

論文の内容の要旨

論文題目 様々な臓器に存在する間質細胞の特異性および普遍性に関する研究

申請者 黒澤珠希

背景

臓器は実質と間質に大別される。これまでの研究において、臓器の特性は主に実質細胞の機能を通じて理解されてきた。例えば、骨格筋や肝臓といった臓器の機能を調べる際には、専ら筋細胞および肝細胞に注目し研究が行われてきた。一方で、間質は実質の足場として臓器の種類によらず類似の存在と見なされ、その機能に関しては十分に研究されてこなかった。臓器の間質は血管構成細胞や血球細胞ならびに線維芽細胞様の間葉系間質細胞など複数種の細胞から成る。このうち血管および血球に関しては血液輸送や免疫応答といった機能が比較的明確である一方、間葉系間質細胞の機能の多くは謎である。

間葉系間質細胞を生体内で見分ける方法は長らく存在せず、ゆえに本細胞を精度高く研究することは困難であった。しかし 2010 年以降、様々な臓器における間葉系間質細胞が共通の細胞表面マーカー platelet derived growth factor receptor α (PDGFR α) により認識できることが明らかになってきた。本マーカーの特異性を利用することで、生体内における間葉系間質細胞の高度な解析が可能となり、2019-2020 年には、PDGFR α 陽性細胞を欠損させたマウスにおいて骨格筋の萎縮および機能低下が生じることが示され、PDGFR α 陽性細胞が筋組織の維持に必須であることが明らかとなった。これは、間葉系間質細胞が実質を維持していることを科学的に立証した貴重な例であり、骨格筋以外の臓器においても「間葉系間質細胞による実質の維持機構」が働いていることを想像させる。しかし、様々な臓器の間葉系間質細胞を体系的に研究した例はこれまでにない。

以上の背景から本研究では、間質の中でも特に謎が残されている間葉系間質細胞に着目することとした。間葉系間質細胞の本質的機能として実質の維持作用を想定し、様々な臓器の間葉系間質細胞の比較解析からその機能解明を目指した。また、臓器の

機能低下の例として老化現象を取り上げ、間葉系間質細胞の加齢変化を解析するアプローチからも、本細胞の持つ臓器維持機能に迫ることを試みた。比較解析の結果、同定された因子の臓器維持における機能的意義の検証においては、近年、その老化がサルコペニアと呼ばれ社会問題となっている骨格筋に焦点を当て解析を行った。

目的

本研究では、様々な臓器の間葉系間質細胞を体系的に比較解析し、その臓器維持に果たす重要性を検証することを目的とした。6 臓器由来 7 種類の PDGFR α 陽性細胞の臓器内局在、in vitro における分化特性、網羅的遺伝子発現プロファイルを比較解析した。網羅的遺伝子発現解析においては老化個体由来 PDGFR α 陽性細胞の解析も実施し、若齢-老化間の比較を加味することで、間葉系間質細胞の臓器維持作用を担う機能的因子の絞り込みを試みた。間葉系間質細胞による臓器維持機構の重要性を実証するため、骨格筋に注目し、比較解析から同定された因子の機能を欠損マウスを用いて解析した。

方法

複数種類の臓器に由来する PDGFR α 陽性細胞を調べ、比較検討し、本細胞の臓器特異性・共通性を精査した。具体的には、マウスの骨格筋、心臓、皮下脂肪、肝臓、肺、および小腸の 6 臓器における PDGFR α 陽性細胞を対象に、その細胞形態、分化能、ならびに遺伝子発現プロファイルの比較解析を、以下の通り実施した。

組織内での局在・細胞形態を正確に捉えるため、各組織の PDGFR α に対するホルマウント免疫染色を行った。2,2'-Thiodiethanol (TDE) を用いて組織を透明化処理し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元イメージングした。

分化能の比較は、各組織から単離した PDGFR α 陽性細胞を用いた培養系にて行った。細胞単離は FACS セルソーターを用いて実施した。分化誘導は 3 系譜の間葉系について行った。TGF- β 1 添加による線維芽細胞分化誘導と、インスリン、デキサメタゾンおよび IBMX 添加による脂肪分化誘導、ならびに BMP-4 添加による骨芽細胞分化誘導を実施した。各分化能は特殊染色によって定量評価した。

網羅的遺伝子発現解析は RNAseq によって行った。RNAseq は若齢および老化マウスの各組織から単離した PDGFR α 陽性細胞に対して実施した。取得した網羅的遺伝子発現データに対して主成分分析 (principal component analysis, PCA) を行うことで、PDGFR α 陽性細胞の臓器特異性を評価した。

