

博士論文

細胞老化による筋組織の恒常性破綻機構に関する研究

杉原 英俊

目次

序論	4
図表	12
第一章 ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの DMD モデル動物としての妥当性の検討	
第一節 ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの経時的な骨格筋病態の解析	
緒言	16
材料と方法	18
結果	24
考察	27
図表	30
第二節 ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの経時的な心病態の解析	
結果	42
考察	43
小括	44
図表	45
第二章 細胞老化が筋ジストロフィー病態悪化に関与する可能性の検討	
緒言	49
図表	51
材料と方法	52
結果	65
考察	71
図表	77

第三章 老化間葉系前駆細胞による筋ジストロフィーの病態悪化機構の解明

緒言	111
材料と方法	113
結果	121
考察	125
図表	129
総合考察	147
参考文献	150
謝辞	166

序論

骨格筋の構造と機能

骨格筋は生体全体の約 40 %の体積を占める最大の組織であり、多核の筋線維の集簇体として構成され、収縮もしくは弛緩することで機械的な運動を引き起こす。骨格筋の収縮機構の基本単位はサルコメアと呼ばれる構造で、アクチン線維とミオシン線維が交互に配列している。モータータンパク質の一種であるミオシン分子の頭部にはアクチンと結合する機能を持つ領域と ATP を加水分解する機能を持つ領域が存在し、ATP を加水分解することによりミオシン頭部の立体構造が変化し、ミオシンとアクチンの相対的な位置の変化が引き起こされる。これによって骨格筋が収縮し、運動器官としての機能を発揮する (Huxley and Niedergerke, 1954)。

骨格筋におけるジストロフィンの構造と機能

基底膜は筋細胞膜外に存在する厚いシート状の構造物である。筋細胞膜は細胞の内部環境を維持するための脂質二重層からなり、比較的機械的強度が低い (Ozawa, 2010)。骨格筋が収縮する際、筋細胞膜には強い圧力がかかるが、骨格筋はジストロフィンを発現することによって、筋細胞膜を裏打ちし、その機械的強度を補強することで、筋細胞膜を保護している (Fig. 0-1)。

ジストロフィンは X 染色体上に存在する *Dmd* 遺伝子によってコードされるタンパク質であり、アクチン結合ドメイン、ロッドドメイン、システインリッチドメインおよび C 末端ドメインの 4 つの機能的なドメインから構成される (Fig. 0-2A) (Koenig et al., 1988)。ジストロフィンには少なくとも 7 つの組織特異的プロモーターが同定されており、各組織において異なった長さのジストロフィンアイソフォームが発現する (Fig. 0-2B) (Doorenweerd, 2020)。骨格筋と心筋では最大長の 427 kDa のジストロフィンが翻訳され、これが筋細胞内ではアクチン結合ドメインとロッドドメインにおいてアクチン線維に結合する一方 (Rybakova et al., 2000)、筋細胞膜上では C 末端ドメインにおいてサルコグリカン複合体、ジストログリカン複合体と結合する (Ozawa et al., 1999)。C 末端で形成されるこのような複合体はジストロフィン糖タンパク質複合体 (Dystrophin glycoprotein complex: DGC) と呼ばれ、同複合体を介して基底膜を構成するラミニンと結合する。ジストロフィンはこのように基底膜と筋線維細胞骨格を物理的に連絡し、筋収縮時に筋細胞膜に加わる張力を減弱させることで、筋線維の機械的強度を保つ (Ozawa, 2010)。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) とモデル動物

ジストロフィンを欠損する遺伝性疾患として、デュシェンヌ型筋ジストロフィー

(Duchenne Muscular Dystrophy: DMD) が知られている。DMD は新生男児約 3500 人に 1 人が罹患する遺伝性疾患であり、DMD 患者ではジストロフィンの欠損による筋細胞膜の脆弱化に伴って、慢性的に筋損傷が繰り返される。DMD 患者は躯幹・四肢の筋力低下により歩行が困難になり、最終的には横隔膜を含む呼吸筋の損傷によって呼吸困難、心筋の損傷によって心不全に至る。通常、骨格筋は高い再生能を有し、損傷した場合は速やかに再生することで恒常性を維持しているが、DMD では筋線維の壊死・再生が繰り返された結果、再生が壊死に追いつかなくなるといわれている。

近年の人工呼吸器の普及によって、骨格筋機能の低下が直接の死因となるケースは少なくなったが、DMD 患者は心不全が原因となって 40 代までに死亡する。心不全症状を改善するために、これまでにコルチコステロイドやアンジオテンシン変換酵素阻害薬、 β 遮断薬などが用いられており、一定の治療効果は認めるものの、根治的な治療法となるには至っていない (Eagle et al., 2002)。したがって、骨格筋、心筋における病状悪化機序の解明は、それぞれ患者の QOL の改善、延命のために急務である。

DMD の治療法として国内で認可されている薬剤は現在のところステロイドのみである。しかし、近年では様々なアプローチによって治療薬の開発が試みられている。特に最も注目を集めているのは、アンチセンス核酸を用いたエキソンスキップ薬である。これは DMD 患者における変異を持つジストロフィン mRNA に対してアンチセンス核酸を結合させ、スプライシング位置を調節することによって変異を持つエキソンを強制的にスキップし、短縮型のジストロフィンを発現させることを狙った薬剤である。米国では 2017 年にジストロフィン遺伝子のエキソン 51 をターゲットとするエテプリルセン、2019 年にはエキソン 53 をスキップするゴロディルセンが既に承認されている (Dzierlega and Yokota, 2020)。ジストロフィンは 79 のエキソンから構成されるが、中でもエキソン 43-55 は約 68% と多くの患者において変異が報告されており、この部位をホットスポットと呼ぶ (Bladen et al., 2015)。近年では、上述の薬剤のようにホットスポットを標的としたアンチセンス核酸の開発が盛んに行われているが (Echigoya et al., 2019)、現在のところ筋線維におけるジストロフィンの発現回復効率は高くなく、さらにホットスポット以外に変異を持つ患者には奏効しないという課題も残る。

DMD の病態解明ならびに DMD の治療法開発に際して、DMD 疾患モデル動物が重要な役割を果たしてきた。特にマウスモデルである X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) マウスや、イヌのモデルである Canine X-linked muscular dystrophy (CXMD) イヌが広く研究に用いられている。これらのモデル動物はそれぞれ長所と短所を併せ持っている。最も広く用いられる mdx マウスは繁殖・維持が容易である一方、病状が一過性でヒト DMD においてみられる重度の筋病変や線維・脂肪化は観察されず、心不全徴候もみられない (Grady et al., 1997)。一方、CXMD イヌはヒト DMD に類似した重篤な骨格筋、心機能低下を示す (McGreevy et al., 2015) もの、個体差が非常に大きく、また繁殖・飼育に多大な労力を要する。近年ではウサギやブタ、サル DMD モデル動物も作出されており (Chen et al., 2015;

Selsby et al., 2015; Sui et al., 2018)、近い将来各モデル動物を実験目的に合わせて適切に使用できるようになることが期待される。

DMD 患者骨格筋の線維組織及び脂肪組織浸潤とその起源

DMDでは疾患の進行に伴って骨格筋間質の線維組織及び脂肪組織浸潤が顕著になることが知られている。これら線維・脂肪組織の起源を同定しようと、様々な研究がなされてきたが、2010年にマウスにおいて線維芽細胞、脂肪細胞分化能を併せ持つ fibro/adipogenic progenitor cells (FAPs) が発見された (Joe et al., 2010)。FAPs は骨格筋内に存在し、血管内皮細胞のマーカーである CD31 陰性、白血球のマーカーである CD45 陰性、幹細胞マーカーである Sca-1 陽性を示す細胞群として発見されたが、同時期に別のグループがマウスで CD31 陰性、CD45 陰性、Sca-1 陽性、かつ Platelet-derived growth factor receptor α (PDGFR α) 陽性の細胞が高度な脂肪分化能を持つことを明らかにした (Uezumi et al., 2010)。その後、同グループは、この細胞が線維芽細胞への分化能も併せ持つこと (Uezumi et al., 2011) やヒトでも同様の細胞が存在すること (Uezumi et al., 2014) を示し、これを間葉系前駆細胞と名付けた。当研究室においても、ラットヒラメ筋より分離した高度な脂肪分化能を持つ細胞クローン 2G11 細胞の取得に成功している (Murakami et al., 2011)。2G11 細胞の性質をより詳細に調べたところ、2G11 細胞は線維芽細胞への分化能も併せ持ち、ラット間葉系前駆細胞クローンとして位置づけられることが明らかになった (Takeuchi et al., 2016)。さらに、2G11 細胞は細胞膜表面に特異的なマーカーとして Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) を発現することが分かり、ラットにおいては PDGFR α の代わりに CSPG4 を間葉系前駆細胞のマーカーとして用いる事ができる (Takeuchi et al., 2016)。

間葉系前駆細胞は Transforming growth factor β (TGF- β) によって線維芽細胞に分化することがわかっている (Uezumi et al., 2011)。TGF- β は DMD 患者の骨格筋で発現が上昇しており、線維芽細胞の活性化を促進し、コラーゲンなどの膠原線維の産生を亢進させることで、骨格筋内の線維組織沈着の引き金になる。また他にも Fibroblast growth factor (FGF) は線維芽細胞に対して増殖活性を有する因子として発見されたが、筋損傷にともなって発現上昇し、線維芽細胞だけでなく様々な細胞に対する細胞増殖・分化促進作用を持つ。当研究室では、骨格筋由来間葉系前駆細胞クローン 2G11 細胞の脂肪分化能の維持には basic FGF (bFGF) の作用が必要であることを明らかにしている (Nakano et al., 2016)。

筋再生と筋衛星細胞

骨格筋に存在する未分化な細胞として、間葉系前駆細胞の他に筋衛星細胞が存在する (Mauro, 1961)。骨格筋は筋損傷に应答し、速やかに再生することで恒常性を維持している。骨格筋の再生は主に骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞が司っている。筋衛星細胞は筋線維周囲の筋細胞膜と基底膜の間に存在し、通常は静止状態にある。このとき、筋衛星細胞は転写因子である Pax7 や、M-cadherin、Neural cell adhesion molecule (NCAM)、Vascular cell

adhesion molecule-1 (VCAM-1)、Syndecan 3/4 などの表面抗原を特異的に発現するという特徴をもつ。筋損傷に伴って壊死した筋線維がマクロファージによって除去されると、筋衛星細胞は MyoD ファミリー転写因子 (MyoD、Myf5) を発現することで活性化し、筋芽細胞となって分裂・増殖を開始する (Edmondson and Olson, 1989)。増殖した筋芽細胞は Myogenin、MRF4 を発現するようになると互いに融合し、多核の筋管細胞を形成する (Wright et al., 1989)。このような幼若な再生筋線維は胎児型ミオシン重鎖 (Embryonic myosin heavy chain: eMHC) を発現するが、この再生筋線維が成熟し、筋線維径が増大することで、筋再生が完了する (Chal and Pourquie, 2017)。

筋衛星細胞の分化調節

筋衛星細胞は様々な因子によってその分裂・増殖が制御されている。例えば筋損傷時に発現が上昇する成長因子として FGF や Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) があり、これらは筋衛星細胞の持続的な増殖を維持することが知られている (Dimario and Strohman, 1988; Machida and Booth, 2004)。一方、TGF- β は筋損傷時に発現が上昇し、筋衛星細胞に様々な影響を及ぼす。活性化した筋衛星細胞は TGF- β の作用により増殖と融合が抑制されるのに加え (Allen and Boxhorn, 1987)、損傷筋に移植した筋衛星細胞は TGF- β により、その運命が変わり、線維芽細胞様の性質を持つ細胞へと分化することも示されている (Li et al., 2004)。

TGF- β は主に炎症細胞から分泌される液性因子であるが、もともと細胞内では前駆体として産生される。前駆体は N 端に 25 kDa からなる活性型 TGF- β ホモダイマーを有するが、これに Latency associated peptide (LAP) が結合した形を取っており、そのままでは活性を示さない。細胞内において TGF- β /LAP 複合体に Latent TGF- β binding protein (LTBP) が結合し、TGF- β /LAP/LTBP 複合体 (Large latent complex: LLC) を形成することで不活性化状態が保たれており、この状態で細胞外に分泌される。細胞外に分泌された LLC は通常は LTBP を介して細胞外基質中の fibrillin や fibronectin などに結合しているが、炎症細胞から分泌される Matrix metalloproteinase (MMP) や Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX) によって産生される Reactive oxygen species (ROS)、pH の低下等によって分解され、最終的に活性型 TGF- β として解離する (Fig. 0-3) (Robertson et al., 2015; Taylor, 2009)。

筋衛星細胞の数は加齢に伴って減少し、活性化能も低下することから、加齢も筋衛星細胞による骨格筋の恒常性維持を制御する重要な因子の一つであるといえる。骨格筋は加齢に伴って筋量が減少し、筋力低下により身体機能の低下が引き起こされる (サルコペニア) が、近年、加齢に伴う筋衛星細胞の細胞老化がサルコペニアに関与することがわかってきた (Sousa-Victor et al., 2014)。

細胞老化と筋疾患

細胞老化とは細胞が分裂を不可逆的に停止する仕組みであり、継代を繰り返した細胞が分裂を次第に停止する現象から見出された (Hayflick and Moorhead, 1961)。1990 年代後半に

なって継代による分裂過多だけではなく、癌遺伝子の活性化、放射線、及び酸化的ストレスによって、分裂限界以前に細胞老化が誘導できることが明らかになってきた (早期細胞老化: Premature senescence) (Di Leonardo et al., 1994; Lee et al., 1999; Serrano et al., 1997)。老化細胞が分裂を不可逆的に停止する仕組みとして、DNA 損傷応答 (DNA Damage Response: DDR) を介する経路、及び p16^{INK4A} を介する経路などが存在する。分裂過多によるテロメアの短縮や、放射線、酸化的ストレスによって DNA が損傷されると、DDR を介して *Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* 遺伝子上の p19^{ARF} (ヒトでは p14^{ARF}) が転写される。p19 は p53 を分解する E3 ユビキチンリガーゼである Mouse double minute 2 homolog (MDM2) を抑制し、p53 を安定化させる。p53 は転写因子として働き、最終的に細胞分裂に必要な因子である Cyclin dependent kinase (CDK) の阻害因子、p21^{CIP1/Waf1} の発現を誘導することによって細胞分裂を抑制する (Di Micco et al., 2006)。一方、p16 の発現は基本的にはエピジェネティックな制御を受けることが近年の研究でわかってきた。ヒストンメチルトランスフェラーゼである Polycomb Group (PcG) protein が *CDKN2A* 遺伝子座の H3K27 をトリメチル化することによって p16 の発現が抑制されることや、ヒストンアセチルトランスフェラーゼである p300 は転写因子 Sp1 によって *CDKN2A* プロモーター領域に誘導され、H4 のアセチル化によって p16 の発現を亢進させることなどが知られている (Jiao et al., 2018)。p16 は細胞周期抑制因子であり、CyclinD と CDK 4/6 の結合を阻害することによって Rb のリン酸化を抑制し、最終的に細胞周期の進行を停止させる (Denchi et al., 2005)。

細胞は細胞老化に伴って様々な表現型の変化を起こす。上述の不可逆的な分裂停止に加え、細胞の肥大・扁平化などの形態的变化やクロマチンの構造変化 (Senescence associated heterochromatin foci ; SAHF)、 β -galactosidase 活性の上昇 (Senescence associated β -galactosidase activity: SA- β Gal 活性) などがあるが、近年最も注目を集めているのが Senescence associated secretory phenotype (SASP) である。SASP は 2000 年代に、早期細胞老化を起こした細胞培養液中に癌細胞の分裂を促進する因子が含まれていることから発見された (Krtolica et al., 2001)。現在では老化細胞は SASP を獲得することで、炎症性サイトカイン、Matrix Metalloproteinase (MMP) や増殖因子など様々な因子を分泌することがわかっている。特に SASP 獲得によって分泌される因子のうち、Interleukin-6 (IL-6)、TGF- β などは老化細胞自身に自己分泌的に作用し、増殖抑制を維持するとともに周囲の細胞にも働きかけて細胞老化を誘導する作用があると考えられている (Acosta et al., 2013; Kuilman et al., 2008)。

細胞老化にはこれまで完全に特異的なマーカーは同定されておらず、通常複数のマーカーを用いて解析が行われる。例えば、p21 は老化細胞マーカーであるが、骨格筋では筋分化過程においても発現が上昇するため、必ずしも細胞老化特異的なマーカーとはいえない (Halevy et al., 1995)。DNA 損傷のマーカーである γ H2AX もしばしば細胞老化のマーカーとして用いられるが、これはアポトーシスを起こした細胞においても認められる (Rogakou et al., 2000)。最もよく用いられる細胞老化のマーカーは SA- β Gal 活性及び p16 であるが、これらもそれぞれ問題点がある。 β -Gal 活性の上昇は老化細胞で観察されるが、マクロファージ

や破骨細胞は元々 β -Galの活性も高いことから、SA- β Gal染色が偽陽性になることが知られている (Kopp et al., 2007)。p16は細胞老化マーカーとしての特異性が最も高いが、p16と同様にCDK4/6の阻害因子として働くp15^{INK4B}がp16の機能を代償して、p16の発現が認められない老化細胞も存在することが示されている (Krimpenfort et al., 2007)。

このように、老化細胞は特異的なマーカーが存在しないため、*in vivo*での解析は困難を極めてきた。しかし、近年プロテオーム解析などによって細胞老化を起こした細胞において発現上昇する表面抗原 (DEP-1 や β 2-microglobulin など) が明らかになってきており (Althubiti et al., 2014)、生体内における細胞老化に関する研究が発展するのではないかと期待されている。

老化細胞は加齢に伴って体内の様々な組織に蓄積し (Krishnamurthy et al., 2004)、加齢性疾患の発症にも関与する。老化モデルマウスを用いた実験において細胞老化を抑制した時、サルコペニア症状が改善したこと (Baker et al., 2008)、老齢マウスで筋衛星細胞特異的にp16を欠損させたところ、同症状が改善されること (Sousa-Victor et al., 2014) から、骨格筋においてもサルコペニアの進行に細胞老化が関与しており、細胞老化が骨格筋における病態形成にも関与することがわかる。さらに、このような加齢に伴う全身状態の悪化のみならず、細胞老化は病的状態においても誘導され、SASPによって特発性肺線維症、肝線維症、動脈硬化などの様々な炎症性疾患の進行に関与することが近年明らかとなってきた (Childs et al., 2016; Ogrodnik et al., 2017; Schafer et al., 2017)。

DMD患者の骨格筋生検組織を用いた実験で、患者由来骨格筋初代培養細胞中の筋芽細胞の割合が加齢性に減少し、線維芽細胞の割合が増加することが示されている。また、同筋芽細胞の一部は形態学的な変化も示し、通常の筋芽細胞に比べて細胞が肥大・扁平化する。さらにこのような形態変化を起こした細胞は特に分裂能が低いことが明らかになった (Blau et al., 1983)。このような細胞の形態的变化や分裂停止といった特徴は老化細胞の表現型を忠実に反映している。また、DMD患者では、筋の持続的な損傷によって慢性炎症が誘導され、これによって骨格筋中の酸化的ストレスが増加する (Petrillo et al., 2017; Verhaart and Aartsma-Rus, 2019)。骨格筋細胞内の酸化的ストレスは主にNADPH oxidase (NOX) を介して産生されることが知られている (Kozakowska et al., 2015; Whitehead et al., 2010)。NOXは細胞膜上に発現するタンパク質であり、NADPHから電子を酸素に受け渡すことで活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を産生する役割を持つ (Bedard and Krause, 2007)。なかでもNOX-4はTGF- β 、NF- κ Bなどの炎症因子によって発現が調節され、炎症反応によってその発現が亢進する (Chen et al., 2012)。これに加えてDMDでは慢性炎症に伴ってマクロファージや好中球などが骨格筋内に浸潤し、これらの炎症細胞由来の活性酸素種も酸化的ストレスを上昇させる (Kozakowska et al., 2015)。酸化的ストレスは細胞老化の原因のひとつであることから、DMDでは慢性炎症に伴う酸化的ストレスの蓄積が細胞老化を誘導する可能性が考えられる。そこで当研究室ではDMDと細胞老化の関係を明らかにするために、新しくラットに着目し、以下に示すような新規筋ジストロフィーモデル動物の作出を試みた。

CRISPR/Cas 法を用いた新規モデル動物の作出

DMD を研究する上で疾患モデル動物の存在が重要であるが、mdx マウスや CXMD イヌを用いた実験は前述のように課題が残る。

マウスとイヌの中間の身体サイズを持つラットはこれまでヒトの疾病に対する治療法開発研究に用いられてきた利便性の高い実験動物種であり、特に薬効評価や毒性試験に好んで用いられてきた (Jacob, 1999)。これはマウスに比べて身体のサイズが大きく、採血が容易で採血量も確保できたからであると考えられる。一方で、マウスは ES 細胞の培養法や発生工学的手法も確立されているという利点があり、特定の遺伝子座のゲノム編集が容易であったため、様々な遺伝子のノックアウト、ノックインマウスモデルが作出され、マウスを実験動物として使用することが主流になった。マウスとは異なり、ラットでは ES 細胞の培養方法が確立されておらず、特定の遺伝子座を標的としたゲノム編集を行うことは非常に困難であった。しかし近年、新しいゲノム編集技術である CRISPR/Cas 法が注目を集めるようになり、このような状況が変化してきた。これは古細菌の獲得免疫システムである clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) と CRISPR associated nuclease (Cas9) を応用して、短い RNA 合成のみで標的部位に変異を導入できる技術である。CRISPR/Cas 法では protospacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる配列の上流 20 数塩基の標的と相同な配列及び足場 (scaffold) の配列で構成される guide RNA (gRNA) が標的配列に結合し、そこに Cas9 が結合することで標的部位の二本鎖切断を誘導する。この二本鎖切断に伴う DNA 修復機構である非相同末端修復は、修復過程で DNA に高確率に変異を起こすため、標的部位に変異が導入された動物を作出できる。この方法は ES 細胞を用いた方法よりも安価で迅速であり、さらにゲノム編集効率も高く、マウスでは 100%に近い効率で遺伝子欠損した個体を F0 で作出することができる (Fujii et al., 2013)。CRISPR/Cas 法はラットを含めた様々な動物種で応用可能であることが示されており (Li et al., 2013)、近年ではブタ、ウサギ、サルなどげっ歯類に限らない様々な動物種において用いられている。以上の技術を用いて、当研究室では CRISPR/Cas 法を用いて *Dmd* 遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットを作出することに成功した (Nakamura et al., 2014)。同ラットは F0 世代の研究において、12 週齢から骨格筋の線維化や心筋の炎症像を呈するなど、既存のモデル動物に比べて重篤な表現型を持つことが示された。

本研究の目的

上述のように DMD では細胞老化が誘導されている可能性がある。そこで、本研究では第一章において *Dmd* 遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットを系統化し、第一節において骨格筋、第二節において心筋の経時的な機能・病理学的解析を行うことによって同ラットの DMD モデル動物としての妥当性を検討した。第二章では実際に同ラットにおいて細胞老化が疾患の進行に関与するかどうかを検討し、第三章において細胞老化による DMD の病態進

行機序を解明することを本研究の第一の目的とした。以上の病態進行機序の存在が明らかになれば、ベッカー型筋ジストロフィーや、メロシン欠損型筋ジストロフィーなど DMD と同様に慢性炎症を伴う筋疾患一般に同機序が敷衍できる可能性がある。サルコペニアでは既に細胞老化が疾患の進行に関与することが示されており、本研究によって新たに炎症性筋疾患における細胞老化の病態進行機構を解明することで、広く細胞老化による筋組織の恒常性破綻機構を提言し、老化細胞の病態生理学的な意義の解明や筋疾患一般の治療法開発に貢献することを第二の目的とした。

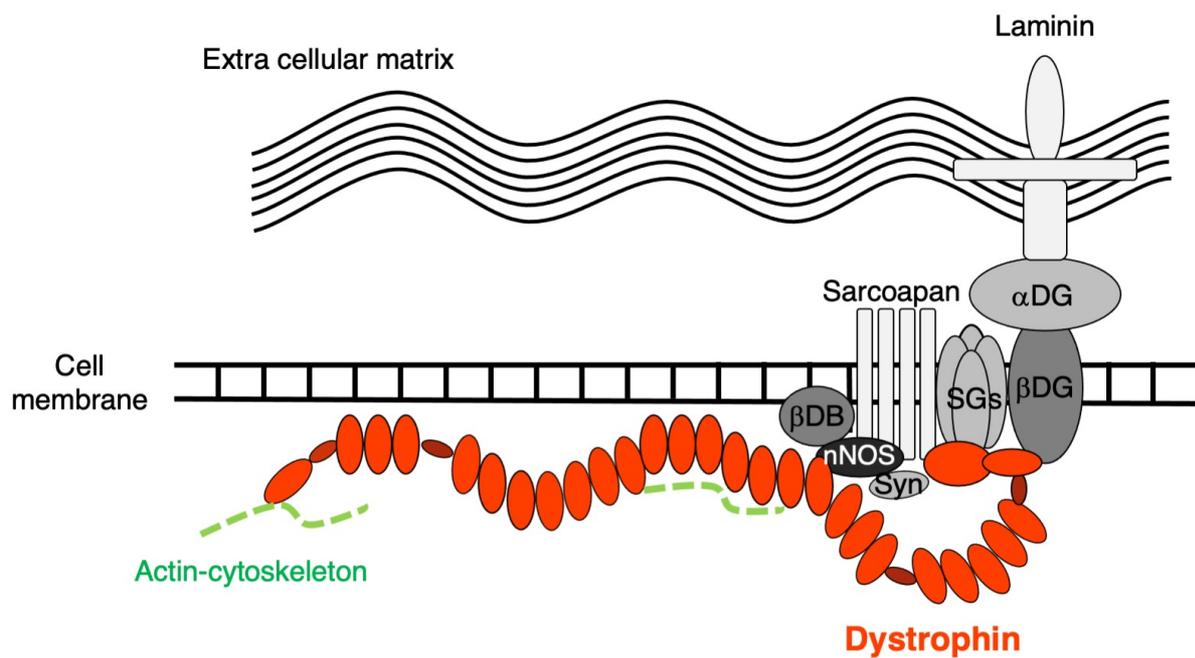
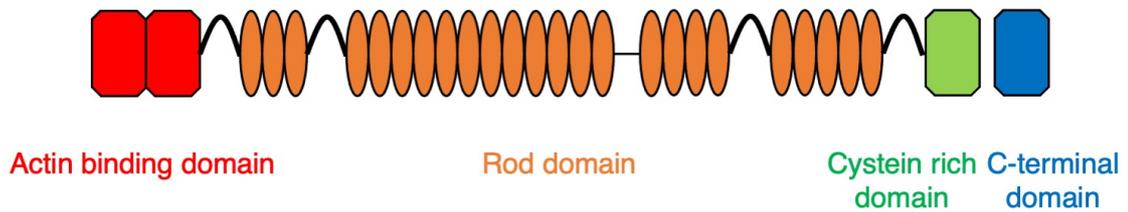


Fig. 0-1 筋組織におけるジストロフィンとジストロフィン糖タンパク質複合体 (Dystrophin glycoprotein complex: DGC)

α DG: α -dystroglycan、 β DG: β -dystroglycan、SG: Sarcoglycan、 β DB: β -dystrobrevin、Syn: Syntrophin、nNOS: neural nitric oxide synthase.

(A)



(B)

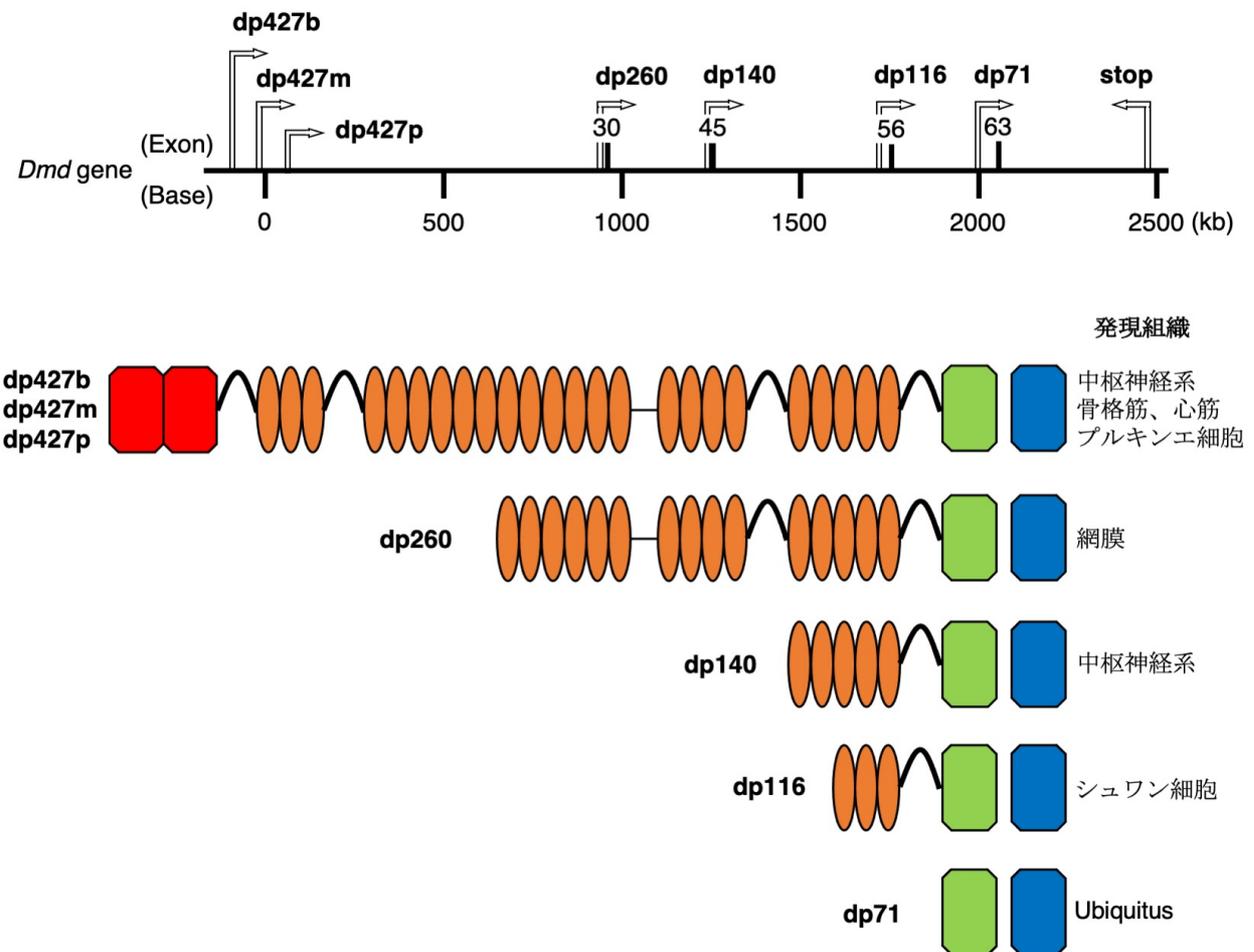


Fig. 0-2 ジストロフィンの分子構造とジストロフィンアイソフォーム

(A) ジストロフィンの分子構造

(B) *Dmd*遺伝子から転写・翻訳されるジストロフィンアイソフォームの転写開始点とその分子構造および主な発現組織

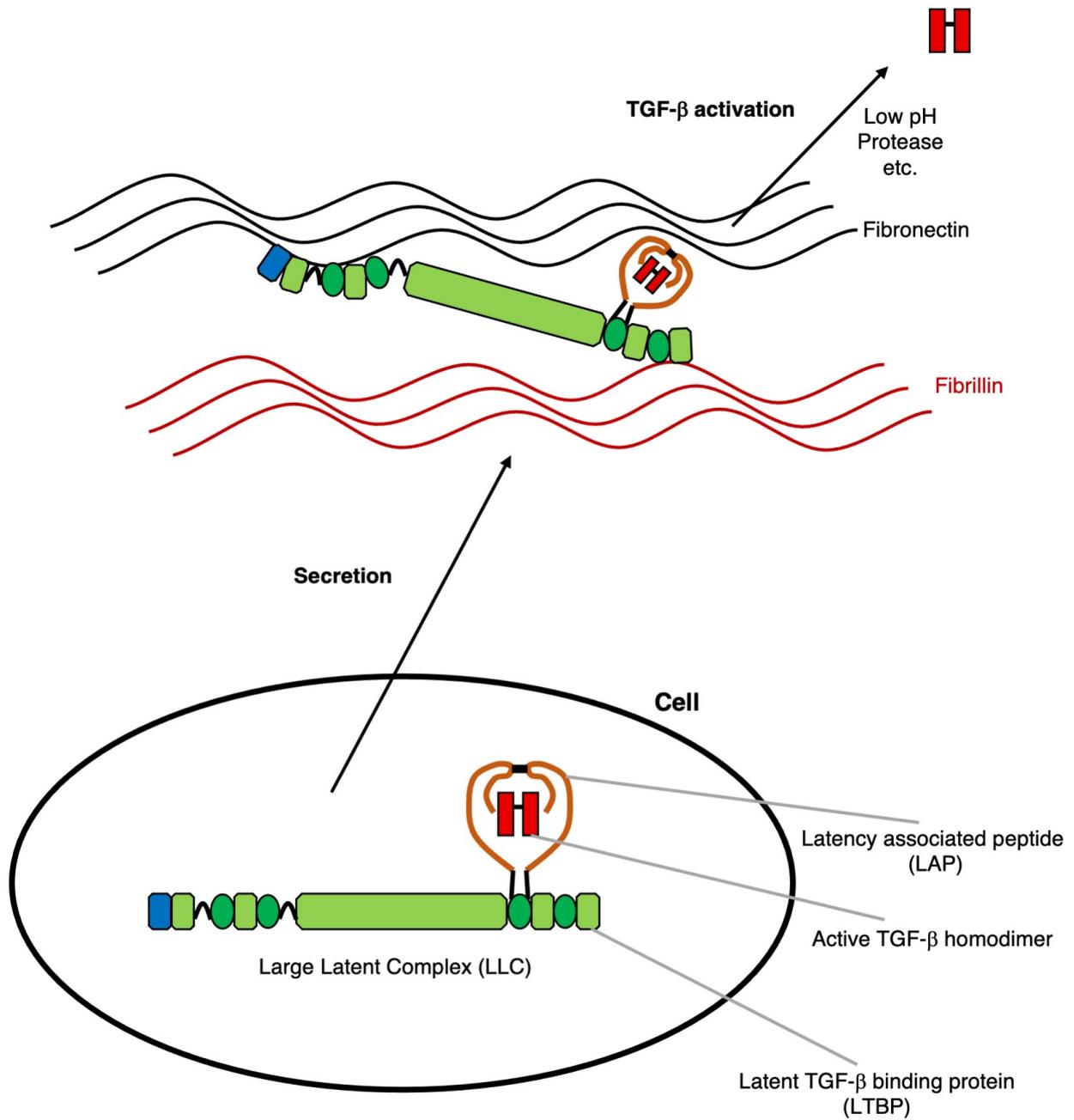


Fig. 0-3 TGF-βの産生、分泌、活性化機構の概要図

第一章

ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの
DMD モデル動物としての妥当性の検討

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はジストロフィン遺伝子の out-of-frame 変異に起因する遺伝性疾患であり、新生男児の約 3500 人に 1 人が罹患する。ジストロフィンタンパク質は筋組織において主に発現し、骨格筋線維や心筋線維のアクチン骨格と筋基底膜を接続することによって筋線維細胞膜を安定化させる役割を担っている (Ryder et al., 2017)。このジストロフィンタンパク質が欠損すると、筋線維が脆弱化し、DMD 患者では慢性的に筋損傷が繰り返される。その結果、患者は筋力の低下によって 8-14 歳までに車椅子が必要になり、最終的には横隔膜の損傷によって呼吸不全や、心筋の傷害によって心不全を呈する (Mercuri and Muntoni, 2013)。

骨格筋は再生能の高い組織であり、損傷を受けた場合には速やかに再生することで恒常性を維持している。筋損傷時には骨格筋特異的幹細胞である筋衛星細胞が活性化し、分裂・増殖を繰り返した後に、互いに融合して幼若な筋線維を形成する。この幼若な筋線維が成熟することによって新しい筋線維が再生される (Yin et al., 2013)。しかし、DMD 患者では筋の再生がうまく行われず、骨格筋間質に重度の線維・脂肪組織浸潤が認められる (Verhaart and Aartsma-Rus, 2019)。近年の研究によって、骨格筋の線維・脂肪化は骨格筋間質に存在する間葉系前駆細胞と呼ばれる細胞を共通の起源とすることが明らかになった (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010; Uezumi et al., 2011)。間葉系前駆細胞は筋の急性損傷時には分裂・増殖の後、筋衛星細胞の分化や、筋の再生を促す働きをもつ (Joe et al., 2010)。一方で、病的な状態では間葉系前駆細胞は線維芽細胞・脂肪細胞に分化し、逆に筋の再生を抑制する (Rao et al., 2013; Uezumi et al., 2010; Uezumi et al., 2011)。

近年の人工呼吸器の普及によって、骨格筋機能の低下が直接の死因となるケースは少なくなかったが、DMD 患者は心不全が原因となって 40 代までに死亡する。心不全を改善するために、これまでにコルチコステロイドやアンジオテンシン変換酵素阻害薬、 β 遮断薬などが用いられており、一定の治療効果は認めるものの、根治的な治療法となるには至っていない (Eagle et al., 2002)。

これまで、DMD の病態解明を目的として様々な DMD モデル動物が作出されてきた。ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つマウスモデル (mdx マウス) は DMD の研究に最も広く用いられている。しかし、mdx マウスは症状が軽症であり、骨格筋の線維・脂肪化が認められず、心機能不全も見られないため、必ずしもヒト DMD の病態を適切に反映しているとはいえない (Faysoil et al., 2013; Grady et al., 1997; Verhaart et al., 2012)。当研究室では 2014 年にジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットを作出した (Nakamura et al., 2014)。この F0 ラットは mdx マウスよりも比較的重度の表現型を示し、12 週齢という早期から骨格筋の線維化が亢進しており、心筋の損傷も認められた。そこで、本研究では F1

で分離した out-of-frame 変異を持つ系統を用いて、第一節においての骨格筋を、第二節において心筋をそれぞれ経時的に機能的・病理学的に解析することで、DMD のモデル動物として有用性を検討することを目的とした。

材料と方法

動物と飼育条件

本研究室では、2014年に Wistar Imamichi ラットを背景とし、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を有するラットを複数作成した。その中から Fig. 1-1-1A に示される変異を持つラットが選択され、ジストロフィン遺伝子にヘテロで変異を有する $X^{Dmd}X$ メスラットに、動物繁殖研究所 (茨城、日本) から購入した野生型の雄を6代以上交配させることによって系統化した (OF ラット)。6代以上の交配によって CRISPR/Cas 法における off-target 効果も減弱されたと考えられる。実験には OF ラットおよび同腹の野生型ラットのオスを用いた。

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) 及び水は自由に摂取させた。全ての実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づき、東京大学動物実験委員会の承認を得て行われた (P18-125)。

遺伝子型の判定 (ジェノタイピング)

出生後、尻尾を先端から 1-2 mm ほど切断し、ジェノタイピングに用いた。これに 180 μl の 50 mM NaOH を加え、 95°C 、10 分間加熱処理した。40 μl の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えたのち遠心 (12,000 rpm、10 分) し、上清を回収した。これを 1-2 μl 用い、KOD FX (東洋紡、大阪、日本) を用いて以下の組成、温度、時間にて PCR 反応を行った。

PCR 反応液の組成

2×PCR buffer	10 μl
2 mM dNTP	4 μl
滅菌超純水	4 μl
Forward Primer	0.6 μl
Reverse Primer	0.6 μl
KOD FX	0.4 μl
Template (DNA)	1-2 μl
Total Volume	約 20 μl

PCR 反応条件

94°C、2分

94°C、10秒

60°C、20秒

68°C、1分 /kb

36 サイクル

PCR に用いたプライマーを下記に示す。Dmd: Forward, 5'-AGTTTC CAT CAA TAG CCA TAC CAAA -3'; Reverse, 5'-TCT CAG TGT ACA AGT GTG ACG AAC A- 3'。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動することによりジェノタイプを判断した。

グリップテスト

前肢の筋力 (kg) をマウス・ラット用握力測定装置 GPM-101B/V (メルクエスト、富山、日本)を用いて計測した。ラットの尻尾を持ち、ラットが T 字グリップを握ったのを確認し、ラットを測定装置に対して水平遠位方向に牽引し、ラットが手を離すまでの最大筋力を記録した。これを連続して 10 回行い、その中で最大の数値を筋力の指標として解析に用いた。

サンプリング (筋組織および血液の採取)

ラットから、血清、心臓、前脛骨筋、ヒラメ筋および大腿四頭筋を採取した。以下にその方法を示す。イソフルランによる吸入麻酔下の動物を開腹し、腹大動脈から全採血を行った。血液を室温で 30 分以上静置したのち遠心し (2,000 rpm、30 分、4°C)、血清を採取した。採取した血清は -20°C で保存した。心臓、前脛骨筋、ヒラメ筋は採取後、周囲の結合組織を取り除いたのち、それぞれの重量を測定した。採取した前脛骨筋を、超純水と混合した TRAGACANTH GUM 粉末 (和光純薬、大阪、日本) を用いてコルク上に固定し、液体窒素で冷却した 2-メチルブタン (和光純薬) 中で急速に凍結させた。採取した大腿四頭筋は、後述するラット骨格筋初代培養細胞の採取に使用した。

組織切片の染色

1. 組織切片の免疫染色

凍結した前脛骨筋を -20°C に設定したクリオスタット (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) 内で 30 分馴致させ、O.C.T.コンパウンド (Tissue-Tek, Sakura Finetek U.S.A, CA, USA) によりコルクごと台に固定し、厚さ 7 μm の凍結切片を作成した。余分な切片は MAS コート付きスライドガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) 上に貼り付け、風乾させたのち、-80°C で保存した。保存した切片は、使用する際には室温に戻し、風乾させた後に実験に用いた。作成した凍結切片を 10 分間風乾後、4%パラホルムアルデヒド (Paraformaldehyde: PFA、和光純薬) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline: PBS) にて 15 分間固定した。PBS により 3 回洗浄したのち、5%正常ヤギ血清 (Normal Goat Serum: NGS, Vector

laboratories, Burlingame, CA, USA) と 0.1%の Triton-X (Sigma, St. Louis, MO, USA)、50 倍希釈した 31% H_2O_2 を含む PBS にて 20 分間ブロッキングし、同時に内因性ペルオキシダーゼを失活させた。洗浄後、5% NGS/PBS で 100 倍に希釈した抗 Embryonic myosin heavy chain (eMHC) マウスモノクローナル抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA, USA)、20 倍に希釈した抗 Utrophin マウスポリクローナル抗体 (Leica, Wetzlar, Germany) を 4°C で一晩反応させた。二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M) (ニチレイバイオサイエンス、東京、日本) を用いて室温で 1 時間反応させた。3,3'-diaminobenzidine (DAB) を用いて、50 mg DAB/ 100 ml PBS 溶液に 50 μ l の 31% H_2O_2 を添加した後に、切片を浸漬して 1-5 分反応させ、褐色の色素沈着を確認した。核の対比染色にはマイヤーヘマトキシリン溶液 (和光純薬) に 5 分反応させ、流水で 5 分洗浄したあとに核が紫色に染色されていることを確認した。エタノール (和光純薬)、キシレン (和光純薬) を用いて脱水・透徹を行った後、切片を Multimount (松浪硝子工業) により封入し、観察を行った。

2. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および Masson's trichrome 染色

東京大学獣医病理学教室において実施した。前脛骨筋凍結切片に対し、HE 染色および Masson's trichrome 染色を施した。また、採取した心臓は、定法に従い厚さ 2 μ m のパラフィン切片を作製し、Masson's trichrome 染色を施した。写真はデジタルカメラ (DP73: Olympus、東京、日本) を搭載した蛍光顕微鏡 (Olympus) を用いて撮影した。線維化面積の定量は、Masson's trichrome 染色を施した切片における写真画像から CellProfiler (Broad Institute, MA, USA) を用いて青色の画素及び切片全体の画像を抽出し、それらの面積を定量したあとに、青色の面積を切片全体の面積で除することによって行った。

ウェスタンブロット

1. 筋組織からのタンパク質抽出

クリオスタットにて薄切した筋切片 (厚さ 7 μ m、約 50 枚) をあらかじめ -20°C に冷却した 1.5 ml 遠心チューブ (Beckman Coulter, CA, USA) に集め、50-200 μ l の RIPA buffer (0.1% SDS、2 mM EDTA、1% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、50 mM NaF、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl) を加え、4°C、15,000 rpm で 30 分間の遠心を行ったのち、上清を別のチューブに回収した。プロテインアッセイ BCA 試薬 (和光純薬) を用いてタンパク質濃度を測定したあと、5-10 μ g/ μ l になるように必要ならば RIPA buffer で希釈し、6x Sample buffer (0.35 M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% Glycerol、3.1% Dithiothreitol) を添加した。沸騰水中で 100°C、5 分加熱処理し、S-S 結合を切断した。

2. SDS-PAGE とブロッティング

サンプルを、SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) に

より分離した。各レーンに 20-25 μg のタンパク質をアプライし、泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS) 中で 150V の低電圧下で約 1 時間泳動した。ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD、Hercules、CA、USA) に転写バッファー (10% メタノール、25 mM Tris、190 mM Glycine) を加え、45 V の定電圧下で一晩ブロッキングを行い、ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへ転写を行った。その後、メンブレンを取り出し、5% スキムミルク/TBS-T (0.1% Tween 20/TBS) に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体には TBS-T で 1000 倍に希釈した抗 Perilipin 抗体 (Cell signaling Technology、MA、USA) を用いて 4°C で一晩反応させた。反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら TBS-T にて 5 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/TBS-T で 8,000 倍希釈した Horseradish Peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Laboratory、MA、USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare、Chalfont Saint Giles、UK) により発光させ、ChemiDoc XRS+システム (BIO-RAD) により画像を取得し、画像処理により各タンパク質の定量を行った。

細胞培養と免疫染色

1. ラット骨格筋初代培養細胞

採取した大腿四頭筋を PBS に浸した。筋に付着している結合組織を除去したのち、10 cm シャーレ (BD Falcon、NJ、USA) に骨格筋を移し、鋏で細かく刻んだ。細切した組織をそれぞれ Protease type XIV : Bacterial (EC、3、4、24、31) from *Streptomyces griseus* (Sigma、最終濃度 1.25 mg/ml) を含む 40 ml の PBS により 37°C で 1 時間酵素処理した。酵素処理終了後、3,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。再び 37°C の PBS を加え攪拌し、1,000 rpm の遠心分離を行い、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 3,000 rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿した細胞を 10% Fetal Bovine Serum/DMEM+ 50 U/ml Penicillin+ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (10% FBS/DMEM+PSG: 通常培地) に懸濁し、70 μm 径の Cell Strainer (BD Falcon) を用いて濾過した。得られた細胞は poly-L-lysine (Sigma) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen) でコートした 48-well プレート (IWAKI、千葉、日本) に、1 個体当たり 2 well になるように播種した。細胞は通常培地にて、37°C、湿度飽和、5%CO₂-95%空気条件下で培養した。培養開始 24 時間後に培地交換を行ったのち、培養開始 48 時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。プレートのコートにあたっては、まず培養表面を poly-L-lysine で 5 分間処理し、滅菌超純水で 3 回洗浄してよく乾燥させた。さらに、0.001%の human plasma fibronectin を含む DMEM で 30 分以上処理し、細胞を播種する直前に吸引除去した。

2. 培養細胞の免疫染色

4% PFA/PBS で各ウェルを満たし、室温で 15 分間反応させることにより、細胞の固定を行った。PBS で 3 回洗浄後、5% NGS + 0.1% Triton-X を含む PBS にて 20 分間ブロッキングした。再度 PBS で洗浄後、一次抗体液を 4°C で一晩反応させた。一次抗体液として、5% NGS/PBS で 100 倍希釈した抗 Pax7 マウスモノクローナル抗体 (Developmental Studies Hybridoma Bank: DSHB, IA, USA)、抗 MyoD マウスモノクローナル抗体 (Novocastra, Wetzlar, Germany) を用いた。反応終了後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体液として 5% NGS/PBS で 500 倍に希釈した Alexa Flour® 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体または Alexa Flour® 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS にて 0.1 µg/ml に希釈した hoechst33258 (同仁化学研究所、熊本、日本) 溶液を 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡下で観察・撮影を行った。画像解析には、Fiji のプラグインである、U-net を用いた Deep learning を使用した (Computer vision group: University of Freiburg) (Falk et al., 2019)。Hoechst を撮影した画像と染色画像を合成したのち、Fiji を用いて陽性核を Annotation し、数枚の教師データを作成した。Google colabatory が提供するクラウド GPU を用いて、Computer vision group が提供するモデルに対して教師データを学習させ、モデルを最適化した。同モデルを用いて各画像から陽性核の数を自動抽出させた。

筋損傷マーカーの測定

1. 血中クレアチンキナーゼ値 (Creatine kinase: CK) の測定

-20°C で保存した血清を融解し、富士ドライケムシステム (富士フィルム、東京、日本) を用いて CK 値を測定した。CK 値が測定範囲を超過している場合は、0.9% 生理食塩水を用いて希釈してから再度測定した。

2. 尿の採取・尿中タイチン値の測定

近年の研究によって、血中のクレアチンキナーゼ値に加えて、尿中タイチン値も筋損傷を反映するマーカーであることが明らかになってきた (Matsuo et al., 2019)。WT、OF ラットを 2-6 時間、ラット用代謝ケージ (TECNIPLAST、VA、Italy) 内で飼育し、尿を採取した。採取した尿は

-20°C で保存し、共同研究先の神戸学院大学総合リハビリテーション学部 核酸創薬研究寄付講座に輸送され、タイチン値を測定した。タイチンの測定には Titin-N Fragment Assay Kit-IBL (免疫生物研究所、群馬、日本) を用いた。クレアチンの測定には LabAssay™ Creatine (和光純薬) を用いた。各個体のタイチン値として、クレアチンによって標準化した値を用いた。

呼吸機能解析

呼吸機能解析には、FinePointe™ Small Animal Whole Body Plethysmography (WBP) system and computerized program (Buxco Systems Inc., NY, USA) を用いた。6、9 ヶ月齢の WT、OF ラットを非麻酔下でチャンバー内に入れ、30 分間各呼吸機能を記録した。ラットが安定した呼吸を行っている約 10 秒間の測定データを呼吸機能の指標として出力した。f は 1 分間

あたりの呼吸数、Enhanced pause (Penh) は気道収縮、Tidal Volume は1回換気量を表す。Penh は、最大呼気流量 (Peak expiratory flow: PEF (mL/sec))、最大吸気流量 (Peak inspiratory flow: PIF (mL/sec))、呼気時間 (Expiratory time: Te (sec))、Relaxation time: Tr (sec) (呼気圧が36%まで減衰するまでの時間) から計算され、 $Penh = (PEF/PIF) \times (Te/Tr - 1)$ の式で計算された。

心機能解析

超音波検査による心機能測定は東京大学大学院医学系研究科循環器内科の木村公一博士、東京大学医学部附属病院検査部の岡野智子氏のご協力のもと行われた。6、10ヶ月齢のWT、OFラットを5%の濃度でイソフルラン麻酔導入を行った。なお、麻酔維持下のイソフルラン濃度は、WTでは4%、OFラットでは1-2%にした。心エコー図検査は12MHz 12S-D probe (GE Healthcare) を用いて、Vivid E95 digital ultrasound system (GE Healthcare) のもとで行った。フレームレートは1秒間に約250枚以上の高画質を得られるように注意しながら、乳頭筋レベルでの短軸像、四腔断面像を記録した。短軸像からは、拡張末期において左室拡張末期径 (Left ventricular (LV) end-diastolic diameter: LVDd)、心室中隔壁厚 (intraventricular septum thickness)、左室後壁厚 (LV posterior wall thickness) を測定し、収縮末期において左室収縮末期径 (LV end-systolic diameter)、左室内径短縮率 (LV fractional shortening (LVFS)) を測定した。四腔断面像からは、右室内腔面積変化率 (Right ventricular fractional area change: RVFAC)、僧帽弁拡張早期波高 (Transmitral peak E velocity)、僧帽弁拡張早期波減衰時間 (Transmitral E deceleration time: Transmitral E DT)、三尖弁拡張早期波 (Tricuspid peak E velocity) を測定した。さらに、同画像において組織ドプラ法 (Tissue Doppler Imaging: TDI)を用いて左室自由壁、左室中隔壁における僧帽弁輪収縮期波最高速度 (TDI Peak systolic velocity at systole (Sa) at lateral wall, or septum wall: TDI Sa lateral, TDI Sa septum) や僧帽弁輪拡張早期波最高速度 (TDI peak systolic velocity at early-diastole at lateral wall, or septum wall: TDI Ea lateral, TDI Ea septum) を測定した。右室において、自由壁における三尖弁輪収縮期波最高速度 (TDI Sa at right ventricular wall: TDI Sa RV free-wall) および三尖弁輪拡張早期波最高速度 (TDI peak systolic velocity at early-diastole: TDI Ea RV free-wall) や、三尖弁輪収縮期移動距離 (Tricuspid annular plane systolic excursion: TAPSE) を測定した。僧帽弁及び三尖弁における E/Ea はそれぞれの E 値を Ea 値で除することによって得られた。最後に、脱水の指標として最大下大静脈径 (Maximum IVC diameter) を測定した。

統計処理

数値データは平均値±標準誤差で示し、生データを黒点で表した。2群間の比較は Unpaired Welch's t-test (two-tailed) を用いて行った。3群以上の場合には 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。グラフの描画や p 値の計算は統計ソフト R (ver.4.0.0) を用いて行った。

第一節 ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの経時的な骨格筋病態の解析

結果

系統化したジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットにおけるジストロフィンの欠損

本研究室の先行研究において、CRISPR/Cas 法を用いて *Dmd* 遺伝子の exon3-16 に変異を持つ複数のラットが作出された (Nakamura et al., 2014)。作出されたラットの中で、Fig. 1-1-1A に示されるように exon3 付近に 329 塩基欠損を持ち、exon16 に 1 塩基挿入を持つラットが選択され、系統化された (OF ラット)。OF ラットでは intron3 における 5'-スプライス配列を欠損するため、cDNA 配列は Fig. 1-1-1B で示されるように exon3 が欠損した形になる。cDNA 配列から予測される翻訳アミノ酸配列を調べたところ、OF ラットは exon16 に導入された 1 塩基挿入によって out-of-frame 変異になることが確認された (Fig. 1-1-1B)。導入された変異によってジストロフィンタンパク質が欠損しているかどうかを検討するために、3 ヶ月齢の野生型ラット (WT) および OF ラット前脛骨筋より抽出したタンパク質を用いて、ジストロフィンタンパク質に対するウェスタンブロットを行ったところ、実際に OF ラットではジストロフィンタンパク質が検出されないことが確認された (Fig. 1-1-1C)。

OF ラットにおける経時的な病態解析

OF ラットにおける病態を評価するために、まず経時的な外観の観察を行った (Fig. 1-1-2)。OF ラットでは 6 ヶ月齢から消瘦や、毛並みの悪化が認められ、10 ヶ月齢では脊柱の後弯 (Kyphosis) が顕著であった。体重を経時的に測定したところ、WT では経時的に体重が増加するのに対し、OF ラットでは 27 週齢以降において、むしろ体重が経時的に減少していた (Fig. 1-1-3A)。速筋の代表として前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle: TA)、遅筋の代表としてヒラメ筋 (Soleus muscle: SOL) の筋重量を測定したところ、どちらの筋においても 1 ヶ月齢という早期や、8、10 ヶ月齢という後期では OF ラットにおいて筋重量の減少が観察された (Fig. 1-1-3B, C)。一方で、6 ヶ月齢においては WT、OF ラット間で差が認められなかったが、これは OF ラットでは筋損傷に応答して一過的に仮性肥大が誘導され、代償的に筋重量が増加した可能性が考えられる。筋機能の評価するために、グリップテストによって連続して 10 回筋力を測定し、その最大筋力を比較した。その結果、OF ラットでは 2 ヶ月齢という早期から筋力が減少しており、さらに加齢に伴って筋力が減少していた (Fig. 1-1-4)。

OF ラット骨格筋における経時的な組織学的表現型解析

OF ラットの骨格筋組織像を調べるために、1-10 ヶ月齢の各月齢において前脛骨筋切片の HE 染色を行った。その結果、OF ラットでは 1-3 ヶ月齢という早期では筋線維の壊死や、それに伴う炎症細胞浸潤像が観察される一方で、6-10 ヶ月齢という後期では、骨格筋間質における線維・脂肪組織浸潤が顕著であった (Fig. 1-1-5)。特に、10 ヶ月齢では筋線維がほとんど線維・脂肪組織に置換されている像が観察され、OF ラットはヒトに類似した重篤な表現型を示すことが明らかになった。筋損傷マーカーである血中クレアチンキナーゼ (Creatine kinase: CK) 値と、尿中タイチン値を測定したところ、OF ラットでは 1-3 ヶ月齢においてこれらのマーカーは高い値を示すものの、病態の進行とともにその値が減少していた (Fig. 1-1-6A, B)。このことから、筋線維の損傷は比較的早期にピークを迎えることが示唆される。骨格筋の線維・脂肪化に関してより詳細に検討するために、前脛骨筋切片のマッソントリクローム染色、及び前脛骨筋抽出タンパク質において Perilipin に対するウェスタンブロットを行った。その結果、OF ラットでは 3 ヶ月齢から線維組織増生が認められるのに対し (Fig. 1-1-7A, C)、脂肪細胞のマーカーである Perilipin の発現は 6 ヶ月齢から増加していた (Fig. 1-1-7B, D)。このことから、骨格筋の線維・脂肪化は同時に誘導されるのではなく、OF ラットでは線維化が脂肪化に先行することが示された。

