

骨格筋における非構造的細胞外マトリクス因子 SPARC
の役割とその作用機構に関する研究

中村 克行

目次

略語一覧.....	4
序論.....	6
図表.....	15

第一章 In vivo siRNA による SPARC 発現抑制が筋線維に与える影響

緒言.....	17
材料と方法.....	19
結果.....	24
考察.....	27
図表.....	30

第二章 加齢に伴い骨格筋前駆細胞群で生じる SPARC 抵抗性と それに対する SPARC 内在化機構の関与

緒言.....	36
材料と方法.....	38

第一節 骨格筋前駆細胞群における加齢に伴う SPARC に対する反応性低下

結果.....	45
考察.....	48
図表.....	51

第二節 骨格筋前駆細胞群における SPARC の内在化機構とその SPARC 抵抗性 への関与

結果.....	60
考察.....	64
図表.....	67

第三章 新規デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル動物の作成とその病態時における SPARC の発現

緒言.....	83
材料と方法.....	86
結果.....	91
考察.....	96
図表.....	99

総括.....	125
図表.....	129

参考文献.....	131
-----------	-----

謝辞.....	149
---------	-----

略語一覽

SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
IMAT	intra-muscular adipose tissue
Sca-1	stem cell antigen-1
FAPs	Fibroadipogenic progenitors
PDGF	platelet-derived growth factor
Skm-PCs	Skeletal muscle derived progenitor cells
ECM	extracellular matrix
TGF	transforming growth factor
GDF	differentiation factor
FGF	fibroblast growth factor
WAP	whey acidic protein
TA	Tibialis anterior muscle
SMOC	SPARC related modular calcium binding
VEGF	vascular endothelial growth factor
ILK	integrin-linked kinase
C/EBP	CCAAT-enhancer-binding protein
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
DMD	Duchenne muscular dystrophy
cxmd	canine X-linked muscular dystrophy
MuRF1	muscle RING-finger protein 1
TNF	tumor necrosis factor
siRNA	short interference RNA
itga5	integrin α 5
itgb1	integrin β 1
HSPG	heparan sulfate proteoglycan
BMP	bone morphogenetic protein
BARS	brefeldinA-ADP ribosylated substrate
Cltc	clathrin heavy chain
Cav1	caveolin1
MT-MMP1	membrane type matrix metalloproteinase 1

ZFN	zinc finger nuclease
TALEN	transcription activator-like effector nuclease
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeats
Cas9	CRISPR associated nuclease 9
PAM	protospacer adjacent motif
gRNA	short guide RNA
SOL	soleus muscle
BPVC	bupivacaine hydrochloride
ABD	actin binding domain
BMD	Becker muscular dystrophy

序論

加齢性骨格筋減弱症 サルコペニア

高齢化が叫ばれて久しい我が国では高齢者に対する社会的負担の増加が問題視されその解決が急務となっている。中でも加齢に伴う骨格筋量の減少や筋力低下、それに伴う身体機能の低下は高齢者の転倒や骨折、それによる寝たきりを引き起こす要因となっており（鈴木、2011）、高齢者の Quality of Life を著しく低下させる。1989年、このような加齢による骨格筋量の減少や筋力低下に対して Rosenberg がサルコペニアという呼称を使用したのを機に（Rosenberg, 1989）、高齢者の虚弱や身体的自由を損ねる要因としてのサルコペニアという概念に対し認知度が徐々に高まりつつある。2010年、The European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) により初めて性別ごとにサルコペニアの臨床的定義や診断基準となるカットオフ値に関する国際的なコンセンサスが得られた（Cruz-Jentoft et al., 2010）。それによるとサルコペニアは骨格筋量の減少、筋力の低下、身体機能の低下の3つを指標に、骨格筋量の減少のみがみられる前サルコペニア、これに加えて筋力低下あるいは身体機能の低下のいずれかを伴うものをサルコペニア、そしてこれら3つの症状を併発する重症サルコペニアの3段階に分類され、特に重症のものに関しては加齢性筋疾患として積極的に医療介入するべきとの認識がなされるようになった。そこでサルコペニアの発症メカニズムに基づいた治療法が求められるが、サルコペニアを始めとする加齢性疾患の原因は多岐に渡ることから、その開発は困難を極めている。

筋線維の加齢性変化と骨格筋内に出現する脂肪細胞

骨格筋でおこる加齢性変化として、筋線維直径の縮小による筋線維の萎縮や筋線維数の減少、ならびに速筋型の筋線維の萎縮・減少が知られている。高齢者の骨格筋では筋線維での変化以外にも、間質においてしばしば脂肪細胞の浸潤や（Song et al., 2004）、線維化の亢進（fibrosis）がみられる（Serrano et al., 2011）。実験的にも同様な変化が観察されており、老齢マウスの骨格筋を損傷させた際、若齢のものに比べて筋再生能が低下し（Cong et al., 2003）、脂肪細胞の浸潤が亢進する（Liu et al., 2012）。サルコペニアでみられる骨格筋内脂肪（intra-muscular adipose tissue, IMAT）の量は、骨格筋量と負の相関を示す

(Visser et al., 2002)。この IMAT は筋線維の喪失を脂肪組織で置換する役割を担うことが予想されるが、筋線維よりも脆弱な脂肪組織の増加は筋収縮能を低下させると考えられる。さらに、IMAT は骨格筋の収縮機能の低下だけでなく、骨格筋の糖代謝機能に対してインスリンへの感受性を低下させるインスリン抵抗性に寄与するとの報告もある (Zoico et al., 2010)。以上のことから、サルコペニアに対する防護策を講じる上で、加齢に伴う筋萎縮を防ぐだけでなく、同時に IMAT の蓄積を抑制する処置が必要である。

骨格筋に存在する組織特異的幹細胞 “筋衛星細胞”

骨格筋には骨格筋組織特異的幹細胞である筋衛星細胞が存在する (Mauro, 1961)。筋衛星細胞は筋線維を取り巻く筋膜と基底膜の間に存在し、通常は休止状態であるが、筋損傷時に活性化し増殖することで、筋芽細胞へと分化し、それが融合することでさらに筋管へと分化して筋組織の修復を担う (Anderson, 2006)。筋衛星細胞の筋分化は bHLH ドメインを持つ MyoD ファミリー転写調節因子 (MyoD、Myf5、myogenin、Myogenic regulatory factor 4, MRF4) によって制御されている。筋衛星細胞の活性化時には Myf5 や MyoD を発現し、その後 myogenin や MRF4 を発現するようになると筋芽細胞同士が融合し、多核の筋管細胞を形成する (Davis et al., 1987; Edmondson and Olson, 1989; Wright et al., 1989; Weintraub et al., 1991)。この筋衛星細胞の数は加齢に伴い減少し、筋衛星細胞の活性化能が低下する (Jang et al., 2011)。また老齢マウスの筋衛星細胞では、幹細胞としての重要な機能である筋衛星細胞自身を作り出し幹細胞の枯渇を防ぐ stemness が消失するとの報告もなされている (Chakkalakal et al., 2012)。さらに 30 月齢以上の老齢マウスでは、細胞分裂を繰り返すことで分裂の限界を迎え増殖が停止する細胞老化が筋衛星細胞自身にも起こるようになる (Sousa-Victor et al., 2014)。このような加齢に伴い筋衛星細胞に起こる様々な変化が、高齢者での骨格筋量の減少や筋力低下を引き起こす一因となる可能性が考えられている。

IMAT の起源 “FAPs”

骨格筋内の脂肪細胞の起源については筋衛星細胞が多分化能を有するのか、あるいはこれとは別の細胞集団が存在するのか長らく議論されてきたが、2010 年、筋衛星細胞とは別の細胞集団で、stem cell antigen (Sca) -1 陽性の、高度

な脂肪分化能を有する Fibroadipogenic progenitors (FAPs)とよばれる細胞集団が骨格筋内に存在する脂肪前駆細胞として同定された (Joe et al., 2010)。同時に、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 受容体 α (PDGFR α) 陽性の細胞が脂肪分化を有しかつ筋衛星細胞とは別の集団であると報告された (Uezumi et al., 2010)。これらの細胞は骨格筋の損傷時に in vivo で脂肪細胞へと分化することが示されており、これらの細胞が、IMAT の起源であると考えられている。

ラットやマウス骨格筋より単離した骨格筋前駆細胞群 (本研究では Skeletal muscle derived progenitor cells, Skm-PCs と称する) には筋衛星細胞以外にもこれらの脂肪前駆細胞が含まれており、Skm-PCs を脂肪分化誘導条件下で培養すると多核の筋管以外にも成熟した脂肪細胞が出現する。加齢に伴い Skm-PCs の脂肪分化能が亢進する (Taylor-Jones et al., 2002)。このことは老齢マウスで脂肪細胞の浸潤が亢進すること、そして高齢者の骨格筋で脂肪浸潤がみられる知見に合致する。

骨格筋の老化におけるニッチの関与

Parabiosis と称される若齢個体と老齢個体の血流を共有させる並体結合実験や、若齢個体より単離した細胞を老齢個体に生着させる移植実験では 老齢個体の筋再生能が回復することから (Carlson & Faulkner, 1989; Conboy et al., 2005)、骨格筋の再生能低下といった加齢性変化は、ニッチとよばれる細胞外の微小環境に大きく影響を受けると考えられている (Gopinath & Rando, 2008)。ニッチは、血流または支持細胞ならびに幹細胞自身から分泌・供給される成長因子などの液性因子と、その機械的支持を担う構造的細胞外マトリクス (extracellular matrix, ECM) から構成される。このような血流を介して筋衛星細胞の老化に関与する機構として、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor, TGF) β スーパーファミリーに属する growth differentiation factor (GDF) 11 の血中濃度の低下が、筋衛星細胞の加齢性変化を引き起こすこと (Sinha et al., 2014)、さらに乳汁分泌や社会行動を制御するとされるオキシトシンの血中濃度の減少が、老齢マウスにおける筋再生能低下の要因であることが示されている (Elabd et al., 2014)。前述した筋衛星細胞の stemness の低下についても、筋衛星細胞の周囲に線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) が増加し、FGF シグナルが亢進することに起

因することも明らかになっている (Chakkalakal et al., 2012)。このように成長因子やホルモンなどの液性因子を中心として、筋衛星細胞のニッチ構成因子とサルコペニアとの関連性について、その全容が少しずつ明らかになり始めている。

サルコペニアモデルラットと Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)

当研究室での先行研究において、乳清酸性タンパク質 (whey acidic protein, WAP) 遺伝子のプロモーター領域の下流にヒト成長ホルモン遺伝子を組み込んだコンストラクトを導入したトランスジェニックラットの作成に成功している (Ikeda et al., 1994)。予想に反して、このラットでは血中への成長ホルモンの分泌が低下していた。これは、WAP プロモーターの働きにより低いながらも中枢で発現するヒト成長ホルモンの負のフィードバック作用によりラットの自己下垂体からの分泌が抑制されるためと考えられる。成長ホルモンは加齢に伴いその分泌量が低下することがヒトにおいてもよく知られているが、このラットでみられる成長ホルモン分泌低下は高齢者で生じる成長ホルモン分泌不全とそれに付随する病態をよく反映しており、事実、このトランスジェニックラットでは高度な脂肪蓄積をはじめ、骨組織の脆弱化、耐糖能異常など様々な加齢性変化に類似する症状を呈する (Ikeda et al., 1998; Yamanouchi et al., 2004)。骨格筋においても同様に、出生後早期に骨格筋量の減少、筋線維直径の萎縮、筋力低下など骨格筋の加齢性変化に極めて類似した特徴がみられた (Shibata et al., 2010)。筋線維の萎縮に関しても遅筋型に比べ、速筋型の筋線維に強い萎縮がみられ、このことは高齢者での筋線維型にみられる現象に一致している。さらにこのラット骨格筋より単離した Skm-PCs の分化能を調べたところ、筋分化能は低下する一方脂肪分化能は亢進しており、骨格筋前駆細胞群の分化能に関するこれまでに報告された加齢性変化と一致する。以上のことからこの成長ホルモン分泌低下トランスジェニックラットはサルコペニアの有用なモデル動物となりうる。

サルコペニア原因因子を特定するため、このサルコペニアモデルラットの前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle, TA) において DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、細胞外マトリクス構成因子や成長因子などのニッチ構成因子の発現量を野生型ラットと比較した。その結果、このトランスジ

エニックラットで発現が低下している因子として細胞外マトリクス構成因子である Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) を同定した。この DNA マイクロアレイの再現性を取るべく、4 ヶ月齢の若齢ラットおよび 21 ヶ月齢以上の老齢ラットの TA において SPARC の遺伝子発現量を比較したところ、老齢ラットにおいて SPARC の遺伝子発現量は若齢のものに比べて半減していることが明らかとなった (中村 卒業論文、2011)。マウスにおいても同様に大腿四頭筋において加齢により SPARC の遺伝子発現量が低下することが報告されている (Scimè et al., 2010)。以上の結果から加齢に伴う SPARC の発現量減少がサルコペニア発症に関与する可能性が考えられる。

SPARC の性状

SPARC は osteonectin や BM-40 とよばれる 43kDa の分泌性の糖タンパク質で、線維性 collagen や fibronectin、laminin などの構造的マトリクスとは異なり、組織の機械的支持には関与しない非構造的細胞外 β マトリクス因子の一つであり、matricellular タンパク質に分類される (Brekken et al., 2001)。SPARC は同じように非構造的細胞外マトリクス因子でその構造や作用に共通性を持つ SPARC ファミリーに属している (Bradshaw, 2012)。この SPARC ファミリーには、最近の研究から発癌メカニズムへの関与が明らかにされている分子である hevin や SPARC related modular calcium binding (SMOC) 1、2 などが含まれる (Fig. 0)。

SPARC は線虫から昆虫、ヒトに至るまで進化的に高度に保存されている遺伝子で、ヒト、マウスおよびラット間では 90% 以上の相同性が維持されている。SPARC 遺伝子の突然変異によって発症する遺伝病はこれまでに報告された例はない。ヒトの SPARC は 298 から 304 個のアミノ酸からなり、最初の 17 アミノ酸は細胞外に分泌される際に取り除かれる分泌シグナルとして働き、残る部分は次の 3 つのドメインから構成されている。N 末端 3 から 51 番目のアミノ酸までは Acidic ドメインとよばれるカルシウム結合性配列をなしている。続く 52 から 132 番目のアミノ酸は 10 個のシステインを含むシステインリッチなドメインで、TGF β スーパーファミリーに属するアクチビンやインヒビンと結合する follistatin とよく似た構造を示すことから follistatin-like ドメインとよばれる。そして残りの C 末端側は細胞外ドメインとよばれ、カルシウム結合能を示す他、近傍に位置する follistatin-like ドメインと相互作用を示す (Busch et al.,

2000)。この細胞外ドメインに関しては他の SPARC ファミリーである hevin や SMOC1、2 のいずれにおいても高い相同性を示すことから、SPARC ファミリーを特徴づける上で重要なドメインであると考えられる。この領域には collagen 結合部位も存在し、マトリクスメタロプロテアーゼによる切断を受けるとその親和性が増加することが知られている (Sasaki et al., 1997)。

SPARC の発現は骨や真皮、脳、心臓や肝臓など全身の臓器でみられ、特にリモデリングが盛んに行われるような組織でその高発現が認められる (Porter et al., 1995)。また大腸癌や、肺癌、乳腺癌において SPARC が高発現することが知られているなど (Porter et al., 1995)、これまで癌との関連性を指摘する報告は多い。一方でその作用は癌の種類によって異なり、癌の悪性化に対して相反する知見が混在することから議論の余地を残すところとなっている (Podhajcer et al., 2008)。SPARC と相互作用する因子が複数存在し、その発現パターンが癌細胞種により異なることで、SPARC の作用発現の複雑さを生み出す原因となっていることが想定されるが、その詳細な機序については不明である。これまでの研究から、SPARC と相互作用する因子が多岐にわたることが明らかとなってきた。SPARC は collagen や vitronectin など多くの構造的 ECM と直接結合する。SPARC は PDGF や血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) とも結合し (Raines et al., 1992; Kupprion et al., 1998)、また fibronectin や laminin、ECM の分解を担うマトリクスメタロプロテアーゼの発現調節作用をもつことから、細胞と ECM との相互作用を制御する役割を担うと考えられている (Brekken et al., 2001)。SPARC のもつ生理作用も様々で、例えば細胞増殖抑制作用や細胞接着抑制作用が知られている他、細胞の分化能を調節する作用をもつ。その例として、SPARC は筋芽細胞株での筋分化の促進 (Cho et al., 2000; Motamed et al., 2003)、白色脂肪由来脂肪前駆細胞の脂肪分化の抑制効果を示す (Nie & Sage, 2009a; 2009b)。したがって SPARC は増殖・遊走・分化・細胞死をはじめとする細胞の様々な動態に関与しそれを制御することで組織の恒常性維持に貢献しているものと考えられる。

SPARC 受容体

様々な細胞種において発現がみられ、多様な作用を発揮する際、分泌された SPARC が細胞表面受容体と結合することが想定されるが、SPARC 特異的受容体は未だ同定には至っていない。最近になりいくつかの細胞表面上の膜分子が

SPARC と結合することがわかってきた。SPARC は脂肪前駆細胞において、fibronectin 受容体として知られる integrin $\alpha 5$ および $\beta 1$ のヘテロダイマーと結合する (Nie et al., 2008)。SPARC の抗脂肪分化作用は、integrin β 鎖の細胞内ドメインと結合する integrin-linked kinase (ILK) ならびにその下流にある β -catenin の核移行を介して CCAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) α や peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ といった脂肪分化のマスター遺伝子の発現を抑制することで発揮される (Nie & Sage, 2009a)。このことから SPARC は integrin と結合し、ILK のリン酸化を介して脂肪分化を抑制するという一連のカスケードにより脂肪分化抑制効果を発現していると推定される。Integrin 以外の分子では、SPARC は TGF β III 型受容体である endoglin と結合することにより TGF β シグナルを調節すること (Rivera & Brekken, 2011)、また白血球において接着分子のひとつである vascular cell adhesion molecule (VCAM) 1 と結合すること (Kelly et al., 2007)、さらにマクロファージではスカベンジャー受容体である stabilin1 に SPARC が結合し、リソソーム中へと輸送されることで、SPARC のクリアランスが行われていることが示されている (Kzhyshkowska, 2006)。これらの細胞表面因子は SPARC 特異的なものではないが、これらの因子が細胞外の SPARC を受容し、そのシグナルを細胞内へと伝達する受容体としての役割を担っている可能性は十分に考えられる。

SPARC と疾患

Thrombospondin-1 や tenascin-C などの matricellular タンパク質の特徴の一つとして、それを欠損したノックアウトマウスが正常に出生し、顕著な表現型を示さないことが知られている (Imanaka-Yoshida & Aoki, 2014)。SPARC ノックアウトマウスも他の matricellular タンパク質と同様に、出生時に明らかな異常はみられないものの、その後のより詳細な表現型解析から、成長とともに様々な表現型を示すことが明らかとなっている。例えば、SPARC ノックアウトマウスは出生後、早期に白内障を呈する他 (Norose et al., 1998)、オステオペニアとよばれるような骨量の低下を示す (Delany et al., 2000)。また SPARC ノックアウトマウスの体重は野生型に比べて同程度であるものの、体重あたりの脂肪組織重量が多いことから (Bradshaw et al., 2003)、骨ならびに骨格筋などの非脂肪組織重量が代償的に減少していることが推察される。これら一連の表現型は高齢者でみられるものに類似しており、SPARC の発現低下がさまざまな

加齢性疾患の発症に関与する可能性が考えられる。一方、SPARCは糖尿病やそれに付随する腎疾患、さらには高血圧時など病的な状態でその発現が誘導されることが報告されている (Kos & Wilding, 2010)。また肝臓において線維化を誘導した際に SPARC の発現抑制がその症状を緩和させることから (Atorrasagasti et al., 2013)、SPARCはfibrosisに対して促進的な作用をもつこともわかっている。個々の病態についてその詳細な機序は異なるかもしれないが、SPARCの発現量の増減がどちらも病態を引き起こしうることから、SPARCの発現および作用を正常に保つことが加齢性疾患の病態制御につながると考えられる。

デュシェンヌ型筋ジストロフィー

サルコペニアとは別に、長年多くの研究者の間でその病態解明や治療法開発のために研究対象となっている筋原性疾患に、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy, DMD) がある。DMDでは筋線維の壊死とそれに付随しておこる筋再生が繰り返されることで、筋組織が脆弱化し機能不全を引き起こす。おおよそ新生男児の3500人に1人の割合で発症し、幼少期より歩行不全として症状があらわれ、横隔膜や心筋にまでその病変がおよぶことで、20、30代で呼吸困難や心不全を引き起こす致死性の疾患である。DMDの原因として、X染色体上に位置する全長おおよそ220万塩基にも及ぶ巨大な*Dmd*遺伝子によってコードされる427 kDaのDystrophinタンパク質が同定された (Hoffman et al., 1987)。筋線維に発現するDystrophinタンパク質は筋細胞膜を裏打ちし、細胞骨格と筋線維のECMとを繋ぐことで、筋細胞膜の安定性を高める作用を持つ (Koenig et al., 1988)。そのため、*Dmd*遺伝子の変異によりDystrophinタンパク質の欠損が起こると、筋線維の安定性が失われ、筋線維が破壊しやすくなると考えられる。サルコペニアと同様に、DMDの病態が進行すると、正常筋線維が減少するだけでなく、脂肪細胞が浸潤する (Kinali et al., 2011)。DMDの原因遺伝子が同定されて以降、DMDに関する精力的な研究が進められてきており、その病態機序解明にDMDモデル動物、なかでもマウスモデルであるmdxマウスやイヌモデルであるcanine X-linked muscular dystrophy (cxmd) 犬がこれまで広く用いられている。ただし、現在のところ有効な治療法は確立されておらず、その多くが臨床試験段階で留まっている。興味深いことに、SPARCはヒトの筋衛星細胞で発現しており、またDMD患者の

骨格筋において再生途中の筋線維において SPARC が発現することが報告されている (Jørgensen et al., 2009)。

本研究の目的

本研究ではこのような多様な作用を有する SPARC が、骨格筋の恒常性維持ならびにサルコペニアや DMD といった脂肪細胞の浸潤を伴う筋疾患の病態発現に関与する可能性を考え、骨格筋における SPARC の役割を明らかにすることを目的とした。本研究の第一章では、骨格筋における SPARC 発現低下が筋線維にどのような影響をあたえるのか検討を行った。続く第二章では Skm-PCs における SPARC の発現ならびにその作用の加齢性変化を解析した。そして第三章では DMD 治療法確立の上で既存のモデルが抱える課題を解決するべく新規 DMD モデルラットを作成し、そのモデルを用いて SPARC の発現解析を行った。

(本序論での記載は概ね 2013 年 4 月 生体の科学 64 巻 2 号 132 から 138 頁「サルコペニアにおける非構造的細胞外マトリクスタンパク質 SPARC の役割」に記載した内容に準ずる。)

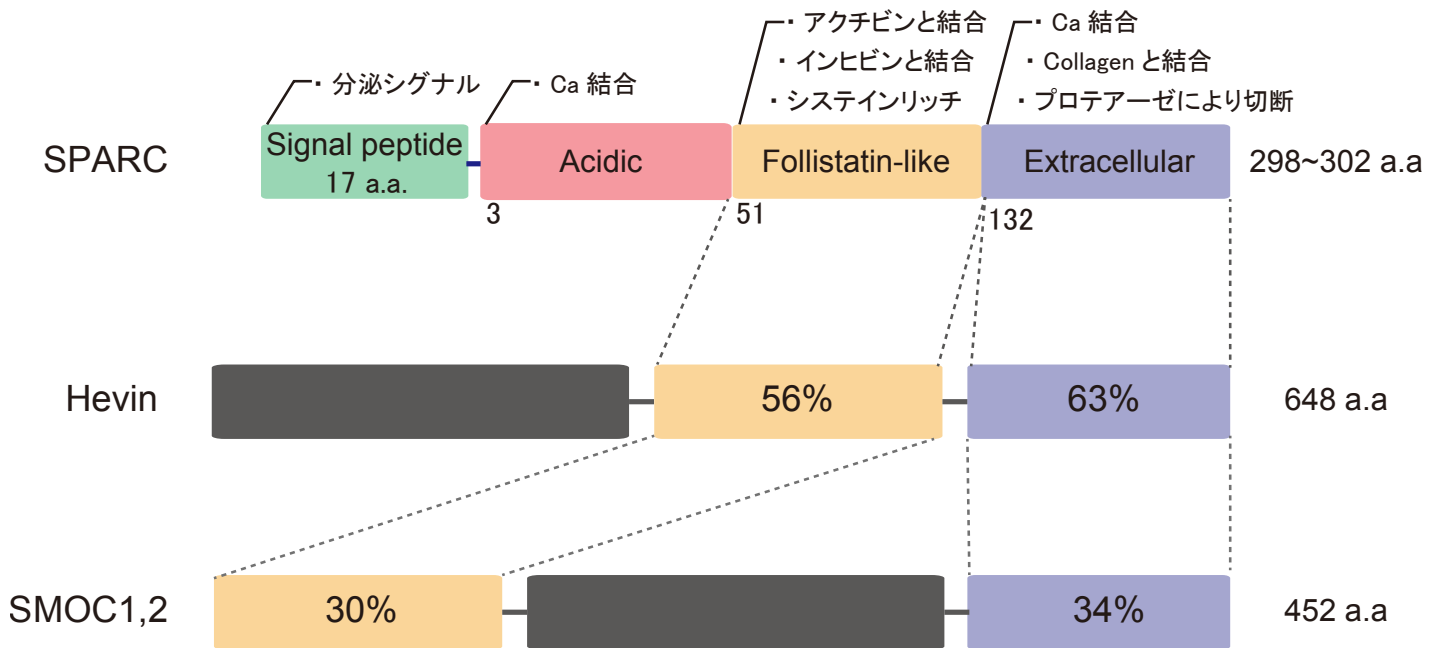


Fig. 0 SPARC を構成するドメインとそのファミリーとの相同性

SPARC の各ドメインにおける機能と、SPARC と SPARC ファミリーの代表的な Hevin、SMOC の各ドメインとの相同性 (%) を示した。Bradshaw (2012) の文献を参考にした。なお、本文および図中では紹介していないが、SPARC ファミリーにはその他にも Testican (sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan, SPOCK) 1, 2, 3 および Follistatin-like (Fst11) が含まれている。

第一章

In vivo siRNA による SPARC 発現抑制が筋線維に与える影響

緒言

骨格筋量は同化と異化のバランスによって維持されている。このバランスが異化に偏ることで、筋線維の萎縮が引き起こされるが、この萎縮には筋萎縮遺伝子と称される、muscle atrophy F box (atrogin1) や muscle RING-finger protein 1 (MuRF1) といった骨格筋特異的ユビキチンリガーゼが中心的な役割を担う。後肢での除神経や後肢懸垂、加齢などの筋線維の萎縮を引き起こす条件下では、これらの筋萎縮遺伝子の発現が誘導され、それが筋萎縮を引き起こす直接的な原因となることが示されている (Bodine et al., 2001; Glass, 2003; Kamei et al., 2004; Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004; Clavel et al., 2006)。Atrogin1 や MuRF1 の発現は、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor, TNF) α やトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor, TGF) β などの炎症性サイトカイン、あるいはその下流に位置するリン酸化シグナルカスケードによって制御されている。TNF α はその下流である p38MAP キナーゼを介して atrogin1 や MuRF1 の発現を (Li et al., 2005)、一方 TGF β は Smad2/3 を介して atrogin1 の発現を誘導することが報告されている (Sartori et al., 2009; Mendias et al., 2012)。

加齢に伴い骨格筋での異化が亢進し筋線維が萎縮する現象はサルコペニアと呼ばれ、骨格筋量の減少や筋力の低下を招き、高齢者の QOL を低下させる大きな要因となっている。サルコペニアの特徴として、筋線維の本数の減少ならびに筋線維直径の縮小が同時におこり、さらに遅筋型、速筋型のうち特に速筋型で筋線維の萎縮が顕著で、遅筋型の筋線維の割合が増加することが広く知られている (Forbes & Reina, 1970)。これに加え、ラットにおいて加齢に伴い骨格筋での atrogin1 や MuRF1 の発現が増加することも報告されている (Pattison et al., 2003; Clavel et al., 2006)。

SPARC は分子量 43kDa の分泌性糖タンパク質で、matricellular タンパク質といわれる非構造的細胞外マトリクス因子として知られている。SPARC は細胞接着や細胞増殖を抑制する作用をはじめ、細胞外マトリクスや成長因子と結合することや細胞の分化能を調節する作用を有する (Brekken & Sage, 2001; Kos & Wilding, 2010)。SPARC は C2C12 ならびに MM14 などの筋芽細胞株に対し、

筋分化促進作用を持つ。FGF-2 やその受容体である FGFR-1 による細胞増殖の促進が最終的な筋管細胞への分化を抑制するが、SPARC はそれを阻害することにより筋分化を促進することが報告されている (Cho et al., 2000; Motamed et al., 2003)。さらに SPARC ノックアウトマウスは早期の白内障 (Norose et al., 1998)、オステオペニアと呼ばれる骨量の減少、肥満の症状や骨格筋量の減少など、高齢者で典型的にみられるような表現型を示す (Delany et al., 2000; Bradshaw et al., 2003)。これに加えて、骨格筋における SPARC の発現量は老齢マウスやラットでは若齢のものに比べて低下していることも判明している (Scimè et al., 2010)。SPARC は TGF β の III 型受容体である endoglin を介して TGF β のシグナルを抑制することも報告されている (Rivera & Brekken, 2011)。TGF β は atrogen1 の発現調節に関与することから、骨格筋における SPARC の発現量の低下が TGF β シグナルの亢進を引き起こし、このことが加齢に伴う筋萎縮の一因である可能性が考えられる。

短鎖干渉 RNA (short interference RNA, siRNA) は 21 から 23 塩基対の二本鎖 RNA で、標的 mRNA と相同的な配列を持ち、標的 mRNA と結合することでその mRNA を分解する作用を持つ。この siRNA を用いることで、目的遺伝子の発現を特異的に抑制することが可能となる。そこで第一章ではこの siRNA を *in vivo* で適用することで、骨格筋における SPARC の発現抑制を再現し、そのときの筋線維に与える影響を検討した。

材料と方法

動物

オス 8 週齢 C57BL/6J マウスをチャールズ・リバー・ジャパン社（神奈川）より購入した。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；7:00-19:00）の条件下で飼育し、固形試料（ラボ MR スタンダード、日本農産工業、横浜）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。

In vivo siRNA transfection

Mouse SPARC に対する siRNA ならびに陰性対照としての negative control siRNA は Applied Biosystems/Ambion (TX, USA) より購入した。製造元の推奨する手順に従い、最終濃度 0.7 mg/ml となるようそれぞれの siRNA を InvivoFectamine2.0 (Invitrogen, CA, USA) と混合した。この溶液をそれぞれ麻酔下のマウスの前脛骨筋 (TA) にそれぞれ 50 μl 注入した。siRNA による SPARC の発現抑制効果を検討するため、siRNA を投与してから 2 日および 10 日後にそれぞれ TA を採取し、結合組織を取り除いてから、液体窒素中で冷却したイソペンタン（和光純薬、大阪）の中で急速に凍結させた後、ドライアイスの上でイソペンタンを蒸発させ、使用まで -80°C にて保存した。そのうち一部を定量的 PCR (qPCR) およびウェスタンブロットに、また TA の骨格筋凍結切片を作成し免疫染色に供した。

RNA の抽出

凍結した TA を TRIzol reagent (Invitrogen) 中で、ホモジェナイザー (Shake Master、バイオメディカルサイエンス、東京) により粉砕後、 4°C 、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上層を別のチューブに移した。1 ml の TRIzol reagent に対しクロロホルム（和光純薬）を 200 μl 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、上層の透明な部分の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を加え、攪拌してから 10 分間室温で静置し、 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 1 ml 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 10~50 μl の DEPC 処理水を加え、RNA を

溶解させた。得られた RNA は、GeneQuant II (GE Healthcare、UK) にて濃度を測定した。

逆転写反応 (Reverse transcription reaction: RT)

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

Total RNA (1-2 µg)	5 µl
<u>Oligo dT (Invitrogen)</u>	<u>1 µl</u>
Total Volume	6 µl

次に、以下に示す反応溶液で、42°C で 60 分間逆転写反応を行った。

Total RNA + Primer	6 µl
dNTP (2 mM, Applied biosystems)	5 µl
5 × RT buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
Super Script- II (Invitrogen)	1 µl
<u>RNase Inhibitor</u>	<u>2 µl</u>
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。

qPCR

逆転写反応によって得た cDNA を用いて、Light Cycler 2 (Roche、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。qPCR に使用したプライマーは forward、reverse の順にそれぞれ以下に示した。

SPARC: 5'-ccctgaaccttgctctctt-3'	5'-cacggttctctctccacta-3'
HPRT: 5'-agtcccagcgtcgtgattagccat-3'	5'-cttgagcacacagaggccacaat-3'
Atrogin1: 5'-agtgaggaccggctactgtg-3'	5'-gatcaaacgcttgcaatct-3'
MuRF1: 5'-gcaggagtgtccagtcg-3'	5'-tcttcgtgttccttgccat-3'
TNFα: 5'-ctgtagcccacgtcgtagc-3'	5'-ttgagatccatgccgttg-3'
TGFβ1: 5'-tggagcaacatgtggaactc-3'	5'-gtcagcagccggttacca-3'
TGFβ2: 5'-aggaggtttataaaatcgacatgc-3'	5'-tagaaagtgggcccggatg-3'

TGFβ3: 5'-ccctggacaccaattactgc-3'

5'-tcaatataaagggggcgtaca-3'

Myostatin: 5'-tggccatgatcttctgtaa-3'

5'-ccttgacttctaaaaaggattca-3'

各 cDNA サンプルを超純水で 100 倍希釈した溶液を PCR に用いた。また、標準検量線作成のために別途 cDNA を 10 倍、100 倍、1000 倍希釈し、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 Milli-Q 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 の代わりに超純水のみを用いた。

100 倍に希釈した cDNA、5 μM のプライマー、THUNDERBIRD™ SYBER® qPCR Mix (東洋紡、大阪) を以下の組成で混合した。

希釈された cDNA	5 μl
滅菌超純水	4 μl
Forward Primer	0.5 μl
Reverse Primer	0.5 μl
<u>SYBER qPCR Mix</u>	<u>10 μl</u>
Total Volume	20 μl

以下の条件で PCR の反応を行った。72°C を 1 秒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 サイクル毎に行った。

qPCR 反応条件

95°C、15 分

95°C、15 秒

57°C、20 秒

72°C、1 秒

45 サイクル

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

骨格筋からのタンパク質抽出ならびにウェスタンブロット

凍結した TA をサンプルバッファー (0.5 M Tris-HCl (和光純薬)、10% glycerol (和光純薬)、1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、ナカライテスク、京都)、

10% 2-mercaptoethanol (和光純薬) 中でホモジナイザーにより粉碎した後、5,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上層を別のチューブに移した。このタンパク質抽出物を、SDS を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。

ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD、CA、USA) により 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 PVDF メンブレン (Millipore) へと転写した。ブロッティングにはトランスファーバッファー (10% メタノール (和光純薬)、25 mM Tris、190 mM Glycine (和光純薬)) を用いた。その後、メンブレンを取り出し、5% スキムミルク/PBS-T (0.1% Tween20 / PBS) に浸し、室温で一時間ブロッキングした。一次抗体は PBS-T で 2,000 倍に希釈した抗 SPARC ヤギポリクローナル抗体 (R&D systems、MN、USA)、4,000 倍に希釈した抗 α -tubulin マウスモノクローナル抗体 (Sigma、MO、USA)、1,000 倍に希釈した抗 p38 ウサギポリクローナル抗体、抗リン酸化 p38 ウサギポリクローナル抗体、抗 Smad3 ウサギモノクローナル抗体、抗リン酸化 Smad3 ウサギモノクローナル抗体 (Cell signaling Technology、MA、USA) を用い、4°C にて一晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら、PBS-T で 10 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/PBS-T で 10,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates、AL、USA)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories、ME、USA)、ME、USA) および Biotin 標識ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories、CA、USA) を用い、室温で一時間反応させた。Biotin 標識ヤギ IgG 抗体を使用した際は、その後 VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) を用いて HRP 標識を行った。PBS-T で 3 回洗浄したのち、ECL Western blotting analysis system により発光させ、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad)により画像を取得したのち、画像処理により各タンパク質量の定量を行った。

骨格筋の凍結切片の作成

凍結させた TA を O.C.T コンパウンド (Tissue-Tek; Sakura Finetek U.S.A、CA、USA) によりクリオスタット (MICROM International GmbH、Walldorf、Germany) に固定し、厚さ 7~8 μ m の凍結切片を作成した。切片は筋線維に対

して垂直な面となるように作成し、MAS コート付きスライドガラス（松波硝子工業株式会社、大阪）上に貼り付け、風乾させた後、-80℃で保存した。

組織切片の染色

作成した凍結切片を、4%パラホルムアルデヒド（PFA）を含むリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered-Saline; 以下 PBS）にて 15 分間固定を行った。PBS により 3 回洗浄した後、5%ロバ血清（DS）を含む PBS にて 1 時間ブロッキングした。洗浄後、PBS で 100 倍に希釈した抗 SPARC ヤギポリクローナル抗体（R&D systems）、抗 laminin ウサギポリクローナル抗体（Sigma）を 4℃で一晩反応させた。PBS で洗浄後、5%DS/PBS にて 500 倍に希釈した Alexa Fluor® 488 ロバ抗ヤギ IgG 抗体（Invitrogen）と Alexa Fluor® 594 ロバ抗ウサギ IgG 抗体（Invitrogen）を一時間反応させた。核は Hoechst 33258 dye により対比染色した。

遅筋型筋線維の検出には、0.6%過酸化水素水（和光純薬）を含む 5%正常ヤギ血清（NGS、Invitrogen）を含む PBS で室温にて 1 時間ブロッキングした後、PBS で 500 倍に希釈した抗遅筋型ミオシン重鎖（myosin heavy chain、MHC）マウスモノクローナル抗体（Sigma）を 4℃で一晩反応させた。その後 HRP 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた後、最終濃度 0.5 mg/ml の diaminobenzidine と 0.03%過酸化水素水を含む溶液にて発色させた。また HE 染色、あるいは抗遅筋型ミオシン重鎖に対する免疫染色を行った切片から、1 個体あたり 5 視野を任意に選んで写真撮影し、短径を測定することで筋線維直径とした。

