあるため (Lluri et al., 2006 ; Dehmel et al., 2008 ; Zimowska et al., 2008)、骨格筋の種類によって異なる切断型の CSPG4 が産生されている可能性がある。また、CSPG4 分子の D2 ドメインに位置する 999 番目のセリンはコンドロイチン硫酸鎖の修飾を受ける (Stallcup, 2002) が、筋線維タイプの違いが CSPG4 の糖鎖修飾に影響を与えている可能性も考えられる。以上を踏まえると、骨格筋の種類による CSPG4 の機能の違いの解明には、CSPG4 と結合する分子の発現や CSPG4 の構造にも着目して取り組む必要があると考えられる。

## まとめ

本研究では、従来、線維芽細胞や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、CSPG4 が FGF のプライミング効果を調節することで脂肪分化を促進する機能や、筋線維芽細胞の過剰活性化を抑制する機能を有する可能性を示した。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するとともに、その治療法の確立にも寄与するものであると期待している。

# 正常骨格筋における一過的損傷



**Fig. 4** 筋損傷後の骨格筋 MPC の分化機構と CSPG4 による MPC の分化制御  
 骨格筋が損傷されると MPC は増殖し、FGF シグナルによって脂肪分化能が高まる。増殖した MPC は正常な骨格筋ではアポトーシスによって除去されるか、もしくは FGF シグナルの低下によって脂肪分化能が低下した静止状態に戻る。DMD などの慢性的な損傷の場合には、TGFβシグナルが持続的に亢進しているため、MPC は筋線維芽細胞に分化する。筋線維芽細胞は FGF シグナルの亢進や筋線維芽細胞間のシグナル減少によって未分化 MPC 状態に戻り、脂肪分化誘導刺激を受けることで脂肪細胞へと分化する。  
 MPC 細胞膜表面の CSPG4 は FGF シグナルによる細胞増殖や脂肪分化能の亢進 (FGF のプライミング効果) を促進する。一方で、筋線維芽細胞の過剰活性化を抑制する。

## 参考文献

Allen, R.E., and Boxhorn, L.K. (1989). Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J. Cell. Physiol.* *138*, 311–315.

Anderson, J.E., Liu, L., and Kardami, E. (1991). Distinctive patterns of basic fibroblast growth factor (bFGF) distribution in degenerating and regenerating areas of dystrophic (mdx) striated muscles. *Dev. Biol.* *147*, 96–109.

Arsic, N., Zacchigna, S., Zentilin, L., Ramirez-Correa, G., Pattarini, L., Salvi, A., Sinagra, G., and Giacca, M. (2004). Vascular endothelial growth factor stimulates skeletal muscle regeneration in Vivo. *Mol. Ther.* *10*, 844–854.

Aumailley, M., Krieg, T., Razaka, G., and Mullert, P.K. (1982). Influence of cell density on collagen biosynthesis in fibroblast cultures. 206.

Banks, G.B., and Chamberlain, J.S. (2008). *The Value of Mammalian Models for Duchenne Muscular Dystrophy in Developing Therapeutic Strategies* (Elsevier Inc.).

Barritt, D.S., Pearn, M.T., Zisch, A.H., Lee, S.S., Javier, R.T., Pasquale, E.B., and Stallcup, W.B. (2000). The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cytoplasmic ligand for the membrane-spanning proteoglycan NG2. *J. Cell. Biochem.* *79*, 213–224.

Bentzinger, C.F., Wang, Y.X., and Rudnicki, M.A. (2012). Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a008342–a008342.

Bernasconi, P., Torchiana, E., Confalonieri, P., Brugnoli, R., Barresi, R., Mora, M., Cornelio, F., Morandi, L., and Mantegazza, R. (1995). Expression of transforming growth factor-beta 1 in dystrophic patient muscles correlates with fibrosis. Pathogenetic role of a fibrogenic cytokine. *J. Clin. Invest.* *96*, 1137–1144.



Biname, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., and Trotter, J. (2013). NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins. *J. Neurosci.* *33*, 10858–10874.

Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Enikolopov, G.N., Mintz, A., and Delbono, O. (2013a). Role of Pericytes in Skeletal Muscle Regeneration and Fat Accumulation. *Stem Cells Dev.* *22*, 2298–2314.