OF ラット骨格筋における加齢性の筋再生能低下

DMD 患者では、筋の損傷と再生が繰り返されるうちに、やがて再生が損傷に追いつかなくなると考えられている。筋再生能を評価するために、WT、OF ラット前脛骨筋切片において再生筋線維のマーカーである eMHC に対する免疫染色を行ったところ、OF ラットにおいて、WT では観察されなかった eMHC 陽性の再生筋線維が観察された。切片あたりの eMHC 陽性筋線維数は 1 ヶ月齢や 3 ヶ月齢においては数多く観察されたが、6 ヶ月齢から加齢に伴って eMHC 陽性の再生筋線維数が顕著に減少していた (Fig. 1-1-8A, B)。OF ラットにおいて前脛骨筋における総筋線維数を測定したところ、加齢に伴って総筋線維数自体が減少していたが (Fig. 1-1-8C)、再生筋線維数を総筋線維数で除した値も加齢に伴って減少した (Fig. 1-1-8D) ことから、Fig. 1-1-8B で観察された加齢性の再生筋線維数の減少は、総筋線維数の減少を反映したものではなく、筋再生能の低下を表すと考えられる。次に、筋再生を司る筋衛星細胞の数を評価するために、WT、OF ラット骨格筋初代培養細胞において Pax7 及び MyoD の免疫染色を行った。その結果、OF ラットでは進行性に Pax7 及び MyoD 陽性細胞数が減少していた (Fig. 1-1-9A, C; Fig. 1-1-9B, D)。以上のことから、OF ラットでは加齢性に筋衛星細胞数が減少し、これが筋再生能の低下、及び病態の進行に関与する可能性が考えられる。

OF ラット骨格筋におけるユートロフィンの発現

DMD のモデル動物として最も使用されている mdx マウスは症状が一過的であり、ヒトほ

ど重篤な表現型が認められない。その原因のひとつとして、mdx マウスではジストロフィンが欠損するものの、そのホモログであるユートロフィンが筋線維に発現することによってジストロフィンの機能を代償し、症状が緩和されると考えられている (Grady et al., 1997)。そこで、ヒトと同様に重篤な骨格筋組織像を呈する OF ラットにおいて筋線維にユートロフィンが発現するかどうかを検討するために、WT、OF ラット前脛骨筋においてユートロフィンに対する免疫染色を行った。その結果、WT では血管内皮細胞にのみユートロフィンの発現が認められた (Ramirez-Sanchez et al., 2007)。一方、OF ラットは重篤な表現型が見られるにも関わらず、予想に反して、血管内皮細胞のみならず、一部の筋線維においてもユートロフィンが発現していた (Fig. 1-1-10)。

OF ラット横隔膜の組織学的解析及び呼吸機能解析

DMD 患者では横隔膜を含む呼吸筋の損傷によって呼吸機能障害を呈し、呼吸数の増加や、一回換気量の低下を示す (Lo Mauro and Aliverti, 2016)。そこで、OF ラットにおいても横隔膜の損傷や、それに伴う呼吸機能障害が生じる可能性を検討した。まず WT、OF ラット横隔膜組織切片において HE 染色、マッソントリクローム染色を行い、組織学的観察を行ったところ、OF ラットでは前脛骨筋と同様に横隔膜においても 6 ヶ月齢から筋の線維・脂肪化が顕著であることがわかった (Fig. 1-1-11A)。このような病態の進行に伴って呼吸機能に障害が生じる可能性がある。そこで、Whole Body Plethysmography (WBP) システムを用いて WT、OF ラットの呼吸機能を測定した。その結果、OF ラットでは気管収縮の指標である Enhanced pause (Penh) 値が有意に増加していたものの、一回換気量には WT、OF ラット間で差がなく、呼吸数はむしろ WT に比べて低下していた (Fig. 1-1-11B)。なお、Penh の計算に用いた指標の各値は Table 1-1 に示した。以上のことから、OF ラットでは組織学的な病変が認められるものの、一回換気量は保たれており、呼吸機能には WT と比較して軽微な差しか見られないことが明らかになった。

考察

本節の研究によって、OF ラットはヒトに類似した重篤な表現型を示すことが明らかになった。ヒト DMD 患者では、1-3 歳から歩行開始時期の遅れや、階段の上り下りの困難などの症状が見られ、8-14 歳までに進行性に筋力が低下し、車椅子が必要になる (Ryder et al., 2017)。このような加齢性の筋力低下は OF ラットにおいても認められ、筋機能の面でヒトの病態をよく反映している。また、ヒト DMD 患者では病態の進行に伴って筋組織が線維・脂肪組織に置換されるが (Burakiewicz et al., 2017; Desguerre et al., 2009)、OF ラットにおいても特に 6-10 ヶ月齢において同様の傾向が見られ、組織学的にもヒトの病態を再現している。一方で、ヒト DMD 患者とは異なる点も見られた。OF ラットでは 6-10 ヶ月齢において脊柱の後弯が認められるものの、ヒト DMD 患者で頻発する脊柱の側弯は認められない。また、DMD 患者では重度の呼吸機能障害が問題となるが、OF ラットでは 10 ヶ月齢においても換気量低下などの重度な呼吸不全は見られなかった。ヒト DMD 患者では、歩行困難後に車椅子になるが、これが脊椎の伸展喪失につながり、側弯の発症に関与すると考えられている (Shapiro et al., 2014)。さらに、側弯の進行は胸郭の狭量化によって呼吸機能の低下に関与する (Yamashita et al., 2001)。以上より、ヒトと違い 4 足歩行を用いる OF ラットでは脊柱にかかる負担がヒトとは異なり、側弯、ひいては呼吸機能不全を呈さなかった可能性が考えられる。

本研究によって OF ラットでは mdx マウスに比べて重篤な表現型を示すことが明らかになった。これまで mdx マウスでは、筋線維におけるユートロフィンの過剰な発現がジストロフィンの機能を代償し、病態緩和につながると考えられてきた。実際に mdx マウスにおいてユートロフィンを欠損させることで病態が重篤化することや (Grady et al., 1997)、ユートロフィンを過剰発現させることで病態が緩和されること (Rafael et al., 1998) からも、ユートロフィンはジストロフィンの機能を代償できることがわかる。しかし、ユートロフィンの発現は症状が重篤な DMD 患者においても筋線維に発現する場合があること (Voit et al., 1991) や、本研究で見られたように重篤な症状を示す OF ラットにおいても筋線維に発現していたことから、ヒト DMD 患者や OF ラットにおいても、ユートロフィンは代償的な機能を果たしている可能性があり、むしろヒトやラットではユートロフィンの発現によっても代償しきれない増悪因子が存在することが示唆される。ジストロフィンはジストログリカン複合体 (DGC complex) を形成し、筋線維内のアクチン骨格と筋基底膜を接続することによって筋細胞膜を安定化させる役割を果たしている。その構成要素のひとつである $\alpha 7\beta 1$ integrin や α -dystrobrevin、 δ -sarcoglycan はそれぞれ mdx マウスにおいて欠損させることで症状が重篤化すること (Grady et al., 1999; Guo et al., 2006; Li et al., 2009) から、ユートロフィン以外の DGC の構成要素も mdx マウスにおいては代償的な機能を果たす一方、OF ラット

やヒト DMD ではこれらの発現量が mdx マウスに比べて低下しており、これが重篤な病態に繋がっている可能性が考えられる。

筋再生能の違いもマウスと、ラットやヒトとの病態の差を生む要因かもしれない。Mdx マウスは非常に筋再生能が高く、週に 1 回 20 週間塩酸ブピバカインによる筋損傷を行ってもなお通常通り筋再生が行われることが示されている (Luz et al., 2002)。また、mdx マウスでは 11 ヶ月齢においても野生型と同等数の筋衛星細胞が保たれており、これも mdx マウスの筋再生能の高さを説明する一因かもしれない。Mdx マウスは通常 C57/Bl6 系統のものが使用されるが、これを DBA/2 系統の遺伝的背景になるように交配させると比較的病態が重篤化し、筋再生能も低下する (Fukada et al., 2010)。このような遺伝的背景の違いもマウスと、ラットやヒトとの筋再生能の違いを説明する一因かもしれない。

OF ラットでは、病態の重篤化とともに骨格筋の線維・脂肪化が亢進していたが、興味深いことに線維化が脂肪化に先行していた。DMD 患者では 3-5 歳においてすでに間質の線維化が認められる (Desguerre et al., 2009)。一方、脂肪組織は 3-5 歳では MRI で検出できないが、加齢性に脂肪組織浸潤が顕著になること (Marden et al., 2005) から、ヒト DMD においても OF ラットと同様の経過をたどる可能性がある。骨格筋の線維・脂肪組織は、骨格筋の間質に存在する間葉系前駆細胞を起源とする (Uezumi et al., 2010)。間葉系前駆細胞は TGF- β の刺激によって線維芽細胞へと分化するが、DMD では TGF- β の産生元は主にマクロファージであることが mdx マウスを用いた研究によって調べられている (Zhou et al., 2006)。本研究と同様にジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットを用いた別のグループの研究から、ラットでは少なくとも 2 週齢から炎症が誘導され、8-12 週齢に炎症のピークを迎えることが示されている (Ouisse et al., 2019)。OF ラットにおいて 3 ヶ月齢から既に線維化が誘導されていたのは、このような持続的なマクロファージの浸潤によって TGF- β が産生され、間葉系前駆細胞が線維芽細胞に分化したことを反映しているのかもしれない。一方で脂肪化に関しては、mdx マウスにおいてマクロファージを一過的に除去することで、筋衛星細胞が脂肪細胞に分化するという興味深い報告がある (Madaró et al., 2019)。本研究において筋損傷マーカーである CK や尿中タイチン値は 1-3 ヶ月齢をピークとし、加齢とともに減少していたことや、先述した OF ラットの炎症に関する報告と合わせて考えると、OF ラットでは 8-12 週齢を炎症のピークとし、以降は筋損傷に伴うマクロファージなどの炎症細胞浸潤は減弱すると考えられる。このような相対的なマクロファージ数の減少によって、筋衛星細胞が脂肪細胞に分化することで、6 ヶ月齢以降に脂肪化が誘導された可能性がある。また、間葉系前駆細胞は一般に、骨格筋間質に存在する PDGFR α 陽性で線維芽細胞、脂肪細胞分化能をもつ細胞と定義されているが、その中にも様々な subpopulation が存在し、ヘテロな集団であることが知られている (Malecova et al., 2018; Uezumi et al., 2010)。近年の研究では、PDGFR α 陽性細胞のうち、CD142 陽性の subpopulation は GDF10 を分泌することで脂肪化を抑制する一方、CD142 陰性の subpopulation は脂肪分化能が高いことが示されており (Camps et al., 2020)、OF ラットにおいても同様の集団が存在すると仮定すると、CD142 陽性

の集団と CD142 陰性の集団の比が加齢性に变化することで比較的后期に脂肪化が誘導されやすくなる可能性も考えられる。今後の研究によって上述の機序を詳細に検討することで、骨格筋の線維・脂肪化の機序を解明することができるかもしれない。

本節では、OF ラットの骨格筋に着目し、OF ラットでは加齢に伴って筋機能が低下することや、組織学的には顕著な線維・脂肪化を認めるなど、進行性の病態が認められ、OF ラットはヒト DMD に外挿可能な病態を示すことを明らかにした。第二節では、OF ラットにおける心筋の病態を評価することで、心臓においても OF ラットがヒト DMD の病態を反映するかどうかを検討する。

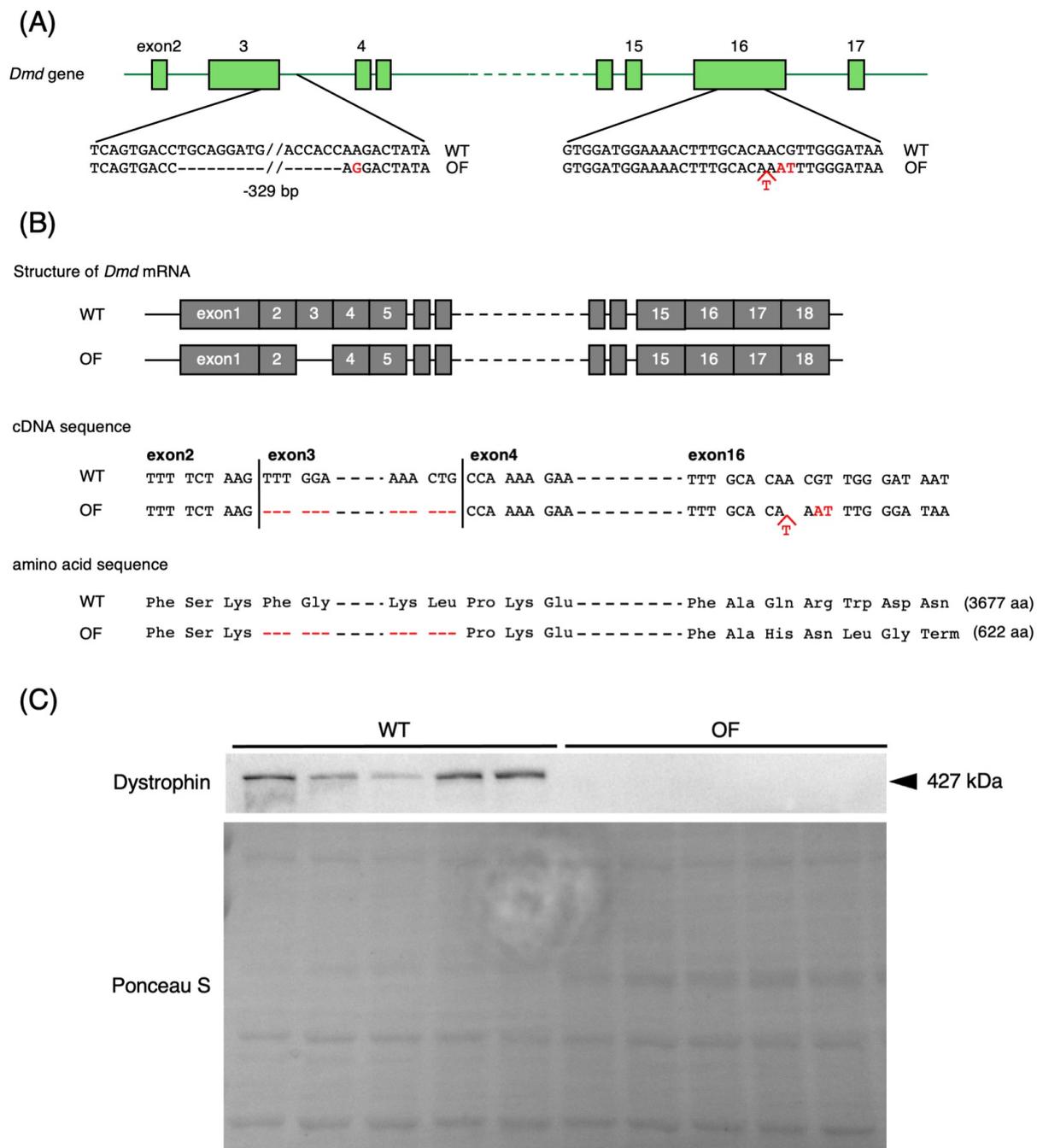


Fig. 1-1-1 OFラットにおける*Dmd*遺伝子変異及びジストロフィンタンパク質の欠失

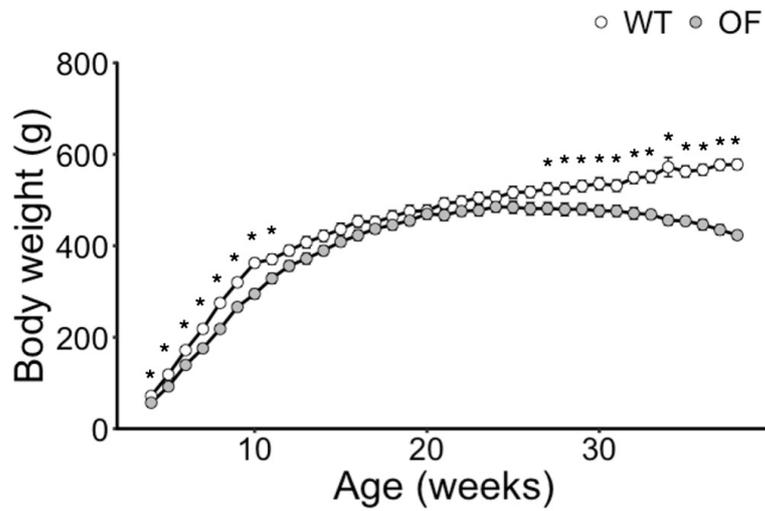
- (A) OFラットに導入された*Dmd*遺伝子配列における変異。
- (B) *Dmd* mRNA配列における変異と、予測される翻訳アミノ酸配列。
- (C) 3ヶ月齢のWT、OFラット前脛骨筋抽出タンパク質における、ジストロフィンに対するウェスタンブロット像。ローディングコントロールとして、Ponceau S染色を用いた。



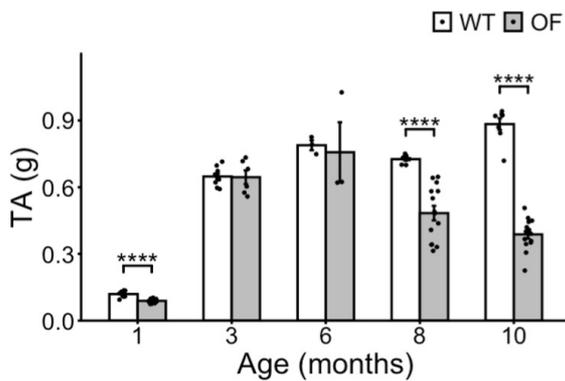
Fig. 1-1-2 OFラットの外観

6、10ヶ月齢のWT、OFラットの外観を示す。OFラットでは10ヶ月齢において矢頭で示される脊柱の湾曲が認められた。

(A)



(B)



(C)

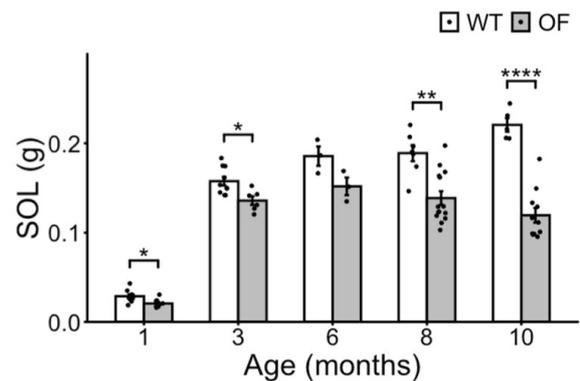


Fig. 1-1-3 OFラットにおける体重および骨格筋重量の減少

(A) WT、OFラットにおける1週間毎の体重変化。WT: n = 8; OF: n = 6。

(B) 1, 3, 6, 8, 10ヶ月齢における前脛骨筋重量の変化。WT: n = 10, 10, 3, 7, 8; OF: n = 11, 6, 3, 14, 14。

(C) 1, 3, 6, 8, 10ヶ月齢におけるヒラメ筋重量の変化。WT: n = 10, 10, 3, 7, 5; OF: n = 11, 6, 3, 14, 11。

データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (t-test, vs age-matched WT)。

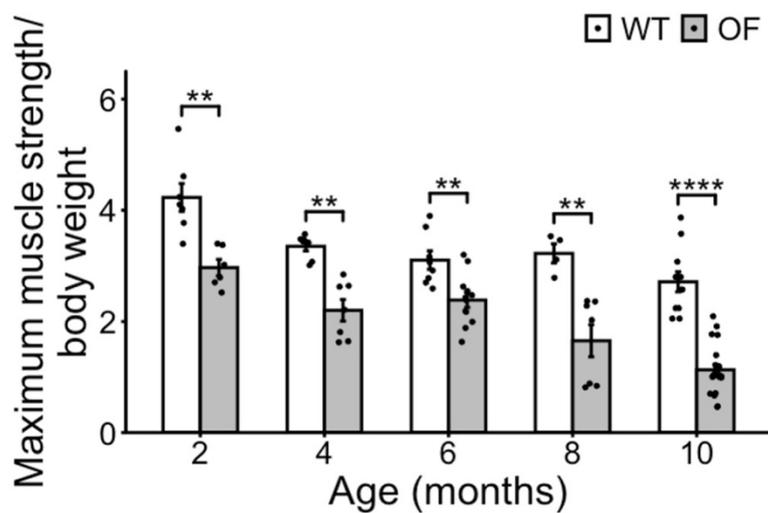


Fig. 1-1-4 OFラットにおける筋力の減少

WT、OFラットにおける経時的な筋力の変化。グリップテストを10回行ったときの最大筋力をプロットした。WT: n = 7, 7, 8, 4, 11; OF: n = 6, 7, 12, 7, 21。

データは平均値±標準誤差で表した。**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (t-test, vs age-matched WT)。

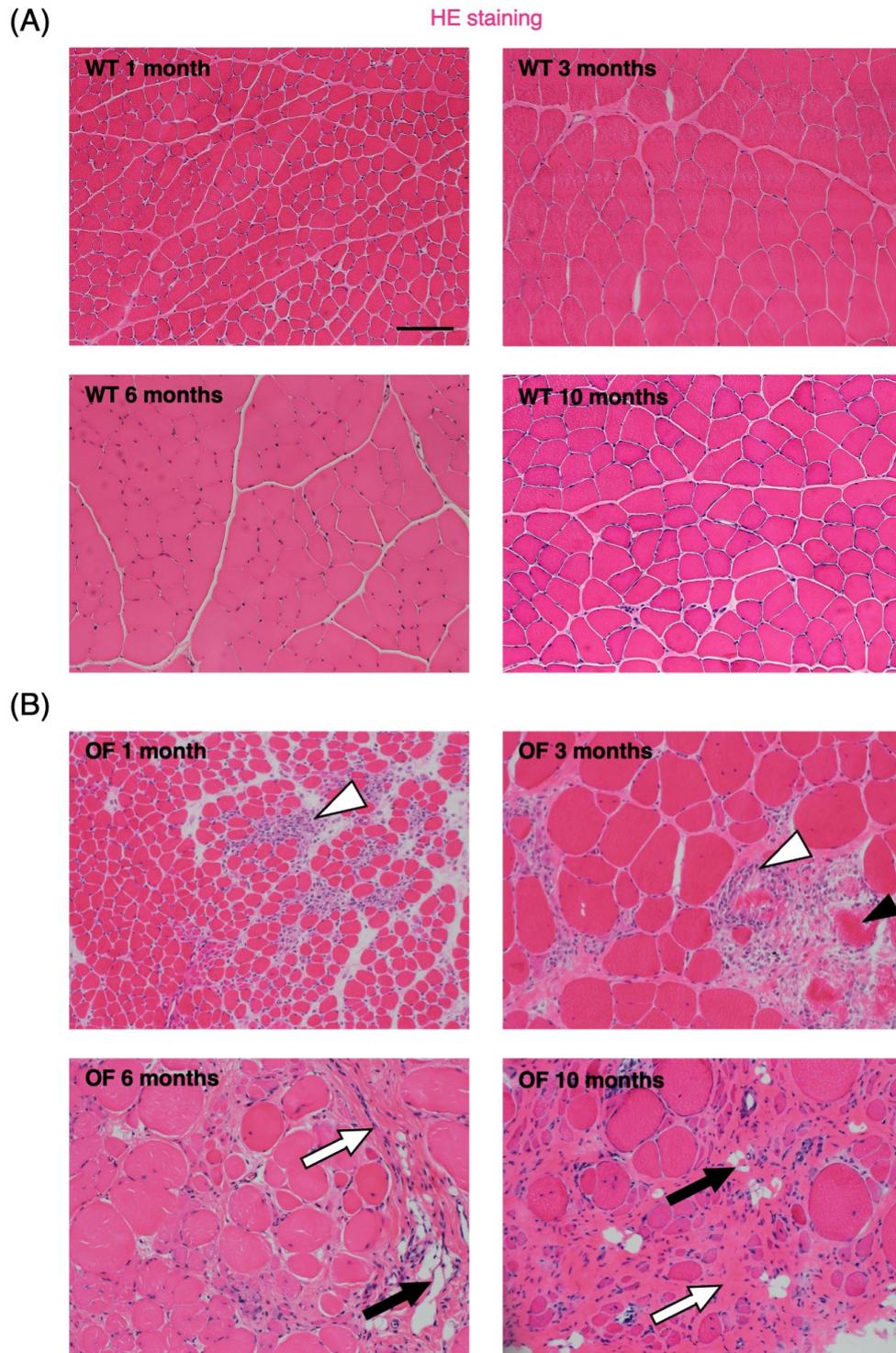


Fig. 1-1-5 OFラットにおける経時的な骨格筋組織像の変化

- (A) 1~10ヶ月齢のWTラット前脛骨筋HE染色像。
 (B) 1~10ヶ月齢のOFラット前脛骨筋HE染色像。白矢頭、黒矢頭、白矢印、黒矢印、はそれぞれ炎症細胞浸潤、壊死筋線維、線維化、脂肪化を表す。Scale bar = 100 μ m。

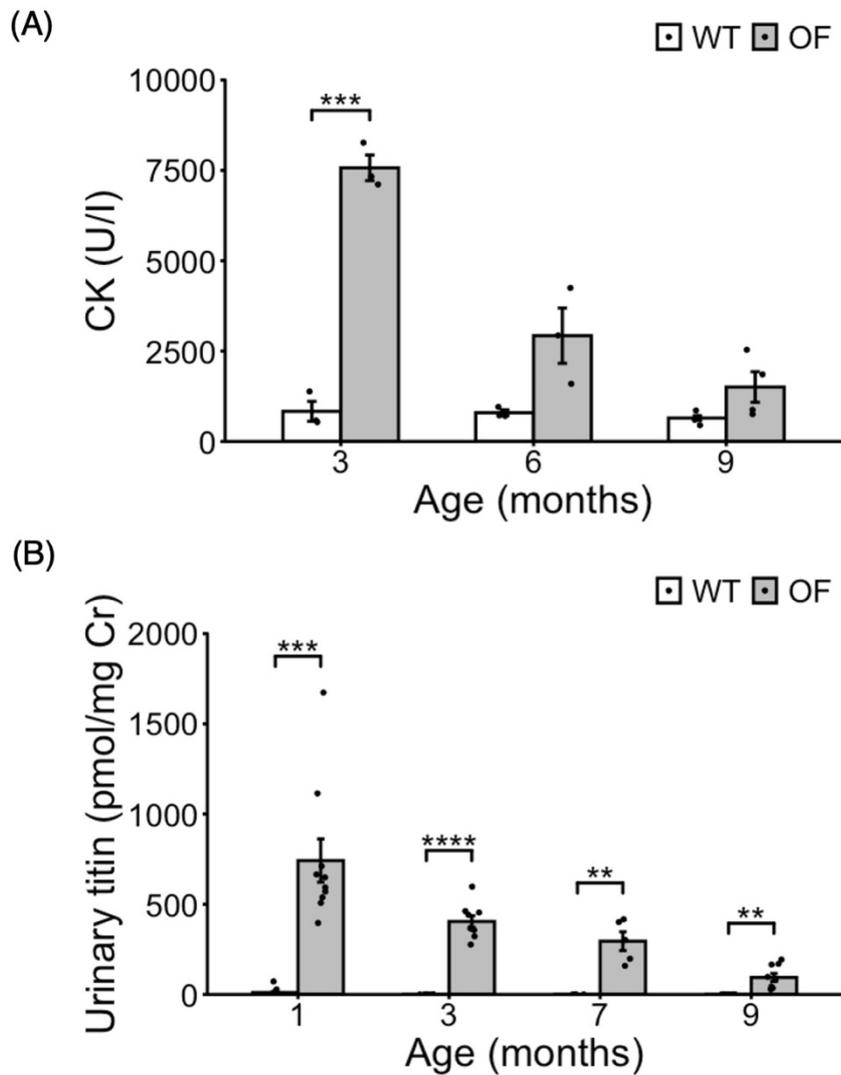


Fig. 1-1-6 OFラットにおける筋損傷マーカーの増加

WT、OFラット血清中のcreatin kinase値 (A)及び尿中タイチン値の月齢に伴う変化 (B)

(A) WT: n = 3, 3, 5; OF: n = 3, 3, 4。

(B) WT: n = 10, 9, 5, 9; OF: n = 10, 9, 5, 9。

データは平均値±標準誤差で表した。**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (t-test, vs age-matched WT)。

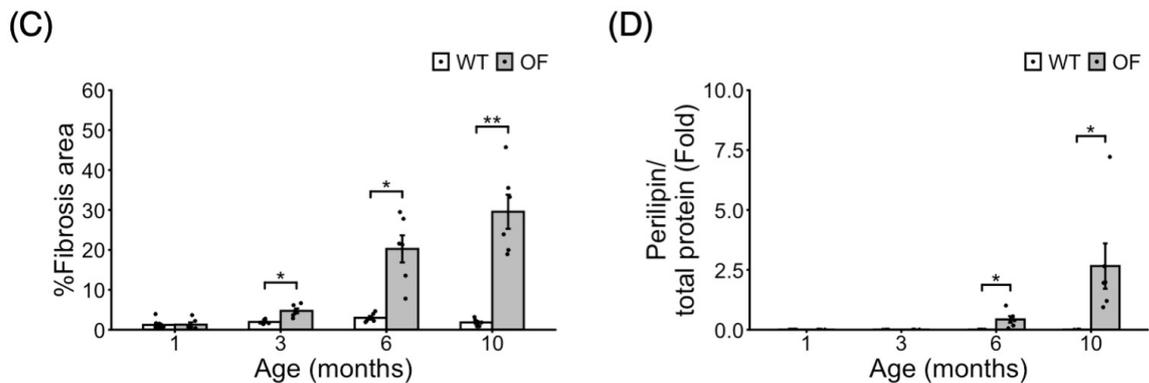
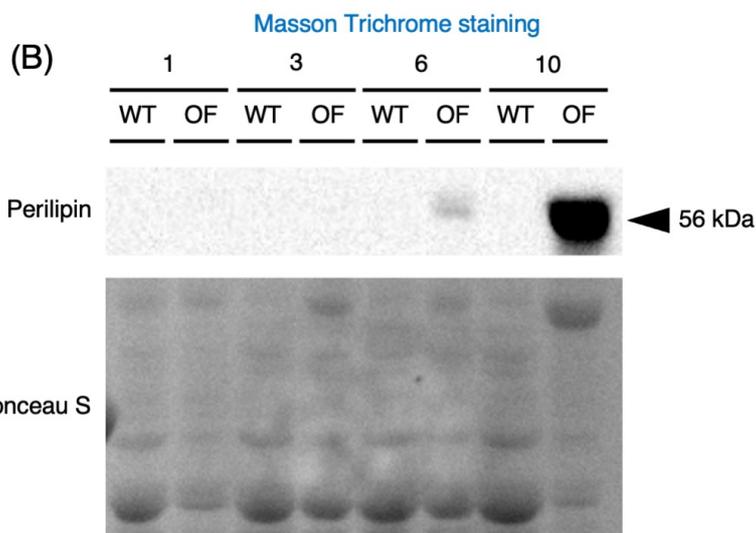
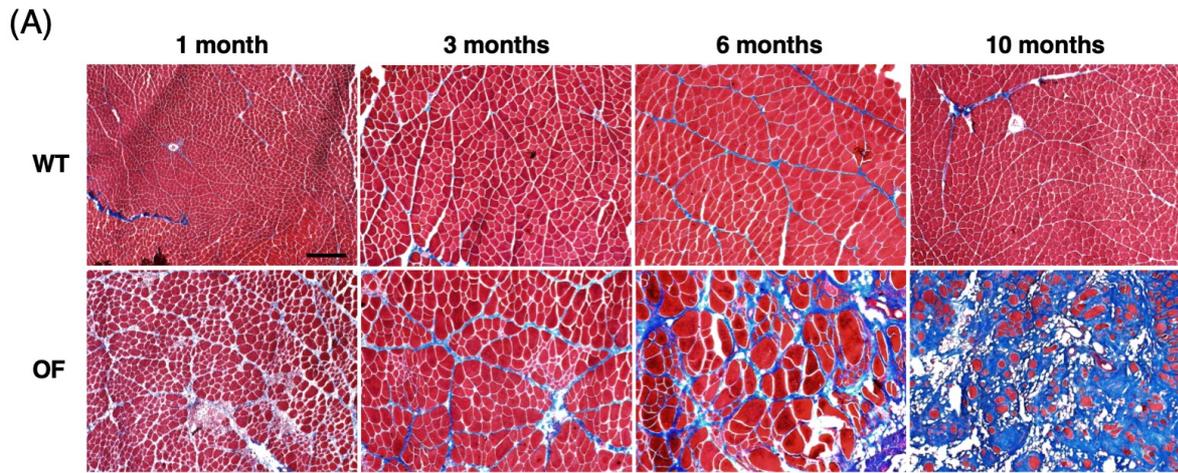


Fig. 1-1-7 OFラット骨格筋における線維・脂肪組織の増加

- (A) 各月齢のWT、OFラット前脛骨筋切片におけるマッソントリクローム染色像。Scale bar = 250 μ m。
- (B) 各月齢のWT、OFラット前脛骨筋切片抽出タンパク質を用いたperilipinに対するウェスタンブロット像。ローディングコントロールとしてPonceau S染色を用いた。
- (C) マッソントリクローム染色における青色が全体の面積に占める割合。(n = 6, each)。
- (D) Perilipinのバンド強度をPonceau Sで示されたTotal protein量で標準化したグラフ。(n = 6, each)。
- データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01 (t-test, vs age-matched WT)。

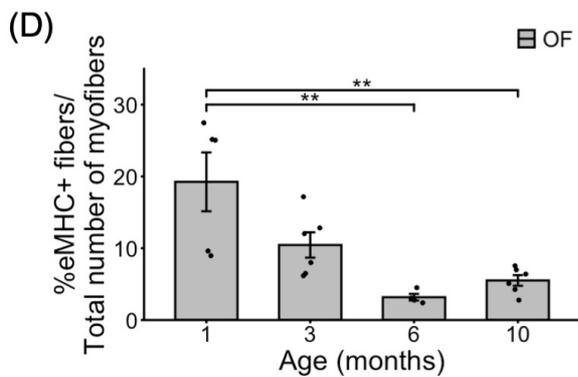
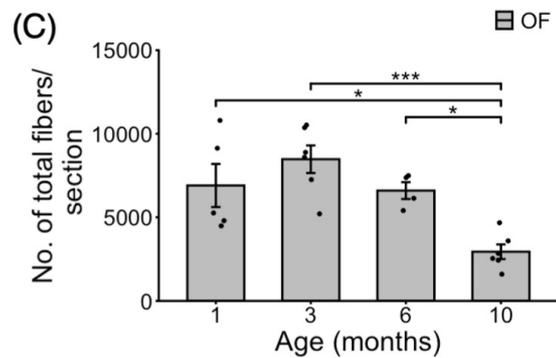
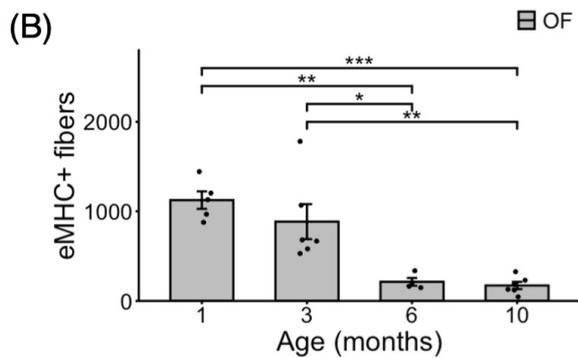
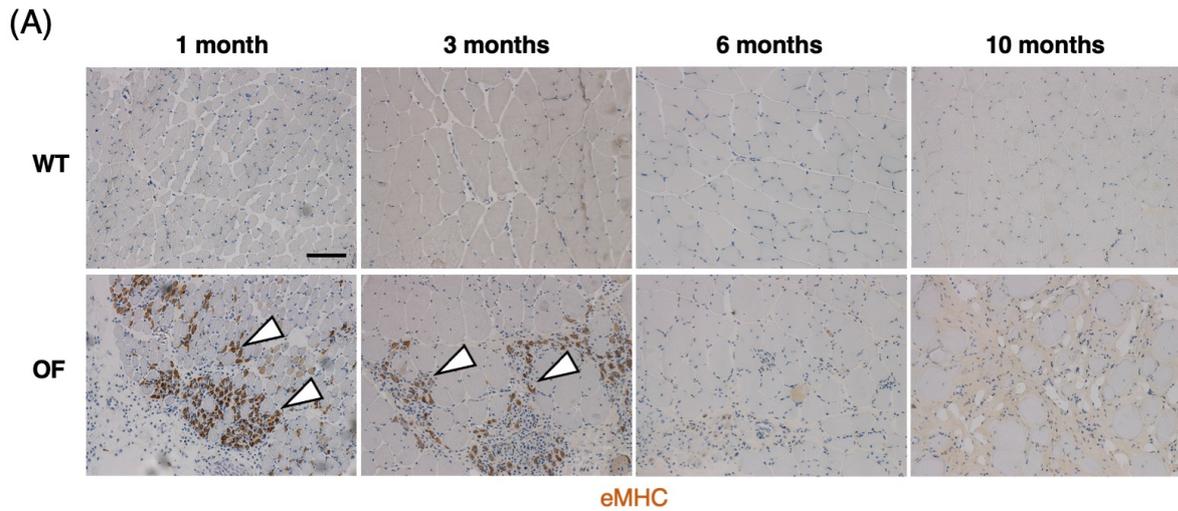


Fig. 1-1-8 OFラット骨格筋における経時的な再生筋線維数の減少

- (A) 各月齢のWT、OFラット前脛骨筋切片における抗eMHC抗体を用いた免疫染色像。Scale bar = 250 μ m。
 (B) 各月齢のOFラットにおける、前脛骨筋切片1切片あたりのeMHC陽性筋線維数。(n = 6, each)。
 (C) 各月齢のOFラットにおける、前脛骨筋切片1切片あたりの総筋線維数。(n = 6, each)。
 (D) 各月齢のOFラットにおける、前脛骨筋切片1切片あたりのeMHC陽性筋線維数を総筋線維数で除した割合。(n = 6, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tukey Kramer's test)。白矢頭はeMHC陽性筋線維を示す。

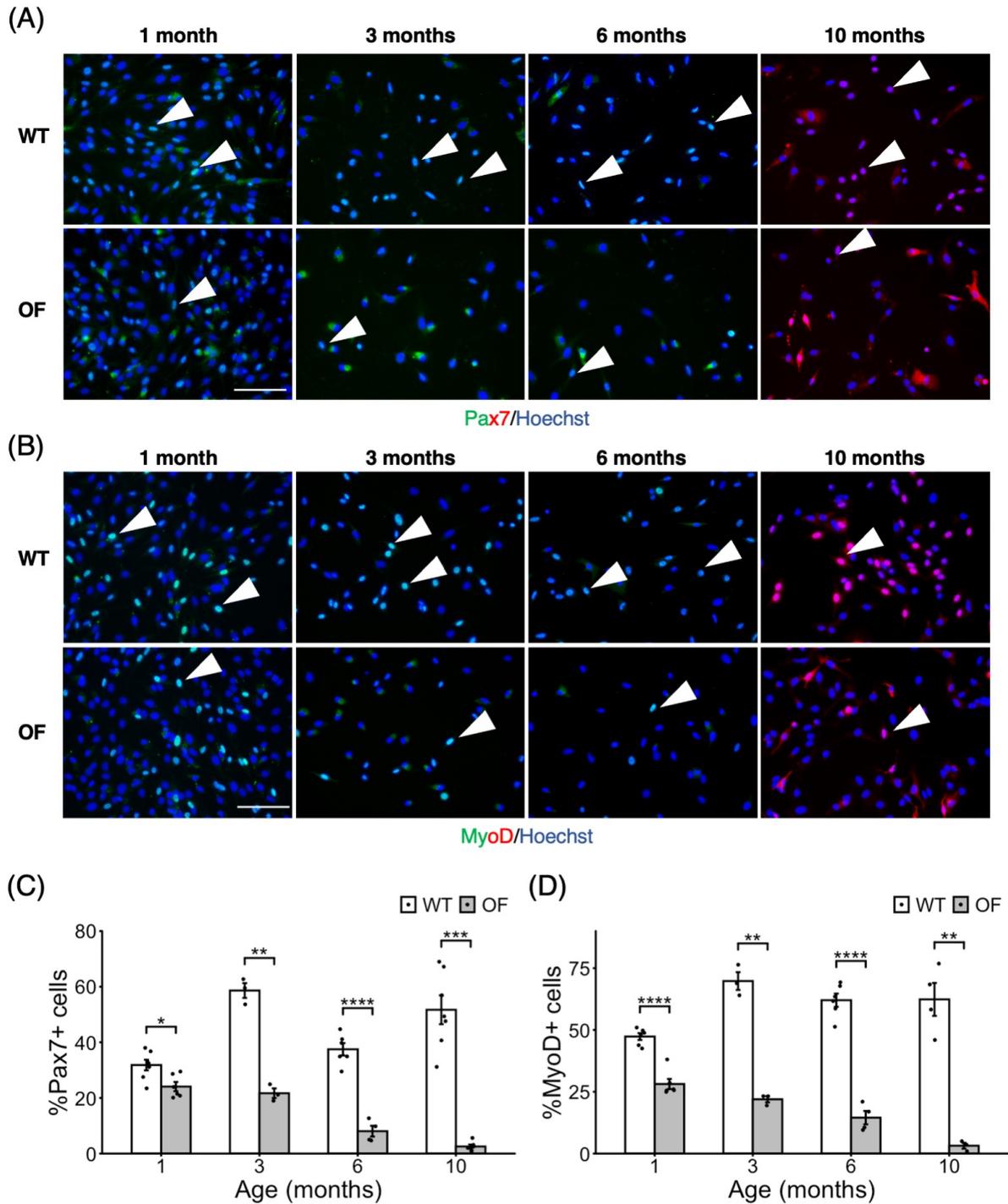
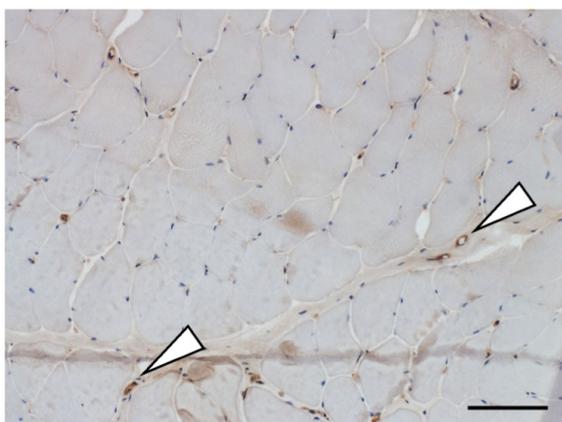


Fig. 1-1-9 OFラット骨格筋における経時的な筋衛星細胞数の減少

- (A) WT、OFラット骨格筋初代培養細胞における抗Pax7抗体を用いた免疫染色像。Scale bar = 100 μ m。
 (B) WT、OFラット骨格筋初代培養細胞における抗MyoD抗体を用いた免疫染色像。Scale bar = 100 μ m。
 (C) 各月齢のWT、OFラットにおけるPax7陽性細胞数の割合。(n = 6)。
 (D) 各月齢のWT、OFラットにおけるMyoD陽性細胞数の割合。(n = 6)。

データは平均値 \pm 標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (t-test, vs age-matched WT)。

WT rat skeletal muscle



DMD rat skeletal muscle

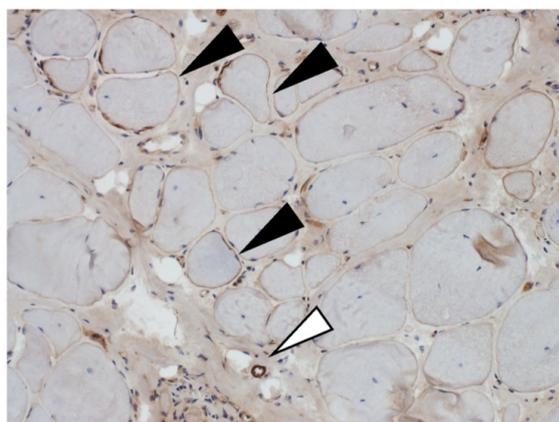
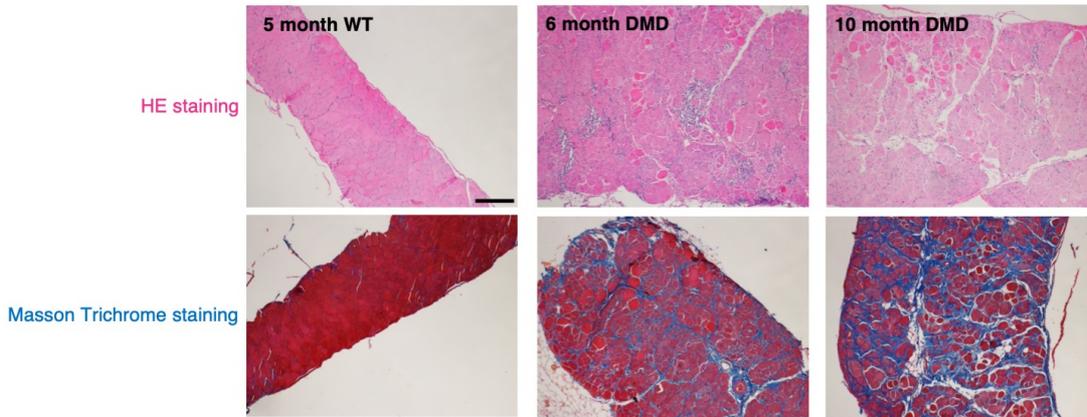


Fig. 1-1-10 OFラットにおけるユートロフィンタンパク質の発現

WT、OFラット前脛骨筋において抗Utrophin抗体を用いて免疫染色を行った。白矢頭は血管内皮細胞、黒矢頭はUtrophin陽性の筋線維を示す。Scale bar = 100 μ m。

(A)



(B)

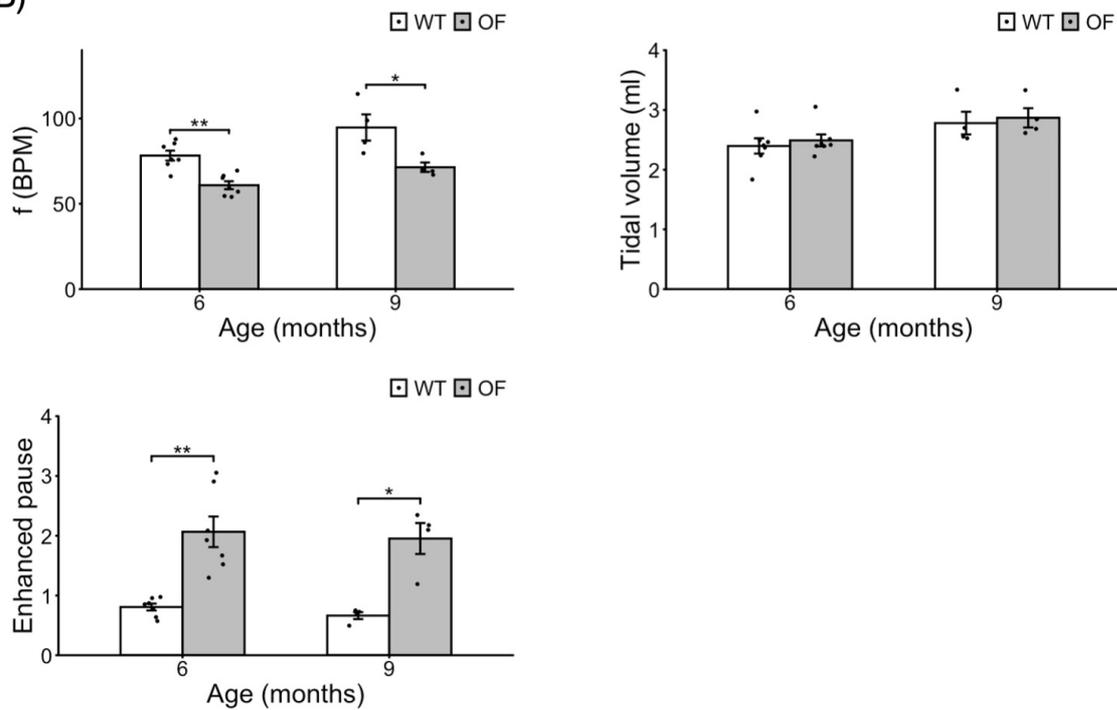


Fig. 1-1-11 OFラット横隔膜における組織学的変化及び呼吸機能評価

(A) HE染色およびMasson Trichrome染色による、WT、OFラット横隔膜の組織像、線維化の評価。
Scale bar = 250 μ m.

(B) WT、OFラットにおいてwhole body plethysmographyを用いて呼吸機能の評価した。fは1分間あたりの呼吸数、Tidal volumeは1回換気量、Enhanced pauseは気道収縮の指標を表す。6 months: n = 7, each; 9 months: n = 4, each.

データは平均値 \pm 標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01 (t-test, vs age-matched WT)。

Variables	6 months			10 months		
	WT	DMD	P-value	WT	DMD	P-value
Peak inspiratory flow: PIF (ml/s)	16.6 ± 2.0	14.0 ± 2.1	0.051	19.0 ± 3.5	17.2 ± 2.7	0.511
Peak expiratory flow: PEF (ml/s)	7.2 ± 0.5	8.3 ± 1.5	0.095	9.3 ± 1.6	11.1 ± 0.9	0.163
Expiratory time (s)	0.54 ± 0.06	0.66 ± 0.05	0.002	0.45 ± 0.07	0.57 ± 0.03	0.046
Relaxation time (s)	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.104	0.22 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.09

Table 1-1. Whole body plethysmography (WBP) による呼吸機能測定

6、10ヶ月齢のWT、OFラットにおいてWBPを用いて各呼吸機能の指標を測定した結果と統計結果。
6months: WT n=7, OF n=7; 10 months: WT n=4, OF n=4。P値はt-testによって得られた。

第二節 ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットの経時的な心病態の解析

結果

OF ラットにおける心機能解析

6、10ヶ月齢の WT、OF ラットにおいて、心エコー図検査によって心機能解析を行った (Table1-2)。その結果、6ヶ月齢においては、解析を行った指標のうち、左室拡張末期径 (Left ventricular end-diastolic diameter: LVDd) の値以外に WT、OF ラット間で有意差は認められなかった。第一節で示されたように、OF ラットは進行性に体重が減少することから、6ヶ月齢で認められた LVDd 値の低下は、体重減少による心臓重量、体積の低下を反映しているものと考えられる。実際、経時的に心臓重量を測定したところ、OF ラットでは体重の減少によって、基本的にいずれの月齢においても野生型より心重量が低下していた (Fig. 1-2-1A)。10ヶ月齢では、LVDd を含めたいくつかのパラメーターについて WT、OF ラット間で有意差が認められた。OF ラットでは、左心収縮能の指標である左室内径短縮率 (Left ventricular fractional shortening: LVFS) の低下や、右心収縮能の指標である右室内腔面積変化率 (Right ventricular fractional area change: RVFAC) の低下傾向が観察された。組織ドプラ法 (Tissue doppler imaging: TDI) を用いて心臓の部位ごとの収縮能をより詳細に比較したところ、OF ラットでは、左室・右室自由壁収縮能の指標である左室自由壁僧帽弁輪収縮期波最高速度 (TDI Peak systolic velocity at systole (Sa) at lateral wall: TDI Sa lateral) や右室自由壁三尖弁輪収縮期波最高速度 (TDI Sa at right ventricular wall: TDI Sa RV) の低下が認められた一方、左室中隔壁収縮能の指標である左室中隔壁僧帽弁輪収縮期波最高速度 (TDI Sa at septum wall: TDI Sa septum) には WT、OF ラット間で有意な差が見られなかった。

OF ラットにおける心筋の組織学的解析

5、11ヶ月齢の OF ラットにおいて、マッソントリクローム染色により心筋の線維化を定量した。その結果、5、11ヶ月齢の WT では心筋の線維化はみられないものの、5ヶ月齢の OF ラットでは左心の自由壁側に軽度の線維化が認められた (Fig. 1-2-1B, C, D)。10ヶ月齢においては、この線維化がより進行し、右心、左心の自由壁に顕著な線維化が観察される一方、左心の中隔壁側は比較的線維化が軽微であった (Fig. 1-2-1B, C, D)。

考察

第二節では、OF ラットの心機能、や組織像を経時的に評価し、10 ヶ月齢においては心筋の重度の線維化に加え、左心、右心収縮不全を呈することを明らかにした。

OF ラットは、10 ヶ月齢において LVFS や TDI Sa lateral の低下など、左心不全徴候が認められた一方で、TDI Sa septum には WT、OF ラット間で有意な差が見られなかった。これは、OF ラットにおいて左心の機能低下は中隔壁よりも先に自由壁側から生じる可能性を示している。心筋のマッソントリクローム染色においても 10 ヶ月齢では左心の自由壁側に顕著な線維組織浸潤が認められる一方、中隔は比較的線維化が軽微であることから伺える。実際、ヒト DMD 患者においても同様の経過で病態が進行することが知られており (Kamdar and Garry, 2016)、OF ラットはこの点でヒトの病態をよく反映すると考えられる。

OF ラットでは RVFAC の低下傾向や、TDI Sa RV の低下が見られるなど、右心不全徴候も示した。さらに、組織学的には加齢性に右心自由壁の線維化が観察された。第一節で示したように、OF ラットでは軽微な呼吸機能障害があり、これによる後負荷の上昇が右心の傷害、線維化や、右心機能不全につながった可能性がある。

ラットの 6-10 ヶ月齢はヒトの 18-25 歳に相当する (Sengupta, 2013)。ヒト DMD 患者では 18 歳までに軽度から中等度の左心不全徴候が見られ、25 歳までに中隔壁を含めた全体的な左心不全に発展し、心拡張能も低下すること (Kimura et al., 2013; Tandon et al., 2015) を考慮すると、6 ヶ月齢において心機能不全を呈さず、10 ヶ月齢においても拡張能は低下せず、軽度な左心収縮不全を認めるにとどまる OF ラット心筋の病態は、ヒト DMD 患者に比べて軽度であると言えるかもしれない。

しかし、既存の DMD モデル動物と比較すると、OF ラットは DMD の心筋の病態進行機序を解明する上で優れたモデル動物であると考えられる。DMD の研究に最も広く用いられている mdx マウスは組織学的、機能的にも心臓にほとんど病変が見られない (Faysoil et al., 2013; Verhaart et al., 2012)。Mdx マウスの症状を重篤化するために作出されたジストロフィン-ユートロフィンダブルノックアウトマウス (mdx *Utrn*^{-/-}マウス) は 2 ヶ月齢から左心不全が認められるが、症状の重篤さから 3 ヶ月齢までに死亡してしまうため、個体数を確保するのが難しい。他の DMD モデル動物として、イヌ DMD モデルである CXMD イヌがよく用いられる。CXMD イヌは重篤な骨格筋症状を示すものの、心臓の病態進行は比較的緩徐であり、70 ヶ月齢になってようやく左心不全が見られる程度である (Guo et al., 2019)。その点、OF ラットは 10 ヶ月齢において心不全徴候を示し、心筋の線維化の進行過程もヒト DMD に類似していたことから、既存のモデル動物に比べて、ヒト DMD における心臓の病態進行過程を解析する上で優れていると考えられる。

小括

本章では、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つ OF ラットは、骨格筋、心筋両方の観点で既存のモデル動物より重篤な表現型を示し、優れたモデル動物であることを明らかにした。したがって、以降は OF ラットをヒトの病態を適切に反映する DMD ラットとして位置づけ、OF ラットを DMD ラットと呼称する。DMD ラットは飼育・繁殖も比較的容易であることから、DMD の病態進行メカニズムの解明や、治療候補薬の薬効評価にも貢献することが期待される。本章で示した研究成果はその礎となる基礎的なデータを提供した点で意義深いものである。

Variables	6 months			10 months		
	WT	DMD	p-value	WT	DMD	p-value
Heart rate (bpm)	306 ± 47	316 ± 39	0.688	328 ± 14	339 ± 42	0.603
Left Heart Variables						
Septal wall thickness (mm)	1.8 ± 0.5	1.6 ± 0.3	0.524	1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.523
Posterior wall thickness (mm)	1.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3	0.994	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2	0.501
LV end-diastolic diameter (mm)	8.9 ± 0.6	8.2 ± 0.5	0.047	10.1 ± 0.5	7.2 ± 0.8	0.001
LV end-systolic diameter (mm)	5.2 ± 0.7	4.7 ± 0.4	0.218	5.6 ± 0.6	4.9 ± 0.8	0.146
LV fractional shortening (%)	41 ± 6	42 ± 4	0.771	44 ± 6	33 ± 5	0.024
Transmitral E velocity (cm/s)	94 ± 11	99 ± 7	0.376	115 ± 16	83 ± 12	0.011
Transmitral E DT (ms)	54 ± 9	47 ± 12	0.269	44 ± 5	43 ± 8	0.752
Transmitral E/Ea septum	17.6 ± 5.2	24.2 ± 7.1	0.101	15.3 ± 3.7	16.1 ± 3.1	0.733
Transmitral E/Ea lateral	20.5 ± 3.9	23.6 ± 5.4	0.304	21.7 ± 3.7	19.1 ± 1.5	0.272
TDI Sa septum (cm/s)	3.9 ± 1.1	4.0 ± 0.9	0.955	3.6 ± 0.7	3.6 ± 0.7	0.895
TDI Sa lateral (cm/s)	5.9 ± 1.9	5.4 ± 1.1	0.608	5.7 ± 0.9	4.3 ± 0.7	0.041
Right Heart Variables						
RV fractional area change (%)	51 ± 5	46 ± 5	0.118	47 ± 3	39 ± 8	0.057
TAPSE (mm)	2.5 ± 0.4	2.4 ± 0.4	0.725	2.4 ± 0.5	1.9 ± 0.5	0.178
Transtriuspid E velocity (cm/s)	65 ± 21	75 ± 20	0.467	78 ± 8	69 ± 22	0.392
Transtriuspid E/Ea RV free-wall	13.0 ± 10.2	15.0 ± 3.7	0.673	12.3 ± 2.4	13.9 ± 4.8	0.542
TDI Sa RV free-wall (cm/s)	5.0 ± 0.9	4.2 ± 0.7	0.160	5.3 ± 0.8	3.3 ± 0.7	0.004
Maximum IVC diameter (mm)	2.5 ± 0.6	2.4 ± 0.5	0.591	3.0 ± 0.5	2.5 ± 0.3	0.284