統計処理

2 群間の平均値の比較は、Unpaired Student's t-test を用いて行った。中央値の比較には、Wilcoxon rank sum test 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。

結果

In vivo siRNA によるマウス前脛骨筋における SPARC の発現抑制

骨格筋において SPARC が発現しており、SPARC の発現が加齢に伴い減少することはこれまでに報告されているものの、骨格筋における SPARC の作用ならびにその発現低下の意義については不明である。そこで成体骨格筋における SPARC の役割を明らかにするため、8 週齢 C57BL/6J マウスの前脛骨筋において、in vivo における siRNA 導入により SPARC をノックダウンし、加齢に伴う SPARC の発現低下を若齢個体で再現することを試みた。Invivofectamine2.0 を用いたリポフェクション法により SPARC を標的とした siRNA (siSPARC) を前脛骨筋に直接投与し、その 2 日および 10 日後に SPARC の mRNA、タンパク質発現量を調べた (Fig. 1-1)。その結果、siRNA 導入 2 日後において SPARC の mRNA 量が対照群に比べて 70%以上抑制されていた (Fig. 1-1A)。この発現抑制は 10 日後には消失しており、対照群と同程度にまで回復していた。ウェスタンブロットの結果も同様に、siSPARC 群では siRNA 導入 2 日後に対照群に比べて 50%以上の発現抑制効果を認めた (Fig. 1-1B)。SPARC に対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行ったところ、siRNA 導入 2 日後において対照群では間質に SPARC の発現を認めたが、siSPARC 導入群では SPARC の発現はほとんどみられなかった (Fig. 1-1C)。以上の結果から、in vivo において SPARC に対する siRNA を直接投与することにより、SPARC の発現が一過的に抑制されることが明らかとなった。

SPARC 発現抑制が筋線維直径に与える影響

SPARC の発現抑制が骨格筋に与える影響を検討するため、siSPARC 導入 2 日および 10 日後の筋線維の直径を調べた (Fig. 1-2)。その結果、siRNA 導入 2 日後では、対照群、siSPARC 導入群間で筋線維の直径の分布に違いはみられなかった (Fig. 1-2A、B)。このとき対照群、siSPARC 導入群どちらの群においても間質への炎症細胞の浸潤が認められたが、HE 染色像からは両者に炎症の程度の違いはみられなかったことから、この炎症細胞の浸潤は siRNA を含んだ溶液を骨格筋に直接投与したことに起因するものと考えられた。一方、siRNA 導入 10 日後においては siSPARC 導入群で有意な筋線維直径の縮小を認めた (Fig. 1-2A、C)。筋線維の直径の平均値についても、同様に siRNA 導入 2 日後には変

化がみられなかったが、10日後では siSPARC 導入群で有意な縮小が認められた。以上の結果から、SPARC の発現抑制は、筋線維の萎縮を引き起こす可能性が考えられた。

速筋型および遅筋型筋線維における SPARC 発現抑制の影響

高齢者の骨格筋では遅筋型よりも速筋型の筋線維において萎縮が顕著であり、さらに遅筋型の筋線維が占める割合が増加することが知られている (Lexell et al., 1988)。そこで SPARC 発現抑制による筋線維の萎縮がみられた 10 日後において遅筋型ミオシン重鎖に対する抗体による免疫染色を行い、筋線維型の割合に変化が起こるのか、また速筋型・遅筋型のどちらの筋線維に萎縮が起きているのかを調べた (Fig. 1-3)。まず対照群および siSPARC 導入群間で遅筋型筋線維の割合を比較したところ、遅筋型筋線維の占める割合に変化はみられなかった (Fig. 1-3A、B)。次に遅筋型、速筋型それぞれにおける筋線維の直径を測定したところ、遅筋型の筋線維においては筋線維の直径の分布について対照群および siSPARC 導入群間で違いはみられなかった (Fig. 1-3C)。一方、速筋型の筋線維では siSPARC 導入群で筋線維の直径の分布が左方へ移動していた (Fig. 1-3D)。筋線維直径の平均値に関しても遅筋型では対照群および siSPARC 導入群間に違いはみられず、速筋型において siSPARC 導入群で直径の縮小が認められた (Fig. 1-3E)。以上の結果から、SPARC の発現抑制は筋線維型の割合に影響は与えないものの、速筋型筋線維に対して筋線維直径の減少を引き起こすことが明らかとなった。

SPARC の筋萎縮遺伝子ならびに TNF α および TGF β シグナル調節作用

骨格筋が萎縮する条件下ではその萎縮の原因となる筋萎縮遺伝子 atrogen1 や MuRF1 の発現が上昇することが報告されている。そこで、SPARC の発現抑制により筋線維の萎縮がみとめられた 10 日後においてこれら筋萎縮遺伝子の発現量を調べた (Fig. 1-4)。その結果 MuRF1 の発現量については対照群および siSPARC 導入群間で違いはみられなかったものの、atrogen1 の遺伝子発現量に関しては siSPARC 導入群で増加していることが判明した。このことから、SPARC の発現抑制により atrogen1 が上昇することが、SPARC 発現抑制による筋萎縮の一因である可能性が考えられた。

SPARC の発現抑制が atrogen1 の発現量増加を引き起こす機序を明らかにするため、atrogin1 の発現を上昇させる作用をもつサイトカインである、TNF α および TGF β 1 の遺伝子発現量を調べた (Fig. 1-5A)。その結果、siRNA 導入 2 日後において、SPARC 発現抑制によりこれらサイトカインの発現量が増加する結果は得られなかった。

骨格筋で同様に発現することが知られる (Zhou et al., 2006; Smith et al., 2007)、TGF β 1 のアイソフォームである TGF β 2 および 3、また筋萎縮を引き起こす myostatin についてもその発現量を調べたところ、同様に SPARC 発現抑制による発現量の有意な増加はみられなかった。

次に SPARC の発現抑制によりサイトカインに対する反応性が変化する可能性を考え、その下流シグナルのリン酸化を調べたところ、TNF α の下流である p38 については変化がないものの、siSPARC 導入群において TGF β の下流シグナルである Smad3 のリン酸化が亢進することが明らかとなった (Fig. 1-5B)。以上の結果から、SPARC は TGF β シグナルを選択的に抑制することで、筋萎縮遺伝子の発現上昇に起因する筋萎縮から筋線維を保護する役割を担っていると考えられた。

考察

本研究により、骨格筋への siRNA の直接投与による SPARC の発現抑制は TGF β シグナルの亢進、atrogin1 の発現上昇および筋線維の萎縮を引き起こすことが示された。SPARC ノックアウトマウスの表現型として脂肪蓄積の亢進があげられ、これには体重増加を伴わないことから、代償的な骨格筋量の減少が予想される (Bradshaw et al., 2003)。本研究の SPARC の喪失による筋萎縮の結果はこのような知見と一致する。

骨格筋への siRNA 溶液の直接投与は筋線維間への炎症細胞の浸潤を引き起こし、これら炎症細胞は atrogin1 の発現を誘導する TNF α を産生することが知られている (Lundberg, 2000)。以上のことから、本研究においてみられた siRNA 導入による SPARC 発現抑制時の atrogin1 の発現上昇が siRNA 投与によって誘導された TNF α 産生に起因するといった可能性も十分考えられる。しかしながら、対照群と siSPARC 導入群間で HE 染色像では炎症の程度に顕著な違いは認められなかったこと、また TNF α の発現量についても両群間に違いはみられなかったことから、SPARC の発現抑制時にみられた atrogin1 の発現上昇は、SPARC タンパク質の喪失に起因するものと考えている。しかし、siRNA 投与による炎症誘導が、SPARC 発現抑制による atrogin1 の発現上昇効果の発現に必要な条件である可能性は依然として残される。骨格筋への siRNA の直接投与という手法よりもより非侵襲的で、かつ SPARC の発現が時間的かつ筋線維限局的に制御できるような薬剤誘導性のコンディショナルノックアウトや、オプトジェネティクスなど新しい手法を開発することで、SPARC の筋線維に対する直接的な影響について今後より詳細を明らかにできるものと思われる。

Smad3 のリン酸化をはじめとする TGF β シグナルは加齢に伴いマウス骨格筋で亢進することが知られており、老齢マウスでみられる TGF β シグナルの亢進を抑制することで、筋機能の回復がみられたことから、TGF β シグナルがサルコペニア治療法を開発する上での標的の一つとなっている (Carlson et al., 2009; Burks & Cohn, 2011)。SPARC は TGF β 1 の活性を制御する因子であることは以前より知られていたが (Brekken & Sage, 2001)、最近になり、SPARC は pericyte において、細胞膜上に存在する TGF β の III 型受容体である endoglin と

直接複合体を形成することで、TGF β 1 とその受容体と結合を阻害することが報告された (Rivera & Brekken, 2011)。このことから骨格筋においてこの endoglin が SPARC と TGF β シグナルとを仲介している可能性が考えられる。しかし、骨格筋における endoglin の発現は、ラットの筋芽細胞や血管内皮細胞に局限しており (Duff et al., 2003)、免疫染色では筋線維には発現がみられない (Frydelund-Larsen et al., 2003)。この点に関して、興味深いことに、endoglin は従来の膜結合型以外にも溶解型の構造をもち、この溶解型の endoglin がヒトの血清中に存在し、TGF β 1 とその受容体との結合を阻害する作用を示すことが明らかとなった (Venkatesha et al., 2006)。以上のことから、この溶解型 endoglin が骨格筋にも存在し、SPARC の TGF β シグナル抑制作用を仲介する可能性を検証することで、骨格筋における SPARC の作用機序に関する知見を得ることが期待できる。

In vivo における様々な筋萎縮モデルでは atrogen1 と MuRF1 の mRNA 双方の発現が上昇することが知られているが、本研究では SPARC 発現抑制時に atrogen1 の発現上昇しか観察されなかった。Atrogen1 や MuRF1 などの筋萎縮遺伝子は、骨格筋の萎縮以外にもリモデリングならびに異化作用を調節することで骨格筋量の維持を担うことが知られている (Foletta et al., 2011)。これに加えて、ユビキチンリガーゼである atrogen1 と MuRF1 の基質特異性が異なることもいくつか報告されている。例えば、atrogen1 は筋分化に重要な転写調節因子である MyoD や Myogenin ならびに longation initiator factor substrate subtype 5 を分解することで、筋分化やタンパク質翻訳に影響を与える (Tintignac et al., 2005; Lagirand-Cantaloube et al., 2008; Jogo et al., 2009)。一方、MuRF1 はミオシン軽鎖やミオシン重鎖といった筋線維の構造を担う因子と相互作用を示すとされている (Clarke et al., 2007; Cohen et al., 2009)。現在のところこれらの筋萎縮遺伝子の基質特異性の違いがどのような生理学的意義を持つかは不明であるが、この違いが atrogen1 と MuRF1 が筋萎縮やリモデリング時に別々の役割を担っていることを示すものである可能性が高い。SPARC は TGF β シグナルならびにその下流に位置する atrogen1 の発現を制御することで、筋線維の構造を担う因子よりも筋分化を制御する因子の調節に関与しているのかもしれない。

本研究では8週齢のマウスを用いており、この週齢のマウスでは筋芽細胞が活発に働き骨格筋の成長が著しい時期である (Nishijo et al., 2009)。そのため、SPARC 発現抑制による筋線維直径の縮小が骨格筋の成長の遅延によるものである可能性も十分に考えられる。しかしながら、本研究では siRNA 導入 2 日後および 10 日後間で筋線維の直径に顕著な変化はみられなかった。このことから、本研究でみられた短期間における筋線維直径の縮小は、骨格筋の成長の遅延によるものというよりも、筋線維の萎縮に起因するものである可能性が高いと考えている。

以上、本研究により、SPARC の発現抑制が TGF β シグナルの亢進を招き、その結果 atrogen1 の発現増加による筋萎縮を引き起こす可能性が示された。さらにこの筋萎縮が速筋型筋線維で顕著であったことは、高齢者で遅筋型よりも速筋型筋線維で萎縮が著しい知見と一致する。以上のことから SPARC は筋線維の萎縮から筋線維を保護する作用を持ち、その発現の維持ならびにその作用の増強がサルコペニア克服への標的となることを期待している。

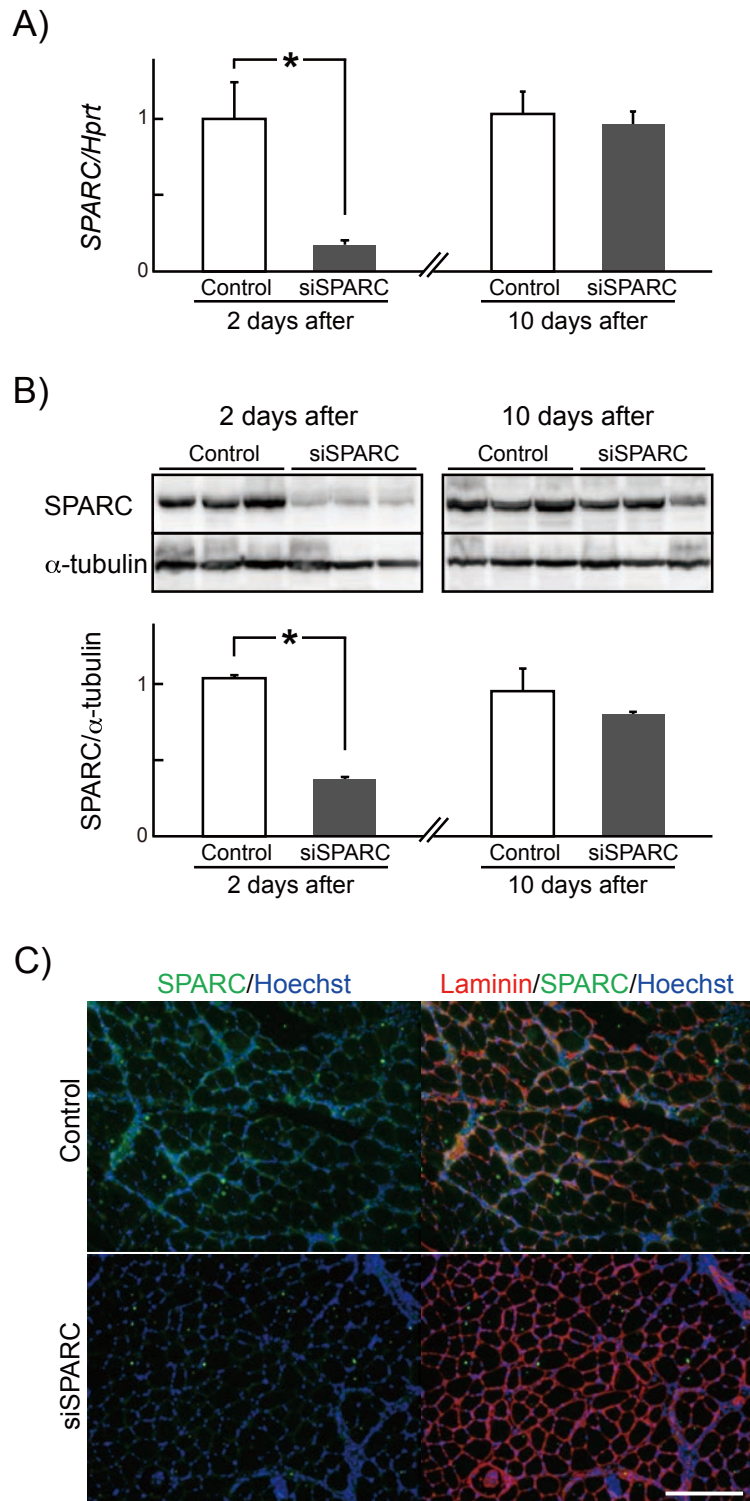


Fig. 1-1 In vivo siRNA による SPARC ノックダウン効率の評価

マウス前脛骨筋 (TA) へ siRNA 投与 2 および 10 日後に TA を採取し、qPCR (A)、ウェスタンブロット (B) により SPARC の発現量を定量した。

n = 3。*: p < 0.05。

(C) SPARC に対する免疫染色像。Scale bar = 100 μ m。

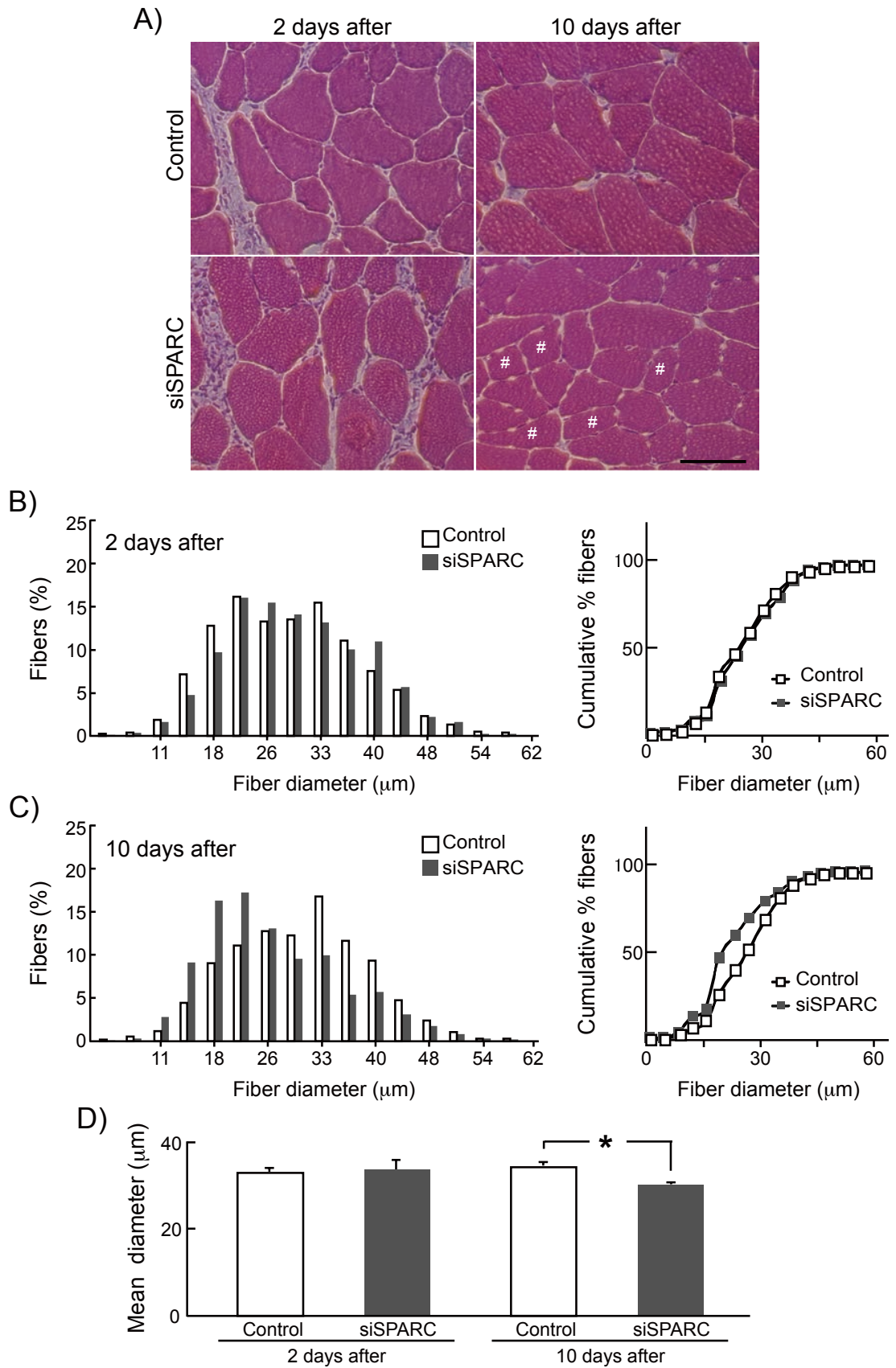


Fig. 1-2 siRNA による SPARC ノックダウンが筋線維に与える影響

マウス TA へ siRNA 投与 2 および 10 日後の TA 凍結切片の HE 染色像 (A) とその時の筋線維直径の分布 (B、C) およびその平均 (D)。# は萎縮した筋線維を示す。

n = 3。Scale bar = 100 μm。*: p < 0.05。

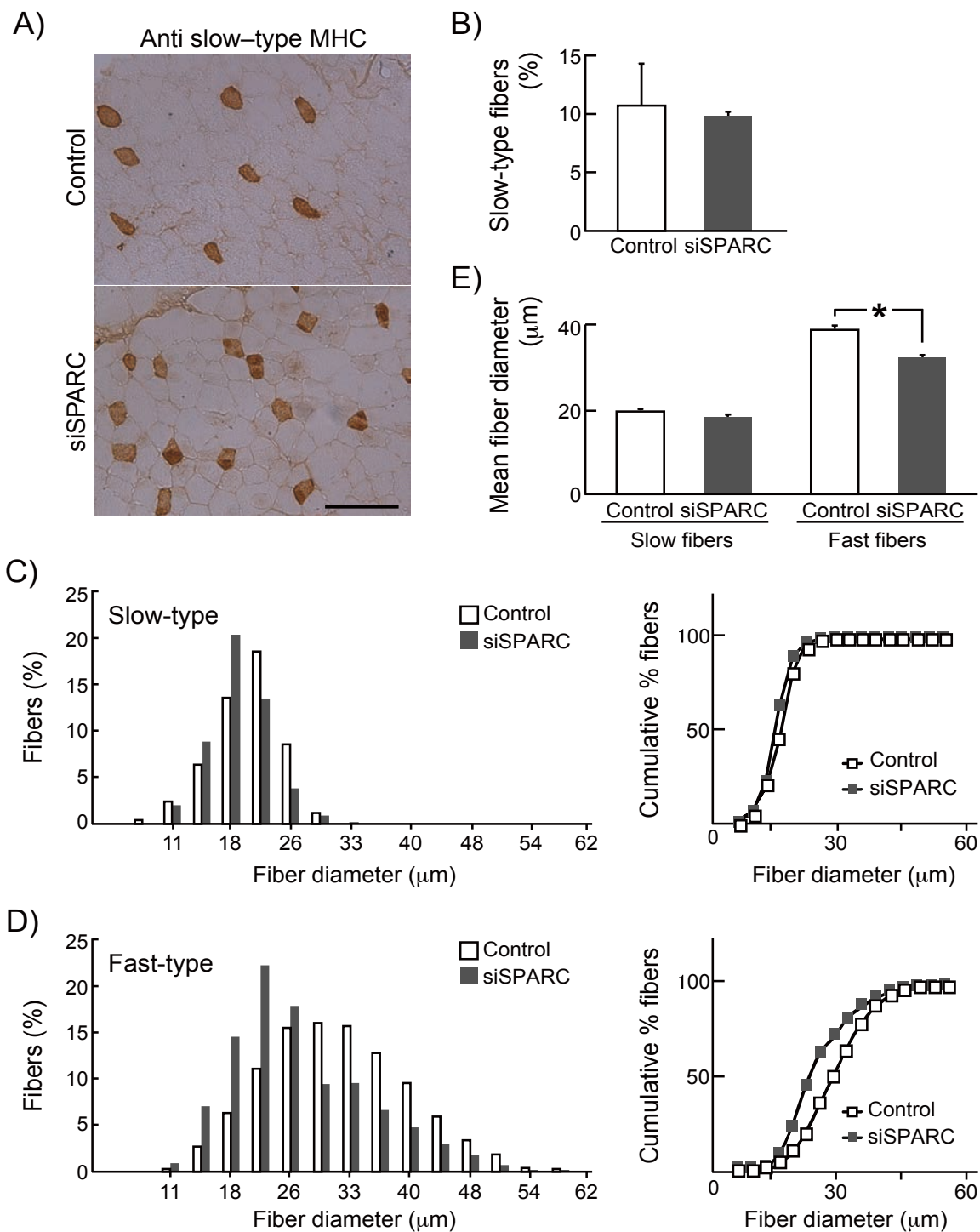


Fig. 1-3 SPARC ノックダウンが筋線維型に与える影響

マウス TA への siRNA 投与 10 日後の TA における抗遅筋型ミオシン重鎖抗体を用いた免疫染色像 (A) と遅筋型筋線維が占める割合 (B) ならびにその時の筋線維直径の分布 (C、D) とその平均 (E) をグラフ化したもの。n = 3。Scale bar = 100 μm。
*: p < 0.05。

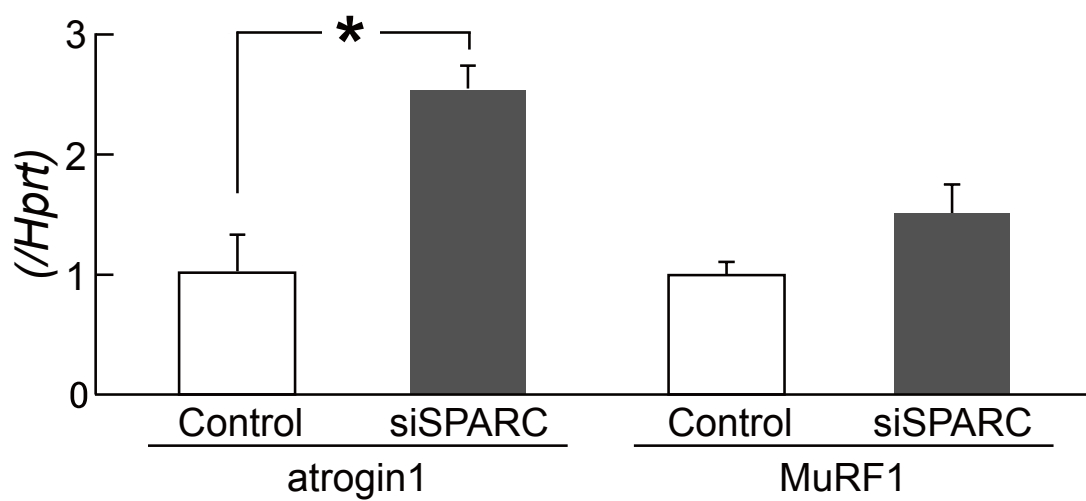


Fig. 1-4 SPARC 発現抑制による筋萎縮遺伝子発現量の変化

マウス TA への siRNA 投与 10 日後における atrogen1 および MuRF1 の遺伝子発現量を qPCR により定量した。n = 3。*: p < 0.05。

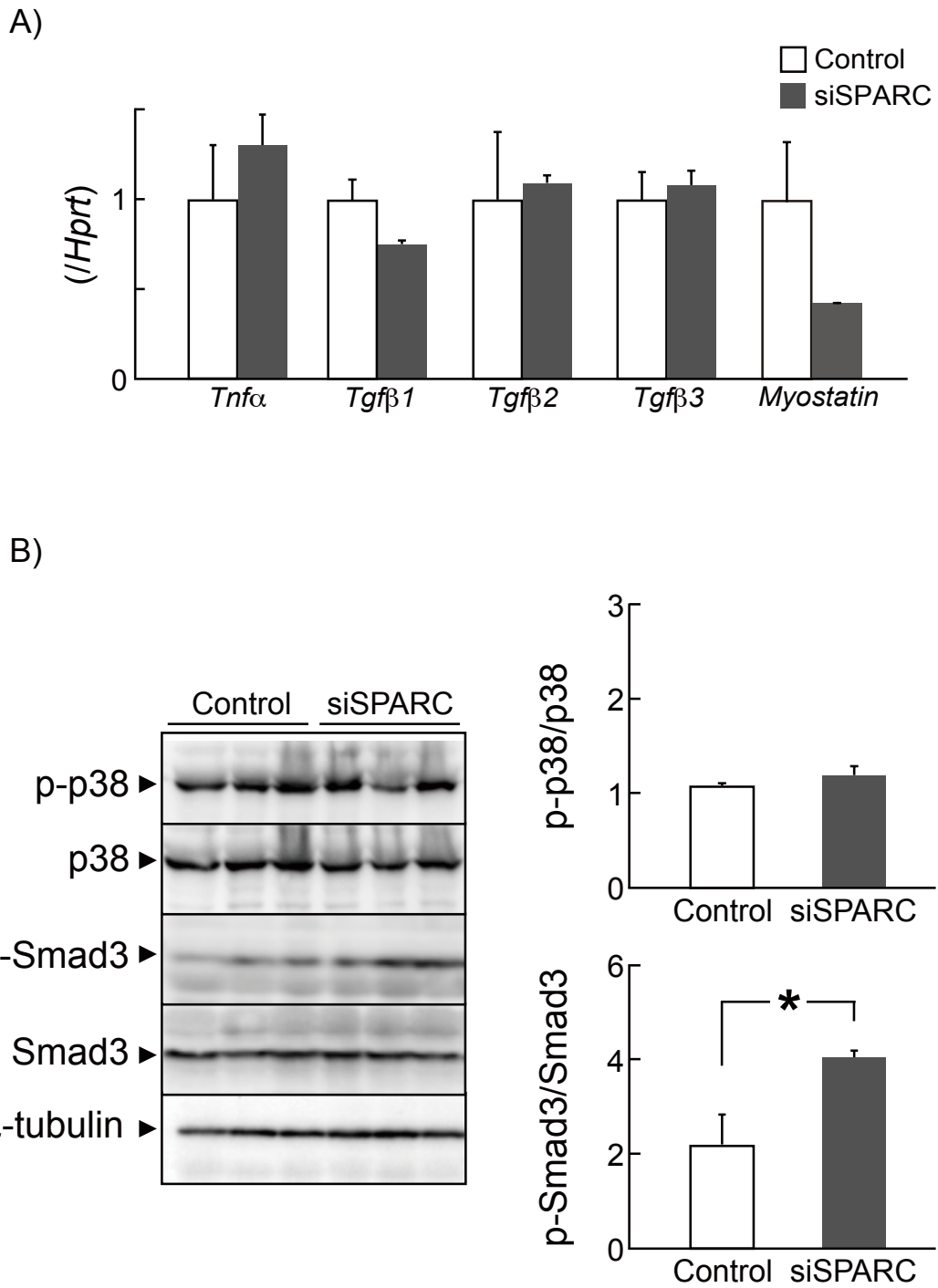


Fig. 1-5 SPARC 発現抑制による $TNF\alpha$ および $TGF\beta$ シグナルの変化

(A) マウス TA への siRNA 投与 2 日後における $TNF\alpha$ 、 $TGF\beta$ および Myostatin 遺伝子の mRNA 発現量を qPCR により定量した。n = 3。

(B) マウス TA への siRNA 投与 2 日後、p38 および 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。n = 3。*: p < 0.05。

第二章

加齢に伴い骨格筋前駆細胞群で生じる SPARC 抵抗性と
それに対する SPARC 内在化機構の関与

緒言

第一章において、骨格筋では SPARC が筋線維の萎縮に対し保護的な作用を持つことが示唆された。骨格筋には筋線維以外にも、筋衛星細胞や脂肪前駆細胞などの前駆細胞が存在する (Mauro, 1961; Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010)。これらの細胞の分化能における加齢性変化として、筋衛星細胞の筋分化能が低下し、脂肪前駆細胞の脂肪分化能が亢進する。SPARC は、筋衛星細胞においてもその発現が確認されており (Jørgensen et al., 2009)、筋芽細胞株を用いた実験から、筋管形成を促進する作用を持つことが示されている (Cho et al., 2000; Motamed et al., 2003)。一方で、脂肪分化能に関しては、マウスの白色脂肪組織由来の脂肪前駆細胞の培地中に SPARC タンパク質を添加すると脂肪分化能が抑制されることから、SPARC が脂肪分化抑制作用を持つことが報告されている (Nie & Sage, 2009a; 2009b)。このように SPARC が筋分化、脂肪分化の双方の分化能に対し調節作用を有することから、SPARC が筋線維だけでなく骨格筋を構成する前駆細胞群に対しその分化能を制御することで、骨格筋の恒常性維持に寄与していることが想定される。以上のことから、加齢に伴いこの SPARC の発現量、もしくは SPARC の分化調節作用に対する反応性が筋衛星細胞および脂肪前駆細胞において低下することで、筋衛星細胞ならびに脂肪前駆細胞でみられる分化能の加齢性変化を引き起こす可能性を考えた。

SPARC と相互作用を示す因子の一つに integrin $\alpha 5$ (*itga5*) が挙げられる (Nie et al., 2008)。細胞表面上に位置する integrin は ECM 受容体として働き、ECM と細胞間の相互作用を仲介している。Integrin の活性は細胞外、細胞内様々な因子によって制御されており、細胞表面上の integrin はその一部がエンドサイトーシス経路により細胞内へと内在化することが知られている。(Caswell et al., 2009)。一度細胞内に取り込まれた integrin はその後リサイクルエンドソームへと輸送され、細胞表面上に戻って再利用される。リガンドは、一般に、受容体を介したエンドサイトーシスあるいは飲作用 (pinocytosis) によるものが知られている (Conner & Schmid, 2003)。この経路は大きく分けて、大飲作用 (macropinocytosis)、clathrin 依存性、caveolin 依存性ならびに clathrin・caveolin 非依存性エンドサイトーシス経路の四種類に分類される。Integrin の内在化に関しては macropinocytosis によるもの (Gu et al., 2011)、

clathrin 依存性 (Ezratty et al., 2009) および caveolin 依存性エンドサイトーシス経路により細胞内に内在化することが知られている (Caswell & Norman, 2006)。この integrin の内在化がラット骨髄由来間葉系幹細胞の分化能調節の重要な制御機構となっている (Du et al., 2011)。

本章では、まず第一節において若齢 (young) と老齢 (old) ラットより単離した骨格筋前駆細胞群 (Skeletal muscle derived progenitor cells, Skm-PCs) を用いて、Skm-PCs における SPARC の発現量および SPARC に対する反応性を若齢・老齢間で比較した。また、SPARC と相互作用する itga5 に関して、itga5 が SPARC の分化調節作用を仲介するかどうかについて検討を加えた。第二節では、integrin が細胞内へと内在化されることに着目し、SPARC の分化調節作用とその加齢性変化に対して、SPARC の内在化機構が関与するかどうかを検証した。

材料と方法

動物と飼育条件

本研究では、若齢群として 4 から 5 月齢の、老齢群として 21 ヶ月齢以上の Wistar-Imamichi ラットの雄を用いた。これらは動物繁殖研究所（茨城）から購入したものをそれぞれの月齢になるまで飼育した。

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；7:00-19:00）の条件下で飼育し、固形試料（ラボ MR スタンダード、日本農産工業、横浜）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。

ラット骨格筋からの骨格前駆筋細胞 Skm-PCs の単離および培養

上記の条件下で飼育したラットを CO_2 ガスにて安楽殺し、70% エタノールに 5 分間浸け、全身を消毒した。その後、後肢と背部の骨格筋を採取し PBS に浸した。骨格筋に付着している脂肪や結合組織を取り除いた後、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。細切した骨格筋重量を測定し、10-12.5 g の組織を、それぞれプロテアーゼ (Sigma、最終濃度 1.25 mg/ml) を含む 30 ml の PBS により 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 Skm-PCs 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% ウシ胎児血清 (FBS、Invitrogen) 及び 50 Unit/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (Invitrogen) を含む DMEM (Invitrogen、以下通常培地とする) にて浮遊させ、Cell strainer (BD Falcon) を用いて濾過した。

得られた Skm-PCs は、poly-L-lysine と human plasma fibronectin (Invitrogen) でコートした 24-well および 48-well プレート (IWAKI、千葉) に、それぞれ 1 well あたり、その細胞が由来する筋組織の重量が 0.5 g および 0.25 g と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% CO_2 -95% 空気条件下で培養した。培養開始 24 時間後に、通常培地で 2 回から 3 回洗うことにより非付着性の細胞や結合組織などを取り除いた。

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、続いて滅菌超純水で 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。

Skm-PCs の分化誘導

Skm-PCs の脂肪分化誘導は以下のように行った。Skm-PCs を播種してから約 24 時間後に、通常培地にインスリン (最終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$)、DEX (最終濃度 0.1 $\mu\text{g/ml}$)、IBMX (最終濃度 27.8 $\mu\text{g/ml}$) 及び Troglitazone (最終濃度 10 μM 、第一三共、東京) を添加した培地 (ADM) へと交換し、48 時間培養した。続いて、インスリンと Troglitazone のみを添加した通常培地で 48 時間培養した。この培地で以降の細胞培養を行い、2 日おきに交換した。インスリン、DEX、IBMX については、インスリン 1 mg/ml (0.1N HCl)、DEX 0.1 mg/ml (メタノール)、IBMX 27.8 mg/ml (DMSO) をストック溶液とし、 -20°C にして保存したものをを用いた。筋分化誘導は 2% 馬血清 (horse serum, HS) 及び 50 Unit/ml ペニシリン、50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、50 $\mu\text{g/ml}$ ゲンタマイシンを含む DMEM 培地により行った。細胞播種後、2、3 日後にこの培地に交換した。細胞を播種して 1 日後、血球系の細胞や結合組織などを 2 回から 3 回の培地交換により取り除いた。以降、2 日ごとに筋分化誘導培地を交換した。

siRNA (short interference RNA) の導入

本章で使用した siRNA のセンス鎖の配列を以下に示した。
SPARC (Sigma、以下 3 種類の siRNA を混合し、カクテルとして使用した。)

#1: 5'-gccacaagctccacctggatt-3'

#2: 5'-gugugaagaagauccacgatt-3'

#3: 5'-ccugugaccuagacaaugatt-3'

Itga5 (Sigma、第一節): 5'-gaaugaaucaagaauucagatt-3'

Itga5 (Ambion、第二節) #1: 5'-cauucauuugacagcaaatt-3'

#2: 5'-acauguaccaacucuaatt-3'

BARS (Ambion、第二節) #1: 5'-gcacaguggagaugccuauatt-3'

#2: 5'-cagcggguugacaacauatt-3'

Cltc (Ambion、第二節) #1: 5'-caacaaguccgugaacgaatt-3'

#2: 5'-cauugaaguugguacaccatt-3'

Cav1 (Ambion、第二節) #1: 5'-cgacgacguggucaagauutt-3'

#2: 5'-cgcuugcugucuaccaucutt-3'

Rab7 (Ambion、第二節) #1: 5'-agaaguucaguaaccaguatt-3'