Birbrair, A., Zhang, T., Wang, Z.-M., Messi, M.L., Mintz, A., and Delbono, O. (2013b). Type-1 pericytes participate in fibrous tissue deposition in aged skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Physiol.* *305*, C1098–C1113.

Bruno, G., Cencetti, F., Pertici, I., Japtok, L., Bernacchioni, C., Donati, C., and Bruni, P. (2015). CTGF/CCN2 exerts profibrotic action in myoblasts via the up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 signaling axis: Implications in the action mechanism of TGF $\beta$ . *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 194–202.

Burg, M.A., Tillet, E., Timpl, R., and Stallcup, W.B. (1996). Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J. Biol. Chem.* *271*, 26110–26116.

Canty, E.G., and Kadler, K.E. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* *118*, 1341–1353.

Cao, Z., Umek, R.M., and McKnight, S.L. (1991). Regulated expression of three C/EBP isoforms during adipose conversion of 3T3-L1 cells. *Genes Dev.* *5*, 1538–1552

Cattaruzza, S., Ozerdem, U., Denzel, M., Ranscht, B., Bulian, P., Cavallaro, U., Zanocco, D., Colombatti, A., Stallcup, W.B., and Perris, R. (2013). Multivalent proteoglycan modulation of FGF mitogenic responses in perivascular cells. *Angiogenesis* *16*, 309–327.

Chang, Y., She, Z.-G., Sakimura, K., Roberts, A., Kucharova, K., Rowitch, D.H., and Stallcup, W.B. (2012). Ablation of NG2 proteoglycan leads to deficits in brown fat function and to adult onset obesity. *PLoS One* 7, e30637.

Chargé, S.B.P., and Rudnicki, M. a (2004). Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209–238.

Chatterjee, N., Stegmüller, J., Schätzle, P., Karram, K., Koroll, M., Werner, H.B., Nave, K.A., and Trotter, J. (2008). Interaction of syntenin-1 and the NG2 proteoglycan in migratory oligodendrocyte precursor cells. *J. Biol. Chem.* 283, 8310–8317.

Chen, P.Y., Qin, L., Li, G., Tellides, G., and Simons, M. (2016). Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGFβ)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation. *Sci. Rep.* 6, 1–11.

Cholok, D., Lee, E., Lisiecki, J., Agarwal, S., Loder, S., Ranganathan, K., Qureshi, A.T., Davis, T.A., and Levi, B. (2017). Traumatic muscle fibrosis: From pathway to prevention. *J. Trauma Acute Care Surg.* 82, 174–184.

Cooper, R.N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., and Butler-Browne, G.S. (1999). In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 1), 2895–2901.

Cornelison, D.D., and Wold, B.J. (1997). Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells. *Dev. Biol.* 191, 270–283.

Cushing, M.C., Mariner, P.D., Liao, J.-T., Sims, E.A., and Anseth, K.S. (2008). Fibroblast growth factor represses Smad-mediated myofibroblast activation in aortic valvular interstitial cells. *FASEB J.* 22, 1769–1777.

Dehmel, T., Goebel, H.H., Hartung, H.P., Lehmann, H., Wiendl, H., and Kieseier, B.C. (2008). The metalloproteinase-disintegrin ADAM10 is exclusively expressed by type I muscle fibers. *Muscle and Nerve* 38, 1049–1051.

Desai, V.D., Hsia, H.C., and Schwarzbauer, J.E. (2014). Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9, e86865.

DiMario, J., Buffinger, N., Yamada, S., and Strohman, R.C. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science* 244, 688–690.

DO, M.-K.Q., Suzuki, T., Gerelt, B., Sato, Y., Mizunoya, W., Nakamura, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J.E., and Tatsumi, R. (2012). Time-coordinated prevalence of extracellular HGF, FGF2 and TGF- $\beta$ 3 in crush-injured skeletal muscle. *Anim. Sci. J.* 83, 712–717.

Edlund, S., Landström, M., Heldin, C.-H., and Aspenström, P. (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell* 13, 902–914.

Estrada, B., Gisselbrecht, S.S., and Michelson, A.M. (2007). The transmembrane protein Perdido interacts with Grip and integrins to mediate myotube projection and attachment in the *Drosophila* embryo. *Development* 134, 4469–4478.

Eyre, D.R., Paz, M.A., and Gallop, P.M. (1984). Cross-linking in collagen and elastin. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 717–748.