Table 1-2. 心エコーによる心機能評価

6、10ヶ月齢のWT、OFラットにおける心エコー指標の各値と統計結果。6 months: WT n = 7, OF n = 7; 10 months: WT n = 7, OF n = 4。p値はt-testによって得られた。

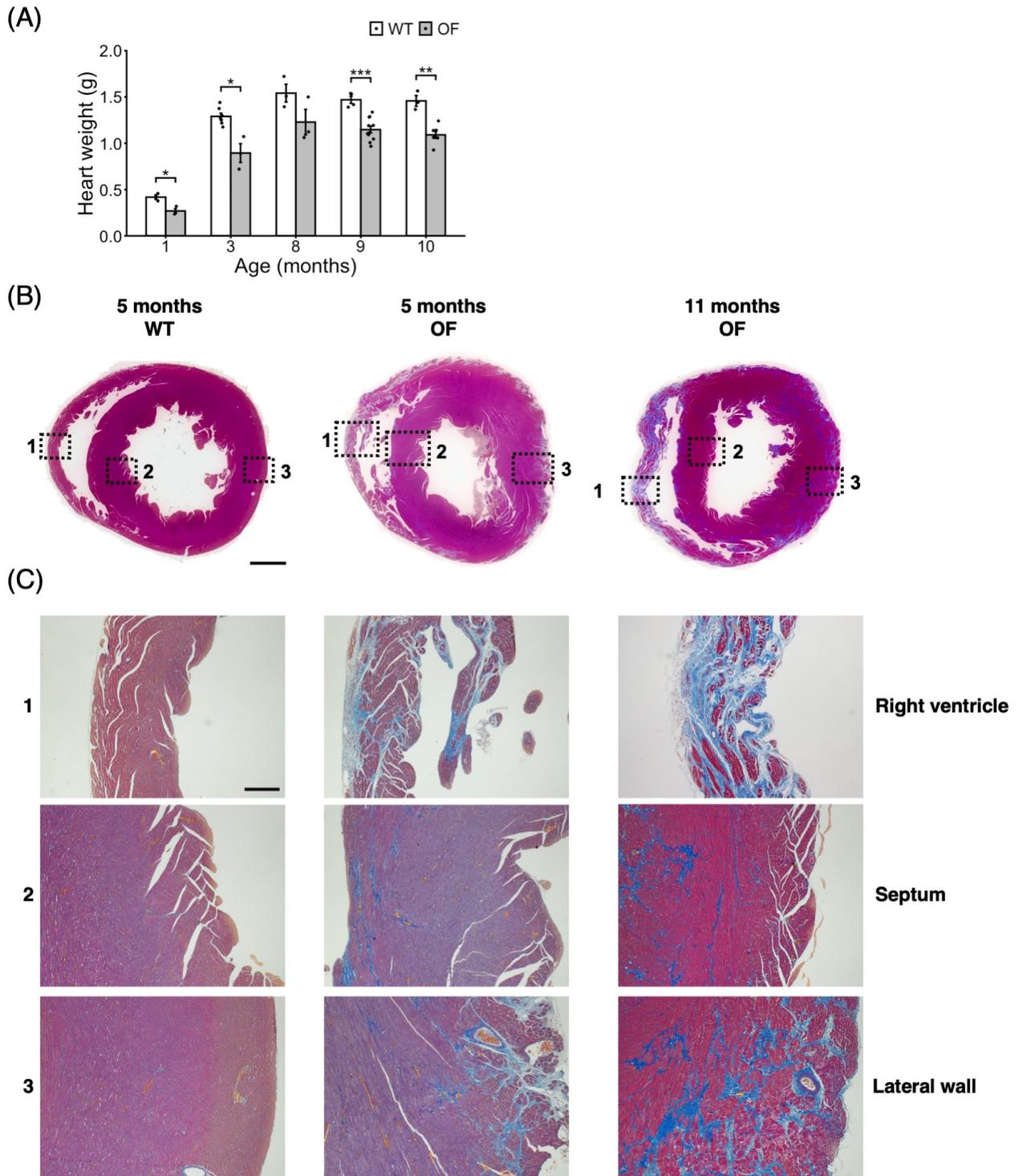


Fig. 1-2-1 OFラット心筋組織の表現型解析 (次項に続く)

- (A) 1-10ヶ月齢のWT、OFラットの心重量。データは平均値±標準誤差で表した。WT: n = 3, 7, 3, 4, 3; OF: n = 3, 3, 3, 11, 7。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (t-test, vs age-matched WT)。
- (B) WT、OFラットにおける心病理切片におけるマッソントリクローム染色の全体像。Scale bar = 2 mm。
- (C) B)における1、2、3で示された箇所を拡大した図。上段から、右室、中隔、左室自由壁の順に示した。Scale bar = 250 μ m。

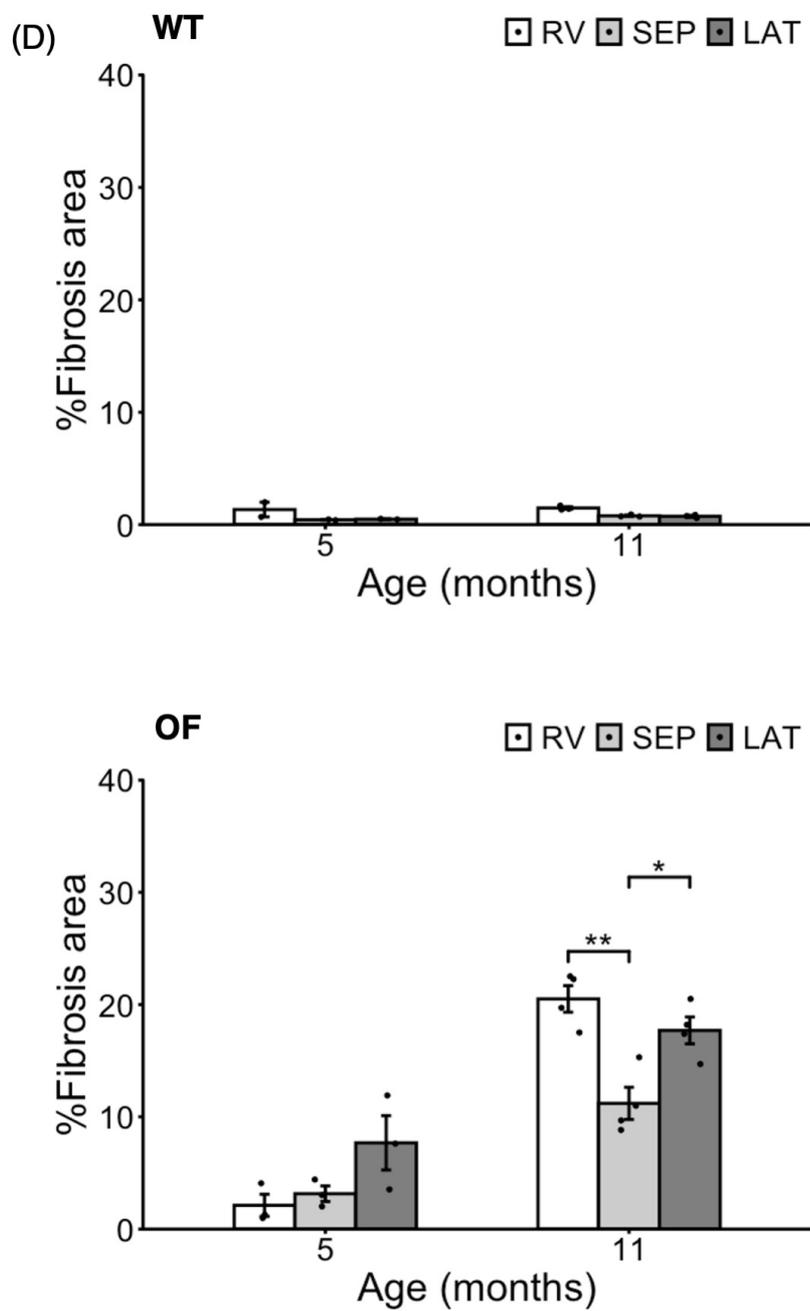


Fig. 1-2-1 OFラット心筋組織の表現型解析

(D) 5、11ヶ月齢のWT、OFラットにおける、心臓各部のマッソントリクローム染色陽性面積の割合。
 (上段: WT; 5 months: n = 2; 11 months: n = 3。下段: OFラット; 5 months: n = 3; 11 months: n = 4)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01 (Tukey Kramer's test)。

第二章

細胞老化が筋ジストロフィー病態病悪化に関与する可能性の検討

緒言

細胞老化は細胞が分裂を繰り返すうちに、次第に分裂を不可逆的に停止する *in vitro* の現象として見いだされた (Hayflick and Moorhead, 1961)。しかし、近年の研究によって、細胞老化は分裂過多のみではなく、酸化ストレスを含む DNA 損傷刺激によっても誘導され、さらに細胞老化は培養細胞だけではなく、生体の中でも誘導されることがわかってきた (Krishnamurthy et al., 2004; Parrinello et al., 2003)。細胞が老化すると、いくつかの特徴的な表現型を示すことが知られている。①核の膨化や細胞の扁平化、② β -galactosidase の活性上昇 (Senescence associated β -galactosidase activity: SA- β Gal activity)、③p16^{INK4A} や ARF、p21 などの細胞分裂抑制因子の発現などである (Muñoz-Espín and Serrano, 2014)。p16 と ARF は共通の遺伝子である *CDKN2A* 遺伝子にコードされるタンパク質である。*CDKN2A* 遺伝子は3つの exon から構成され、p16 はその中の exon1 α , exon2 及び exon3 によってコードされている。一方で、ARF の mRNA は exon1 β と呼ばれる *CDKN2A* 遺伝子座の別の exon から転写されるが、exon2 以下は p16 と共通した構造を持つ (Fig. 2-0)。しかし、ARF は exon1 β からの読み枠が異なるため、p16 とアミノ酸の相同性はないという特徴がある (Sharpless and Chin, 2003)。ARF は、ヒトにおいては 14 kDa のタンパク質として翻訳されるため、p14^{ARF} と呼ばれる一方、マウスやラットでは 19 kDa であるため、p19^{ARF} と呼ばれる。

老化細胞のもうひとつの特徴的な表現型として近年注目を集めているのが、細胞老化随伴分泌現象 (Senescence associated secretory phenotype: SASP) である。老化した細胞は単に分裂を停止するだけではなく、IL-6 や TGF- β を始めとした様々な液性因子を分泌することが知られており、これを SASP という (Kuilman et al., 2008; Tominaga and Suzuki, 2019)。細胞老化は、加齢や様々な病的状態において誘導され、SASP によって特発性肺線維症、肝線維症、動脈硬化などの多様な加齢性疾患、炎症性疾患の病態に関与することが近年明らかとなってきた (Childs et al., 2016; Ogrodnik et al., 2017; Schafer et al., 2017)。さらに、骨格筋においては老齢マウスにおける筋衛星細胞の細胞老化が、分裂停止によって筋衛星細胞数の減少や、筋再生能の低下につながることを示されている (Sousa-Victor et al., 2014)。

DMD 患者では、筋の持続的な損傷によって慢性炎症が誘導され、骨格筋中の酸化ストレスが増加する (Petrillo et al., 2017; Verhaart and Aartsma-Rus, 2019)。骨格筋における細胞内酸化ストレスの産生には活性酸素種の産生を司る NADPH oxidase (NOX) が関与することが知られており (Cully and Rodney, 2020)、TGF- β 、NF- κ Bなどの炎症因子によって発現が調節されている (Chen et al., 2012)。これに加えて DMD では慢性炎症に伴ってマクロファージや好中球などの炎症細胞由来の活性酸素種も酸化ストレスを上昇させる (Kozakowska et al., 2015)。酸化ストレスは細胞老化の原因のひとつであることから、DMD では慢性炎症に伴う酸化ストレスの蓄積が細胞老化を誘導する可能性が考えられる。実際、DMD 患者

由来の骨格筋初代培養細胞では、細胞老化に特徴的な細胞の扁平化や、分裂能の低下などが観察されている (Blau et al., 1983)。そこで、本章では DMD ラットを用いて、DMD において細胞老化が誘導されているかどうか、及び、病態進行に細胞老化が関与する可能性を検討した。

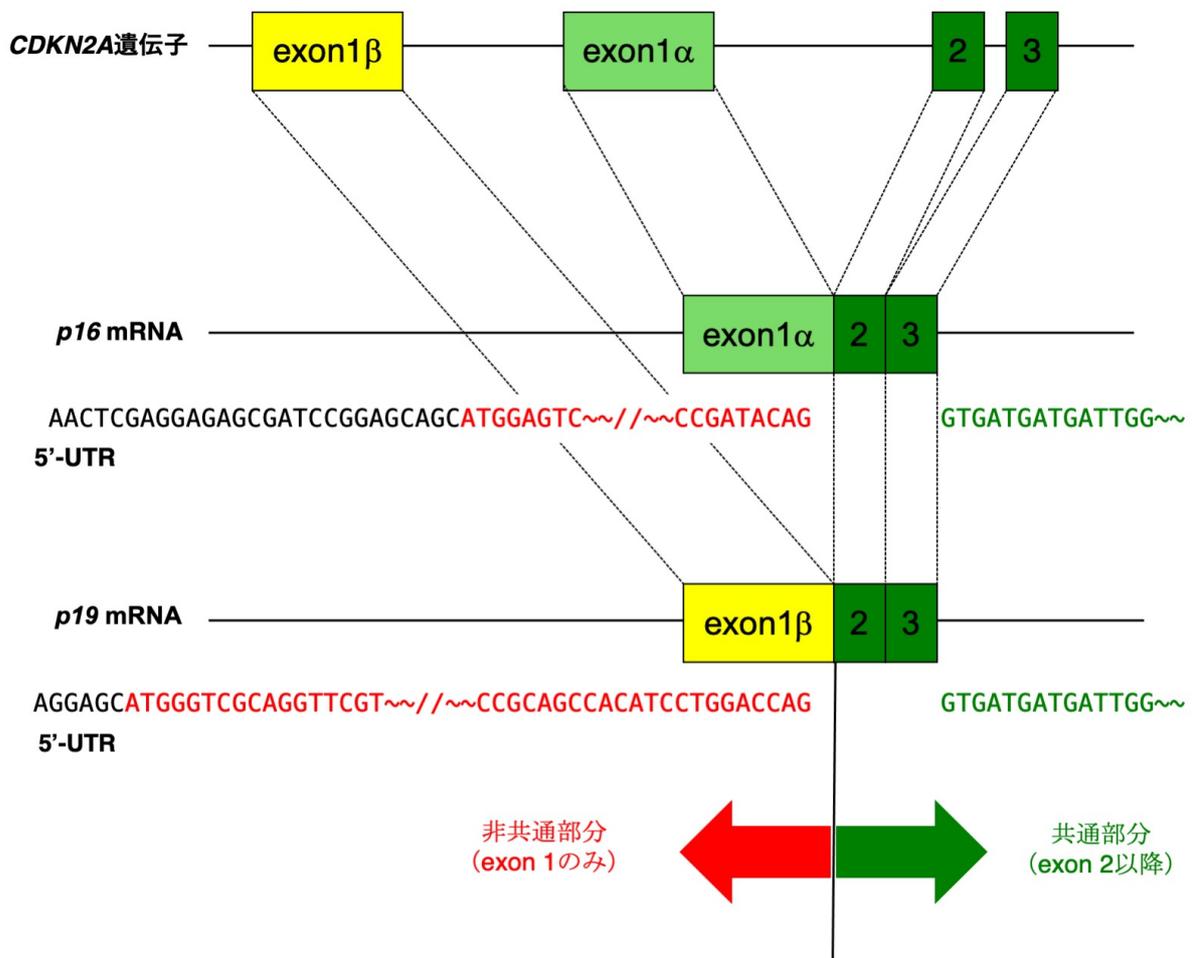


Fig. 2-0 CDKN2A遺伝子とp16、p19 mRNAの構造

CDKN2A遺伝子の構造と、p16、p19 mRNAの関係を図示した。p16、p19はexon2、3は共有するが、exon1が異なる。

材料と方法

DMD 患者生検サンプル

国立精神・神経センターの西野一三博士、小笠原真志博士のご協力の下、DMD 患者の骨格筋生検・剖検組織を実験に使用した。これらの実験は「東京大学倫理審査委員会 (19-322)」および「国立精神・神経センター倫理委員会 (A2019-031)」の承認を得、2013 年のヘルシンキ宣言の研究倫理基準に則って行われた。また、患者及び両親のインフォームドコンセントも得られている。2-33 歳の 34 人の DMD 患者が実験に参加した。この内 23 人についてはジストロフィン遺伝子の変異を特定しているが、残りの患者については典型的な症状、及び筋組織切片におけるジストロフィンに対する免疫原性の低下から DMD と診断された (Table 2)。神経筋疾患が疑われたが、骨格筋組織切片上で病変が認められなかった患者のサンプルを、非 DMD 患者筋コントロールとして実験に用いた。

CRISPR/Cas 法による p16 欠損ラットの作出

5 週齢のメス Wistar-Imamichi ラットに 25 IU の妊馬血清性性腺刺激ホルモン (equine chorionic gonadotropin: eCG) を投与し、48 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin: hCG) を投与することで過排卵を誘起し、WT オスラットと交配させた。hCG 投与約 20 時間後に受精卵を回収し、マイクロインジェクターを用いて、4 pl の 10 µg/ml gRNA と 10 µg/ml Cas9 mRNA を含む溶液を受精卵に注入した (NARISHIGE、東京、日本)。受精卵を M16 培地中で 2 時間ほど培養し、回復させたあと、偽妊娠させた 8 週齢のメス Wistar-Imamichi ラットの卵管膨大部に移植した。F0 ラット出生後、新生児から尻尾の先端を切除し、下記に示すようにゲノム抽出を行った。gRNA 標的配列付近に Forward、Reverse のプライマーを設計し (Forward, 5'-CAC TGAATC TCC GAG AGG AAG G-3'; Reverse, 5'-ATT ACC TGG GGT ATA CAT TTC ATG C-3')、抽出したゲノム DNA を用いて PCR 反応を行ったあと、アガロースゲル電気泳動後に Gel/PCR エクストラクションキット (日本ジェネティクス、東京、日本) を用いてゲル抽出を行った。これを BigDye Terminator (Applied Biosystems、CA、USA) と上記 Forward プライマーを用いて、以下の組成、温度、時間で反応させ、サンガーシーケンスを行った。

サンガーシーケンス反応液の組成

BigDye Terminator	2 µl
ゲル抽出産物	2 µl
Forward Primer	1 µl

Total Volume

約 20 μ l

反応条件

96°C、1分

96°C、30秒

56°C、15秒

60°C、4分

27 サイクル

反応産物を、エタノールを用いた常法において精製後、ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA) を用いてシーケンスに供し、変異部位を特定した。

動物と飼育条件

CRISPR/Cas 法による off-target 効果を減弱させるため、p16 にヘテロで変異を持つ $p16^{+/-}$ メスラットを、WT オスラットと 6 代以上交配を重ねた。p16 にヘテロで変異を持つ $p16^{+/-}$ オスラットをジストロフィン遺伝子にヘテロで変異を有する $X^{Dmd}X$ メスラットと交配させることで、最終的に $p16^{+/+}XY$ (WT)、 $p16^{+/-}XY$ 、 $p16^{-/-}XY$ 、 $p16^{+/+}X^{Dmd}Y$ (DMD ラット)、 $p16^{+/-}X^{Dmd}Y$ 、 $p16^{-/-}X^{Dmd}Y$ ラット (dKO ラット) を作出した。実験にはすべてオスラットを使用した。

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) 及び水は自由に摂取させた。全ての実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づいて行った。

ABT263 の投与

100%エタノール：ポリエチレングリコール 400：Phosal 50PG (少なくとも 50%のホスファチジルコリンとプロピレングリコールを含む標準化ホスファチジルコリン濃縮物 (Phospholipid GmbH, Cologne, Germany)) を、1:3:6 になるように混合し、これを溶媒として ABT263 の粉末 (AdooQ Bioscience, CA, USA) を 4°C で一晩攪拌し、溶解した。8 ヶ月齢の WT、DMD ラットに対して、毎日体重を測定し、ゾンデを用いて $18.75\text{ mg/kg weight/day}$ で 7 日間経口投与した。2 週間休薬期間を設け、さらに 7 日間同様のプロトコルで経口投与した。

遺伝子型の判定 (ジェノタイピング)

出生後、尻尾を先端から 1-2 mm ほど切断し、ジェノタイピングに用いた。これに 180 μ l の 50 mM NaOH を加え、 95°C 、10 分間加熱処理した。20 μ l の 1M Tris-HCl (pH 8.0) を加えたのち遠心 (12,000 rpm、10 分) し、上清を回収した。これを 1-2 μ l 用い、KOD FX (東洋紡、

大阪、日本) を用いて以下の組成、温度、時間にて PCR 反応を行った。

PCR 反応液の組成

2×PCR buffer	10 µl
2 mM dNTP	4 µl
滅菌超純水	4 µl
Forward Primer	0.6 µl
Reverse Primer	0.6 µl
KOD FX	0.4 µl
Template (DNA)	1-2 µl
<hr/>	
Total Volume	約 20 µl

PCR 反応条件

94°C、2分

94°C、10秒

60°C、20秒

68°C、1分 /kb

36 サイクル

PCR に用いたプライマーを下記に示す。 *Dmd*: Forward, 5'-AGT TTC CAT CAA TAG CCA TAC CAA A -3'; Reverse, 5'-TCT CAG TGT ACA AGT GTG ACG AAC A- 3', *p16*: Forward, 5'-CAC TGA ATC TCC GAG AGG AAG G-3'; Reverse, 5'-ATT ACC TGG GGT ATA CAT TTC ATG C-3'。 PCR 産物を MultiNA (島津製作所、京都、日本) を用いてアガロース電気泳動することによりジェノタイプを判断した。

グリップテスト

前肢の筋力 (kg) をマウス・ラット用握力測定装置 GPM-101B/V (メルクエスト、富山、日本) を用いて計測した。ラットの尻尾を持ち、ラットが T 字グリップを握ったのを確認した瞬間に、ラットを測定装置に対して水平遠位方向に牽引し、ラットが手を離すまでの最大筋力を記録した。これを連続して 10 回行い、その中で最大の数値を筋力の指標として解析に用いた。

サンプリング (筋組織および血液の採取)

ラットから、血清、心臓、前脛骨筋、ヒラメ筋および大腿四頭筋を採取した。以下にその

方法を示す。イソフルランによる吸入麻酔下の動物を開腹し、腹大動脈から全採血を行った。血液を室温で30分以上静置したのち遠心し(2,000 rpm、30分、4°C)、血清を採取した。採取した血清は-20°Cで保存した。心臓、前脛骨筋、ヒラメ筋は採取後、周囲の結合組織を取り除いたのち、それぞれの重量を測定した。採取した前脛骨筋を、超純水と混合したTRAGACANTH GUM粉末(和光純薬、大阪、日本)を用いてコルク上に固定し、液体窒素で冷却した2-メチルブタン(和光純薬)中で急速に凍結させた。採取した大腿四頭筋は、後述するラット骨格筋初代培養細胞の採取に使用した。

組織切片の染色

1. 組織切片の免疫染色

凍結した筋組織を-20°Cに設定したクリオスタット(MICROM International GmbH、Walldorf、Germany)内で30分馴致させ、O.C.T.コンパウンド(Tissue-Tek、Sakura Finetek U.S.A、CA、USA)によりコルクごと台に固定し、厚さ7µmの凍結切片を作成した。余分な切片はMASコート付きスライドガラス(松浪硝子工業、大阪、日本)上に貼り付け、風乾させたのち、-80°Cで保存した。ヒト凍結組織切片は国立精神・神経センターにおいて作成された。保存した切片は、使用する際には室温に戻し、風乾させた後に実験に用いた。作成したラット前脛骨筋凍結切片、またはヒト骨格筋組織生検切片を10分間風乾後、4%パラホルムアルデヒド(Paraformaldehyde: PFA、和光純薬)を含むリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline: PBS)にて15分間固定した。PBSにより3回洗浄したのち、5%正常ヤギ血清(Normal Goat Serum: NGS、Vector laboratories、Burlingame、CA、USA)と0.1%のTriton-X(Sigma、MO、USA)を50倍希釈した31% H_2O_2 を含むPBSにて20分間ブロッキングし、同時に内因性ペルオキシダーゼを失活させた。洗浄後、ラット組織切片には5%NGS/PBSで100倍に希釈した抗Embryonic myosin heavy chain(eMHC)マウスモノクローナル抗体(F1.652、Developmental Studies Hybridoma Bank、Iowa City、IA、USA)、ヒト組織切片には100倍希釈した抗lamininウサギポリクローナル抗体(Sigma)、100倍希釈した抗Pax7マウスモノクローナル抗体(DSHB)、100倍希釈した抗PDGFR α ヤギポリクローナル抗体(R&D、MN、USA)、Negative controlとして、通常マウスモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnologies、TX、USA)を4°Cで一晩反応させた。ラット組織切片には、二次抗体にはヒストファインシンプルステインMAX-PO(M)(ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)を用いて室温で1時間反応させた。3,3'-diaminobenzidine(DAB)を用いて、50 mg DAB/100 ml PBS溶液に50 µlの31% H_2O_2 (和光純薬)を添加し、1-5分反応させ、褐色の色素沈着を確認した。このとき、Negative controlでは褐色の色素沈着が見られないことを確認した。核の対比染色にはマイヤーヘマトキシリン溶液(和光純薬)に5分反応させ、流水で5分洗浄したあとに核が紫色に染色されていることを確認した。エタノール(和光純薬)、キシレン(和光純薬)を用いて脱水・透徹を行った後、切片をMultimount(松浪硝子工業)により封入し、観察を行った。ヒト組織切片には、二次抗体液として5%NGS/PBSで500倍に希釈したAlexa Flour® 488

標識ロバ抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch laboratories, PA, USA) または Alexa Flour® 488 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch laboratories)、及び Alexa Flour® 594 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immunoresearch laboratories) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS にて 0.1 µg/ml に希釈した hoechst33258 (同仁化学研究所) 溶液を 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡下で観察・撮影を行った。

2. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色および Masson's trichrome 染色

東京大学獣医病理学教室において実施した。前脛骨筋凍結切片に対し、HE 染色および Masson's trichrome 染色を施した。写真はデジタルカメラ (DP73: Olympus、東京、日本) を搭載した蛍光顕微鏡 (Olympus) を用いて撮影された。線維化面積の定量は、Masson's trichrome 染色を施した切片における写真画像から CellProfiler (Broad Institute, MA, USA) を用いて青色の画素及び切片全体の画像を抽出し、それらの面積を定量したあとに、青色の面積を切片全体の面積で除することによって行った。

3. RNAScope を用いた、CDKN2A mRNA に対する *in situ* hybridization

CDKN2A mRNA の検出には、RNAScope キット (RNAScope 2.5HD Reagent kit Brown or Red、コスモ・バイオ、東京、日本) を用いた。ラット及びヒト新鮮凍結切片を 4% PFA/PBS で 15 分間、4°C で反応させたあと、内因性のペルオキシダーゼをキット付属の RNAScope Hydrogen Peroxide で失活させた。次に、付属の RNAScope Protease 4 液を 30 分間反応させた後に、ラットサンプルでは RNAScope-Probe-Rn-Cdkn2a (コスモ・バイオ) を、ヒトサンプルでは RNAScope-Probe-Hs-CDKN2A (コスモ・バイオ) をハイブリダイズさせた。付属の AMP1-6 でシグナルを増幅した後、DAB もしくは Fast Red を用いて発色させ、ラットサンプルではマイヤーヘマトキシリン、ヒトサンプルでは Hoechst33258 を用いて対比染色を行った後に封入し、観察を行った。

ウェスタンブロット

1. 筋組織からのタンパク質抽出

クリオスタットにて薄切した筋切片 (厚さ 7 µm、約 50 枚) をあらかじめ -20°C に冷却した 1.5 ml 遠心チューブ (Beckman Coulter, CA, USA) に集め、50-200 µl の RIPA buffer (0.1% SDS、2 mM EDTA、1% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、50 mM NaF、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl) を加え、4°C、15,000 rpm で 30 分間の遠心を行ったのち、上清を別のチューブに回収した。プロテインアッセイ BCA 試薬 (和光純薬) を用いてタンパク質濃度を測定したあと、5-10 µg/µl になるように必要ならば RIPA buffer で希釈し、6x Sample buffer (0.35M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% Glycerol、3.1% Dithiothreitol) を添加した。沸騰水中で 100°C、5 分加熱処理し、S-S 結合を切断した。

2. SDS-PAGE とブロッティング

サンプルを、SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。各レーンに 20-25 μg のタンパク質をアプライし、泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS) 中で 150V の低電圧下で約 1 時間泳動した。ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD、Hercules、CA、USA) に転写バッファー (10% メタノール、25 mM Tris、190 mM Glycine) を加え、45V の定電圧下で一晩ブロッティングを行い、ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへ転写を行った。その後、メンブレンを取り出し、5% スキムミルク/TBS-T (0.1% Tween 20/TBS) に浸し、室温で 1 時間ブロッティングした。一次抗体には TBS-T で 1000 倍に希釈した抗 Perilipin ウサギポリクローナル抗体 (Cell signaling Technology、MA、USA)、抗 Smad3 ウサギポリクローナル抗体 (Cell signaling Technology)、抗 pSmad3 ウサギポリクローナル抗体 (Cell signaling Technology)、抗 Vinculin ウサギポリクローナル抗体 (Cell signaling Technology) を用いて 4°C で一晩反応させた。反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら TBS-T にて 5 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/TBS-T で 8,000 倍希釈した Horseradish Peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Laboratory) を用い、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare、Chalfont Saint Giles、UK) により発光させ、ChemiDoc XRS+システム (BIO-RAD) により画像を取得し、画像処理により各タンパク質の定量を行った。

細胞培養と免疫染色

1. ラット骨格筋初代培養細胞

採取した大腿四頭筋を PBS に浸した。筋に付着している結合組織を除去したのち、10 cm シャーレ (BD Falcon、NJ、USA) に骨格筋を移し、鋏で細かく刻んだ。細切した組織をそれぞれ Protease type XIV : Bacterial (EC、3、4、24、31) from *Streptomyces griseus* (Sigma、最終濃度 1.25 mg/ml) を含む 40 ml の PBS により 37°C で 1 時間酵素処理した。酵素処理終了後、3,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。再び 37°C の PBS を加え攪拌し、1,000 rpm の遠心分離を行い、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 3,000 rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿した細胞を 10% Fetal Bovine Serum/DMEM+50 U/ml Penicillin+ 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin (10% FBS/DMEM+PSG: 通常培地) に懸濁し、70 μm 径の Cell Strainer (BD Falcon) を用いて濾過した。得られた細胞は poly-L-lysine (Sigma) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen、CA、USA) でコートした 48-well プレート (IWAKI、千葉、日本) に、1 個体当たり 2 well になるように播種した。細胞は通常培地にて、37°C、湿度飽和、5%CO₂-95%空気条件下で培養した。培養開始 24 時間後に培地交換を行ったのち、培養開始 48 時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。プレートのコートにあたっては、まず培養表面を poly-L-lysine で 5 分間処理し、滅菌超純水で 3 回洗浄してよく乾燥させた。さらに、0.001%

の human plasma fibronectin を含む DMEM で 30 分以上処理し、細胞を播種する直前に吸引除去した。

2. 培養細胞の免疫染色

4% PFA/ PBS で各ウェルを満たし、室温で 15 分間反応させることにより、細胞の固定を行った。PBS で 3 回洗浄後、5% NGS + 0.1% Triton-X を含む PBS にて 20 分間ブロッキングした。再度 PBS で洗浄後、一次抗体液を 4°C で一晩反応させた。一次抗体液として、5% NGS/PBS で希釈した抗 Pax7 マウスモノクローナル抗体 (1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank: DSHB, IA, USA)、抗 MyoD マウスモノクローナル抗体 (1:200; Novocastra, Wetzlar, Germany) を用いた。反応終了後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体液として 5% NGS/PBS で 500 倍に希釈した Alexa Flour® 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体または Alexa Flour® 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS にて 0.1 µg/ml に希釈した hoechst33258 (同仁化学研究所、熊本、日本) 溶液を 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡下で観察・撮影を行った。画像解析には、Fiji のプラグインである、U-net を用いた Deep learning を使用した (Computer vision group: University of Freiburg) (Falk et al., 2019)。Hoechst を撮影した画像と染色画像を合成したのち、Fiji を用いて陽性核を Annotation し、数枚の教師データを作成した。Google colabatory が提供するクラウド GPU を用いて、Computer vision group が提供するモデルに対して教師データを学習させ、モデルを最適化した。同モデルを用いて各画像から陽性核の数を自動抽出させた。

3. MACS を用いた CD45 陽性細胞の除去と、培養細胞の SA-βGal 染色

3 ヶ月齢の WT、DMD ラット骨格筋初代培養細胞を上記 1 に示すように採取し、得られた細胞の沈殿を、マグネットビーズが付加された抗ラット CD45 抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 溶液で懸濁・反応させた。その後、Manual MACS Separator (Miltenyi Biotec) に設置した LS カラム (Miltenyi Biotec) 中に反応させた細胞を流し、CD45 陽性細胞を除去した。得られた細胞は poly-L-lysine (Sigma) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen) でコートした 48-well プレート (IWAKI) に播種した。培養 2 日目に、Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて fixation buffer で 10 分細胞を固定したあと、Staining solution で 15 時間、37°C で培養し、PBS で洗浄後に観察を行った。

4. RNAScope を用いた、Cdkn1a、Cdkn2a mRNA に対する *in situ* hybridization とその後の免疫染色

CDKN2A mRNA の検出には、RNAScope キット (RNAScope 2.5HD Reagent kit Brown、コスモ・バイオ、東京、日本) を用いた。培養 2 日目のラット骨格筋初代培養細胞を 4% PFA/PBS で 15 分間、4°C で反応させたあと、内因性のペルオキシダーゼをキット付属の RNAScope

Hydrogen Peroxide で失活させた。次に、付属の RNAScope Protease 4 液を 10 分間反応させた後に、細胞膜を可溶化するために 0.1% Triton-X/PBS で 20 分反応させた。RNAScope-Probe-Rn-Cdkn1a (コスモ・バイオ) または RNAScope-Probe-Rn-Cdkn2a (コスモ・バイオ) をハイブリダイズさせ、付属の AMP1-6 でシグナルを増幅した後、DAB を用いて発色させた。*Cdkn1a*、*Cdkn2a* mRNA を発現する細胞種を同定するために続けて免疫染色を行った。5% NGS + 0.1% Triton-X を含む PBS にて 20 分間ブロッキングした。再度 PBS で洗浄後、一次抗体液を 4°C で一晩反応させた。一次抗体液として、抗 Pax7 マウスモノクローナル抗体 (1:200、DSHB)、抗 MyoD マウスモノクローナル抗体 (1:200、Novocastra)、抗 CSPG4 マウスモノクローナル抗体 (1:50、当研究室で作出 (Takeuchi et al., 2016))、PE 標識抗 CD45 マウスモノクローナル抗体 (1:100、BD Biosciences、NJ、USA)、抗 CD31 ウサギポリクローナル抗体 (1:100、フナコシ、東京、日本)、抗 von Willebrand factor ヒツジポリクローナル抗体 (1:100、Bio-Rad) を用いた。反応終了後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体液として 5% NGS/PBS で 500 倍に希釈した Alexa Flour® 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体または Alexa Flour® 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS にて 0.1 µg/ml に希釈した hoechst33258 (同仁化学研究所) 溶液を 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡下で観察・撮影を行った。

5. 初代培養細胞に対する活性型 TGF-β1 添加

初代培養細胞をプレートに播種する際には、通常培地の代わりに 10%ウマ血清 (Horse Serum: HS)/DMEM を用いた。培養開始 24 時間後の培地交換時に 0、1、10、100 ng/ml の Recombinant Human TGF-β1 Protein (R&D) を添加した。24 時間毎に TGF-βの量を同濃度に調整した培地を用いて培地交換し、最終的に培養開始 120 時間後に細胞を固定し、SA-βGal 染色、または RNA の回収を行った。

6. 骨髄由来マクロファージの作成

ラットから両側の大腿骨を単離し、骨端を骨鉗子で切り取り、19G 針、20ml シリンジ、DMEM only (Gibco) を用いて骨髄腔内を洗い出し、チューブに回収した。70µm のセルストレイナーを通し、450g 5min 4°Cで遠心後、5ml ACK lysis buffer (NH₄Cl 155 mM、KHCO₃ 10 mM、EDTA 0.1mM) を用いて室温で 30 秒反応させた。赤血球を溶血した後、即座に PBS で 50 ml まで mess up し、450g 5 min 4°Cで遠心した。これを 10% FBS/RPMI (ナカライテスク、京都、日本) +PSG+2-ME (50 µM)+M-CSF (最終濃度 10 ng/ml; PeproTech、NJ、USA)+Gluta-Max (Gibco) に懸濁し、10cm Petri dish 1 枚あたり 5 ml として 2 枚に播種した。2 日後に medium を変えずに、10% FBS/DMEM+PSG+M-CSF+Gluta-Max (①) を 5ml 加えた。以降 2 日ごとに上清を抜去し、①の medium を 5 ml 添加した。播種後 7 日目に解析に用いた。

筋損傷マーカーの測定

血中クレアチンキナーゼ値 (Creatine kinase: CK) の測定

-20°C で保存した血清を融解し、富士ドライケムシステム (富士フィルム、東京、日本) を用いて CK 値を測定した。CK 値が測定範囲を超過している場合は、0.9% 生理食塩水を用いて希釈してから再度測定した。

前脛骨筋中の TGF-β濃度測定

TGF-βの濃度の測定には human TGF-beta 1 Quantikine ELISA kit (R&D) を用いた。手順は Kit 付属のプロトコルに準じた。サンプルは RIPA バッファーを用いてタンパク抽出を行った。TGF-βは pH の低下によって活性型になることが知られているため、HCl によって酸処理を行った群、および酸処理を行っていない群の 2 群にサンプルを分けた。Kit 付属の抗 TGF-β抗体は活性型 TGF-βを認識部位とするため、酸処理を行ったサンプル (全ての TGF-βが活性化状態) を TGF-βの総量、酸処理を行っていないサンプルを活性型 TGF-βの量として解析した。

定量的 PCR

1. RNA の抽出

クリオスタットにて薄切した筋切片 (厚さ 7 μm、約 50 枚) をあらかじめ-20°C に冷却したチューブに回収し、TRIZOL Reagent (Invitrogen) を加え、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行った後、上清を新しいチューブに移した。1 ml の TRIZOL Reagent に対して 200 μl のクロロホルム (和光純薬) を加え、攪拌したのちに、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上層の透明な水層を別のチューブに回収した。これと等量のイソプロピルアルコール (和光純薬) を加え、攪拌し、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行った。上清を捨て、70%エタノール 500 μl (和光純薬) を加え、さらに 15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、風乾させたのちに 10-20 μl の Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を加え、RNA を溶解させた。得られた RNA は、NanoDrop One (ThermoFisher Scientific、MA、USA) にて濃度を測定した。

2. 逆転写反応

まず、以下に示した反応溶液を 65°C で 15 分間処理したのち、氷上で急冷した。

Total RNA (1-2 μg)	5 μl
Oligo d(T) (Invitrogen)	1 μl
<hr/>	
Total volume	6 μl

次に、以下に示す反応溶液を用いて 42°C で 60 分間逆転写反応を行った。

Total RNA+Primer	6 μ l
dNTP (2 mM、Applied biosystems)	5 μ l
5 \times RT buffer	4 μ l
0.1M DTT	2 μ l
Super Script-II (Invitrogen)	1 μ l
RNase Inhibitor (Applied biosystems)	1 μ l
DEPC 処理水	1 μ l
Total volume	20 μl

反応終了後、94°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷した。

3. 定量的 PCR

逆転写反応によって得られた cDNA を用い、Light Cycler 2 (Roche、Basel、Switzerland) を用いた qPCR により各遺伝子の発現を定量した。内部標準遺伝子としては、*Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT)* を用いた。各サンプルの cDNA 量から増幅される *HPRT* 遺伝子 PCR 産物量がほぼ同じになるように cDNA 量を合わせたのち、各遺伝子に対応するプライマーを用いて定量的 PCR を行った。定量的 PCR に用いたプライマーを下記に示す。

ラット

Gene Name	F/R	Sequence (5' \rightarrow 3')
<i>Hprt</i>	F	GACCGGTTCTGTCATGTCG
	R	ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC
<i>Tnfα</i>	F	GCCCAGACCCTCACACTC
	R	CCACTCCAGCTGCTCCTCT
<i>Il1β</i>	F	TGTGATGAAAGACGGCACAC
	R	CTTCTTCTTTGGGTATTGTTTGG
<i>Ifnγ</i>	F	AGCATCCATGCTACTTGAGTTAAA
	R	TTTTGCAGCTCTGCCTCAT
<i>Nox4</i>	F	GAACCCAAGTTCCAAGCTCA
	R	GCACAAAGGTCCAGAAATCC
<i>p16</i>	F	TTCACCAAACGCCCCGAACA
	R	CAGGAGAGCTGCCACTTTGAC
<i>p19</i>	F	GTGTTGAGGCCAGAGAGGAT
	R	TTGCCCATCATCATCACCT

<i>p21</i>	F	GACATCTCAGGGCCGAAA
	R	GGCGCTTGGAGTGATAGAAA
<i>p15</i>	F	AGGGCCACCGTGATATTG
	R	GTTCTGGAAGGCCAGCAG
<i>p53</i>	F	AGAGAGCACTGCCCACCA
	R	AACATCTCGAAGCGCTCAC
<i>Il6</i>	F	CCCTTCAGGAACTATGAA
	R	ACAACATCAGTCCCAAGAAGG
<i>Tgfβ1</i>	F	CCTGGAAAGGGCTCAACAC
	R	CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA
<i>Bmp4</i>	F	TGGGATGTTCTCCAGATGTTC
	R	CGGGCTTGAGTACCCTGAG
<i>B2m</i>	F	CCGTGATCTTTCTGGTGCTT
	R	GTGGAAGTGGACACGTAGC
<i>Dep1</i>	F	AACCGCTACAACAACGTCCT
	R	TCGTCTGTCTGAATGGGTCTG
<i>Fgf2</i>	F	TCTTCCTGCGCATCCATC
	R	GCTTGGAGCTGTTAGTTTGACG
<i>Mmp2</i>	F	CACCACCGAGGATTATGACC
	R	CACCCACAGTGGACATAGCA
<i>Ctgf</i>	F	GGTGACCTAGAGGAAAACATTAAGA
	R	CCGGTAGGTCTTCACACTGG

ヒト

Gene Name	F/R	Sequence (5' → 3')
<i>HPRT</i>	F	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
	R	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT
<i>p16</i>	F	CTGCCCAACGCACCGAATAG
	R	CACGGGTCGGGTGAGAGT
<i>p14</i>	F	CTACTGAGGAGCCAGCGTCTA
	R	CTGCCATCATCATGACCT
<i>p21</i>	F	CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG
	R	CATGGGTTCTGACGGACAT

また、標準検量線作成のために別途 cDNA を 20 倍、200 倍、2,000 倍希釈した三段階の濃

度のサンプルを用いて、各プライマーセットに対して標準検量線を作成した。超純水は全て MilliQ 超純水製造装置 (Millipore) により精製されたものを用いた。なお陰性対照には cDNA の代わりに滅菌超純水のみを用いた。cDNA、0.5 mM のプライマー、THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix (東洋紡) を以下の組成で混合した。

希釈した cDNA	5 μ l
滅菌超純水	4 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
SYBR qPCR Mix	10 μ l
Total volume	20 μ l

以下の条件で PCR 反応を行った。72°C を 1 分間維持するフェーズが終了した時点で蛍光度を検出し、これを 1 サイクルごとに行った。

95°C	1 分	45 サイクル
95°C	5 秒	
60°C	30 秒	
72°C	1 分	

各遺伝子発現量を *HPRT* 遺伝子発現量により除した値を定量 PCR による各遺伝子の相対的な発現量とした。

4. 半定量的 PCR

逆転写反応によって得られた cDNA を用いて PCR を行った。PCR 混合溶液の組成および反応条件はジェノタイピングに準じた。また、使用したプライマー及び PCR サイクル数については Table 1 に示した。PCR 産物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色し、観察した。

Gene Name	F/R	Sequence (5' → 3')	Cycle No.
<i>p16</i>	F	GATCCGGAGCAGCATGGAGT	40
	R	CATTATGTATTTTTTTAAAGCCATATGC	
<i>Pax7</i>	F	ACGATGAGGAAGGAGACAAAAA	40
	R	GGTACTGAACCAGACCTGGAC	
<i>Myod1</i>	F	AAGTGAACGAGGCCTTCGAG	40
	R	GCCGCTGTAATCCATCATGC	

<i>Pdgfrα</i>	F	CTTGCAATCCGTCAGTAGCA	40
	R	ATAACCCTAGCCGAGGACGT	
<i>Cd31</i>	F	TTGTGACCAGTCTCCGAAGC	40
	R	TTCCGTTCTCTTGGTGAGGC	
<i>Cd11b</i>	F	GGCAGAGTGTGATCCAGCTT	40
	R	TCGATCGTGTTGATGCTACCG	
<i>Hprt</i>	F	GCTGGTGAAGGACCTCT	40
	R	CACAGGACTAGAACRYCTGC	

セルソーティング

1. C₁₂FDG を用いた SA- β Gal 染色

培養開始から 2 日経過した骨格筋初代培養細胞に対して、通常培地で 100 nM に希釈した bafilomycin A1 (Sigma) を 2 ml/35 mm dish (BD Falcon) で加え、1 時間 37°C でインキュベートした。その後、通常培地で 10 倍に希釈した最終濃度 2 mM の 5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranoside (C₁₂FDG、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を 33 μ l 加え、2 時間 37°C でインキュベートした。

2. サンプルの調製とセルソーティング

SA- β Gal 染色を終えた細胞の上清を除去した後、10 mM の EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)/PBS を加えて 10 分インキュベートした。その後、セルスクレーパー (SARSTEDT AG. Co、Nümbrecht、Germany) を用いて細胞をディッシュから剥がした。剥がした細胞を回収し、2% FBS/PBS で懸濁した後、3000 rpm、3 分、4 °C で遠心分離し、上清を除去した。沈殿した細胞を 200 μ l の 2% FBS/PBS 再懸濁し、一次抗体を氷上で 10 分間反応させた。一次抗体として抗 β 2-microglobulin 抗体 (PE-conjugated; BD Biosciences) を 1 μ l、抗 CD45 抗体 (Alexa647-conjugated; BD Biosciences) を 1 μ l 用いた。反応終了後、2% FBS/PBS を 500 μ l 加えることによって洗浄し、3000 rpm、3 分、4 °C で遠心分離し、上清を除去した。上記のように調整したサンプルをポアサイズ 40 μ m のセルストレイナー (BD Falcon) で濾過し、BD FACSAria III (BD Biosciences) を用いて細胞 C₁₂FDG⁺B2M⁺CD45⁻の分画の細胞を採取した。

統計処理

数値データは平均値 \pm 標準誤差で示し、生データを黒点で表した。2 群間の比較は Unpaired Welch's *t*-test (two-tailed) を用いて行った。3 群以上の場合には Tukey-Kramer's test を用いた検定を行った。ABT263 投与実験において、投与前後における体重、筋力の変化を検定する際には、paired *t*-test (two-tailed) を用いた。危険率 5%未満をもって有意な差があると判定した。

グラフの描画や p 値の計算は統計ソフト R (ver.4.0.0) を用いて行われた。

結果

DMD ラットにおける炎症および酸化ストレス産生因子の発現

細胞老化は、炎症に伴う酸化ストレスの蓄積などによって誘導される。そこで、DMD ラット前脛骨筋における炎症因子、酸化ストレス産生に関わる因子の発現を調べた。その結果、*Tnfa*の発現量には WT、DMD ラット間で有意な差は認められなかったが、*Il1β*は後期、*Ifnγ*は早期から DMD ラットにおいて発現上昇が認められた (Fig. 2-1A)。このような炎症性サイトカインの発現上昇に伴って、DMD ラットでは3ヶ月齢から野生型に比べて、骨格筋の酸化ストレス産生に関わる、*Nox4* の発現上昇が観察され、さらに加齢に伴ってその発現が上昇していた (Fig. 2-1B)。以上の結果から、DMD ラットでは、炎症に伴って3ヶ月齢から加齢性に酸化ストレスが蓄積することが示唆された。

DMD ラット骨格筋における老化細胞の出現

DMD ラットにおいて細胞老化が誘導されているかどうかを検討した。細胞老化時には細胞分裂が停止するため、細胞分裂を抑制する因子の発現が上昇する。そこで、DMD ラット前脛骨筋において細胞分裂抑制因子である、*p15*、*p16*、*p19*、*p21*、*p53* の発現量を調べた。その結果、*p53* の発現量には WT、DMD ラット間で大きな変動は見られなかったが、それ以外のいずれの因子においても加齢に伴う発現上昇が認められた (Fig. 2-2)。*p53* はリン酸化されることによって機能を発揮するため、mRNA レベルでは差が見られなかった可能性がある。特に、細胞老化に最も特異的なマーカーである *p16* の発現が3ヶ月齢から上昇していたことから、DMD ラットにおいて3ヶ月齢から細胞老化が誘導されることが示唆された。次に、SASP 因子として *Il6*、*Tgfb1*、*Bmp4* の発現量を測定したところ、DMD ラットにおいて *Tgfb1* の発現上昇や、*Il6* の発現上昇傾向が認められた (Fig. 2-3A)。老化細胞は表面抗原マーカーとして、Major histocompatibility complex (MHC) class1 構成要素の一つである β 2-microglobulin (B2M) や、チロシン脱リン酸化酵素である Density enhanced protein tyrosine phosphatase-1 (DEP-1) の発現量が高いことがわかっている (Althubiti et al., 2014)。これらの遺伝子の発現量を測定したところ、両者ともに DMD ラットにおいて発現が上昇していた (Fig. 2-3B)。老化細胞を同定する方法として、SA- β Gal 染色も頻用される。しかし、SA- β Gal 染色は、もともと β -galactosidase 発現量の高いマクロファージも陽性として染色するという問題点がある。実際、WT 骨髄から M-CSF によって誘導した通常のマクロファージは、SA- β Gal 染色陽性になることが確認された (Fig. 2-4A)。そこで、マクロファージなど偽陽性の細胞を除去するため、3ヶ月齢の WT、DMD ラット骨格筋初代培養細胞において MACS によって CD45 陽性の免疫細胞を除去したあとに、SA- β Gal 染色を行った。その結果、WT ではほとんど SA- β Gal 染色陽性細胞が観察されない一方で、DMD ラットでは約 40%の細胞が

SA- β Gal 染色陽性であった (Fig. 2-4B, C)。以上の結果から、DMD ラットでは細胞老化が誘導されることが明らかになった。

DMD ラットにおける老化細胞種の同定

次に、老化細胞種を同定するために、RNA Scope を用いて *p16*、*p19* をコードする遺伝子である *Cdkn2a* mRNA に対する *in situ* hybridization (ISH) を行った。*p16*、*p19* はともに細胞老化に特異的なマーカーであることから、ISH に用いたプローブは、exon1 α 、exon2、exon3 を標的とする領域に設計し、*p19* も同時に検出される形にした。6 ヶ月齢の WT、DMD ラット前脛骨筋において *Cdkn2a* mRNA に対する ISH を行ったところ、WT では *Cdkn2a* mRNA のシグナルは検出されないものの、DMD ラットでは、筋線維、及び単核の細胞群に *Cdkn2a* の発現が認められた (Fig. 2-5A, B)。単核の細胞群について、その老化細胞種を同定するために、DMD ラット骨格筋初代培養細胞において *Cdkn2a* mRNA に対する ISH を行った後に、各細胞種特異的なマーカーを用いて免疫染色を行った。なお、間葉系前駆細胞のマーカーとして、ヒトやマウスでは PDGFR α が用いられるが、ラットでは現状のところこれを染色できる抗体が存在しない。当研究室では、以前にラット骨格筋では CSPG4 が間葉系前駆細胞に特異的なマーカーであることを同定しており (Takeuchi et al., 2016)、本章では CSPG4 に対する抗体を用いてラット間葉系前駆細胞を染色した。その結果、*Cdkn2a* mRNA は Pax7 陽性の筋衛星細胞、および CSPG4 陽性の間葉系前駆細胞に発現していた (Fig. 2-6A)。一方で *Cdkn2a* mRNA の発現は CD45 陽性の免疫細胞や、CD31 陽性の血管内皮細胞には見られなかった (Fig. 2-6A)。筋衛星細胞、及び間葉系前駆細胞における *Cdkn2a* mRNA 陽性細胞の割合を定量したところ、6 ヶ月齢では Pax7 陽性細胞のうち約 50%、CSPG4 陽性細胞のうち約 25%が *Cdkn2a* を発現していた (Fig. 2-6B)。p21 をコードする *Cdkn1a* 遺伝子に対する ISH を行ったところ、*Cdkn2a* 遺伝子の場合と同様に *Cdkn1a* mRNA は Pax7 陽性の筋衛星細胞、および CSPG4 陽性の間葉系前駆細胞に発現し、CD45 陽性の免疫細胞や、von Willebrand factor (vWF) 陽性の血管内皮細胞には発現しなかった (Fig. 2-6C)。また、*Cdkn2a* のシグナルは WT 由来の骨格筋初代培養細胞においては観察されなかった (Fig. 2-7)。次に、セルソーターを用いて老化細胞の単離を試みた。 β -galactosidase に代謝されることによって緑色の蛍光を発する物質である C₁₂FDG、及び老化細胞表面抗原マーカーである B2M を用いて、C₁₂FDG⁺B2M⁺CD45⁻の細胞を老化細胞として単離した。この集団では RT-PCR によって *p16* の発現が確認されたほか、Fig. 2-6 と同様に筋衛星細胞のマーカーである *Pax7*、*Myod1*、間葉系前駆細胞のマーカーである *Pdgfra* も発現していた (Fig. 2-8)。また、マクロファージのマーカーである *Cd11b* や、血管内皮細胞のマーカーである *Cd31* は発現しないことも確認された。

以上の結果から、DMD ラットでは筋線維に *Cdkn2a* が発現し、筋衛星細胞及び間葉系前駆細胞に細胞老化が誘導されることが明らかになった。

p16 欠損ラット及び p16 欠損 DMD ラットの作出

細胞老化が DMD の病態進行に関与するかどうかを検討するために、DMD ラットにおいて p16 を欠損させることで細胞老化の抑制を試みた。そこで、CRISPR/Cas 法を用いて p16 遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットを作出した (Fig. 2-9A, B)。同ラットでは *Cdkn2a* 遺伝子座の exon1 α 上に 7 塩基の欠損を認め、予測アミノ酸配列では exon2 の起始部位で終止コドンが誘導されていた (Fig. 2-9B)。この p16 欠損ラットを DMD ラットと交配させる事によって、p16 欠損 DMD ラット (dKO ラット) を作出した。これらのラットにおいて実際に p16 のタンパク質が欠損しているかどうかを確認するために、9 ヶ月齢の p16^{+/+} XY (WT)、p16^{+/-}XY、p16^{-/-}XY、p16^{+/+}X^{Dmd}Y (DMD ラット)、p16^{+/-}X^{Dmd}Y、p16^{-/-}X^{Dmd}Y ラット (dKO ラット) の前脛骨筋抽出タンパク質を用いて p16 に対するウェスタンブロットを行った。その結果、*Dmd* 遺伝子に変異を持たないラットでは p16 の発現が確認されないものの、p16^{+/+}X^{Dmd}Y ラット (DMD ラット) では p16 の発現が確認され、Fig. 2-2A の結果と一致した。一方、p16^{-/-}X^{Dmd}Y ラット (dKO ラット) では p16 タンパク質の完全な欠損が確認され、p16 遺伝子にヘテロで変異を持つ p16^{+/-}X^{Dmd}Y では DMD ラットの半分ほど p16 が発現していた (Fig. 2-9C)。以上の結果から、p16 遺伝子に導入された変異によって、実際にタンパク質レベルでも p16 の発現が消失していることが確認された。

p16 欠損が DMD ラットの全身状態に与える影響

p16 の欠損が DMD ラットの全身状態に与える影響を評価した。dKO ラットでは、DMD ラットにおいて観察された消瘦や、脊柱の後弯が改善され、四肢の麻痺も改善していた (Fig. 2-10)。経時的に体重を測定したところ、*Dmd* 遺伝子に変異を持たないラットでは p16 の変異に関わらず同じように経時的な体重増加を示した。一方、*Dmd* 遺伝子に変異を持つラットでは、DMD ラットにおいて約 6 ヶ月齢から認められる体重減少が、p16 の欠損に伴って緩和されていた (Fig. 2-11A)。経時的に筋力を測定したところ、9 ヶ月齢において、DMD ラットで認められる筋力低下が、p16 発現量の減少 (+/-)、欠損 (-/-) に伴って改善していた (Fig. 2-11B)。Fig. 2-10A で認められた dKO ラットにおける体重増加に伴って、心重量の増加が認められた (Fig. 2-12A)。さらに前脛骨筋とヒラメ筋において筋重量を測定したところ、いずれにおいても p16 の欠損に伴って DMD ラットでは筋重量が増加していた (Fig. 2-12B)。以上の結果から、p16 の欠損によって DMD ラットの全身状態が改善することが明らかになった。

p16 欠損が DMD ラットの骨格筋組織像に与える影響

上記で観察された全身の病態改善効果に伴って骨格筋組織像がどのように変化するかを検討するために、WT、DMD ラット、dKO ラット前脛骨筋切片の HE 染色を行い、組織像を観察した。その結果、DMD ラットで認められた重度の骨格筋組織の線維・脂肪化が、dKO ラットの一部の個体では野生型と同程度まで減少しているような像が観察された (Fig. 2-