#2: 5'-cagacuuucugaccaaggatt-3'

どの siRNA も最終濃度 50 nM となるように調製して実験に用いた。陰性対照として Scrambled siRNA (Invitrogen、第一節)、Negative control (Ambion、第二節) を導入に用いた。Skm-PCs は播種してから 2 日間 (Myogenin の免疫染色の場合には 1 日間) 培養した後、抗生物質を含まない培地に交換し、さらに一晩培養した。その後、導入試薬の Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen、CA、USA) を用い、製造元の推奨する手順に従って siRNA を導入した。siRNA 導入 48 時間後に、RNA、タンパク質抽出および脂肪分化誘導培地、筋分化誘導培地への交換を行った。

SPARC タンパク質の添加

培地中への SPARC タンパク質の添加実験には内因性の SPARC を siRNA により抑制した後、ヒトリコンビナント SPARC (120-36、Peprotech、NJ、USA) を用いて行った。BSA およびヒトリコンビナント SPARC は Alexa 標識キット (Invitrogen) を用い、製造元の推奨する手順に従い蛍光標識した。その後蛍光標識 SPARC を SDS-PAGE した後、ゲルを Oriole 染色 (BioRad) に供し、変性していないことを確認した。

Oil Red O 染色

Oil Red O 粉末 (Sigma) をイソプロピルアルコール (和光純薬) に溶解し、0.5% (w/v) Oil Red O ストック溶液とした。このストック溶液を、染色の直前に超純水で希釈 (Oil Red O ストック溶液: 超純水 = 3:2) し、孔径 0.20 μm の滅菌フィルター (Corning、NY、USA; # 431222) で濾過したものを 0.3% Oil Red O 染色液とした。まず細胞を、4% PFA/PBS で 15 分間固定した。固定後、PBS で 3 回洗浄し、次に Oil Red O 染色液で 7 分間染色した。PBS で 3 回洗浄後、観察及び写真撮影を行った。解析には 1 well あたり無作為に 5 視野を選び、Photoshop (Adobe Systems Incorporated、CA、USA) で二階調化した後、ImageJ (ver1.41、National Institutes of Health: NIH、MD、USA) を用いて Oil Red O 染色陽性面積を算出した。

免疫染色

用いた一次抗体を以下に示す。抗 Pax7 マウスモノクローナル抗体 (1:100、Developmental Studies Hybridoma Bank: DSHB、IA、USA)、抗 MyoD マウスモノクローナル抗体 (1:100、A5.8、Novocastra、Newcastle upon Tyne、UK)、抗 myogenin マウスモノクローナル抗体 (1:100、F5D、DSHB)、抗ニワトリミオシン重鎖マウスモノクローナル抗体 (1:200、MF20、DSHB)、抗 SPARC ヤギポリクローナル抗体 (1:100、R&D systems)、抗 itga5 ウサギポリクローナル抗体 (1:1000、Millipore、MA、USA)、抗 Cltc ウサギモノクローナル抗体 (1:100、D3C6、Cell signaling)、抗 Rab5 ウサギモノクローナル抗体 (1:100、C8B1、Cell signaling)、抗 Rab7 ウサギモノクローナル抗体 (1:100、D95F2、Cell signaling)、ウサギ抗 Rab11 モノクローナル抗体 (1:50、D4F5、Cell signaling)、抗 C/EBP α ウサギポリクローナル抗体 (1:200、Santa Cruz)、抗 PPAR γ マウスモノクローナル抗体 (1:200、Santa Cruz)、抗 Perilipin ウサギモノクローナル抗体 (1:500、D1D8、Cell signaling) をそれぞれ用いた。二次抗体には、Invitrogen より購入した Alexa Fluor[®] 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を、また一次抗体にヤギ抗体を用いた際はロバ抗ヤギ IgG 抗体、ロバ抗マウス IgG 抗体、ロバ抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ用いた。対比染色として、核を Hoechst 33258 dye により染色した。細胞膜の易透化には Triton-X (Sigma) を用いた。

蛍光強度の解析には 1 well あたり無作為に 5 視野を選び、Photoshop により二階調化した後、Hoechst 陽性細胞数と各タンパク質の陽性細胞数または陽性面積を ImageJ (NIH、ver1.4.3) を用いて計測した。また 1 細胞ごとにおける蛍光強度の定量は、まず Photoshop により 1 細胞ごとに画像を分割し、二階調化した後、ImageJ により蛍光標識 SPARC 内在化量ならびにエンドソームマーカーとの共局在を定量した。共焦点顕微鏡は、Zeiss LSM510 system (Carl Zeiss Jena GmbH、Jena、Germany) を用いた。

RNA の抽出

24-well プレートで培養した Skm-PCs に、500 μ l の TRIzol reagent (Invitrogen、CA、USA) を加え、チューブに移した。1 ml の TRIzol reagent に対しクロロホルムを 200 μ l 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、上層の透明な部分の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を加え、攪拌してから 10 分間室温で静置し、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 1 ml 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 10~50 µl の DEPC 処理水を加え、RNA を溶解させた。得られた RNA は、GeneQuant II (GE Healthcare、UK) にて濃度を測定した。

逆転写反応 (Reverse transcription reaction: RT)

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

Total RNA (1-2 mg)	5 µl
<u>Oligo dT (Invitrogen)</u>	<u>1 µl</u>
Total Volume	6 µl

次に、以下に示す反応溶液で、42°C で 60 分間逆転写反応を行った。

Total RNA + Primer	6 µl
dNTP (2 mM, Applied biosystems)	5 µl
5 × RT buffer	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
Super Script- II (Invitrogen)	1 µl
<u>RNase Inhibitor</u>	<u>2 µl</u>
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。

リアルタイム RT-PCR

逆転写反応によって得た cDNA を用いて、Light Cycler 2 (Roche、Switzerland) を用いたリアルタイム PCR 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。qPCR に使用したプライマーは forward、reverse の順にそれぞれ以下に示した。

SPARC: 5'-aggtgcagaggaaactgtcg-3' 5'-gtttgcagtgatggttctgg-3'

HPRT: 5'-gaccggttctgtcatgtcg-3' 5'-acctggttcatacactaatcac-3'

Itga5: 5'-gcaccattcaattgacagc-3' 5'-ttgtactccacaggttctcac-3'

Itgb1: 5'-atcatgcaggttgcagtttg-3' 5'-cgtggaaaacaccagcagt-3'

BARS: 5'- gctcgcacttgctcaaca-3' 5'-ctccaaccaaagctctcagg-3'
 Cltc: 5'- cgaatcctgaacaacctct-3' 5'-catctattgatgttcgcagagc-3'
 Cav1: 5'- aacgacgacgtggtcaaga-3' 5'-cacagtgaaggtggtgaagc-3'
 Rab7: 5'- ggaggccatcaatgtgga-3' 5'-cagctccacttccgtttcc-3'

各 cDNA サンプルを超純水で 100 倍希釈した溶液を PCR に用いた。また、標準検量線作成のために別途 cDNA を 10 倍、100 倍、1000 倍希釈した 3 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 Milli-Q 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 の代わりに超純水のみを用いた。

第一節では 100 倍に希釈した cDNA、5 μ M のプライマー、THUNDERBIRD™ probe® qPCR Mix を以下の組成で混合した。

希釈された cDNA	5 μ l
滅菌超純水	3.8 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
Probe	0.2 μ l
probe qPCR Mix	10 μ l
Total Volume	20 μ l

第二節では第一章と同様に THUNDERBIRD™ SYBER® qPCR Mix (東洋紡、大阪) を用いた。各遺伝子発現量を HPRT 遺伝子発現量により除した値を qPCR による各遺伝子の相対的な発現量とした。

Skm-PCs からのタンパク質抽出ならびにウェスタンブロット

組織より単離後 2、3 日培養後、あるいは siRNA 導入後 48 時間後の Skm-PCs 中にサンプルバッファーを加え、15,000 rpm で 5 分間の遠心分離を行い、上層を別のチューブに移した。このタンパク質抽出物を、SDS を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した後、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色もしくは β -actin の発現量により各サンプル間のタンパク質量が等量となるように調整した。一次抗体として抗 SPARC ウサギポリ

クローナル抗体 (1:1,000)、抗 Cltc ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000)、抗 Rab7 ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000) を PBS-T に希釈して用い、4°C にて一晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら PBS-T で 10 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/PBS-T で 10,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates, AL, USA) および HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories, ME, USA) を用い、室温で一時間反応させた。Biotin 標識ヤギ IgG 抗体を使用した際は、その後 VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) を用いて HRP 標識を行った。PBS-T で 3 回洗浄したのち、ECL Western blotting analysis system により発光させた。画像取得は第一節では X 線フィルム (GE Healthcare, UK) に感光させた後、自動現像機 (SRX-101、コニカ・ミノルタ、東京) により現像した。現像液および定着液(コニカ・ミノルタ、東京) は製造元の推奨する手順に従い作製したものをを用いた。第二節では ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad) により画像を取得したのち、付属の ImageLab ソフトウェアを用いた画像処理により各タンパク質量の定量を行った。

統計処理

数値データは平均値±標準誤差で示した。平均値の比較を、Unpaired Student's t-test を用いて行った。3 群以上の場合は ANOVA で解析した後、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。

第一節 骨格筋前駆細胞群における加齢に伴う SPARC に対する反応性低下

結果

骨格筋前駆細胞群 Skm-PCs における SPARC 発現とその加齢性変化

Skm-PCs に含まれる筋芽細胞ならびに脂肪前駆細胞における SPARC の発現量を調べるため、筋分化、脂肪分化の各段階において SPARC に対する抗体を用いた免疫染色を行った。その結果、筋芽細胞マーカーの MyoD 陽性細胞、脂肪細胞マーカーの C/EBP α 陽性細胞いずれも SPARC を発現していたが、MyoD 陰性、C/EBP α 陰性細胞においても SPARC の発現が認められた (Fig. 2-1-1)。また、筋分化誘導条件下でのミオシン重鎖陽性の筋管細胞、また脂肪分化誘導条件下での Oil Red O 染色陽性の脂肪細胞においても SPARC の発現が認められた一方、MHC 陰性の細胞においても SPARC は発現していた。この結果から、Skm-PCs では、細胞種やその分化段階にかかわらずほぼ全てが SPARC を発現していることが明らかとなった。

この Skm-PCs 自身が発現する SPARC が、Skm-PCs の筋分化・脂肪分化能を調節しており、その発現量が加齢に伴い減少することが Skm-PCs での加齢に伴う筋分化能低下・脂肪分化能亢進を引き起こす可能性を考えた。そこで若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間で SPARC の発現量を比較したところ、両者の間において qPCR (Fig. 2-1-2A)、ウェスタンブロッティング (Fig. 2-1-2B) いずれにおいても有意な発現量の差はみられず、また免疫染色においても SPARC を発現する細胞の割合に違いはみられなかった (Fig. 2-1-2C)。以上の結果から、Skm-PCs 老化に伴う Skm-PCs においてこれまで報告された加齢に伴う筋分化能低下ならびに脂肪分化能の亢進は、Skm-PCs 自身が産生する SPARC 発現量の低下によるものではない可能性が考えられた。

若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs の分化能に対する siSPARC の影響

先の結果を受け、新たな可能性として、SPARC に対する反応性が加齢に伴い低下することで、Skm-PCs における筋分化能低下・脂肪分化能亢進が生じている可能性が考えられる。そこで、若齢および老齢ラット由来の Skm-PCs において自身が産生する内因性の SPARC の発現を抑制した時の分化能に変化が生じるかどうかについて調べた。まず、若齢および老齢ラット由来の Skm-PCs にお

いて SPARC に対する siRNA (siSPARC) を導入したときの発現抑制効果を、mRNA、タンパク質レベルで調べたところ、若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs どちらにおいても siSPARC 群でその発現量が著しく低下した (Fig. 2-1-3)。

次に若齢および老齢ラット由来の Skm-PCs において siRNA 導入により内因性の SPARC 発現を低下させた時の脂肪分化能を調べた (Fig. 2-1-4)。その結果、若齢ラット由来 Skm-PCs では SPARC の発現を抑制すると脂肪分化能が有意に上昇したが、老齢ラット由来 Skm-PCs ではそのような変化が認められなかった。また内因性の SPARC の発現を抑制した時の筋分化能についても調べたところ、脂肪分化能に関して得られた結果と同じように、SPARC 発現抑制による若齢ラット由来の細胞でみられた Myogenin 陽性細胞および MHC 陽性細胞数の減少が、老齢ラット由来の細胞では消失していた (Fig. 2-1-5)。

siSPARC により内因性の SPARC 発現を抑制したうえで培地中へ SPARC を添加し脂肪分化能・筋分化能を定量することで、SPARC に対する反応性ならびにその加齢性変化を評価した (Fig. 2-1-6)。その結果、若齢ラット由来 Skm-PCs においては SPARC を添加することにより脂肪分化が抑制され、筋分化能が亢進したのに対し、老齢ラット由来 Skm-PCs では SPARC 添加による分化能の変化は認められなかった。以上の結果から、加齢に伴い Skm-PCs の SPARC に対する反応性が低下しており、このことが脂肪分化能の亢進ならびに筋分化能低下の一因となっている可能性が示された。

SPARC に対する反応性低下における integrin の関与

SPARC の作用機序の一つとして細胞接着因子である integrin を介したものが知られており (Nie et al., 2008)、脂肪前駆細胞では SPARC が integrin $\alpha 5$ (itga5) と integrin $\beta 1$ (itgb1) 二量体と結合すること、さらに SPARC の脂肪分化抑制作用は integrin $\beta 1$ の細胞内ドメインにより活性が制御される integrin-linked kinase (ILK) を介した経路であるという報告がある (Nie & Sage, 2009)。そこで、Skm-PCs における SPARC の分化調節作用が itga5 を介したものであり、itga5 の発現低下が老齢ラット由来 Skm-PCs でみられた SPARC に対する反応性低下を引き起こす可能性を考えた。まず mRNA の発現量を qPCR により調べた結果、老齢ラット由来 Skm-PCs における itga5 の発現量は若齢のもののおおよそ 50%程度にまで低下していることが判明した (Fig.

2-1-7A)。免疫染色でも同様に、itga5 シグナルが老齢ラット由来 Skm-PCs において低下していた (Fig. 2-1-7B、C)。

Skm-PCs において SPARC の分化調節作用を itga5 が仲介するか若齢ラット由来 Skm-PCs を用いて検討を試みた。まず itga5 に対する siRNA (si-itga5) を導入し、その発現を qPCR ならびに免疫染色により調べたところ、対照群に比べ、50%ほど遺伝子発現が抑制された (Fig. 2-1-8A、B)。次に、Skm-PCs に si-itga5 を導入した条件下でも siSPARC 導入による脂肪分化能の亢進、筋分化能低下が依然として見られるかどうかについて調べた。SPARC を添加しない条件下では、si-itga5 と siSPARC を両方導入した群と si-itga5 単独導入群との間には Oil Red O 染色陽性面積ならびに MHC 陽性細胞の割合に違いは見られなかった (Fig. 2-1-8C、D)。一方、itga5 の発現を si-itga5 により抑制すると同時に SPARC を添加したときの SPARC の脂肪分化抑制作用および筋分化促進作用を調べたところ、脂肪分化抑制作用は itga5 の発現抑制により消失したのに対し、筋分化促進作用に関しては Fig. 2-1-6 に示した結果に比べて減弱はするものの、依然として示されることが明らかとなった (Fig. 2-1-8E、F)。以上の結果から、itga5 は SPARC の脂肪分化抑制作用の大部分を、また筋分化促進作用の一部を仲介しており、この発現量が加齢に伴い低下することで SPARC に対する反応性低下を引き起こす可能性が示された。

考察

本研究により、老齡ラットの Skm-PCs では SPARC の持つ脂肪分化抑制作用・筋分化促進作用に対する抵抗性が生じていることが初めて明らかとなり、これがサルコペニアで見られる骨格筋内の脂肪蓄積や筋萎縮の原因となっている可能性が示された。

SPARC に対する抵抗性については、癌細胞の melanoma 細胞株でも報告があり、SPARC を添加しても癌細胞株の細胞増殖が抑えられないことから、SPARC 抵抗性が癌の悪性化に関与することが示唆されている (Haber et al., 2008)。SPARC は collagen を始めとするニッチを構成する様々な因子と結合し相互作用することがこれまでの研究結果から示されている。しかし、現在のところ、幅広い組織や細胞種で発現している SPARC に対する特異的な受容体の報告はされていない。骨格筋をはじめとする生体組織に広く発現が見られる integrin が SPARC と結合するという知見が得られており (Nie et al., 2008)、integrin を SPARC の作用を介する受容体と考えると、SPARC が全身性に広く生理作用を示すことと一致する。Integrin の中でも、integrin 二量体の $\alpha 5\beta 1$ がヒトの骨格筋初代培養細胞で発現が確認されていること (Blaschuk & Holland, 1994)、また脂肪前駆細胞では SPARC は integrin $\alpha 5$ と $\beta 1$ 鎖は SPARC と結合する一方、 $\alpha 6$ 鎖は結合しないことが報告されている (Nie et al., 2008)。すなわち、integrin $\beta 1$ 鎖と α 鎖によって形成されるもののうち、integrin $\alpha 5\beta 1$ 二量体は SPARC との高い親和性を示す。このことと本研究で得られた結果から、Skm-PCs においては SPARC が integrin $\alpha 5\beta 1$ と結合しそのシグナルを細胞内に伝えることでその作用を発揮しており、SPARC に対する抵抗性はこの integrin $\alpha 5\beta 1$ 二量体が老齡個体由来の Skm-PCs では減少することにより生じていると考えられる。興味深いことに、ヒト線維芽細胞では老化に伴い itga5 の mRNA 量は増加するものの、機能を有する integrin $\alpha 5\beta 1$ 二量体の細胞膜でのタンパク質量が低下するという報告がなされている (Hu et al., 1996)。Skm-PCs における SPARC に対する反応性低下に関して、その作用を仲介する可能性が極めて高い itga5 の分子特性に着目することで、その機序についてさらなる知見が得られると期待される。

本研究では SPARC の筋分化促進作用に関して、加齢に伴うその反応性低下が *itga5* 以外の機構で引き起こされる可能性を示した。*Itga5* 以外に SPARC と相互作用を示す因子として、主にマクロファージにおいて発現が認められる *stabilin-1* とよばれるスカベンジャー受容体が SPARC と高い親和性を持ち、細胞外における SPARC のクリアランスを担っていることが報告されている (Kzhyshkowska et al., 2006)。ただし、この受容体の発現はマクロファージや類洞内皮細胞に限られるとされており (Kzhyshkowska, 2010)、*Skm-PCs* における SPARC 抵抗性が *stabilin-1* を介している可能性は低いと考えられる。その他、第一章であげた *endoglin* について、 $TGF\beta$ もまた筋分化に深く関与する重要な因子であることから、その関与が *Skm-PCs* においても十分に考えられる。また、これとは別に、SPARC が白血球において血管内皮細胞接着因子 VCAM-1 と結合するという報告が挙げられる (Kelly et al., 2007)。興味深いことにこの VCAM-1 に関しては筋芽細胞株である C2C12 において発現が認められ、VCAM-1 に対する中和抗体を加えたところその筋管形成が抑制されたことから、筋分化を促進する役割を担う因子であることが考えられる (Rosen et al., 1992)。この VCAM-1 は筋衛星細胞のマーカーとしても使用されており (Yin et al., 2013)、*Skm-PCs* 中に含まれる筋衛星細胞由来の筋芽細胞がこの筋分化を担っていることを鑑みると、この VCAM-1 と SPARC の相互作用が *Skm-PCs* においても認められるか明らかにすることが、SPARC の筋分化調節作用に関する新たな知見につながると期待される。

今回、培地中へ SPARC 添加し、その脂肪分化抑制作用が発現するためには 20 $\mu\text{g/ml}$ という比較的高濃度の SPARC が必要であった。FGF とヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) との結合に見られるように、細胞周囲で網目状に存在する ECM は成長因子や骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein, BMP)、Wnt といった液性因子と複合体を形成している (Clark, 2008; Dityatev et al., 2010)。さらに、Rentz らの研究結果は SPARC も ECM に存在する collagen I、III、IV と結合しており、線維芽細胞から分泌された SPARC は細胞周囲の collagen の安定性を高め、SPARC が細胞表面と collagen 分子間で作用することを示唆している (Rentz et al., 2007)。以上のことから、*Skm-PCs* 自身から産生された SPARC は分泌直後に何らかの機構により *Skm-PCs* 周囲の ECM に結合しトラップされることで細胞と ECM 間

の局所においてその作用を示すのに対し、外から添加した SPARC の大部分は培養液中に拡散してしまい、ECM に結合して Skm-PCs 周囲の局所で作用を示す SPARC はほんの一部である可能性が考えられる。そのため外からの添加した SPARC の作用が表れるためには高濃度の添加が必要であったのではないかと推察される。

以上、第一章の結果と合わせると以下の仮説が考えられる。老化とともに骨格筋内における SPARC の発現量が減少する。また、Skm-PCs においても *itga5* の発現量が低下することにより SPARC に対する抵抗性を生じる。この2つが相加的に働くことで Skm-PCs における SPARC の作用が減弱し、筋分化能の低下、脂肪分化能の亢進が引き起こされる。このような Skm-PCs の変化が筋の萎縮や脂肪蓄積といったサルコペニアで見られる骨格筋内の加齢性変化を引き起こす。

そこで本章第二節では、*itga5* の分子特性に着想を得、SPARC 反応性低下の機序に関して SPARC の内在化機構に着目しさらなる解析を行った。

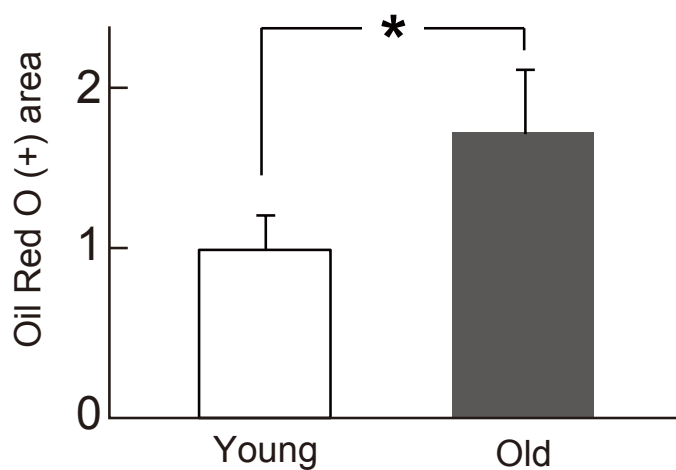
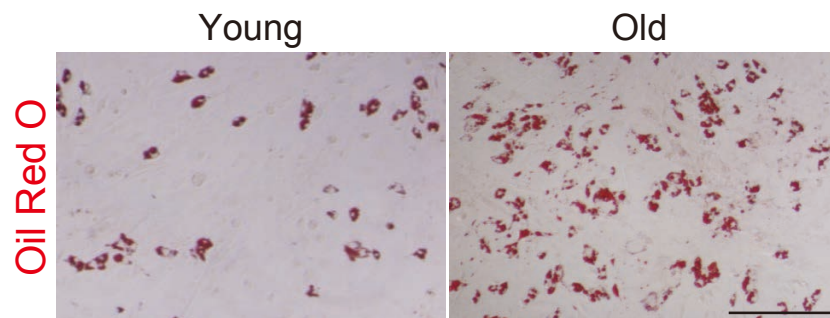


Fig. 2-0 若齢、老齢ラット由来 Skm-PCs における脂肪分化能

若齢および老齢ラット骨格筋より Skm-PCs を単離し、脂肪分化誘導後 Oil Red O 染色により脂肪分化能を評価した。上の写真が Oil Red O 染色像で、それを定量したものが下のグラフである。Scale bar = 500 μm 。n = 3。*: p < 0.05。

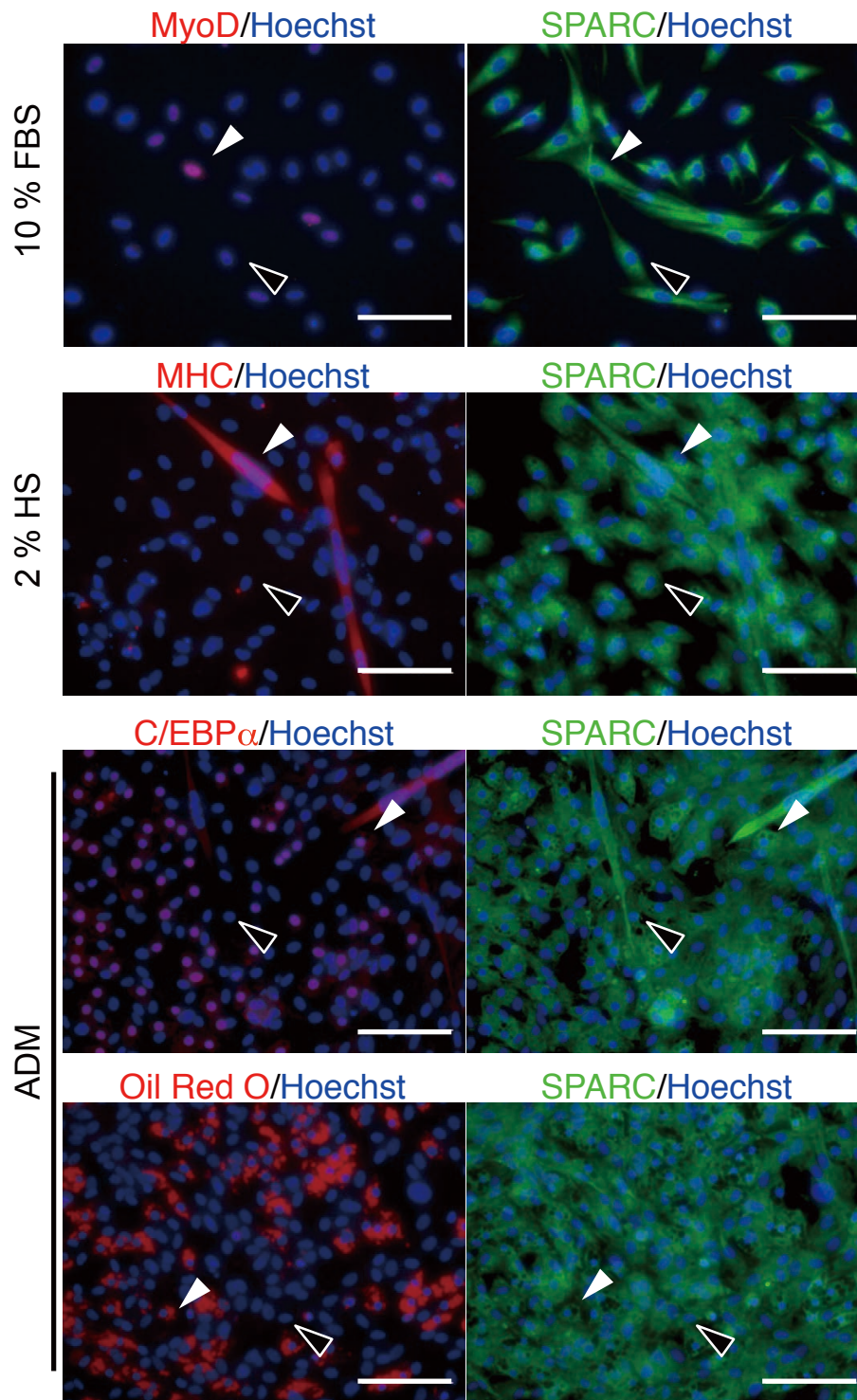


Fig. 2-1-1 Skm-PCs における SPARC の発現

若齢ラット由来 Skm-PCs において通常培養時、筋分化誘導時および脂肪分化誘導時 (ADM) において SPARC の発現を免疫染色により評価した。白矢頭は左写真上記に赤字で示した筋芽細胞マーカー (MyoD、MHC) あるいは脂肪細胞マーカー (C/EBP α 、Oil Red O) 陽性細胞を、黒矢頭は陰性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。

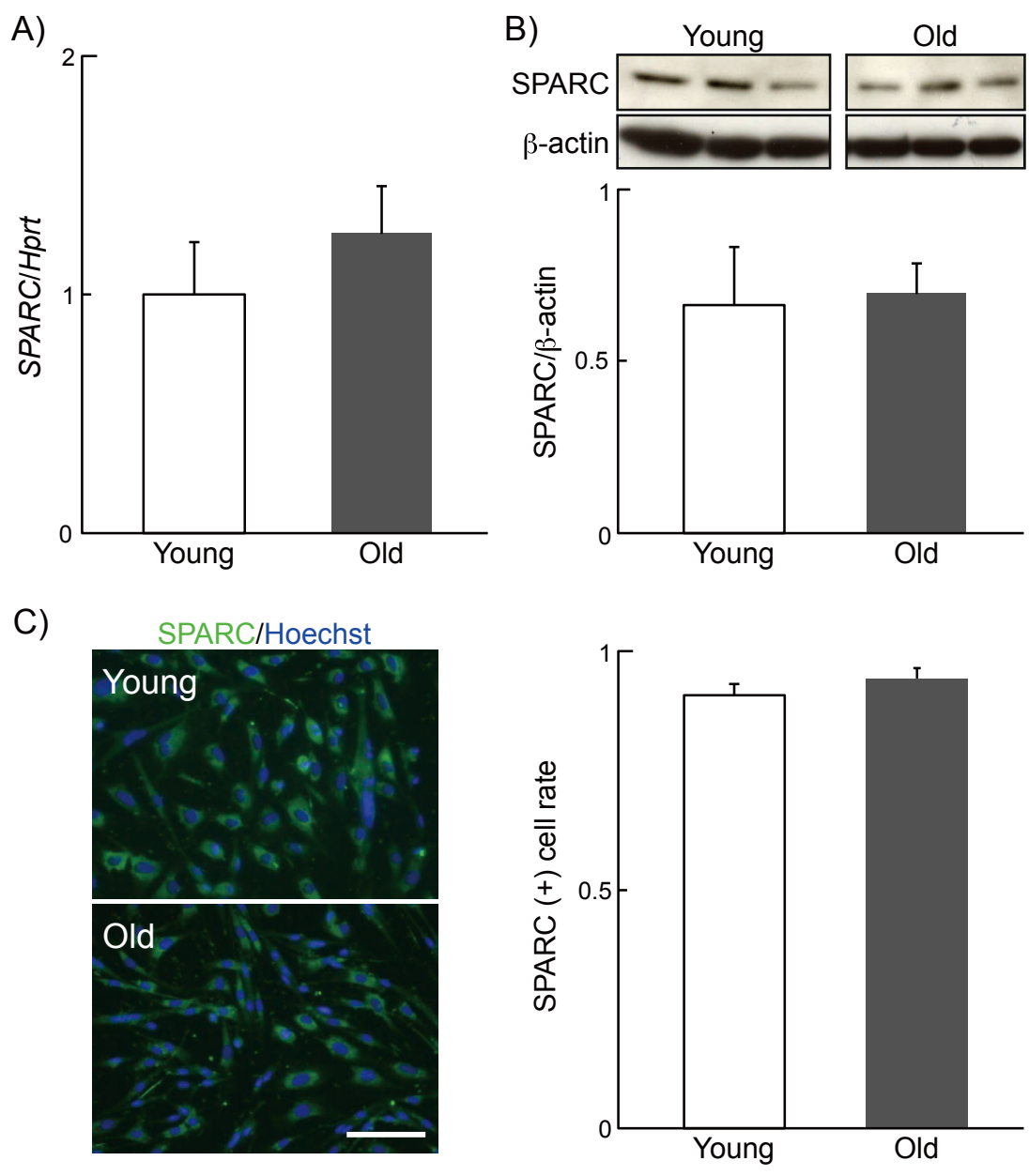


Fig. 2-1-2 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間における SPARC 発現量の比較

若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs において SPARC の発現量を qPCR (A)、ウェスタンブロット (B) および免疫染色 (C) により評価した。Scale bar = 100 μ m。A: n = 4、B、C: n = 3。

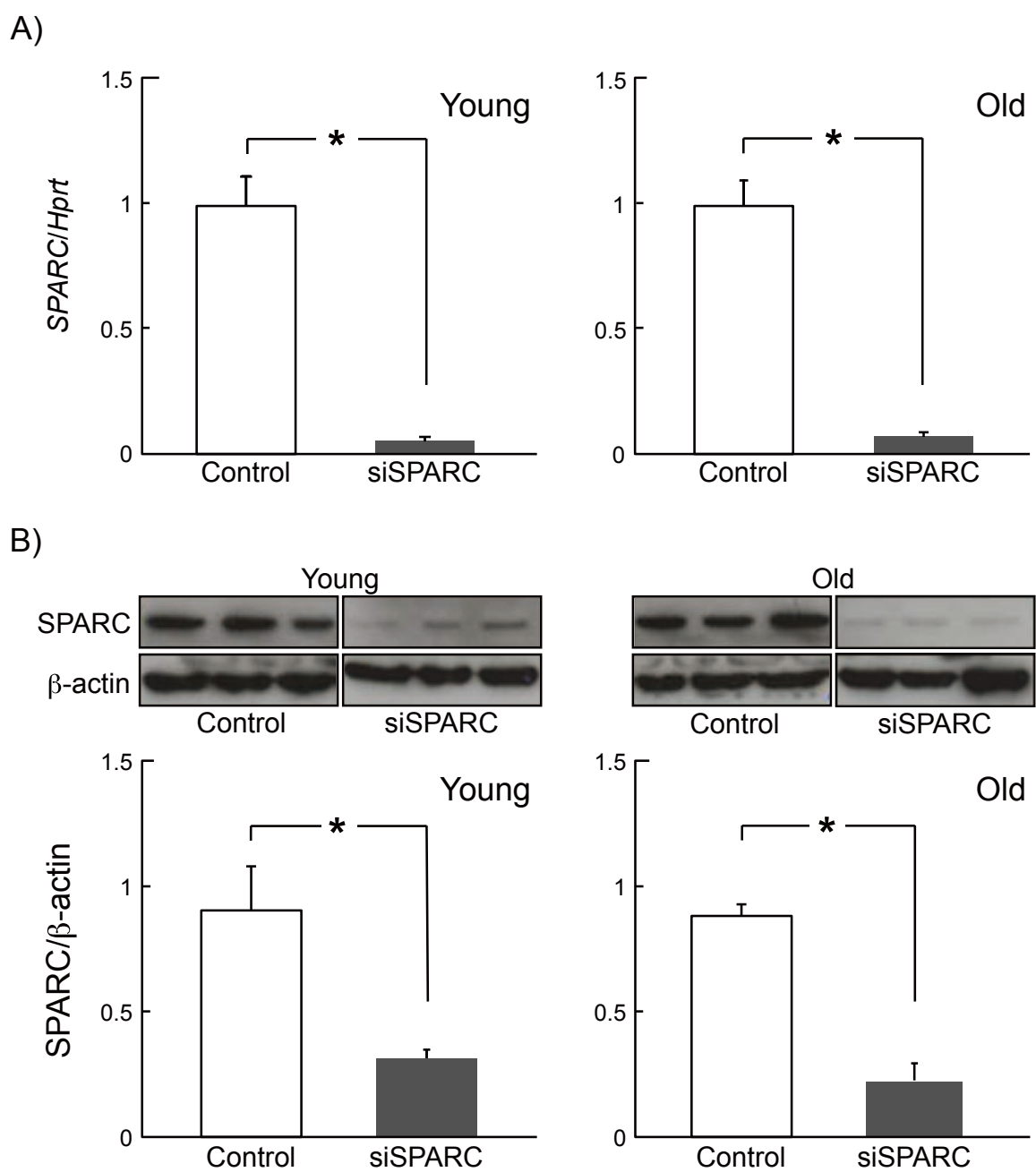


Fig. 2-1-3 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs における siRNA による SPARC 発現抑制効果

若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs において SPARC に対する siRNA 導入 2 日後に SPARC の発現量を qPCR (A) およびウェスタンブロット (B) により評価した。

A: n = 4、B: n = 3。*: p < 0.05。

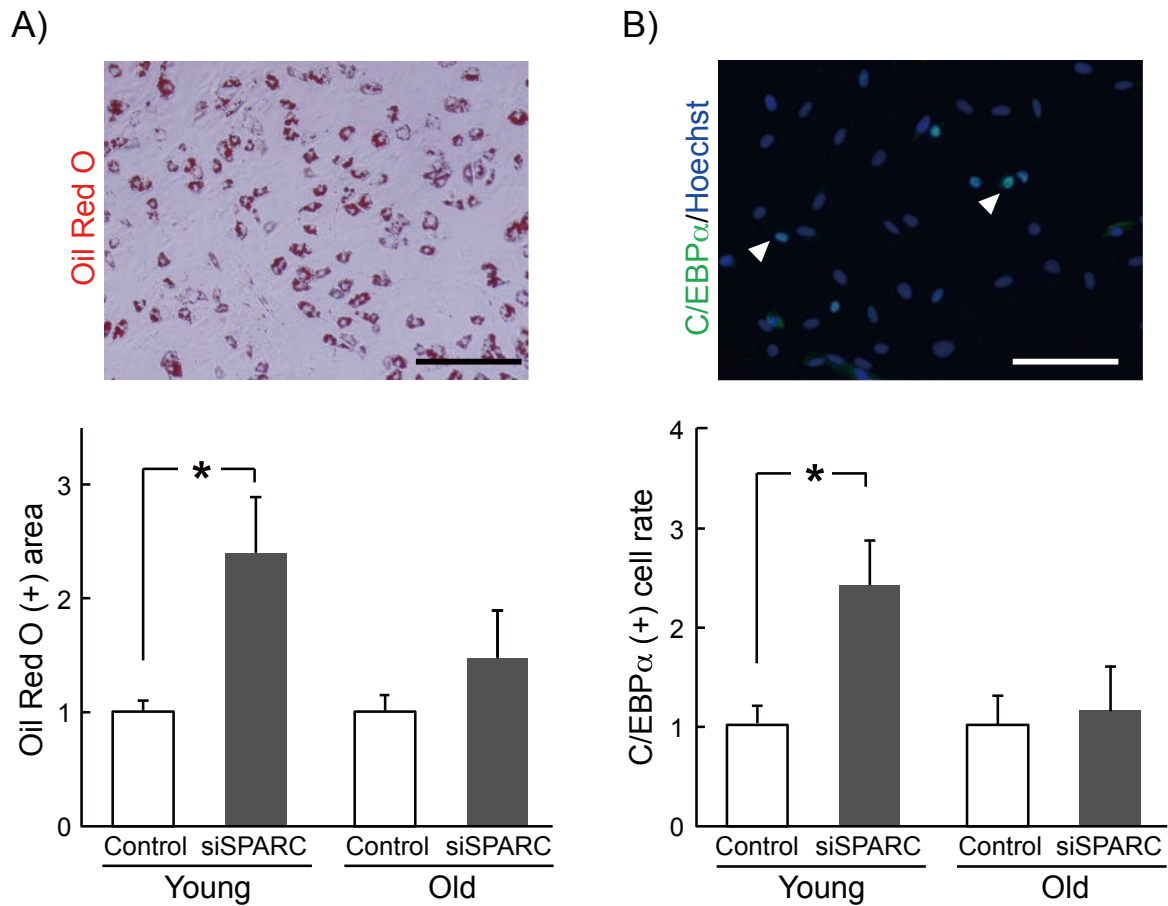


Fig. 2-1-4 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs における SPARC 発現抑制時の脂肪分化能の変化

