

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 29 年度博士課程入学

氏名 杉原 英俊
指導教員名 山内 啓太郎

論文題目 細胞老化による筋組織の恒常性破綻機構に関する研究

ジストロフィンはジストロフィン遺伝子 (*DMD* 遺伝子) によってコードされ、骨格筋や心筋といった筋組織に主に発現し、筋細胞膜を安定化させる役割を持つ。*DMD* 遺伝子に *out-of-frame* 変異を生じる疾患がデュシェンヌ型筋ジストロフィー (*DMD*) である。*DMD* では筋線維の脆弱化に伴って炎症反応が繰り返される。通常、骨格筋は高い再生能を有しており、損傷した場合は骨格筋特異的な幹細胞である筋衛星細胞が活性化し、筋芽細胞となって分裂・増殖する。その後、分化・融合することで多核の筋管細胞が形成され、これが成熟することで新しい筋線維が再生される。しかし、*DMD* 患者骨格筋では筋再生能が低下すると同時に、間葉系前駆細胞を起源とする線維・脂肪組織の高度な浸潤が生じる。

細胞老化は細胞が継代を繰り返すうちに不可逆的に分裂停止する現象として見いだされたが、近年、酸化ストレスなどによる DNA 損傷が原因で分裂限界以前に誘導される場合があることが分かってきた (早期細胞老化: *Premature senescence*)。 *DMD* 患者骨格筋では炎症に伴って酸化ストレスが蓄積することから、細胞老化が誘導されている可能性がある。そこで、本研究では細胞老化が *DMD* の病態悪化に関与するかを検討し、それを通じて細胞老化による筋組織の恒常性破綻機構を解明することを目的とした。

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

当研究室では 2014 年に 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し、系統化した (OF ラット)。本章では第一節で OF ラットの骨格筋病態を、第二節で心病態をそれぞれ経時的に解析することで、DMD モデルとしての有用性を検討した。

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

野生型 (WT) 及び OF ラットの筋力、体重を経時的に測定したところ、OF ラットでは WT に比べ、2 ヶ月齢から加齢性の筋力低下が、6 ヶ月齢から体重の減少が認められた。OF ラット前脛骨筋の組織像を観察したところ、1-3 ヶ月齢の病態早期では筋線維の壊死像や炎症像が観察される一方、6-10 ヶ月齢の病態後期では筋線維が線維・脂肪組織に置換され、ヒト DMD 患者に類似した重篤な表現型が認められた。再生筋の指標である embryonic Myosin Heavy Chain (eMHC) に対する免疫染色を行ったところ、加齢性に eMHC 陽性再生筋線維数が減少していた。さらに、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マーカーである Pax7 に対する免疫染色を行ったところ、加齢性に筋衛星細胞数が減少しており、病態悪化とともに筋再生能が低下することがわかった。

WT、OF ラットにおいて whole body plethysmography によって呼吸機能を評価したところ、1 回換気量には両群間で差がなかったものの、OF ラットでは気管収縮の指標である Enhanced pause (Penh) の高値など、軽微な呼吸障害が認められた。以上より、OF ラットは DMD 骨格筋における病態進行機序を解明する上で有用なモデル動物であると考えられた。

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

WT、OF ラットにおいて心エコー検査を行ったところ、10 ヶ月齢の OF ラットでは左室収縮能の指標である左室内径短縮率 (Left ventricular fractional shortening: LVFS) が WT に比べて低下していた。組織ドプラ法を用いてより詳細に検討したところ、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 (Peak systolic velocity at systole (Sa) at lateral wall: Sa lateral) や右室自由壁三尖弁輪収縮期波最高速度 (Sa at right ventricular wall: Sa RV free-wall) がそれぞれ WT に比べて低下する一方、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 (Sa at septum wall: Sa septum) には両群間で差がみられなかった。Masson's Trichrome 染色によって心筋の線維化を評価したところ、10 ヶ月齢では左室及び右室自由壁側では線維化が顕著である一方、左室中隔では線維化が軽微であった。ヒト DMD 患者の心病理所見においても左室自由壁側から次第に心全体に線維化が進行することが確認されており、OF ラットで認められた心筋の機能不全や線維化は、ヒトの病態をよく反映すると考えられる。以上の結果から、OF ラットは病態末期では心不全も併発し、第一節で観察された骨格筋病態と合わせて、ヒト DMD の病態をよく再現することから、以降は DMD ラットと表記することとした。

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

近年の研究によって老化細胞は単に分裂を停止するだけでなく、senescence associated secretory phenotype (SASP) という形質を獲得することで多様な液性因子を分泌し、様々な加齢性疾患の病態悪化に関与することがわかってきた。DMD 患者では炎症に伴って酸化的ストレスが蓄積することから、DMD では細胞老化が誘導されている可能性が考えられる。そこで本章では、実際に細胞老化が DMD の病態悪化に関与するかどうかを検討した。