Fang, X., Burg, M. a, Barritt, D., Dahlin-Huppe, K., Nishiyama, a, and Stallcup, W.B. (1999). Cytoskeletal reorganization induced by engagement of the NG2 proteoglycan leads to cell spreading and migration. *Mol. Biol. Cell* 10, 3373–3387.

Ferraro, F., Celso, C. Lo, and Scadden, D. (2010). Adult stem cells and their niches. *Adv. Exp. Med. Biol.* *695*, 155–168.

Fujii, W., Kawasaki, K., Sugiura, K., and Naito, K. (2013). Efficient generation of large-scale genome-modified mice using gRNA and CAS9 endonuclease. *Nucleic Acids Res.* *41*, e187.

Fukushima, K., Nakamura, A., Ueda, H., Yuasa, K., Yoshida, K., Takeda, S., and Ikeda, S.I. (2007). Activation and localization of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the skeletal muscle of the muscular dystrophy dog (CXMDJ). *BMC Musculoskelet. Disord.* *8*, 1–11.

Gaeta, M., Messina, S., Mileto, A., Vita, G.L., Ascenti, G., Vinci, S., Bottari, A., Vita, G., Settineri, N., Bruschetta, D., Racchiusa, S., and Minutoli, F. (2012). Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: Evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments preliminary experience. *Skeletal Radiol.* *41*, 955–961.

Garrison, G., Huang, S.K., Okunishi, K., Scott, J.P., Penke, L.R.K., Scruggs, A.M., and Peters-Golden, M. (2013). Reversal of myofibroblast differentiation by prostaglandin E2. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* *48*, 550–558.

Georges, P.C., Hui, J.J., Gombos, Z., McCormick, M.E., Wang, A.Y., Uemura, M., Mick, R., Janmey, P.A., Furth, E.E., and Wells, R.G. (2007). Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition: implications for fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* *293*, G1147-1154.

Goretzki, L., Burg, M.A., Grako, K.A., and Stallcup, W.B. (1999). High-affinity Binding of Basic Fibroblast Growth Factor and Platelet-derived Growth Factor-AA to the Core Protein of the NG2 Proteoglycan. *J. Biol. Chem.* *274*, 16831–16837.

Grako, K.A., and Stallcup, W.B. (1995). Participation of the NG2 proteoglycan in rat aortic smooth muscle cell responses to platelet-derived growth factor. *Exp. Cell Res.* 221, 231–240.

Grako, K.A., Ochiya, T., Barritt, D., Nishiyama, A., and Stallcup, W.B. (1999). PDGF  $\alpha$ -receptor is unresponsive to PDGF-AA in aortic smooth muscle cells from the NG2 knockout mouse. *J. Cell Sci.* 112, 905–915.

Gros, J., Manceau, M., Thomé, V., and Marcelle, C. (2005). A common somitic origin for embryonic muscle progenitors and satellite cells. *Nature* 435, 954–958.

Gutpell, K.M., and Hoffman, L.M. (2015). VEGF induces stress fiber formation in fibroblasts isolated from dystrophic muscle. *J. Cell Commun. Signal.* 353–360.

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J.H., Edmondson, D.G., Venuti, J.M., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1993). Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364, 501–506.

Heredia, J.E., Mukundan, L., Chen, F.M., Mueller, A. a, Deo, R.C., Locksley, R.M., Rando, T.A, and Chawla, A. (2013). Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. *Cell* 153, 376–388.

Honda, E., Park, A., Yoshida, K., Tabuchi, M., and Munakata, H. (2013). Myofibroblasts: Biochemical and Proteomic Approaches to Fibrosis. *Tohoku J Exp Med* 67–73.

Hwangbo, C., Tae, N., Lee, S., Kim, O., Park, O.K., Kim, J., Kwon, S.-H.H., and Lee, J.-H.H. (2015). Syntenin regulates TGF- $\beta$ 1-induced Smad activation and the epithelial-to-mesenchymal transition by inhibiting caveolin-mediated TGF- $\beta$  type I receptor internalization. *Oncogene* 35, 389–401.

Iida, J., Pei, D., Kang, T., Simpson, M.A., Herlyn, M., Furcht, L.T., and McCarthy, J.B. (2001). Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan Regulates Matrix

Metalloproteinase-dependent Human Melanoma Invasion into Type I Collagen. *J. Biol. Chem.* *276*, 18786–18794.