若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs において siRNA により内因性の SPARC の発現を抑制した時の脂肪分化能を Oil Red O 陽性面積 (A) および C/EBP α 陽性細胞数 (B) により評価した。白矢頭は C/EBP α 陽性細胞を示す。Scale bar = 200 (A)、100 (B) μm 。n = 4。*: p < 0.05。

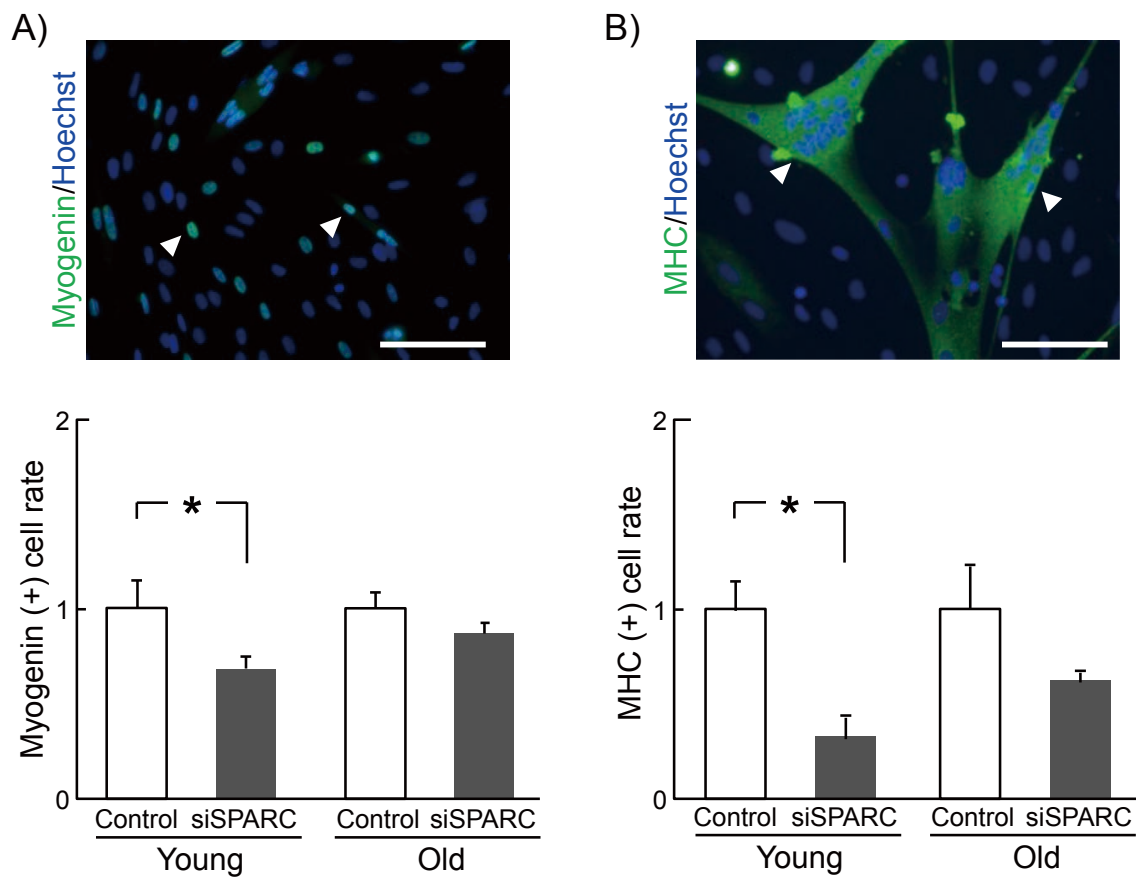
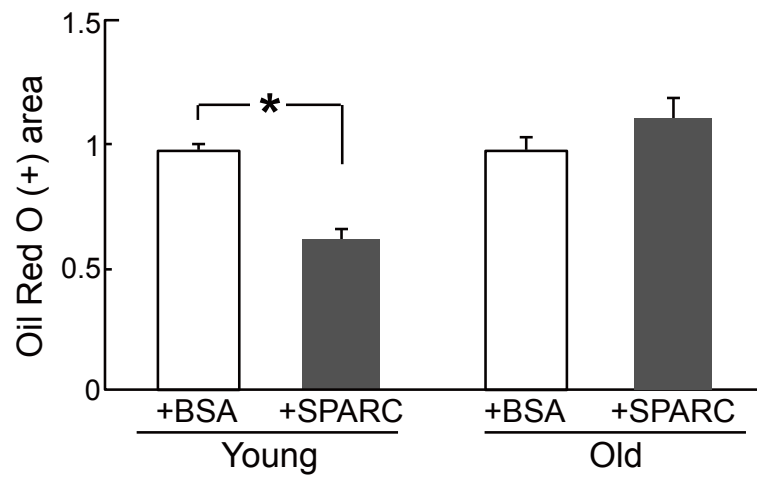


Fig. 2-1-5 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs における SPARC 発現抑制時の筋分化能の変化

若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs において siRNA により内因性の SPARC の発現を抑制した時の筋分化能を Myogenin(A) および MHC(B) 陽性細胞数により評価した。白矢頭は Myogenin あるいは MHC 陽性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。n = 4。*: p < 0.05。

A)



B)

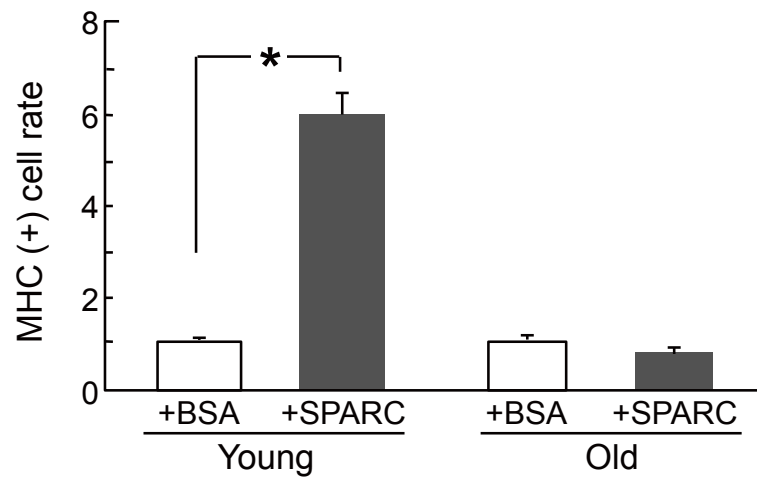


Fig. 2-1-6 老齡ラット由来 Skm-PCs における SPARC に対する反応性低下

若齡および老齡ラット由来 Skm-PCs において siRNA により内因性の SPARC の発現を抑制した後、培地中にリコンビナント SPARC を添加した時の脂肪分化能 (A) および筋分化能 (B) を評価した。

n = 3。*: p < 0.05。

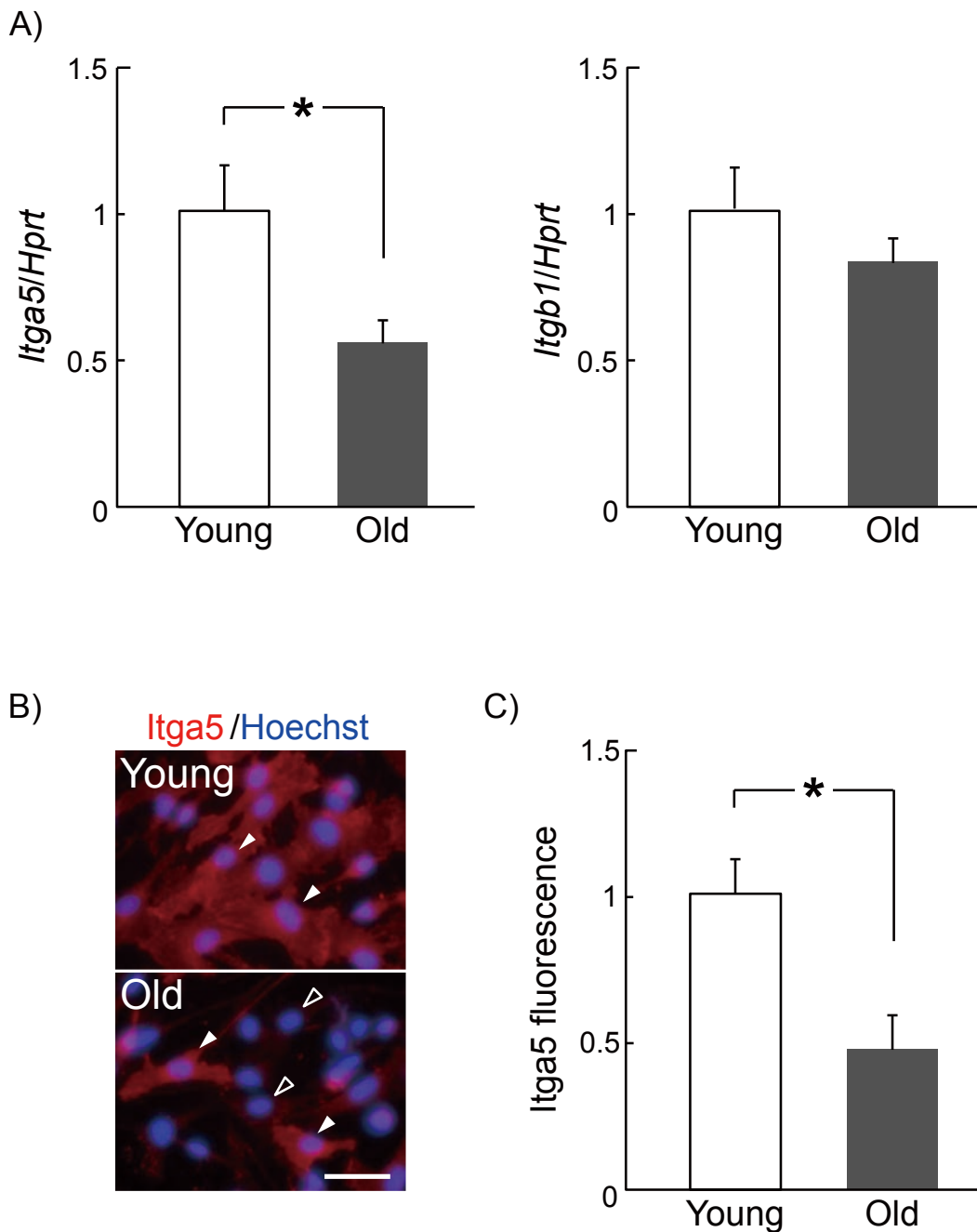


Fig. 2-1-7 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間における integrin $\alpha 5$ 発現量の比較

(A) Integrin $\alpha 5$ (*itga5*) および integrin $\beta 1$ (*itgb1*) の発現量を qPCR により若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間で比較した。(*itga5*: young; $n = 4$, old; $n = 6$, *itgb1*: $n = 4$)。*: $p < 0.05$ 。免疫染色により *itga5* の発現量を若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間で比較した。(B) がその写真で、それを定量したグラフを (C) に示した。白矢頭が *itga5* 強発現細胞を、黒矢頭が弱発現細胞を示す。Scale bar = 100 μm 。 $n = 3$ 。*: $p < 0.05$ 。

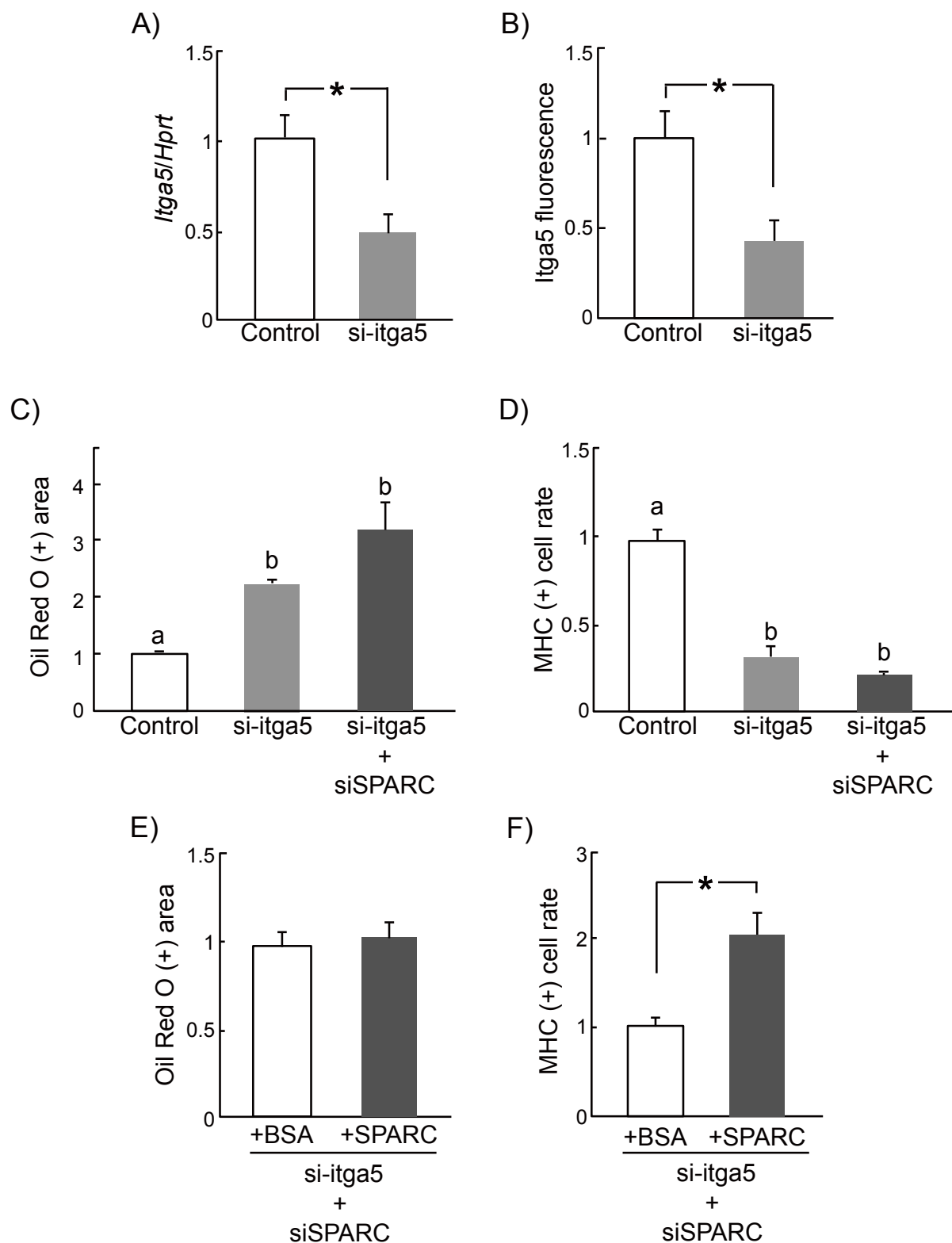


Fig. 2-1-8 SPARCの分化調節作用における integrin $\alpha 5$ の関与

若齢ラット Skm-PCsにおいて *itga5* に対する siRNA を導入後 qPCR (A) および免疫染色 (B) によりその発現抑制効果を確認した。n = 3。*: p < 0.05。Itga5 および SPARC に対する siRNA を導入後、脂肪分化能 (C) および筋分化能 (D) を評価した。同符号間に有意差はない。itga5 および SPARC に対する siRNA を導入後、培地中に SPARC タンパク質を添加し、このときの脂肪分化能 (E) および筋分化能 (F) を評価した。n = 3。*: p < 0.05。

第二節 骨格筋前駆細胞群における SPARC の内在化機構とその SPARC 抵抗性への関与

結果

Skm-PCs における SPARC の内在化

前節において SPARC 抵抗性に関して *itga5* の発現低下による可能性が示された。Integrin は ECM 受容体として細胞と ECM 間の相互作用を仲介する重要な因子であるが、この integrin には細胞内へと内在化される機構が存在し、この内在化がラット骨髄由来間葉系幹細胞の分化能調節の重要な制御機構となっている (Du et al., 2011)。SPARC が *itga5* のリガンドの一つと考えると、SPARC における Skm-PCs の分化調節作用に *itga5* との相互作用による SPARC の内在化機構が関与する可能性が高い。

そこで、Skm-PCs において SPARC が内在化する機構が存在するかどうかを、Alexa 蛍光色素で標識した SPARC (Alexa-SPARC) を用いて検討した (Fig. 2-2-1)。その結果、培地中へ添加した Alexa-SPARC は Skm-PCs の細胞内へと取り込まれることが判明した (Fig. 2-2-1A)。その後時間とともに Skm-PCs における蛍光強度が減弱したことから、取り込まれた SPARC が分解あるいは排除されたことが推察される。Alexa-SPARC が核周囲に局在を示すことから、細胞内へ取り込まれたことを予想したが、これを確証するため、Alexa-SPARC を取り込ませた後、界面活性剤により細胞膜を易透化したもの (permeabilized) とそうでないもの (non-permeabilized) に対して SPARC に対する抗体を用いた免疫染色を行った (Fig. 2-2-1B)。その結果、易透化していないものでは細胞内に取り込まれた Alexa-SPARC が SPARC に対する抗体による染色性を示さなかったのに対し、易透化したものでは Alexa-SPARC が SPARC に対する抗体により染色された。共焦点顕微鏡によっても同様の結果が得られたことから (Fig. 2-2-1C)、Skm-PCs において SPARC は細胞内へと内在化する機構が存在することが明らかとなった。

この SPARC の内在化機構が SPARC 特異的であるかどうか確認するため、Alexa-SPARC と非標識 SPARC とを同時に添加し、蛍光標識 SPARC の取り込みが非標識 SPARC により競合するか検討した (Fig. 2-2-2)。その結果、蛍光標識した SPARC の取り込みは、当量あるいは 4 倍量の非標識 SPARC により抑

制された。このことから、Skm-PCsにおける SPARC の内在化は SPARC に特異的な経路を介したものである可能性が示された。

この SPARC の内在化が、加齢に伴い変化するのかどうか調べるため、若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs の培地中に Alexa-SPARC を添加した (Fig. 2-2-3)。その結果、老齢ラット由来 Skm-PCs では若齢に比べ SPARC の内在化が亢進していることが判明した。このことから、前節でみられた SPARC 抵抗性とこの加齢に伴う SPARC 内在化亢進との関連性を考え、以下でその検証を試みた。

SPARC 内在化における itga5 の関与

SPARC の内在化が、前節で示された SPARC の分化能調節作用を仲介する itga5 を介した経路であるか検討するため、Alexa-SPARC を添加した後、itga5 に対する抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 2-2-4)。その結果、内在化した SPARC は itga5 と局在が一致することが明らかとなった。この SPARC の内在化における itga5 の役割を検証するため、itga5 の発現を siRNA により抑制した時の SPARC 取り込み量の変化を調べた (Fig. 2-2-5)。まず itga5 に対する siRNA (si-itga5) の有効性を qPCR および免疫染色により評価したところ、mRNA (Fig. 2-2-5B) ならびにタンパク質 (Fig. 2-2-5A,C)いずれの場合においても si-itga5 導入群で itga5 発現量が抑制されていた。このとき、SPARC の取り込みは対照群に比べ si-itga5 導入群で顕著に減少した (Fig. 2-2-5D)。共焦点顕微鏡においても si-itga5 導入群で itga5 発現量ならびに SPARC 内在化の抑制が確認できた (Fig. 2-2-5E)。以上の結果から、SPARC は itga5 を介して細胞内へと取り込まれることが明らかとなった。

Clathrin 依存性エンドサイトーシス経路による SPARC 内在化

Integrin が細胞内へと内在化する経路には、macropinocytosis (Gu et al., 2011)、clathrin 依存性 (Ezratty et al., 2009) および caveolin 依存性エンドサイトーシス経路が報告されている (Caswell & Norman, 2006)。そこで、SPARC がこのいずれの経路において内在化されるか検討するため、macropinocytosis に必須の制御因子である brefeldinA-ADP ribosylated substrate (BARS、Liberali et al., 2008; Haga et al., 2009; Gu et al., 2011)と、clathrin heavy chain (Cltc) ならびに caveolin1 (Cav1) に対する siRNA を導入し、そのときの

SPARC 内在化量を定量した (Fig. 2-2-6)。それぞれの siRNA の有効性を qPCR により確認した後 (Fig. 2-2-6A)、Alexa-SPARC を培地中へ添加したところ、BARS および Cav1 を抑制した群では対照群との違いはみられなかったものの、Cltc の発現を抑制した時 SPARC 取り込み量は著しく減少した (Fig. 2-2-6B、C)。以上の結果から、SPARC は Clathrin 依存性エンドサイトーシス経路により Skm-PCs の細胞内に取り込まれることが明らかとなった。

内在化 SPARC が示す Rab7 陽性後期エンドソームへの局在

内在化した SPARC がどのエンドソームに輸送されるのかを調べるため、初期エンドソームマーカーである Rab5、後期エンドソームのマーカーである Rab7 およびリサイクルエンドソームマーカーである Rab11 に対する抗体を用いて免疫染色を行った (Fig. 2-2-7)。その結果、Rab5 (Fig. 2-2-7A) や Rab11 (Fig. 2-2-7C) に比べ、Rab7 と内在化した SPARC が局在の一致を示した (Fig. 2-2-7B)。SPARC とエンドソームマーカーとの局在の一致を定量したところ、Alexa-SPARC 添加 2 時間後では、SPARC は Rab5 および Rab7 と共局在し、12 時間後に大部分が Rab7 陽性エンドソームへと局在することが判明した (Fig. 2-2-7D)。共焦点顕微鏡でも同様の結果が得られたことから (Fig. 2-2-8)、Skm-PCs に取り込まれた SPARC はその後 Rab7 陽性の後期エンドソームへと輸送されると考えられた。

加齢に伴う SPARC 内在化の亢進と SPARC 抵抗性

そこで、SPARC の内在化が前節でみられた加齢に伴う SPARC に対する反応性低下に関与するか検討するため、筋芽細胞マーカーである MyoD に対する抗体を用いた免疫染色により、Skm-PCs 中の筋芽細胞ならびに脂肪前駆細胞のいずれにおいて SPARC 内在化の亢進が起こるのかを検討した (Fig. 2-2-9)。本実験の手法では Skm-PCs 中には MyoD 陽性の筋芽細胞以外のものも含まれるが、その大部分が脂肪前駆細胞であることが分かっている (Takegahara et al., 2014)。その結果、MyoD 陽性細胞に関して若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間に SPARC 内在化量に違いはみられなかったものの、MyoD 陰性の細胞においては老齢由来の細胞において SPARC の内在化が亢進していた。このことから、加齢に伴う SPARC 内在化の亢進は筋芽細胞ではなく脂肪前駆細胞に生じている可能性が考えられた。

次に SPARC の内在化に関与する Cltc ならびに Rab7 についてその発現量を若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs 間で比較した (Fig. 2-2-10)。その結果、Cltc の発現量に関して、若齢に比べ老齢ラット由来 Skm-PCs は増加傾向を示すのに対し (Fig. 2-2-10A)、Rab7 の発現量は老齢ラット由来 Skm-PCs において低下することが明らかとなった。この Cltc の発現増加ならびに Rab7 の発現低下が筋芽細胞、脂肪前駆細胞どちらで生じるのか、MyoD との共免疫染色により検討した (Fig. 2-2-11)。その結果、老齢ラット由来 Skm-PCs 中の MyoD 陰性細胞において、Cltc 発現量の増加ならびに Rab7 の発現量低下がみられたことから、加齢に伴う SPARC 内在化亢進を引き起こす内在化関連因子の発現変化は脂肪前駆細胞に生じていることが示唆された。

筋芽細胞においては SPARC 内在化亢進がみられなかったため、この SPARC 内在化の亢進が SPARC の脂肪分化抑制作用に対する反応性低下を引き起こす可能性を考えた。そこで、SPARC の脂肪分化抑制作用における、SPARC 内在化関連因子の Cltc ならびに Rab7 の役割について、若齢ラット由来 Skm-PCs を用い、siRNA により Cltc ならびに Rab7 を抑制した時の SPARC の脂肪分化抑制作用への影響を検証した。Cltc ならびに Rab7 を siRNA で抑制した時の有効性を確認したところ、Cltc に関してはタンパク質レベルで、Rab7 に関しては mRNA、タンパク質レベルで siRNA による顕著な抑制効果が確認された (Fig. 2-2-12)。Cltc に対する siRNA を導入した後、SPARC の脂肪分化抑制作用を調べたところ、通常添加する濃度の半分の濃度 (10 $\mu\text{g/ml}$) では SPARC の脂肪分化抑制作用は強くみられないものの、Cltc の発現抑制によりその作用が増強され、有意な差として現れた (Fig. 2-2-13)。一方、Rab7 を抑制した際には SPARC の脂肪分化抑制作用が減弱する結果が得られた (Fig. 2-2-14)。以上の結果から、SPARC の脂肪分化抑制作用を、Cltc は減弱し、Rab7 は促進する役割を担い、加齢に伴い Cltc の発現量が増加し Rab7 の発現量が減少することが SPARC の脂肪分化抑制作用の低下を招く可能性が明らかとなった。

考察

前節では SPARC が Skm-PCs において筋分化促進作用および脂肪分化抑制作用を示すこと、さらにこれら筋分化・脂肪分化双方に対する SPARC の作用には加齢に伴うその反応性の低下がみられることを示した。本節では Skm-PCs における *itga5* を介した SPARC の内在化とその加齢に伴う亢進を示したが、この内在化の亢進は Skm-PCs 中の筋芽細胞マーカーである MyoD 陽性の細胞ではみられなかった。このことから、SPARC の筋分化促進作用に対する反応性低下は筋芽細胞における SPARC の内在化亢進によるものではないと考えられたが、この点について詳細は総括で述べたい。一方、MyoD 陰性細胞では SPARC 内在化の亢進、Clathrin の発現増加ならびに Rab7 の発現減少がみられたことから、MyoD 陰性細胞中で大部分を占める脂肪前駆細胞において SPARC 内在化に参与する因子の発現が変化し SPARC の内在化が亢進することで、SPARC の脂肪分化抑制作用に対する反応性低下を示すようになると思われた。

本節では *itga5* を介した経路で SPARC が Skm-PCs 内へと内在化することを明らかにした。他のグループの先行研究では SPARC がマクロファージにおいてスカベンジャー受容体の一つである *stabilin-1* を介して細胞内へと取り込まれることが示されている (Kzhyshkowska et al., 2006)。このことから、マクロファージにより細胞外の SPARC が除去されるものと推察されるが、マクロファージに取り込まれた SPARC はその後 Rab7 陽性のエンドソームへと輸送されることも示されており、この知見は本節で得られた結果と一致する。また、SPARC は線維芽細胞においても ECM 構成要素である collagen や vitronectin、また *itga5* のリガンドである fibronectin とともに積極的に内在化され、同時に SPARC が既存の ECM の分解を促進することが報告されている (Chlenski et al., 2011)。本節においても SPARC 内在化機構が SPARC の脂肪分化調節作用を制御する機構であることを示した。これらの知見を合わせると、SPARC の内在化は単に細胞外の SPARC を除去するだけでなく、SPARC が持つ様々な生理作用の発現において重要な役割を担っている可能性が考えられる。

Clathrin は上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) や Wnt をはじめ、様々なリガンド依存性エンドサイトーシス経路を制御するが (Disanza et al.,

2009)、その役割は両者において異なっている。Wnt3a の作用は clathrin の発現抑制により減弱されることから、Wnt シグナルは細胞内へと内在化されたエンドソームの状態を入力されると考えられる (Blitzer & Nusse, 2006)。その一方で clathrin 依存性エンドサイトーシスを仲介する Dynamin の発現欠損・消失は EGF シグナルを増強する (Sousa et al., 2012)。このことから EGF に関して clathrin は EGF を細胞内へと内在化することで EGF による細胞へのシグナルの入力を終わらせる役割を持つことが考えられる。今回、SPARC に関しては clathrin の発現抑制によりその作用が増強される結果が得られたことから、SPARC の作用もまた EGF と同様に、エンドサイトーシスにより終結するものと思われる。Clathrin は integrin の制御因子としても知られており、clathrin の発現抑制は細胞表面上の itga5 の量を増加させることが示されている (Moravac et al., 2012)。加齢に伴い Skm-PCs でみられた clathrin の発現増加は SPARC の脂肪分化抑制作用の終結を促進するだけでなく、細胞表面上の itga5 の量を減少させ、SPARC に対する反応性低下に寄与しているのかもしれない。

本研究では Rab7 が内在化した SPARC と共局在を示し、Rab7 が SPARC の脂肪分化抑制作用を発揮する上で必要な因子であることを示した。

Dominant-negative Rab7 を用いた実験により、Rab7 が早期エンドソームから後期エンドソームへの物質の細胞内輸送を制御する因子であること (Feng et al., 1995; Press et al., 1998)、また、Rab7 が後期エンドソームとリソソームとの融合に重要な役割を担う因子であることが知られている (Bucci et al., 2000)。一方で別の報告では、細胞内に取り込まれた膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (membrane type matrix metalloproteinase, MT-MMP) 1 が再び細胞表面上へと輸送される際に Rab7 を介してリサイクルされることが示された (Williams & Coppolino, 2011)。興味深いことに、MT-MMP1 と itga5 とが MT-MMP1 のエンドサイトーシス時に共局在かつ共輸送されていることも示されている。以上の知見ならびに本節で得られた結果から、Rab7 は後期エンドソームから細胞表面上へと分子をリサイクルする際にそれを促進する役割を担う可能性が考えられる。もしこれが事実であれば、itga5 もまたこの Rab7 によってリサイクルされる可能性が高い。

以上、本節の研究から考えられる可能性を Fig. 2-2-15 に示した。SPARC の反応性低下に関して、若齢個体における Skm-PCs では細胞表面上の itga5 と結合した SPARC が itga5 を通じて脂肪分化抑制作用を発揮し、その後 Clathrin により細胞内へと内在化されることで、SPARC の脂肪分化抑制作用が減弱される。その後、Rab7 が SPARC とともに内在化された itga5 を細胞表面上へとリサイクルすることで、SPARC に対する反応性を回復させる。一方、老齢個体の Skm-PCs では itga5 の発現量が減少することに加え、Clathrin による内在化が亢進しているため、細胞表面上から入力される SPARC の脂肪分化抑制作用が低下する。さらに Rab7 の発現量が低下することで itga5 のリサイクルが減少し、SPARC への反応性回復が十分に行われな可能性が考えられる。このことから、老齢個体で低下した SPARC の作用を回復させるには、骨格筋における SPARC の発現量を維持するだけでなく、SPARC に対する反応性を回復させる必要があり、またその回復には SPARC の受容機構だけでなくその後の細胞内内在化機構に着目する必要があることを示唆するものとする。

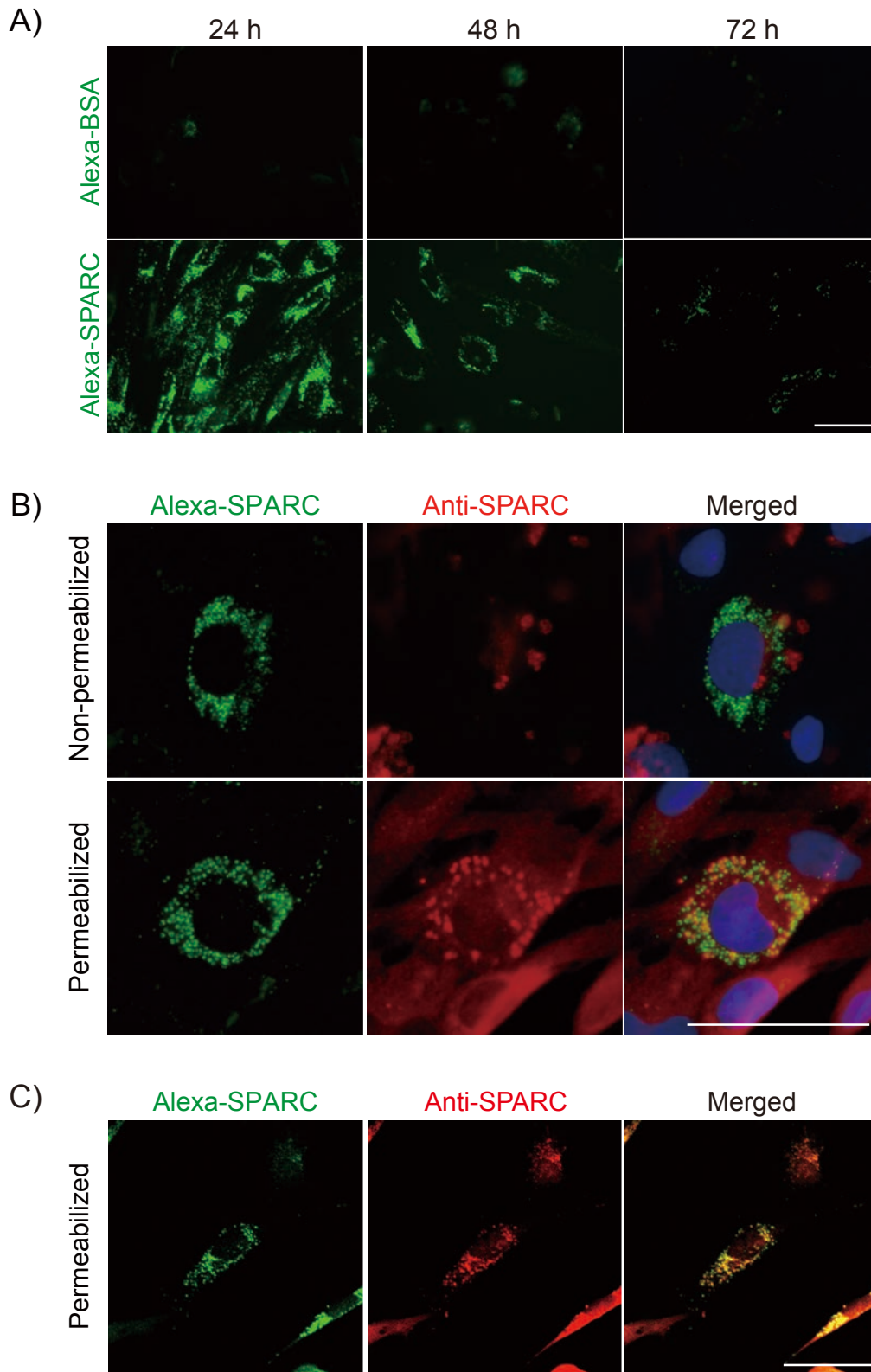


Fig. 2-2-1 Skm-PCs 間における SPARC の内在化

(A) 若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した BSA ならびに SPARC を培地中に添加後、24、48、72 時間後に画像を取得した。Scale bar = 50 μm 。

(B) 若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加後、膜の易透化の有無の条件下において SPARC に対する抗体による染色性を調べた。Scale bar = 50 μm 。

(C) 若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加後、膜の易透化条件下で SPARC に対する免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により画像を取得した。

Scale bar = 40 μm 。

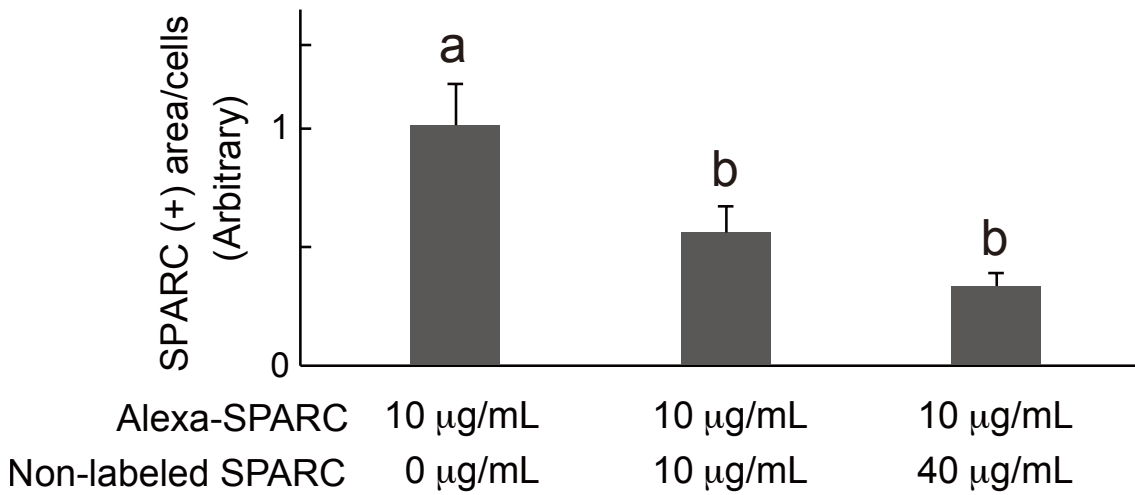
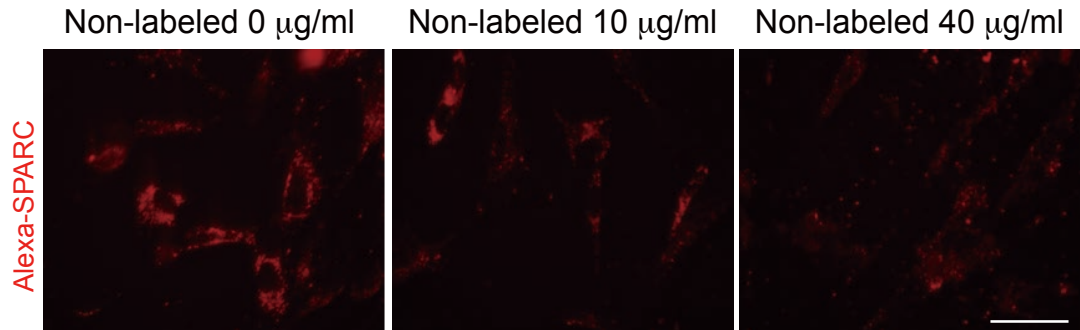