13)。実際に筋の線維・脂肪化を定量するために、前脛骨筋組織切片においてマッソントリクローム染色および、前脛骨筋組織切片抽出タンパク質を用いて Perilipin に対するウェスタンブロットを行った。その結果、p16 の欠損によって、DMD ラットで見られた線維化や脂肪化が減少していたが、dKO ラット全体でみると野生型と同程度までには線維・脂肪化は改善していなかった (Fig. 2-14A, C; Fig. 2-14B, D)。当研究室の先行研究によって bFGF は間葉系前駆細胞の脂肪化を促進することが示されている (Nakano et al., 2016)。そこで WT、DMD ラット、dKO ラット前脛骨筋を用いて bFGF をコードする遺伝子である *Fgf2* の発現量を測定したが、ジェノタイプ間で有意な差は認められなかった (Fig. 2-15)。以上の結果から p16 の欠損によって DMD ラットの線維・脂肪化の減少などの病態改善効果が認められることが明らかになった。一方で、筋損傷マーカーである CK 値は dKO ラットにおいても DMD ラットに比べて有意な減少は見られなかった (Fig. 2-16)。

p16 欠損が DMD ラットの筋再生能に与える影響

前脛骨筋切片において eMHC に対する免疫染色を行ったところ、p16 発現量の減少 (+/-)、欠損 (-/-) によって切片あたりの eMHC 陽性筋線維数が増加していた (Fig. 2-17A, B)。骨格筋初代培養細胞において筋再生を司る筋衛星細胞の数を測定したところ、p16 の欠損によって DMD ラットにおける Pax7 陽性、MyoD 陽性細胞数の増加が認められた (Fig. 2-18A, C; Fig. 2-18B, D)。以上のことから、p16 の欠損が DMD ラットにおける筋再生能を亢進させることが示された。

p16 欠損が DMD ラットの SASP、細胞老化関連因子に与える影響

p16 の欠損が SASP に与える影響を調べるために、SASP 因子のうち、*Il1 β* 、*Tgf β 1*、*Il6*、*Mmp2*、*Connective tissue growth factor (Ctgf)* に関して定量的 PCR を行い、WT、DMD ラット、dKO ラット前脛骨筋におけるそれぞれの発現量を比較した。その結果、DMD ラットにおいて p16 の欠損によって *Tgf β 1*、*Mmp2*、*Ctgf* の発現量が減少していた (Fig. 2-19A)。また、p16 の欠損によって実際に細胞老化が抑制されているかどうかを調べるために、細胞老化関連因子である *p15*、*p19*、*p21* の発現量を測定したところ、dKO ラットでは DMD ラットに比べて *p15*、*p21* の発現量が減少していた (Fig. 2-19B)。以上の結果から、p16 の欠損によって細胞老化が抑制され、一部の SASP 因子の発現が低下することがわかった。

ABT263 が DMD ラットの病態に与える影響

以上の dKO ラットに関する研究から、p16 の欠損によって DMD の病態を改善できることが明らかになった。しかし、p16 の欠損は癌化のリスクを上昇させ、特に DMD ラットでは 9 ヶ月齢以降において横紋筋肉腫の発生を誘発することが示されている (寺本、博士論文)。そこで、DMD の新たな治療法を探る上で、Bcl-2 の阻害剤である ABT263 に着目した。ABT263 は抗アポトーシス因子である Bcl-2 を阻害し、細胞にアポトーシスを誘導すること

によって老化細胞を特異的に除去することが報告されている (Chang et al., 2016)。しかし、抗がん剤としても使用されるため、長期投与では血小板減少症などの副作用を起こす可能性がある。そこで、末期の病状を呈すると考えられる 8 ヶ月齢の DMD ラットに ABT263 を 18.75 mg/kg で 1 週間毎日経口投与した後に、2 週間休薬期間を置き、さらに 1 週間毎日経口投与した後、サンプリングし、その病態を解析した (Fig. 2-20)。ABT263 の投与によって、DMD ラットでは細胞老化関連因子 *p16*、*p19*、*p21* の発現量が減少することが確認された (Fig. 2-21)。さらに、前脛骨筋切片における *Cdkn2a* mRNA に対する ISH の結果から、切片あたりの *Cdkn2a* 陽性細胞数の減少が認められた (Fig. 2-22A, B)。以上の結果から、老化細胞が効果的に除去されていることがわかった。

Vehicle 投与群では、投与前後において、病態の進行に伴って体重、筋力が低下した。一方で、ABT263 投与群ではこのような体重、筋力の低下がみられず (Fig. 2-23A, B)、病態の進行を抑制することが示された。

ABT263 が DMD ラットの骨格筋組織像に与える影響

ABT263 が骨格筋組織像に与える影響を評価するために、Vehicle 投与群、及び ABT263 投与群の前脛骨筋組織切片においてマッソントリクローム染色および、前脛骨筋組織切片抽出タンパク質を用いて Perilipin に対するウェスタンブロットを行った。その結果、p16 欠損時と異なり、ABT263 投与群では、線維・脂肪化に関して Vehicle 投与群と有意な差は認められなかった (Fig. 2-24A, C; Fig. 2-24B, D)。以上のことから、本投薬プロトコルでは ABT263 は線維・脂肪化に対して改善効果を持たないことがわかった。

ABT263 が DMD ラットの筋再生能に与える影響

前脛骨筋切片において eMHC に対する免疫染色を行ったところ、ABT263 投与群では Vehicle 投与群に比べて切片あたりの eMHC 陽性筋線維数が増加していた (Fig. 2-25A, B)。骨格筋初代培養細胞において筋衛星細胞数をカウントしたところ、Vehicle 投与群と ABT263 投与群でその数に差が認められなかった (Fig. 2-26A, C; Fig. 2-26B, D)。以上の結果から、ABT263 は筋衛星細胞以外の経路によって筋再生能を亢進させる可能性が示された。

ABT263 が SASP 因子の発現に与える影響

ABT263 投与群では老化細胞数の減少に伴って SASP 因子の発現が低下する可能性が考えられる。そこで、Vehicle 投与群、及び ABT263 投与群において前脛骨筋切片から抽出した mRNA を用いて、SASP 因子のうち、*Il1 β* 、*Tgfb1*、*Il6*、*Mmp2*、*Ctgf* に関して定量的 PCR を行った。その結果、ABT263 投与群では、*Il1 β* 、*Tgfb1*、*Il6* の発現が低下しており (Fig. 2-27)、実際に SASP 因子の発現が抑制されていることが示された。

DMD ラットにおける細胞老化誘導機構の探索

以上の結果から、細胞老化を抑制することによって DMD の病態改善、または病態進行の抑制が可能であることが判明した。TGF- β は DMD 患者で発現増強がみられること、筋衛星細胞の分裂を抑制すること (Rathbone et al., 2011)、骨格筋では NADPH oxidase 4 (NOX-4) の発現上昇を介して、細胞老化の原因である酸化ストレスの形成に関与すること (Yan, 2014) が知られている。また、老化細胞から分泌される TGF- β が傍分泌的に作用して、近接した細胞の細胞老化に重要な役割を果たしていること (Acosta et al., 2013) から、TGF- β は DMD ラットにおける細胞老化の誘導に重要な役割を果たしていると推察される。実際、DMD ラットでは *Tgfb1* や *Nox4* の発現量が亢進していた (Fig. 2-3A; Fig. 2-1B)。そこで、DMD ラット骨格筋で細胞老化が誘導される機構の一つとして TGF- β が関与する可能性について調べた。タンパク質レベルにおいて TGF- β 1 の発現量が亢進しているかを確認するために、前脛骨筋において ELISA を用いて TGF- β のタンパク質量を定量したところ、TGF- β の総量は 1 ヶ月齢から DMD ラットにおいて増加していたが (Fig. 2-28A)、活性型 TGF- β は 3 ヶ月齢から DMD ラットで発現が認められ、加齢に伴ってその発現量が上昇していた (Fig. 2-28B)。このような活性型 TGF- β の発現上昇に伴って、TGF- β の下流シグナルである Smad3 のリン酸化が亢進していた (Fig. 2-29A, B)。実際に TGF- β が骨格筋において細胞老化を誘導するかどうか検討するために、WT 由来骨格筋初代培養細胞 (WT では初代培養細胞中に約 95%の純度で筋芽細胞を取得できるため、以降 WT 由来筋芽細胞と記す (Tatsumi et al., 2006)) において活性型 TGF- β の添加実験を行った。その結果、活性型 TGF- β を添加した群では細胞老化マーカーの p16 の発現上昇が認められ (Fig. 2-30A)、活性型 TGF- β 濃度非依存的に SA- β Gal 染色陽性細胞数が増加した (Fig. 2-30B)。以上の結果から、活性型 TGF- β の存在によって、実際に筋芽細胞に細胞老化が誘導されることが明らかになった。

ヒト DMD 患者における老化細胞の出現

最後に、ヒト DMD 患者においても細胞老化が誘導されているかどうかを検討した。本実験には 10 人の非 DMD 患者と、2-33 歳の 34 人の DMD 患者が参加した (Table 2)。DMD 患者由来骨格筋及び非 DMD 患者由来骨格筋を用いて細胞老化関連因子である *p16*、*p14*、*p21* の発現量を定量的 PCR によって測定した。その結果、*p16* の発現は 3 歳以上の DMD 患者骨格筋において認められた一方、非 DMD 患者骨格筋では検出されなかった (Fig. 2-31A)。*p14*、*p21* に関しては DMD 患者において有意な発現上昇が認められ、2 歳から発現が上昇していた (Fig. 2-31A)。以上の結果から、ヒト DMD 患者においても若齢から細胞老化が誘導されている可能性が示された。ヒト DMD 患者における老化細胞種を同定するために、患者骨格筋切片において *CDKN2A* mRNA に対する ISH を行った。ISH は、ランダムに抽出された、5 人の DMD 患者 (患者番号: 12、25、30、35、40) 及び、3 人の非 DMD 患者 (患者番号: 7、8、9) の骨格筋組織切片を用いて行った。その結果、ヒトにおいても Pax7 陽性細胞、PDGFR α 陽性細胞において *CDKN2A* の発現が認められた (Fig. 2-31B)。一方で、筋線維における *CDKN2A* の発現は認められなかった。以上の結果から、ヒト DMD 患者においても筋

衛星細胞および間葉系前駆細胞に細胞老化が誘導されていることがわかった。

考察

本章の研究から、DMD ラットでは慢性炎症に伴って細胞老化が誘導されることが明らかとなった。さらに遺伝学的手法や薬剤によって細胞老化を抑制することで DMD ラットの病態が改善されることも示した。細胞老化はヒト DMD 患者においても誘導されることが示唆され、ヒト DMD 患者における治療法の開発への応用も期待される。

本研究によって老化細胞種として筋衛星細胞や間葉系前駆細胞が同定されたため、DMD の病態進行にはこれらの細胞が関与する可能性がある。まず、筋衛星細胞の細胞老化が DMD の病態進行に関与する機序について考察する。人工的にテロメラーゼを欠損させた mdx マウス (mdx/mTR マウス) では筋衛星細胞の分裂能が低下し、加齢性に数が減少することで病態が重篤化する (Sacco et al., 2010)。テロメアの短縮は細胞老化の一因であることから、mdx/mTR マウスにおける病態の重篤化は、筋衛星細胞の細胞老化を原因とする可能性がある。老齢マウス由来の筋衛星細胞では、細胞老化によって自己複製能が低下し、十分な幹細胞プールを維持できず、結果として筋損傷時に筋再生不全が生じる (Sousa-Victor et al., 2014)。また、老齢マウス由来の筋衛星細胞では筋損傷時における MyoD 陽性細胞の割合が減少しており、筋衛星細胞が活性化されにくくなる (Sousa-Victor et al., 2014)。さらに、DNA 損傷ストレス応答によって筋芽細胞に細胞老化が誘導されると、筋分化能が低下することが報告されている (Latella et al., 2017)。以上のことから、DMD ラットに見られた加齢性の筋衛星細胞数の減少や、筋再生能の低下は、筋衛星細胞の細胞老化による分裂停止、または分化不全が原因である可能性がある。

このような細胞老化による筋衛星細胞自身の性質変化に加えて、老化した筋衛星細胞と他細胞との crosstalk も興味深い。筋衛星細胞は VEGF α を発現することによって血管内皮細胞を自身の近傍に誘導することが知られている (Verma et al., 2018)。血管内皮細胞は Notch ligand である Dll4 を発現することで筋衛星細胞の Notch 受容体に結合し、筋衛星細胞の未分化性を保ち、幹細胞プールの維持に寄与する。Mdx マウスでは筋衛星細胞における VEGF α の発現低下に伴って、筋の血管密度が減少するが、血管内皮細胞特異的に VEGF signal を増強することで筋再生能の亢進や、全身病態が改善することが見いだされている (Verma et al., 2019)。VEGF α は血管内皮細胞に作用するのみならず、単球の浸潤を促進する作用も持つ。筋衛星細胞は筋損傷時に CCL22、CX3CL1 や VEGF α などを発現することによって単球を自身の近傍に誘導し、単球由来の液性因子によって自身の増殖を促進させる他、アポトーシスも抑制するという報告がある (Chazaud et al., 2003)。本研究では ABT263 の投与によって IL-6 などの SASP 因子の発現低下が認められたため、老化細胞は SASP によって IL-6 を分泌する可能性がある。通常の筋再生過程では、マクロファージは炎症性マクロファージ (M1) から筋再生の進行に伴って抗炎症性マクロファージ (M2) へ分化し、炎症を終息させること

で正常な筋再生に貢献する。しかし、過剰な M2 は骨格筋の線維化を促進すること (Mann et al., 2011) や、IL-6 はマクロファージの M2 への分化を促進すること (Luckett-Chastain et al., 2016; Sanmarco et al., 2017) が報告されている。このことから、老化筋衛星細胞由来の IL-6 は、マクロファージを過剰に M2 に分化誘導させ、間接的に線維化を促進する可能性がある。以上から、筋衛星細胞では細胞老化によって VEGF α や CCL22、IL-6 などの液性因子分泌動態が変化した結果、筋衛星細胞と血管内皮細胞、単球、マクロファージとの正常な相互作用が破綻し、これが DMD の病態進行につながった可能性がある。

また、細胞老化によらず、先天的に筋衛星細胞に異常が生じている可能性もある。近年の研究によってジストロフィンタンパク質は筋衛星細胞においても発現することが明らかになってきた (Dumont et al., 2015)。筋衛星細胞は非対称分裂を行うことによって、筋分化が可能な筋芽細胞を作るが、筋衛星細胞におけるジストロフィンタンパク質の発現がこの非対称分裂の形成に関与することが示されている (Dumont et al., 2015)。Fig. 1-1-9 において、経時的に Pax7 陽性細胞数と MyoD 陽性細胞数を測定したが、細胞老化が誘導されていない 1 ヶ月齢から DMD ラットにおいて筋衛星細胞数の低下が認められていた。このことから、DMD ラットにおいても筋衛星細胞の活性化不全や、ひいては分裂異常による筋衛星細胞数の減少が細胞老化以前に誘導されている可能性がある。本研究では ABT263 が DMD の病態進行を抑制することが示されたが、将来的に ABT263 が奏効しても上記筋衛星細胞の先天的な問題は改善できないため、エキソンスキップ療法や、ジストロフィンの発現を回復させた筋衛星細胞を移植する細胞療法も併用可能になることが望まれる。現在これらの治療法開発研究は盛んに行われており、今後の研究が期待される分野である (Motohashi et al., 2019)。

次に、間葉系前駆細胞の細胞老化が DMD の病態進行に関与する機序について考察する。近年の研究によって間葉系前駆細胞は筋衛星細胞の幹細胞プールの維持に重要な役割を果たすことがわかってきた。実際、*Pdgfra-Cre* マウスを用いて長期間に間葉系前駆細胞を死滅させると、筋衛星細胞数の減少や筋再生能の低下が認められる (Wosczyzna et al., 2019)。また、老齢マウスの間葉系前駆細胞における *Wisp-1* の発現低下が、筋衛星細胞の自己複製能の低下や筋分化能の低下を招くことも明らかになってきた (Lukjanenko et al., 2019)。さらに、*mdx* マウスにおいて微細な針で筋損傷を誘導することで線維化を亢進させ、ヒト DMD に近い病態を示すようになったマウスでは、間葉系前駆細胞において TGF- β を活性化させる BMP1 や MMP14 の発現が上昇することが報告されている (Juban et al., 2018)。活性型 TGF- β は線維化に重要な因子である (Meng et al., 2016) のみならず、筋衛星細胞の増殖、活性化、分化を抑制する働きも持つ (Allen and Boxhorn, 1987; Carlson et al., 2008)。以上のことから、DMD ラットでは、間葉系前駆細胞の細胞老化によって SASP を介して液性因子の分泌動態が変化し、これが筋衛星細胞の自己複製能の低下や、筋分化能の低下に繋がった可能性が考えられる。本研究において ABT263 の投与は老化細胞数を減少させていたため、老化した筋衛星細胞や間葉系前駆細胞にアポトーシスが誘導されたことが示唆される。そのため、ABT263 投与群では筋衛星細胞の総数が減少することが予想されるが、Vehicle 投与群との間で筋衛

星細胞の総数に差は認められなかった。これは、上記に述べた機序によって老化間葉系前駆細胞による筋衛星細胞分裂抑制効果が解除され、アポトーシスによる筋衛星細胞数の減少を補填したことを示唆している。さらに、Vehicle 投与群と ABT263 投与群で筋衛星細胞の総数に群間で差が見られないことから、ABT263 投与群でみられた筋再生能の亢進は、老化間葉系前駆細胞由来の SASP による筋分化の抑制が解除されたことによるものかもしれない。

本研究によって DMD ラットでは筋線維においても *Cdkn2a* が発現することが明らかになり、*Cdkn2a* 陽性筋線維が病態進行に関与する可能性も考えられる。近年では、最終分化して分裂が停止した細胞においても、酸化的ストレス等によって細胞老化様の表現型がみられることがわかってきている (Jurk et al., 2012; Minamino et al., 2009)。DMD ラットでは慢性的な炎症によって持続的な酸化的ストレスの亢進が予測され、これが筋衛星細胞や間葉系前駆細胞のみならず、筋線維核においても *Cdkn2a* の発現を促し、細胞老化様の表現型を獲得させる可能性も考えられる。近年の研究によって、骨格筋は単なる運動器官であるのみならず、マイオカインと呼ばれる液性因子を分泌することで全身性に影響を与えうる内分泌器官であることが明らかになってきた (Carson, 2017; Pedersen and Fischer, 2007)。仮に筋線維において細胞老化様の表現型が獲得されたとすると、筋線維核の一部が SASP 様の表現型を獲得し、マイオカインの組成、発現量が変動する可能性が考えられる。しかし、実際にこのような機序が働いているかどうかについては今後のより詳細な検討が必要である。

本研究によって TGF- β は DMD ラット骨格筋において細胞老化を誘導する可能性が示された。これまで、TGF- β は筋芽細胞の分裂、増殖から分化、融合に至るまで幅広く筋分化を抑制することが知られていたが、今回新たに筋芽細胞に対して細胞老化誘導効果を持つことが明らかになった。筋衛星細胞は Notch signaling によって自身の幹細胞性を維持しているが、老齢時には筋衛星細胞の Notch signaling が低下し、幹細胞プールが維持されにくくなることがわかっている (Conboy et al., 2003)。この時、老齢マウスの筋衛星細胞において TGF- β /Smad3 signaling が活性化すると、筋衛星細胞に p15、p16 などの細胞周期抑制因子が発現することが示されている (Carlson et al., 2008)。このことから、Notch signaling は筋衛星細胞の未分化性を維持するのみではなく、TGF- β による細胞老化誘導効果も抑制する可能性がある。上述したように DMD では筋衛星細胞における VEGF α の発現低下に伴って Notch ligand を発現する血管内皮細胞との crosstalk が破綻することが示されており、DMD ラットにおいても同機構が存在すると仮定すると、筋衛星細胞に TGF- β signal が惹起されると細胞老化が誘導されやすい状態になっていると考えられる。実際に本研究では活性化 TGF- β の発現が見られない 1 ヶ月齢では細胞老化は誘導されないが、3 ヶ月齢になり活性化 TGF- β が発現すると同時に細胞老化が生じることが示された。今後の研究によって TGF- β の細胞老化誘導能に対する WT、DMD ラット筋衛星細胞の感受性や、筋衛星細胞と血管内皮細胞との相互作用について比較検討することで、TGF- β が細胞老化を誘導する際に重要な因子の同定や、細胞老化抑制剤などの開発に寄与することが期待される。

細胞老化が誘導される機序として、TGF- β 非依存的な経路も考えられる。細胞老化はがん遺伝子の発現や、酸化ストレス、DNA 損傷ストレスなど、様々なストレスに応答して誘導される。DMD では、ジストロフィンの欠損によって筋線維の変性、破壊が繰り返された結果、筋線維細胞質が Damage associated molecular patterns (DAMPs) となって細胞外環境に放出され、マクロファージなどの Toll Like Receptor に結合し、自然免疫応答が誘発される (Rosenberg et al., 2015)。これによって炎症性細胞が活性化し、活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) が産生され、DMD 患者では進行性に酸化ストレスが蓄積する (Petrillo et al., 2017)。DMD 患者では2歳ごろから既に炎症細胞浸潤が認められ、これは病態が進行した患者においても観察される (Engel and Arahata, 1986; Skuk et al., 2006)。また、当研究室とは異なる DMD モデルラットを用いた研究において、DMD ラットでは2週齢から炎症細胞浸潤が見られ、8-12 週齢において炎症のピークを迎えるが、その後も炎症細胞浸潤は認められる (Ouisse et al., 2019)。細胞老化は、TNF- α や IFN γ などのサイトカインによっても誘導されることが知られている (Braumüller et al., 2013; Hubackova et al., 2016; Reimann et al., 2010)。これら TNF- α や IFN γ は、ヒト DMD 患者においても発現が増加しており、主に炎症性細胞から産生される (De Paepe and De Bleecker, 2013; Porreca et al., 1999; Song et al., 2017)。以上のことから、ヒト DMD 患者や DMD ラットに見られる持続的な炎症が、酸化ストレスや、細胞老化を誘導するサイトカインの発現上昇につながり、最終的に細胞老化を誘導した可能性がある。

本研究では、DMD ラット、ヒト DMD 患者骨格筋において細胞老化が誘導される可能性を示したが、ヒト DMD 患者では p14、p21 の発現量が高い一方、p16 の発現量は相対的に低かった。細胞老化は酸化ストレスや、がん遺伝子の発現、テロメアの短縮など、様々なストレスによって誘導される。細胞老化は通常 p53-p21 を介した経路、または p16-pRB を介した経路によって誘導される。これらの経路はお互いに相関しあっているが、単独でも細胞老化は誘導される (Campisi and di Fagagna, 2007)。しかし、p16 がどのような刺激によって誘導されるかは未解明な部分もまだ多い。例えば、酸化ストレスによって特定の細胞種では p16 が誘導されるが (Parrinello et al., 2003)、同じ刺激でも p16 が誘導されない場合もあり (Itahana et al., 2003)、細胞がどのように老化するかは、刺激の種類や、細胞種、動物種特異性が関与すると考えられている (Itahana et al., 2004)。このようなヒトとラットの種特異性の違いが細胞老化関連因子の発現動態の差となって表れたのかもしれない。

本研究では p16 の欠損のみならず、p16 の発現量が減弱するだけで病態の改善効果があることが示された。p16 はがん抑制遺伝子であるため、p16 の欠損は発がんリスクの上昇から治療標的には不相当であると考えられる。実際 dKO ラットでは9ヶ月齢から11ヶ月齢までに約50%の確率で横紋筋肉腫が発生する (寺本、博士論文)。しかし、p16 の発現を抑制するだけで病態改善効果が得られるのであれば、発がん抑制作用を維持しつつ、病態改善効果が得られるように p16 の発現をうまく調節する薬剤の開発に期待が持てるかもしれない。

p16 発現量の減弱が病態を改善した機序について考察する。近年の研究によって、老化細

胞はヒストン H3K9 のトリメチル化などによってエピジェネティックに様々な遺伝子発現のリプログラミングを行うため、一言に細胞老化といってもその中に様々な段階を持つ動的な現象であることが明らかになってきた (Lee and Schmitt, 2019)。例えば SASP に関して、培養細胞が細胞老化を起こすと、時間経過とともに液性因子の発現動態が様々な段階に変化することが示されている (De Cecco et al., 2019; Hoare et al., 2016)。また、分裂停止という表現型に着目しても、老化細胞において細胞分裂抑制に関与する Rb または p53 の発現を欠損させるだけで分裂を再開させることができる場合もあれば、p53 の欠損のみでは分裂停止を解除できないこともあり、分裂停止状態にも様々な段階があると考えられる (Beausejour et al., 2003; Sage et al., 2003)。p53 欠損時に分裂が再開できるかどうかは p16 の発現量が関与しており、細胞老化時に p16 の発現量が高いほど分裂再開が抑制されることが報告されている (Beausejour et al., 2003)。また、p16 は細胞分裂抑制作用を持つのみならず、直接 NF- κ B のサブユニットである p65 に結合し、液性因子の発現動態を制御するなど、多様な機能を持つことがわかってきた (Wolff and Naumann, 1999)。以上のことから、p16 の発現量の減少によって細胞老化がいわば「深い」状態から「浅い」状態に遷移することによって筋再生を司る筋衛星細胞の分裂再開が容易になり、なおかつ液性因子発現動態も変化することによって筋再生を抑制する SASP 因子の発現量が低下し、これらが病態を改善させた可能性がある。

本研究によって ABT263 の投与が老化細胞数を減少させ、DMD ラットの病態進行を抑制したことから、ABT263 は DMD の新たな治療薬として期待が持てる。現在までのところ、DMD の治療薬として、唯一ステロイドのみが有効な薬剤として使用されている。近年ではエキソンスキップやウイルスベクターを用いてジストロフィンの発現を直接回復させる取り組みが行われているが、最大で 5% 程度の筋線維にしか発現回復が認められず、効果は限定的であるとともに、ジストロフィンが非自己と認識されて免疫反応を誘発する危険もある (Motohashi et al., 2019; Shimizu-Motohashi et al., 2018)。さらに、エキソンスキップは患者の遺伝子変異パターンによっては使用ができない場合もある。本研究では、新たに細胞老化が治療ターゲットになりうることを明らかにした。p16 の発現抑制は癌化リスクの増大から現在のところ実現は難しいかもしれないが、老化細胞除去薬は 8 ヶ月齢という末期の病状を示すと考えられる時点からの投与においても奏効したことから、ヒトへの応用に期待が持てる。さらに、老化細胞除去薬は常に血中に存在せずとも十分であることが示唆されている。例えば、D+Q 合剤 (Dasatinib + Quercetin) は ABT263 とは異なる老化細胞除去薬であるが、これは老齢マウスにおいて 2 週間おきに一度投与すれば老化細胞数の減少に伴って寿命延長効果を発揮することがわかっている (Xu et al., 2018)。本研究において、DMD ラットの 1 ヶ月齢では p16 の発現は WT と同程度であったことや、DMD ラットの炎症は 2 週齢ころから始まること (Ouisse et al., 2019) と合わせて考えれば、少なくとも細胞老化が誘導されるには 2 週間以上の時間がかかることが予想される。したがって老化細胞除去薬の間欠的な投与のみで十分に病態改善効果が見られる可能性があり、副作用リスクを低減できる。しかし、本研究では WT に ABT263 を投与しておらず、今後の研究によって副作用や投薬

プロトコルに関して詳細に検討する必要がある。

以上より、本章では細胞老化が DMD の病態進行に関与することが示された。次章では、本章で同定された老化細胞種である間葉系前駆細胞の細胞老化に着目し、これが DMD ラットの病態進行に関与する機序を検討する。

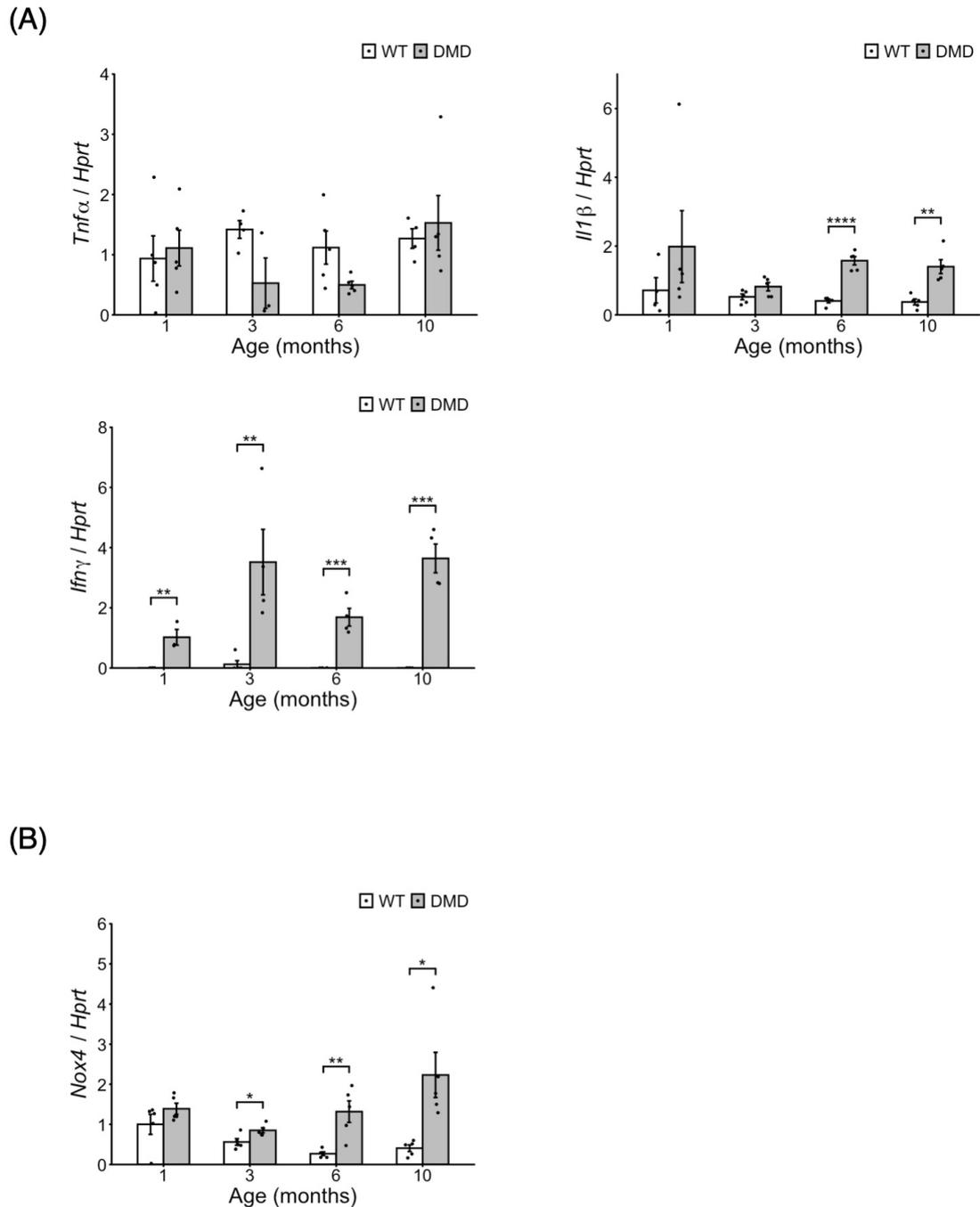


Fig. 2-1 DMDラットにおける炎症及び酸化的ストレス産生因子の発現

1-10ヶ月齢のWT及びDMDラット前脛骨筋における (A) 炎症関連因子 ($Tnf\alpha$, $Il1\beta$, $fn\gamma$) の発現と、 (B) 酸化的ストレス産生に関わる因子NADPH oxidase 4 ($Nox4$) の発現。 (n = 5, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (t-test, vs age-matched WT)。

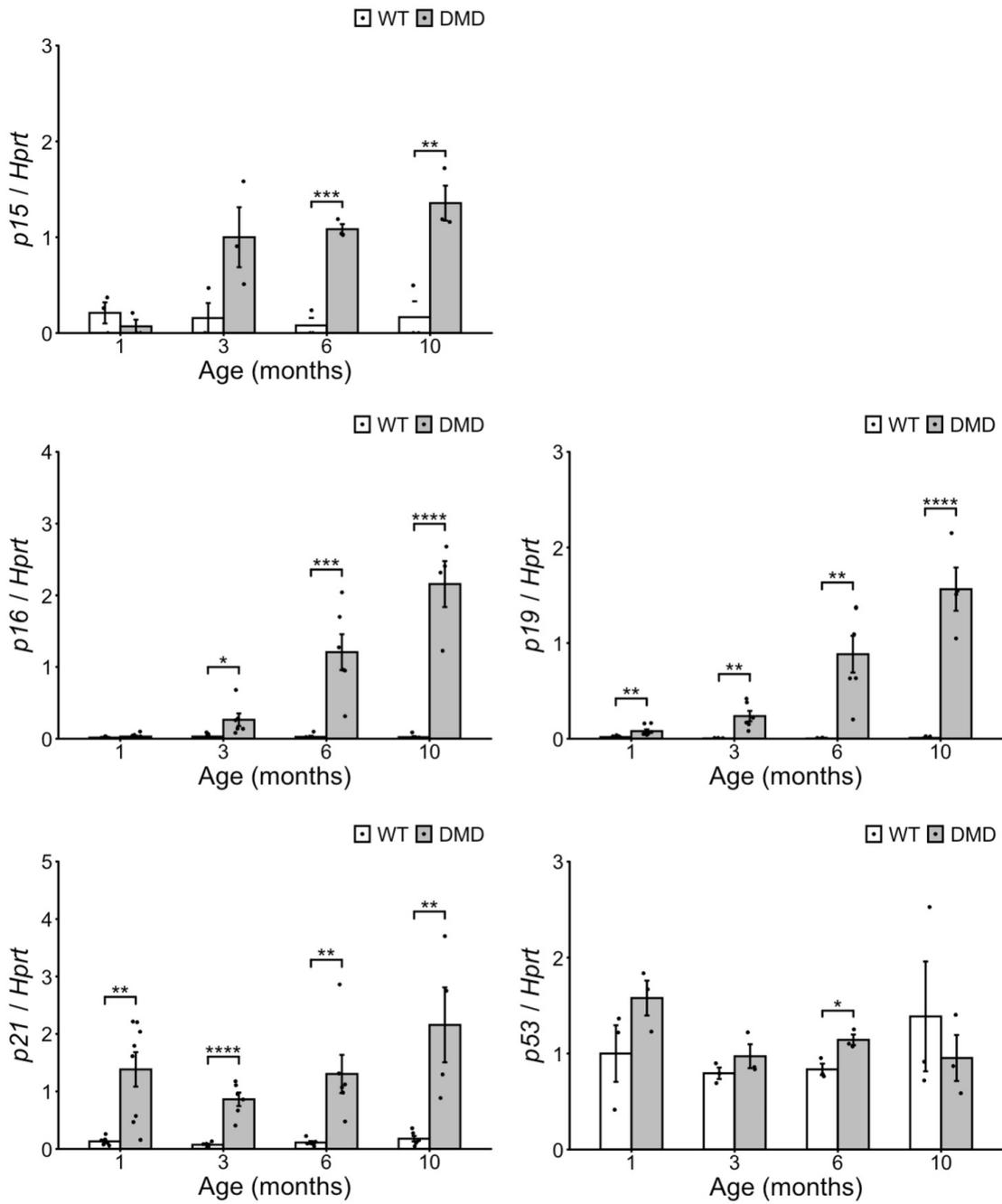


Fig. 2-2 DMDラットにおける細胞老化関連因子の発現

1-10ヶ月齢のWT及びDMDラットにおける細胞老化関連因子である*p15*、*p16*、*p19*、*p21*、*p53*の発現。データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (t-test, vs age-matched WT)。

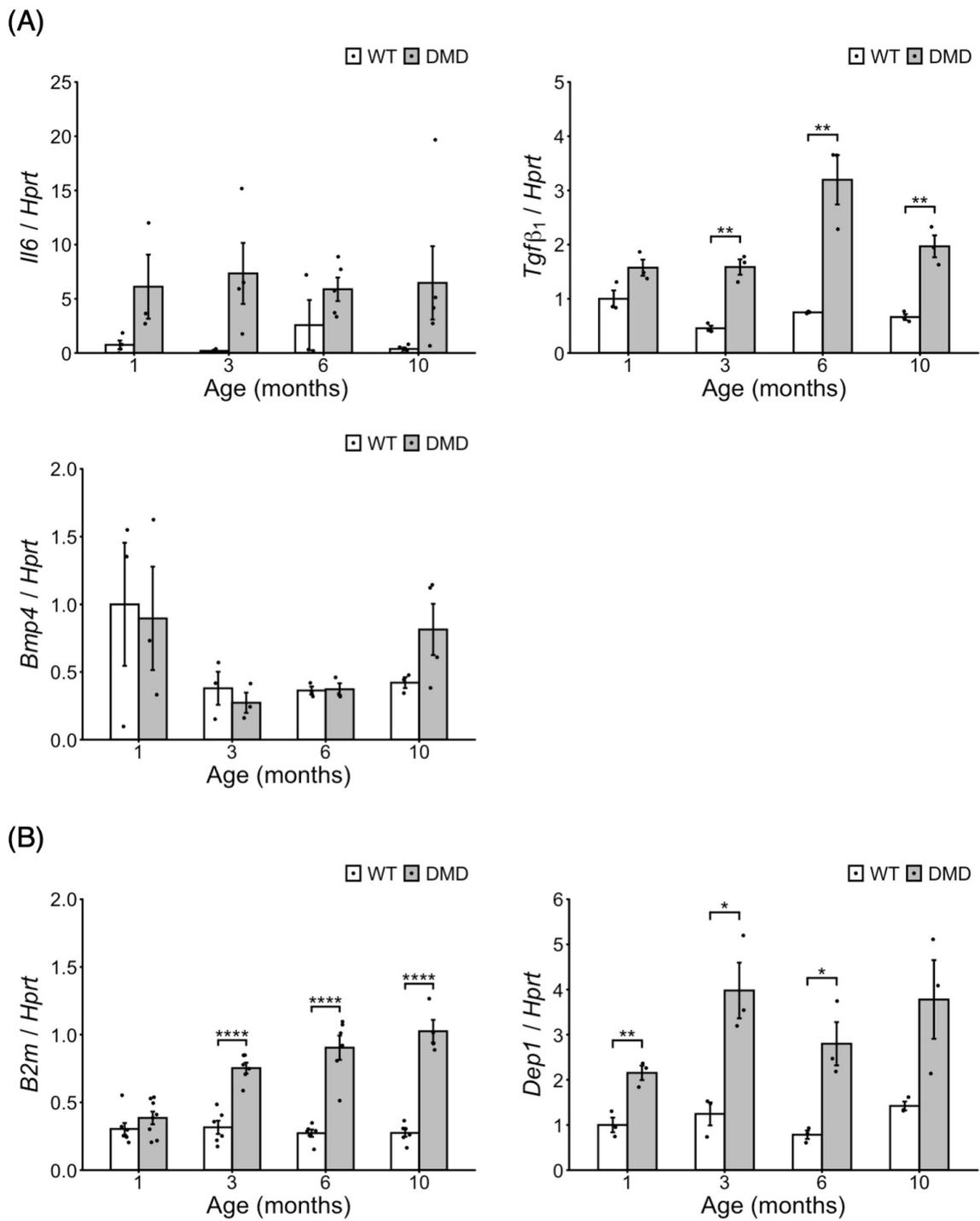


Fig. 2-3 DMDラットにおけるSASP因子や細胞老化関連表面抗原の発現

(A) 1-10ヶ月齢のWT及びDMDラットにおけるSASP因子 (*Il6*, *Bmp4*, *Tgfβ1*) の発現。

(B) 1-10ヶ月齢のWT及びDMDラットにおける細胞老化関連表面抗原のうち、*B2m*及び*Dep1*の発現。

データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (t-test, vs age-matched WT)。

Il6, *B2m*: $n = 6$, each; *Tgfβ1*, *Bmp4*, *Dep1*: $n = 3$, each。

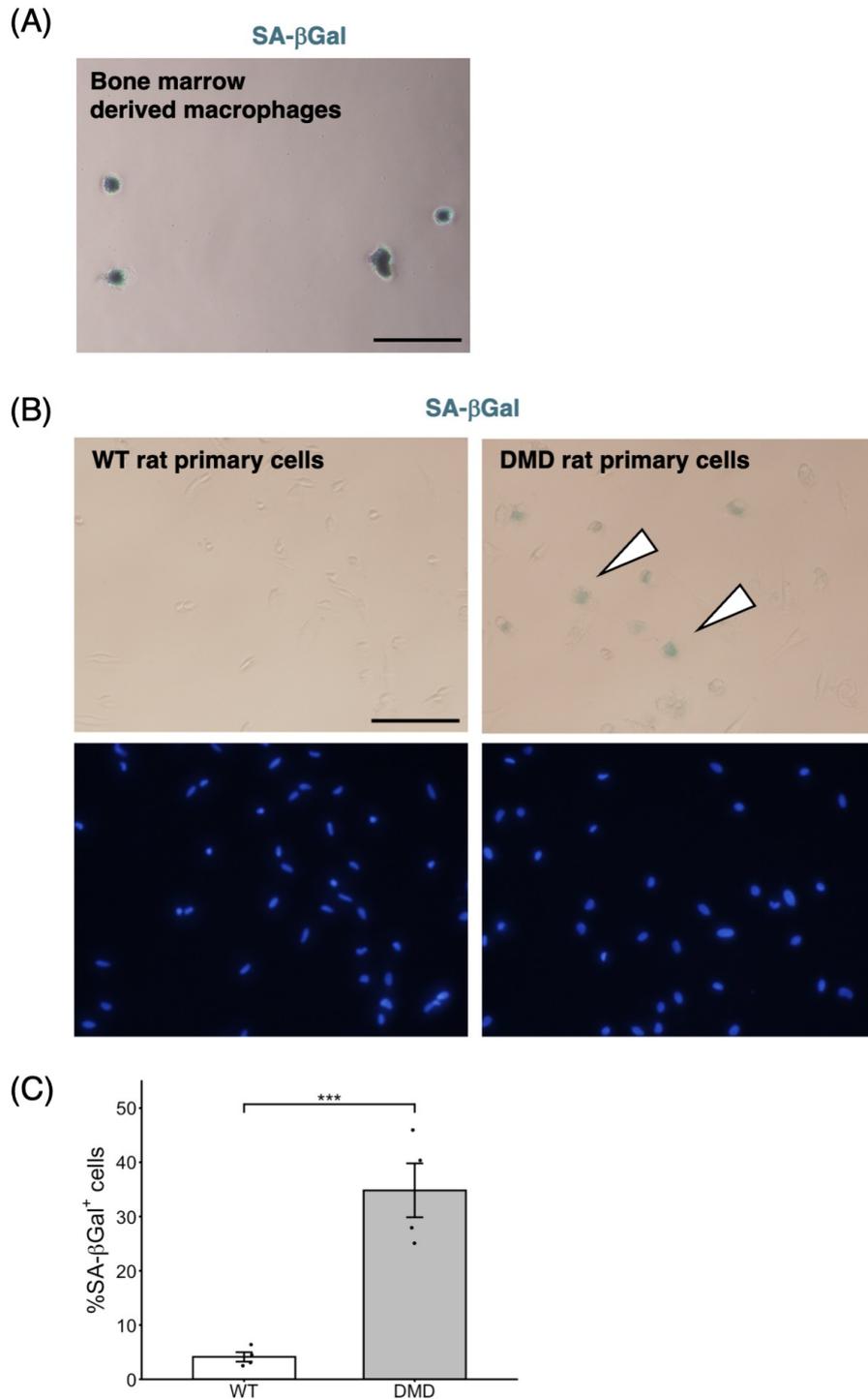
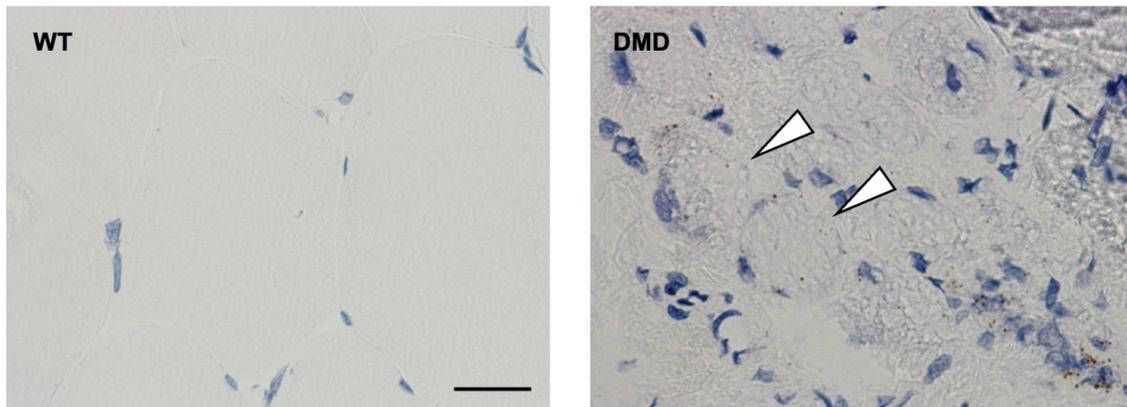


Fig. 2-4 SA-βGal染色によるDMDラット骨格筋初代培養細胞における老化細胞数の評価

- (A) WT骨髄よりM-CSFを用いて誘導されたマクロファージにおけるSA-βGal染色。マクロファージはSA-βGal染色が偽陽性になることが確認できる。Scale bar = 200 μm。
- (B) MACSによってCD45陽性細胞を除外したあとに、3ヶ月齢のWT及びDMDラット骨格筋初代培養細胞をSA-βGal染色した典型像。Scale bar = 200 μm。
- (C) BにおいてSA-βGal染色陽性細胞を定量したグラフ。データは平均値±標準誤差で表した。*** $p < 0.01$ (t-test)。($n = 4$, each)。白矢頭はSA-βGal染色陽性細胞を示す。

(A)



(B)

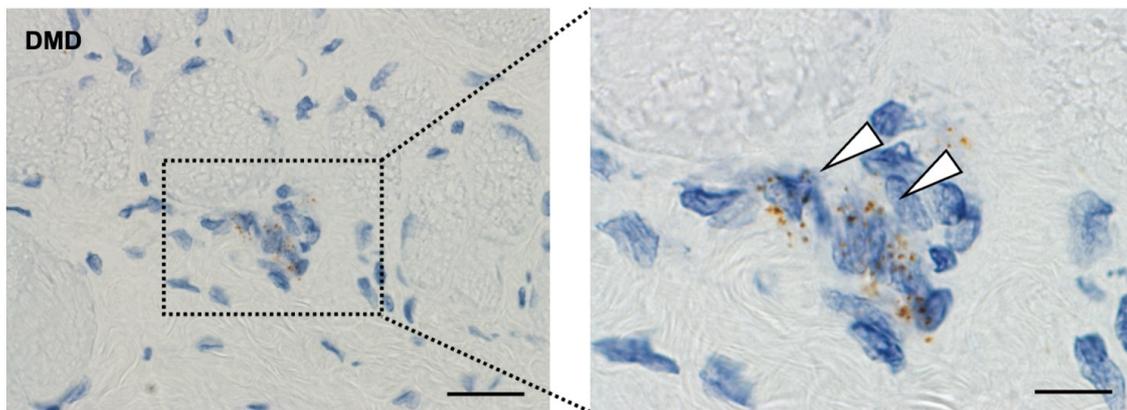


Fig. 2-5 筋線維、単核の細胞群における *Cdkn2a* 遺伝子の発現

- (A) 6ヶ月齢のWT及びDMDラットにおけるRNAScopeを用いた*Cdkn2a* mRNAに対する典型的な in situ hybridization像。茶色の点が*Cdkn2a*のmRNAを示す。DMDラットでは、白矢頭で示される*Cdkn2a*陽性の筋線維が観察された。Scale bar = 50 μ m。
- (B) 6ヶ月齢のDMDラットにおけるRNAScopeを用いた*Cdkn2a* mRNAに対するin situ hybridization像(左)と、拡大像(右)。単核の細胞群にも*Cdkn2a*の発現が認められた。Scale bar = 50 μ m (左)。Scale bar = 10 μ m (右)。

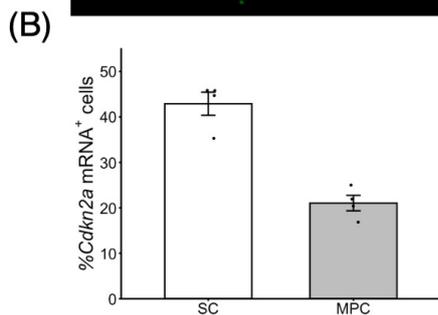
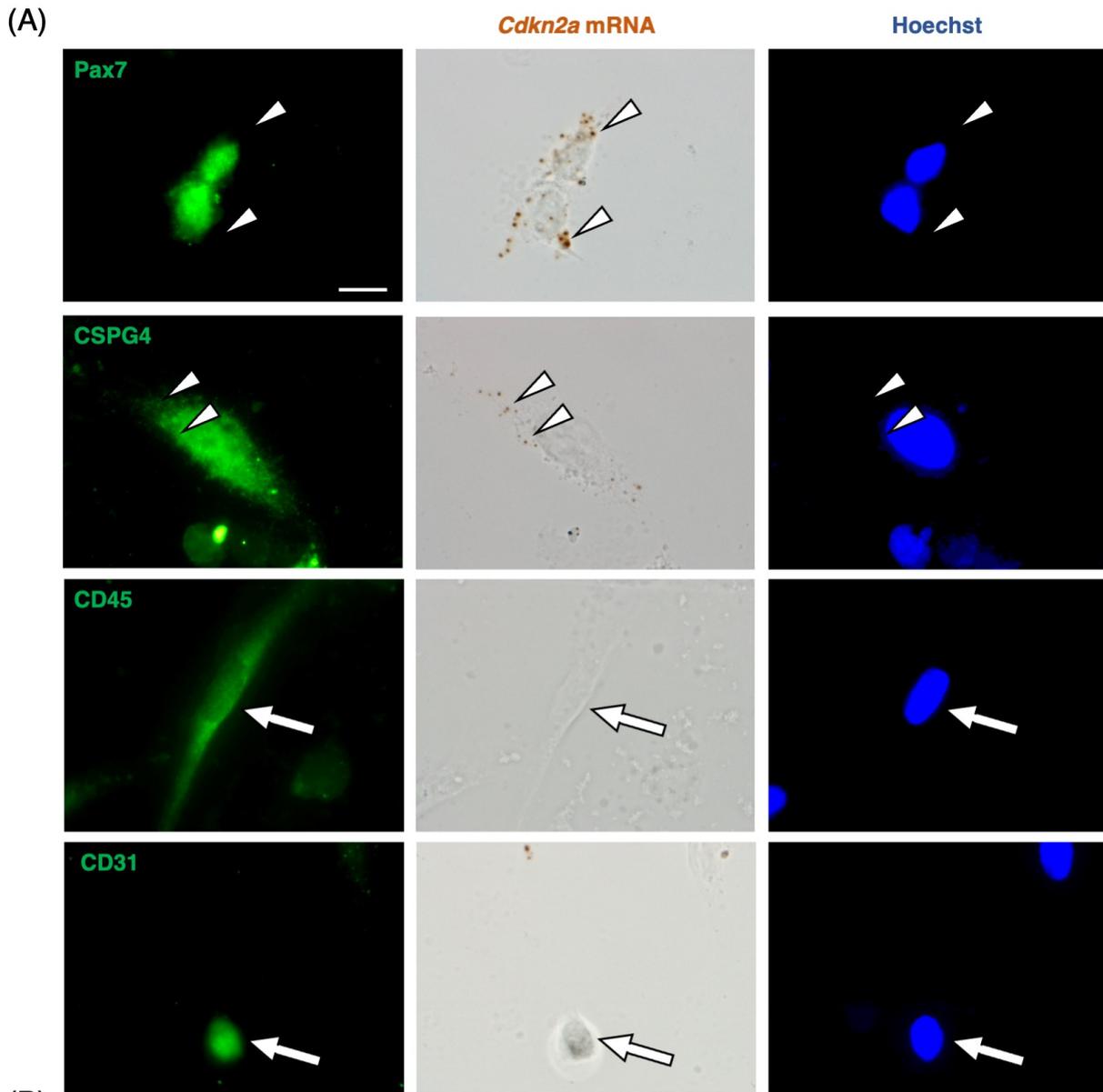


Fig. 2-6 DMDラット骨格筋初代培養細胞における老化細胞種の同定 (次項に続く)

- (A) 6ヶ月齢のDMDラット骨格筋初代培養細胞においてRNAScopeを用いた*Cdkn2a* mRNAに対するin situ hybridizationを行った後、細胞種特異的なマーカーで免疫染色した。矢頭は*Cdkn2a* mRNAの位置、矢印は*Cdkn2a*陰性の細胞の位置を示す。Scale bar = 10 μ m。
- (B) Aにおいて*Cdkn2a* mRNAを発現している細胞の割合を定量した。SCはPax7陽性の筋衛星細胞、MPCはCSPG4陽性の間葉系前駆細胞を表す。データは平均値 \pm 標準誤差で表した。(n = 4, each)。

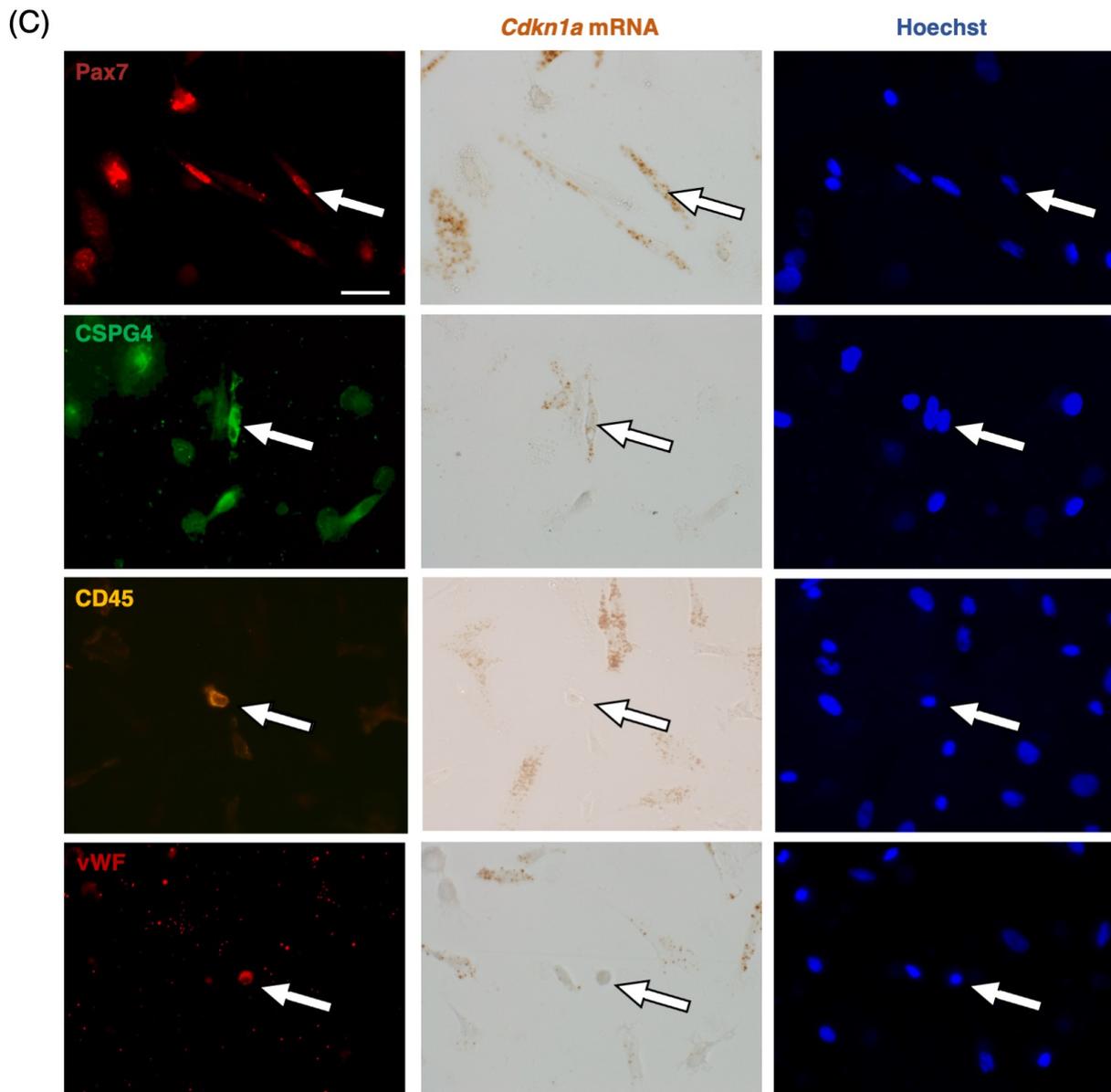


Fig. 2-6 DMDラット骨格筋初代培養細胞における老化細胞種の同定

(C) 6ヶ月齢のDMDラット骨格筋初代培養細胞においてRNAScopeを用いた*Cdkn1a* mRNAに対するin situ hybridizationを行った後、細胞種特異的なマーカーで免疫染色した。矢印は各免疫染色陽性の細胞の位置を示す。Scale bar = 50 μ m。