Iida, J., Wilhelmson, K.L., Ng, J., Lee, P., Morrison, C., Tam, E., Overall, C.M., and McCarthy, J.B. (2007). Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochem. J.* *403*, 553–563.

Järvinen, T.A.H., Józsa, L., Kannus, P., Järvinen, T.L.N., and Järvinen, M. (2002). Organization and distribution of intramuscular connective tissue in normal and immobilized skeletal muscles. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *23*, 245–254.

Jerkovic, R., Argentini, C., Serrano-Sanchez, A., Cordonnier, C., and Schiaffino, S. (1997). Early myosin switching induced by nerve activity in regenerating slow skeletal muscle. *Cell Struct. Funct.* *22*, 147–153.

Jirmanová, I., and Thesleff, S. (1972). Ultrastructural study of experimental muscle degeneration and regeneration in the adult rat. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* *131*, 77–97.

Joe, A.W.B., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A., and Rossi, F.M.V. (2010). Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* *12*, 153–163.

Jones, L.L., Sajed, D., and Tuszynski, M.H. (2003). Axonal regeneration through regions of chondroitin sulfate proteoglycan deposition after spinal cord injury: a balance of permissiveness and inhibition. *J. Neurosci.* *23*, 9276–9288.

Joo, N.E., Miao, D., Bermúdez, M., Stallcup, W.B., and Kapila, Y.L. (2014). Shedding of NG2 by MMP-13 Attenuates Anoikis. *DNA Cell Biol.* *33*, 1–9.

Kassar-Duchossoy, L., Giaccone, E., Gayraud-morel, B., Jory, A., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2005). Pax3 / Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. 1426–1431.

Kelly de Abreu, D., Lessa, T., Bertassoli, B., Zomer, H., Fratini, P., Elisabete Alves de Lima Will, S., Rici, R., Agostinho da Silva, R., Neto, A., Miglino, M., and Ambrosio, C. (2012). Picrosirius Staining for Dystrophic Animal Models of Diaphragm Morphology. In *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology*, A. Méndez-Vilas, ed. (Formatex Research Center), pp. 28–32.

Kherif, S., Lafuma, C., Dehaupas, M., Lachkar, S., Fournier, J.G., Verdière-Sahuqué, M., Fardeau, M., and Alameddine, H.S. (1999). Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in regenerating skeletal muscle: A study in experimentally injured and mdx muscles. *Dev. Biol.* 205, 158–170.

Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Cirak, S., Glover, A., Guglieri, M., Feng, L., Hollingsworth, K.G., Hunt, D., Jungbluth, H., Roper, H.P., Quinlivan, R.M., Gosalakal, J.A., Jayawant, S., Nadeau, A., Hughes-Carre, L., Manzur, A.Y., Mercuri, E., Morgan, J.E., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Rutherford, M., and Muntoni, F. (2011). Muscle histology vs MRI in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* 76, 346–353.

Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228.

Kovanen, V. (2002). Intramuscular extracellular matrix: Complex environment of muscle cells. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 30, 20–25.

Lakshmi, S.P., Reddy, A.T., and Reddy, R.C. (2017). Transforming Growth Factor  $\beta$  Suppresses Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Expression via Both SMAD Binding and Novel TGF- $\beta$  Inhibitory Elements. *Biochem. J.* 474, 1531–1546.

Larsen, P.H., Wells, J.E., Stallcup, W.B., Opdenakker, G., and Yong, V.W. (2003). Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *J. Neurosci.* *23*, 11127–11135.

Lei, H., Leong, D., Smith, L.R., and Barton, E.R. (2013). Matrix metalloproteinase 13 is a new contributor to skeletal muscle regeneration and critical for myoblast migration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *305*, C529–C538.

Lemos, D.R., Babaeijandaghi, F., Low, M., Chang, C.K., Lee, S.T., Fiore, D., Zhang, R.H., Natarajan, A., Nedospasov, S.A., and Rossi, F.M.V. (2015). Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* *21*, 786–794.

Lieber, R.L., and Ward, S.R. (2013). Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 4. Structural and functional consequences of skeletal muscle fibrosis. *AJP Cell Physiol.* *305*, C241–C252.

Liu, F., Mih, J.D., Shea, B.S., Kho, A.T., Sharif, A.S., Tager, A.M., and Tschumperlin, D.J. (2010). Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression. *J. Cell Biol.* *190*, 693–706.