Fig. 2-2-2 非標識 SPARC による SPARC 内在化の競合

若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加した際、同時に非標識 SPARC を添加したときの内在化した蛍光標識 SPARC の量を調べた。Scale bar = 50 μm 。n = 10 cells。同符号間に有意差はない。

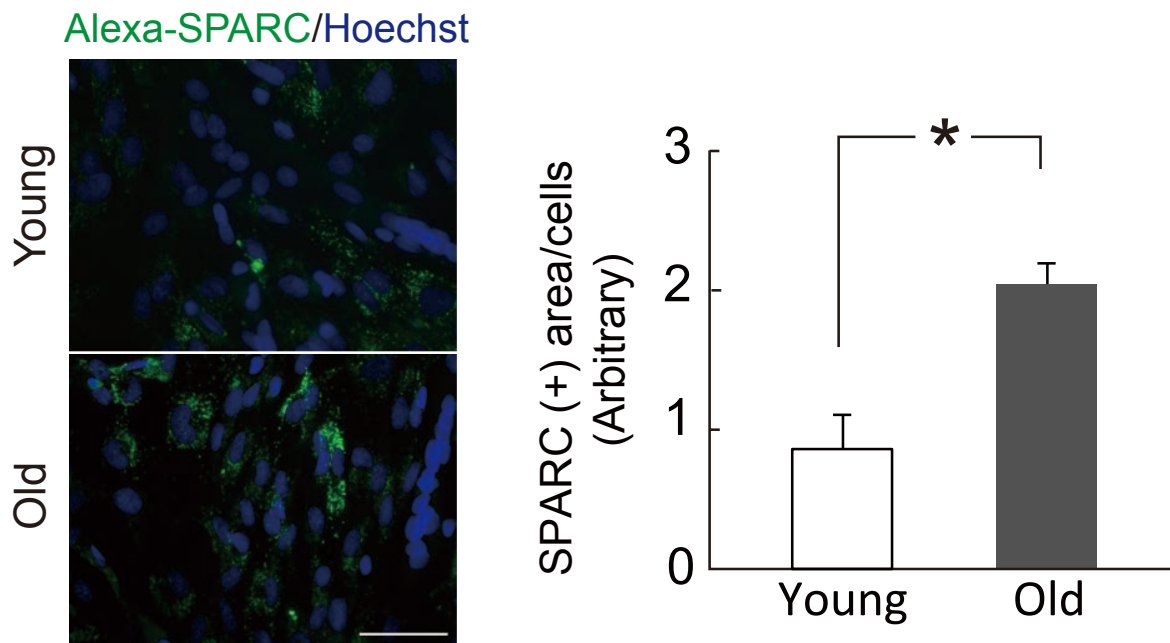


Fig. 2-2-3 若齢および老齢ラット Skm-PCs 間における SPARC 内在化量の比較

若齢および老齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加し、SPARC の内在化量を定量した。Scale bar = 50 μm 。n = 3。*: p < 0.05。



Fig. 2-2-4 SPARC 内在化における integrin $\alpha 5$ の関与
若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加した後、
integrin $\alpha 5$ (itga5) に対する抗体を用い、免疫染色を行った。

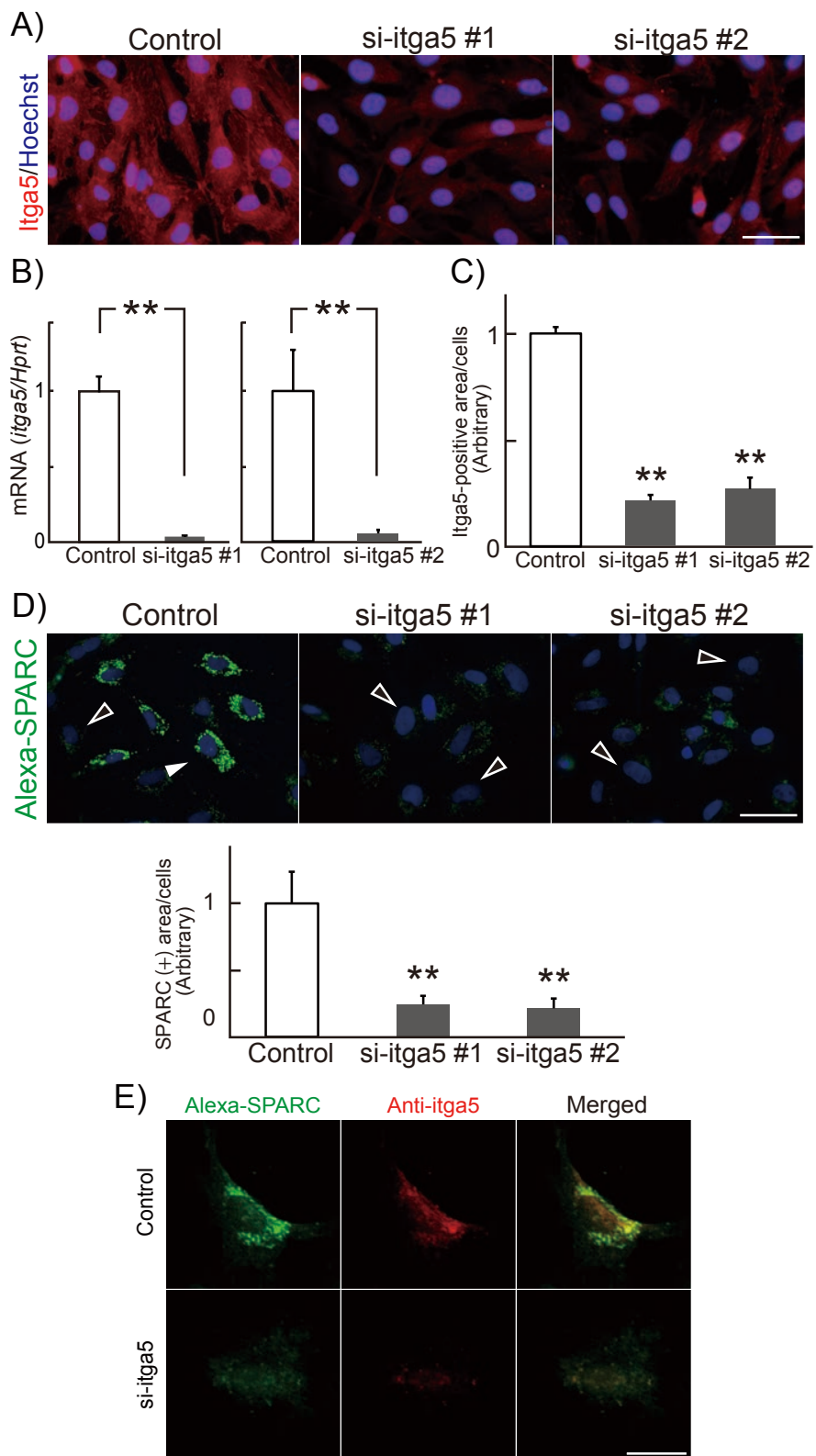


Fig. 2-2-5 Integrin $\alpha 5$ を介した SPARC の内在化

若齢ラット Skm-PCs において itga5 に対する siRNA を導入し、その時の発現量を免疫染色 (A、C) および qPCR (B) により評価した。免疫染色像を (A) に、それを定量したグラフを (C) に示す。

n = 3。**: p < 0.01。Scale bar = 50 μ m。

(D) 若齢ラット Skm-PCs において itga5 に対する siRNA を導入した後、蛍光標識した SPARC を培地中に添加し、SPARC の内在化量を調べた。白矢頭は SPARC 内在化を強く示す細胞を、黒矢頭は弱く示す細胞を表す。

n = 10 cells。**: p < 0.01。Scale bar = 50 μ m。

(E) 若齢ラット Skm-PCs において蛍光標識した SPARC を培地中に添加し、itga5 に対する免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により画像を取得した。Scale bar = 20 μ m。

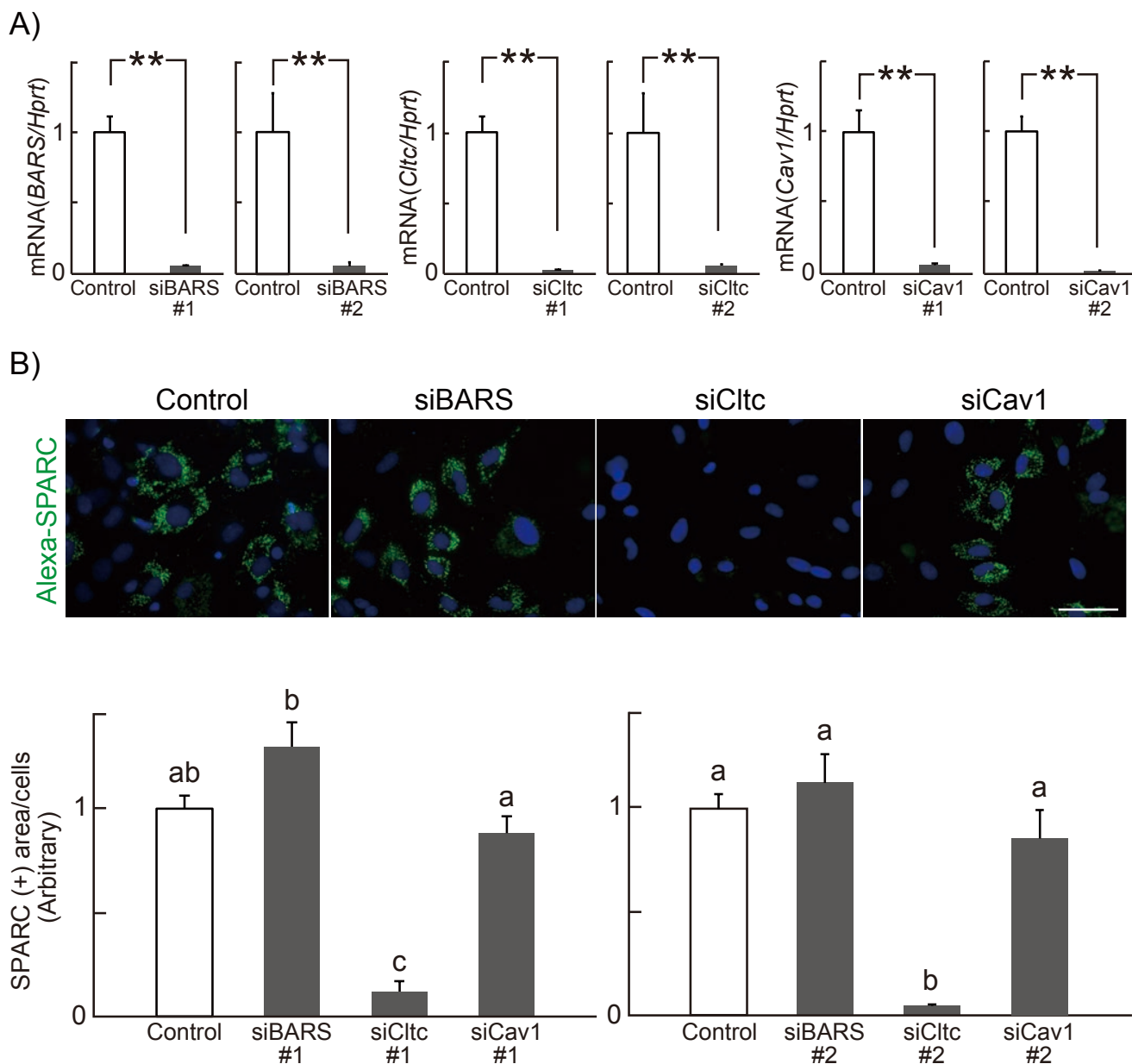


Fig. 2-2-6 SPARC 内在化エンドサイトーシス経路の特定

(A) 若齢ラット Skm-PCs において BARS、clathrin (Cltc)、caveolin1 (Cav1) に対する siRNA を導入した時のそれぞれの mRNA 発現量を qPCR により評価した。n = 3。**: p < 0.01。

(B) 若齢ラット Skm-PCs において BARS、clathrin (Cltc)、caveolin1 (Cav1) に対する siRNA を導入した後、蛍光標識した SPARC を培地中に添加し、SPARC の内在化量を評価した。上がその写真で、それを定量したグラフを下に示す。n = 10 cells。同符号間に有意差はない。

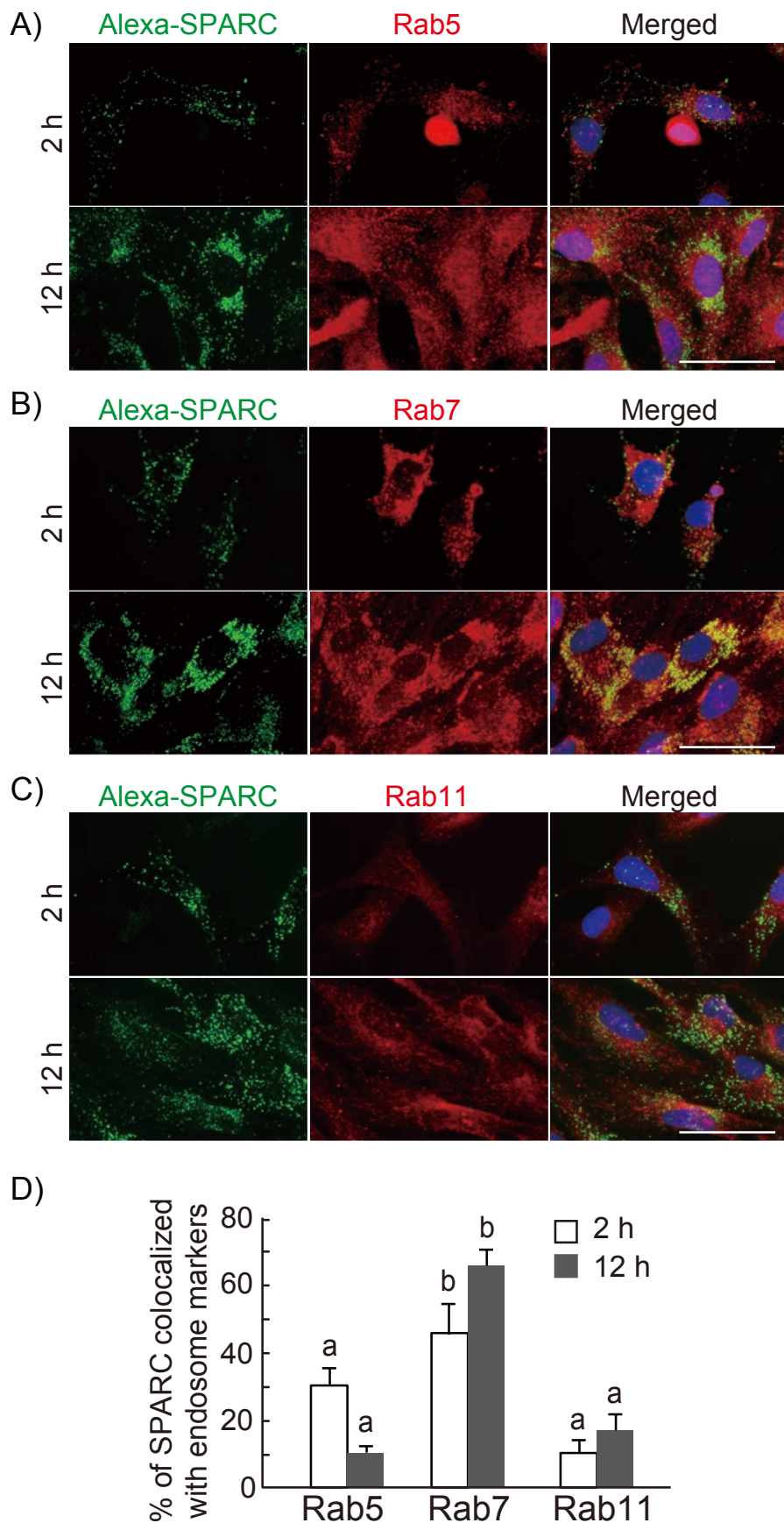


Fig. 2-2-7 内在化後の SPARC が局在するエンドソームの同定

若齢ラット Skm-PCs において蛍光色素で標識した SPARC を添加後、エンドソームマーカーである Rab5 (A)、Rab7 (B)、Rab11 (C) に対する抗体を用いた免疫染色を行った。Scale bar = 50 μm 。(D) 各エンドソームマーカーと内在化 SPARC との局在が一致する割合を定量したグラフ。
n = 10 cells。同符号間に有意差はない。

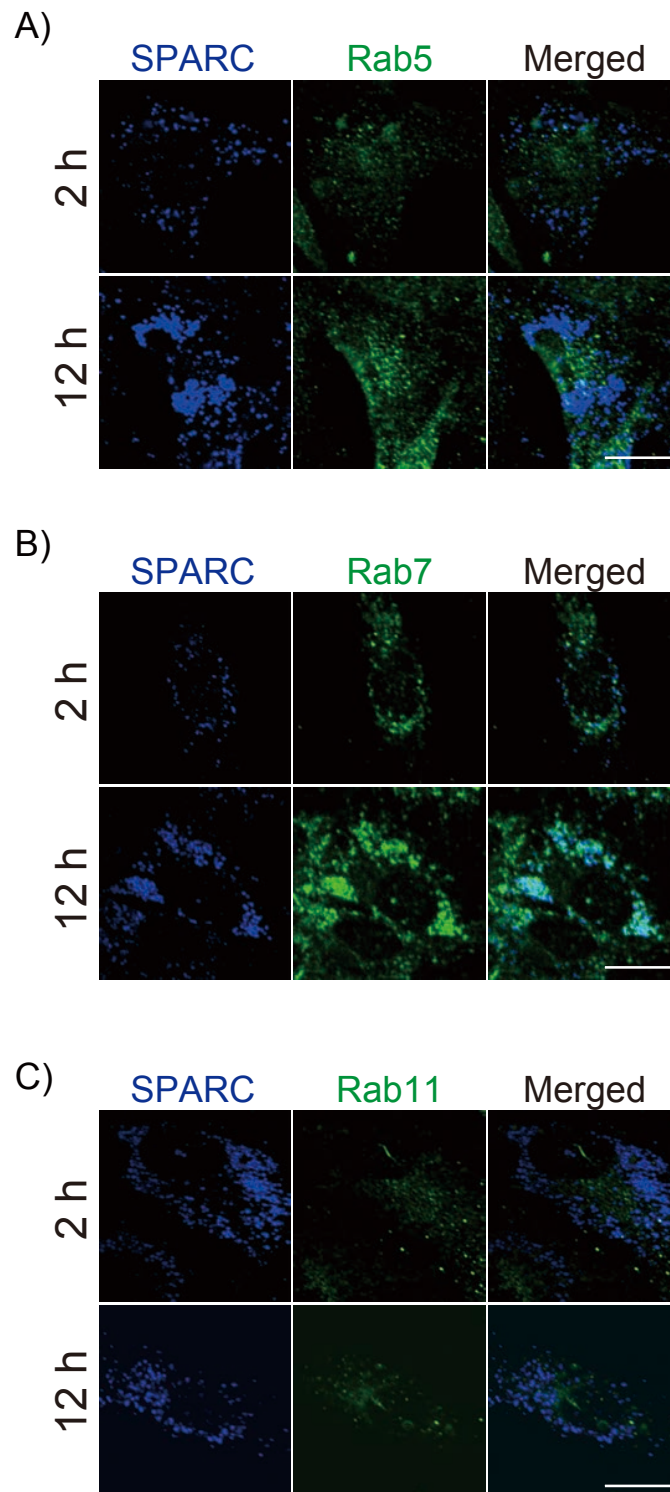


Fig. 2-2-8 共焦点顕微鏡による各エンドソームマーカーと
SPARC との共局在像

若齢ラット Skm-PCs において蛍光色素で標識した SPARC を添加後、エンドソームマーカーである Rab5 (A)、Rab7 (B)、Rab11 (C) に対する抗体を用いた免疫染色を行い、共焦点顕微鏡により画像を取得した。Scale bar = 20 μm 。

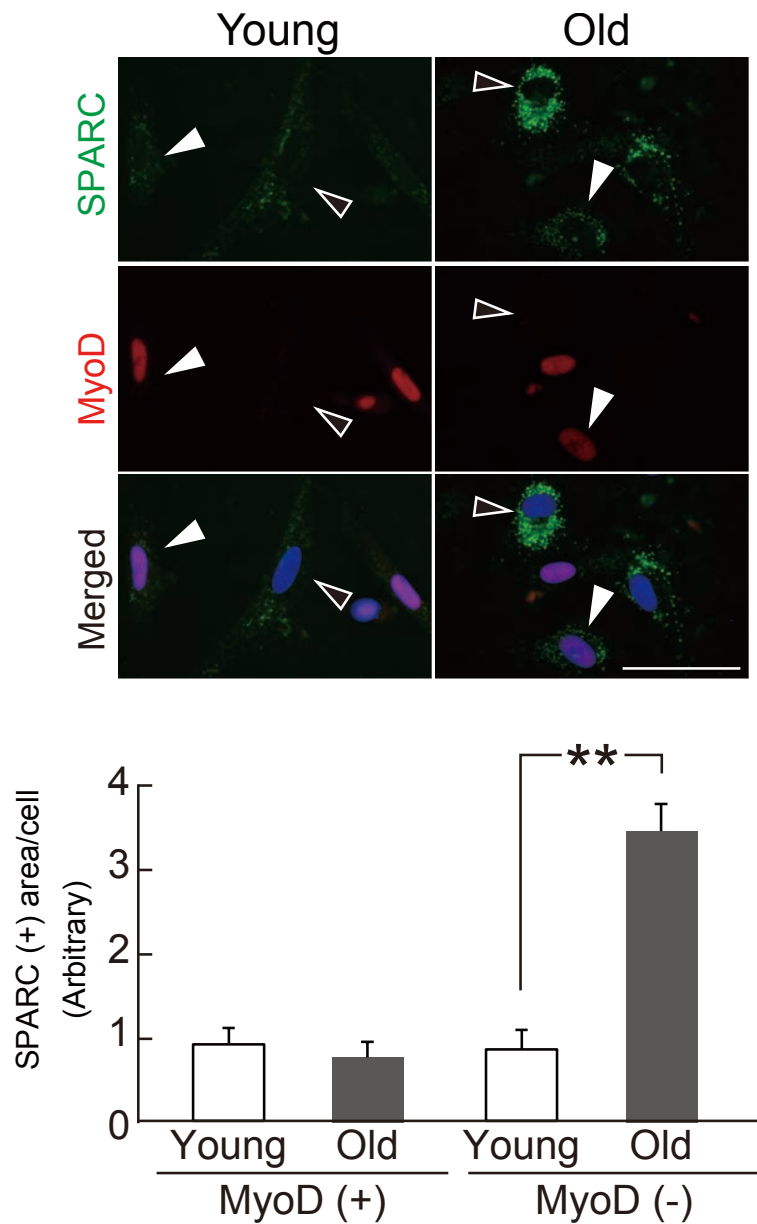


Fig. 2-2-9 若齢および老齢ラット由来 Skm-PCs における MyoD 陽性 / 陰性細胞における SPARC 内在化量の比較

若齢および老齢ラット Skm-PCs において免疫染色を行い、MyoD 陽性ならびに陰性細胞における SPARC 内在化量を画像処理により評価した。上にその写真を、下にそれを定量したグラフを示す。白矢頭は MyoD 陽性細胞を、黒矢頭は MyoD 陰性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。n = 10 cells。
*: p < 0.05、**: p < 0.01。

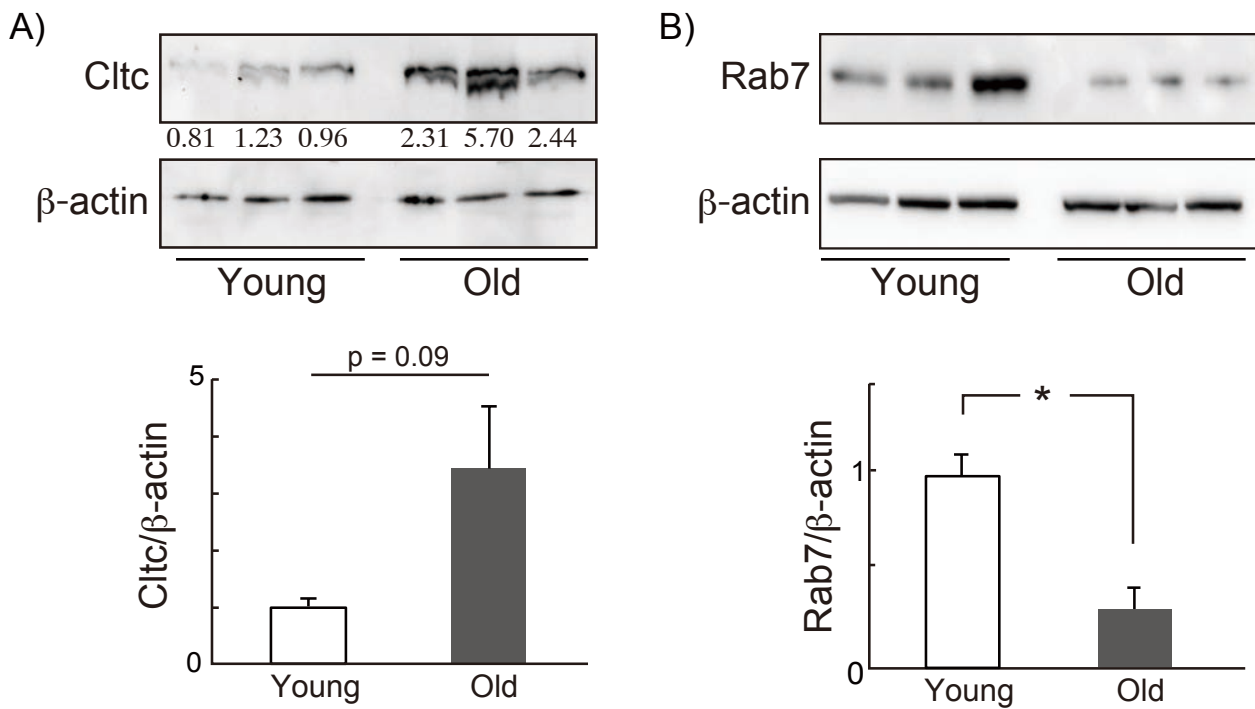


Fig. 2-2-10 若齢および老齢ラット由来 Skm-PC s における clathrin ならびに Rab7 発現量の比較

若齢および老齢ラット Skm-PCs において Cltc (A) ならびに Rab7 (B) の発現量をウェスタンブロットにより評価した。n = 3。*: $p < 0.05$ 。

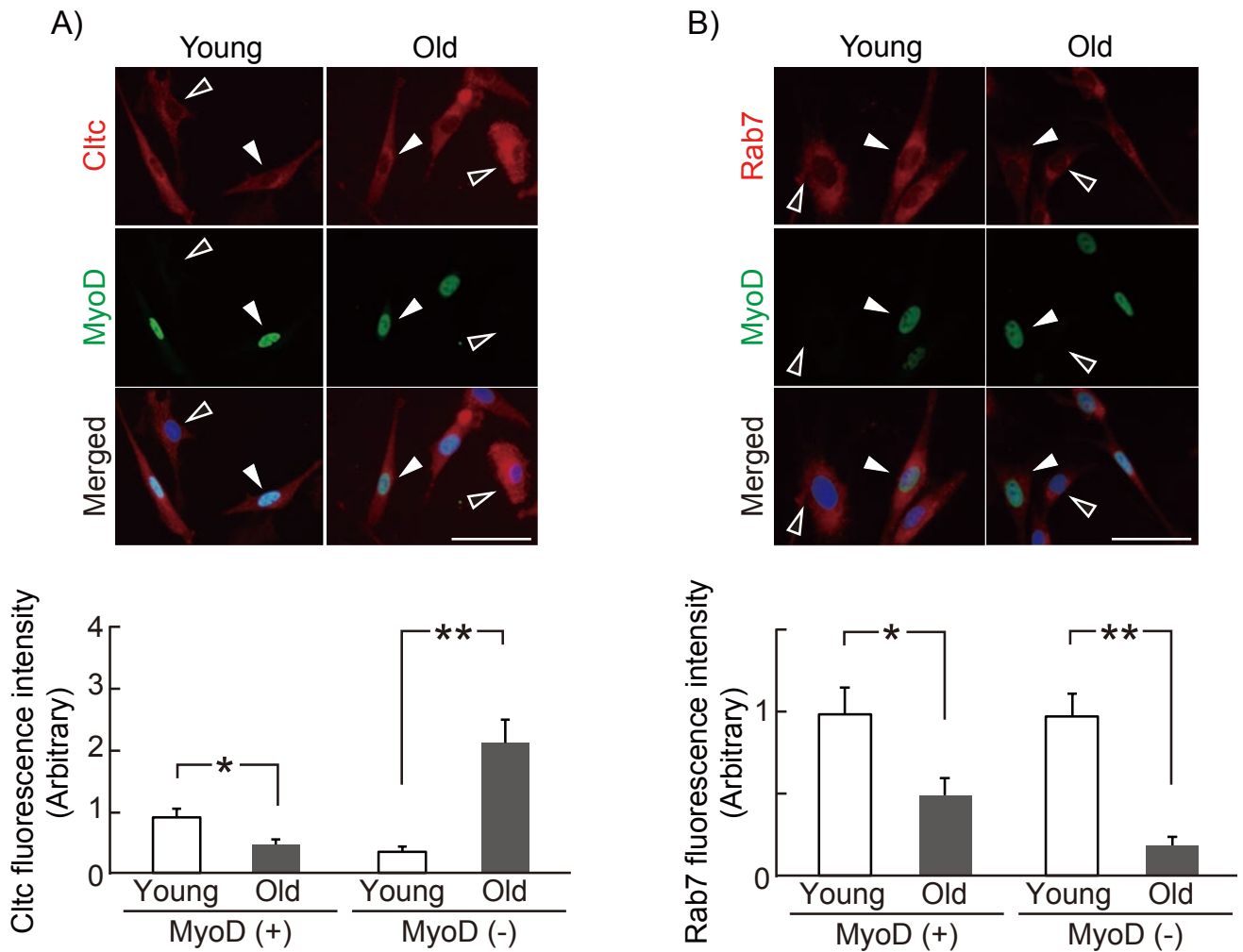


Fig. 2-2-11 若齢および老齢ラット由来 Skm-PC s における MyoD 陽性 / 陰性細胞における clathrin ならびに Rab7 発現量の比較

若齢および老齢ラット Skm-PCs において免疫染色を行い、MyoD 陽性ならびに MyoD 陰性細胞における Cltc (A) ならびに Rab7 (B) の発現量を画像処理により評価した。白矢頭は MyoD 陽性細胞を、黒矢頭は MyoD 陰性細胞を示す。Scale bar = 100 μ m。n = 10 cells。*: p < 0.05、**: p < 0.01。

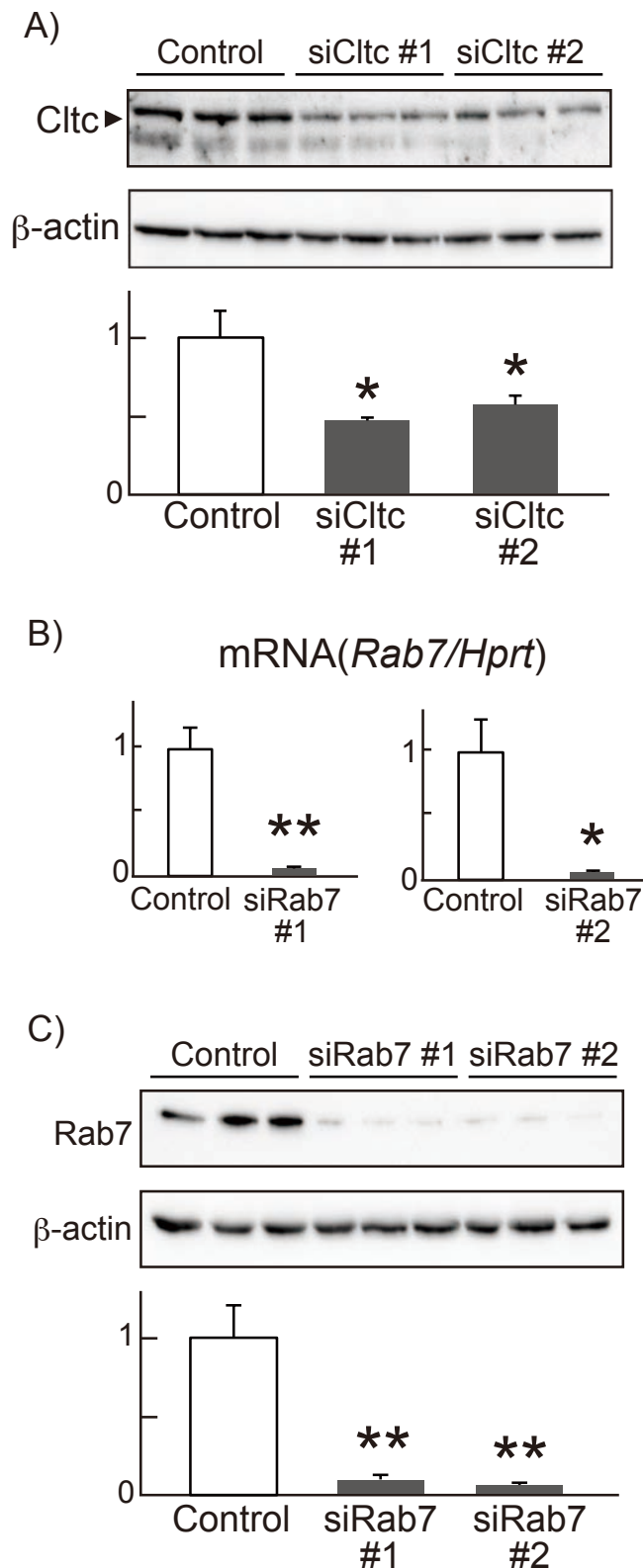


Fig. 2-2-12 Clathrin ならびに Rab7 に対する siRNA の抑制効果

(A) 若齢ラット Skm-PCs において Cltc に対する siRNA を導入し、その時の発現量をウェスタンブロットにより評価した。n = 3。*: p < 0.05。

若齢ラット Skm-PCs において Rab7 に対する siRNA を導入し、その時の発現量を qPCR (B) およびウェスタンブロット (C) により評価した。n = 3。*: p < 0.05、**: p < 0.01。

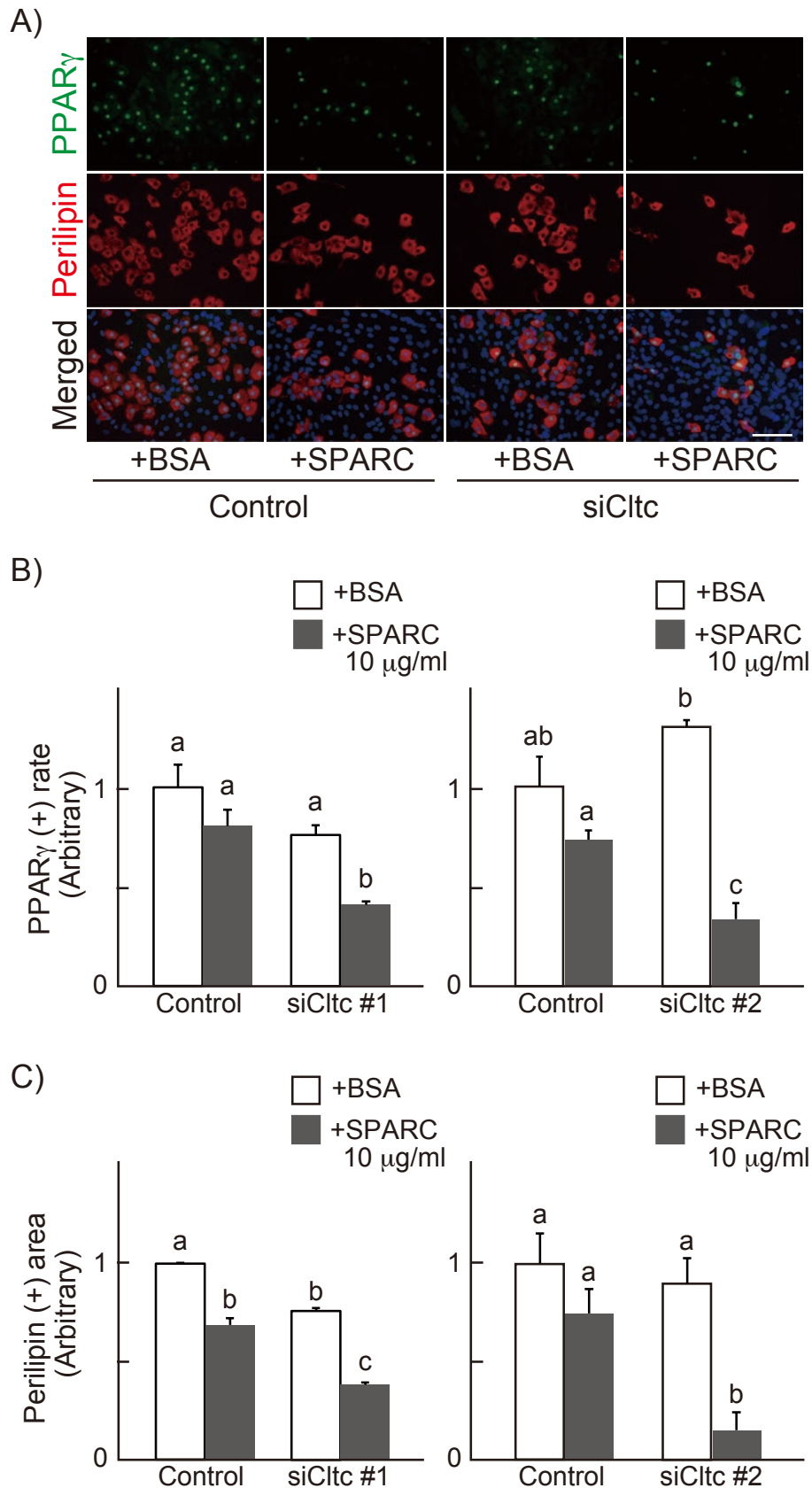


Fig. 2-2-13 SPARC の脂肪分化抑制作用における clathrin の関与

若齢ラット Skm-PCs において Cltc に対する siRNA を導入後，培地中に SPARC を添加し，脂肪細胞マーカーを用いた免疫染色によりその時の脂肪分化能を評価した。そのときの写真 (A) と、PPAR γ 陽性細胞数割合 (B) および Perilipin 陽性面積 (C) を定量したグラフを示した。同符号間に有意差はない。