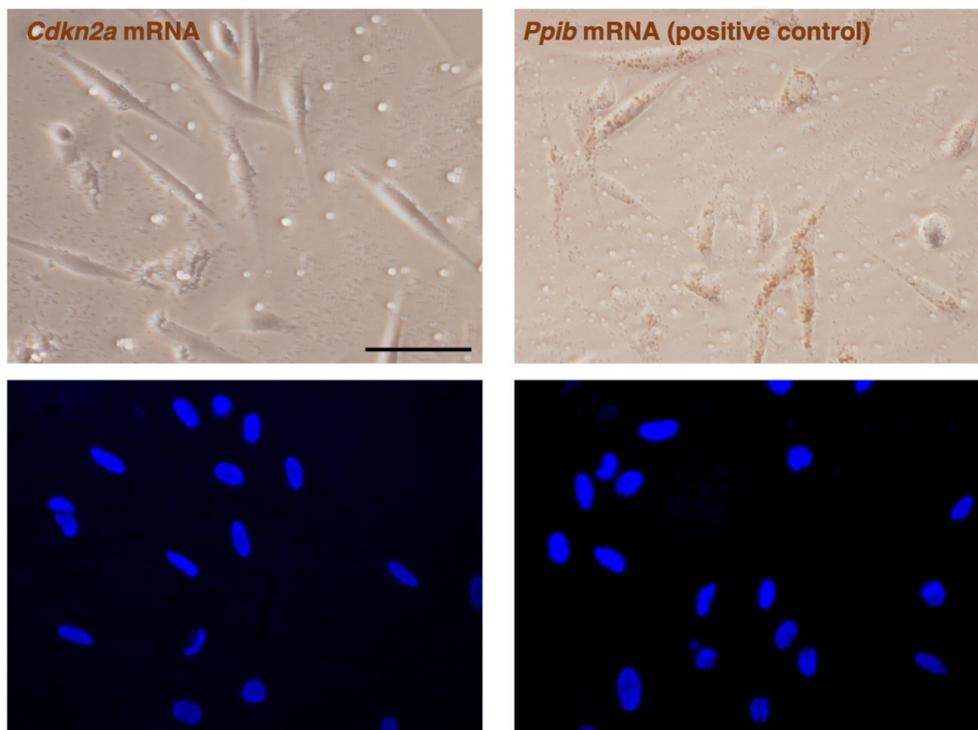
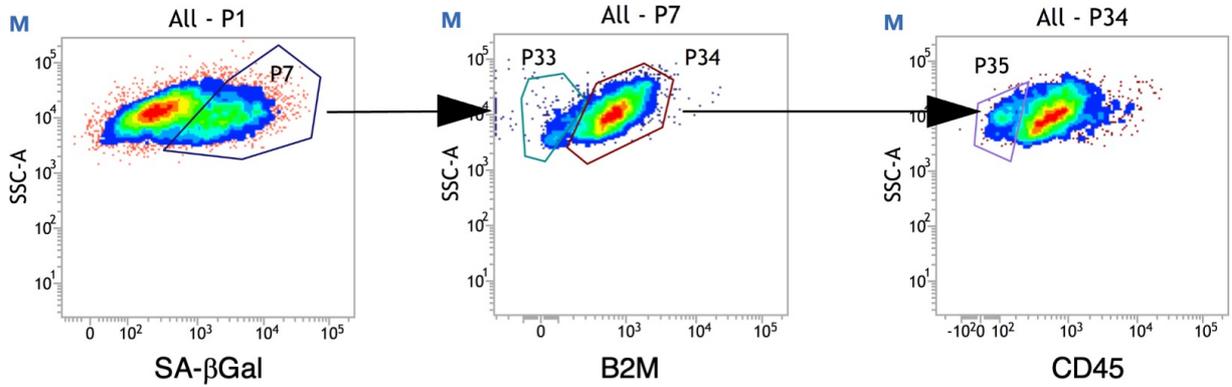


Fig. 2-7 WT骨格筋初代培養細胞における*Cdkn2a*遺伝子非発現の確認

3ヶ月齢のDMDラット骨格筋初代培養細胞においてRNAScopeを用いた*Cdkn2a* mRNAに対するin situ hybridizationを行った(左)。Positive Controlとして、同時に*Ppib* mRNAに対するin situ hybridizationも行った。Scale bar = 100 μ m。

(A)



(B)

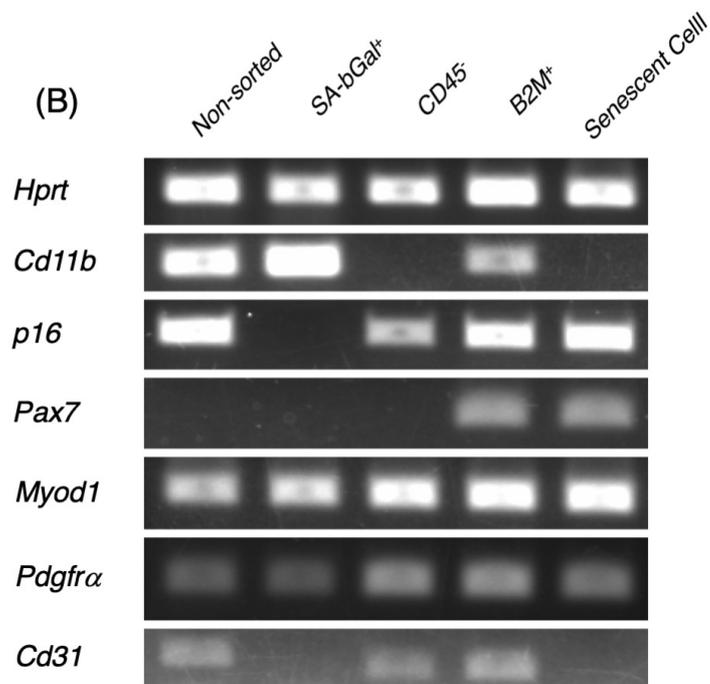
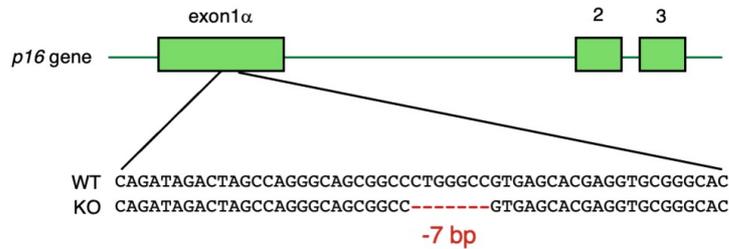


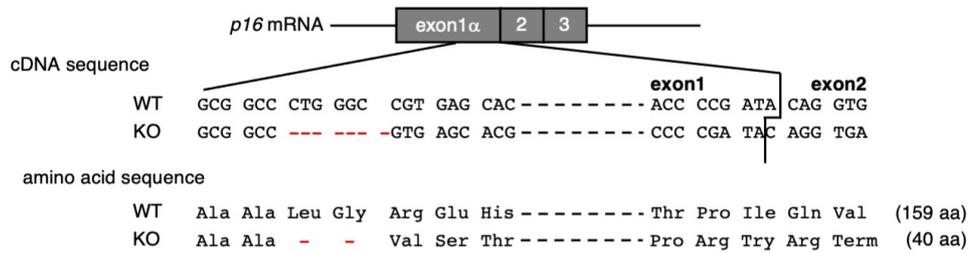
Fig. 2-8. 老化細胞の単離と遺伝子発現解析

- (A) FACSで観察した細胞のうち、SA-βGal陽性分画 (P7) からB2M陽性分画 (P34) を分離し、さらにCD45陰性の分画 (P35) を老化細胞として分取した。
- (B) 6ヶ月齢のOFラット大腿四頭筋由来初代培養細胞から、ソーティングしない群 (Non-sorted)、SA-βGal陽性細胞群 (SA-βGal⁺)、CD45陰性分画 (CD45⁻)、B2M陽性分画 (B2M⁺) 及び (A) で分取した細胞群 (Senescent Cell) を用意し、これらからHprt、Cd11b、p16、Pax7、Myod1、Pdgfra、Cd31についてRT-PCRを行った。

(A)



(B)



(C)

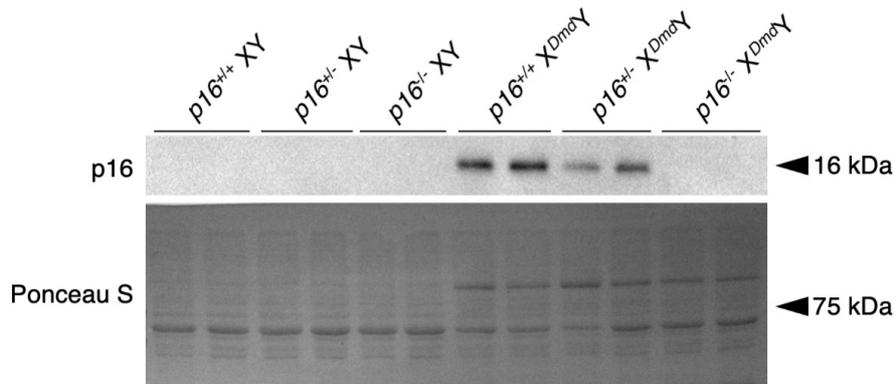


Fig. 2-9 CRISPR/Cas法による*p16*欠損ラットの作出

- (A) *p16*欠損ラットに導入された*p16*遺伝子配列における変異。
- (B) *p16* mRNA配列における変異と、予測される翻訳アミノ酸配列。
- (C) 9ヶ月齢における*p16*^{+/+} XY、*p16*^{+/-} XY、*p16*^{-/-} XY、*p16*^{+/+} X^{Dmd}Y、*p16*^{+/-} X^{Dmd}Y、*p16*^{-/-} X^{Dmd}Yラット前脛骨筋抽出タンパク質における*p16*に対するウェスタンブロット像。ローディングコントロールとして、Ponceau S染色を用いた。

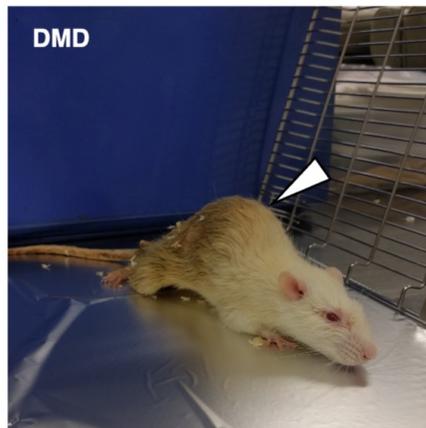


Fig. 2-10 dKOラットの外観

9ヶ月齢のWT、DMDラット、dKOラットの外観を示す。dKOラットでは毛並みなどの全身状態の改善に加え、DMDラットで見られた脊柱の湾曲(白矢頭)が見られなくなっている。

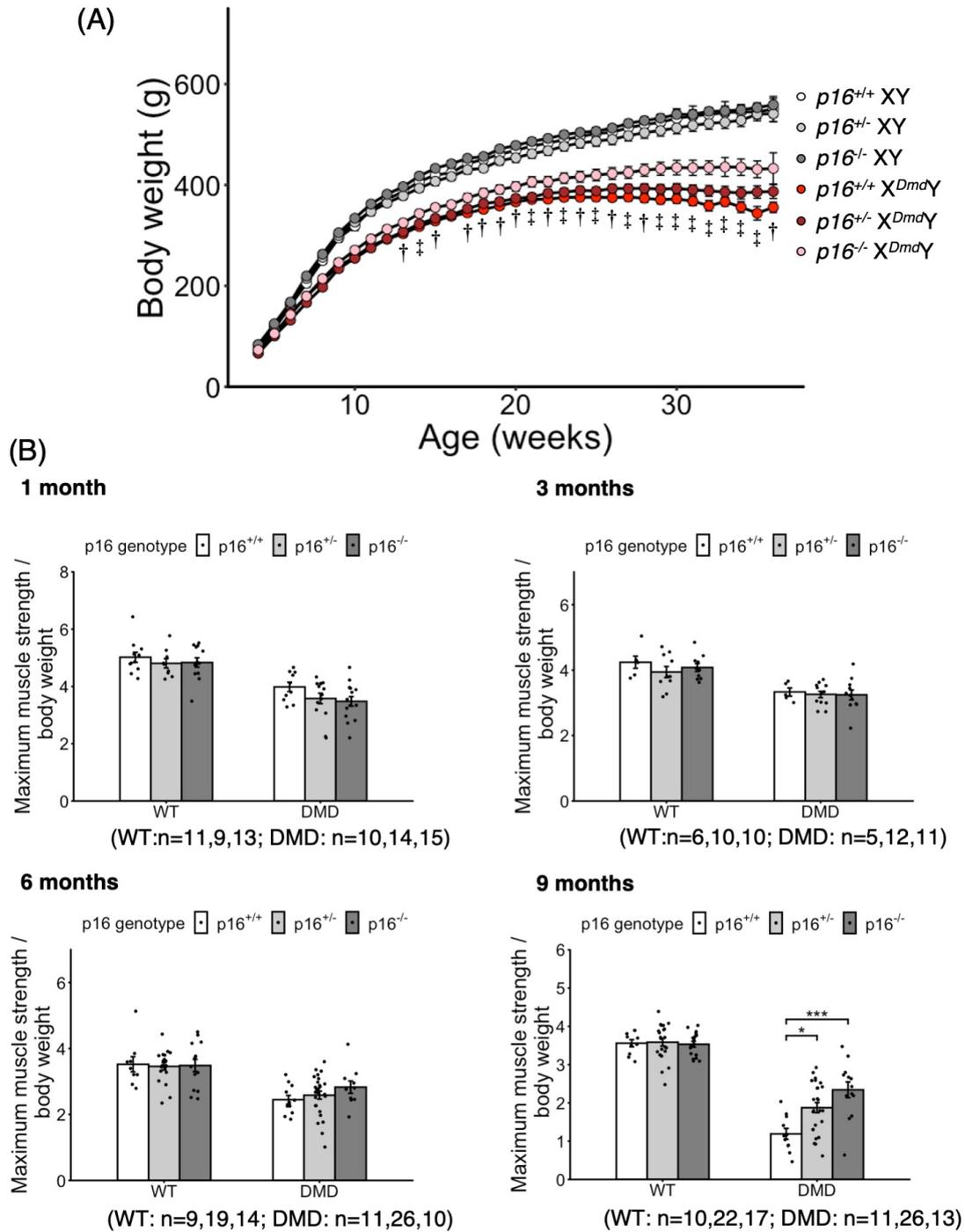


Fig. 2-11 dKOラットにおける、経時的な体重・筋力の変化

- (A) $p16^{+/+} XY$, $p16^{+/-} XY$, $p16^{-/-} XY$, $p16^{+/+} X^{DmdY}$, $p16^{+/-} X^{DmdY}$, $p16^{-/-} X^{DmdY}$ ラットの経時的な体重変化。(n = 20, 26, 24, 20, 29, 23)。Dmd遺伝子の遺伝子型によって3群ずつにグループ分けし、各週齢毎にTukey Kramer's testを行った。Dmd遺伝子が野生型の3群間 ($p16^{+/+} XY$, $p16^{+/-} XY$, $p16^{-/-} XY$) では、いずれの週齢においても有意な差は認められなかった。Dmd遺伝子に変異を持つ3群 ($p16^{+/+} X^{DmdY}$, $p16^{+/-} X^{DmdY}$, $p16^{-/-} X^{DmdY}$) の内、p16遺伝子に関して (+/+) vs (-/-) 間のみで $p < 0.05$ の有意差を認めたものを†、(+/+) vs (-/-) 間及び (+/-) vs (-/-) 間の両方で $p < 0.05$ の有意差を認めたものを‡で表した。
- (B) グリップテストによって、1-9ヶ月齢の $p16^{+/+} XY$, $p16^{+/-} XY$, $p16^{-/-} XY$, $p16^{+/+} X^{DmdY}$, $p16^{+/-} X^{DmdY}$, $p16^{-/-} X^{DmdY}$ ラットの筋力を経時的に測定した。データは平均値±標準誤差で表した。
* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (Tukey Kramer's test (grouped by genotype of Dmd gene)).

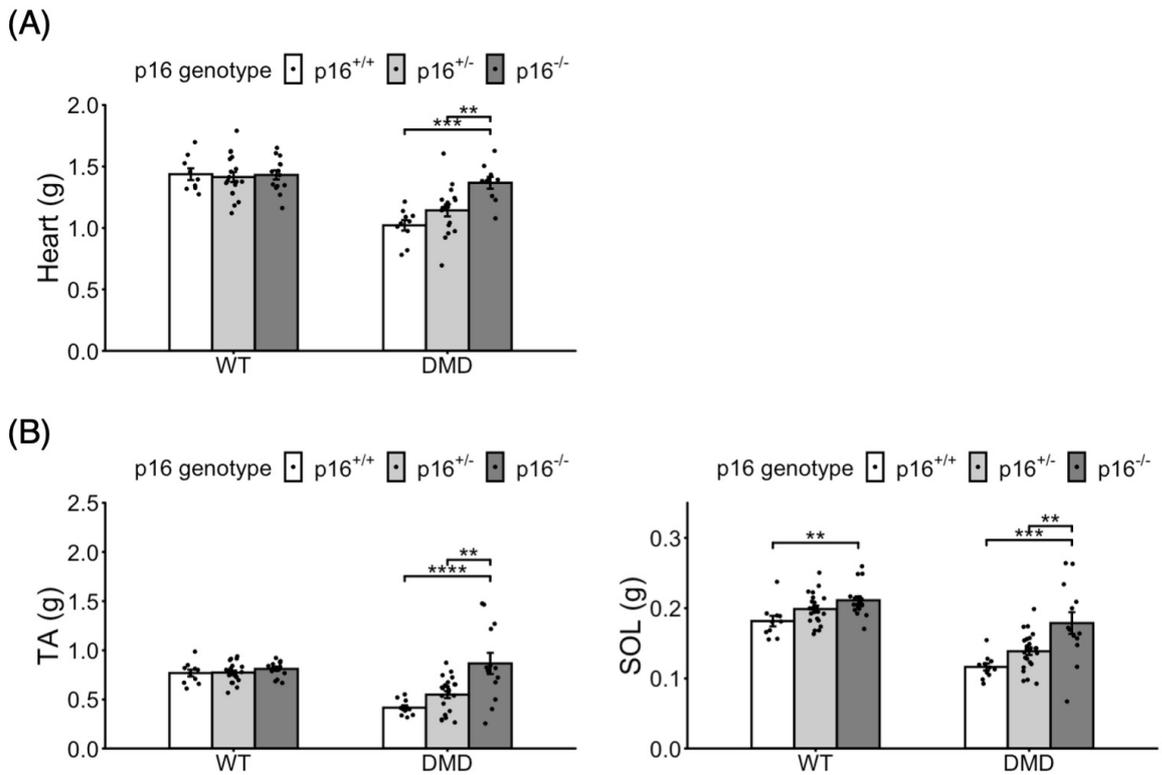


Fig. 2-12 dKOラットにおける、心・筋重量の変化

- (A) 9ヶ月齢の $p16^{+/+}$ XY、 $p16^{+/-}$ XY、 $p16^{-/-}$ XY、 $p16^{+/+}$ X^{Dmd}Y、 $p16^{+/-}$ X^{Dmd}Y、 $p16^{-/-}$ X^{Dmd}Yラットにおける心重量の変化。(n = 10, 22, 17, 11, 26, 13)。
- (B) 9ヶ月齢の $p16^{+/+}$ XY、 $p16^{+/-}$ XY、 $p16^{-/-}$ XY、 $p16^{+/+}$ X^{Dmd}Y、 $p16^{+/-}$ X^{Dmd}Y、 $p16^{-/-}$ X^{Dmd}Yラットにおける前脛骨筋重量(左)、ヒラメ筋重量(右)の変化。(n = 10, 22, 17, 11, 26, 13)。
- データは平均値±標準誤差で表した。**p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001 (Tukey Kramer's test (grouped by genotype of *Dmd* gene))。

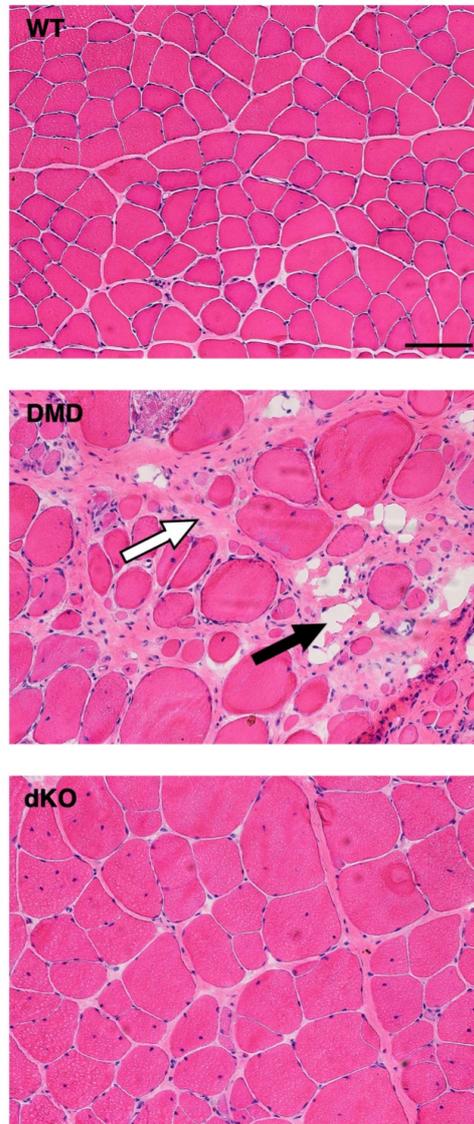
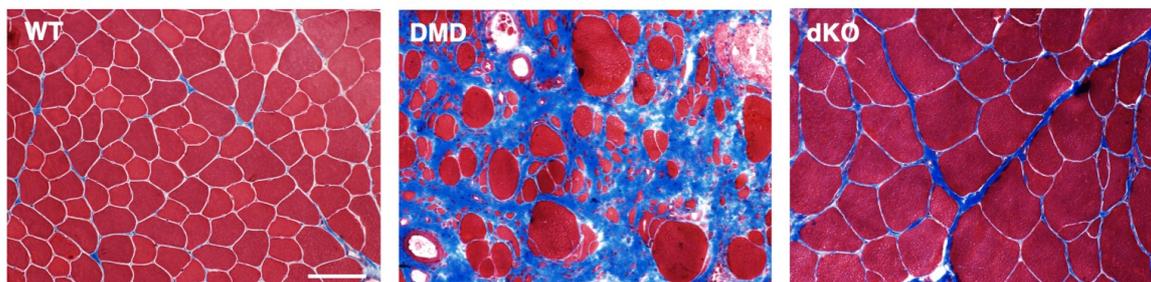


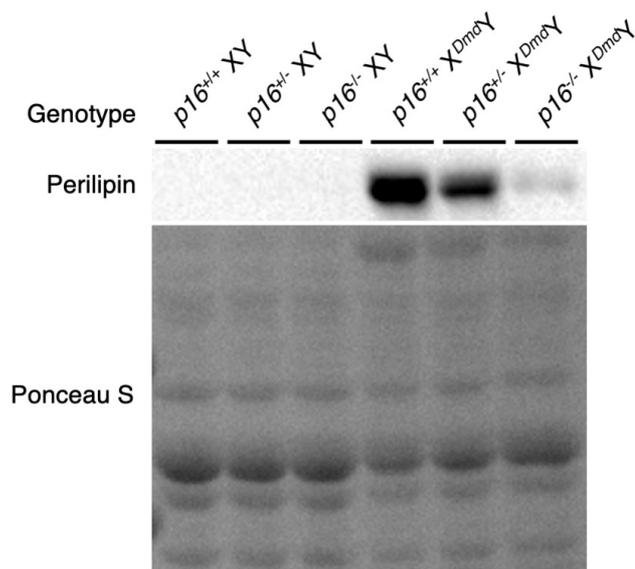
Fig. 2-13 dKOラットにおける骨格筋切片HE染色像

9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋におけるHE染色像。DMDラットで観察された線維化(白矢印)、脂肪化(黒矢印)がdKOラットでは抑制されていることがわかる。Scale bar = 100 μ m。

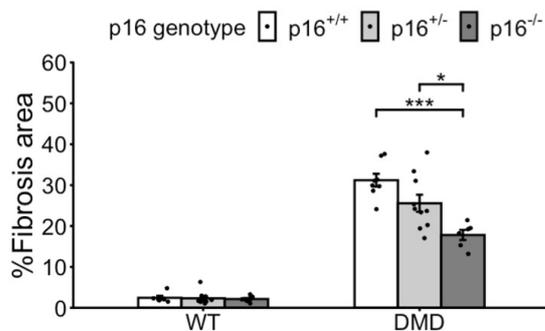
(A)



(B)



(C)



(D)

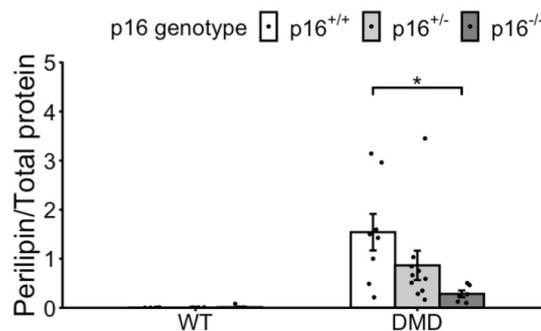


Fig. 2-14 dKOラットにおける線維・脂肪組織の減少

- (A) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋におけるマッソントリクローム染色像。Scale bar = 100 μ m。
- (B) 9ヶ月齢のp16^{+/+} XY、p16^{+/-} XY、p16^{-/-} XY、p16^{+/+} XDmdY、p16^{+/-} XDmdY、p16^{-/-} XDmdYラット前脛骨筋抽出タンパク質を用いたPerilipinタンパク質に対するウェスタンブロット像。
- (C) マッソントリクローム染色における青色が全体に占める割合。(n = 6, 13, 8, 8, 10, 6)。
- (D) Perilipinのバンド強度をPonceau Sで示されたTotal protein量で標準化したグラフ。(n = 6, 13, 8, 8, 10, 6)。
- データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, ***p < 0.001 (Tukey Kramer's test (grouped by genotype of *Dmd* gene))。

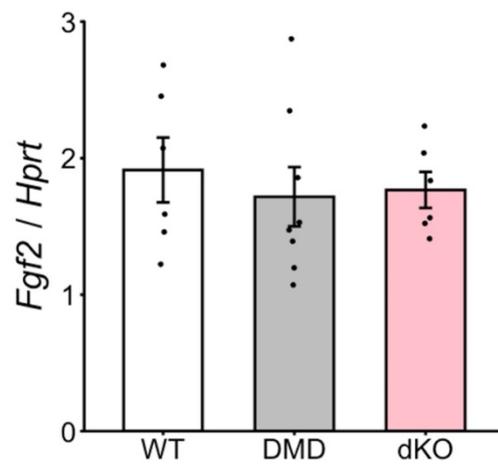


Fig. 2-15 dKOラットにおける脂肪化関連因子の発現

9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋における脂肪化関連因子 (*Fgf2*) の発現。データは平均値±標準誤差で表した。(n = 6, 8, 6)。

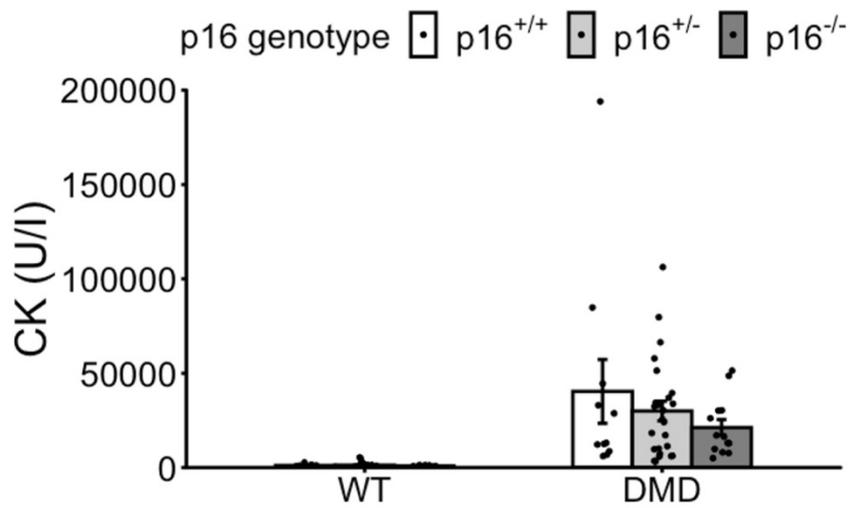
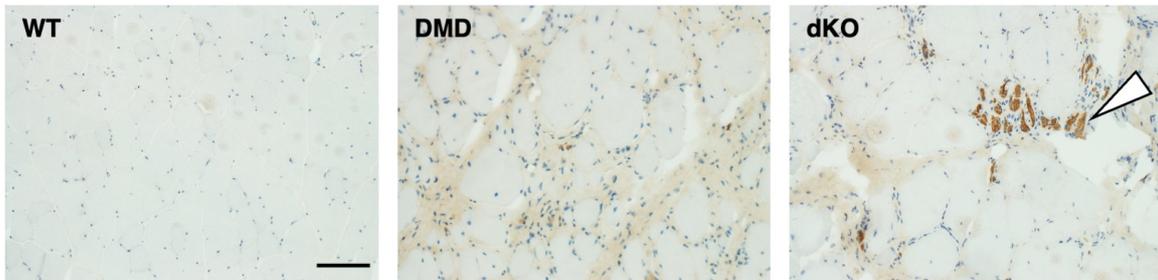


Fig. 2-16 dKOラットにおける筋損傷マーカーの変化

9ヶ月齢のp16^{+/+}XY、p16^{+/-}XY、p16^{-/-}XY、p16^{+/+}X^{Dmd}Y、p16^{+/-}X^{Dmd}Y、p16^{-/-}X^{Dmd}Yラットにおける筋損傷マーカーの変化。データは平均値±標準誤差で表した。(n = 10, 22, 17, 11, 26, 13)。

(A)



(B)

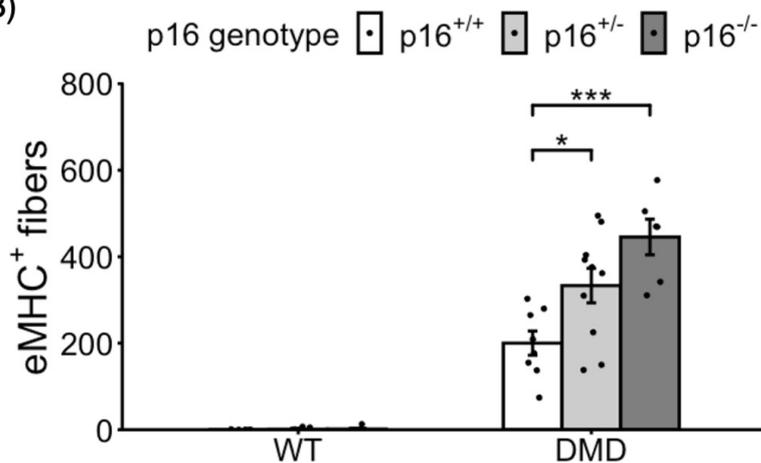


Fig. 2-17 dKOラットにおける線維・脂肪組織の減少

(A) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋におけるeMHCに対する免疫染色像。Scale bar = 100 μ m。

(B) 9ヶ月齢のp16^{+/+} XY、p16^{+/-} XY、p16^{-/-} XY、p16^{+/+} X^{Dmd}Y、p16^{+/-} X^{Dmd}Y、p16^{-/-} X^{Dmd}Yラット前脛骨筋1切片あたりのeMHC陽性筋線維数。(n = 6, 13, 8, 8, 10, 6)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, ***p < 0.001 (Tukey Kramer's test (grouped by genotype of *Dmd* gene))。白矢頭はeMHC陽性筋線維を表す。

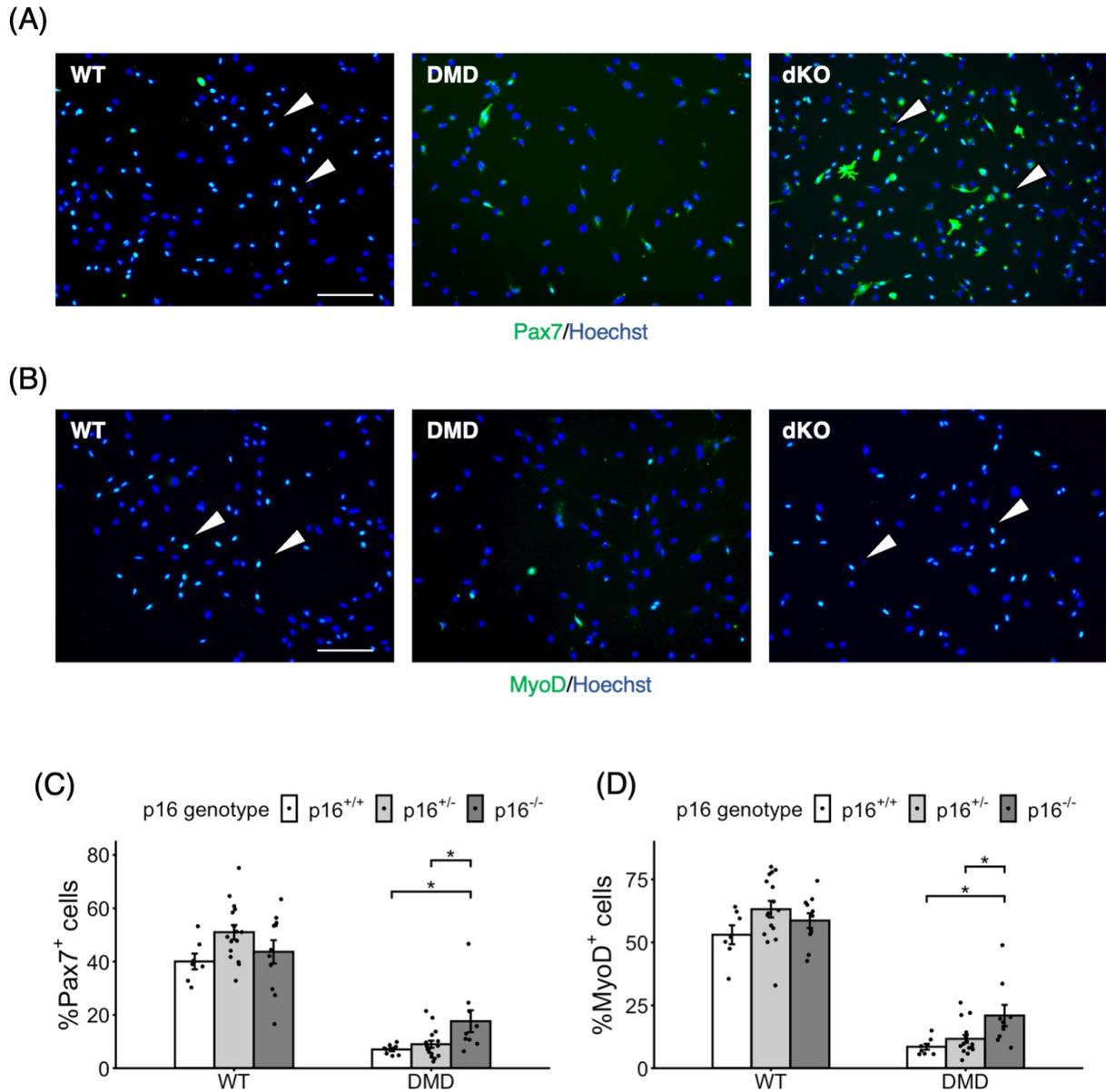


Fig. 2-18 dKOラットにおける筋衛星細胞数の増加

- (A) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット骨格筋初代培養細胞におけるPax7の免疫染色像。Scale bar = 200 μ m。
- (B) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット骨格筋初代培養細胞におけるMyoDの免疫染色像。Scale bar = 200 μ m。
- (C) Pax7陽性細胞が全体に占める割合。(n = 6, 13, 8, 8, 10, 6)。
- (D) MyoD陽性細胞が全体に占める割合。(n = 6, 13, 8, 8, 10, 6)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05 (Tukey Kramer's test (grouped by genotype of *Dmd* gene))。白矢頭は各免疫染色陽性細胞を示す。

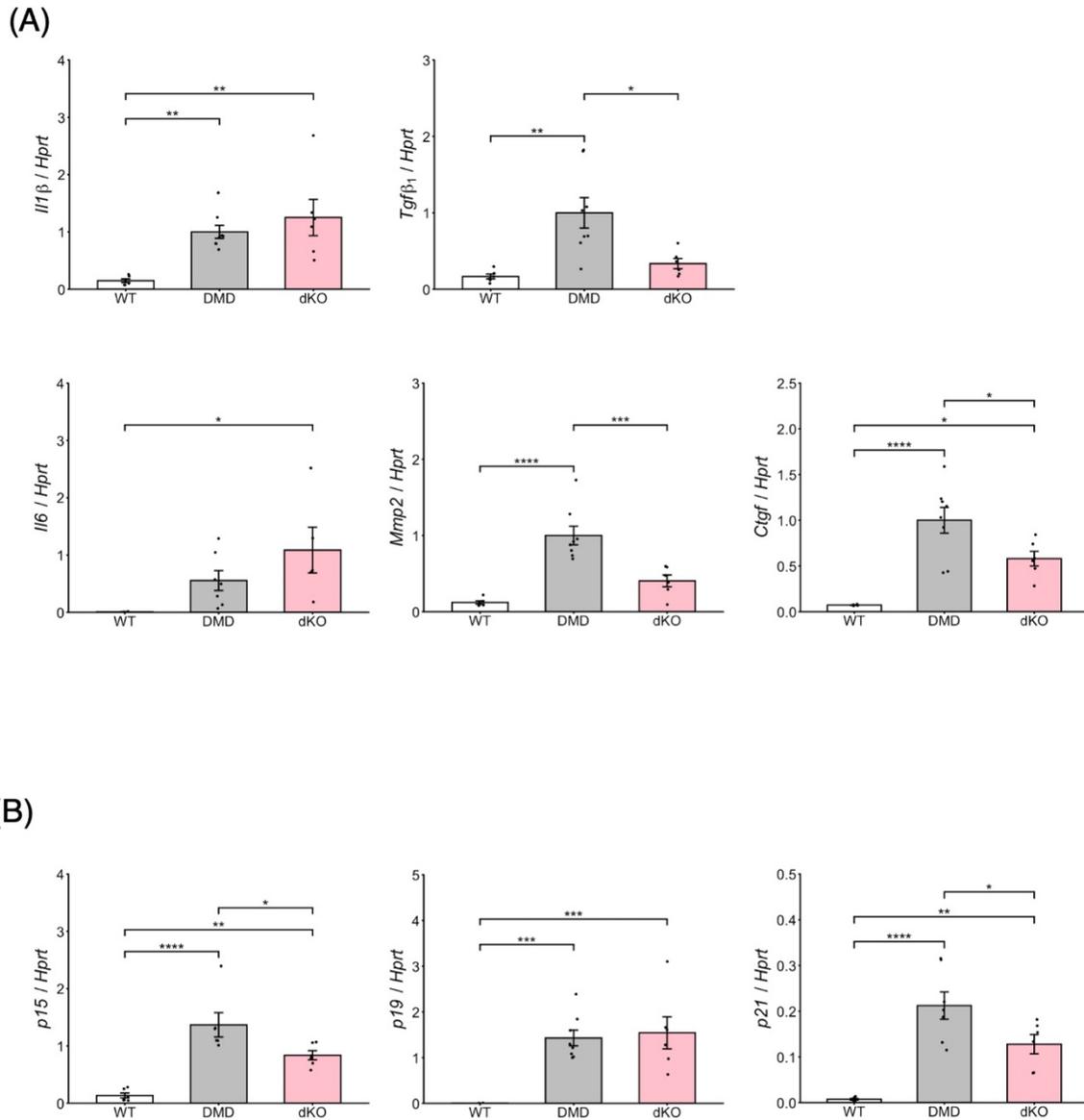


Fig. 2-19 dKOラットにおけるSASP、脂肪化、細胞老化関連因子の発現

(A) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋におけるSASP関連因子 (*Il1β*、*Tgfβ1*、*Il6*、*Mmp2*、*Ctgf*) の発現。

(B) 9ヶ月齢のWT、DMD、dKOラット前脛骨筋における細胞老化関連因子 (*p15*、*p19*、*p21*) の発現。

データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (Tukey Kramer's test)。 (n = 6, 8, 6)。

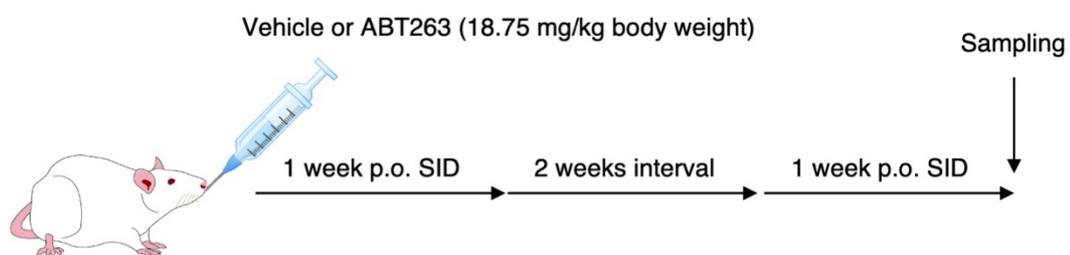


Fig. 2-20 ABT263の投与スケジュール

8ヶ月齢のDMDラットにVehicleまたはABT263を投与したスケジュール。

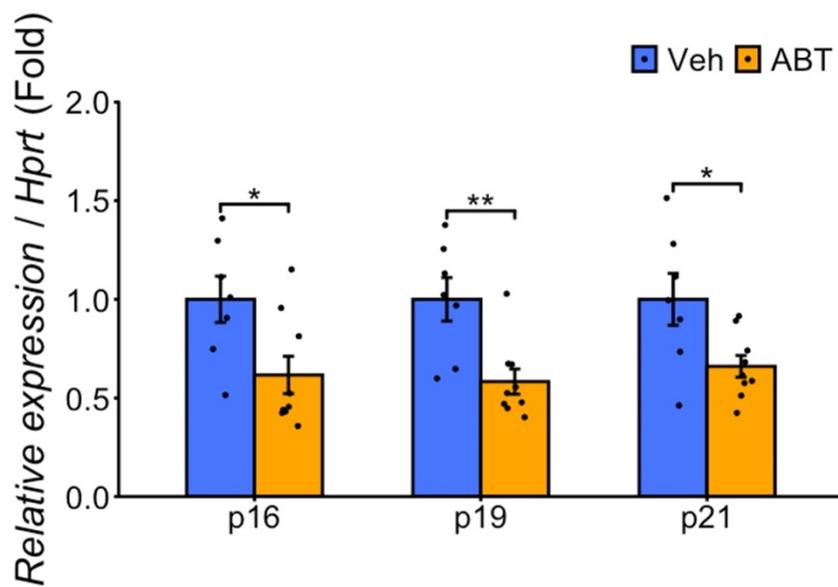


Fig. 2-21 ABT263投与群における細胞老化関連因子の発現

VehicleまたはABT263投与したラット前脛骨筋における細胞老化関連因子 (*p16*、*p19*、*p21*) の発現。データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t-test)。 (n = 7, 9)。

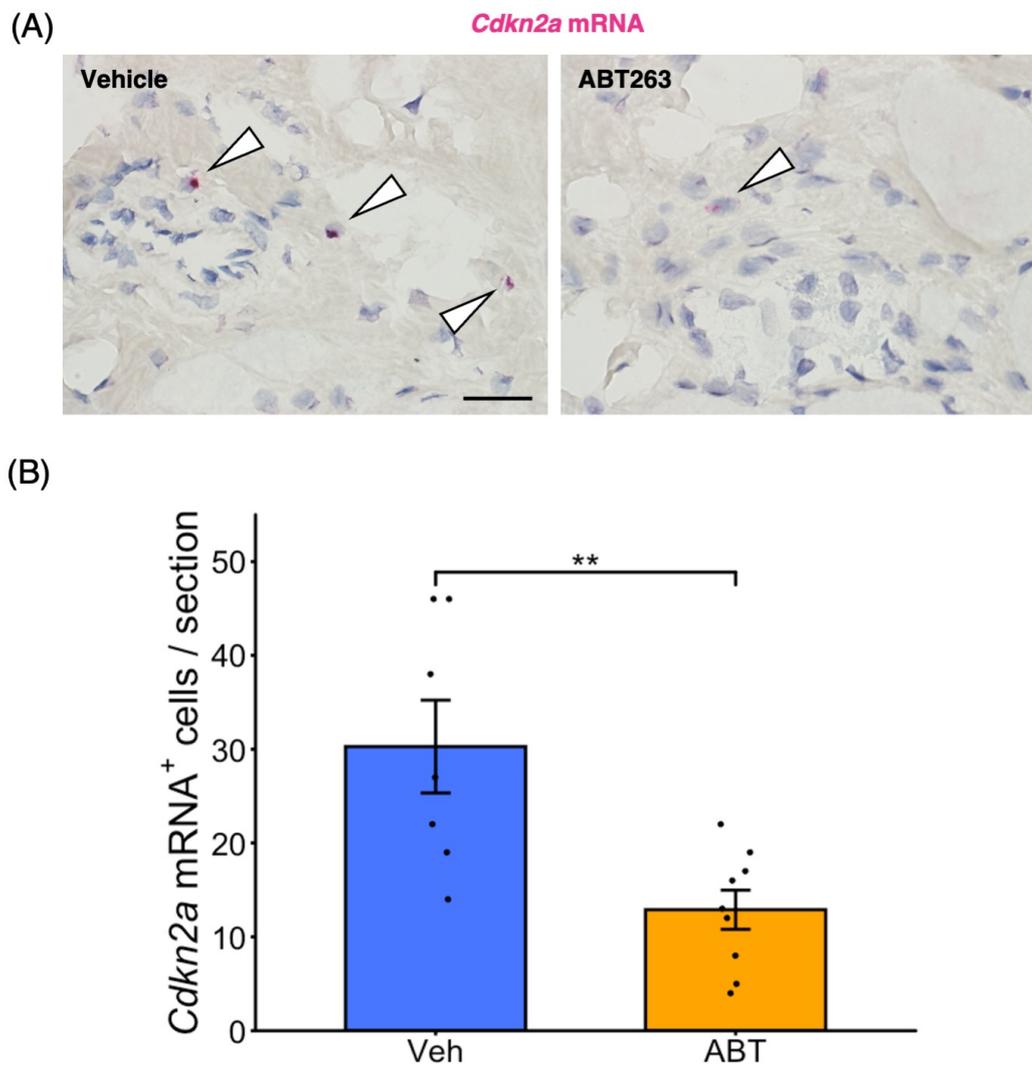


Fig. 2-22 ABT263投与群における老化細胞数の減少

(A) VehicleまたはABT263投与したラット前脛骨筋におけるRNAScopeを用いた*Cdkn2a* mRNAに対する典型的なin situ hybridization像。Scale bar = 50 μ m。

(B) (A)において、切片あたりの*Cdkn2a*陽性細胞数を定量したグラフ。

データは平均値±標準誤差で表した。** $p < 0.01$ (t-test)。 (n=7,9)。

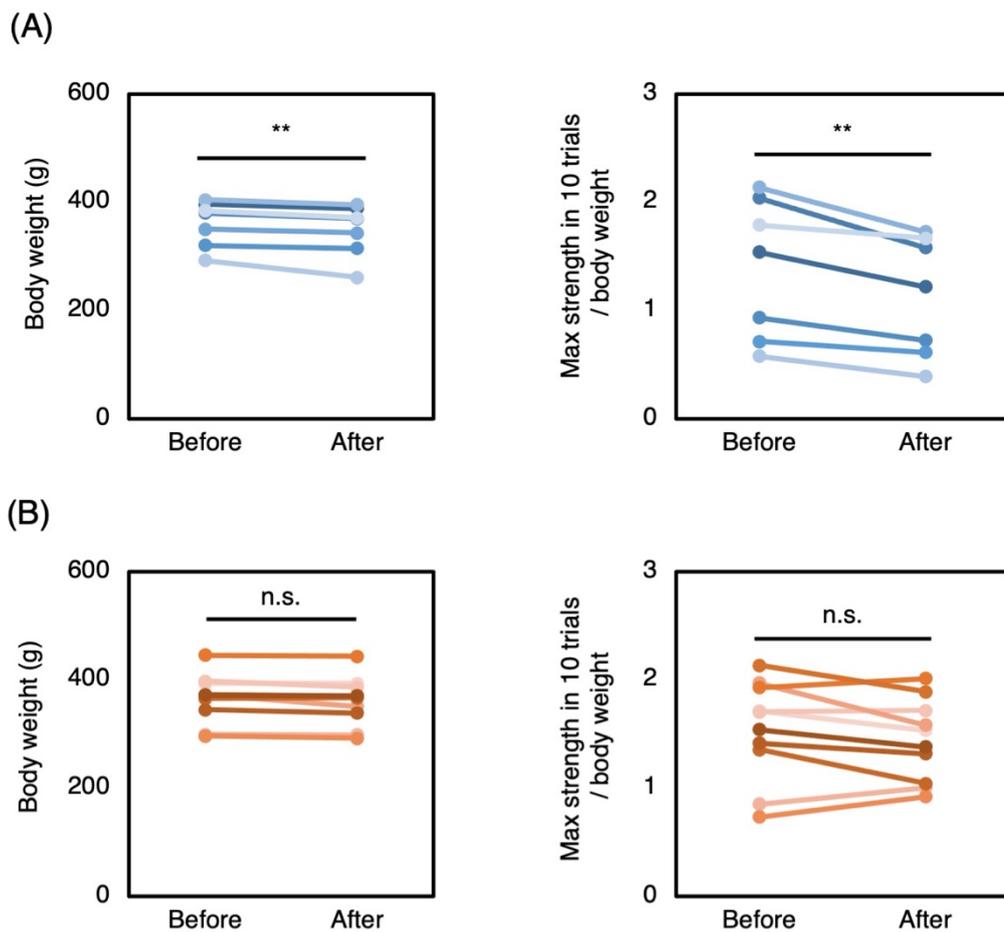


Fig. 2-23 ABT263投与群における体重・筋力の減少の抑制

(A) Vehicleを投与したラットにおける、投与前後の体重変化(左)、及び筋力変化(右)。
 (B) ABT263を投与したラットにおける、投与前後の体重変化(左)、及び筋力変化(右)。
 データは平均値±標準誤差で表した。** $p < 0.01$ (paired t-test)。 (n=7,9)。

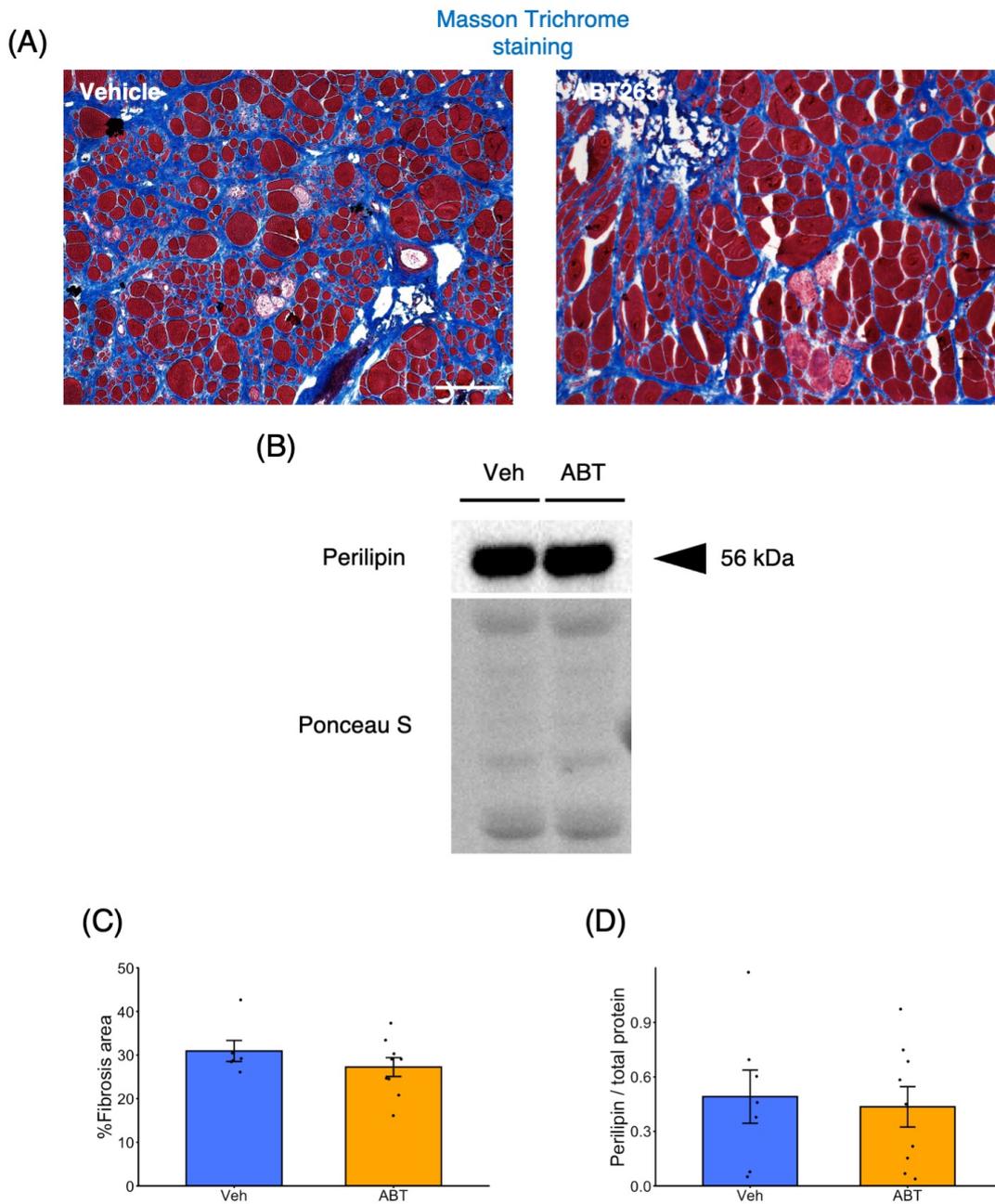


Fig. 2-24 ABT263投与群における線維・脂肪化の定量

- (A) Vehicle及びABT263を投与したラット前脛骨筋における代表的なマッソントリクローム染色像。Scale bar = 250 μ m。
- (B) Vehicle及びABT263を投与したラット前脛骨筋抽出タンパク質を用いた、Perilipinに対するウェスタンブロット像。
- (C) マッソントリクローム染色における青色が全体の面積に占める割合。
- (D) Perilipinのバンド強度をPonceau Sで示されたTotal protein量で標準化したグラフ。
データは平均値±標準誤差で表した。(n = 7, 9)。

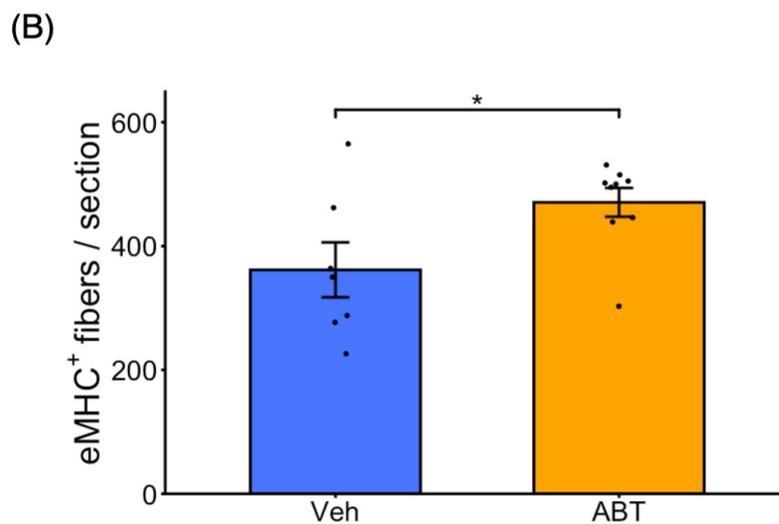
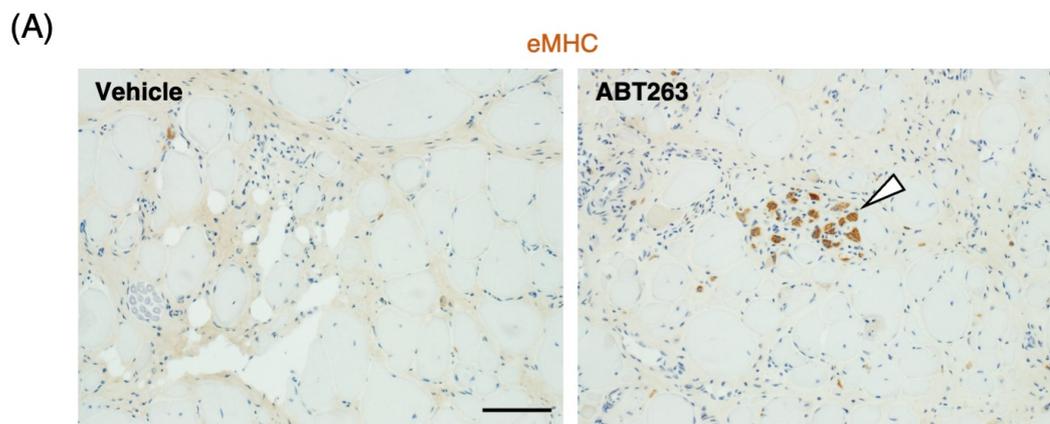


Fig. 2-25 ABT263投与群における筋再生能の変化

- (A) Vehicle及びABT263を投与したラット前脛骨筋における代表的なマッソントリクローム染色像。
Scale bar = 100 μ m。
- (B) Vehicle及びABT263を投与したラット前脛骨筋前脛骨筋1切片あたりのeMHC陽性筋線維数。
データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ (t-test)。(n = 7, 9)。白矢頭はeMHC陽性筋線維を示す。