Lluri, G., Langlois, G.D., McClellan, B., Soloway, P.D., and Jaworski, D.M. (2006). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a beta1 integrin-mediated mechanism. *J. Neurobiol.* *66*, 1365–1377.

Lynch, M.D., and Watt, F.M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J. Clin. Invest.* *128*, 26–35.

Makagiansar, I.T., Williams, S., Mustelin, T., and Stallcup, W.B. (2007). Differential phosphorylation of NG2 proteoglycan by ERK and PKC $\alpha$  helps balance cell proliferation and migration. *J. Cell Biol.* *178*, 155–165.



Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* *339*, 823–826.

Maltseva, O., Folger, P., Zekaria, D., Petridou, S., and Masur, S.K. (2001). Fibroblast growth factor reversal of the corneal myofibroblast phenotype. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 2490–2495.

Mann, C.J., Perdiguero, E., Kharraz, Y., Aguilar, S., Pessina, P., Serrano, A.L., and Muñoz-Cánoves, P. (2011). Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. *Skelet. Muscle* *1*, 21.

Marinkovic, M., Sacco, F., Spada, F., Petrilli, L.L., Fuoco, C., Micarelli, E., Pavlidou, T., Castagnoli, L., Mann, M., Gargioli, C., and Cesareni, G. (2017). Skeletal muscle fibro-adipogenic progenitors of dystrophic mice are insensitive to NOTCH-dependent regulation of adipogenesis. *BioRxiv* 223370.

Masur, S.K., Dewal, H.S., Dinh, T.T., Erenburg, I., and Petridou, S. (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 4219–4223.

Mathew, S.J., Hansen, J.M., Merrell, A.J., Murphy, M.M., Lawson, J.A., Hutcheson, D.A., Hansen, M.S., Angus-Hill, M., and Kardon, G. (2011). Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development* *138*, 371–384.

Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* *9*, 493–495.

Morgenstern, D.A., Asher, R.A., Naidu, M., Carlstedt, T., Levine, J.M., and Fawcett, J.W. (2003). Expression and glycanation of the NG2 proteoglycan in developing, adult, and damaged peripheral nerve. *Mol. Cell. Neurosci.* *24*, 787–802.

Muir, E.M., Adcock, K.H., Morgenstern, D.A., Clayton, R., Von Stillfried, N., Rhodes, K., Ellis, C., Fawcett, J.W., and Rogers, J.H. (2002). Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Mol. Brain Res.* *100*, 103–117.

Murakami, Y., Yada, E., Nakano, S., Miyagoe-Suzuki, Y., Hosoyama, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2011). Establishment of bipotent progenitor cell clone from rat skeletal muscle. *Anim. Sci. J.* *82*, 764–772.

Nabeshima, Y., Hanaoka, K., Hayasaka, M., Esumi, E., Li, S., Nonaka, I., and Nabeshima, Y.I. (1993). Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* *364*, 532–535.

Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., Naito, K., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* *4*, 5635.

Nakano, S., Nakamura, K., Teramoto, N., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2016). Basic fibroblast growth factor is pro-adipogenic in rat skeletal muscle progenitor clone, 2G11 cells. *Anim. Sci. J.* *87*, 99–108.

Needleman, B.W., Choi, J., Burrows-Mezu, A., and Fontana, J.A. (1990). Secretion and binding of transforming growth factor  $\beta$  by scleroderma and normal dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum.* *33*, 650–656.

Nishihara, T., Remacle, A.G., Angert, M., Shubayev, I., Shiryayev, S.A., Liu, H., Dolkas, J., Chernov, A. V, Strongin, A.Y., and Shubayev, V.I. (2015). Matrix metalloproteinase-14 both sheds cell surface neuronal glial antigen 2 (NG2) proteoglycan on macrophages and governs the response to peripheral nerve injury. *J. Biol. Chem.* *290*, 3693–3707.

Nishiyama, A., Dahlin, K.J., Prince, J.T., Johnstone, S.R., and Stallcup, W.B. (1991). The primary structure of NG2, a novel membrane-spanning proteoglycan. *J. Cell Biol.* *114*, 359–371.

Nishiyama, A., Lin, X.H., Giese, N., Heldin, C.H., and Stallcup, W.B. (1996). Interaction between NG2 proteoglycan and PDGF alpha-receptor on O2A progenitor cells is required for optimal response to PDGF. *J. Neurosci. Res.* *43*, 315–330.