続いて、骨格筋に着目して詳細な解析を進めた。RNAseqの結果を用いて、まず若齢と老化マウスにおける筋 PDGFR α 陽性細胞の遺伝子発現を比較した。これにより、若齢時に発現が高く老化により発現の低下する遺伝子群を抽出した。続いて抽出した遺伝子群に関して、他臓器の PDGFR α 陽性細胞における発現遺伝子とその発現レベルを比較し、筋 PDGFR α 陽性細胞にて発現の高い遺伝子群を抽出した。絞り込まれた遺伝子の内、遺伝子 X に注目し、そのノックアウトマウスの骨格筋を解析することで、遺伝子 X の機能的重要性を検証した。

最後に、様々な臓器の PDGFR α 陽性細胞に共通して見られる加齢変化を解析した。RNAseqの結果を用いて、複数種類の臓器の同細胞にて共通の加齢変動を呈した遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群に対して Gene Ontology 解析を実施した。

結果

PDGFR α 陽性細胞は骨格筋、心臓、皮下脂肪、肝臓、肺、および小腸の 6 臓器に共通して、間質にて網状形態を取り、血管周囲に豊富に分布していた。続いて、組織から単離した同細胞を分化誘導した結果、6 臓器全ての PDGFR α 陽性細胞が TGF- β 1 に反応し α SMA 陽性の細胞へと変化した。一方で、BMP-4 による骨分化、および脂肪分化能には由来臓器ごとに著しい差が見られた。さらに網羅的遺伝子発現解析データを用い PCA を実施したところ、PDGFR α 陽性細胞は由来臓器ごとに異なる遺伝子発現プロファイルを持つことが示唆された。以上のことから、PDGFR α 陽性細胞の多臓器間における共通性と臓器特異性が明らかとなった。

続いて、骨格筋に注目して研究を進めた。「方法」にて述べた手順に従って、筋由来の PDGFR α 陽性細胞に特異的で老化により発現低下する遺伝子群 (aging signature) を抽出した。Aging signature に含まれる遺伝子 X のノックアウトマウスを用いて、骨格筋の表現型を解析した。その結果、本ノックアウトマウスは野生型に比べて若齢時に筋重量の低下および筋線維断面積の減少を示し、筋萎縮が生じていることが明らかとなった。これらから、遺伝子 X のコードする分子は PDGFR α 陽性細胞による筋維持機構を担う機能分子であることが示された。

最後に、複数臓器に由来する PDGFR α 陽性細胞に共通して見られる加齢変化も捉えた。Gene Ontology 解析の結果、若い臓器の PDGFR α 細胞では細胞外基質の産生が盛んだが老化によりこれが減少すること、他方、老化により炎症性シグナルや自然免疫応答が高まることが示唆された。

考察

間葉系間質細胞はどの臓器のものも類似の存在であるという通説と一致して、PDGFR α 陽性細胞は、骨格筋、心臓、皮下脂肪、肝臓、肺、および小腸といった複数種類の臓器にて共通した細胞形態や組織内分布、ならびに線維芽細胞への分化能を有していた。一方で、本研究にて実施した骨および脂肪細胞への分化能の評価、および遺伝子プロファイルの結果から、同細胞は由来臓器ごとに異なる臓器固有の特性を持つことも明らかとなった。

また本研究では、骨格筋に着目した解析を通じて、骨格筋の PDGFR α 陽性細胞に特異的で老化により発現の低下する遺伝子群 (aging signature) を見出した。さらに、このうち筋維持機構を担う分子 (遺伝子 X) を同定した。先行研究から、本分子の働きとして正常な細胞外基質形成への寄与が示唆されることから、加齢に伴う本分子の発現低下が、筋組織の間質機能の低下を招きサルコペニア発症の一因となる可能性が考えられた。骨格筋 PDGFR α 陽性細胞の aging signature のうち僅かひとつの因子の欠損で筋萎縮が生じたことは、PDGFR α 陽性細胞の加齢変化がサルコペニアの成因になることを強く示唆する。PDGFR α 陽性細胞はサルコペニアの治療法を確立する上で、重要な標的細胞になると考えられる。

加えて、本研究では様々な臓器由来の PDGFR α 陽性細胞に共通して見られる加齢変化も捉えた。Gene Ontology 解析の結果、この遺伝子発現変化は一般に全身性の加齢変化として知られる細胞外基質の産生低下や慢性炎症といった現象を反映していた。この結果は、発症機序が明らかでない加齢に伴う全身性の虚弱であるフレイルの解明にも、PDGFR α 陽性細胞に関する研究が重要になる可能性を示唆する。

以上のように、本研究は PDGFR α 陽性細胞の臓器特異性および共通性を明らかにした。特に PDGFR α 陽性細胞の加齢変化の解析結果は、現在治療法のないサルコペニア、およびフレイルといった老年症候群の発症機序解明へとつながる可能性がある。併せて本研究は「間質から臓器を理解する」新たな視点を提供しており、今後本研究を起点とした新たな研究展開が期待される。