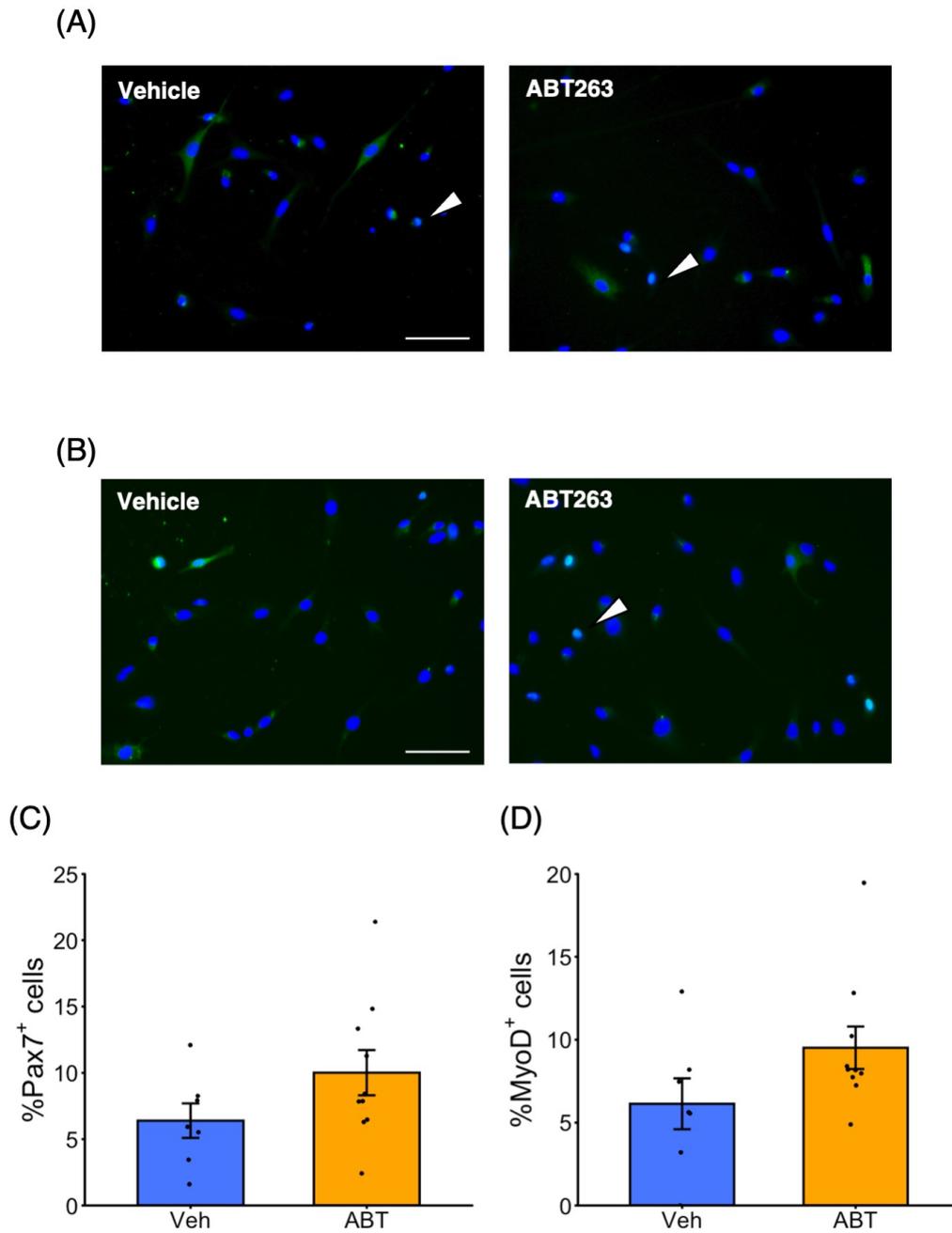


Fig. 2-26 ABT263投与群における筋衛星細胞数の変化

- (A) Vehicle及びABT263を投与した骨格筋初代培養細胞におけるPax7に対する免疫染色像。
Scale bar = 100 μ m。
- (B) Vehicle及びABT263を投与した骨格筋初代培養細胞におけるPax7に対する免疫染色像。
Scale bar = 100 μ m。
- (C) Pax7陽性細胞が全体に占める割合。
- (D) MyoD陽性細胞が全体に占める割合。
- データは平均値±標準誤差で表した。(n = 7, 9)。白矢頭は各免疫染色陽性細胞を示す。

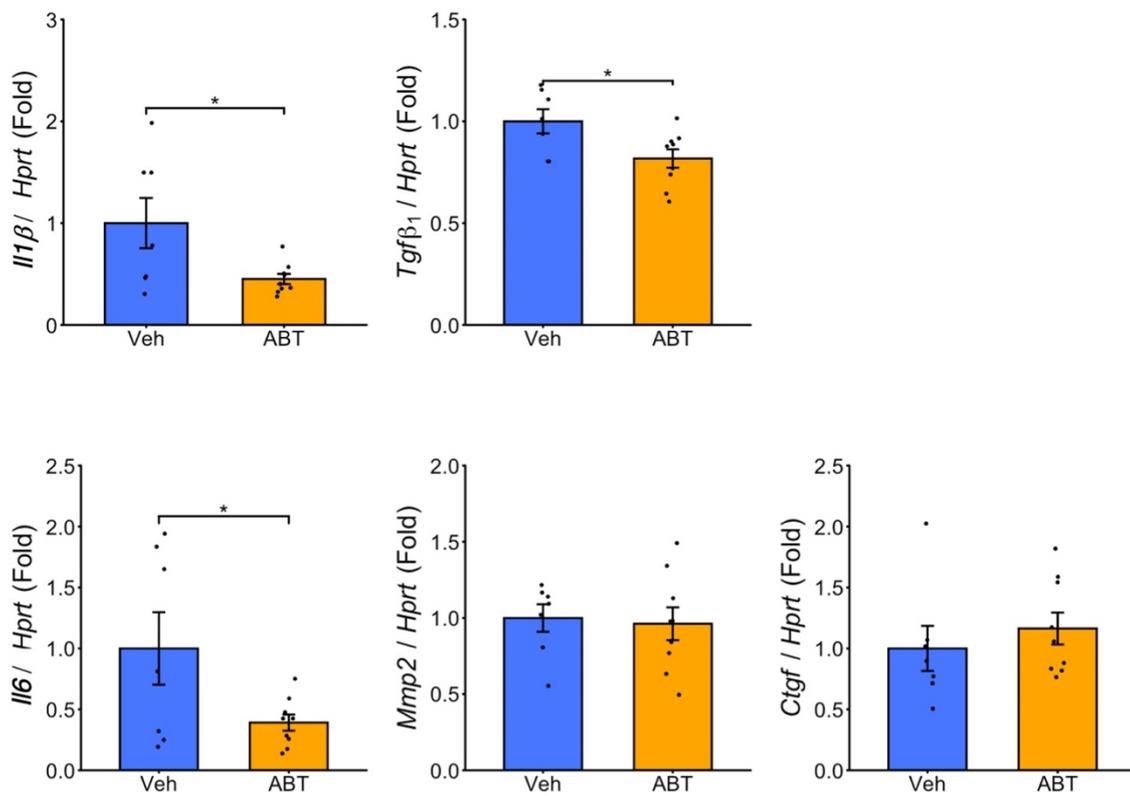


Fig. 2-27 ABT263投与群におけるSASP関連因子の変化

Vehicle及びABT263を投与したラット前脛骨筋におけるSASP関連因子 (*Il1β*, *Tgfβ₁*, *Il-6*, *Mmp2*, *Ctgf*) の発現。データは平均値±標準誤差で表した。* $p < 0.05$ (t-test)。(n = 7, 9)。

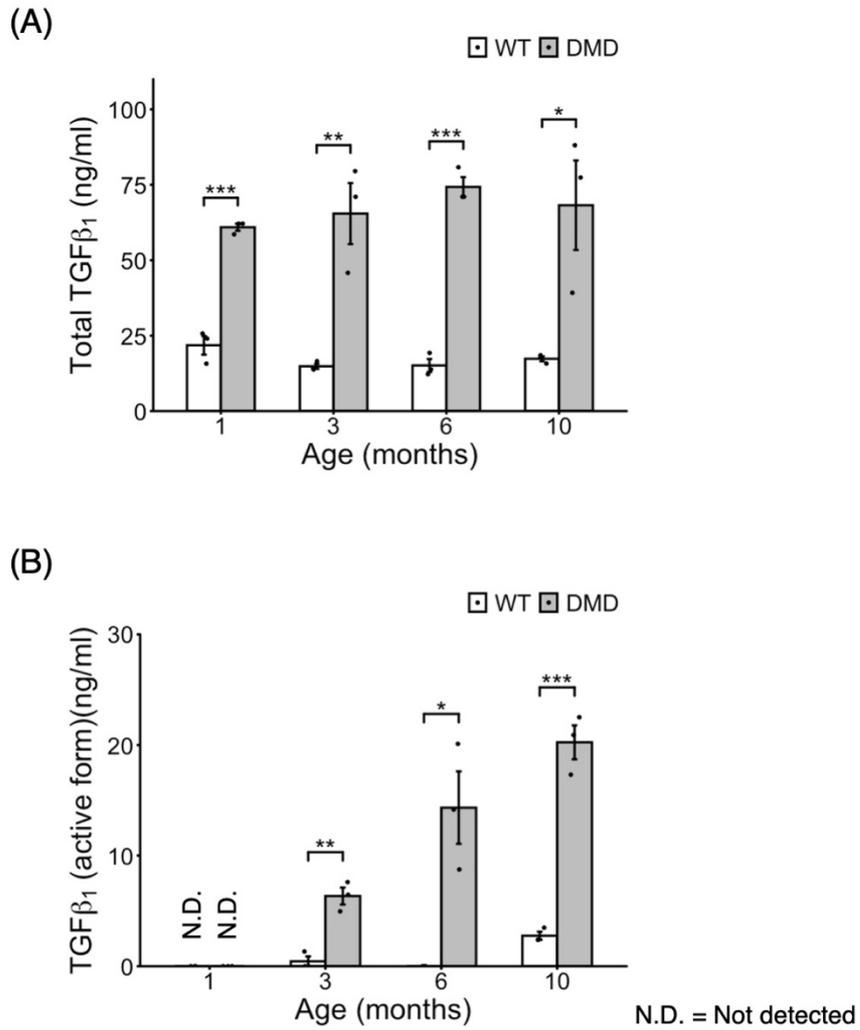


Fig. 2-28 DMDラットにおけるTGF-β発現動態の変化

- (A) 1-10ヶ月齢のWT及びDMDラットの前脛骨筋中のTGF-β1タンパク全量をELISAによって定量した。
 (B) 1-10ヶ月齢のWT及びDMDラットの前脛骨筋中の活性型TGF-β1タンパク量をELISAによって定量した。
 データは平均値±標準誤差で表した。(WT: n = 3; DMD: n = 3, each)。*p < 0.05, **p < 0.01 (t-test)。

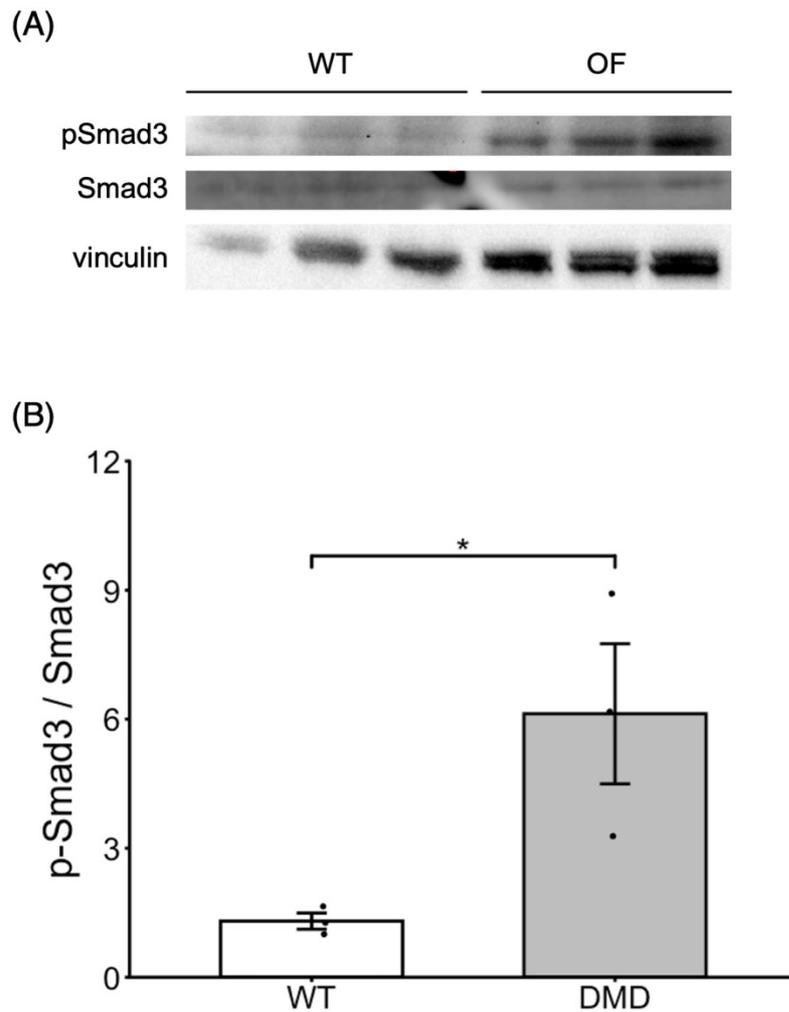


Fig. 2-29 DMDラットにおけるTGF- β シグナルの変化

6ヶ月齢のWT及びDMDラット前脛骨筋中のSmad3のリン酸化の程度をウェスタンブロットにより定量した。データは平均値±標準誤差で表した。WT: n = 3; DMD: n = 3。*p < 0.05 (t-test)。

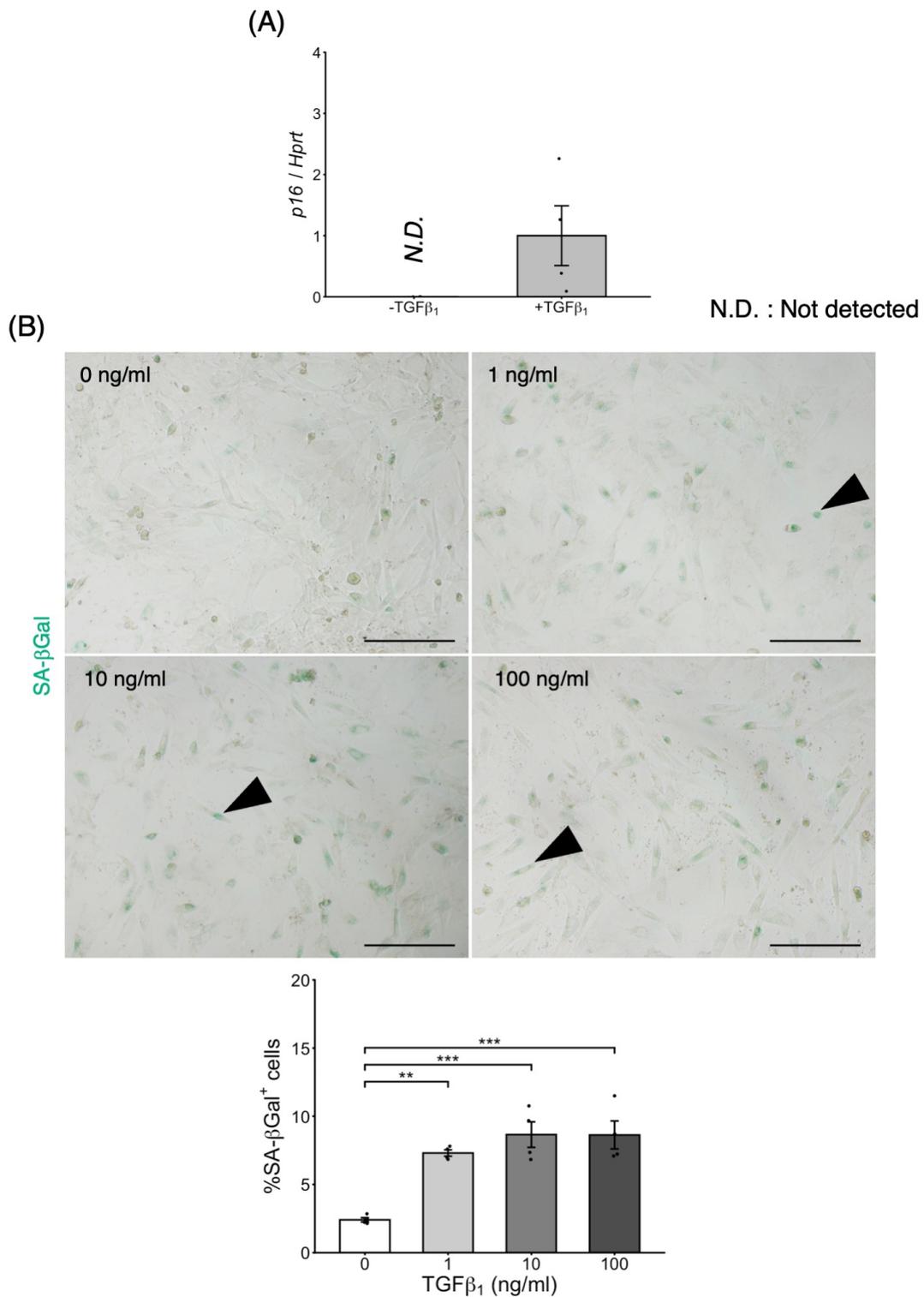


Fig. 2-30 TGF-βによる細胞老化誘導効果

- (A) 3ヶ月齢のWT前脛骨筋由来初代培養細胞において100 ng/mlでTGF-β1を4日間添加し、p16の発現量を定量した。
- (B) 3ヶ月齢のWT前脛骨筋由来初代培養細胞において0、1、10、100 ng/mlでTGF-β1を4日間添加し、SA-βGal染色を行い、陽性細胞の割合を定量した。同符号間に有意差はない。Scale bar = 200 μmを表す。データは平均値±標準誤差で表した。** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Tukey-Kramer's test)。 (n = 4, each)。

Patients	Age	Diagnosis	Mutation	Specimen	Nationality
1	4	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
2	4	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
3	4	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
4	8	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
5	10	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
6	10	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
7	14	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
8	15	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
9	18	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
10	32	non-DMD	No sign of muscle pathology on histology.	Biopsy	Japan
11	2	DMD	exon66: c. 9568C>T (R3190X)	Biopsy	Japan
12	2	DMD	exon33: c.4540G>T (E1514X)	Biopsy	Japan
13	2	DMD	exon33: c.4540G>T (E1514X)	Biopsy	Japan
14	2	DMD	exon53_55del	Biopsy	Japan
15	3	DMD	exon7: c.568C>T (Q190X)	Biopsy	Japan
16	3	DMD	exon21: c. 2701G>T (G901X)	Biopsy	Japan
17	3	DMD	exon59: c.8713C>T (R2905X)	Biopsy	Japan
18	3	DMD	exon62: c.9204_9207delCAAA (N3068KfsX20)	Biopsy	Japan
19	3	DMD	exon23: c.3079G>T (G1027X)	Biopsy	Japan
20	4	DMD	exon14: c. 1663C>T (Q555X)	Biopsy	Japan
21	4	DMD	exon20_29del	Biopsy	Japan
22	5	DMD	exon10: c.1087C>T (Q363X)	Biopsy	Japan
23	5	DMD	exon41: c.5867G>A (W1956X)	Biopsy	Japan
24	5	DMD	exon8_17dup	Biopsy	Japan
25	6	DMD	exon41: c.5758C>T (Q1920X)	Biopsy	Japan
26	6	DMD	exon59: c.8692C>T (Q2898X)	Biopsy	Japan
27	8	DMD	exon13: c.1533_1536delITCAC (H512WfsX4)	Biopsy	Japan
28	9	DMD	exon20: c.2435G>A (W812X)	Biopsy	Japan
29	9	DMD	exon48_50del	Biopsy	Japan
30	10	DMD	Intron6: c.530+1G>A	Biopsy	Egypt
31	10	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
32	10	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
33	10	DMD	exon17_44dup	Biopsy	Japan
34	11	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
35	11	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Myanmar
36	12	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
37	12	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
38	13	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
39	14	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
40	14	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Biopsy	Japan
41	20	DMD	exon12, 13, 17 19del	Autopsy	Japan
42	23	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Autopsy	Japan
43	26	DMD	exon43: c. 6283C>T (R2095X)	Autopsy	Japan
44	33	DMD	Decreased immunoreactivity to dystrophin. Typical clinical signs of DMD.	Autopsy	Japan

Table 2. 実験に参加したDMD患者及び非DMD患者リスト

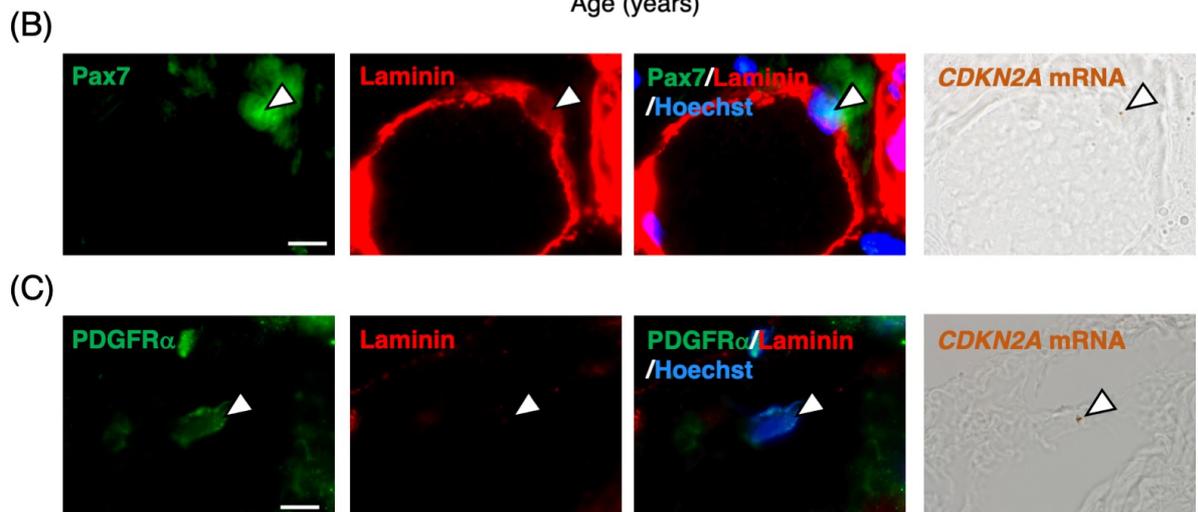
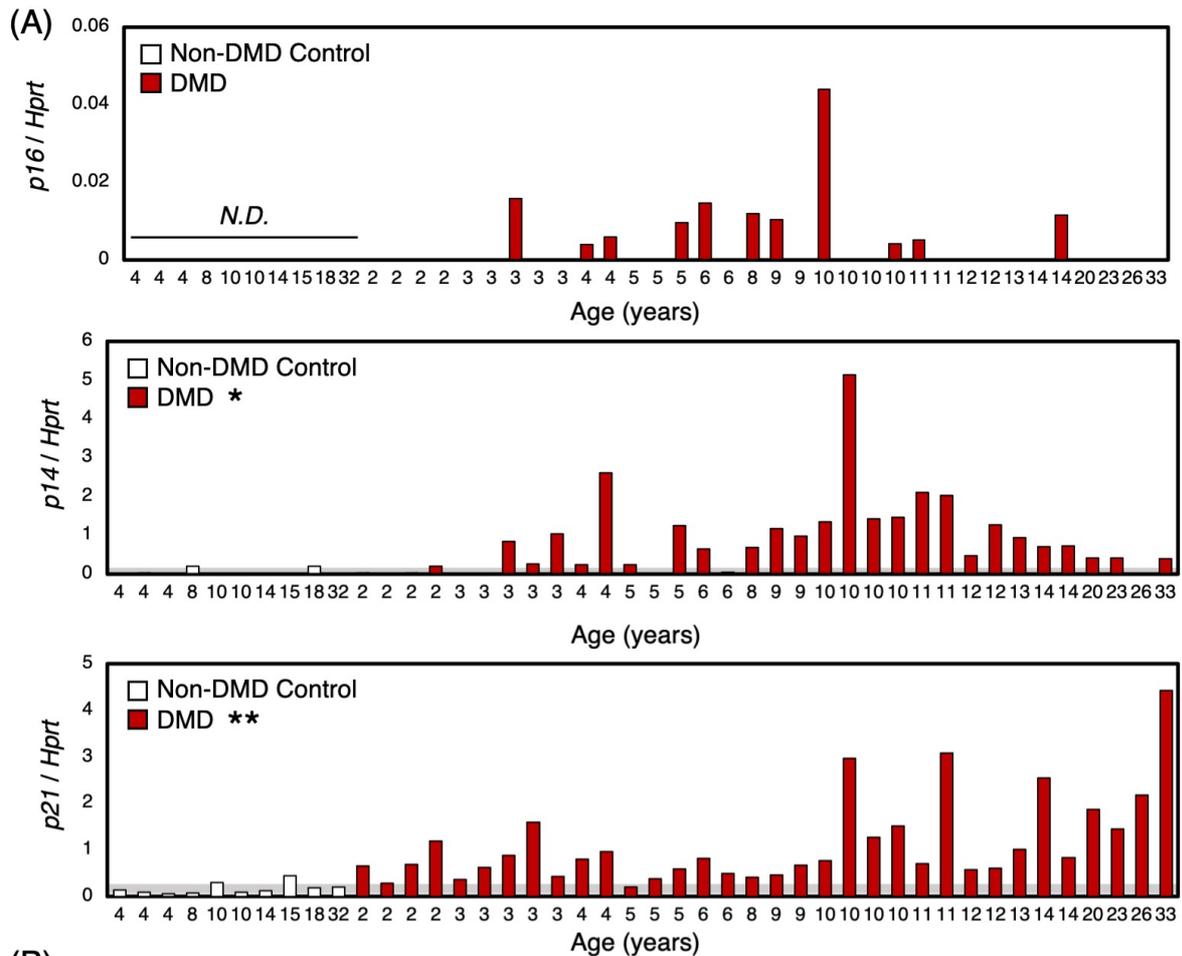


Fig. 2-31 ヒトDMD患者における細胞老化

- (A) 非DMD患者及びヒトDMD患者骨格筋における細胞老化関連因子 (*p16*, *p19*, *p21*) の発現。データはサンプル毎に生データを棒グラフで表した。グラフ中の灰色の帯は非DMD患者筋における平均値±標準偏差の幅を示す。(n = 10, 35)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t-test, non-DMD vs DMD patients)。
- (B) DMD患者骨格筋において*CDKN2A*に対するin situ hybridizationを行ったあとに、Pax7、及び基底膜のマーカであるlamininに対する免疫染色を行った像。矢頭は*CDKN2A*のmRNAを示している。
- (C) DMD患者骨格筋において*CDKN2A*に対するin situ hybridizationを行ったあとに、PDGFR α 、lamininに対する免疫染色を行った像。矢頭は*CDKN2A*のmRNAを示している。

第三章

老化間葉系前駆細胞による筋ジストロフィー病態悪化機構の解明

緒言

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は持続的な筋損傷に伴う慢性炎症を特徴とし、その病態進行に伴って骨格筋組織中に重度の線維・脂肪組織の沈着を認める。これらの線維・脂肪組織はどちらも骨格筋の恒常性維持に悪影響を及ぼす。骨格筋の線維化に関しては、運動機能や筋収縮能の低下 (Mann et al., 2011)、脂肪化に関しては筋機能の低下や、DMD 患者の重症度と相関することがわかっている (Gaeta et al., 2012; Hilton et al., 2008)。近年の研究によって、これらは両者ともに骨格筋間質に存在する間葉系前駆細胞を起源とすることが明らかになった (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010)。間葉系前駆細胞の線維芽細胞、脂肪細胞への分化能は様々な液性因子によって制御されている。例えば、TGF- β は間葉系前駆細胞において線維芽細胞マーカーである CTGF や Colla1、 α -actin-2 (Acta2) 等の発現を増加させる (Uezumi et al., 2011)。また、bFGF は間葉系前駆細胞の脂肪分化能を亢進させることがわかっている (Nakano et al., 2016)。間葉系前駆細胞は通常筋衛星細胞による筋分化を促進することで筋再生能を亢進させる (Joe et al., 2010)。当研究室では、これまでにラット骨格筋から間葉系前駆細胞クローン 2G11 を樹立しており (Murakami et al., 2011)、2G11 細胞が実際に線維芽細胞、脂肪細胞分化能を持ち、筋芽細胞の分化を促進することを確認している (Nakano et al., 2016; Takegahara et al., 2014; Takeuchi et al., 2016)。

第二章では、細胞老化が DMD の病態進行に関与することを示した。これまで、老化細胞の性質を調べるために、人為的に細胞老化を誘導する様々な手法が開発されてきた。最も古典的な方法は培養細胞において分裂限界まで継代を繰り返す手法であり、これによって誘導される細胞老化は Replicative senescence と呼ばれる。他にもがん遺伝子を強制発現させる Oncogene-induced senescence、直接 DNA を損傷させるために H₂O₂ や電離放射線を用いる Oxidative stress-induced senescence、Ionizing radiation (IR)-induced senescence などがある。このような処置によって実際に細胞老化が誘導されたかどうかは細胞分裂抑制因子 (p16、p21、p53 など) の発現や、SA- β Gal 染色、SASP 因子の発現などによって確認されることが多いが、細胞分裂抑制因子の発現動態に関しては注意が必要である。例えば同じ条件で酸化ストレスによって細胞老化を誘導した場合でも特定の細胞種では p16 が誘導されるが (Parrinello et al., 2003)、同じ刺激でも p16 が誘導されない場合もあり (Itahana et al., 2003)、細胞老化が誘導されているかどうかは複数の指標によって評価しなければならない。

第二章では、ABT263 投与時に、筋衛星細胞の総数が Vehicle 群と変わらなかったにも関わらず、筋再生能が亢進することを示した。このことから、老化間葉系前駆細胞による未知の筋再生抑制効果が存在する可能性が考えられる。その機序として、①老化間葉系前駆細胞における線維芽細胞・脂肪細胞分化能が亢進することによって線維・脂肪化が亢進し、間接的に筋再生・筋機能を低下させる可能性、②老化間葉系前駆細胞の SASP によって直接的に

筋再生を抑制する可能性の2つを考えた。そこで、本章では主に間葉系前駆細胞に着目し、①、②のそれぞれの機序について2G11細胞を用いて検討することで、老化間葉系前駆細胞によるDMD病態進行機序を解明することを目的とした。

材料と方法

動物と飼育条件

本研究では、動物繁殖研究所 (茨城、日本) から購入した野生型の雄ラットを用いた。

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) 及び水は自由に摂取させた。全ての実験は「東京大学動物実験実施マニュアル」に基づいて行った。

細胞培養と免疫染色

1. 株化細胞

当研究室で樹立したラット間葉系前駆細胞クローン 2G11 細胞 (Murakami et al., 2011; Takeuchi et al., 2016) は、poly-L-lysine (Sigma-Aldrich、MO、USA) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen、CA、USA) でコートされたディッシュに播種され、10% Fetal Bovine Serum/DMEM+ 50 U/ml Penicillin+ 50 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin (10% FBS/DMEM+PSG: 通常培地) で維持された。プレートのコートにあたっては、まず培養表面を poly-L-lysine で 5 分間処理し、滅菌超純水で 3 回洗浄してよく乾燥させた。さらに、0.001% の human plasma fibronectin を含む DMEM で 30 分以上処理し、細胞を播種する直前に吸引除去した。ラット筋芽細胞株 L6 は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のご厚意で賜った。L6 細胞を培養する際には 10% FBS/DMEM+PSG を使用し、特殊なコートをせずにそのままプレートに播種した。

2. 2G11 細胞、L6 細胞に対する細胞老化誘導

酸化的ストレスによって 2G11 細胞、L6 細胞に細胞老化を誘導するために、10% FBS/DMEM+PSG に 600 μM の H_2O_2 を添加し、 37°C で 30 分培養した。PBS で細胞を 3 回洗浄した後、再び 10% FBS/DMEM+PSG で培養した。4 日後、同様に H_2O_2 による処理を行った後にさらに 4 日間培養し、実験に使用した。なお、このような酸化的ストレス等によって分裂限界以前に生じた細胞老化のことを、早期細胞老化 (Premature-senescence: PMS) と呼ぶ場合がある。 H_2O_2 処置によって老化した 2G11 細胞のことを、PMS-2G11 細胞、 H_2O_2 処置によって老化した L6 細胞のことを PMS-L6 細胞と呼称する。

3. 2G11 細胞、PMS-2G11 細胞に対する線維芽細胞分化誘導および脂肪分化誘導

線維芽細胞分化誘導には、10 ng/ml の TGF- β 1 を含む 10% FBS/DMEM+PSG で 3 日間細胞を培養した。

脂肪分化誘導には、10 ng/ml の bFGF を含む 10% FBS/DMEM+PSG で 1 日間培養を行った後、インスリン (1 µg/ml)、デキサメタゾン (0.1 µg/ml)、イソブチルメチルキサンチン (27.8 µg/ml)、トログリタゾン (10 µM) (第一三共株式会社から分与) を含む 10% FBS/DMEM+PSG を用いて 2 日間培養した。次に、インスリンとトログリタゾンのみを含む 10% FBS/DMEM+PSG でさらに 2 日間培養し、解析を行った。

4. WT ラット骨格筋初代培養細胞 (WT ラット由来筋芽細胞)

WT ラットから採取した大腿四頭筋を PBS に浸した。筋に付着している結合組織を除去したのち、10 cm シャーレ (BD Falcon, NJ, USA) に骨格筋を移し、鋏で細かく刻んだ。細切した組織をそれぞれ Protease type XIV : Bacterial (EC, 3, 4, 24, 31) from *Streptomyces griseus* (Sigma, 最終濃度 1.25 mg/ml) を含む 40 ml の PBS により 37°C で 1 時間酵素処理した。酵素処理終了後、3,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。再び 37°C の PBS を加え攪拌し、1,000 rpm の遠心分離を行い、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 回繰り返す、回収した上清を 3,000 rpm で 3 分間遠心分離した。沈殿した細胞を 10% FBS/DMEM+PSG に懸濁し、70 µm 径の Cell Strainer (BD) を用いて濾過した。得られた細胞は poly-L-lysine (Sigma) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen) でコートした 48-well プレート (IWAKI, 千葉, 日本) に播種した。細胞は通常培地にて、37°C、湿度飽和、5% CO₂-95% 空気条件下で培養した。培養開始 24 時間後に培地交換を行ったのち、Pax7、MyoD に関しては培養開始 48 時間後、Myogenin、Myosin Heavy Chain (MHC) に関しては、培養開始 72 時間後に細胞を固定し、免疫染色を行った。なお、WT では初代培養細胞中に約 95% の純度で筋芽細胞を取得できるため、以降 WT 由来筋芽細胞と記す (Tatsumi et al., 2006))

5. 2G11 細胞、PMS-2G11 細胞または L6 細胞、PMS-L6 細胞と WT 由来筋芽細胞との共培養

24 well polyester Transwell Clear plate (Corning, NY, USA) を用いて、上層および下層を poly-L-lysine (Sigma) と 0.001% human plasma fibronectin (Invitrogen) でコートした。上層にラット骨格筋初代培養細胞を播種し、下層に 1x10⁴ 個の 2G11 細胞または 4x10⁴ 個の PMS-2G11 細胞を播種した。Pax7、MyoD の解析には 2 日間、Myogenin、MHC の解析や RNA 抽出実験には 3 日間共培養を行った後、細胞を固定し、免疫染色に供した。L6 細胞や PMS-L6 細胞を用いた共培養も同様にして行ったが、これらの細胞を播種する際には、特殊なコーティングは行わなかった。

6. 培養細胞の免疫染色

4% PFA/PBS で各ウェルを満たし、室温で 15 分間反応させることにより、細胞の固定を行った。PBS で 3 回洗浄後、5% NGS + 0.1% Triton-X を含む PBS にて 20 分間ブロッキングした。再度 PBS で洗浄後、一次抗体液を 4°C で一晩反応させた。一次抗体液として、抗 Pax7

マウスモノクローナル抗体 (1:200; Developmental Studies Hybridoma Bank: DSHB, IA, USA)、抗 MyoD マウスモノクローナル抗体 (1:200; Novocastra, Wetzlar, Germany)、抗 Myogenin マウスモノクローナル抗体 (1:200; DSHB)、抗 MHC マウスモノクローナル抗体 (1:400; DSHB)、抗 γ H2AX ウサギポリクローナル抗体 (1:1000; Abcam, Cambridge, UK)、抗 α -SMA マウスモノクローナル抗体 (1:400; Sigma)、抗 Perilipin ウサギポリクローナル抗体 (1:500; Cell Signaling)、抗 PPAR γ マウスモノクローナル抗体 (1:100; Santa Cruz Biotechnology, TX, USA)、抗 GFP ウサギポリクローナル抗体 (1:500; MBL ライフサイエンス、東京、日本) を用いた。なお、一次抗体液はすべて 5% NGS/PBS で希釈した。反応終了後、PBS で 3 回洗浄し、二次抗体液として 5% NGS/PBS で 500 倍に希釈した Alexa Flour® 488 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa Flour® 594 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa Flour® 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen)、Alexa Flour® 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen) を室温で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、PBS にて 0.1 μ g/ml に希釈した hoechst33258 (同仁化学研究所、熊本、日本) 溶液を 5 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡下で観察・撮影を行った。

7. 培養細胞の SA- β Gal 染色

Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて fixation buffer で 10 分細胞を固定したあと、Staining solution で 15 時間、37°C で培養し、PBS で洗浄後に観察を行った。

定量的 PCR

1. RNA の抽出

クリオスタットにて薄切した筋切片 (厚さ 7 μ m、約 50 枚) をあらかじめ-20°C に冷却したチューブに回収し、TRIZOL Reagent (Invitrogen) を加え、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行った後、上清を新しいチューブに移した。1 ml の TRIZOL Reagent に対して 200 μ l のクロロホルム (和光純薬、大阪、日本) を加え、攪拌したのちに、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上層の透明な水層を別のチューブに回収した。これと等量のイソプロピルアルコール (和光純薬) を加え、攪拌し、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行った。上清を捨て、70% エタノール 500 μ l (和光純薬) を加え、さらに 15,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を捨て、風乾させたのちに 10-20 μ l の Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水を加え、RNA を溶解させた。得られた RNA は、NanoDrop One (ThermoFisher Scientific, MA, USA) にて濃度を測定した。

2. 逆転写反応

まず、以下に示した反応溶液を 65°C で 15 分間処理したのち、氷上で急冷した。

Total RNA (1-2μg)	5 μl
Oligo d(T) (Invitrogen)	1 μl
Total volume	6 μl

次に、以下に示す反応溶液を用いて 42°C で 60 分間逆転写反応を行った。

Total RNA+Primer	6 μl
dNTP (2mM、Applied biosystems)	5 μl
5×RT buffer	4 μl
0.1M DTT	2 μl
Super Script-II (Invitrogen)	1 μl
RNase Inhibitor (Applied biosystems)	1 μl
DEPC 処理水	1 μl
Total volume	20 μl

反応終了後、94°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷した。

3. 定量的 PCR

逆転写反応によって得られた cDNA を用い、Light Cycler 2 (Roche、Basel、Switzerland) を用いた qPCR により各遺伝子の発現を定量した。内部標準遺伝子としては、hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) を用いた。各サンプルの cDNA 量から増幅される HPRT 遺伝子 PCR 産物量がほぼ同じになるように cDNA 量を合わせたのち、各遺伝子に対応するプライマーを用いて定量的 PCR を行った。定量的 PCR に用いたプライマーを下記に示す。

Gene Name	F/R	Sequence (5' → 3')
<i>Acta2</i>	F	TGCCATGTATGTGGCTATTCA
	R	ACCAGTTGTACGTCCAGAAGC
<i>Colla1</i>	F	TGCTTGAAGACCTATGTGGGTA
	R	AAAGGCAGCATTTGGGGTAT
<i>Ctgf</i>	F	GGTGACCTAGAGGAAAACATTAAGA
	R	CCGGTAGGTCTTCACACTGG
<i>p16</i>	F	TTCACCAAACGCCCCGAACA
	R	CAGGAGAGCTGCCACTTTGAC

<i>p19</i>	F	GTGTTGAGGCCAGAGAGGAT
	R	TTGCCCATCATCATCACCT
<i>p21</i>	F	GACATCTCAGGGCCGAAA
	R	GGCGCTTGGAGTGATAGAAA
<i>p15</i>	F	AGGGCCACCGTGATATTG
	R	GTTCTGGAAGGCCAGCAG
<i>p53</i>	F	AGAGAGCACTGCCACCA
	R	AACATCTCGAAGCGCTCAC
<i>Il6</i>	F	CCCTTCAGGAAGTATGAA
	R	ACAACATCAGTCCCAAGAAGG
<i>Tgfβ1</i>	F	CCTGGAAAGGGCTCAACAC
	R	CAGTTCTTCTCTGTGGAGCTGA
<i>Ccl2</i>	F	CGTGCTGTCTCAGCCAGAT
	R	GGATCATCTTGCCAGTGAATG
<i>Mymk</i>	F	GATGCTTCGCTTCTTCTTTGA
	R	AGCCTTCTTGTGACCTTGG
<i>Mymx</i>	F	CCGTTCCACTGCTCCCGTT
	R	CGTCTTGGGAGCTCAGTCGG
<i>Hprt</i>	F	GACCGGTTCTGTCATGTCG
	R	ACCTGGTTCATCATCACTAATCAC

また、標準検量線作成のために別途 cDNA を 20 倍、200 倍、2,000 倍希釈した三段階の濃度のサンプルを用いて、各プライマーセットに対して標準検量線を作成した。超純水は全て MilliQ 超純水製造装置 (Millipore, MA, USA) により精製されたものを用いた。なお陰性対照には cDNA の代わりに滅菌超純水のみを用いた。cDNA、0.5 mM のプライマー、THUNDERBIRD SYBR® qPCR Mix (東洋紡、大阪、日本) を以下の組成で混合した。

希釈した cDNA	5 μl
滅菌超純水	4 μl
Forward Primer	0.5 μl
Reverse Primer	0.5 μl
SYBR qPCR Mix	10 μl
Total volume	20 μl

以下の条件で PCR 反応を行った。72°C を 1 分間維持するフェーズが終了した時点で蛍光度を検出し、これを 1 サイクルごとに行った。

95°C	1分	45 サイクル
95°C	5秒	
60°C	30秒	
72°C	1分	

各遺伝子発現量を *Hprt* 遺伝子発現量により除した値を定量 PCR による各遺伝子の相対的な発現量とした。

ウェスタンブロット

1. 細胞からのタンパク質抽出

プレートに接着した培養細胞から培養上清を抜去し、TBS で3回ほど洗浄した後、50-100 μ l の RIPA buffer (0.1% SDS、2 mM EDTA、1% NP-40、50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、50 mM NaF、0.5% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl) を加え、上清を別のチューブに回収した。プロテインアッセイ BCA 試薬 (和光純薬) を用いてタンパク質濃度を測定したあと、5-10 μ g/ μ l になるように必要ならば RIPA buffer で希釈し、6x Sample buffer (0.35M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% Glycerol、3.1% Dithiothreitol) を添加した。沸騰水中で 100°C、5分加熱処理し、S-S 結合を切断した。

2. SDS-PAGE とブロッティング

サンプルを、SDS を含む 10% ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した。各レーンに 20-25 μ g のタンパク質をアプライし、泳動バッファー (25 mM Tris、192 mM Glycine、0.1% SDS) 中で 150V の低電圧下で約 1 時間泳動した。総タンパク質量を測定するため、同量のサンプルを泳動した後のゲルを Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色に供した。ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD、Hercules、CA、USA) に転写バッファー (10% メタノール、25 mM Tris、190 mM Glycine) を加え、45V の定電圧下で一晩ブロッティングを行い、ポリアクリルアミドゲルからメンブレンへ転写を行った。その後、メンブレンを取り出し、5% スキムミルク/TBS-T (0.1% Tween 20/TBS) に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。一次抗体には TBS-T で 4000 倍に希釈した抗 α -SMA マウスモノクローナル抗体 (Sigma) を用いて 4°C で一晩反応させた。反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら TBS-T にて 5 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/TBS-T で 10,000 倍希釈した Horseradish Peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Laboratory、MA、USA) を用い、室温で 1 時間反応させた。TBS-T で 3 回洗浄した後、ECL Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare、Chalfont Saint Giles、UK) により発光させ、ChemiDoc XRS+システム (BIO-RAD) により画像を取得し、画像処理により各タンパク質の定量を行った。

In vitro RNA 合成および mRNA、siRNA の transfection

1. In vitro RNA 合成

T3 プロモーターを 5' 端に付加した Forward プライマーを用いて GFP、MYMK、MYMX を発現する細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した後、各遺伝子の ORF を PCR によって増幅した。以下に増幅に用いたプライマーの配列を示す。

Gene Name	F/R	Sequence (5' → 3')
<i>Gfp</i>	F	AATTAACCCTCACTAAAGGGAGAATGGTGAGCAAGGGCGA GGAGCTG
	R	TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT
<i>Mymk</i>	F	GAAATTAACCCTCACTAAAGGGAGAATGGGATTACACCTAC GTTC
	R	TTACTGTGAGTGGCTCGACCGAAAAAC
<i>Mymx</i>	F	GAAATTAACCCTCACTAAAGGGAGAATGCCCGTTCCACTGC TCCC
	R	TCACTTCCGGGGACCCAATCTCTCCTT

増幅産物をゲル抽出後、NanoDrop One (ThermoFisher Scientific) にて濃度を測定した後に、mMESSAGE mMACHINE T3 Transcription kit (Invitrogen) を用いて 0.3-0.5 μ g のゲル抽出産物を鋳型に In vitro RNA 合成を行った。37°C で 1 時間 45 分反応後、kit 付属の TURBO DNase (Invitrogen) を各サンプルに 1 μ l ずつ加え、15 分間 37°C で反応させた。次に、Poly (A) tailing kit (Invitrogen) によって mRNA に Poly (A) を付加した。Poly (A) が付加された mRNA はエタノールを用いた常法によって精製され、NanoDrop One (ThermoFisher Scientific) にて濃度を測定した。

2. mRNA の transfection

WT 由来筋芽細胞を 24 well プレートに播種し、単独、あるいは 2G11 細胞、PMS-2G11 細胞と 2 日間共培養した後、Lipofectamine MessengerMax Transfection Reagent (Invitrogen) を用いて GFP mRNA、*Mymk* mRNA、*Mymx* mRNA、または *Mymk* mRNA、*Mymx* mRNA の両方を、1 well あたり合計 500 ng になるように transfection した。Transfection 後 24 時間培養し、細胞を固定した後、免疫染色に供した。

3. siRNA の transfection

2G11 細胞、PMS-2G11 細胞を 10 cm シャーレにそれぞれ 2×10^5 、 4×10^5 個になるように細胞を播種した翌日に Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen) を用いてシャ

ーレ 1 枚あたり 50 pmol の siRNA を添加した。*Tgfb1* に対する siRNA はブレデザインの Mission siRNA (Sigma) を 3 種類使用し、合計で 50 pmol になるように調整した。対照群には Mission siRNA Universal Negative Control (Sigma) を transfection した。siRNA 添加 2 日後から WT 由来筋芽細胞と共培養を開始し、共培養 3 日後に下層の筋芽細胞を固定し、上層の siRNA を処置された 2G11 細胞、PMS-2G11 細胞からは RNA を抽出した。

統計処理

数値データは平均値±標準誤差で示し、生データを黒点で表した。2 群間の比較は Unpaired Welch's *t*-test (two-tailed) を用いて行った。3 群以上の場合には Tukey-Kramer's test を用いた検定を行った。なお、Fig. 3-11B に示される各核数をもつ筋管細胞の分布の代表値に相違があるかどうかに関しては、Wilcoxon rank sum test (two-tailed) を用いて検定を行った。危険率 5%未満をもって有意な差があると判定した。グラフの描画や p 値の計算は統計ソフト R (ver.4.0.0) を用いて行われた。

結果

酸化ストレスとして H₂O₂ を用いた、2G11 細胞における細胞老化誘導

当研究室で樹立したラット間葉系前駆細胞クローン 2G11 に、酸化ストレスとして H₂O₂ を添加することで人工的に細胞老化を誘導できるかどうかを検討した。Fig. 3-1 に示すタイムスケジュールに従って 4 日おきに 2 回 H₂O₂ を処置した。H₂O₂ 処置によって実際に細胞老化が誘導されたかどうかを検討するために、細胞老化関連因子である *p16*、*p19*、*p21*、*p53* の発現を調べたところ、*p21* および *p53* の発現上昇が認められた (Fig. 3-2A)。このような細胞老化関連因子の発現上昇に伴って SASP 関連因子である *Ccl2*、*Il6*、*Tgfβ1* の発現が上昇していた (Fig. 3-2B)。さらに、H₂O₂ 処置によって、細胞老化のマーカーである γ H2AX を発現する細胞の数や、SA- β Gal 染色陽性細胞数が増加しており (Fig. 3-3; Fig. 3-4)、H₂O₂ 処置によって 2G11 細胞に細胞老化が誘導されたことが確認できた。このような酸化ストレス等によって分裂限界以前に生じた細胞老化のことを、早期細胞老化 (Premature-senescence: PMS) と呼ぶ場合がある。以降、H₂O₂ 処置によって老化した 2G11 細胞のことを、PMS-2G11 細胞と呼称する。

PMS-2G11 細胞における線維芽細胞分化能の検討

老化細胞における線維芽細胞分化能を検討するために、2G11 細胞に細胞老化を誘導したあと、培地中に TGF- β 1 を添加し、3 日間培養した (Fig. 3-5)。2G11 細胞に TGF- β 1 を添加すると、これまで知られている通り *Ctgf*、*Colla1*、*Acta2* の発現が顕著に増加した (Fig. 3-6)。一方で、細胞老化誘導自体によって PMS-2G11 細胞では *Ctgf* の発現が増加するが、*Colla1* や *Acta2* の発現は変化しなかった (Fig. 3-6)。PMS-2G11 細胞に TGF- β 1 を添加すると、*Ctgf*、*Colla1*、*Acta2* のわずかな発現上昇が認められるが、通常の 2G11 細胞に TGF- β 1 を添加した場合に比べてその発現上昇率は低かった (Fig. 3-6)。 α SMA に対する免疫染色を行い、ストレスファイバー形成能を比較したところ、PMS-2G11 細胞では TGF- β 1 添加の有無に関わらずストレスファイバーが形成されていた (Fig. 3-7A)。しかし、ウェスタンブロットによって α SMA のタンパク質レベルでの発現量を比較したところ、細胞老化誘導自体や、PMS-2G11 における TGF- β 1 処置によっても、 α SMA のタンパク質量は TGF- β 1 を処置していない通常の 2G11 細胞と同程度しか発現していないことが明らかになった (Fig. 3-7B, C)。以上の結果から、老化した間葉系前駆細胞はストレスファイバーを形成するものの、線維芽細胞分化能は減弱することが示された。

PMS-2G11 細胞における脂肪細胞分化能の検討

老化間葉系前駆細胞における脂肪分化能を検討するために、2G11 細胞に細胞老化を誘導

したのち、bFGF を添加して 1 日培養したあと、4 日間脂肪分化誘導を行った (Fig. 3-8)。脂肪細胞のマーカーである PPAR γ 及び Perilipin に対して免疫染色を行ったところ、通常の 2G11 細胞においても脂肪分化誘導によって PPAR γ または Perilipin 陽性の細胞が出現するが、bFGF の添加によってその割合が増加し、脂肪分化能が亢進することが確認できた (Fig. 3-9A, C; Fig. 3-9B, D)。一方、PMS-2G11 細胞に脂肪分化誘導を施しても、PPAR γ または Perilipin の発現は全く認められず、PMS-2G11 細胞に bFGF 添加した場合でも同様であった (Fig. 3-9A, C; Fig. 3-9B, D)。以上のことから、細胞老化によって脂肪細胞分化能は消失することが判明した。

PMS-2G11 細胞の SASP が筋芽細胞に及ぼす影響の検討

通常、間葉系前駆細胞は筋芽細胞の分化を促進する働きを持つ。実際、当研究室で樹立された 2G11 細胞も液性因子性に筋芽細胞の分化を促進することが示されている (Takegahara et al., 2014)。Fig. 3-2 では PMS-2G11 細胞において、液性因子の発現動態に変動が見られており、このような間葉系前駆細胞の表現型の変化が筋芽細胞の分化にも影響を及ぼす可能性がある。そこで、セルカルチャーインサートを用いて WT ラット由来筋芽細胞を単独、あるいは 2G11 細胞、PMS-2G11 細胞と非接触性に 3 日間共培養し、筋管細胞のマーカーである Myosin Heavy Chain (MHC) に対する免疫染色を行った (Fig. 3-10)。その結果、2G11 細胞と共培養した場合には、これまでの報告通り単独で培養した筋芽細胞と比較して筋管細胞あたりの核数が増加した (Fig. 3-11A, B) (Takegahara et al., 2014)。また、視野中の核数のうち、MHC 陽性の核の割合を定量することで融合能の指標とする Fusion index も同様に増加していた (Fig. 3-11C)。一方で、WT 由来筋芽細胞を PMS-2G11 細胞と共培養した場合には MHC 陽性細胞は全く認められず (Fig. 3-11A, C)、筋管細胞の形成が著しく阻害されていた。次に、どのようにして筋管細胞の形成が阻害されているかを検討した。まず、PMS-2G11 細胞と共培養したことによって、筋芽細胞側に細胞老化が誘導され、これが分裂停止によって筋芽細胞数の減少や筋管細胞形成の消失につながった可能性を考えた。そこで、実際に分裂停止によって視野あたりの核数が減少しているかどうかを検討したところ、むしろ PMS-2G11 細胞と共培養することによって核数が増加していた (Fig. 3-12A)。また、細胞老化関連因子 *p15*、*p16*、*p19*、*p21*、*p53* の発現量を定量したところ、PMS-2G11 細胞との共培養によって発現が大きく変動する因子が確認できない (Fig. 3-12B) ことから、PMS-2G11 細胞の SASP は筋芽細胞に細胞老化を誘導しないことがわかった。通常、筋芽細胞は培養 2 日目までに活性化・分裂・増殖した後、培養 3 日目から分化・融合することによって筋管細胞を形成する。これらのうちのどのプロセスが阻害されることによって筋管細胞の形成が消失するかを調べるために、共培養 2 日目において活性化・分裂・増殖の指標である Pax7、MyoD の免疫染色を、共培養 3 日目において分化の指標である Myogenin の免疫染色を行った (Fig. 3-10)。その結果、PMS-2G11 細胞と共培養することによって、筋芽細胞単独で培養した場合に比べて、Pax7、MyoD 陽性細胞の割合が増加し、Myogenin 陽性細胞の割合は変化しな

った (Fig. 3-13)。以上のことから、筋芽細胞の活性化・分裂・増殖・分化は PMS-2G11 細胞と共培養しても阻害されないことが明らかになり、PMS-2G11 細胞の SASP は筋芽細胞の融合を阻害することが示唆された。そこで、筋芽細胞の融合に関与する遺伝子である *Myomaker* (*Mymk*)、*Myomixer* (*Mymx*) の発現量を調べたところ、PMS-2G11 細胞と共培養することによって、両者の発現量が低下していた (Fig. 3-14)。MYMK、MYMX を過剰発現させることによって PMS-2G11 細胞による融合阻害効果を緩和できるかどうかを検討するため、*Mymk*、*Mymx* の Open Reading Frame (ORF) をコードする mRNA を合成し、これを培養 2 日目にトランスフェクションした後、24 時間培養した。コントロール群には *Gfp* の mRNA をトランスフェクションした。その結果、トランスフェクションによって実際に GFP の発現が確認された (Fig. 3-15A)。WT 由来筋芽細胞を単独で培養した場合には、*Mymk* mRNA、*Mymx* mRNA あるいはその両方のトランスフェクションによってこれまでの報告通り筋芽細胞の融合が促進されることが確認された (Fig. 3-15B, C) (Bi et al., 2017)。一方、WT 由来筋芽細胞を PMS-2G11 細胞と共培養した場合には *Mymk*、*Mymx* あるいはその両方をトランスフェクションしても筋管細胞は形成されなかった (Fig. 3-15B, C)。以上のことから、PMS-2G11 細胞は SASP によって筋芽細胞の融合を阻害することが示されたが、MYMK、MYMX の発現抑制以外の影響によって筋芽細胞の融合が阻害されることが示唆された。

筋芽細胞クローン L6 の SASP が筋芽細胞に及ぼす影響の検討

第二章において、DMD ラットにおける老化細胞種として筋衛星細胞および間葉系前駆細胞が同定された。そこで、老化した筋衛星細胞の SASP が自己分泌的に作用し、自身の筋分化を抑制する可能性を検討するために、ラット筋芽細胞クローン L6 を用いた。L6 細胞においても 2G11 細胞と同様に酸化的ストレスとして H_2O_2 を使用することで人工的に細胞老化を誘導できるかどうかを検討したところ、SA- β Gal 染色陽性細胞の増加 (Fig. 3-16A) や、*Ccl2*、*Il6* の発現上昇 (Fig. 3-16B) などが観察され、 H_2O_2 処置によって細胞老化に伴って SASP も獲得することが確認された (PMS-L6 細胞)。一方で、2G11 細胞とは異なり、PMS-L6 細胞では *Tgf β 1* の発現量上昇は観察されなかった。次に、PMS-L6 細胞を WT 由来筋芽細胞とセルカルチャーインサートを用いて共培養した。その結果、PMS-L6 細胞を筋芽細胞と共培養すると、筋芽細胞単独で培養した場合や、筋芽細胞と通常の L6 を共培養した場合と同程度の Fusion index を示し (Fig. 3-17A, B)、PMS-L6 細胞の SASP は筋芽細胞の筋分化に影響を与えないことがわかった。

PMS-2G11 細胞由来 SASP 因子における筋融合阻害因子の探索

PMS-2G11 細胞の SASP は筋芽細胞の融合を抑制した一方、PMS-L6 細胞ではこのような効果は認められなかった。そこで、PMS-2G11 細胞由来の SASP 因子のうち、筋芽細胞の融合を阻害する因子を探索する上で、PMS-L6 細胞では発現上昇が見られなかったのに対し、PMS-2G11 で発現が亢進していた TGF- β 1 に着目した。TGF- β 1 は筋芽細胞の分裂・増殖か

ら、分化・融合におけるまで筋分化プロセスを広く阻害する。そこで、PMS-2G11 細胞において *Tgfβ1* に対する siRNA を導入し、その発現を抑制した上で WT 由来筋芽細胞と共培養を行った。まず、*Tgfβ1* に対する siRNA の導入によって、導入 5 日目でも実際に *Tgfβ1* の発現量が低下していることを確認した (Fig. 3-18A)。2G11 細胞、PMS-2G11 細胞に si-*Tgfβ1* 導入した後、導入 2 日後から 3 日間 WT 由来筋芽細胞と共培養し、Fusion index を比較した。その結果、2G11 細胞と共培養した場合には si-*Tgfβ1* の導入によって Fusion index の増加が認められ (Fig. 3-18B, C)、筋芽細胞の融合が促進されていた。一方、PMS-2G11 細胞に si-*Tgfβ1* を導入した後に共培養を行っても筋管細胞は形成されなかった (Fig. 3-18B, C)。以上のことから、PMS-2G11 細胞は TGF-β1 以外の SASP 因子によっても筋芽細胞の融合を阻害することが示された。