Nishiyama, A., Lin, X., and Stallcup, W. (1995). Generation of truncated forms of the NG2 proteoglycan by cell surface proteolysis. *Mol. Biol. Cell* *6*, 1819–1832.

Noizet, M., Lagoutte, E., Gratigny, M., Bouschbacher, M., Lazareth, I., Roest Crollius, H., Darzacq, X., and Dugast-Darzacq, C. (2016). Master regulators in primary skin fibroblast fate reprogramming in a human ex vivo model of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* *24*, 247–262.

Nummenmaa, E., Hämäläinen, M., Moilanen, T., Vuolteenaho, K., and Moilanen, E. (2015). Effects of FGF-2 and FGF receptor antagonists on MMP enzymes, aggrecan, and type II collagen in primary human OA chondrocytes. *Scand. J. Rheumatol.* *44*, 321–330.

Ott, M., Bober, E.V.A., Lyons, G., and Arnold, H. (2000). Early expression of the myogenic regulatory gene, *myf-5*, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo. *1107*, 1097–1107.

Ozerdem, U., and Stallcup, W.B. (2004). Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis* *7*, 269–276.

Perez-Moreno, J.J., Bischoff, M., Martin-Bermudo, M.D., and Estrada, B. (2014). The conserved transmembrane proteoglycan Perdido/Kon-tiki is essential for myofibrillogenesis and sarcomeric structure in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* *127*, 3162–3173.

Pessina, P., Cabrera, D., Morales, M., Riquelme, C.A., Gutiérrez, J., Serrano, A.L., Brandan, E., and Muñoz-Cánoves, P. (2014). Novel and optimized strategies for inducing fibrosis in vivo: focus on Duchenne Muscular Dystrophy. *Skelet. Muscle* 4, 7.

Petridou, S., Maltseva, O., Spanakis, S., and Masur, S.K. (2000). TGF- $\beta$  Receptor Expression and Smad2 Localization Are Cell Density Dependent in Fibroblasts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 89–95.

Petrini, S., Tessa, A., Carrozzo, R., Verardo, M., Pierini, R., Rizza, T., and Bertini, E. (2003). Human melanoma/NG2 chondroitin sulfate proteoglycan is expressed in the sarcolemma of postnatal human skeletal myofibers: Abnormal expression in merosin-negative and Duchenne muscular dystrophies. *Mol. Cell. Neurosci.* 23, 219–231.

Price, M.A., Colvin Wanshura, L.E., Yang, J., Carlson, J., Xiang, B., Li, G., Ferrone, S., Dudek, A.Z., Turley, E.A., and McCarthy, J.B. (2011). CSPG4, a potential therapeutic target, facilitates malignant progression of melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 24, 1148–1157.

Plikus, M.V., Guerrero-Juarez, C.F., Ito, M., Li, Y.R., Dedhia, P.H., Zheng, Y., Shao, M., Gay, D.L., Ramos, R., Hsi, T.-C., Oh, J.W., Wang, X., Ramirez, A., Konopelski, S.E., Elzein, A., Wang, A., Supapannachart, R.J., Lee, H.-L., Lim, C.H., Nace, A., Guo, A., Treffeisen, E., Andl, T., Ramirez, R.N., Murad, R., Offermanns, S., Metzger, D., Chambon, P., Widgerow, A.D., Tuan, T.-L., Mortazavi, A., Gupta, R.K., Hamilton, B.A., Millar, S.E., Seale, P., Pear, W.S., Lazar, M.A., and Cotsarelis, G. (2017). Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science* 355, 748–752.

Ramos, C., Montaña, M., Becerril, C., Cisneros-Lira, J., Barrera, L., Ruíz, V., Pardo, A., and Selman, M. (2006). Acidic fibroblast growth factor decreases alpha-smooth muscle actin expression and induces apoptosis in human normal lung fibroblasts. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 291, L871-9.

Richardson, T.P., Trinkaus-Randall, V., and Nugent, M.A. (1999). Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *274*, 13534–13540.

Sakry, D., Neitz, A., Singh, J., Frischknecht, R., Marongiu, D., Binamé, F., Perera, S.S., Endres, K., Lutz, B., Radyushkin, K., Trotter, J., and Mittmann, T. (2014). Oligodendrocyte Precursor Cells Modulate the Neuronal Network by Activity-Dependent Ectodomain Cleavage of Glial NG2. *PLoS Biol.* *12*.