細胞老化が DMD ラットにおいて誘導されているかどうかを検討するために、*p16*、*p19*、*p21* などの細胞老化関連因子の発現を前脛骨筋において調べたところ、いずれも加齢性に発現が上昇することが明らかになった。前脛骨筋において *p16* および *p19* をコードする遺伝子である *Cdkn2a* に対する in situ hybridization (ISH) を行ったところ、筋線維及び単核の細胞群に発現が認められた。老化細胞種を特定するために、DMD ラット骨格筋初代培養細胞において *Cdkn2a* の ISH を行ったあと、様々な細胞種特異的なマーカーを用いて免疫染色を行ったところ、Pax7 陽性の筋衛星細胞、及び CSPG4 陽性の間葉系前駆細胞に *Cdkn2a* が発現することが明らかになった。

実際に細胞老化が病態悪化に関与するかどうかを検討するために、CRISPR/Cas 法を用いて *p16* 欠損ラットを作出し、これを DMD ラットと交配させることで *p16* 欠損 DMD ラット (dKO ラット) を作出した。dKO ラットでは体重、筋力などの全身状態の改善に伴って骨格筋における線維・脂肪化の減少や、筋再生能の亢進など、病態の改善が認められた。次に、老化細胞除去薬である ABT263 を DMD ラットに経口投与したところ、加齢に伴う体重・筋力の減少が抑制され、eMHC 陽性再生筋線維数の増加が観察された。ヒト DMD 患者骨格筋において細胞老化マーカーの発現を調べたところ、*p14*、*p16*、*p21* の発現上昇が認められた。患者骨格筋組織切片において *CDKN2A* に対する ISH を行ったところ、ヒト DMD 患者においても筋衛星細胞、間葉系前駆細胞に *CDKN2A* の発現が観察された。以上の結果から、細胞老化は DMD の病態悪化に関与することが示された。

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

本章では第二章において認められた老化細胞のうち、間葉系前駆細胞に着目した。間葉系前駆細胞は線維芽細胞や脂肪細胞に分化すると筋分化を抑制する一方、未分化な状態では筋分化を促進することから、老化間葉系前駆細胞が病態悪化に関与するメカニズムとして、①線維芽細胞や脂肪細胞への分化能が亢進し、間接的に筋再生を抑制する可能性、②細胞老化に伴う液性因子分泌動態の変化 (SASP) によって直接筋再生を抑制する可能性が考えられる。そこで本章では①、②の可能性を検討することで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を明らかにすることを目的とした。

当研究室で樹立されたラット間葉系前駆細胞クローン 2G11 細胞において酸化的ストレスを模倣するために H_2O_2 を培地に添加したところ、*p21* や、*Ccl2*、*Il6*、*Tgfb1* の発現量が上

昇したことから、早期細胞老化とともに SASP を誘導できることが分かった (以降、この細胞を Prematurely-senescent 2G11: PMS-2G11 と表記する)。①の可能性について検討するために、PMS-2G11 細胞に線維芽細胞や脂肪細胞への分化誘導を施したところ、正常 2G11 細胞に比べてそれぞれ線維芽細胞マーカー (*Coll1a1*、*Ctgf*、*Acta2*) 発現量や脂肪細胞マーカー (*Perilipin*、*PPAR γ*) 陽性細胞数の低下が観察され、両細胞への分化能が細胞老化によって減弱することがわかった。このことから①の可能性については低いと考えられた。次に、②の可能性について調べるために、WT ラット骨格筋由来筋芽細胞を正常 2G11 細胞、または PMS-2G11 細胞とセルカルチャーインサートを用いて非接触性に共培養した。正常 2G11 細胞と共培養した場合、従来の報告通り Myosin Heavy Chain (MHC) 陽性の筋管細胞の形成が促進された一方、PMS-2G11 細胞と共培養すると筋管細胞の形成が著しく阻害されていた。そこで融合による筋管細胞の形成に先立っておこる筋芽細胞の分裂・増殖や分化が阻害されている可能性を考え、分裂・増殖の指標である Pax7、MyoD、分化の指標である Myogenin の発現量をそれぞれ調べたが、いずれも PMS-2G11 細胞との共培養による発現低下は観察されなかった。また、筋芽細胞総数についても減少は見られなかった。これらの結果から PMS-2G11 細胞は SASP によって筋芽細胞の融合を特異的に抑制することが明らかとなった。以上のことから、本章では、細胞老化によって間葉系前駆細胞自身の分化能が減弱する一方、筋芽細胞に対して何らかの SASP 因子を産生することによってその融合を阻害する結果、直接筋再生を抑制している可能性が示された。

本研究のまとめ

本研究では、ジストロフィン遺伝子に out-of-frame 変異を持つラットは骨格筋、心病態ともに DMD 患者に類似した表現型を示し、DMD の病態を解明する上で適切なモデル動物 (DMD ラット) であることを明らかにした。また、慢性炎症に伴って DMD ラットでは細胞老化が誘導され、これが病態悪化に関与することも明らかにし、その機序の一つとして老化間葉系前駆細胞が、SASP によって筋芽細胞の融合を阻害することで筋再生を抑制する可能性を示した。細胞老化は筋強直性ジストロフィーや加齢性骨格筋減弱症など様々な筋疾患で誘導されることから、本研究によって示された細胞老化による筋組織の恒常性破綻機構は他の筋疾患にも敷衍できる可能性があり、本学位論文で明らかにした研究成果は細胞老化の病態生理学的な意義の解明や、様々な筋疾患の新規治療法の開発に貢献することが期待される。