考察

本研究によって間葉系前駆細胞の SASP が筋芽細胞の融合を阻害することが示されたが、その中でどの因子が筋芽細胞融合阻害因子として働いているのかはまだ特定できていない。本研究では筋分化を抑制する因子として TGF- β 1 に着目したが、PMS-2G11 細胞において発現抑制を行っても筋融合能が回復しなかったことから、TGF- β 1 以外の経路によっても融合が阻害された可能性がある。筋芽細胞の融合に関与する因子として、他に Wnt3a がある。Wnt3a は Wnt シグナリングを活性化させることによってマウス筋芽細胞株 C2C12 細胞の融合を促進することが知られている (Pansters et al., 2011)。ヒト線維芽細胞では、酸化的ストレスによって細胞老化を誘導すると、Wnt リガンドと結合することで Wnt 受容体への結合を阻害する Secreted Frizzled Related Protein 1 (sFRP1) の発現が増加するという報告がある (Elzi et al., 2012)。間葉系前駆細胞は Wnt リガンドである Wnt1、Wnt3a、Wnt5a を発現することや (Joe et al., 2010)、筋芽細胞は Wnt1、Wnt3a などを発現することによって自己分泌的に自身の筋分化能を調節する可能性が示されている (Otto et al., 2008)。これらのことから、PMS-2G11 細胞は Wnt リガンドの発現低下、または sFRP1 の過剰発現によって筋芽細胞における Wnt シグナリングを抑制し、筋芽細胞の融合を阻害する可能性がある。その他の候補として、エクソソームの関与を考えても良いかも知れない。老化した細胞は SASP によって様々な液性因子を分泌するが、これに加えてエクソソームの分泌も亢進することがわかっている (Lehmann et al., 2008)。エクソソームは microRNA (miRNA) などを包含する細胞膜由来の小胞であり、これが他の臓器に輸送され、標的細胞の細胞膜と融合することで miRNA を運搬し、骨格筋を含む様々な臓器の恒常性維持に関与することが知られている (Nakamura et al., 2015)。TNF- α も筋芽細胞の融合を阻害する効果をもつが、これに TNF- α 誘導性の miR-98 が関与し、miR-98 の発現を抑制することで筋芽細胞の融合が促進されることが示されている (Meyer et al., 2015)。また、IL-1 受容体や Toll Like Receptor のアダプタータンパクである MyD88 は近年の研究によって筋芽細胞の融合に重要であることが明らかになったが (Hindi et al., 2017)、miR-203 は MyD88 の発現を抑制することがわかっている (Wei et al., 2013)。他にも、miR-15a や miR-16 は Wnt3a の発現を抑制することが明らかになっており (Bonci et al., 2008)、今後の研究によって PMS-2G11 細胞から放出されるエクソソームにおける miRNA の種類や量を調べることで、筋芽細胞の融合を抑制する因子を同定できる可能性がある。

本研究では Myomaker (MYMK) 及び Myomixer (MYMX) の強制発現によっても PMS-2G11 細胞の筋芽細胞に対する融合阻害効果を打ち消すことができなかった。筋芽細胞の融合は、細胞同士の接着、アクチン細胞骨格の再構成、脂質二重膜の膜融合、膜貫通孔の形成による細胞質の融合などが関与する複雑なプロセスである (Chen et al., 2020)。MYMK 及び

MYMX はそれぞれ膜融合、膜貫通孔の形成に関与するが (Leikina et al., 2018)、これらの因子を強制発現させても PMS-2G11 細胞によって融合が抑制されたことから、より上流のプロセスから阻害されている可能性がある。細胞同士の接着には VCAM1、M-Cadherin、Adam12、Myoferlin、Caveolin を含む数多くの因子が関与することが同定されている (Chen et al., 2020)。特に、Caveolin は Wnt3a 受容体である lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) が Wnt3a に結合した際に、LRP6 の内在化を媒介し、Wnt/ β -catenin シグナリングの伝達に重要であることが示されている (Yamamoto et al., 2006)。さらに、近年 Wnt/ β -catenin シグナリングは筋芽細胞の融合時に細胞骨格の再構成に重要な因子である synaptopodin-2-like (Synpo2l) の発現を促進することや、MYMK、MYMX の発現を亢進させることがわかってきた (Cui et al., 2019)。Caveolin-1 は TNF- α 、IL-23、IL-17A などのサイトカインによって発現が抑制されることが報告されており (Yamaguchi et al., 2015)、PMS-2G11 細胞がこれらのサイトカインを発現し、Caveolin の発現を抑制することで Wnt/ β -catenin signaling が阻害され、これが筋芽細胞に対する融合阻害効果につながった可能性も考えられる。今後の研究によって PMS-2G11 細胞と共培養した筋芽細胞における接着関連因子や細胞骨格系タンパク質の発現を調べ、融合のどのプロセスが阻害されているかを明らかにすることで、PMS-2G11 細胞由来のどの分泌因子が筋芽細胞の融合を抑制しているのかを同定できるかも知れない。

本研究では、細胞老化を誘導するために酸化的ストレスとして H₂O₂ を用いたが、これは p21 の発現は増加させたものの、p16 の発現は増加させなかった。第二章の考察でも述べたように、細胞老化は p53-p21 を介した経路または p16-pRB を介した経路あるいはその両方によって誘導されるが、細胞がどの経路によって老化するかは、刺激の種類や、細胞種、動物種特異性が関与すると考えられている (Itahana et al., 2004)。第二章における *Cdkn2a* mRNA、*Cdkn1a* mRNA に対する ISH の結果から、老化した間葉系前駆細胞は p16 または p21、あるいはその両方を発現することが示された。間葉系前駆細胞はヘテロな集団であることを考えると (Malecova et al., 2018; Uezumi et al., 2010)、間葉系前駆細胞のうち、p21 依存的に細胞老化をおこしやすい集団が存在し、2G11 細胞はその集団から株化された可能性もある。もしそうであるならば、今後の研究によって PMS-2G11 細胞と同様な subpopulation が存在するかどうかや、その集団において特異的に発現する因子などを同定することで、筋再生を促す間葉系前駆細胞を残しつつ、筋再生を強く阻害する老化間葉系前駆細胞のみを除去する新しい治療薬の開発に貢献できるかも知れない。

本研究において、老化間葉系前駆細胞では線維芽細胞、脂肪細胞への分化能が減弱することが示された。脂肪分化能の減弱に関して、細胞老化によって 2G11 細胞が bFGF の刺激に反応しにくくなった可能性も考えられる。しかし、2G11 細胞では bFGF 非存在下においてもある程度の脂肪細胞分化能が存在するのに対し、PMS-2G11 細胞では bFGF 刺激の有無に関わらず PPAR γ 及び Perilipin の発現が完全に消失していたことから、そもそも細胞老化によって脂肪細胞分化能が完全に消失したため、bFGF を添加しても脂肪細胞分化能が亢進しなかった可能性が高いと考えられる。また、2G11 細胞は細胞老化誘導単独の刺激によって

ストレスファイバーを形成していた。細胞は老化すると細胞形態の変化を起し、細胞の扁平化や膨化が認められる。これまでの研究によって、このような細胞の膨化は老化細胞におけるストレスファイバーの形成が原因であることが既に示されている (Chen et al., 2000; Cho et al., 2004)。ストレスファイバーは、細胞と細胞外マトリクス (Extracellular matrix: ECM) を接着斑によって結びつけることによって、ECM の収縮に重要な役割を果たしている (Castella et al., 2010)。老化細胞も ECM と接着斑によって結びついているとすると、ストレスファイバー形成によって、DMD において一部 ECM 収縮能の低下や、筋力低下などに関与するかもしれない。

本章の研究によって、間葉系前駆細胞は細胞老化によって線維芽細胞、脂肪細胞への分化能が低下することが示されたため、DMD ラット骨格筋に見られる線維・脂肪化は、老化細胞自身の分化以外の影響によって亢進すると考えられる。老化細胞を介さない経路については第一章第一節において考察したため、ここでは老化細胞が線維・脂肪化に関与する機序について考察する。まず、線維化に関して、本研究によって DMD ラット骨格筋では、線維化の master regulator である TGF- β の総量は月齢の変化とともに発現量の変動しないのに対し、活性型 TGF- β の量は 3 ヶ月齢から加齢性に発現が上昇することが明らかになった。このことは、細胞老化が誘導される 3 ヶ月齢から TGF- β を活性化させる因子が発現することを示唆している。先行研究によって mdx マウスにおいて微細な針で筋損傷を誘導することで線維化を亢進させ、ヒト DMD に近い病態を示すようになったマウスでは、間葉系前駆細胞において TGF- β を活性化させる BMP1 や MMP14 の発現が上昇することが報告されている (Juban et al., 2018)。特に MMP14 は SASP 因子であることが報告されており (Byun et al., 2015)、3 ヶ月齢から老化細胞が SASP によって TGF- β を活性化させる因子を分泌し、これが老化していない間葉系前駆細胞に作用することで線維化を誘導した可能性が考えられる。

次に、老化細胞が脂肪化に関与する機序について考察する。これまでの研究によって、間葉系前駆細胞は筋管細胞と共培養すると脂肪分化が抑制されることが知られていたが (Uezumi et al., 2010)、近年の研究によって筋管細胞に発現する Notch ligand である Dll1 が間葉系前駆細胞の Notch 受容体に結合することで脂肪分化を抑制することが明らかになってきた (Marinkovic et al., 2019)。さらに、同研究グループは炎症性マクロファージから分泌される TNF- α も脂肪分化抑制効果を持つことを示している (Marinkovic et al., 2019)。老化細胞は SASP によって CCL2 を高発現し、自身の近傍にマクロファージを誘導することが知られている (Kang et al., 2011)。第二章で考察したように、IL-6 はマクロファージの M2 への分化を促進することから、もし老化細胞が自身の近傍に呼び寄せたマクロファージを IL-6 によって過剰に M2 マクロファージへ分化させると仮定すると、TNF- α 発現量減少に伴って間葉系前駆細胞が脂肪化しやすくなる可能性がある。また、老化細胞は細胞老化に伴って膜表面抗原に様々な変化がおきる (Althubiti et al., 2014)。今後の研究によって DMD ラットの筋線維における Notch ligand の発現を調べることで、CDKN2A 陽性筋線維の脂肪化に対する影響も明らかになるかも知れない。

以上より、本章の研究によって、間葉系前駆細胞における細胞老化は、線維芽細胞、脂肪細胞分化能を減弱させることが明らかになった。このことから、老化細胞自身が線維芽細胞や脂肪細胞へ分化し、間接的に筋再生を抑制する可能性は低いと考えられる。一方で、老化間葉系前駆細胞は SASP によって筋芽細胞の融合を著しく阻害することが示された。DMD では筋衛星細胞数の枯渇によって筋再生能が低下すると考えられて来たが、本研究によって新たに老化間葉系前駆細胞の関与が明らかにされ、DMD の治療法開発研究に新機軸を与えうると考えられる。

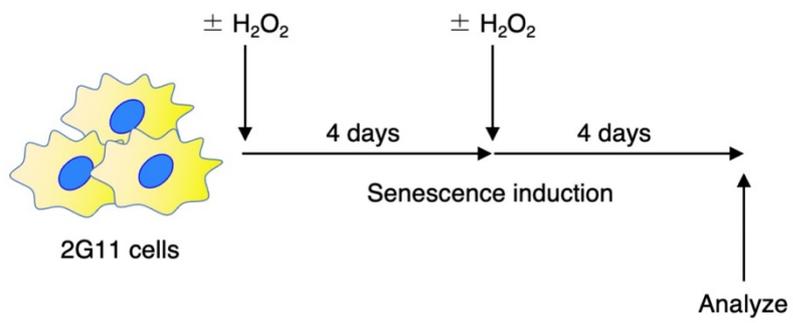


Fig. 3-1 H_2O_2 による2G11細胞における細胞老化誘導のタイムスケジュール

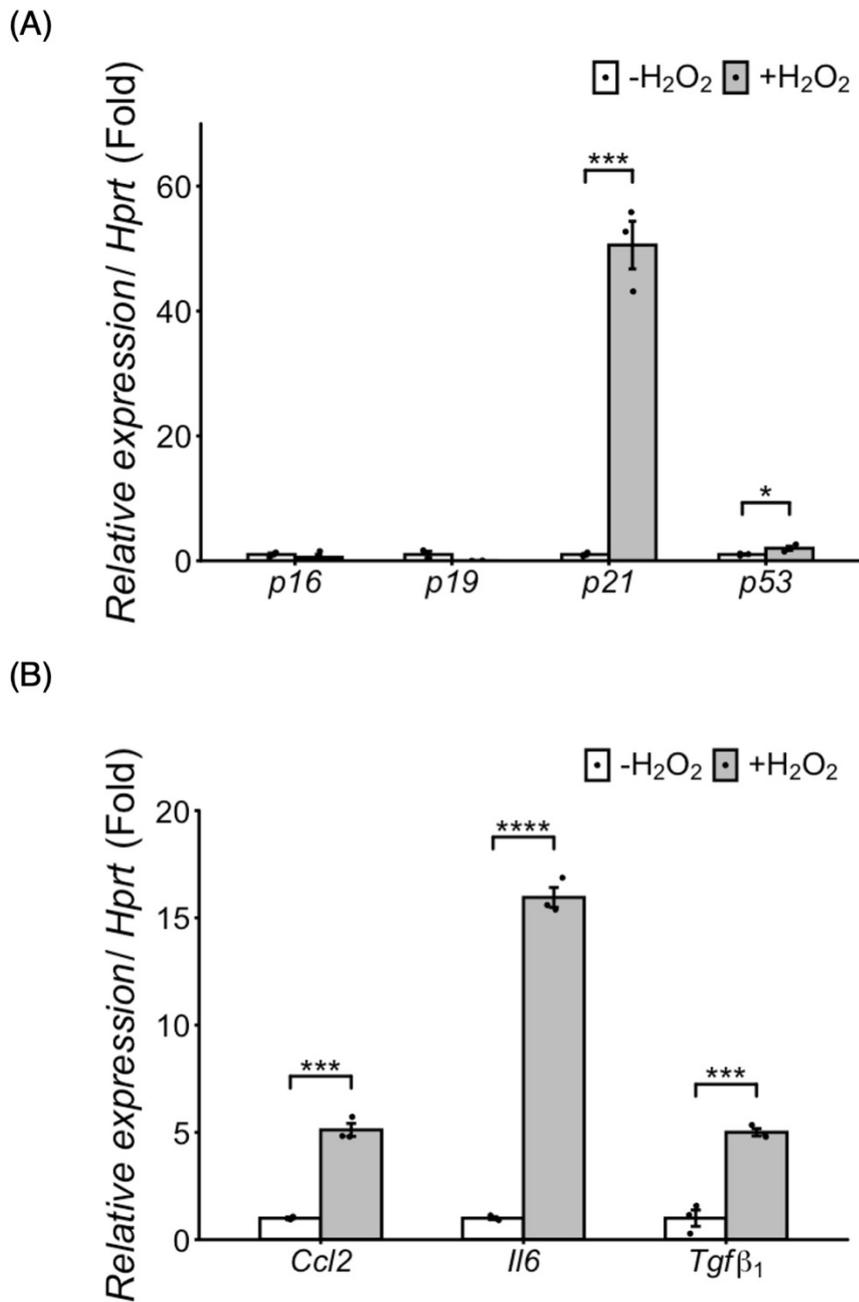
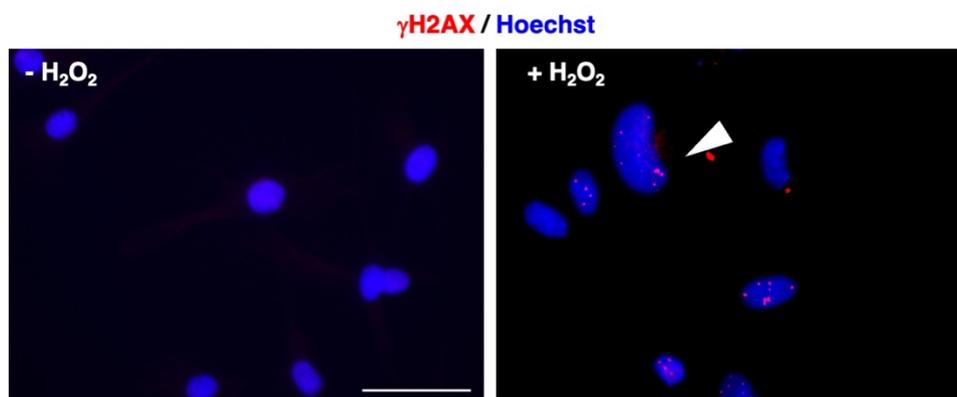


Fig. 3-2 H₂O₂処置による2G11細胞における細胞老化関連因子及びSASP因子の発現変化

- (A) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における細胞老化関連因子 (*p16*, *p19*, *p21*, *p53*) の発現量。 (n = 3, each)。
- (B) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における、SASP因子 (*Ccl2*, *Il6*, *Tgfβ1*) の発現量。 (n = 3, each)。
- データは平均値±標準誤差で表した。***p < 0.001, ****p < 0.0001 (t-test)。

(A)



(B)

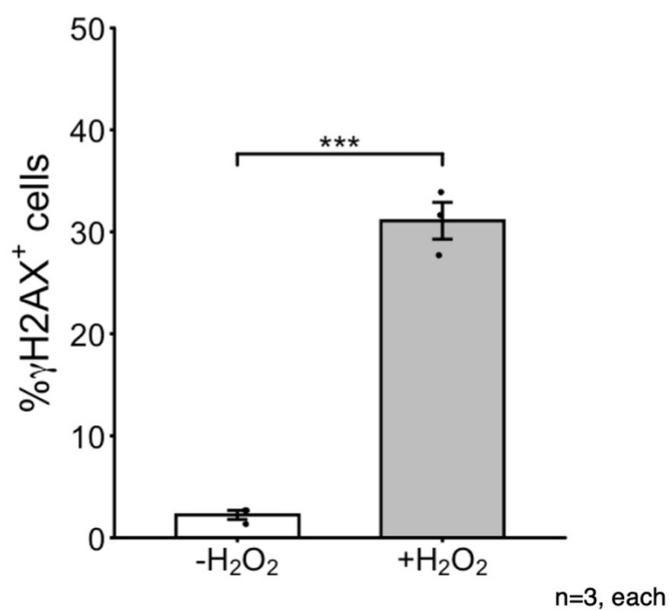
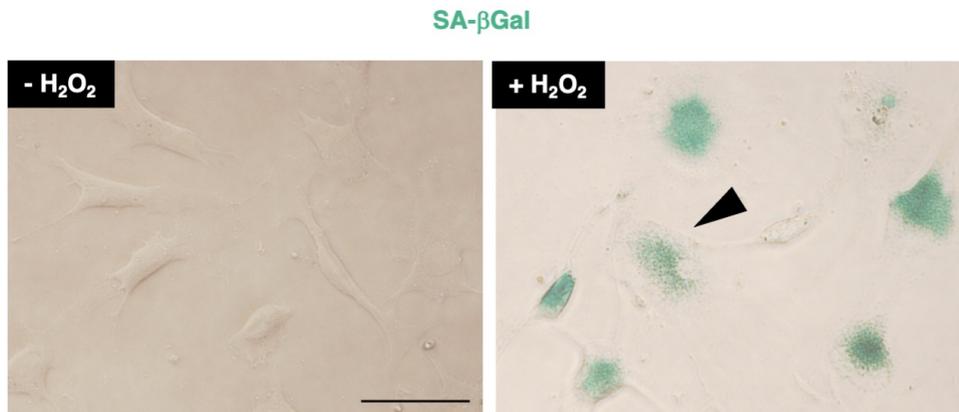


Fig. 3-3 H₂O₂処置した2G11細胞における γ H2AX陽性細胞数の変化

- (A) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における、典型的な γ H2AXに対する染色像。
Scale bar = 50 μ m。
- (B) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における、 γ H2AX陽性細胞の割合を
定量したグラフ。(n = 3, each)。
データは平均値 \pm 標準誤差で表した。***p < 0.001 (t-test)。

(A)



(B)

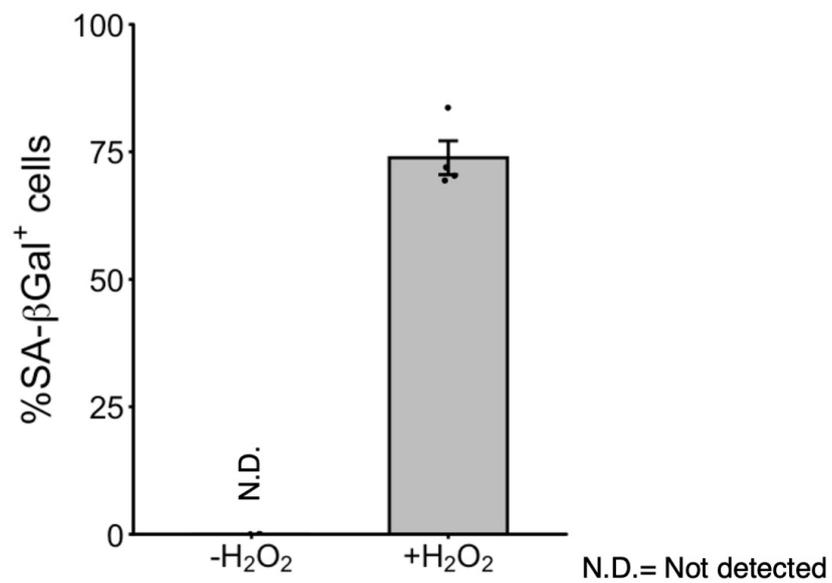


Fig. 3-4 H₂O₂処置した2G11細胞におけるSA-βGal染色陽性細胞の変化

(A) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における、典型的な SA-βGal染色像。

Scale bar = 50 μm。

(B) 無処置の2G11細胞またはH₂O₂処置した2G11細胞における、 SA-βGal染色陽性細胞の割合を定量したグラフ。(n = 3, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。 n = 3, each。 ****p < 0.01 (t-test)。

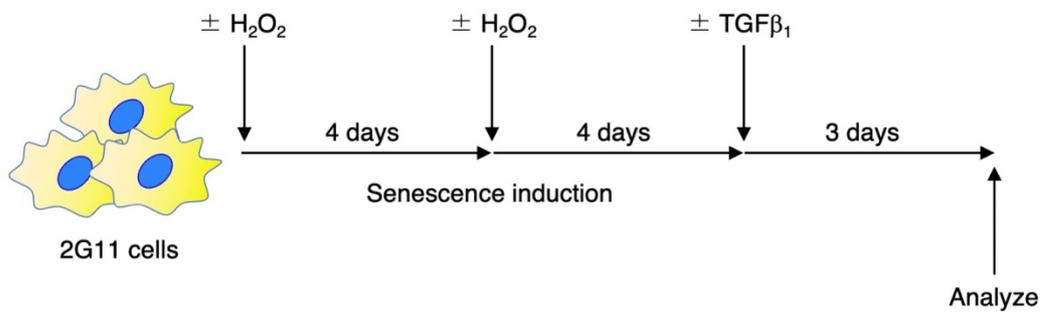


Fig. 3-5 2G11細胞及び老化2G11細胞における線維芽細胞誘導のタイムスケジュール

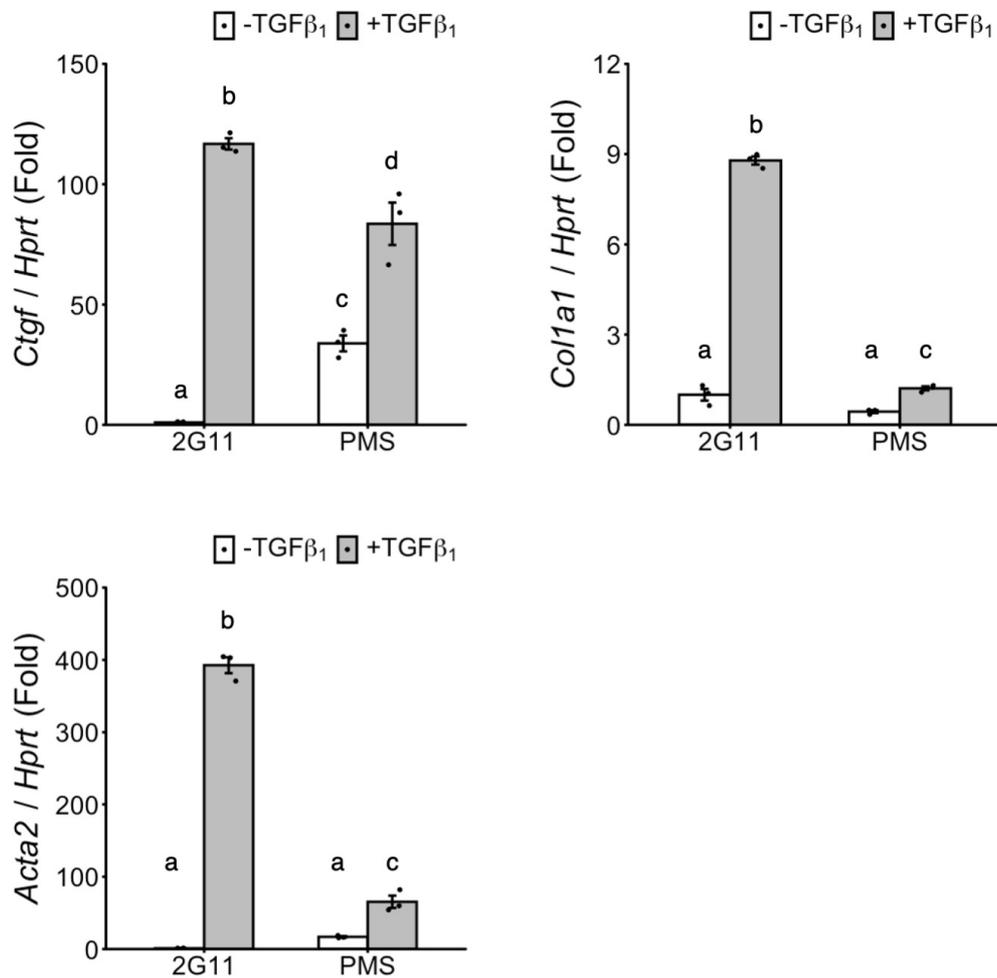


Fig. 3-6 老化した2G11細胞における線維芽細胞マーカーの発現変化

2G11及び老化した2G11細胞において、無処置群、TGFβ₁処置群において線維芽細胞マーカー (*Ctgf*, *Col1a1*, *Acta2*) の発現量を定量したグラフ。(n = 3, each)。PMS = PMS-2G11
 データは平均値±標準誤差で表した。p値はTukey Kramer's testで計算した。異なる符号間はp < 0.05の有意差があることを表す。

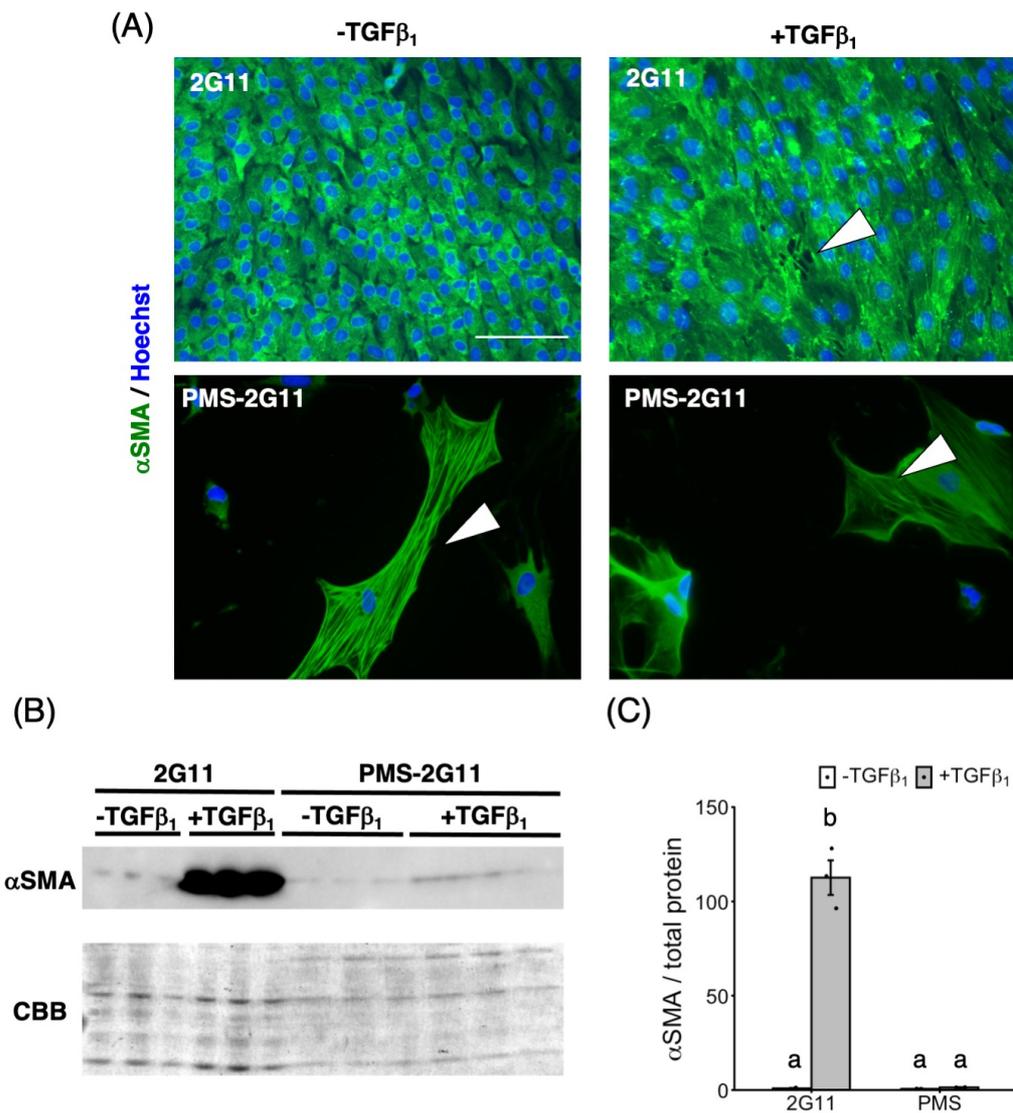


Fig. 3-7 老化した2G11細胞におけるストレスファイバー形成能及び α SMA発現量の変化

- (A) 2G11及び老化した2G11細胞において、無処置群、TGF β_1 処置群に α SMAに対する免疫染色を行い、ストレスファイバー形成能を比較した。Scale bar = 100 μ m。
- (B) 2G11及び老化した2G11細胞において、無処置群、TGF β_1 処置群からタンパク質を抽出し、 α SMAに対するウェスタンブロットを行った。
- (C) α SMAのバンド強度をCBB染色で示されたTotal protein量で標準化したグラフ。(n = 3, each). PMS = PMS-2G11。
データは平均値 \pm 標準誤差で表した。p値はTukey Kramer's testで計算した。異なる符号間はp < 0.05の有意差があることを表す。

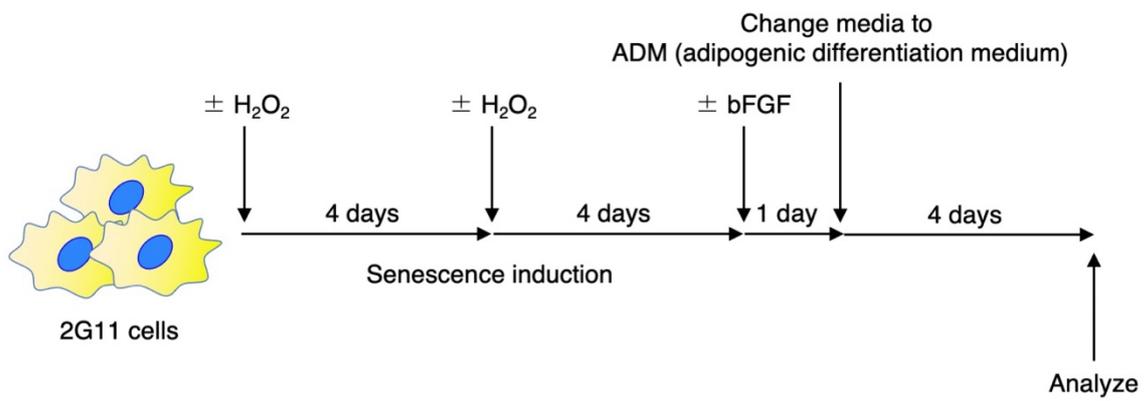


Fig. 3-8 2G11細胞及び老化2G11細胞における脂肪分化誘導のタイムスケジュール

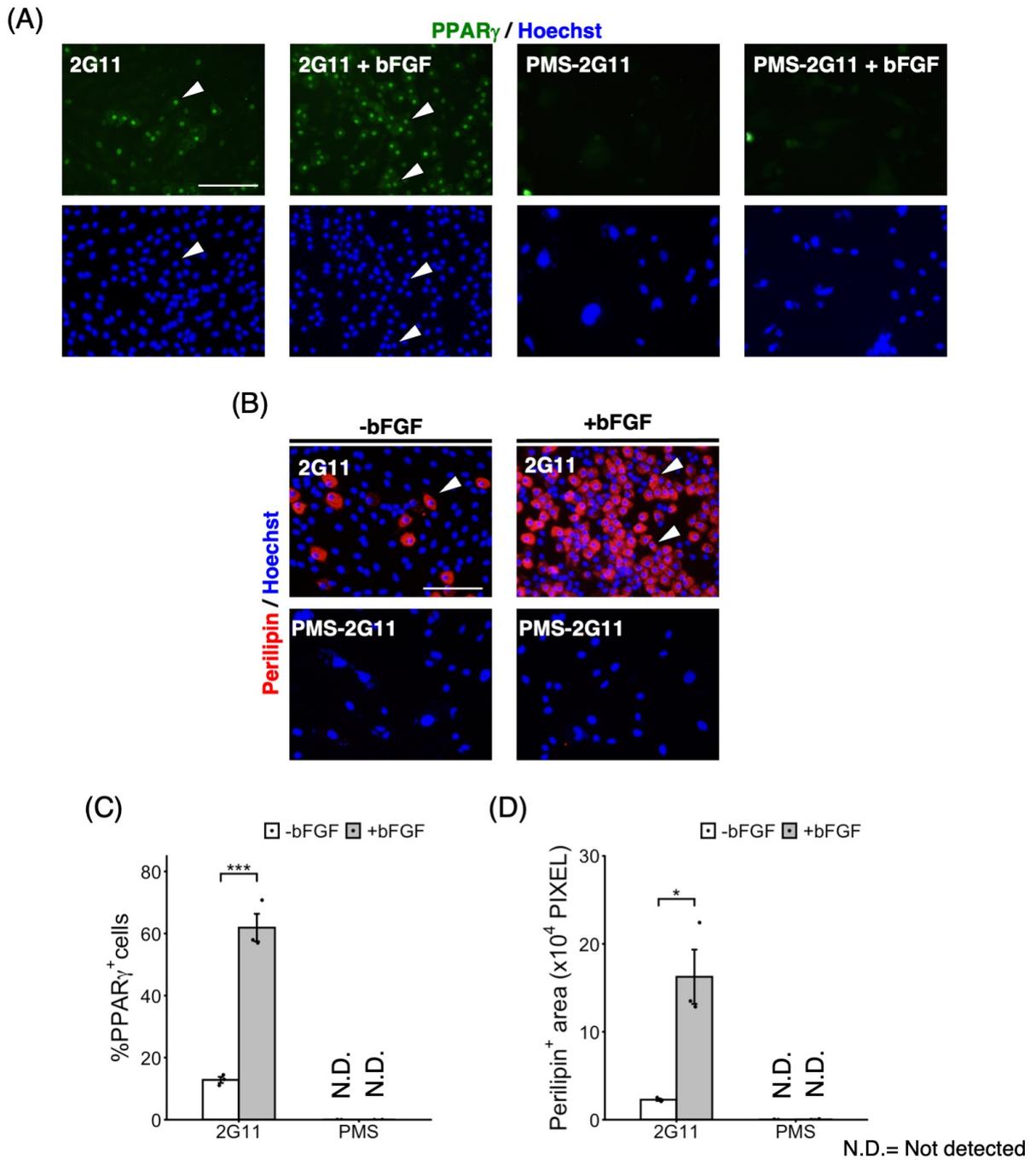


Fig. 3-9 老化した2G11細胞における脂肪分化能の変化

- (A) 2G11及び老化した2G11細胞において、無処置群、bFGF処置群にPPAR γ に対する免疫染色を行った。白矢頭はPPAR γ 陽性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。
- (B) 2G11及び老化した2G11細胞において、無処置群、bFGF処置群にPerilipinに対する免疫染色を行った。白矢頭はPerilipin陽性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。
- (C) Aの群でPPAR γ 陽性細胞の割合を測定したグラフ。PMS = PMS-2G11。(n = 3, each)。
- (D) Bの群でPerilipin陽性細胞の割合を測定したグラフ。PMS = PMS-2G11。(n = 3, each)。
- データは平均値 \pm 標準誤差で表した。*p < 0.05, ***p < 0.001 (t-test)。

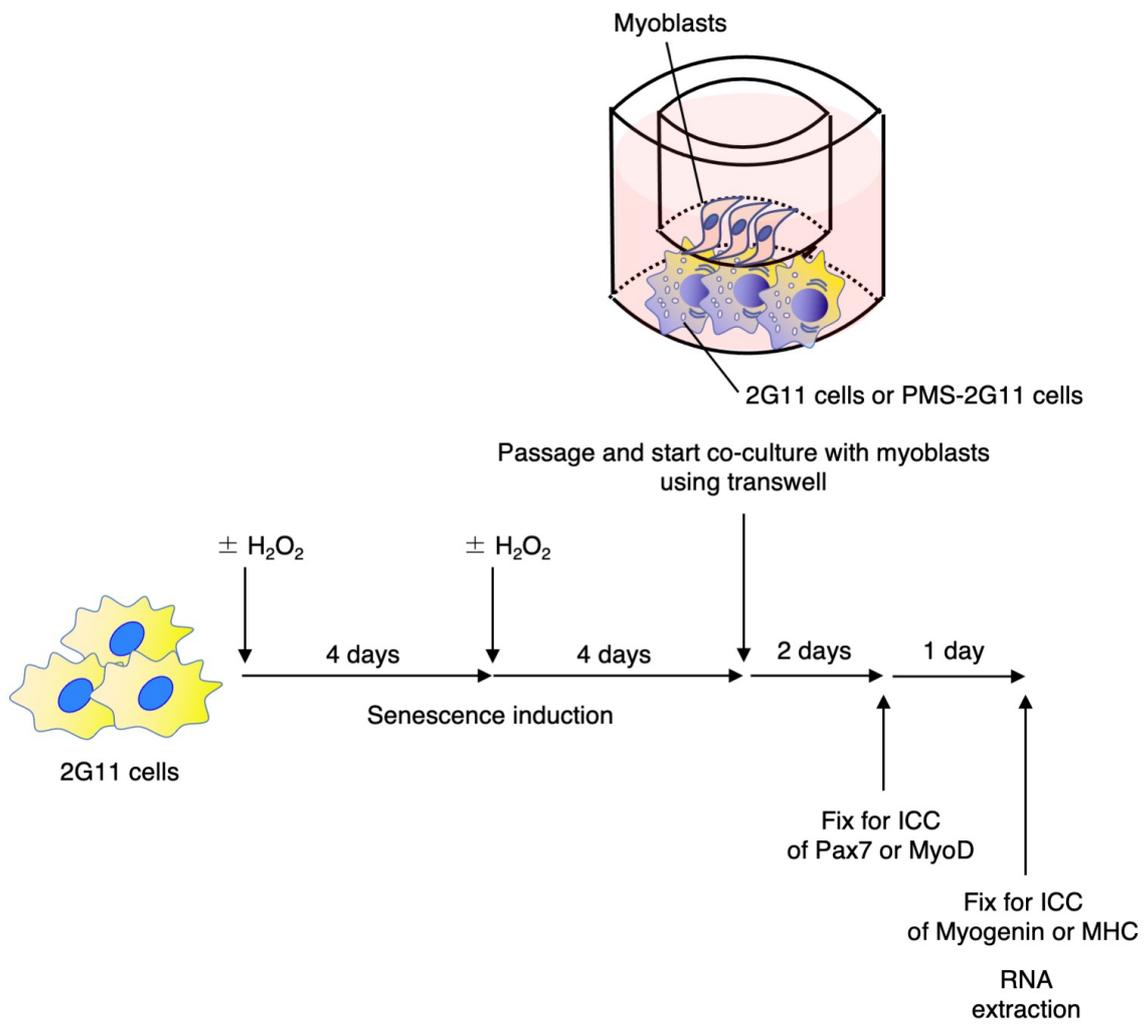


Fig. 3-10 筋芽細胞と、2G11細胞または老化した2G11細胞との共培養のタイムスケジュール

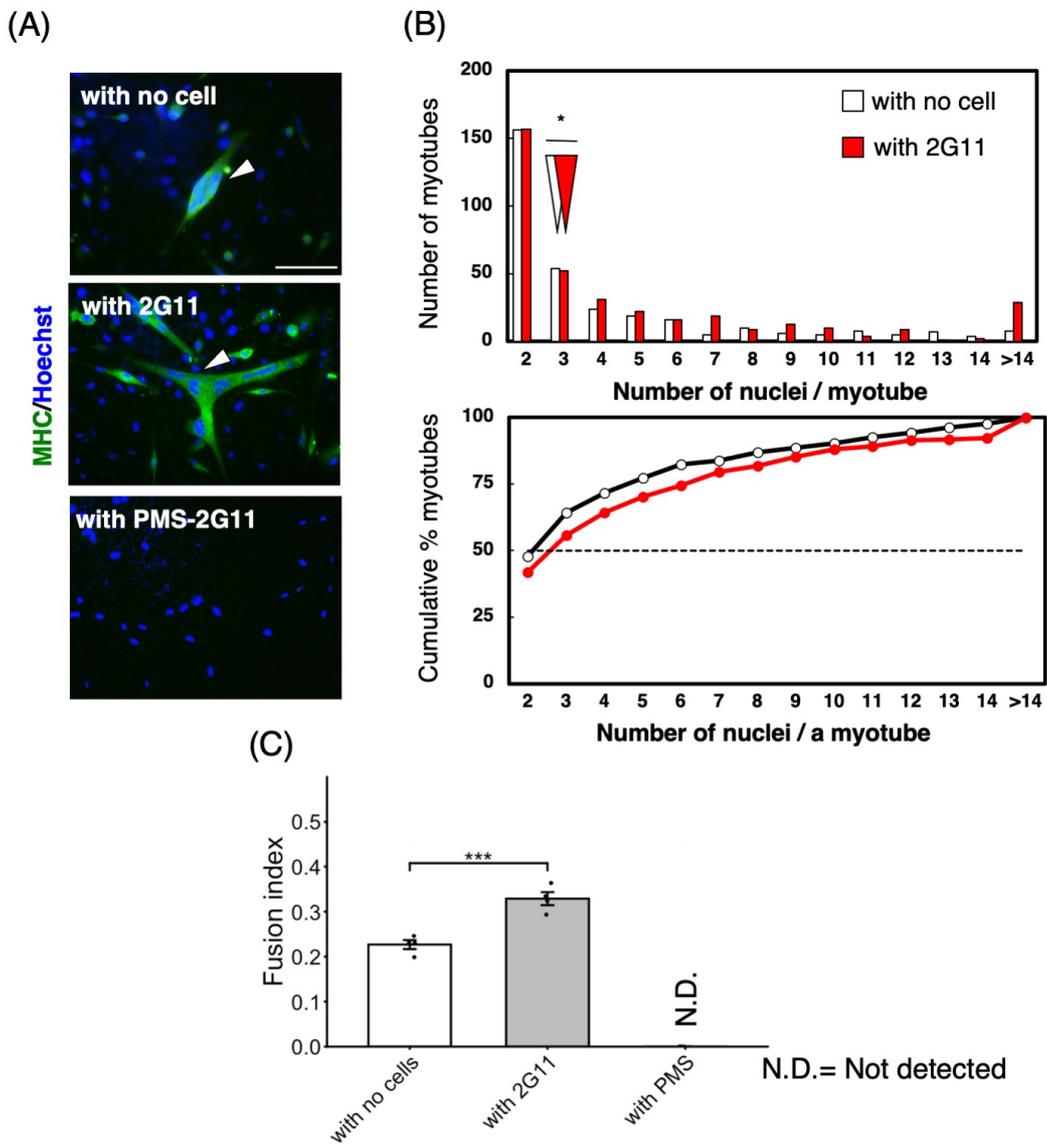


Fig. 3-11 老化した2G11細胞のSASPが筋管形成に与える影響

- (A) ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいは2G11細胞またはPMS-2G11細胞と共培養し、培養3日後にMHCに対する免疫染色を行った。白矢頭はMHC陽性の筋管細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。
- (B) 各核数をもつ筋管細胞の数 (上段)と、各核数をもつ筋管細胞が全体の筋管細胞に占める割合を累積で表したグラフ。* $p < 0.05$ (Wilcoxon rank sum test)。
- (C) Aの群で全体の核数に対する、MHC陽性細胞中の核数の割合を測定したグラフ。PMS = PMS-2G11。(n = 4, each)。
データは平均値 \pm 標準誤差で表した。*** $p < 0.001$ (t-test)。

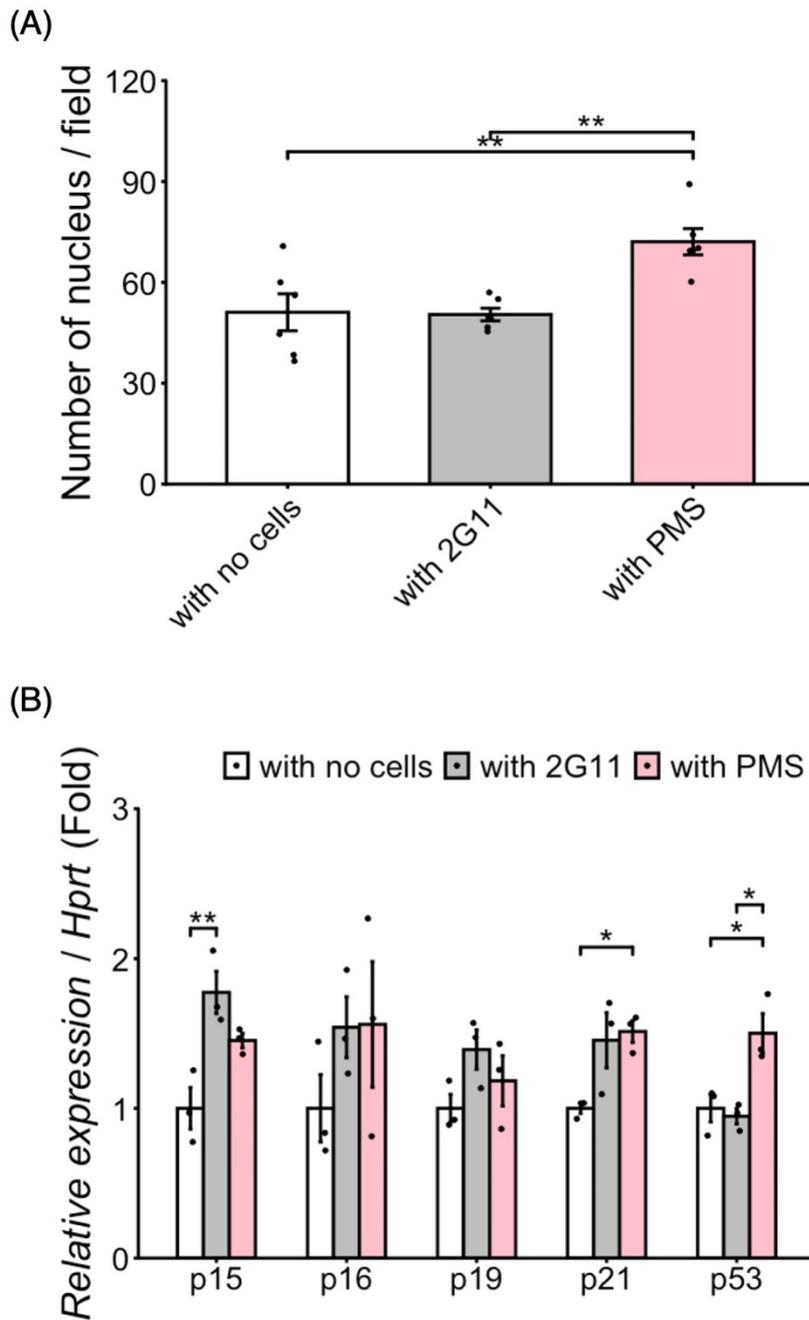


Fig. 3-12 老化した2G11細胞のSASPが筋芽細胞の細胞老化に与える影響

- (A) ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいは2G11細胞または老化した2G11細胞と共培養し、培養2日後に20倍の対物レンズで撮影した視野あたりの核数を定量したグラフ。(n = 6, each)。
- (B) ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいは2G11細胞または老化した2G11細胞と共培養し、培養3日後にRNAを抽出し、細胞老化関連因子(p15、p16、p19、p21、p53)の発現量を比較したグラフ。(n = 3, each)。
- データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01 (Tukey Kramer's test)。

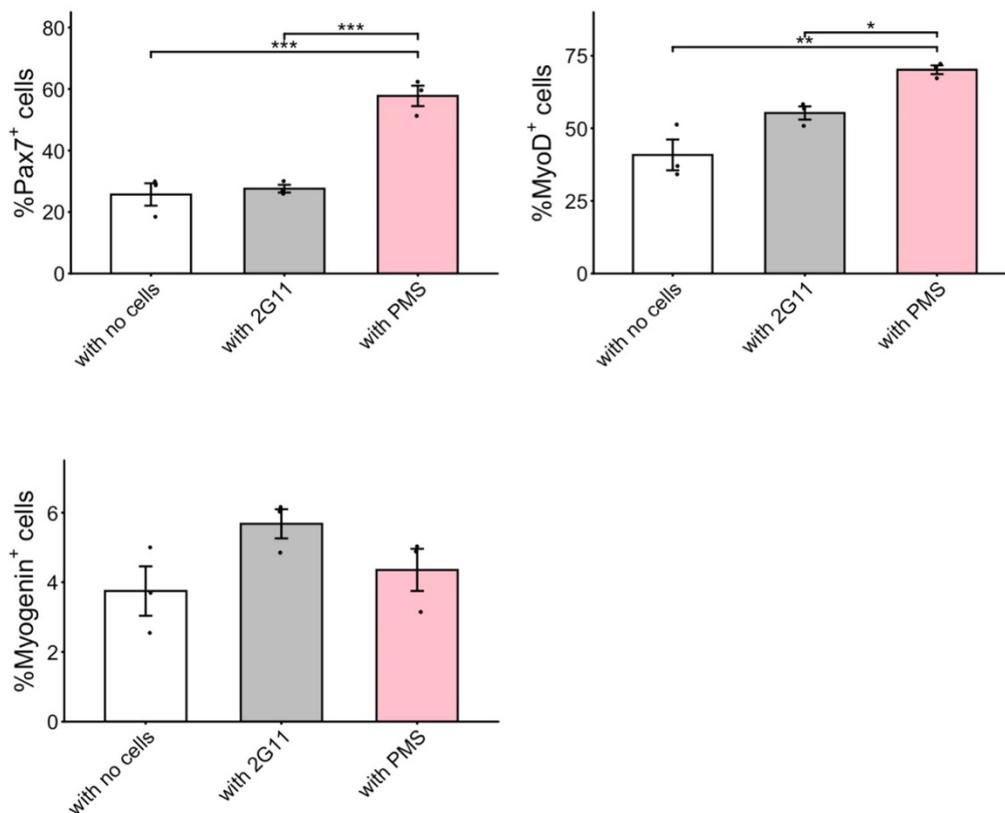


Fig. 3-13 老化した2G11細胞のSASPが筋衛星細胞の分化に与える影響

ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいは2G11細胞または老化した2G11細胞と共培養し、培養2日後にPax7、MyoDに対する免疫染色、3日後にMyogeninに対する免疫染色を行い、各免疫染色陽性細胞の割合を定量したグラフ。(n = 3, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05 (Tukey Kramer's test)。

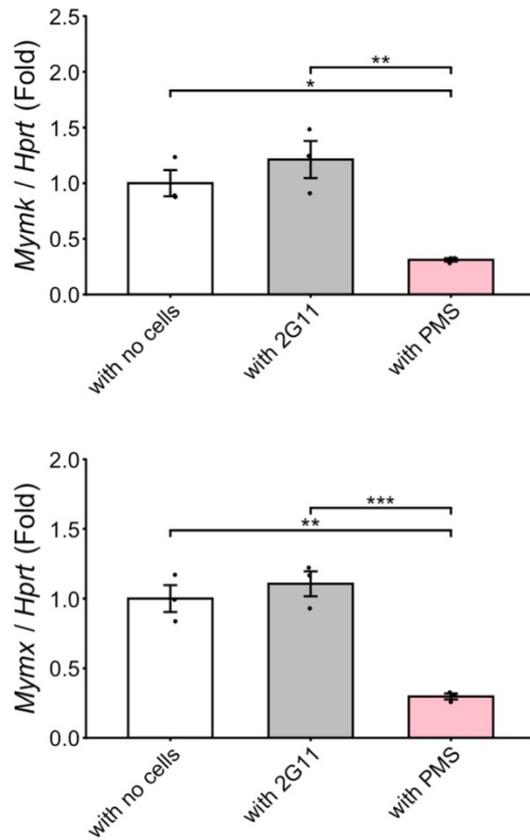


Fig. 3-14 老化した2G11細胞のSASPが筋衛星細胞の融合関連因子の発現に与える影響

ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいは2G11細胞または老化した2G11細胞と共培養し、培養3日後に融合関連因子 (*Mymk*、*Mymx*)の発現量を定量したグラフ。(n = 3, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。*p < 0.05, **p < 0.01, p < 0.001 (Tukey Kramer's test)。

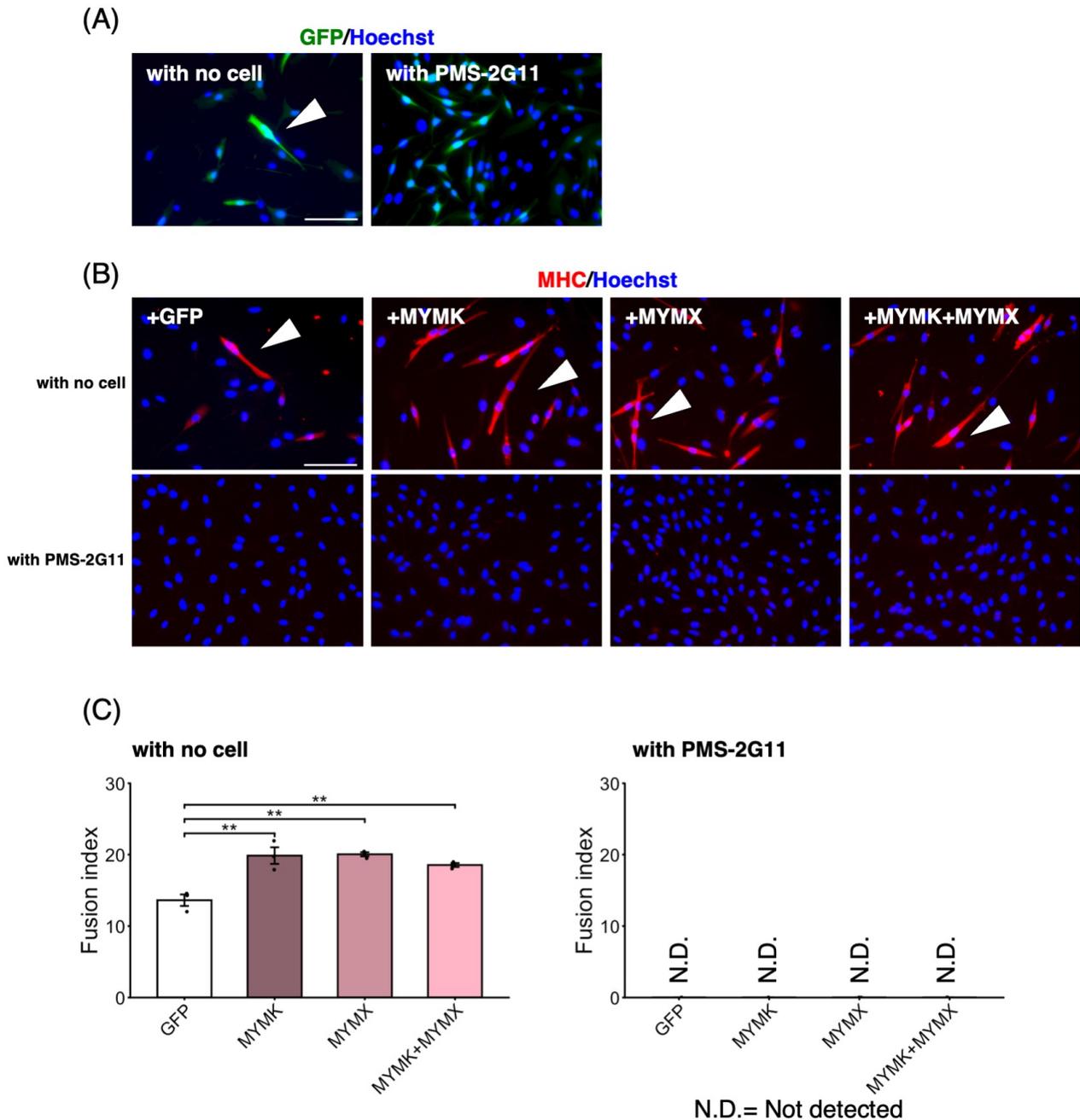
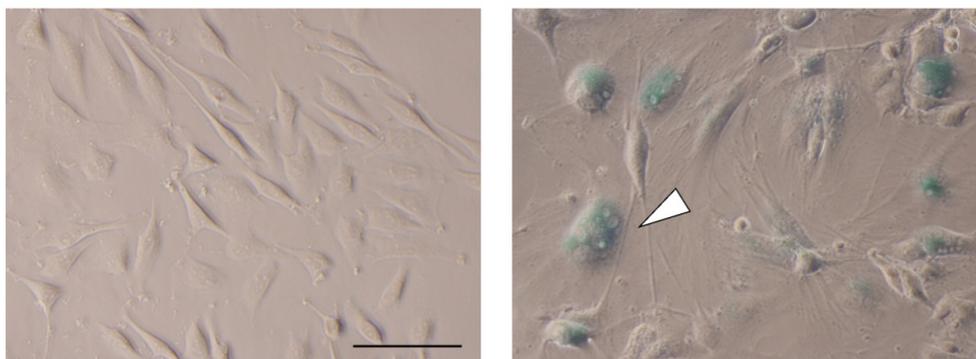