Schultz, E., Gibson, M.C., and Champion, T. (1978). Satellite cells are mitotically quiescent in mature mouse muscle: An EM and radioautographic study. *J. Exp. Zool.* *206*, 451–456.

Sorrell, J.M., and Caplan, A.I. (2009). Chapter 4 Fibroblasts-A Diverse Population at the Center of It All. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *276*, 161–214.

Stallcup, W. (2002). The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* *31*, 423–435.

Takegahara, Y., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Nakano, S., and Nishihara, M. (2014). Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner. *Exp. Cell Res.* *324*, 105–114.

Talele, N.P., Fradette, J., Davies, J.E., Kapus, A., and Hinz, B. (2015). Expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* *4*, 1016–1030.

Tan, A.M., Colletti, M., Rorai, A.T., Skene, J.H.P., and Levine, J.M. (2006). Antibodies against the NG2 proteoglycan promote the regeneration of sensory axons within the dorsal columns of the spinal cord. *J. Neurosci.* *26*, 4729–4739.

Taraboletti, G., D'Ascenzo, S., Borsotti, P., Giavazzi, R., Pavan, A., and Dolo, V. (2002). Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 160, 673–680.

Tatsumi, R., Anderson, J.E., Nevoret, C.J., Halevy, O., and Allen, R.E. (1998). HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev. Biol.* 194, 114–128.

Tillet, E., Ruggiero, F., Nishiyama, A., and Stallcup, W.B. (1997). The membrane-spanning proteoglycan NG2 binds to collagens V and VI through the central nonglobular domain of its core protein. *J. Biol. Chem.* 272, 10769–10776.

Tontonoz, P., Hu, E., Graves, R.A., Budavari, A.I., and Spiegelman, B.M. (1994). mPPAR $\gamma$ 2: Tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 8, 1224–1234.

Tontonoz, P., and Spiegelman, B.M. (2008). Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR $\gamma$ . *Annu. Rev. Biochem.* 77, 289–312.

Torriani, M., Townsend, E., Thomas, B.J., Bredella, M.A., Ghomi, R.H., and Tseng, B.S. (2012). Lower leg muscle involvement in Duchenne muscular dystrophy: An MR imaging and spectroscopy study. *Skeletal Radiol.* 41, 437–445.

Ubil, E., Duan, J., Pillai, I.C.L., Rosa-Garrido, M., Wu, Y., Bargiacchi, F., Lu, Y., Stanbouly, S., Huang, J., Rojas, M., Vondriska, T.M., Stefani, E., and Deb, A. (2014). Mesenchymal–endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature* 514, 585–590.

Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Ikemoto-Uezumi, M., Nakatani, M., Morita, M., Yamaguchi, A., Yamada, H., Nishino, I., Hamada, Y., Tsuchida, K. (2014). Identification and characterization of PDGFR $\alpha$ + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death Dis.* 5, e1186.

Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S., and Tsuchida, K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* *12*, 143–152.

Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M.M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., Tsuchida, K., Yamamoto, H., and Fukada, S. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* *124*, 3654–3664.

Venuti, J.M., Morris, J.H., Vivian, J.L., Olson, E.N., and Klein, W.H. (1995). Myogenin Is Required for Late but Not Early Aspects of Myogenesis during Mouse Development. *128*.

Voloshenyuk, T.G., Landesman, E.S., Khoutorova, E., Hart, A.D., and Gardner, J.D. (2011). Induction of cardiac fibroblast lysyl oxidase by TGF- $\beta$ 1 requires PI3K/Akt, Smad3, and MAPK signaling. *Cytokine* *55*, 90–97.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., and Jaenisch, R. (2013). One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/cas-mediated genome engineering. *Cell* *153*, 910–918.

Wang, W.M., Lee, S., Steiglitz, B.M., Scott, I.C., Lebares, C.C., Allen, M.L., Brenner, M.C., Takahara, K., and Greenspan, D.S. (2003). Transforming growth factor- $\beta$  induces secretion of activated ADAMTS-2: A procollagen III N-proteinase. *J. Biol. Chem.* *278*, 19549–19557.

Wu, Z., Rosen, E.D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A.E., McKeon, C., Darlington, G.J., and Spiegelman, B.M. (1999). Cross-regulation of C/EBP $\alpha$  and PPAR $\gamma$  controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol. Cell* *3*, 151–158.