Scale bar = 100 μ m。

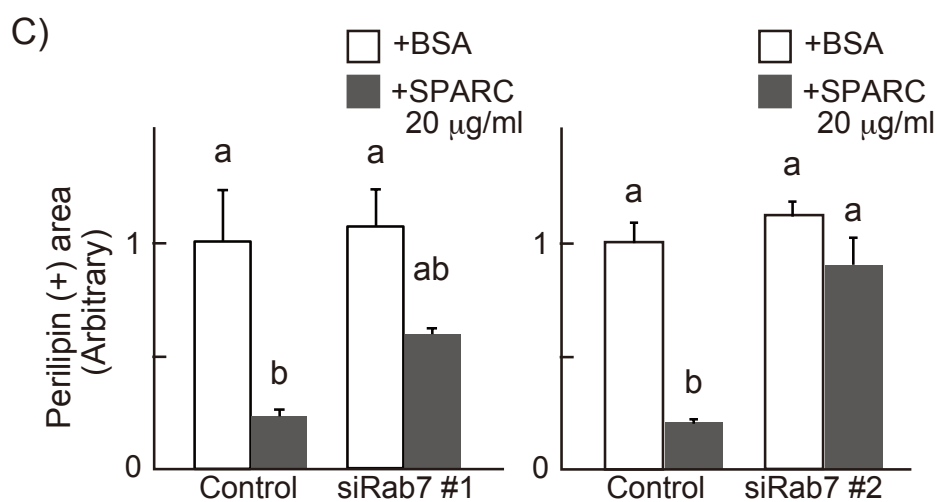
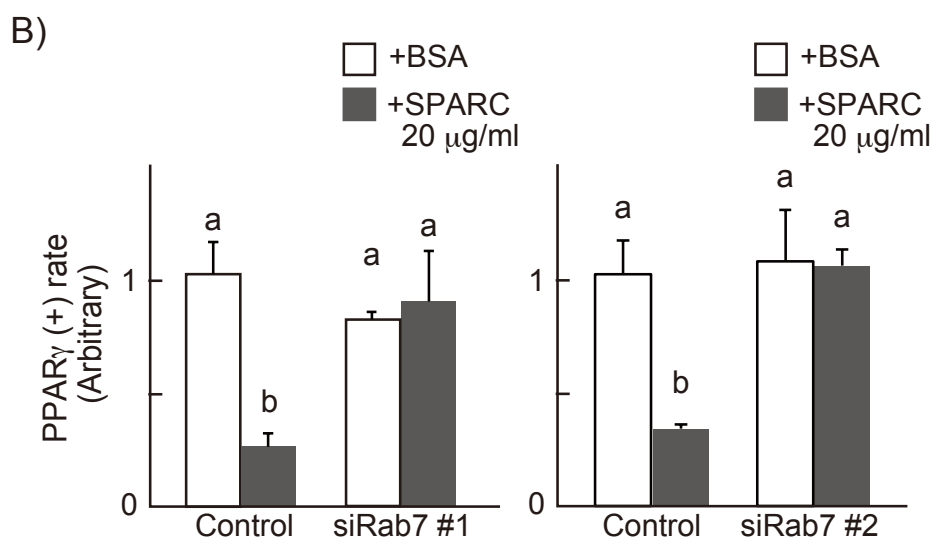
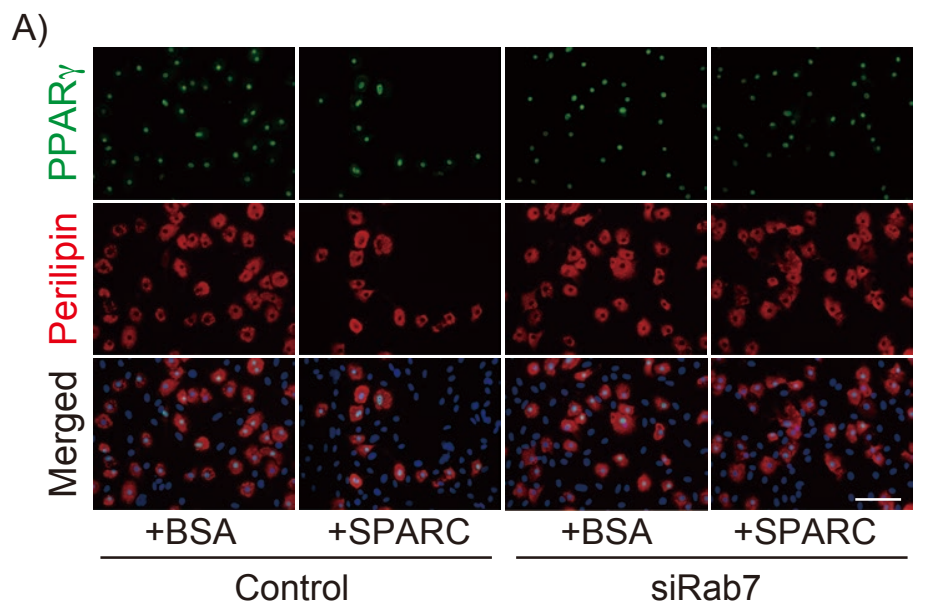


Fig. 2-2-14 SPARC の脂肪分化抑制作用における Rab7 の関与

若齢ラット Skm-PCs において Rab7 に対する siRNA を導入後、培地中に SPARC を添加し、脂肪細胞マーカーを用いた免疫染色によりそのときの脂肪分化能を評価した。そのときの写真 (A) と、PPAR γ 陽性細胞数割合 (B) および Perilipin 陽性面積 (C) を定量したグラフを示した。n = 3。同符号間に有意差はない。Scale bar = 100 μ m。

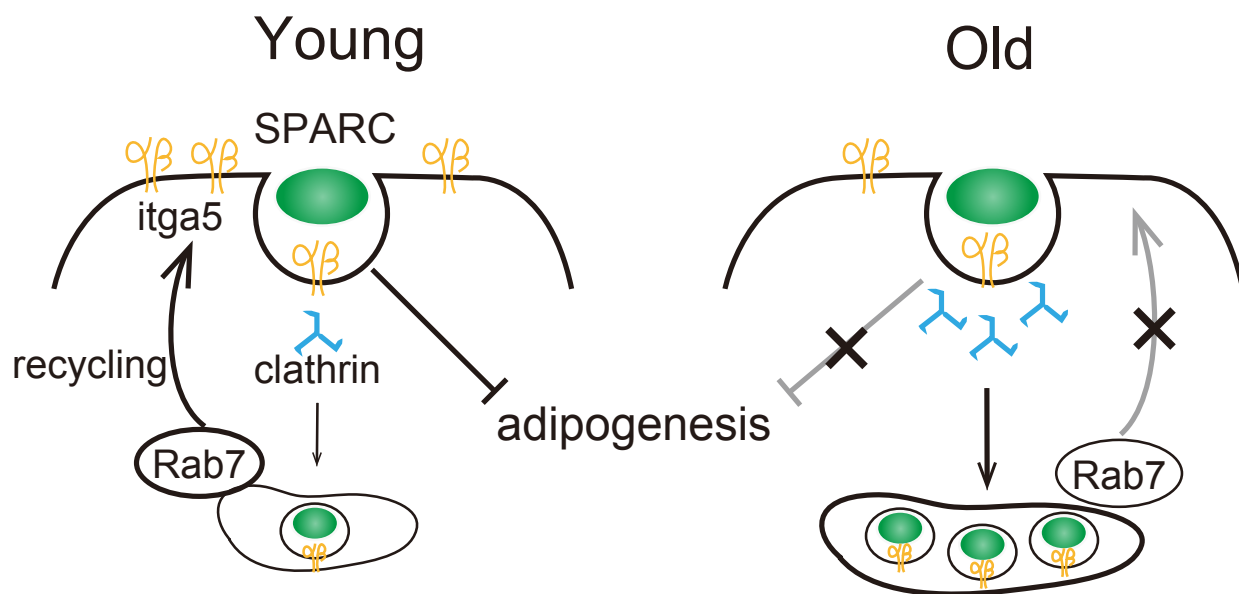


Fig. 2-2-15 SPARC の脂肪分化抑制作用における内在化の関与とその加齢性変化

若齢ラット Skm-PCs において、細胞表面上の itga5 と結合した SPARC は脂肪分化抑制作用を発揮し、続いて Clathrin により細胞内へと内在化されることで、その作用が減弱される。その後、Rab7 が SPARC とともに内在化された itga5 を細胞表面上へとリサイクルすることで、SPARC への反応性を回復させる。一方、老齢ラットの Skm-PCs では itga5 の発現量が減少することに加え、Clathrin による内在化が亢進することで、細胞表面上での SPARC の脂肪分化抑制作用が低下する。さらに Rab7 の発現量が減少することで、itga5 のリサイクルが減少し、SPARC への反応性回復が十分に行われない可能性が考えられる。

第三章

新規デュシェンヌ型筋ジストロフィーモデル動物の作成と その病態時における SPARC の発現

緒言

Dystrophin は、X 染色体上に位置する全長おおよそ 220 万塩基、79 の exon からなる *Dmd* 遺伝子によってコードされる、分子量 427kDa にもおよぶ巨大なタンパク質である (Koenig et al., 1988)。Dystrophin タンパク質は筋線維において細胞骨格と細胞外マトリクスを繋いでおり、筋細胞膜の安定性を高める役割を担う。この *Dmd* 遺伝子の変異により Dystrophin タンパク質が欠損すると、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) と呼ばれる筋原性疾患を発症する。DMD は約 3000 人に 1 人の新生男児に発症し、筋線維が脆弱化することで筋線維の破壊とそれに伴う再生が繰り返され、進行性の筋力低下を呈す重篤な疾患である。病態が進行した患者の骨格筋では、筋線維が減少するだけでなく、脂肪細胞や結合組織によって置換される (Kinali et al., 2011)。DMD は心臓や横隔膜にも影響を及ぼし、心筋や横隔膜筋線維の壊死が引き起こされ、呼吸困難や心不全となり最終的に死に至る。Dystrophin タンパク質は中枢神経系にも発現しており、DMD 患者ではしばしば認知機能の低下を伴う (Anderson et al., 2002; Sekiguchi et al., 2009)。

DMD の病態機序の解明ならびにそれに対する治療法を開発する上で、DMD の疾患モデル動物が重要な役割を果たしてきた (Vanizof et al., 2008)。特に DMD モデルマウスである *mdx* マウスおよびイヌのモデルである canine X-linked muscular dystrophy (*cxmd*) 犬が広く用いられている。これらの *mdx* マウスや *cxmd* 犬を使用することは現在臨床治験段階のものも含め、様々な治療法の開発に有用であった (Nowak et al., 2004; Beytía Mde et al., 2012)。しかしながら、DMD の原因遺伝子が同定されてから 20 年以上経つにも関わらず、現在のところ治療法が確立されていない。これらの DMD モデル動物にはそれぞれ長所と短所がある (Banks et al., 2009; Nakamura et al., 2011)。例えば *mdx* マウスは繁殖やそのコロニーの維持は容易であるが、骨格筋の変性は出生早期に限定的で、ヒトの DMD でみられるような重度の筋線維の変性像や脂肪細胞の浸潤、線維化の亢進といった重篤な症状は示さない。一方、*cxmd* 犬はヒトの DMD によく類似した重篤な表現型を示すが、そのコロニーの維持に大規模な施設が必要になるなど、繁殖や飼育に多大な労力を要する欠点がある。

マウスとイヌの中間の身体の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評価に好んで用いられている (Jacob et al., 1999)。これはマウスよりも身体のサイズが大きいため採血が容易で採血量も確保でき、より正確な測定が可能であるからと考えられる (Abbott et al., 2004)。またラットはマウスに比べ複雑な手順を覚えることができるため、行動実験を行う際にも都合がよい (Abbott et al., 2004)。一方、マウスとは異なり、ES 細胞の培養法が確立されていなかったラットにおいては、標的とした遺伝子部位を改変することは長らくの間技術的に困難であった。しかし、zinc finger nuclease (ZFN) と呼ばれるゲノム編集技術が開発され、これを用いることでこのラットにおいても遺伝子を欠損させることが可能であることが報告された (Geurts et al., 2009)。さらに、その後が開発されたゲノム編集技術である transcription activator-like effector nuclease (TALEN) によってもまた遺伝子改変ラットを作成できることが示された (Tesson et al., 2011)。TALEN では人工ヌクレアーゼの発現ベクターの設計が煩雑であった。この点を改善した、より簡便なゲノム編集技術として、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 (Cas) 9 を応用した、短い RNA 合成のみで標的部位に変異が導入できる CRISPR/Cas 法が開発された (Mali et al., 2013; Wang et al., 2013)。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と足場の配列で構成される全長 100 数塩基の short guide RNA (gRNA) が標的遺伝子に結合し、そこに Cas9 が誘導されることで、標的部位に二本鎖切断を引き起こす。この二本鎖切断は高確率で変異が起こる非相同末端結合により修復されるため、標的部位に変異を導入した動物を作成することが可能である。この方法は他のゲノム編集技術と比べて効率が高く、マウスでは 100% 近い効率で遺伝子欠損個体を F0 世代にて作製できることが報告された (Fujii et al., 2013)。さらにこの CRISPR/Cas 法はラットにも適用できることが示されている (Li et al., 2013)。以上のことから、CRISPR/Cas 法を用いて *Dmd* 遺伝子に変異を持つラットを作成することで、mdx マウスおよび cxmd 犬双方の長所を併せ持つ DMD 疾患モデル動物が作成できる可能性が考えられる。

SPARC は 43kDa の分泌性糖タンパク質で、骨格筋のニッチを構成する非構造性細胞外マトリクス因子の一つである。SPARC は骨格筋の損傷時に発現量が増加し、筋再生が進行するに従い通常の状態にその発現量が戻ること、この損傷に応答し活性化する筋衛星細胞が SPARC を発現することが知られている (Petersson et al., 2013)。また、ヒトの DMD においても筋衛星細胞が SPARC を発現し、DMD 下で見られる再生筋線維もまた SPARC 陽性を示すことが報告されている (Jørgensen et al., 2009)。第一章および第二章により示された骨格筋における SPARC の役割とこれら知見を鑑みると、DMD 病態下においても SPARC が DMD の病態進行に対し保護的に作用する可能性が考えられる。

そこで、本章では DMD における SPARC の役割を考察するため、まず CRISPR/Cas 法を用い、*Dmd* 変異ラットを作成することで既存のマウスモデルよりも重篤な表現型を示す DMD 疾患モデルラットの作成を試みた。その後、このラットを用い、病状の進行による SPARC 遺伝子、タンパク質発現の定量を試みた。

材料と方法

動物

Wistar-Imamichi ラットは動物繁殖研究所（茨城）より購入した。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；7:00-19:00）の条件下で飼育し、固形試料（ラボ MR スタンダード、日本農産工業、横浜）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。

CRISPR/Cas 法による *Dmd* 変異ラットの作成

Cas9 の mRNA は東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用遺伝学研究室 藤井渉先生より分与された (Fujii et al., 2013)。rat *Dmd* の exon3、16、および *sparc* の exon7 に対する gRNA 合成は藤井らの開発した手法に順じて行った (Fujii et al., 2013)。5 週齢のメス Wistar-Imamichi ラットにセロトロピン (25 IU、あすか製薬、東京) を腹腔内に投与し、その 48 時間後にゴナトロピン (あすか製薬) を腹腔内投与し、交配経験済みオス Wistar-Imamichi ラット (動物繁殖研究所) と交配させた。その 20 時間後に卵管を採取し、膨大部より受精卵を採卵した。受精卵は採取後ヒアルロニダーゼ処理した後、M2 培地 (Sigma) 中へ移した。マイクロマニピュレーター (ナリシゲ、東京) により Cas9 mRNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および gRNA (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を顕微注入し、M16 培地にて 1 時間培養した。その後、前日に偽妊娠した 8 週齢メス Wistar-Imamichi ラットの卵管采から膨大部付近を切開し、1 卵管あたりおおよそ 10 個の顕微注入した受精卵をキャピラリーに充填した後卵管内に移植した。

PCR

出産後、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 分間熱処理した後、20 μl の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え中和した。これを 1-2 μl 用い、KOD FX もしくは KOD FX Neo (東洋紡) を用いて以下の温度、時間にて PCR 反応を行った。

94°C、 2分	45 サイクル
94°C、 10秒	
58°C、 20秒	
68°C、 1分/kb	

PCR に用いたプライマーは Table 3 に示した。

PCR 産物はアガロース電気泳動した後、目的の産物のバンドを含むゲルを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス、東京) を用いて PCR 産物を抽出した。この PCR 産物を直接 BigDye (v3.1、Applied Biosystems) と反応させるか、あるいは TA クローニングを経た後プラスミドを FastGene Plasmid Mini Kit (日本ジェネティクス) にて抽出し、BigDye と反応させることで、シーケンスを行った。なおシーケンスには ABI 3130xl (Applied Biosystems) を用いた。

RNA の抽出

クリオスタットにて薄切した TA を TRIzol reagent (Invitrogen) 中で、ホモジェナイザー (Shake Master、バイオメディカルサイエンス、東京) により粉砕後、4°C、15,000 rpm で 15 分間の遠心分離を行い、上層を別のチューブに移した。1 ml の TRIzol reagent に対しクロロホルム (和光純薬) を 200 µl 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、上層の透明な部分の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を加え、攪拌してから 10 分間室温で静置し、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 1 ml 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 10~50 µl の DEPC 処理水を加え、RNA を溶解させた。得られた RNA は、GeneQuant II (GE Healthcare、UK) にて濃度を測定した。

逆転写反応 (Reverse transcription reaction: RT)

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

Total RNA (1-2 µg)	5 µl
Oligo dT (Invitrogen)	1 µl
Total Volume	6 µl

次に、以下に示す反応溶液で、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
0.1 M DTT	2 μ l
Super Script- II (Invitrogen)	1 μ l
RNase Inhibitor	2 μ l
Total Volume	20 μ l

反応終了後、94°C で 5 分間加熱し、氷上で急冷した。

qRT-PCR

逆転写反応によって得た cDNA を用いて、Light Cycler 2 (Roche, 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。qPCR に使用したプライマーは forward、reverse の順にそれぞれ以下に示した。

SPARC: 5'-aggtgcagaggaaactgtcg-3' 5'-gtttgcagtgatggttctgg-3'

HPRT: 5'-gaccggttctgtcatgtcg-3' 5'-acctggttcatacactaataac -3'

骨格筋の凍結切片の作成

凍結させた TA を O.C.T コンパウンド (Tissue-Tek、Sakura Finetek U.S.A, CA、USA) によりクリオスタット (MICROM International GmbH, Walldorf, Germany) に固定し、厚さ 7~8 μ m の凍結切片を作成した。切片は筋線維に対して垂直な面となるように作成し、MAS コート付きスライドガラス (松波硝子工業株式会社、大阪) 上に貼り付け、風乾させた後、-80°C で保存した。

骨格筋からのタンパク質抽出ならびにウェスタンブロット

クリオスタットにて薄切した筋切片を 1.5ml 遠心チューブ (Beckman Coulter, CA, USA) に集め、50~100 μ l のサンプルバッファーを加え、45,000 rpm で 30 分間の超遠心を行った後、上層を別のチューブに移しサンプルとした。このタンパク質抽出物を、SDS を含むポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動 (SDS-PAGE) により分離した後、Coomassie brilliant blue (CBB) 染色もし

くは β -actin の発現量により各サンプル間のタンパク質量が等量となるように調整した。ウェット式転写装置ミニトランスブロットセル (BIO-RAD、CA、USA) により 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 PVDF メンブレン (Millipore) へと転写した。その後、メンブレンを取り出し、5% スキムミルク/PBS-T (0.1% Tween20 /PBS) に浸し、室温で一時間ブロッキングした。一次抗体は PBS-T で希釈した抗 SPARC ヤギポリクローナル抗体 (1:2,000、R&D systems、MN、USA)、4,000 倍に希釈した抗 α -tubulin マウスモノクローナル抗体 (1:4,000、Sigma)、抗 Dystrophin ウサギポリクローナル抗体 (1:1,000、Santa cruz)、抗 Dystrophin マウスモノクローナル抗体 (1:100、Dys1、Dys2、Novocastra)、抗 Perilipin ウサギモノクローナル抗体 (1:1,000、Cell signaling Technology) を用い、4°C にて一晩反応させた。一次抗体反応後、メンブレンを取り出し、振盪しながら、PBS-T で 10 分間、3 回洗浄した。二次抗体反応では、1% スキムミルク/PBS-T で 10,000 倍希釈した HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Southern Biotechnology Associates)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories) および Biotin 標識ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories、CA、USA) を用い、室温で一時間反応させた。Biotin 標識ヤギ IgG 抗体を使用した際は、その後 VECTASTAIN ABC kit (Vector Laboratories) を用いて HRP 標識を行った。PBS-T で 3 回洗浄したのち、ECL Western blotting analysis system により発光させ、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad) により画像を取得したのち、画像処理により各タンパク質量の定量を行った。

組織切片の染色

作成した凍結切片を、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate Buffered-Saline; 以下 PBS) にて 15 分間固定を行った。PBS により 3 回洗浄した後、5%正常ヤギ血清 (NGS) を含む PBS にて一時間ブロッキングした。洗浄後、PBS で 100 倍に希釈した抗 Dystrophin ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz)、抗 Dystrophin マウスモノクローナル抗体 (Dys1、Dys2、Novocastra)、抗 embryonic myosin heavy chain マウスモノクローナル抗体 (F1.652、DSHB)、抗 laminin ウサギポリクローナル抗体 (Sigma)、抗 β -dystroglycan マウスモノクローナル抗体、抗 α -sarcoglycan マウスモノクローナル抗体、抗 nNOS ウサギポリクローナル抗体 (国立精神・神経医療研究セ

ンター 遺伝子疾患治療部 谷端淳博士より分与)、抗 SPARC ヤギポリクローナル抗体 (R&D systems)、500 倍に希釈した抗 Perilipin ウサギモノクローナル抗体 (Cell signaling Technology) を 4°C で一晩反応させた。二次抗体には、Invitrogen より購入した Alexa Fluor® 標識 ヤギ抗マウス IgG 抗体、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を、また一次抗体にヤギ抗体を用いた際は NGS の代わりにロバ血清 (DS) を用い、5%DS/PBS で希釈したロバ抗ヤギ IgG 抗体、ロバ抗マウス IgG 抗体、ロバ抗ウサギ IgG 抗体をそれぞれ用いた。筋線維の直径の評価は laminin に対する免疫染色を行った切片を用いて行った。1 個体あたり 3 視野を任意に選んで写真撮影を行い、Photoshop にて 2 階調化した後、ImageJ により minimal Feret's を算出することで筋線維直径とした。

ワイヤーハングテスト

ワイヤーハングテストは筋力を評価するために行った。ペーパータオルと床敷を 10 cm 重ねてクッションとし、その上空 40 cm に直径が 15 mm のワイヤーを 75 cm 張った。ラットをワイヤーに捕まらせ、落ちるまでの時間を計測し、体重で乗じた値を筋力の指標とした。

Creatine kinase 活性測定

Creatine kinase の活性は F1 ラット腹大動脈より採血した血清を用い、富士ドライケムシステム (富士フイルム、東京) にて測定した。

統計処理

数値データは平均値±標準偏差で示した。2 群間の平均値の比較は、Unpaired Student's t-test を用いて行った。中央値の比較には、Wilcoxon rank sum test 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。

結果

CRISPR/Cas 法による rat *Dmd* 遺伝子への変異導入

ラット *Dmd* への変異導入の効率を高めるため、ラット *Dmd* の exon 3 および 16 に対する gRNA を同時に顕微注入した。得られた F0 オスラットの標的部位をシーケンスした結果を Table 1 および Fig. 3-1 に示した。Exon3 (target1) および exon16 (target2) どちらの標的部位においても欠失もしくは挿入 (indel)、あるいは置換などの変異がみられた。CRISPR/Cas 法は標的部位以外にも gRNA の配列と類似した配列に対し非特異的に切断活性を示すオフターゲット効果が問題視されている (Fu et al., 2013; Fujii et al., 2013; Mali et al., 2013)。今回用いた gRNA はラットゲノム上に 2 塩基以下のミスマッチを含む部位を持たないものを選択しているため、3 塩基のミスマッチを含む配列部位に対してゲノム配列をシーケンスしオフターゲット効果を評価した (Table 2)。その結果、target1 に関して 8 箇所のうち 1 箇所のみで、10 匹中 4 匹において変異の導入が確認された。Target2 に関しては 3 塩基のミスマッチ部位におけるオフターゲット効果は確認されなかった。また、尻尾の先端部で検出された変異と同じ変異が前脛骨筋 (TA) においても観察された (Fig. 3-2A)。今回得られた F0 ラットのうち、いくつかの個体は同一個体内に複数の変異が混在するモザイクを示すが、このモザイクに関しても、尻尾ならびに TA において同一のものが確認された (Fig. 3-2B, C)。このことから、全身の細胞が、1 細胞期から 4 細胞期にかけて Cas9 により導入された変異を持つと考えられる。CRISPR/Cas 法では同一遺伝子に対して 2 つの gRNA を導入した場合、その標的部位間が欠損する long deletion が起こる場合がある (Fujii et al., 2013)。今回、target1 と target2 の間で 300 kb 以上も距離があるにも関わらず、1 個体において long deletion が起こっていた (Fig. 3-3)。このことは CRISPR/Cas 法を用いれば 30 万塩基ほどの領域であれば、標的とした箇所を大きく欠損できることを示唆する。

Dmd に変異が確認できたラットの TA において Dystrophin の mRNA 発現を調べたところ、いくつかの個体に関しては exon3 から 16 にかけて mRNA の発現が残存していたが、この間の mRNA の発現を確認できない個体もみられた (Fig. 3-4A)。次に Dystrophin タンパク質の発現をウェスタンブロットおよび免疫染色により評価したところ、ウェスタンブロットでは *Dmd* 変異ラットにおい

て野生型で見られた Dystrophin タンパク質のバンドが確認されず (Fig. 3-4B)、また免疫染色においても野生型で確認された筋線維細胞膜に沿ったシグナルが *Dmd* 変異ラットでは消失していた (Fig. 3-4C、Fig. 3-5)。以上の結果から、CRISPR/Cas 法により *Dmd* 遺伝子に変異を持つ Dystrophin 欠損ラットが作成できたことが示された。

Fig. 3-1 に示したように、#6 および #7 のラットでは 3 の倍数の欠損を持つため、これらの個体は in-frame 変異を持ち、部分的な Dystrophin タンパク質を発現する可能性が考えられたため、他の Dystrophin に対する抗体 (Dys1 および Dys2) を用いてウェスタンブロットを行った。Dys1 は rod domain と呼ばれる Dystrophin タンパク質の中央部分を、Dys2 は Dystrophin タンパク質の C 末端領域を認識する。Dys2 を用いても同様に *Dmd* 変異ラットでは Dystrophin タンパク質を認識できなかったが (Fig. 3-6A)、Dys1 を用いた際は #6 および #7 のラットにおいても Dystrophin タンパク質が確認できた (Fig. 3-6B)。Dys2 を用いた免疫染色において、in-frame 変異を持つものでは野生型に比べて減弱はしているものの筋細胞膜に沿った Dystrophin タンパク質の発現が認められた (Fig. 3-6C)。以上の結果から、in-frame 変異を持つラットでは部分的な Dystrophin タンパク質が発現していると考えられる。

Dmd 変異ラットにおける筋組織の表現型解析

Dmd 変異ラットが DMD に類似した病態を示すかどうか、その筋組織の表現型を解析した。*Dmd* 変異ラットは 13 週齢までは野生型と同等の体重の推移を示したが (Fig. 3-7A)、*Dmd* 変異ラットの心臓 (Fig. 3-7B) ならびに TA (Fig. 3-7C) の重量は野生型に比べ増加していたことから、これらの組織が Dystrophin タンパク質の欠損により影響を受けていることが考えられた。ヒラメ筋 (soleus muscle, SOL) 重量は両群間に変化はなかったが (Fig. 3-7D)、これは DMD では遅筋型よりも速筋型筋線維が影響されやすく、また SOL は TA に比べ遅筋型筋線維が豊富であることに起因すると推察される。次に TA の組織像を観察したところ、*Dmd* 変異ラットの TA では筋線維の壊死、炎症細胞の浸潤、間質の増大がみられた (Fig. 3-8A)。また中心核をもった再生筋線維が *Dmd* 変異ラットにおいて有意に増加しており (Fig. 3-8B)、筋線維の壊死に続き筋再生が起こっているものと考えられる。Masson's trichrome 染色においても *Dmd* 変異ラットは筋線維の壊死および線維化の亢進を示した (Fig. 3-9A)。この線維

化の度合いに関しては個体差がみられ、特に in-frame 変異のものは out-of-frame 変異のものに比べ、線維化の度合いが少ないようにみられた (Fig. 3-9B)。再生筋線維のマーカである embryonic myosin heavy chain (eMHC) に対する抗体を用いて免疫染色を行ったところ、いずれの *Dmd* 変異ラットにおいても eMHC 陽性の筋線維が確認された (Fig. 3-10)。また脂肪細胞のマーカである Perilipin に対する抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、いくつかの個体で Perilipin のバンドが確認されたことから、その個体において Perilipin に対する免疫染色と Oil red O 染色を行った (Fig. 3-11B)。その結果、間質において Perilipin および Oil Red O 陽性の脂肪細胞が出現していた。筋線維の直径を調べたところ、*Dmd* 変異ラットの筋線維直径は野生型の分布と異なり、直径の小さいもの、また大きいものが多くみられた (Fig. 3-12)。このことは DMD 患者で見られる筋線維の大小不同という特徴と一致する。さらに筋力を評価する手法として、ワイヤーハングテストを行ったところ、*Dmd* 変異ラットは野生型に比べ、筋力が有意に低下していることが判明した。以上の結果から *Dmd* 変異ラットでは筋力低下に加え、DMD に類似する、筋線維の壊死とそれに伴う再生、線維化の亢進ならびに脂肪細胞の浸潤を示すことが明らかとなった。

骨格筋以外の筋組織である心臓ならびに横隔膜においても Masson's trichrome 染色による組織学的解析を行った。*Dmd* 変異ラットの心臓では右心室、左心室ともに心筋の壊死とそれに伴う炎症細胞の浸潤像がみられた (Fig. 3-14A)。またいくつかの *Dmd* 変異ラットは右心室の拡張を示した (Fig. 3-14B)。横隔膜においても TA と同様に *Dmd* 変異ラットでは筋線維の壊死や再生、炎症細胞の浸潤ならびに線維化の亢進がみられた (Fig. 3-15)。以上の結果から、*Dmd* 変異ラットは骨格筋や心筋、横隔膜といった筋組織で DMD に類似した病態を示すことが明らかとなった。

CRISPR/Cas 法により導入された rat *Dmd* 遺伝子変異の次世代への伝達

DMD に類似した病態を示す *Dmd* 遺伝子への変異が次世代にも伝わるかどうか調べるため、得られた F0 の雌ラットと野生型の雄ラットを交配し、F1 の雄ラットの遺伝子型をシーケンス解析した。その結果、F0 の雌ラットで確認された変異と同じ変異が F1 においても確認された (Fig. 3-16A)。1 ヶ月齢の F1 オスラットにおいて、同月齢の野生型に比べて体重が減少しており (Fig.

3-16B)、心臓 (Fig. 3-16C) および SOL 重量 (Fig. 3-16E) に変化はないものの、TA 重量が増加していた (Fig. 3-16D)。この F1 オスラット TA では F0 での結果と同様に Dystrophin タンパク質の発現が消失しており (Fig. 3-17)、筋線維の壊死像 (Fig. 3-18A)、ならびに筋損傷のマーカである血清中の CK 活性の上昇がみられた (Fig. 3-18B)。また F0 ラットと同様に F1 オスラットの TA では eMH 陽性の再生筋線維が広範囲に渡り観察された (Fig. 3-19)。ジストロフィンと結合し、Dystrophin-Glycoprotein Complex (DGC) と呼ばれる複合体を形成する β -dystroglycan、 α -sarcoglycan および nNOS についてその発現を免疫染色により調べたところ、野生型でみられた筋細胞膜に沿ったこれら DGC 関連因子の発現が、F1 の TA では消失していた (Fig. 3-20)。以上の結果から、DMD に類似した表現型を示す *Dmd* 遺伝子の変異が次世代に伝わるものであることが明らかとなった。

DMD モデルラットにおける SPARC の発現動態

これまでの結果から、CRISPR/Cas 法により作成した *Dmd* 変異ラットが、ヒトの DMD の病態をよく反映する DMD モデル動物であることが示された。このラットでは 1 ヶ月齢では筋壊死に伴う筋再生が盛んに行われるヒトの DMD の初期の病態を示し、3 ヶ月齢においてもその再生は維持されている (Fig. 3-21A)。しかし、10 ヶ月齢では筋再生能が著しく低下し、ヒトの DMD 末期の特徴である正常筋線維の消失、そして線維化の亢進や脂肪細胞の高度な浸潤がみられた (Data not shown)。このことから、*Dmd* 変異ラットの月齢を追うことで、DMD の病態進行を観察できると考えられる。そこで DMD 病態とその進行における SPARC の発現動態を明らかにするため、まず DMD モデルラットの各月齢における SPARC の mRNA 発現量を qPCR により定量した。その結果、SPARC の mRNA 発現量について、1 ヶ月齢では野生型および DMD モデルラット間に違いはみられなかったものの、3 ヶ月齢および 10 ヶ月齢においては DMD モデルラットにて SPARC の mRNA 発現量が有意に増加していた (Fig. 3-21B)。

次にラット SPARC のタンパク質を検出するべく、ウェスタンブロットを行ったところ、SPARC の分子量である 43 kDa のバンドとそれ以外に約 90 kDa のバンドを検出した (後述する Fig. 3-22B を参照されたい)。そのため、このバンドが SPARC 特異的なものかどうか検証するため、CRISPR/Cas 法を用いて

SPARC-ノックアウト (KO) ラットを作成することを試みた。ラット SPARC 遺伝子の exon7 を標的とした gRNA および Cas9 mRNA を受精卵にインジェクションしたところ、得られた F0 において標的部位に変異を持つラットが作成され、いずれの変異も 3 の倍数でない、もしくは exon7 のスプライス部位を欠き、かつ exon 内も 3 の倍数でない欠損・挿入変異であった (Fig. 3-22A)。この F0 変異ラット同士を交配させ、得られた F1 の標的部位の DNA 配列をシーケンス解析した結果、両アレルとも親世代で確認された変異を持つことが確認できた。SPARC の発現は筋を損傷させることで誘導される (Petersson et al., 2013)。この SPARC 変異ラットにおいて 0.75%塩酸ブピバカイン (bupivacaine hydrochloride, BPVC) を含む生理食塩水を TA に投与し筋を損傷させた後、SPARC タンパク質の発現をウェスタンブロットにより評価した (Fig. 3-22B)。その結果、SPARC の分子量である 43 k Da 付近のバンドが野生型では確認されたが、SPARC 変異ラットではこのバンドが消失していた。このことから、90 kDa 付近にみられるバンドは非特異的な反応物であると考えられる。ラット SPARC タンパク質が検出できることが確認されたため、最後にこの系を用いて out-of-frame 変異を持つ *Dmd* 変異ラットでの SPARC のタンパク質発現を評価した (Fig. 3-23)。その結果、1 ヶ月齢では野生型および *Dmd* 変異ラットにおいて SPARC タンパク質の発現レベルが高く、両群間に差はないものの、3 ヶ月齢、10 ヶ月齢では野生型において SPARC の発現量が低下しており、*Dmd* 変異ラットではその発現が高い状態で維持されていた。この結果は先の qPCR 結果と概ね一致するものである。以上のことから DMD 初期だけでなく DMD の病態が進行した状態において SPARC の発現が高く維持されていることが明らかとなった。

考察

本研究では新規 DMD モデル動物として *Dmd* 変異ラットの作成に成功した。動物種が異なるため既存のマウスモデルである mdx マウスとこのラットを直接比較することは難しいが、若週齢時に一時的に mdx マウスでみられる骨格筋や横隔膜での壊死・再生像といった典型的な所見は *Dmd* 変異ラットにおいても観察されており、DMD モデル動物としての特徴をよく反映するものであると考えられる。ただし、骨格筋での線維化の亢進、ならびに 1 ヶ月齢だけでなく 3 ヶ月齢時にも筋線維の壊死や再生が広範囲に渡り起こっていること、さらに 3 ヶ月齢において顕著な心筋の壊死像を示すことから、この *Dmd* 変異ラットは mdx マウスよりもヒトの DMD に類似する重篤な表現型を示す可能性が考えられる。事実、この *Dmd* 変異ラットは週齢を重ねるごとに体重減少を示すようになり、骨格筋の壊死に対して再生が遅延し、脂肪細胞の浸潤や線維化の亢進が著しくなることも分かっている。また他グループの研究において TALEN により *Dmd* 遺伝子に変異を持つラットが作成されており (Larcher et al., 2014)、そのラットにおいても mdx マウスよりも重篤な表現型、そして心筋の壊死ならびに心機能が低下することも示されている。心不全は DMD の死因の大きな一因であることから、これまで mdx マウスでは評価できなかった心筋に対する DMD 治療法の評価に対してもこの *Dmd* 変異ラットは有用であると考えられる。