Fig. 3-15 PMS-2G11細胞による筋融合抑制効果に対するMYMK、MYMX過剰発現の影響

- (A) ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいはPMS-2G11細胞と2日間共培養した後、mRNAトランスフェクションによる過剰発現系のコントロールとして*Gfp* mRNAをトランスフェクションし、24時間後にGFPに対する免疫染色を行った。Scale bar = 100 μ m。
- (B) Aと同様のタイムコースでラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいはPMS-2G11細胞と2日間共培養した細胞に*Mymk* mRNA、*Mymx* mRNAあるいはその両方をトランスフェクションし、共培養3日目にMHCに対する免疫染色を行った。なお、対照群には*Gfp* mRNAをトランスフェクションした。Scale bar = 50 μ m。
- (C) Cの群で全体の核数に対する、MHC陽性細胞中の核数の割合を測定したグラフ。左側が単独培養時、右側がPMS-2G11細胞との共培養時の値を表す。(n = 3, each)。
データは平均値±標準誤差で表した。**p < 0.01 (Tukey Kramer's test)。
白矢頭は各免疫染色陽性細胞を示す。

(A)



(B)

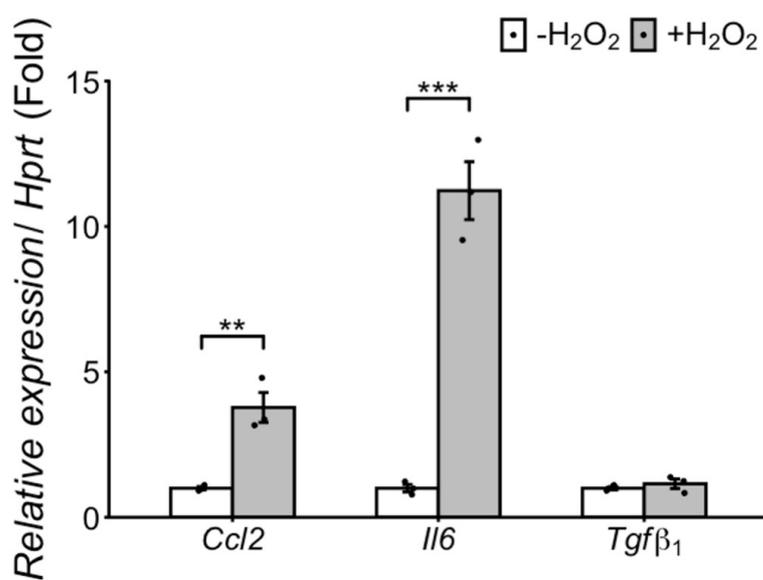


Fig. 3-16 H₂O₂処置によるL6細胞の細胞老化

(A) 無処置のL6細胞、またはH₂O₂処置したL6細胞における、SA-βGal染色。 Scale bar = 100 μm。

(B) 無処置のL6細胞、またはH₂O₂処置したL6細胞における、SASP因子 (*Ccl2*、*Il6*、*Tgfβ1*)の発現量。(n = 3, each)。

データは平均値±標準誤差で表した。**p < 0.01, ***p < 0.001 (t-test)。

白矢頭はSA-βGal染色陽性細胞を示す。

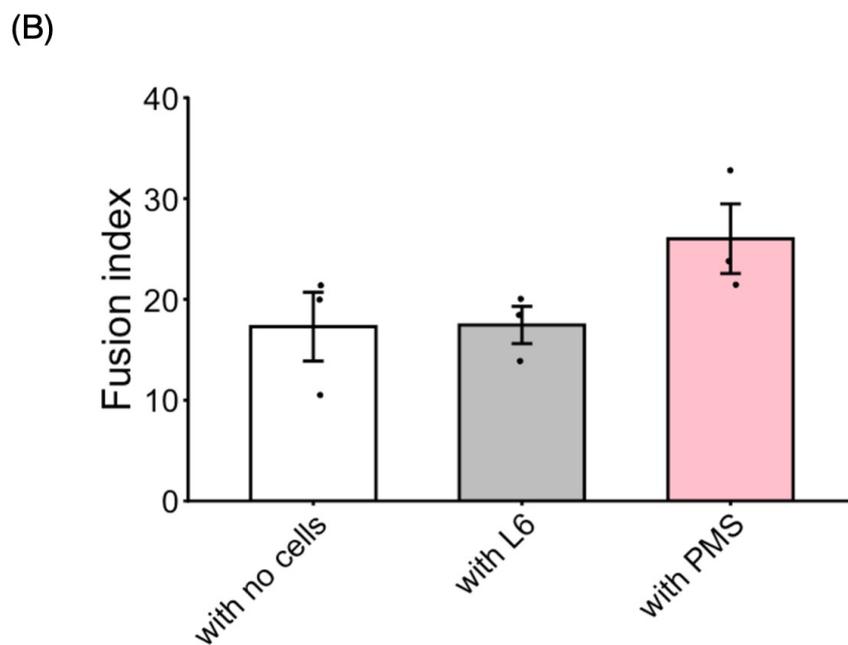
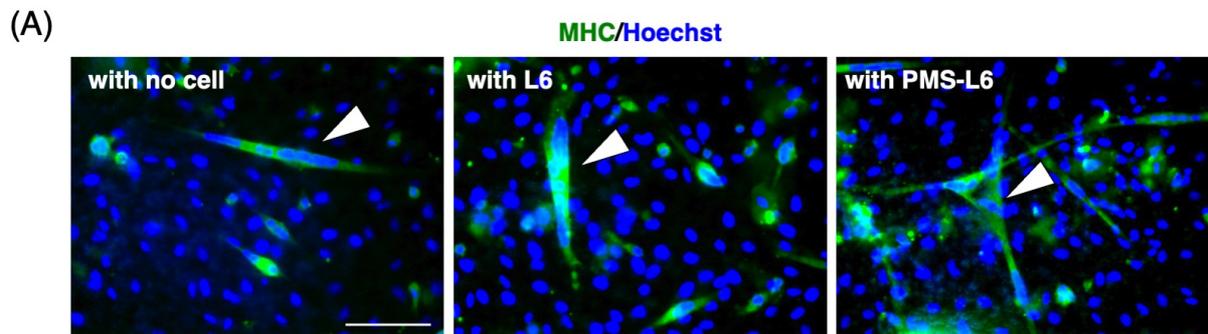


Fig. 3-17 老化したL6細胞のSASPが筋管形成に与える影響

- (A) ラット骨格筋初代培養細胞を単独、あるいはL6細胞または老化したL6細胞と共培養し、培養3日後にMHCに対する免疫染色を行った。白矢頭はMHC陽性の筋管細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。
- (B) Aの群で全体の核数に対する、MHC陽性細胞中の核数の割合を測定したグラフ。PMS=PMS-L6。(n = 3, each)。
データは平均値±標準誤差で表した。白矢頭はMHC陽性筋管細胞を示す。

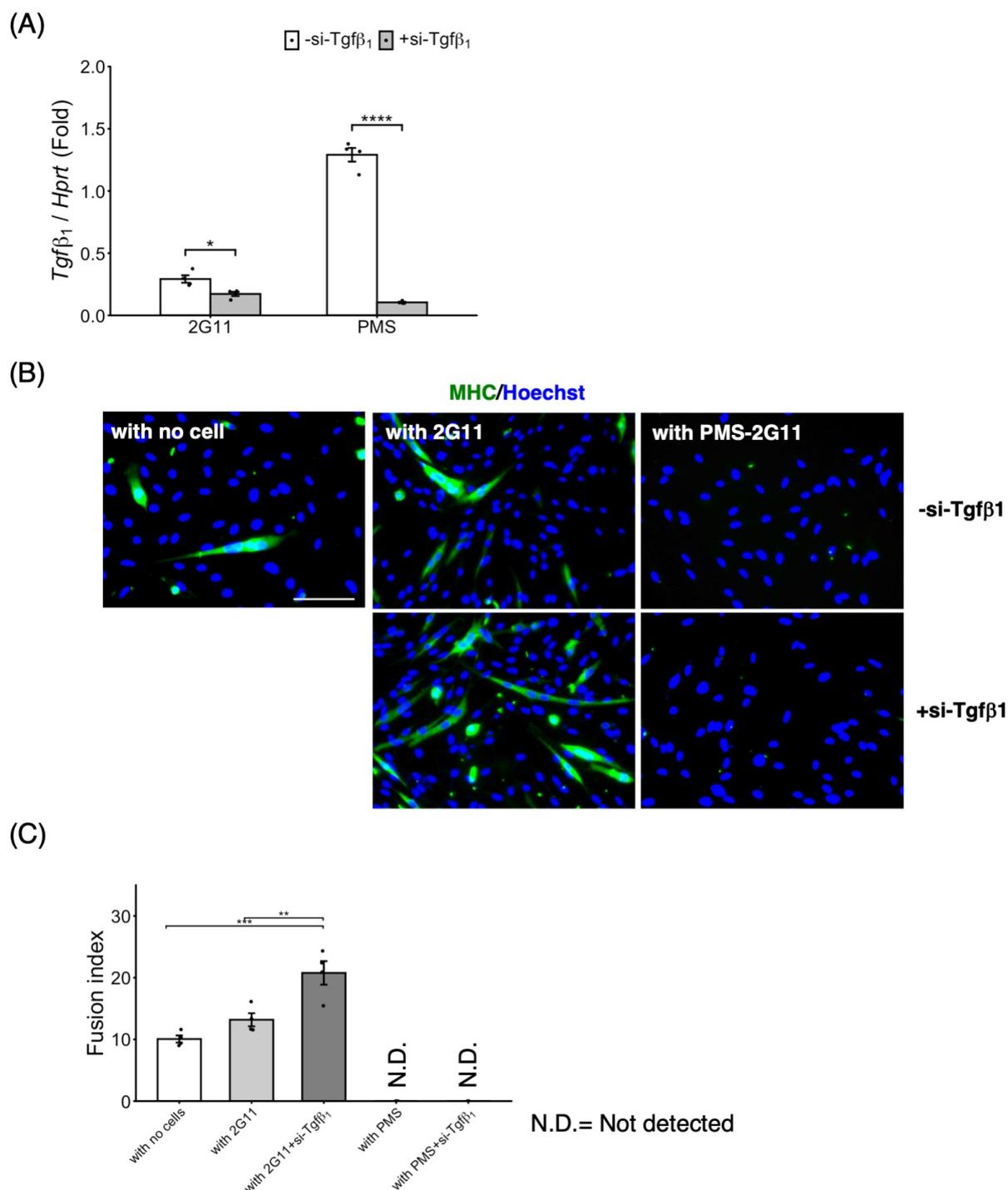


Fig. 3-18 *Tgfβ1*の発現抑制がPMS-2G11細胞による筋融合阻害効果に与える影響

- (A) 2G11細胞、PMS-2G11細胞に対して*Tgfβ1*に対するsiRNAを導入後、5日目にRNAを抽出し、*Tgfβ1*の発現量を定量的PCRによって測定した。PMS = PMS-2G11。(n = 4, each).
- (B) 2G11細胞、PMS-2G11細胞に対して*Tgfβ1*に対するsiRNAを導入後、2日目から筋芽細胞と共培養を開始し、共培養3日目にMHCに対する免疫染色を行った。Scale bar = 100 μm.
- (C) Bの群で全体の核数に対する、MHC陽性細胞中の核数の割合を測定した。PMS = PMS-2G11。(n = 4, each).
 データは平均値±標準誤差で表した。(A) *p < 0.05, ****p < 0.0001 (t-test) (C) **p < 0.01, ***p < 0.001 (Tukey Kramer's test) (なお、with no cells, with 2G11, with 2G11+si-*Tgfβ1*の3群間で検定した。)

総合考察

本研究では、第一章において、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットは重篤な骨格筋の症状を示し、10 ヶ月齢では心不全も伴うなど、ヒトの病態を反映した適切なモデル動物であることを示した。第二章では、DMD ラット骨格筋では慢性炎症に伴って筋衛星細胞、間葉系前駆細胞に細胞老化が誘導されるとともに、筋線維にも *Cdkn2a* が発現することを明らかにし、遺伝学的手法及び薬剤を用いて、細胞老化が病態進行に関与することを明らかにした。最後に、第三章では、その中でも間葉系前駆細胞は細胞老化に伴って SASP を獲得し、これが筋芽細胞の融合を著しく阻害することで DMD の筋再生能低下に関与する可能性を示した。

本研究において、DMD ラットにおける p16 の欠損は線維・脂肪化を改善したが、ABT263 投与時にはこのような改善効果が認められなかった。ABT263 の投与によって線維化の master regulator である TGF- β の発現低下や、PMS-2G11 細胞では 2G11 細胞に比べて TGF- β 1、CTGF の発現上昇が観察されたことから、DMD の線維化に細胞老化が関与すると推測される。しかし、本研究では ABT263 投与によって線維化が改善されなかったが、これには ABT263 投薬期間の影響が考えられる。ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスでは、ブレオマイシン投与後 2-3 週間において線維化のピークを迎えるが、その後 4 ヶ月経過すると、自然に線維化から回復することがわかっている (Hecker et al., 2014)。一方、老齢マウスでは NOX-4 依存性に筋線維芽細胞において細胞老化が誘導され、アポトーシス耐性になることによって、線維化を促進し続け、線維化からの回復が遅延する。実際に同研究グループは in vivo で *Nox4* に対する siRNA を導入することや NOX-1/4 inhibitor の投与によってこのような線維化回復の遅延が改善されることを示しているが、効果が現れるまでに投与開始から少なくとも 6 週間の時間を要している (Hecker et al., 2014)。そのため、本研究における ABT263 投薬プロトコルでは線維化回復に顕著な差は見られなかったが、投与期間の延長や、より若齢期からの投与などによって線維化の改善が期待できるかも知れない。一方、脂肪化に関しては、脂肪組織における細胞老化は周囲の脂肪前駆細胞に作用し、脂肪化を抑制するという報告がいくつかなされている (Gustafson et al., 2019; Xu et al., 2015)。骨格筋においても同様の機構が存在するかどうかは現在のところわからないが、dKO ラットではむしろ脂肪化は抑制されていた。間葉系前駆細胞の脂肪分化能は他細胞との crosstalk によっても制御されており、例えば筋線維は接触性に脂肪化を抑制することが示されている (Marinkovic et al., 2019; Uezumi et al., 2010)。そのため、dKO ラットでは細胞老化が抑制された結果、筋衛星細胞の分裂再開や、第三章で示された老化間葉系前駆細胞による筋芽細胞融合阻害効果が解除されることで筋再生能が亢進し、筋線維数の増加によって間接的に間葉系前駆細胞の脂肪化が抑制されたのかもしれない。また、線維化は筋再生に負の影響を与えるため、

もし ABT263 の長期投与が線維化を改善できるとすれば、これも筋線維数の増加によって脂肪化をも改善できる可能性がある。

本研究によって、細胞老化が DMD の病態進行に関与することが明らかになったが、このような細胞老化による病態進行機序は他の筋疾患においても存在するかもしれない。加齢性骨格筋減弱症 (サルコペニア) は加齢に伴う筋量の顕著な減少を特徴とするが、その進行に筋衛星細胞の細胞老化が関与すると考えられている (Sousa-Victor et al., 2014)。筋強直性ジストロフィーは DMPK 遺伝子の非翻訳 3'領域の CTG 反復配列の伸長を原因とする 1 型 (Myotonic dystrophy type 1: DM1) と、CNBP 遺伝子のイントロン 1 にある CCTG 反復配列の伸長を原因とする 2 型 (Myotonic dystrophy type 2: DM2) に大別される。これら反復配列の異常によって、CUG 配列を認識する RNA 結合タンパク質であり、スプライシング因子として働く muscleblind-like protein 1 (MBNL1)、CUG-triplet repeat RNA-binding protein 1 (CUGBP1) の安定性に異常が生じる。その結果、MBNL1 や CUGBP1 のターゲットである Ca センサータンパク質やサルコメア構成タンパク質をコードする mRNA のスプライシング異常が生じ、筋収縮異常や筋萎縮が引き起こされる (Udd and Krahe, 2012)。近年の研究によって、DM1 患者由来の筋芽細胞では p16 依存的な、DM2 患者由来の筋芽細胞では p16 非依存的な細胞老化が誘導されていることが明らかになり、病態進行に細胞老化が関与することが示唆されている (Bigot et al., 2009; Renna et al., 2014)。また、ジストロフィン遺伝子に in-frame 変異が生じることによって発症するベッカー型筋ジストロフィー (Becker Muscular Dystrophy: BMD) では、正常ジストロフィンではなく、不完全な短縮型のジストロフィンが発現する。短縮型ジストロフィンは、ジストロフィンとしての機能を一部保持しているため、BMD では一般的に DMD ほど病態は悪化しないが、BMD 患者では短縮型ジストロフィンの機能及びその発現量が不十分であり、慢性的な筋の炎症が生じる (Kaido et al., 1991; Koenig et al., 1988)。当研究室で樹立されたジストロフィン遺伝子に in-frame 変異を持つラット (BMD ラット) は、DMD ラットと比較して病態は軽症であるが、11 ヶ月齢においては骨格筋における筋再生能の低下に伴って細胞老化関連因子 p16 の発現が上昇することが示されている (寺本、博士論文)。さらに、メロシン欠損型先天性筋ジストロフィーでは、ラミニン α 2 をコードする遺伝子の out-of-frame 変異によって筋ジストロフィー症状を呈し、骨格筋に慢性炎症が誘導される (Mehuron et al., 2014)。もし同疾患においても慢性炎症に伴って細胞老化が誘導されていれば、DMD と同様に老化細胞をターゲットとした治療法の開発が検討できるかもしれない。

また、近年では心臓においても細胞老化が誘導されることがわかってきた (Shimizu and Minamino, 2019)。大動脈弁狭窄症による心不全を呈するヒト患者由来の心筋細胞や、老齢マウスの心筋細胞は細胞老化のマーカーを発現し、SASP によって線維芽細胞の増殖を亢進させるとともに、非老化心筋細胞の肥大を促進することが報告されている (Anderson et al., 2019)。また、同研究グループは老齢マウスにおいて p16 陽性細胞を特異的に除去することや ABT263 の投与によって心肥大や線維化が抑制されることも示した (Anderson et al., 2019)。

また、心臓における細胞老化の報告は心筋細胞のみにとどまらない。大動脈弁結紮モデルマウスでは心不全に伴って血管内皮細胞に細胞老化のマーカである p53 が発現し、血管内皮細胞特異的に p53 を欠損させることで心肥大や線維化を抑制できることがわかっている (Gogiraju et al., 2015)。上述の心筋細胞における細胞老化の報告では酸化ストレスによって細胞老化が誘導されることが明らかになっており、慢性的に炎症細胞浸潤が観察される DMD ラット心筋でも細胞老化が誘導されている可能性がある。本研究では dKO ラットや ABT263 投与ラットにおける心機能や心病理組織解析は行わなかったが、今後の研究によって細胞老化が DMD における心不全に与える影響も明らかになるかもしれない。

以上より、細胞老化は多様な筋疾患において病態に関与する可能性がある。本学位論文で明らかにした研究成果と合わせて考えると、細胞老化という現象は DMD のみならず、広く筋組織の恒常性を破綻させる機構を持つことが提言され、本研究は様々な筋疾患の病態解明、治療法開発、ひいては細胞老化の病態生理学的な意義の解明に貢献するものと期待される。

参考文献

1. Acosta, J.C., Banito, A., Wuestefeld, T., Georgilis, A., Janich, P., Morton, J.P., Athineos, D., Kang, T.W., Lasitschka, F., Andrulis, M., *et al.* (2013). A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology* 15, 978-U221.
2. Allen, R.E., and Boxhorn, L.K. (1987). Inhibition of skeletal muscle satellite cell differentiation by transforming growth factor-beta. *Journal of cellular physiology* 133, 567-572.
3. Althubiti, M., Lezina, L., Carrera, S., Jukes-Jones, R., Giblett, S.M., Antonov, A., Barlev, N., Saldanha, G.S., Pritchard, C.A., Cain, K., *et al.* (2014). Characterization of novel markers of senescence and their prognostic potential in cancer. *Cell Death & Disease* 5, 10.
4. Anderson, R., Lagnado, A., Maggiorani, D., Walaszczyk, A., Dookun, E., Chapman, J., Birch, J., Salmonowicz, H., Ogrodnik, M., Jurk, D., *et al.* (2019). Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *Embo Journal* 38, 21.
5. Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *Embo Journal* 22, 4212-4222.
6. Bedard, K., and Krause, K.H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 87, 245-313.
7. Bi, P., Ramirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sanchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2017). Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* 356, 323-327.
8. Bigot, A., Klein, A.F., Gasnier, E., Jacquemin, V., Ravassard, P., Butler-Browne, G., Mouly, V., and Furling, D. (2009). Large CTG Repeats Trigger p16-Dependent Premature Senescence in Myotonic Dystrophy Type 1 Muscle Precursor Cells. *American Journal of Pathology* 174, 1435-1442.
9. Bladen, C.L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M.E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A.J., Chamova, T., *et al.* (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation* 36, 395-402.
10. Blau, H.M., Webster, C., and Pavlath, G.K. (1983). DEFECTIVE MYOBLASTS IDENTIFIED IN DUCHENNE MUSCULAR-DYSTROPHY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 80, 4856-4860.
11. Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D'Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., *et al.* (2008). The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature Medicine* 14, 1271-1277.
12. Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Abmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann,

- F., Kneilling, M., Griessinger, C., *et al.* (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* 494, 361-365.
13. Burakiewicz, J., Sinclair, C.D.J., Fischer, D., Walter, G.A., Kan, H.E., and Hollingsworth, K.G. (2017). Quantifying fat replacement of muscle by quantitative MRI in muscular dystrophy. *Journal of Neurology* 264, 2053-2067.
 14. Byun, H.O., Lee, Y.K., Kim, J.M., and Yoon, G. (2015). From cell senescence to age-related diseases: differential mechanisms of action of senescence-associated secretory phenotypes. *Bmb Reports* 48, 549-558.
 15. Campisi, J., and di Fagagna, F.D. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8, 729-740.
 16. Camps, J., Breuls, N., Sifrim, A., Giarratana, N., Corvelyn, M., Danti, L., Grosemans, H., Vanuytven, S., Thiry, I., Belicchi, M., *et al.* (2020). Interstitial Cell Remodeling Promotes Aberrant Adipogenesis in Dystrophic Muscles. *Cell Reports* 31, 20.
 17. Carlson, M.E., Hsu, M., and Conboy, I.M. (2008). Imbalance between pSmad3 and Notch induces CDK inhibitors in old muscle stem cells. *Nature* 454, 528-532.
 18. Carson, B.P. (2017). The Potential Role of Contraction-induced Myokines in the Regulation of Metabolic Function for the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes. *Frontiers in Endocrinology* 8, 8.
 19. Castella, L.F., Buscemi, L., Godbout, C., Meister, J.J., and Hinz, B. (2010). A new lock-step mechanism of matrix remodelling based on subcellular contractile events. *Journal of Cell Science* 123, 1751-1760.
 20. Chal, J., and Pourquie, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 144, 2104-2122.
 21. Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R.-M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N.E., Ding, S., and Feng, W. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature medicine* 22, 78.
 22. Chazaud, B., Sonnet, C., Lafuste, P., Bassez, G., Rimaniol, A.C., Poron, F., Authier, F.J., Dreyfus, P.A., and Gherardi, R.K. (2003). Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *Journal of Cell Biology* 163, 1133-1143.
 23. Chen, B.D., You, W.J., Wang, Y.Z., and Shan, T.Z. (2020). The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences* 77, 1551-1569.
 24. Chen, F., Haigh, S., Barman, S., and Fulton, D.J.R. (2012). From form to function: the role of Nox4 in the cardiovascular system. *Frontiers in Physiology* 3, 12.
 25. Chen, Q.M., Tu, V.C., Catania, J., Burton, M., Toussaint, O., and Dilley, T. (2000). Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by

- hydrogen peroxide. *Journal of Cell Science* 113, 4087-4097.
26. Chen, Y.C., Zheng, Y.H., Kang, Y., Yang, W.L., Niu, Y.Y., Guo, X.Y., Tu, Z.C., Si, C.Y., Wang, H., Xing, R.X., *et al.* (2015). Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Human Molecular Genetics* 24, 3764-3774.
 27. Childs, B.G., Baker, D.J., Wijshake, T., Conover, C.A., Campisi, J., and Van Deursen, J.M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354, 472-477.
 28. Cho, K.A., Ryu, S.J., Oh, Y.S., Park, J.H., Lee, J.W., Kim, H.P., Kim, K.T., Jang, I.S., and Park, S.C. (2004). Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *Journal of Biological Chemistry* 279, 42270-42278.
 29. Conboy, I.M., Conboy, M.J., Smythe, G.M., and Rando, T.A. (2003). Notch-mediated restoration of regenerative potential to aged muscle. *Science* 302, 1575-1577.
 30. Cui, S., Li, L., Ruth, T.Y., Downes, M., Evans, R.M., Hulin, J.-A., Makarenkova, H.P., and Meech, R. (2019). β -catenin is essential for differentiation of primary myoblasts via cooperation with MyoD and α -catenin. *Development* 146.
 31. Cully, T.R., and Rodney, G.G. (2020). Nox4-RyR1-Nox2: Regulators of micro-domain signaling in skeletal muscle. *Redox Biology* 36, 13.
 32. De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A.P., Elias, A.E., Skvir, N.J., Criscione, S.W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E.M., Boeke, J.D., *et al.* (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 566, 73-+.
 33. De Paepe, B., and De Bleecker, J.L. (2013). Cytokines and Chemokines as Regulators of Skeletal Muscle Inflammation: Presenting the Case of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mediators of Inflammation* 2013, 10.
 34. Denchi, E.L., Attwooll, C., Pasini, D., and Helin, K. (2005). Deregulated E2F activity induces hyperplasia and senescence-like features in the mouse pituitary gland. *Molecular and Cellular Biology* 25, 2660-2672.
 35. Desguerre, I., Mayer, M., Leturcq, F., Barbet, J.P., Gherardi, R.K., and Christov, C. (2009). Endomysial Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy: A Marker of Poor Outcome Associated With Macrophage Alternative Activation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 68, 762-773.
 36. Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA-DAMAGE TRIGGERS A PROLONGED P53-DEPENDENT G(1) ARREST AND LONG-TERM INDUCTION OF CIP1 IN NORMAL HUMAN FIBROBLASTS. *Genes & Development* 8, 2540-2551.
 37. Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
 38. Dimario, J., and Strohman, R.C. (1988). SATELLITE CELLS FROM DYSTROPHIC (MDX)

MOUSE MUSCLE ARE STIMULATED BY FIBROBLAST GROWTH-FACTOR INVITRO. *Differentiation* 39, 42-49.

39. Doorenweerd, N. (2020). Combining genetics, neuropsychology and neuroimaging to improve understanding of brain involvement in Duchenne muscular dystrophy - a narrative review. *Neuromuscular Disorders* 30, 437-442.
40. Dzierlega, K., and Yokota, T. (2020). Optimization of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Gene Therapy* 27, 407-416.
41. Eagle, M., Baudouin, S.V., Chandler, C., Giddings, D.R., Bullock, R., and Bushby, K. (2002). Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscular disorders* 12, 926-929.
42. Echigoya, Y., Lim, K.R.Q., Melo, D., Bao, B., Trieu, N., Mizobe, Y., Maruyama, R., Mamchaoui, K., Tanihata, J., Aoki, Y., *et al.* (2019). Exons 45-55 Skipping Using Mutation-Tailored Cocktails of Antisense Morpholinos in the DMD Gene. *Molecular Therapy* 27, 2005-2017.
43. Edmondson, D.G., and Olson, E.N. (1989). A GENE WITH HOMOLOGY TO THE MYC SIMILARITY REGION OF MYOD1 IS EXPRESSED DURING MYOGENESIS AND IS SUFFICIENT TO ACTIVATE THE MUSCLE DIFFERENTIATION PROGRAM. *Genes & Development* 3, 628-640.
44. Elzi, D.J., Song, M.H., Hakala, K., Weintraub, S.T., and Shio, Y. (2012). Wnt Antagonist SFRP1 Functions as a Secreted Mediator of Senescence. *Molecular and Cellular Biology* 32, 4388-4399.
45. Engel, A.G., and Arahata, K. (1986). Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum Pathol* 17, 704-721.
46. Falk, T., Mai, D., Bensch, R., Çiçek, Ö., Abdulkadir, A., Marrakchi, Y., Böhm, A., Deubner, J., Jäckel, Z., and Seiwald, K. (2019). U-Net: deep learning for cell counting, detection, and morphometry. *Nature methods* 16, 67-70.
47. Fayssoil, A., Renault, G., Guerchet, N., Marchiol-Fournigault, C., Fougousse, F., and Richard, I. (2013). Cardiac characterization of mdx mice using high-resolution Doppler echocardiography. *Journal of Ultrasound in Medicine* 32, 757-761.
48. 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 Research* 41, 9.
49. Fukada, S., Morikawa, D., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Sumie, N., Yamaguchi, M., Ito, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., *et al.* (2010). Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes. *American Journal of Pathology* 176, 2414-2424.
50. Gaeta, M., Messina, S., Mileto, A., Vita, G.L., Ascenti, G., Vinci, S., Bottari, A., Vita, G., Settineri, N., Bruschetta, D., *et al.* (2012). Muscle fat-fraction and mapping in Duchenne muscular dystrophy: evaluation of disease distribution and correlation with clinical assessments. *Skeletal Radiology* 41,

955-961.

51. Gogiraju, R., Xu, X.B., Bochenek, M.L., Steinbrecher, J.H., Lehnart, S.E., Wenzel, P., Kessel, M., Zeisberg, E.M., Dobbelstein, M., and Schafer, K. (2015). Endothelial p53 Deletion Improves Angiogenesis and Prevents Cardiac Fibrosis and Heart Failure Induced by Pressure Overload in Mice. *Journal of the American Heart Association* 4, 21.
52. Grady, R.M., Grange, R.W., Lau, K.S., Maimone, M.M., Nichol, M.C., Stull, J.T., and Sanes, J.R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nature Cell Biology* 1, 215-220.
53. Grady, R.M., Teng, H., Nichol, M.C., Cunningham, J.C., Wilkinson, R.S., and Sanes, J.R. (1997). Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 729-738.
54. Guo, C., Willem, M., Raivich, G., Emerson, M., Neyses, L., and Mayer, U. (2006). Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics* 15, 989-998.
55. Guo, L.J., Soslow, J.H., Bettis, A.K., Nghiem, P.P., Cummings, K.J., Lenox, M.W., Miller, M.W., Kornegay, J.N., and Spurney, C.F. (2019). Natural History of Cardiomyopathy in Adult Dogs With Golden Retriever Muscular Dystrophy. *Journal of the American Heart Association* 8, e012443.
56. Gustafson, B., Nerstedt, A., and Smith, U. (2019). Reduced subcutaneous adipogenesis in human hypertrophic obesity is linked to senescent precursor cells. *Nature Communications* 10, 9.
57. Halevy, O., Novitch, B.G., Spicer, D.B., Skapek, S.X., Rhee, J., Hannon, G.J., Beach, D., and Lassar, A.B. (1995). CORRELATION OF TERMINAL CELL-CYCLE ARREST OF SKELETAL-MUSCLE WITH INDUCTION OF P21 BY MYOD. *Science* 267, 1018-1021.
58. Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). SERIAL CULTIVATION OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research* 25, 585-+.
59. Hecker, L., Logsdon, N.J., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Bernard, K., Hock, T., Meldrum, E., Sanders, Y.Y., and Thannickal, V.J. (2014). Reversal of Persistent Fibrosis in Aging by Targeting Nox4-Nrf2 Redox Imbalance. *Science Translational Medicine* 6, 12.
60. Hilton, T.N., Tuttle, L.J., Bohnert, K.L., Mueller, M.J., and Sinacore, D.R. (2008). Excessive Adipose Tissue Infiltration in Skeletal Muscle in Individuals With Obesity, Diabetes Mellitus, and Peripheral Neuropathy: Association With Performance and Function. *Physical Therapy* 88, 1336-1344.
61. Hindi, S.M., Shin, J., Gallot, Y.S., Straughn, A.R., Simionescu-Bankston, A., Hindi, L., Xiong, G.Y., Friedland, R.P., and Kumar, A. (2017). MyD88 promotes myoblast fusion in a cell-autonomous manner. *Nature Communications* 8, 15.
62. Hoare, M., Ito, Y., Kang, T.W., Weekes, M.P., Matheson, N.J., Patten, D.A., Shetty, S., Parry, A.J., Menon, S., Salama, R., *et al.* (2016). NOTCH1 mediates a switch between two distinct secretomes during senescence. *Nature Cell Biology* 18, 979-992.

63. Hubackova, S., Kucerova, A., Michlits, G., Kyjacova, L., Reinis, M., Korolov, O., Bartek, J., and Hodny, Z. (2016). IFN gamma induces oxidative stress, DNA damage and tumor cell senescence via TGF beta/SMAD signaling-dependent induction of Nox4 and suppression of ANT2. *Oncogene* 35, 1236-1249.
64. Huxley, A.F., and Niedergerke, R. (1954). STRUCTURAL CHANGES IN MUSCLE DURING CONTRACTION - INTERFERENCE MICROSCOPY OF LIVING MUSCLE FIBRES. *Nature* 173, 971-973.
65. Itahana, K., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2004). Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology* 5, 1-10.
66. Itahana, K., Zou, Y., Itahana, Y., Martinez, J.L., Beausejour, C., Jacobs, J.J.L., van Lohuizen, M., Band, V., Campisi, J., and Dimri, G.P. (2003). Control of the replicative life span of human fibroblasts by p16 and the polycomb protein Bmi-1. *Molecular and Cellular Biology* 23, 389-401.
67. Jacob, H.J. (1999). Functional genomics and rat models. *Genome Research* 9, 1013-1016.
68. Jiao, Y., Feng, Y.P., and Wang, X.L. (2018). Regulation of Tumor Suppressor Gene CDKN2A and Encoded p16-INK4a Protein by Covalent Modifications. *Biochemistry-Moscow* 83, 1289-1298.
69. 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. *Nature cell biology* 12, 153-163.
70. Juban, G., Saclier, M., Yacoub-Youssef, H., Kernou, A., Arnold, L., Boisson, C., Ben Larbi, S., Magnan, M., Cuvellier, S., Théret, M., *et al.* (2018). AMPK Activation Regulates LTBP4-Dependent TGF- β 1 Secretion by Pro-inflammatory Macrophages and Controls Fibrosis in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell Rep* 25, 2163-2176.e2166.
71. Jurk, D., Wang, C.F., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tzolou, A., Gonos, E.S., Thrasivoulou, C., Saffrey, M.J., Cameron, K., *et al.* (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell* 11, 996-1004.
72. Kaido, M., Arahata, K., Hoffman, E.P., Nonaka, I., and Sugita, H. (1991). Muscle histology in Becker muscular dystrophy. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine* 14, 1067-1073.
73. Kamdar, F., and Garry, D.J. (2016). Dystrophin-Deficient Cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* 67, 2533-2546.
74. Kang, T.W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., *et al.* (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* 479, 547-551.
75. Kimura, K., Takenaka, K., Ebihara, A., Uno, K., Morita, H., Nakajima, T., Ozawa, T., Aida, I., Yonemochi, Y., Higuchi, S., *et al.* (2013). Prognostic impact of left ventricular noncompaction in patients with Duchenne/Becker muscular dystrophy - Prospective multicenter cohort study.

International Journal of Cardiology 168, 1900-1904.

76. 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.
77. Kopp, H.G., Hooper, A.T., Shmelkov, S.V., and Rafii, S. (2007). beta-galactosidase staining on bone marrow. The osteoclast pitfall. *Histology and Histopathology* 22, 971-976.
78. Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2015). The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 36, 377-393.
79. Krimpenfort, P., Ijpenberg, A., Song, J.Y., van der Valk, M., Nawijn, M., Zevenhoven, J., and Berns, A. (2007). p15(Ink4b) is a critical tumour suppressor in the absence of p16(Ink4a). *Nature* 448, 943-U911.
80. Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation* 114, 1299-1307.
81. Krtolica, A., Parrinello, S., Lockett, S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2001). Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 12072-12077.
82. Kuilman, T., Michaloglou, C., Vredeveld, L.C.W., Douma, S., van Doorn, R., Desmet, C.J., Aarden, L.A., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2008). Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133, 1019-1031.
83. Latella, L., Dall'Agnese, A., Boscolo, F.S., Nardoni, C., Cosentino, M., Lahm, A., Sacco, A., and Puri, P.L. (2017). DNA damage signaling mediates the functional antagonism between replicative senescence and terminal muscle differentiation. *Genes Dev* 31, 648-659.
84. Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry* 274, 7936-7940.
85. Lee, S., and Schmitt, C.A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology* 21, 94-101.
86. Lehmann, B.D., Paine, M.S., Brooks, A.M., McCubrey, J.A., Renegar, R.H., Wang, R., and Terrian, D.M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Research* 68, 7864-7871.
87. Leikina, E., Gamage, D.G., Prasad, V., Goykhberg, J., Crowe, M., Diao, J.J., Kozlov, M.M., Chernomordik, L.V., and Millay, D.P. (2018). Myomaker and Myomerger Work Independently to Control Distinct Steps of Membrane Remodeling during Myoblast Fusion. *Developmental Cell* 46, 767-+.
88. Li, D.J., Long, C., Yue, Y.P., and Duan, D.S. (2009). Sub-physiological sarcoglycan expression

- contributes to compensatory muscle protection in mdx mice. *Human Molecular Genetics* 18, 1209-1220.
89. Li, D.L., Qiu, Z.W., Shao, Y.J., Chen, Y.T., Guan, Y.T., Liu, M.Z., Li, Y.M., Gao, N., Wang, L.R., Lu, X.L., *et al.* (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology* 31, 681-683.
 90. Li, Y., Foster, W., Deasy, B.M., Chan, Y.S., Prisk, V., Tang, Y., Cummins, J., and Huard, J. (2004). Transforming growth factor-beta 1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle - A key event in muscle fibrogenesis. *American Journal of Pathology* 164, 1007-1019.
 91. Lo Mauro, A., and Aliverti, A. (2016). Physiology of respiratory disturbances in muscular dystrophies. *Breathe* 12, 319-328.
 92. Lockett-Chastain, L., Calhoun, K., Schartz, T., and Gallucci, R.M. (2016). IL-6 influences the balance between M1 and M2 macrophages in a mouse model of irritant contact dermatitis. *Journal of Immunology* 196, 1.
 93. Lukjanenko, L., Karaz, S., Stuelsatz, P., Gurriaran-Rodriguez, U., Michaud, J., Dammone, G., Sizzano, F., Mashinchian, O., Ancel, S., Migliavacca, E., *et al.* (2019). Aging Disrupts Muscle Stem Cell Function by Impairing Matricellular WISP1 Secretion from Fibro-Adipogenic Progenitors. *Cell Stem Cell* 24, 433-446.e437.
 94. Luz, M.A.M., Marques, M.J., and Neto, H.S. (2002). Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 35, 691-695.
 95. Machida, S., and Booth, F.W. (2004). Insulin-like growth factor 1 and muscle growth: implication for satellite cell proliferation. *Proceedings of the Nutrition Society* 63, 337-340.
 96. Madaro, L., Torcinaro, A., De Bardi, M., Contino, F.F., Pelizzola, M., Diaferia, G.R., Imeneo, G., Bouche, M., Puri, P.L., and De Santa, F. (2019). Macrophages fine tune satellite cell fate in dystrophic skeletal muscle of mdx mice. *Plos Genetics* 15, 29.
 97. Malecova, B., Gatto, S., Etxaniz, U., Passafaro, M., Cortez, A., Nicoletti, C., Giordani, L., Torcinaro, A., De Bardi, M., Bicciato, S., *et al.* (2018). Dynamics of cellular states of fibro-adipogenic progenitors during myogenesis and muscular dystrophy. *Nature Communications* 9, 12.
 98. 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. *Skeletal muscle* 1, 21.
 99. Marden, F.A., Connolly, A.M., Siegel, M.J., and Rubin, D.A. (2005). Compositional analysis of muscle in boys with Duchenne muscular dystrophy using MR imaging. *Skeletal Radiology* 34, 140-148.
 100. Marinkovic, M., Fuoco, C., Sacco, F., Perpetuini, A.C., Giuliani, G., Micarelli, E., Pavlidou, T., Petrilli, L.L., Reggio, A., Riccio, F., *et al.* (2019). Fibro-adipogenic progenitors of dystrophic mice are

- insensitive to NOTCH regulation of adipogenesis. *Life Science Alliance* 2, 17.
101. Matsuo, M., Awano, H., Maruyama, N., and Nishio, H. (2019). Titin fragment in urine: A noninvasive biomarker of muscle degradation. *Advances in clinical chemistry* 10.
 102. Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9, 493.
 103. McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D.S. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Disease Models & Mechanisms* 8, 195-213.
 104. Mehuron, T., Kumar, A., Duarte, L., Yamauchi, J., Accorsi, A., and Girgenrath, M. (2014). Dysregulation of matricellular proteins is an early signature of pathology in laminin-deficient muscular dystrophy. *Skeletal muscle* 4, 14.
 105. Meng, X.-m., Nikolic-Paterson, D.J., and Lan, H.Y. (2016). TGF- β : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology* 12, 325.
 106. Mercuri, E., and Muntoni, F. (2013). Muscular dystrophies. *The Lancet* 381, 845-860.
 107. Meyer, S.U., Thirion, C., Polesskaya, A., Bauersachs, S., Kaiser, S., Krause, S., and Pfaffl, M.W. (2015). TNF-alpha and IGF1 modify the microRNA signature in skeletal muscle cell differentiation. *Cell Communication and Signaling* 13, 14.
 108. Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., *et al.* (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine* 15, 1082-U1140.
 109. Motohashi, N., Shimizu-Motohashi, Y., Roberts, T.C., and Aoki, Y. (2019). Potential Therapies Using Myogenic Stem Cells Combined with Bio-Engineering Approaches for Treatment of Muscular Dystrophies. *Cells* 8, 1066.
 110. 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. *Animal Science Journal* 82, 764-772.
 111. Muñoz-Espín, D., and Serrano, M. (2014). Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 482-496.
 112. 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. *Scientific reports* 4, 5635.
 113. Nakamura, Y., Miyaki, S., Ishitobi, H., Matsuyama, S., Nakasa, T., Kamei, N., Akimoto, T., Higashi, Y., and Ochi, M. (2015). Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *Febs Letters* 589, 1257-1265.
 114. 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. *Animal Science*

Journal 87, 99-108.

115. Ogradnik, M., Miwa, S., Tehkonja, T., Tiniakos, D., Wilson, C.L., Lahat, A., Day, C.P., Burt, A., Palmer, A., and Anstee, Q.M. (2017). Cellular senescence drives age-dependent hepatic steatosis. *Nature communications* 8, 1-12.
116. Otto, A., Schmidt, C., Luke, G., Allen, S., Valasek, P., Muntoni, F., Lawrence-Watt, D., and Patel, K. (2008). Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *Journal of Cell Science* 121, 2939-2950.
117. Ouisse, L.H., Remy, S., Lafoux, A., Larcher, T., Tesson, L., Chenouard, V., Guillonneau, C., Brusselle, L., Vimond, N., Rouger, K., *et al.* (2019). Immunophenotype of a Rat Model of Duchenne's Disease and Demonstration of Improved Muscle Strength After Anti-CD45RC Antibody Treatment. *Front Immunol* 10, 2131.
118. Ozawa, E. (2010). Our trails and trials in the subsarcolemmal cytoskeleton network and muscular dystrophy researches in the dystrophin era. *Proceedings of the Japan Academy Series B-Physical and Biological Sciences* 86, 798-821.
119. Ozawa, E., Hagiwara, Y., and Yoshida, M. (1999). Creatine kinase, cell membrane and Duchenne muscular dystrophy. *Molecular and Cellular Biochemistry* 190, 143-151.
120. Pansters, N.A.M., van der Velden, J.L.J., Kelders, M., Laeremans, H., Schols, A., and Langen, R.C.J. (2011). Segregation of myoblast fusion and muscle-specific gene expression by distinct ligand-dependent inactivation of GSK-3 beta. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 523-535.
121. Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.
122. Pedersen, B.K., and Fischer, C.P. (2007). Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends in Pharmacological Sciences* 28, 152-156.
123. Petrillo, S., Pelosi, L., Piemonte, F., Travaglini, L., Forcina, L., Catteruccia, M., Petrini, S., Verardo, M., D'Amico, A., and Musarò, A. (2017). Oxidative stress in Duchenne muscular dystrophy: focus on the NRF2 redox pathway. *Human Molecular Genetics* 26, 2781-2790.
124. Porreca, E., Guglielmi, M.D., Uncini, A., Di Gregorio, P., Angelini, A., Di Febbo, C., Pierdomenico, S.D., Baccante, G., and Cuccurullo, F. (1999). Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients. *Thromb Haemost* 81, 543-546.
125. Rafael, J.A., Tinsley, J.M., Potter, A.C., Deconinck, A.E., and Davies, K.E. (1998). Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. *Nature Genetics* 19, 79-82.
126. Ramirez-Sanchez, I., Ceballos-Reyes, G., Rosas-Vargas, H., Cerecedo-Mercado, D., Zentella-Dehesa, A., Salamanca, F., and Coral-Vazquez, R.M. (2007). Expression and function of utrophin associated protein complex in stretched endothelial cells: dissociation and activation of eNOS. *Frontiers in Bioscience-Landmark* 12, 1956-U1103.

127. Rao, N., Evans, S., Stewart, D., Spencer, K.H., Sheikh, F., Hui, E.E., and Christman, K.L. (2013). Fibroblasts influence muscle progenitor differentiation and alignment in contact independent and dependent manners in organized co-culture devices. *Biomedical Microdevices* *15*, 161-169.
128. Rathbone, C.R., Yamanouchi, K., Chen, X.Y.K., Nevoret-Bell, C.J., Rhoads, R.P., and Allen, R.E. (2011). Effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta 1) on satellite cell activation and survival during oxidative stress. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* *32*, 99-109.
129. Reimann, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Dörr, J.R., Tabor, V., Aichele, P., Stein, H., Dörken, B., Jenuwein, T., and Schmitt, C.A. (2010). Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell* *17*, 262-272.
130. Renna, L.V., Cardani, R., Botta, A., Rossi, G., Fossati, B., Costa, E., and Meola, G. (2014). Premature senescence in primary muscle cultures of myotonic dystrophy type 2 is not associated with p16 induction. *European Journal of Histochemistry* *58*, 275-286.
131. Robertson, I.B., Horiguchi, M., Zilberberg, L., Dabovic, B., Hadjiolova, K., and Rifkin, D.B. (2015). Latent TGF-beta-binding proteins. *Matrix Biology* *47*, 44-53.
132. Rogakou, E.P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., and Bonner, W.M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 9390-9395.
133. Rosenberg, A.S., Puig, M., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Villalta, S.A., Rao, V.A., Wakefield, L.M., and Woodcock, J. (2015). Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Science translational medicine* *7*, 299rv294-299rv294.
134. Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *Journal of Cell Biology* *150*, 1209-1214.
135. Ryder, S., Leadley, R.M., Armstrong, N., Westwood, M., De Kock, S., Butt, T., Jain, M., and Kleijnen, J. (2017). The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review. *Orphanet journal of rare diseases* *12*, 79.
136. Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J.H., Artandi, S.E., *et al.* (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* *143*, 1059-1071.
137. Sage, J., Miller, A.L., Perez-Mancera, P.A., Wysocki, J.M., and Jacks, T. (2003). Acute mutation of retinoblastoma gene function is sufficient for cell cycle re-entry. *Nature* *424*, 223-228.
138. Sanmarco, L.M., Ponce, N.E., Visconti, L.M., Eberhardt, N., Theumer, M.G., Minguez, A.R., and Aoki, M.P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* *1863*, 857-869.
139. Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., and Zhu, Y. (2017). Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease.

Nature communications 8, 1-11.

140. Selsby, J.T., Ross, J.W., Nonneman, D., and Hollinger, K. (2015). Porcine Models of Muscular Dystrophy. *Ilar Journal* 56, 116-126.
141. Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: relating its age with human's. *International journal of preventive medicine* 4, 624.
142. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell* 88, 593-602.
143. Shapiro, F., Zurakowski, D., Bui, T., and Darras, B.T. (2014). Progression of spinal deformity in wheelchair-dependent patients with Duchenne muscular dystrophy who are not treated with steroids: coronal plane (scoliosis) and sagittal plane (kyphosis, lordosis) deformity. *The bone & joint journal* 96, 100-105.
144. Sharpless, N.E., and Chin, L. (2003). The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 22, 3092-3098.
145. Shimizu, I., and Minamino, T. (2019). Cellular senescence in cardiac diseases. *Journal of Cardiology* 74, 313-319.
146. Shimizu-Motohashi, Y., Murakami, T., Kimura, E., Komaki, H., and Watanabe, N. (2018). Exon skipping for Duchenne muscular dystrophy: a systematic review and meta-analysis. *Orphanet journal of rare diseases* 13, 93.
147. Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J.-P., Roy, R., Dugré, F.J., Sylvain, M., Lachance, J.-G., and Deschênes, L. (2006). Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 65, 371-386.
148. Song, Y., Yao, S., Liu, Y., Long, L., Yang, H., Li, Q., Liang, J., Li, X., Lu, Y., Zhu, H., *et al.* (2017). Expression levels of TGF- β 1 and CTGF are associated with the severity of Duchenne muscular dystrophy. *Exp Ther Med* 13, 1209-1214.
149. Sousa-Victor, P., Gutarra, S., García-Prat, L., Rodríguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jardí, M., Ballestar, E., González, S., and Serrano, A.L. (2014). Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* 506, 316-321.
150. Sui, T.T., Lau, Y.S., Liu, D., Liu, T.J., Xu, L., Gao, Y.D., Lai, L.X., Li, Z.J., and Han, R.Z. (2018). A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9. *Disease Models & Mechanisms* 11, 9.
151. 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. *Experimental Cell Research* 324, 105-114.
152. Takeuchi, S., Nakano, S.-I., Nakamura, K., Ozoe, A., Chien, P., Yoshihara, H., Hakuno, F., Matsuwaki, T., Saeki, Y., and Takahashi, S.-I. (2016). Roles of chondroitin sulfate proteoglycan 4 in fibrogenic/adipogenic differentiation in skeletal muscle tissues. *Experimental cell research* 347, 367-

377.

153. Tandon, A., Villa, C.R., Hor, K.N., Jefferies, J.L., Gao, Z., Towbin, J.A., Wong, B.L., Mazur, W., Fleck, R.J., and Sticka, J.J. (2015). Myocardial fibrosis burden predicts left ventricular ejection fraction and is associated with age and steroid treatment duration in duchenne muscular dystrophy. *Journal of the American Heart Association* 4, e001338.
154. Tatsumi, R., Yamada, M., Katsuki, Y., Okamoto, S., Ishizaki, J., Mizunoya, W., Ikeuchi, Y., Hattori, A., Shimokawa, H., and Allen, R.E. (2006). Low-pH preparation of skeletal muscle satellite cells can be used to study activation in vitro. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 1678-1685.
155. Taylor, A.W. (2009). Review of the activation of TGF-beta in immunity. *Journal of Leukocyte Biology* 85, 29-33.
156. Tominaga, K., and Suzuki, H.I. (2019). TGF- β Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *International journal of molecular sciences* 20, 5002.
157. Udd, B., and Krahe, R. (2012). The myotonic dystrophies: molecular, clinical, and therapeutic challenges. *Lancet Neurology* 11, 891-905.
158. Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Ikemoto-Uezumi, M., Nakatani, M., Morita, M., Yamaguchi, A., Yamada, H., Nishino, I., Hamada, Y., *et al.* (2014). Identification and characterization of PDGFR alpha(+) mesenchymal progenitors in human skeletal muscle. *Cell Death & Disease* 5, 13.
159. Uezumi, A., Fukada, S.-i., Yamamoto, N., Takeda, S.i., and Tsuchida, K. (2010). Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nature cell biology* 12, 143-152.
160. Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M.M., and Miyagoe-Suzuki, Y. (2011). Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *Journal of cell science* 124, 3654-3664.
161. Verhaart, I.E.C., and Aartsma-Rus, A. (2019). Therapeutic developments for Duchenne muscular dystrophy. *Nature Reviews Neurology* 15, 373-386.
162. Verhaart, I.E.C., van Duijn, R.J.M., den Adel, B., Roest, A.A.W., Verschuuren, J.J.G.M., Aartsma-Rus, A., and van der Weerd, L. (2012). Assessment of cardiac function in three mouse dystrophinopathies by magnetic resonance imaging. *Neuromuscular Disorders* 22, 418-426.
163. Verma, M., Asakura, Y., Murakonda, B.S.R., Pengo, T., Latroche, C., Chazaud, B., McLoon, L.K., and Asakura, A. (2018). Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell* 23, 530-+.
164. Verma, M., Shimizu-Motohashi, Y., Asakura, Y., Ennen, J.P., Bosco, J., Zhou, Z., Fong, G.-H., Josiah, S., Keefe, D., and Asakura, A. (2019). Inhibition of FLT1 ameliorates muscular dystrophy phenotype by increased vasculature in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS genetics* 15, e1008468.

165. Voit, T., Haas, K., Leger, J.O.C., Pons, F., and Leger, J.J. (1991). XP21 DYSTROPHIN AND 6Q-DYSTROPHIN-RELATED PROTEIN - COMPARATIVE IMMUNOLocalIZATION USING MULTIPLE ANTIBODIES. *American Journal of Pathology* 139, 969-976.
166. Wei, J., Huang, X.L., Zhang, Z.B., Jia, W., Zhao, Z.J., Zhang, Y., Liu, X.M., and Xu, G.X. (2013). MyD88 as a target of microRNA-203 in regulation of lipopolysaccharide or Bacille Calmette-Guerin induced inflammatory response of macrophage RAW264.7 cells. *Molecular Immunology* 55, 303-309.
167. Whitehead, N.P., Yeung, E.W., Froehner, S.C., and Allen, D.G. (2010). Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the mdx Mouse. *Plos One* 5, 10.
168. Wolff, B., and Naumann, M. (1999). INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappa B. *Oncogene* 18, 2663-2666.
169. Wosczyzna, M.N., Konishi, C.T., Perez Carbajal, E.E., Wang, T.T., Walsh, R.A., Gan, Q., Wagner, M.W., and Rando, T.A. (2019). Mesenchymal Stromal Cells Are Required for Regeneration and Homeostatic Maintenance of Skeletal Muscle. *Cell Rep* 27, 2029-2035.e2025.
170. Wright, W.E., Sassoon, D.A., and Lin, V.K. (1989). MYOGENIN, A FACTOR REGULATING MYOGENESIS, HAS A DOMAIN HOMOLOGOUS TO MYOD. *Cell* 56, 607-617.
171. Xu, M., Palmer, A.K., Ding, H., Weivoda, M.M., Pirtskhalava, T., White, T.A., Sepe, A., Johnson, K.O., Stout, M.B., Giorgadze, N., *et al.* (2015). Targeting senescent cells enhances adipogenesis and metabolic function in old age. *Elife* 4, 20.
172. Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., *et al.* (2018). Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24, 1246-1256.
173. Yamaguchi, Y., Watanabe, Y., Watanabe, T., Komitsu, N., and Aihara, M. (2015). Decreased Expression of Caveolin-1 Contributes to the Pathogenesis of Psoriasiform Dermatitis in Mice. *Journal of Investigative Dermatology* 135, 2764-2774.
174. Yamamoto, H., Komekado, H., and Kikuchi, A. (2006). Caveolin is necessary for Wnt-3a-dependent internalization of LRP6 and accumulation of beta-catenin. *Developmental Cell* 11, 213-223.
175. Yamashita, T., Kanaya, K., Yokogushi, K., Ishikawa, Y., and Minami, R. (2001). Correlation between progression of spinal deformity and pulmonary function in Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Pediatric Orthopaedics* 21, 113-116.
176. Yan, L.J. (2014). Positive oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biology* 2, 165-169.
177. Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M.A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* 93, 23-67.

謝辞

本研究の遂行、論文の執筆にあたり、厳しさの中に優しさのあるご指導、ご鞭撻を賜るとともに、獣医生理学研究室を大黒柱として支え、最適な研究環境を整えてくださいました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 西村眞杉名誉教授に深い敬意とともに、心からの感謝を申し上げます。

本研究の遂行、論文の執筆にあたり、熱心かつ的確なご指導を賜るとともに、研究生活面においても親身なお心遣いをくださいました、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学教室 松脇貴志准教授に深い敬意とともに、心からの感謝を申し上げます。

研究室入室から1年間、研究の基礎を教えてくださいました、筋ジストロフィーと細胞老化に関する研究の立ち上げに尽力してくださった、中村克行博士に心より御礼申し上げます。

論文の執筆、心エコー図検査において多大なご協力をいただき、心臓に関する研究の魅力を存分に伝えてくださいました、東京大学大学院医学系研究科循環器内科 木村公一博士、東京大学医学部附属病院検査部 岡野智子氏に心より御礼申し上げます。

尿中タイチン値の測定にご協力いただくとともに、患者さんとお会いし、お話する貴重な機会も与えてくださいました、神戸学院大学総合リハビリテーション学部核酸創薬研究寄付講座 松尾雅文特命教授、白川卓博士に心より御礼申し上げます。

ヒトサンプルのご提供にご協力いただきました、国立精神・神経医療研究センター疾病研究第一部 西野一三博士、小笠原真志博士に心より御礼申し上げます。

病理切片の作成や、病理診断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教室 内田和幸准教授、志賀崇徳博士に心より御礼申し上げます。

研究面、日常面でも助け合い、支え合ってきた庄司(寺本)奈保美博士、竹内志帆博士をはじめとして、異文化交流の楽しさを教えてくれた Amgen scholars program の留学生の皆様や、研究室生活で大変お世話になった諸先輩、後輩に心より御礼申し上げます。

いつも心の支えとなり、筆者のことを励まし、応援し、長い間育ててくれた家族に心からの感謝の意を表します。

本研究は数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念を捧げます。

最後に、本研究の遂行、論文の執筆にあたり、研究に対する真摯な姿勢と、科学的な物の考え方をご指導くださるとともに、留学生との交流や様々な学会発表等、幅広い経験の機会を与えてくださいました、指導教員である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、心からの感謝を申し上げます。