Wynn, T.A. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.* 214, 199–210.

Yablonka-Reuveni, Z., and Rivera, A.J. (1997). Proliferative Dynamics and the Role of FGF2 During Myogenesis of Rat Satellite Cells on Isolated Fibers. *Basic Appl. Myol.* 7, 189–202.

Yamanouchi, K., Nakamura, K., Takegahara, Y., Nakano, S., and Nishihara, M. (2013). Ex vivo bupivacaine treatment results in increased adipogenesis of skeletal muscle cells in the rat. *Anim. Sci. J.* 84, 757–763.

Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67.

You, W.K., Yotsumoto, F., Sakimura, K., Adams, R.H., and Stallcup, W.B. (2014). NG2 proteoglycan promotes tumor vascularization via integrin-dependent effects on pericyte function. *Angiogenesis* 17, 61–76.

Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D., and Phan, S.H. (1994). Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am. J. Pathol.* 145, 114–125.

Zhang, Y.E. (2009). Non-Smad pathways in TGF- $\beta$  signaling. *Cell Res.* 19, 128–139.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. 2747–2761.

Zhou, L., Porter, J.D., Cheng, G., Gong, B., Hatala, D.A., Merriam, A.P., Zhou, X., Rafael, J.A., and Kaminski, H.J. (2006). Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- $\beta$ 1, 2, 3 and T $\beta$ RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* 16, 32–38.



Zimowska, M., Brzoska, E., Swierczynska, M., Streminska, W., and Moraczewski, J. (2008). Distinct patterns of MMP-9 and MMP-2 activity in slow and fast twitch skeletal muscle regeneration in vivo. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 307–314.

杉田秀夫、小澤鉄二郎、埜中征哉（1995）新筋肉病学、南江堂

矢田英理香 2006 博士論文「骨格筋内脂肪蓄積機構に関する研究」

中野真一 2013 博士論文「骨格筋多能性幹細胞の分化制御機構の解明および特異的表面抗原の探索」

杉原英俊 2016 卒業論文「ジストロフィン遺伝子変異ラットの病態悪化に細胞老化が関与する可能性」

## 謝辞

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、いつも温かく見守ってくださるとともに、真摯なご指導・ご鞭撻を賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 西原眞杉教授に深い敬意とともに心からの感謝の意を捧げます。

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、熱心なご指導と厳しくも的確な助言を賜るとともに、筆者の言葉に耳を傾け、思いやりのあるお言葉をかけていただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 山内啓太郎准教授に深い敬意とともに心からの感謝の意を捧げます。本当にありがとうございました。

本研究の遂行および論文の執筆にあたり、研究室生活や研究について細やかな助言とお心遣いを賜りました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 松脇貴志助教に心からの感謝の意を捧げます。

抗原同定の際にご協力いただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科動物細胞制御学研究室 高橋伸一郎教授、伯野史彦助教、尾添淳文氏ならびに東京都医学総合研究所蛋白質代謝研究室 佐伯泰氏、吉原英人氏に心よりお礼申し上げます。

セルソーティングの際にご協力いただいた、東京大学分子細胞生物学研究所発生・再生研究分野 宮島篤教授、宮田奈保子氏、古賀千津子氏に心よりお礼申し上げます。

遺伝子変異ラット作出の際にご協力いただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科応用遺伝学研究室 藤井渉助教に心よりお礼申し上げます。

病理切片の染色の際にご協力いただいた、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医病理学研究室 志賀崇徳氏に心よりお礼申し上げます。

実験手技のご指導をはじめ多大なご協力と励ましの言葉をいただき、筆者の大学生活、研究室生活を豊かなものにしていただきました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室の先輩、後輩の皆様に心よりお礼申し上げます。

筆者とともに実験を行い、研究の楽しさを分かち合ってくださいました、UTokyo Amgen Scholars Program 参加者の Peggie Chien、Michelle Ko、Rakhat Sagynbekkyzy、Linh Chi Dam に心よりお礼申し上げます。

いつでも筆者の意志を尊重し、筆者の大学生活、研究室生活を応援し支えてくれた家族に感謝の意を表します。

最後に、本研究は多くの動物たちの尊い命の犠牲の上に遂行されました。ここに哀悼の意とともに深い感謝の意を捧げます。