Mdx マウス以外にも mdx^{2cv-5cv} あるいは mdx52 マウスなど、これまでいくつかの *Dmd* 遺伝子に変異を持つ DMD モデルマウスが作成されている (Willmann et al., 2004)。 *Dmd* 遺伝子内に変異が起こる部位はそれぞれのモデルマウスで異なるものの、概してその表現型に差はない。またヒトの DMD 患者において Dystrophin タンパク質が欠損している場合、 *Dmd* 遺伝子での変異と重篤度に明らかな相関はみられないと考えられている (Blake et al., 2002)。本研究では exon3 および 16 に、mdx マウスは exon23 に変異を持つが、この変異の違いがマウスおよびラット DMD モデルにおける表現型の違いを引き起こす可能性は低いと考えている。マウスにおいて通常の mdx マウスでよく使用される C57BL/10 から DBA/2 へとマウスの遺伝的バックグラウンドを変更したところ、骨格筋の病態が重篤になることが示されている (Fukada et al., 2010)。このことから、先に述べたマウス・ラット間による表現型の差異は、異種間の

遺伝的バックグラウンドの違いに起因し、マウスよりもラットの遺伝的背景の方が、DMD 病態が顕在化しやすい可能性が考えられる。なぜこのような違いが起こるのかは、現時点では不明であるが、ラットの方が身体のサイズが大きく体重も重いため、骨格筋や心筋に与える負荷がマウスよりも大きいことが、筋組織の変性をより引き起こしやすくさせているのかもしれない。

Dmd 遺伝子に in-frame 変異が起こることで Dystrophin タンパク質が部分的に欠損することで DMD と比較して軽微な骨格筋の変性を主徴とする筋原性疾患に Becker 型筋ジストロフィー (BMD) が挙げられる。CRISPR/Cas9 法は DNA 修復機構である非相同末端結合を介して標的部位に変異を入れる手法であり、得られる変異は様々である。そのため、今回 exon3 のみに in-frame 変異を持つ個体が得られた。この in-frame 変異のラットにおいて、部分的な Dystrophin タンパク質の発現は Dys1 抗体によるウェスタンブロットや免疫染色により確認はされたものの、他の抗体を用いた際は検出されないことから、部分的な Dystrophin タンパク質の発現量は野生型での正常な Dystrophin タンパク質に比べて減少している可能性が考えられる。またこの in-frame 変異ラットの骨格筋では筋線維の壊死・再生像が局所的であり、横隔膜・心筋の壊死も他の out-of-frame 変異ラットに比べて軽微であった。この exon3 は actin binding domain (ABD) と呼ばれる、Dystrophin タンパク質と細胞骨格とを繋ぐ役割を担う重要なドメインをコードしている (Ervasti, 2007)。この付近に変異を持つ BMD 患者では部分的な Dystrophin タンパク質の発現が健常者での発現量に比べて減少する傾向が示されており、症状も重症化しやすい (Beggs et al., 1991)。ABD ドメインではなく、Dystrophin の中央に位置する rod ドメインという部分を欠いた Dystrophin タンパク質は完全長のものに比べてタンパク質分子の安定性が低下することが示されている (Henderson et al., 2011)。以上のことから、本研究で作成された不完全な Dystrophin タンパク質を発現する in-frame 変異ラットは、Dystrophin タンパク質の機能的なドメインが失われたことに加え Dystrophin タンパク質分子の安定性が低下することで、Dystrophin の筋細胞膜の安定性を維持する作用が減弱し、DMD よりも軽微な症状を示す BMD モデル動物としての特徴を示すものであると考えられる。

発生段階の骨格筋では単核の細胞および筋管細胞において SPARC の発現が

高いことが報告されている (Jørgensen et al., 2009)。1 ヶ月齢の *Dmd* 変異ラットと野生型との間に SPARC の mRNA・タンパク質発現量に差がなかったのは、骨格筋の成長が著しい 1 ヶ月齢の野生型においても SPARC の発現量が高く維持されていたからかもしれない。一方、筋線維再生がまだ起こる 3 ヶ月齢および病態が進行し再生不良を示す 10 ヶ月齢の *Dmd* 変異ラットにおいてに SPARC の mRNA およびタンパク質の発現が野生型に比べて高い状態で維持されていた。DMD では再生途中の筋管だけでなく、筋線維の壊死に反応して活性化した筋衛星細胞および間質の単核細胞において発現が認められている (Jørgensen et al., 2009)。SPARC は筋分化を促進し、脂肪分化を抑制すること、また筋衛星細胞だけでなく骨格筋から単離した脂肪前駆細胞においても SPARC が発現することを考えると、DMD の病態では筋線維、筋衛星細胞、脂肪前駆細胞と幅広い細胞種において SPARC の発現が亢進することが推察される。なぜ SPARC が DMD 末期になってもその発現が高い状態で維持されているのか、またこのことが DMD 病態にどのように関与するのかについては、第二章でみられた SPARC に対する反応性の低下によるものではないかと思われるが、これについては詳細を総括の項で記したい。本章では SPARC タンパク質を欠損するラットの作成にも成功していることから、今後、この SPARC-KO ラットと *Dmd* 変異ラットをかけあわせ週齢を追うことで、DMD において発現が亢進する SPARC の役割について更なる知見が得られることが期待される。

以上のことから、*Dmd* 変異ラットはヒト DMD の病態をよく反映する新たな DMD 疾患モデル動物であることが示された。この DMD モデルラットが今後の DMD 治療法開発ならびに SPARC のようなこれまで DMD での役割が解明されていなかった因子との関連性など、さらなる病態解明に寄与することを期待している。

Table 1 CRISPR/Cas 法による *Dmd* 変異ラットの作成効率

Generation efficiency of <i>Dmd</i> - mutated rats using CRISPR/Cas9					
Males/Newborns	Detectable/Newborn Males		Mutant Allele/Detectable Rats		Double Mutated Rats /Newborn Males
	Target1	Target2	Target1	Target2	
10/17	8/10	9/10	8/8	7/9	5/10*

*:1 個体において、target1 と target2 の間欠損する long deletion がみられた。

Table 2 CRISPR/Cas 法におけるオフターゲット効果

	Sequence of Off-target	Locus	No. of Mutated F0 Male Rats
1.1	CCTGCAGGATGGGAAA GGCATCT	chr14: 80,131,101-80,131,123	0/10
1.2	CCTGCAGG CTGGCCA ACGCCTCC	chr20: 14,437,218-14,437,240	0/10
1.3	CCTGCAGGATGGGAAA ACCAGC	chr8: 60,483,929-60,483,951	4/10
1.4	CCAGCAGGA AGGGAAA CCCT TC	chr8: 50,757,345-50,757,367	0/10
1.5	CCTGCAGG CTGGGCAACGCCTTC	chr2: 135,597,810-135,597,832	0/10
1.6	CCAGCAGGA AGGGAAA TGGCTCC	chr6: 1,082,237-1,082,259	0/10
1.7	CCTGCAGGATGGGA CACTCCACC	chr10: 57,594,822-57,594,844	0/10
1.8	CCTGCAGGA CTGGAAA TGCCTCC	chr13: 102,121,427-102,121,449	0/10
2.1	GGAAA ACTCTGCACAACCC TTGG	chr18: 41,820,912-41,820,934	0/10
2.2	AGAAAAGTTTGCACAAC TTTGGG	chr9: 117,853,303-117,853,325	0/10
2.3	GG CTAACTTTGCACAA TGTTGGG	chr11: 31,967,242-31,967,264	0/10
2.4	GG TAACTTTGCACAACG TTTGT	chr15: 2,132,713-2,132,735	0/10
2.5	GG CAA ACTTTGCACAAC ATTGGC	chr1: 94,964,610-94,964,632	0/10
2.6	GGAA ACCTTTGCACAA AGATGGG	chr2: 260,132,982-260,133,004	0/10

Table 3 PCR に用いた Primer の一覧

Target	Forward	Reverse	
Target 1	For #1, #4	5' -AGTTTCCATCAATAGCCATACCAA	5' -TCTCAGTGTACAAGTGTGACGAACA
	For #5	5' -TATTGATGCACACTATCTCCCTTGA	5' -AGGAGGCAAGTGAGAGATAGGATTT
	For #8	5' -ATCGAAGTGCTGAAAAGAATCTCAT	5' -TATAACCATGTTTTCTCTCCCAA
	For others	5' -AAAAGGAGAACAGGAGTTTTTGAAT	5' -TACAGTAGCTGAGTCAATGAGGTTG
Target 2	5' -GAATACCTTTGGGTGTGACTGTATC	5' -TACAGTTTTCCATTTCTGAAGAACC	
Target 1	Off-target1.1	5' -CCCAC TTCATAGATGAGA AACTGA	5' -CTGTAGCCAGGAAGTAAAGCTGTGT
	Off-target1.2	5' -CCTCCTATACAACCCACATGTTTCT	5' -TACATATCTTCCCAGCCAGTGATCT
	Off-target1.3	5' -AGGTCCCATCTCCTAGTCTCAAAGT	5' -TTCTTAGAAGTCTGATCCTGGCAGT
	Off-target1.4	5' -TAACACGAGCACAGGCAATTTATTA	5' -GCTTCTCTCTTTACACCACCACATT
	Off-target1.5	5' -TCACCGACCTAACATGTAAATCAAA	5' -GTGCAATGCTGATACATAATACACAA
	Off-target1.6	5' -AAAAAGGAAGGGTAAATAGCACGAC	5' -ACCCTTGCACTGAGAACACATATT
	Off-target1.7	5' -TGGCTAGTACATCAAGGTCTCTTGG	5' -CTTCCTCATTACTCAGACCCAAAAA
	Off-target1.8	5' -AATACGACCTAGGTTAGGTGGGAAG	5' -ACTCCCATACAGGTGCTATCAAGAG
Target 2	Off-target2.1	5' -ACTCAATTTTGACTGAAGACCAACC	5' -CATGCTCTTCCGGTAGGAGATAGTA
	Off-target2.2	5' -GCTACTTACCGTCAAATGAGTGGTA	5' -GCATAGGACTAGGAAGACATCCAGA
	Off-target2.3	5' -TTCTTTGACTGCCTTCATGATATT	5' -GGAGCGTTTCATATGTGAGATGAGAT
	Off-target2.4	5' -AAAAAGGTTCTCATTTCCCAAGTAGC	5' -TGGAATGACACAGAAAGAAATGAA
	Off-target2.5	5' -TAAGTGGTTTCAAACCCTAAGCTC	5' -GGCTTAAGTGGACAATCATTTCAACT
	Off-target2.6	5' -AAACAGACGTAGCCTTCTCAGGTAA	5' -GCGTGACACATATTTCTATCCTGTG
<i>Dmd</i> mRNA	5' -AAAGCAACACATAGACAACCTCTTC	5' -GTTTTACCATGATTTGTTCCCTTGT	
<i>Hprt</i> mRNA	5' -GCTGGTGAAAAGGACCTCT	5' -CACAGGACTAGAACRYCTGC	
<i>Sparc</i> exon7	5' -GGAAGAGTCTGGATCAGAGAGACAG	5' -GCTTAAGGAGAAGGCCTGTAACTC	

A) Target 1

chrX: 51,878,371-51,878,393

```

WT 5' CTTATTAATTGAAAGGGTCAAAT//CAGTGACCTGCAGGATGGGAAACGCCTCCCTGGA 3'
#1 CTTATTAATTG-----//-----GGAAACGCCTCCCTGGA -162 bp

#2, #3: unsuccessful

WT CATAGACAACCTCTTCAGTGACCTGCAGG//AATGAATATTTATATGTGGCTATATAA
#4 CATA-----//-----TGTGGCTATATAA -178 bp

WT AGTGACCTGCAGGATGGGAAACGCCTCC//ATAATTCATATTACAATTTTCATTTTTG
#5 AGTGAC-----//-----ACAATTTTCATTTTTG -566 bp

WT AGTGACCTGCAGGATGGGAAACGCCTCCCTGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCAAA
#6 AGTGACCTGCA-----ACGCCTCCTGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCAAA -9 bp
#7-1 AGTGACCTGC-----TGGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCAAA -18 bp

WT AGTGACCTGCAGGATGGGAAACGCCTCCCTG//TATTTCTTCTTTCTTTCTTTCCCA
#7-2 AGTGACCT-----//-----TCTTTCTTCTTTCTTTCCCA -73 bp

WT AGTGACCTGCAGGATGGGAAACGCCTCC//TTTTCATTTTTGCATTGTCTATCATGTG
#8 AGTGACCTGCA-----//-----TTGCATTGTCTATCATGTG -577 bp
#9-1 AGTGACC-----CCTCCTGGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCAAA -16 bp
#9-2 AGTGACCTGCA----tggaaACGCCTCCTGGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCAAA -9/+4 bp
#10 AGTGACCTGCAGggGGATGGGAAACGCCTCCTGGACCTCCTGGAAGGCCTGACAGGGCA +2 bp

```

B) Target 2

chrX: 52,203,342-52,203,364

```

WT 5' GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA 3'
#1-1 GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA
#1-2 GGAAAACTTTGCACA--GTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -2 bp
#1-3 GGAAAACTTTGCACAA--GTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -1 bp

#2: unsuccessful

#3-1 GGAAAACTTTG-----GGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -9 bp
#3-2 GGAAAACTTT-----TGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -9 bp

WT GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA
#4-1 GGAAAACTTTGCACAACG-----//-----GGGAAATTGTGAAGAGGCAGAT -186 bp
#4-2 GGAAAACTTTGT-----GGATAATT//GTATTGGGAAATTGTGAAGAGGCAGAT -10 bp

#5 GGAAAACTTTGCAC-----AAAACTTGAAAAGAGTTCAGCA -21 bp
#6 GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA
#7 GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA
#8 GGAAAACTTTG-----TTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -7 bp
#9-1 GGAAAACTTTGCACAACGTTGGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA
#9-2 GGAAAACTTTGCACAA-----GAGTTCAGCA -32 bp
#9-3 GGAAAACTTTGCACGA-----TGGATAATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -5 bp
#10-1 GGAAAACTTTGCACA-----AATTTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -10 bp
#10-2 GGAAAACTTTGCACAAA--TGGGAT---TTAACCCAAAAAAGAGTTCAGCA -5 bp

```

Fig. 3-1 CRISPR/Cas 法により導入した rat Dmd 遺伝子への変異

F0 オスラットの尻尾先端部ゲノムにおいて Exon3 (target1, A) および exon16 (target2, B) の領域をシーケンス解析した結果を示した。Target 領域はマゼンタで、PAM 配列は緑で示した。塩基置換はシアンで、挿入は紺で示した。

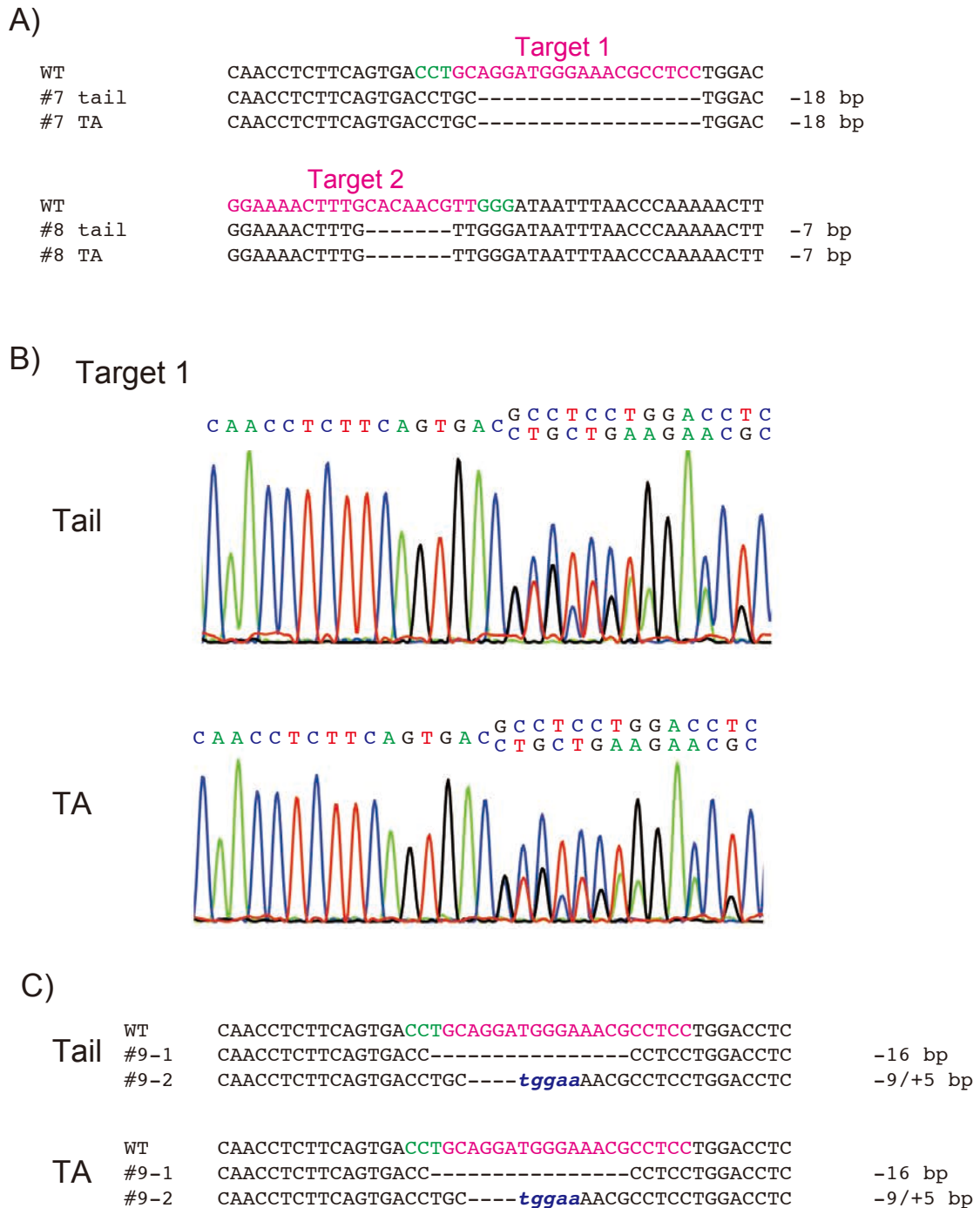
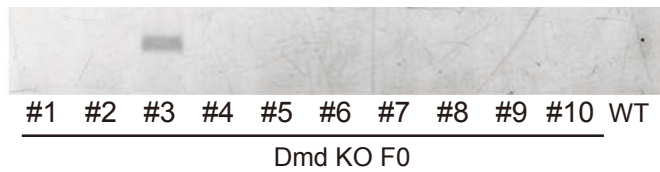
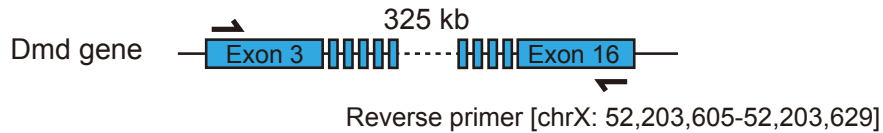


Fig. 3-2 CRISPR/Cas 法により導入された尻尾と前脛骨筋における変異

(A) 尻尾および TA より抽出したゲノムにおいて各 target 領域をシーケンスした結果。
 (B) 尻尾および TA より抽出したゲノムにおける、target1 領域の PCR 産物のダイレクト
 シーケンス結果。波形の重なりはモザイクを示す。
 (C) 尻尾および TA より抽出したゲノムにおける target1 領域の TA cloning 結果。

A)

Forward primer [chrX: 51,878,006-51,878,030]



B)

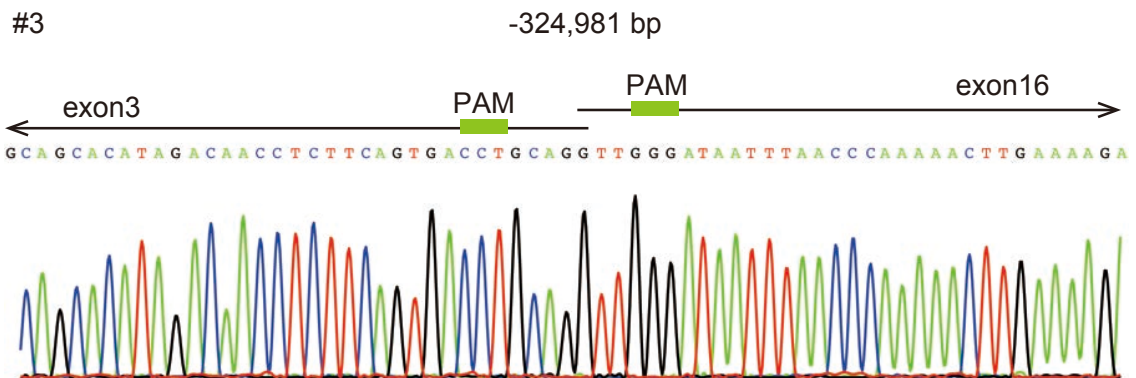


Fig. 3-3 CRISPR/Cas 法による rat Dmd 遺伝子での long deletion

- (A) Exon3 および Exon16 間においてのゲノム PCR 結果。
- (B) #3 においてみられたバンドをシーケンスした結果。

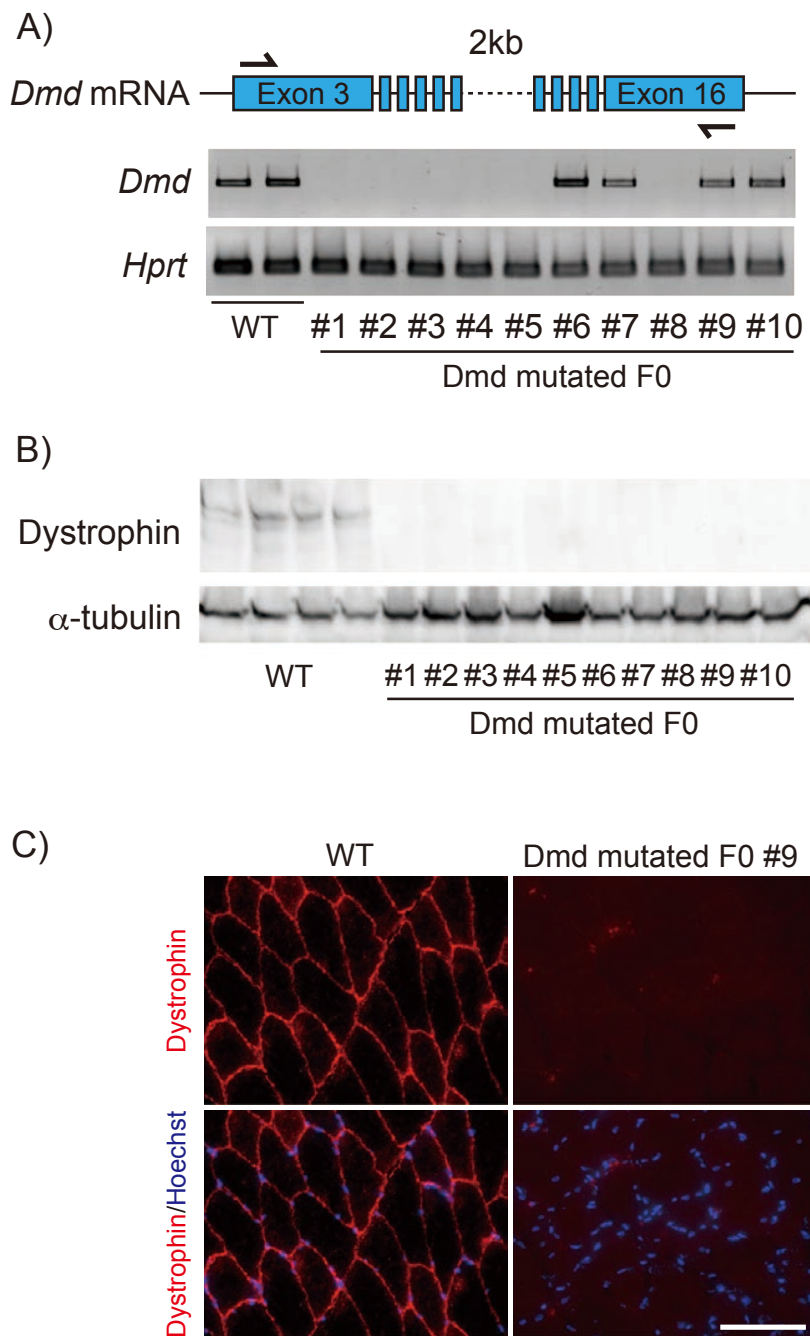


Fig. 3-4 *Dmd* 変異ラットにおける Dystrophin の発現

3 ヶ月齢の野生型および F0 オス *Dmd* 変異ラットの TA における Dystrophin の発現を、RT-PCR (A)、ウェスタンブロット (B) および免疫染色 (C) により評価した。

Scale bar = 100 μ m。

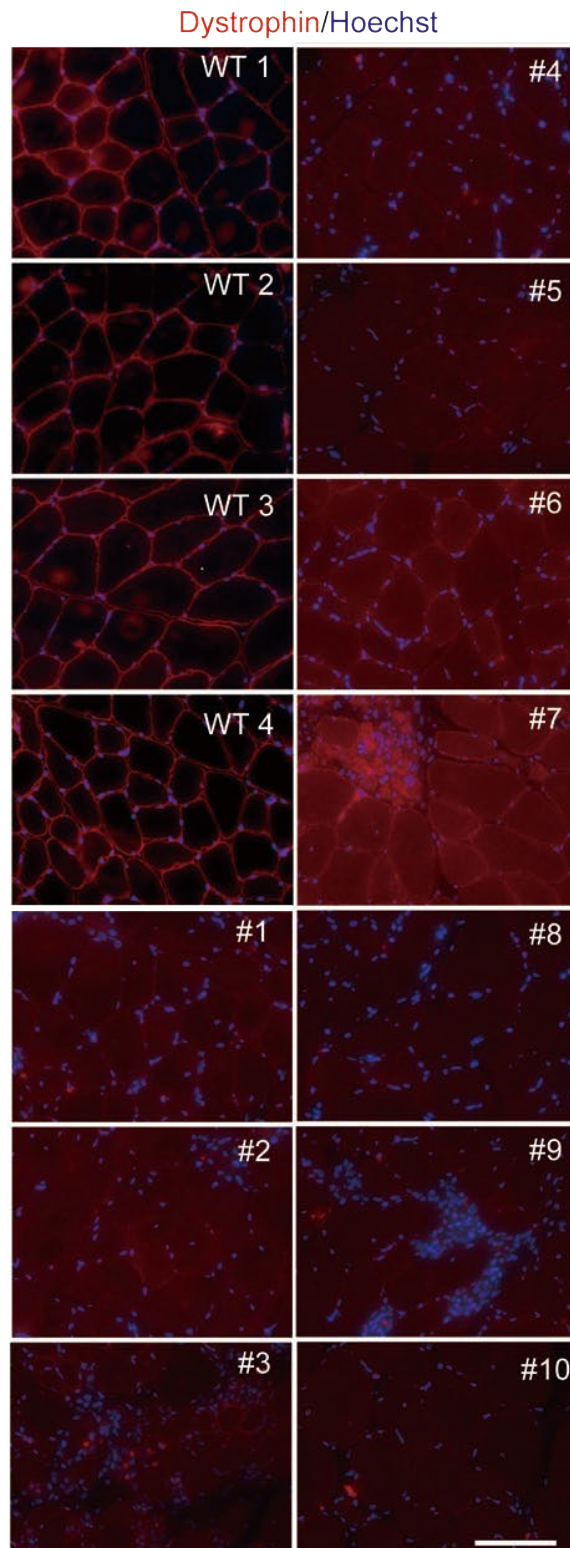


Fig. 3-5 Dmd 変異ラット TA における抗 Dystrophin 抗体を用いた免疫染色

野生型および F0 オス Dmd 変異ラット全 10 個体の TA において抗 Dystrophin ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。Scale bar = 100 μm 。

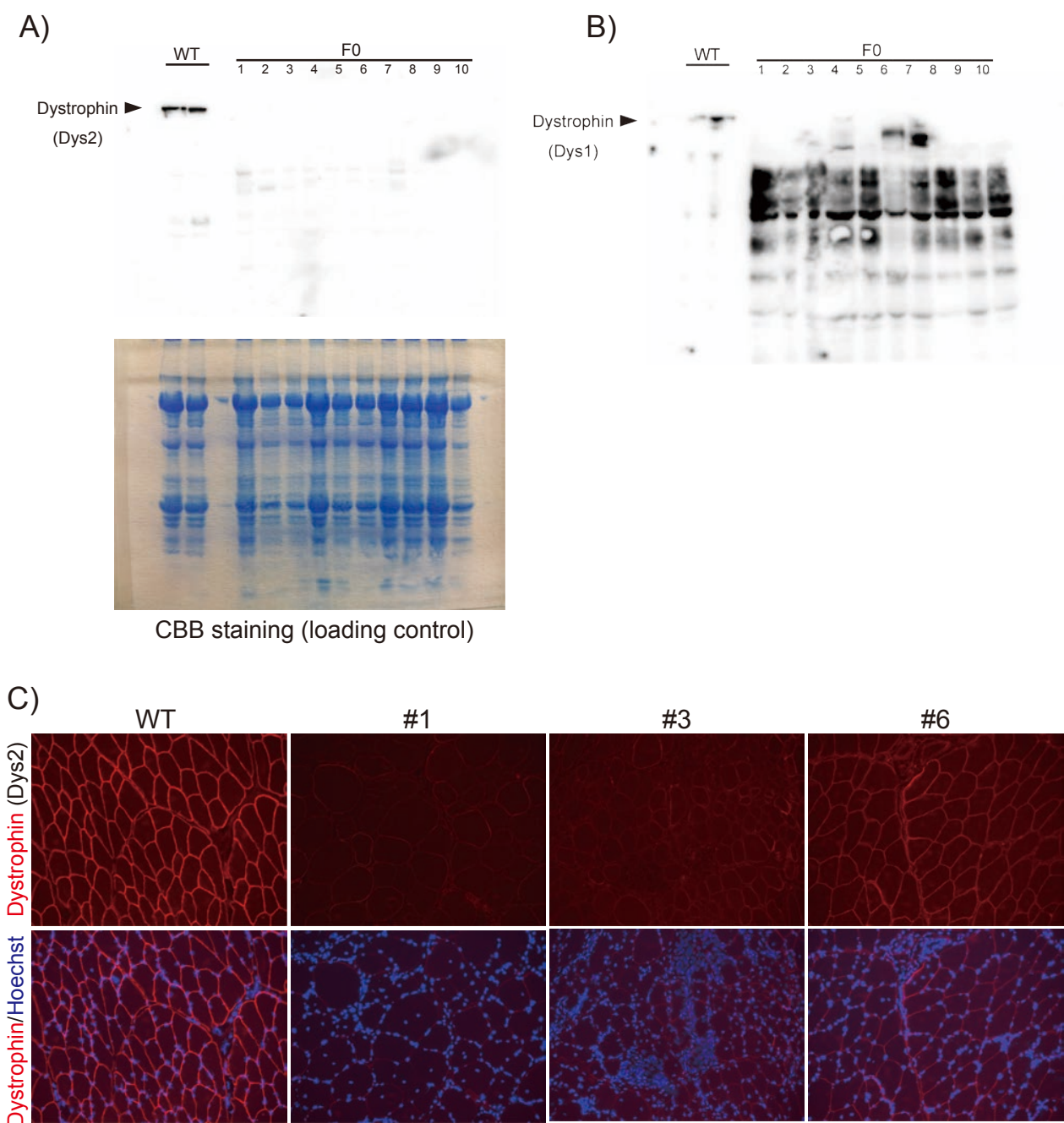


Fig. 3-6 抗 Dystrophin 抗体 Dys1 および Dys2 による Dmd 変異ラットでの Dystrophin タンパク質の検出

野生型および F0 オス Dmd 変異ラット全 10 個体の TA において Dys2 (A) および Dys1 (B) を用いたウェスタンブロット結果。Loading control として CBB 染色像を示した。(C) Dys2 による F0 オス Dmd 変異ラット TA における免疫染色像。

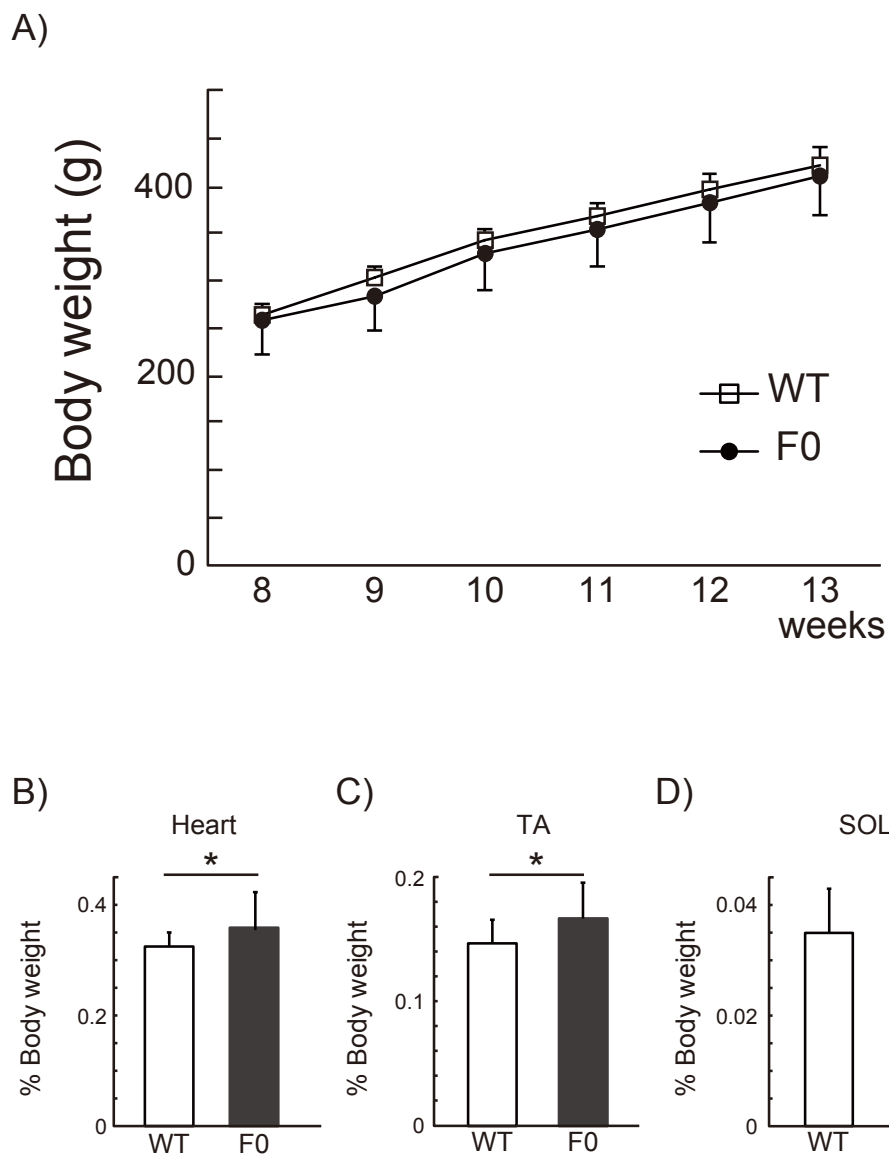


Fig. 3-7 Dmd 変異ラットにおける体重の推移ならびに各組織重量の変化

(A) 野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットの体重の変化をグラフ化した。
 野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットの心臓 (B)、前脛骨筋 (TA、C) および
 ヒラメ筋 (SOL、D) 重量をグラフ化した。WT: n = 4、F0: n = 10。
 *: p < 0.05。

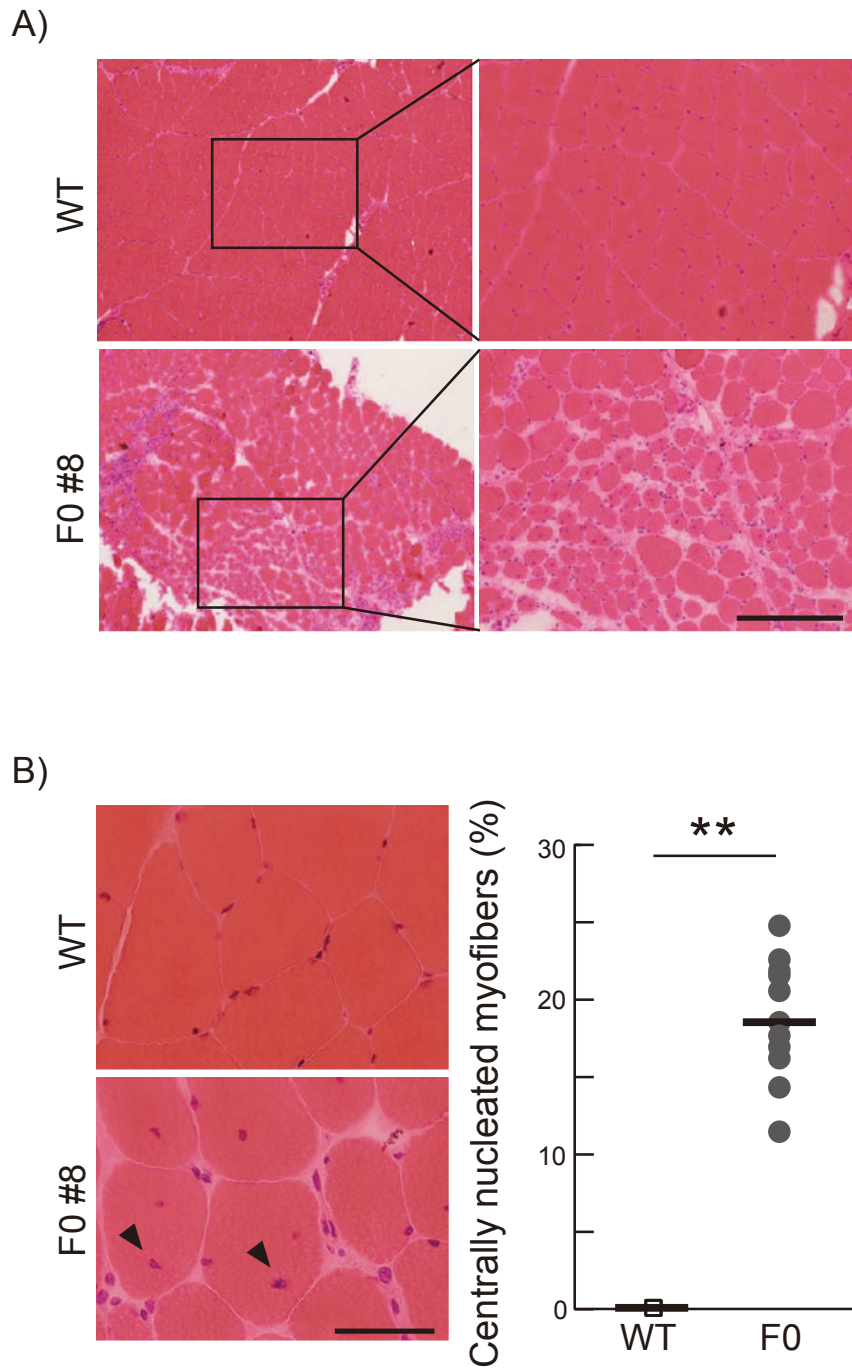


Fig. 3-8 Dmd 変異ラットにおける前脛骨筋の組織学的変化

(A) 3 ヶ月齢の野生型および F0 オス Dmd 変異ラットの TA における HE 染色像。
Scale bar = 100 μm 。

(B) HE 染色像において中心核を有する筋線維数を定量した結果。グラフ中の bar
は平均値を表す。Scale bar = 50 μm 。WT: n = 4、F0: n = 10。**: p < 0.01。

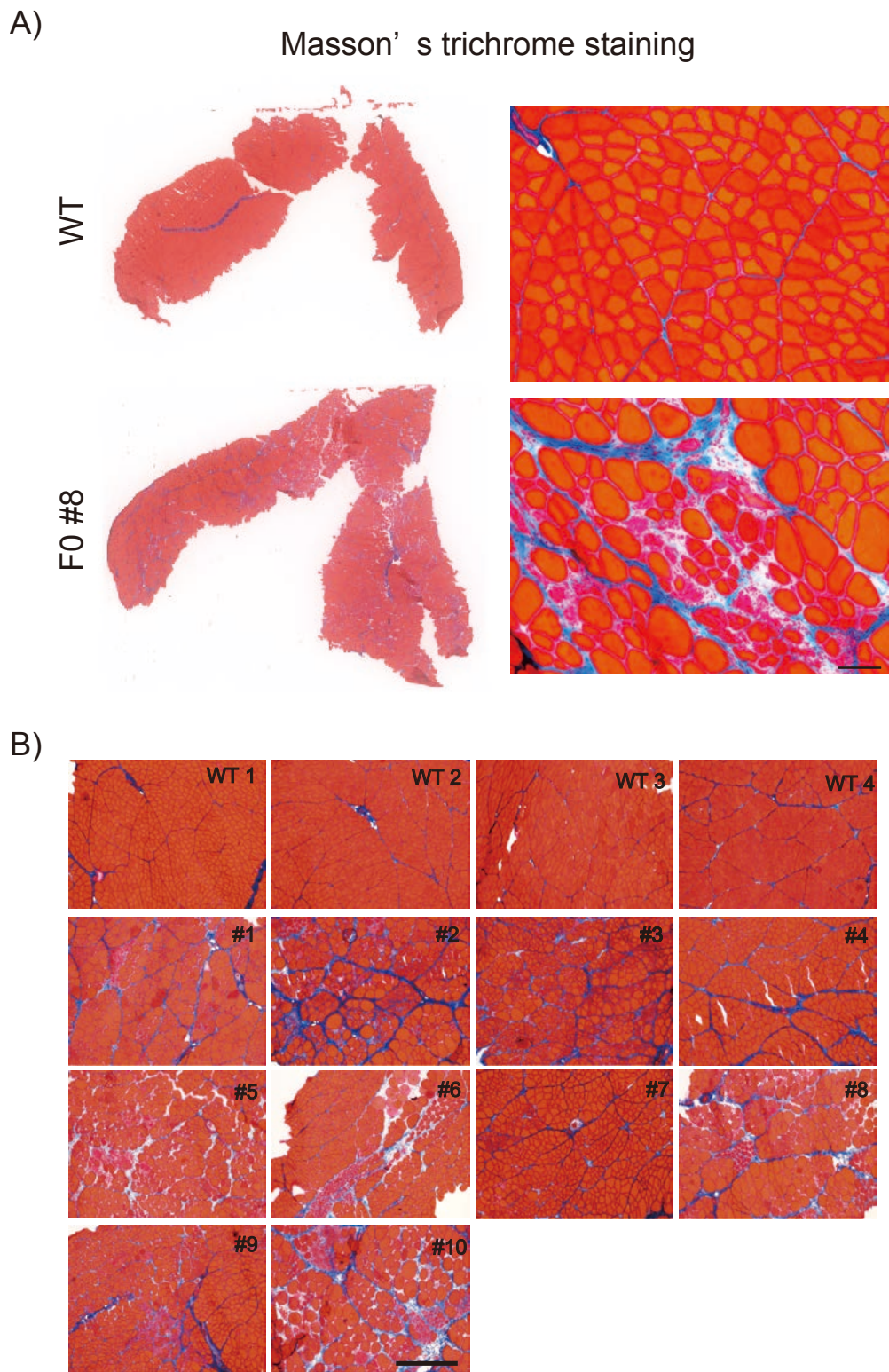


Fig. 3-9 Dmd 変異ラット前脛骨筋における線維化の亢進

(A)3 ヶ月齢の野生型および F0 オス Dmd 変異ラットの TA における Masson' s trichrome 染色の典型像。Scale bar = 100 μm 。

(B)3 ヶ月齢の野生型および F0 オス Dmd 変異ラット全 10 個体の TA における Masson' s trichrome 染色の典型像。Scale bar = 500 μm 。

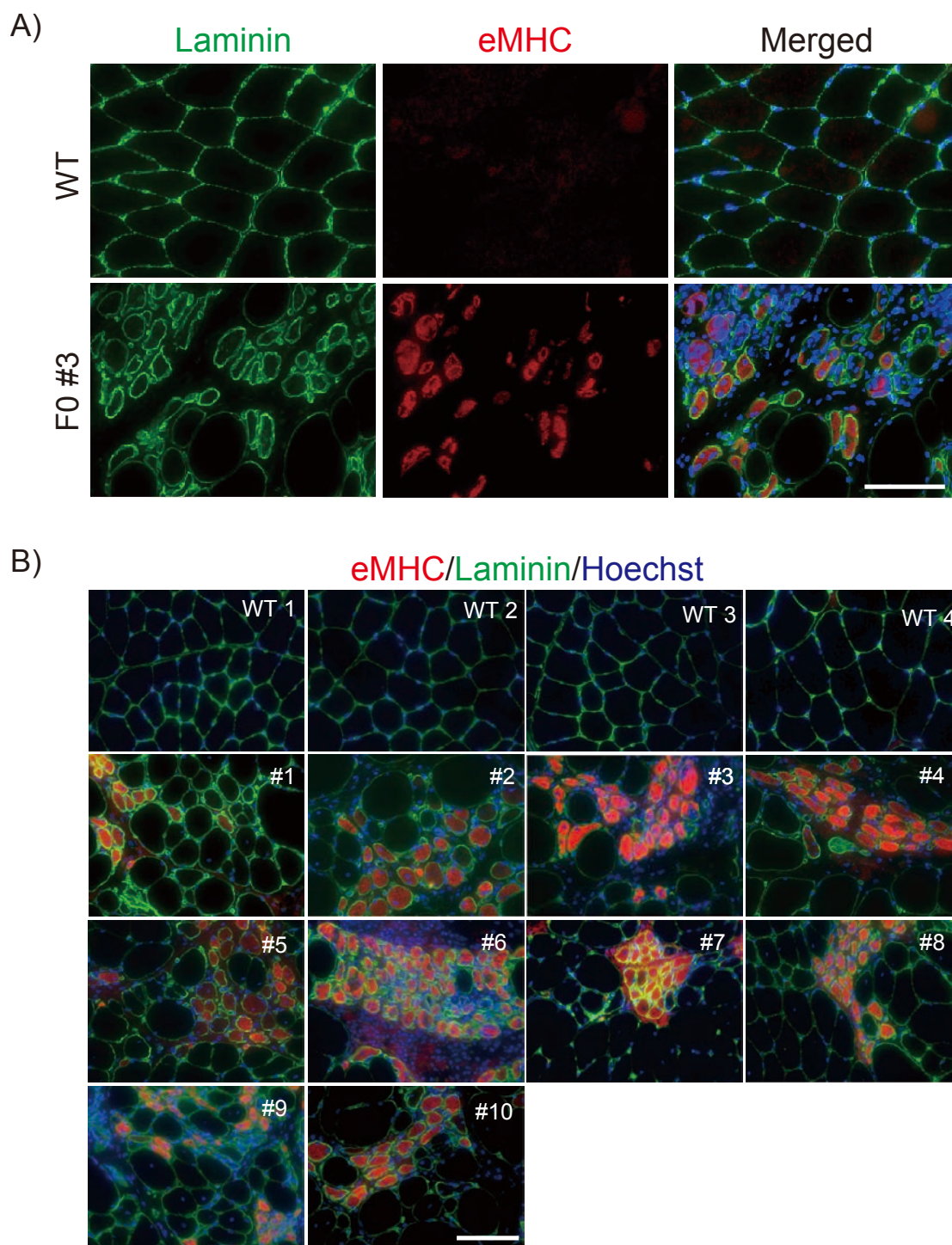


Fig. 3-10 Dmd 変異ラット前脛骨筋における筋線維の再生像

(A) 3 ヶ月齢の野生型および F0 オス Dmd 変異ラットの TA における eMHC に対する免疫染色像。Scale bar = 100 μm 。

(B) 3 ヶ月齢の野生型および F0 オス Dmd 変異ラット全 10 個体の TA における eMHC に対する免疫染色像。Scale bar = 100 μm 。

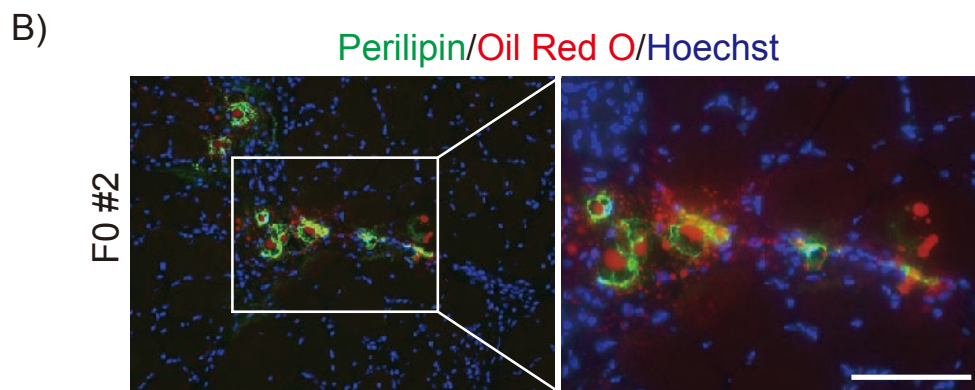
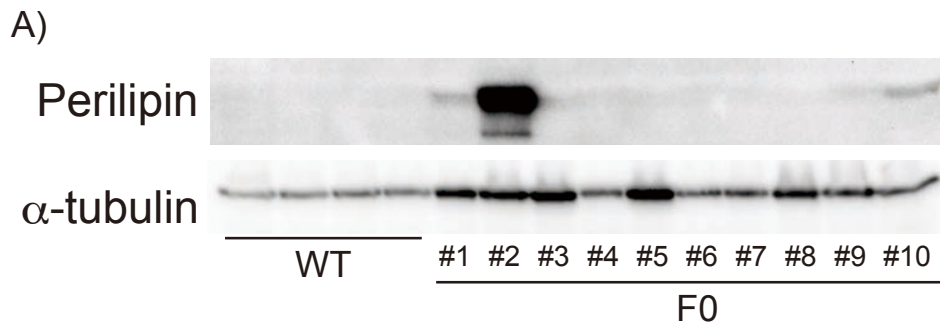


Fig. 3-11 Dmd 変異ラット前脛骨筋における脂肪細胞の浸潤

(A)3 ヶ月齢の野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットの TA における Perilipin の発現をウェスタンブロットにより評価した。

(B)Perilipin の発現がみられた個体の TA において Perilipin に対する免疫染色および Oil Red O 染色を行った。Scale bar = 100 μ m。

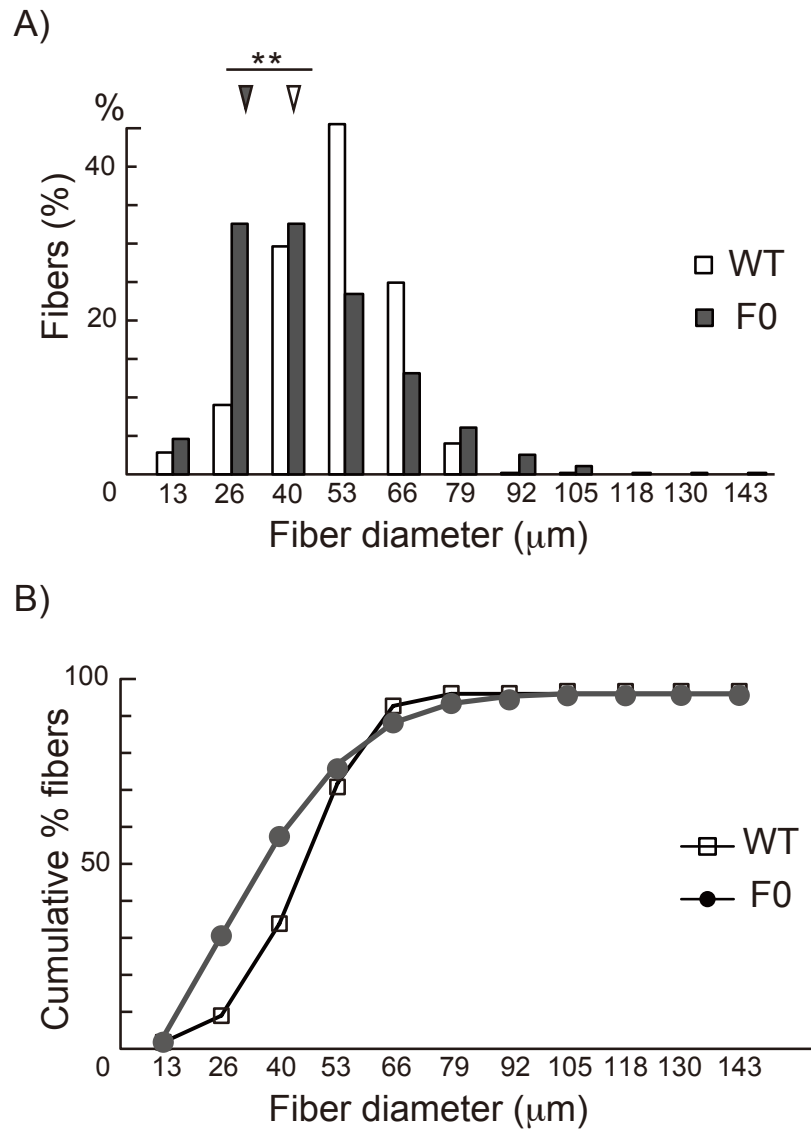


Fig. 3-12 Dmd 変異ラット前脛骨筋における筋線維直径の分布

3ヶ月齢の野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットのTAの各直径における筋線維の割合 (A) とその累積曲線 (B)。**： $p < 0.01$ 。

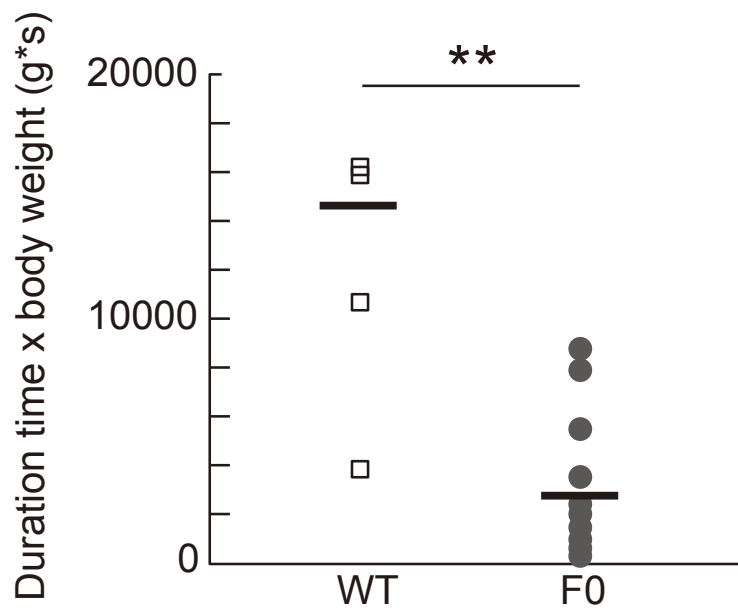


Fig. 3-13 Dmd 変異ラットでみられた筋力の低下

野生型および F0 オス Dmd 変異ラットそれぞれにおいてワイヤーハングテストを行い、その結果をグラフ化した。図中の bar は平均値を表す。

WT: n = 4、F0: n = 10。 **: p < 0.01。

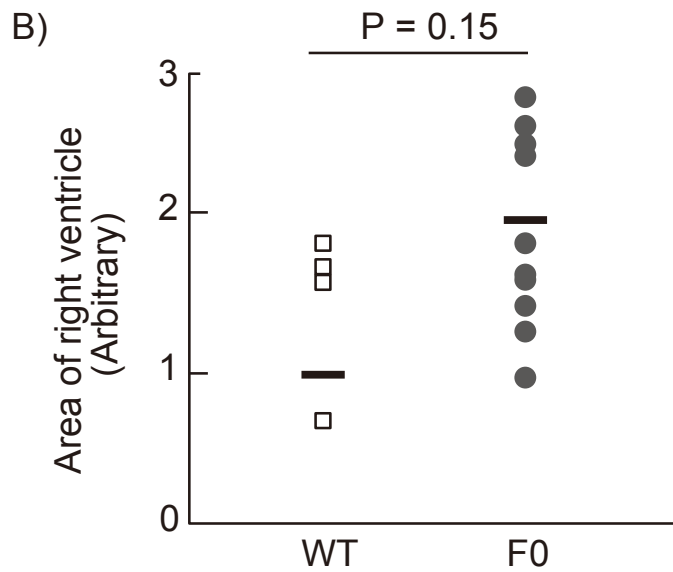
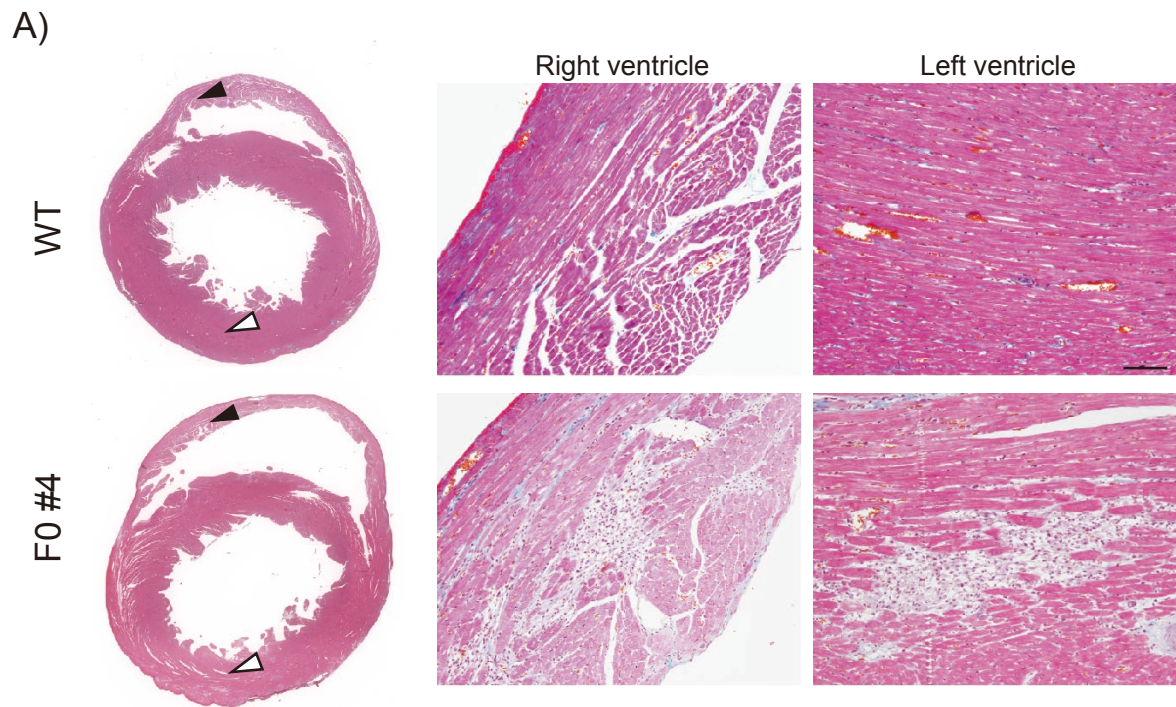


Fig. 3-14 Dmd 変異ラットにおける心筋の病変

(A) 野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットにおける心臓の Masson' s trichrome 染色像。黒矢頭は右心室壁を、白矢頭は左心室壁を示す。Scale bar = 100 μ m。

(B) 野生型およびF0 オス Dmd 変異ラットの心臓において、右心室壁と心室中隔によって囲まれる面積を定量したグラフ。図中の bar は平均値を表す。WT: n = 4、F0: n = 10。

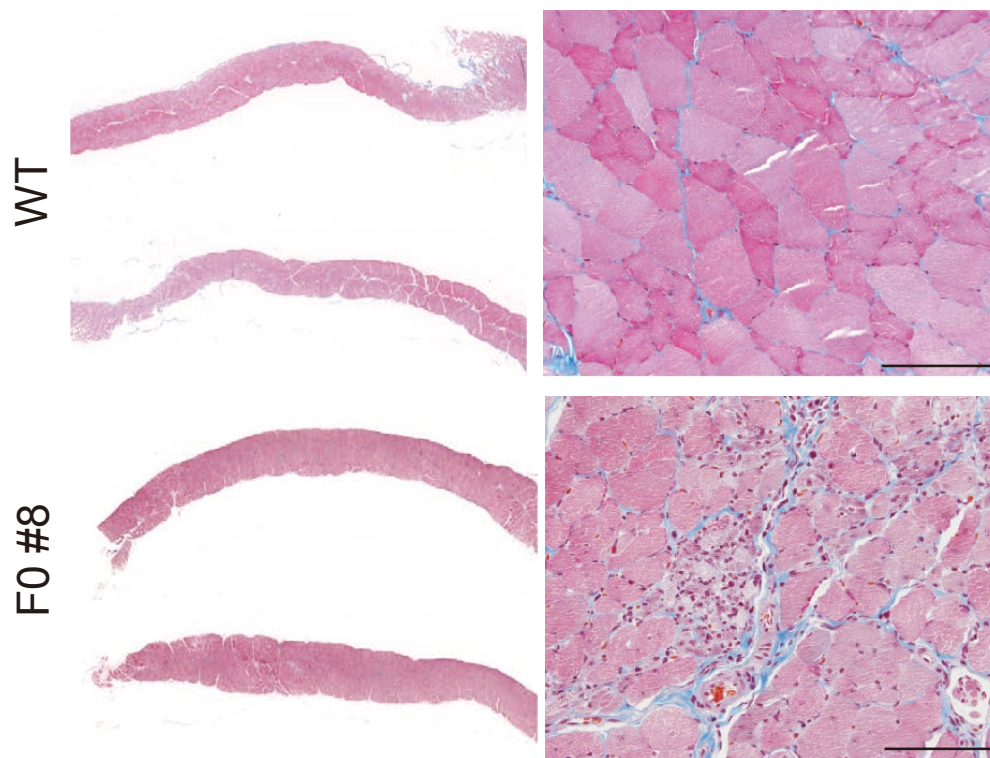


Fig. 3-15 Dmd 変異ラットの横隔膜における組織像

野生型および F0 オス Dmd 変異ラットの横隔膜における Masson' s trichrome 染色像。
Scale bar = 100 μm 。

A)

	Target2 PAM								
GTGGAT	GGAAAAC	TTTGCACAACGTTGGGATAA	WT	GTGGAT	GGAAAAC	TTTGCACA-ACGTTGGGATAA	WT		
GTGGAT	GGAAAAC	TTTG-----GGATAA	F0 mother	GTGGAT	GGAAAAC	TTTGCACA	tAAT	TTGGGATAA	#3
GTGGAT	GGAAAAC	TTTG-----GGATAA	#1	GTGGAT	GGAAAAC	TTTGCACA	tAAT	TTGGGATAA	#4
GTGGAT	GGAAAAC	TTTG-----GGATAA	#2	GTGGAT	GGAAAAC	TTTGCACA	tAAT	TTGGGATAA	#5
*****		*****		*****		*****	*	*****	

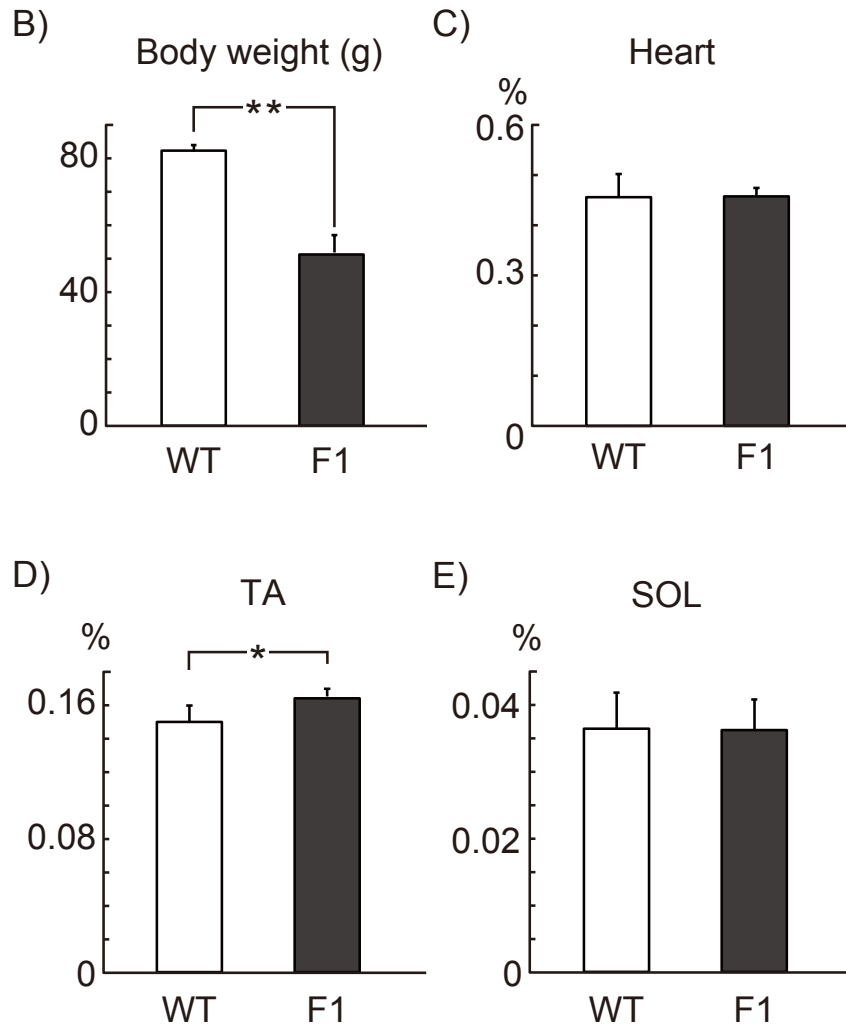


Fig. 3-16 rat Dmd 遺伝子変異の次世代への伝達

(A) F1 オスと交配に使用した F0 メスの target2 領域のシーケンス結果。
 1 ヶ月齢において野生型および F1 オス Dmd 変異ラットの体重 (A)、心臓 (B)、
 前脛骨筋 (TA、C) およびヒラメ筋 (SOL、D) 重量をグラフ化した。
 WT: n = 4、F1: n = 5。*: p < 0.05。

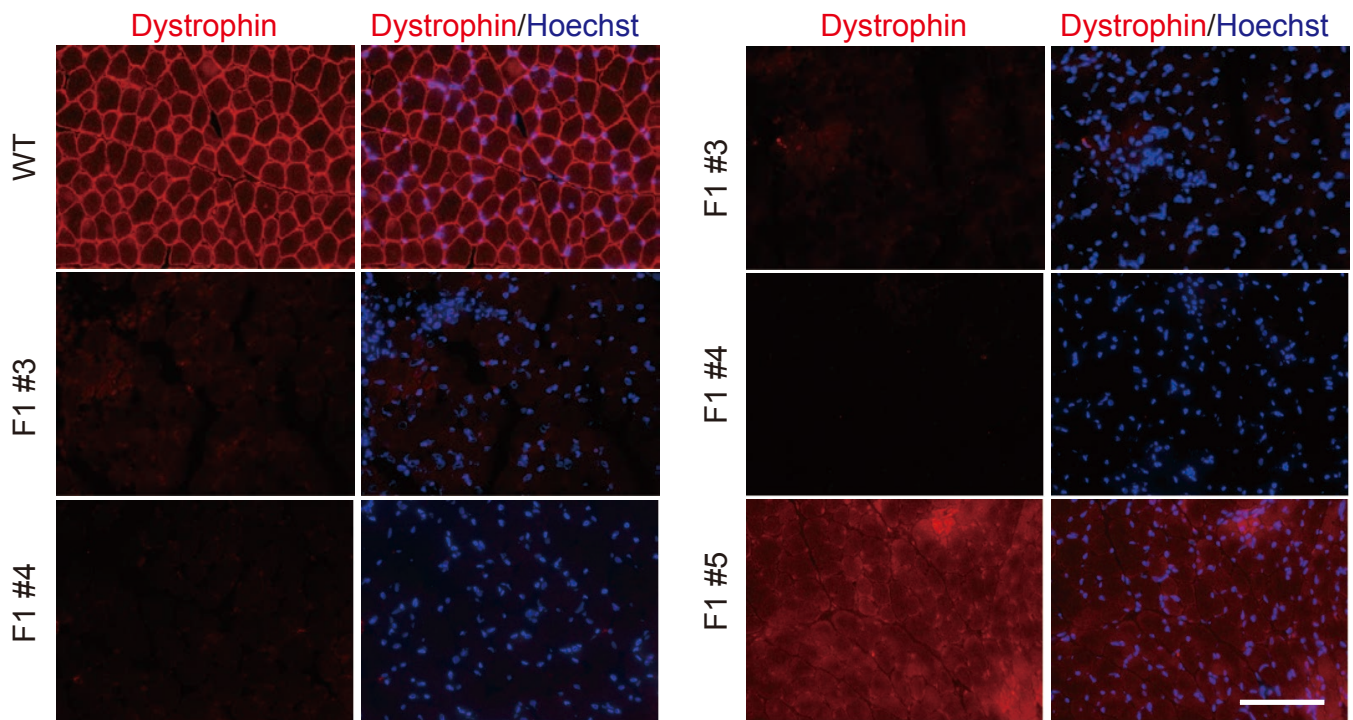


Fig. 3-17 F1 オス Dmd 変異ラットの前脛骨筋における
Dystrophin タンパク質の発現

(A) 1 ヶ月齢の野生型および F1 オス Dmd 変異ラット TA において抗 Dystrophin ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫染色を行った。Scale bar = 100 μm 。

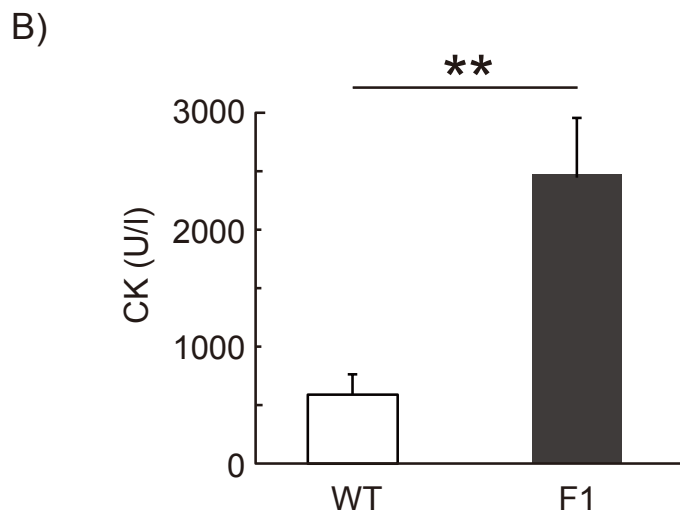
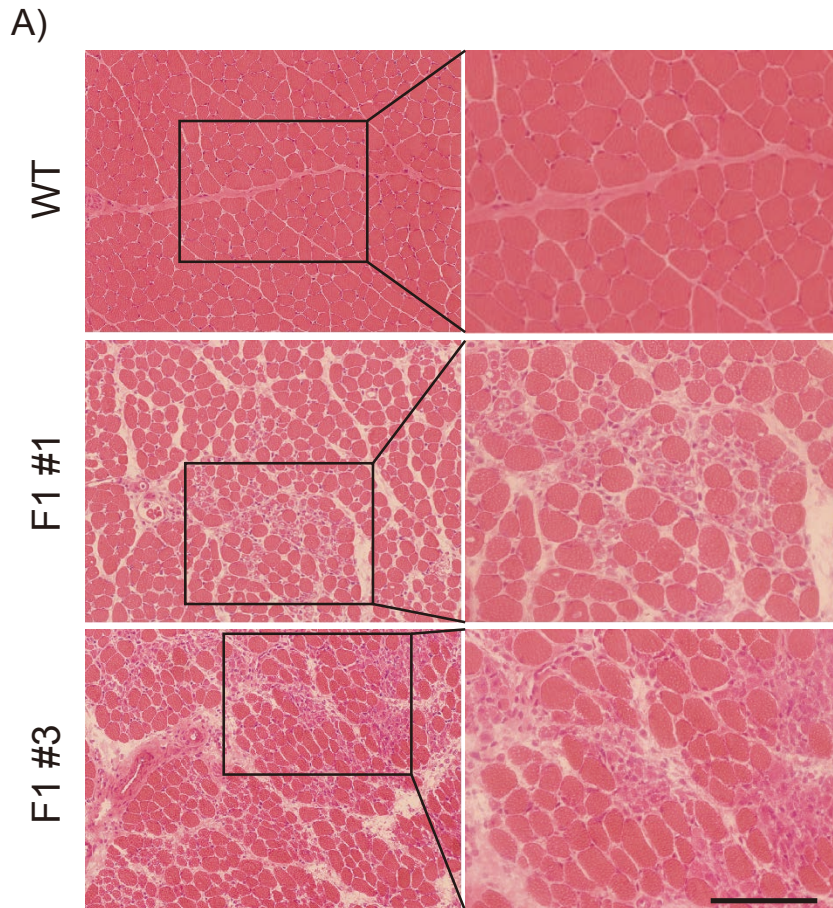


Fig. 3-18 F1 オス Dmd 変異ラットの前脛骨筋における筋線維の再生

(A) 1ヶ月齢の野生型およびF1 オス Dmd 変異ラット TA における HE 染色像。Scale bar = 100 μm 。

(B) 1ヶ月齢の野生型およびF1 オス Dmd 変異ラットにおける血清中の Creatinine Kinase 活性 (CK) の測定結果。WT: n = 3、F1: n = 5。**: p < 0.01。

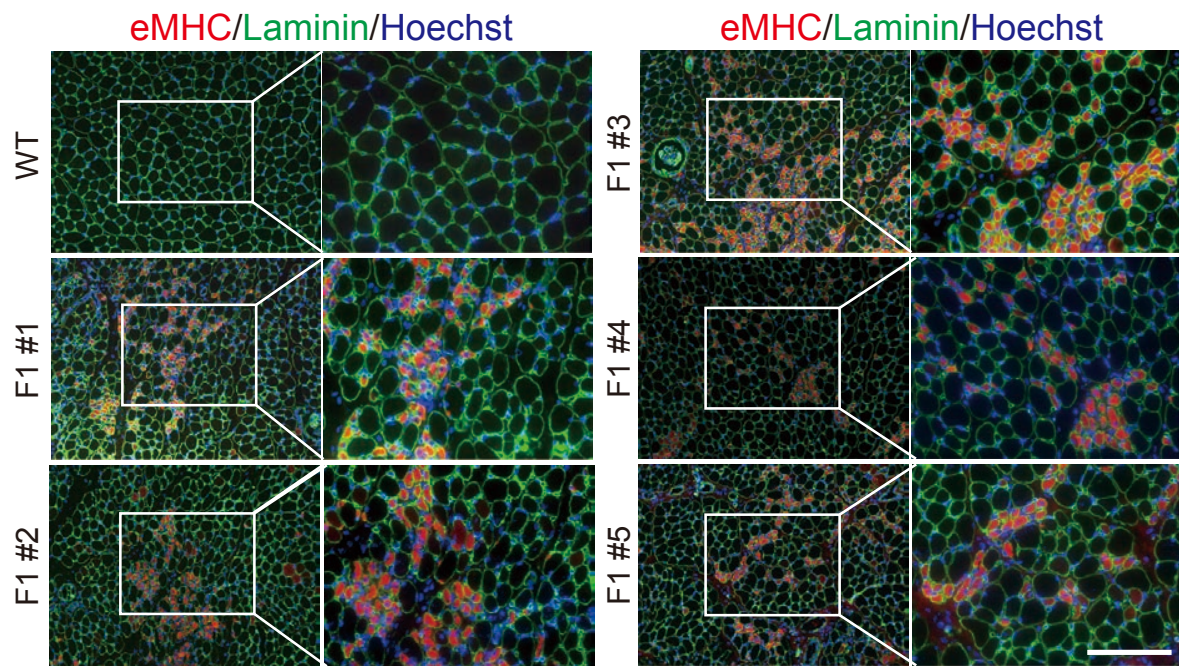


Fig. 3-19 F1 オス Dmd 変異ラットの前脛骨筋における筋線維の再生

1ヶ月齢の野生型およびF1 オス Dmd 変異ラット TA において eMHC および Laminin に対する免疫染色を行った。Scale bar = 100 μm 。

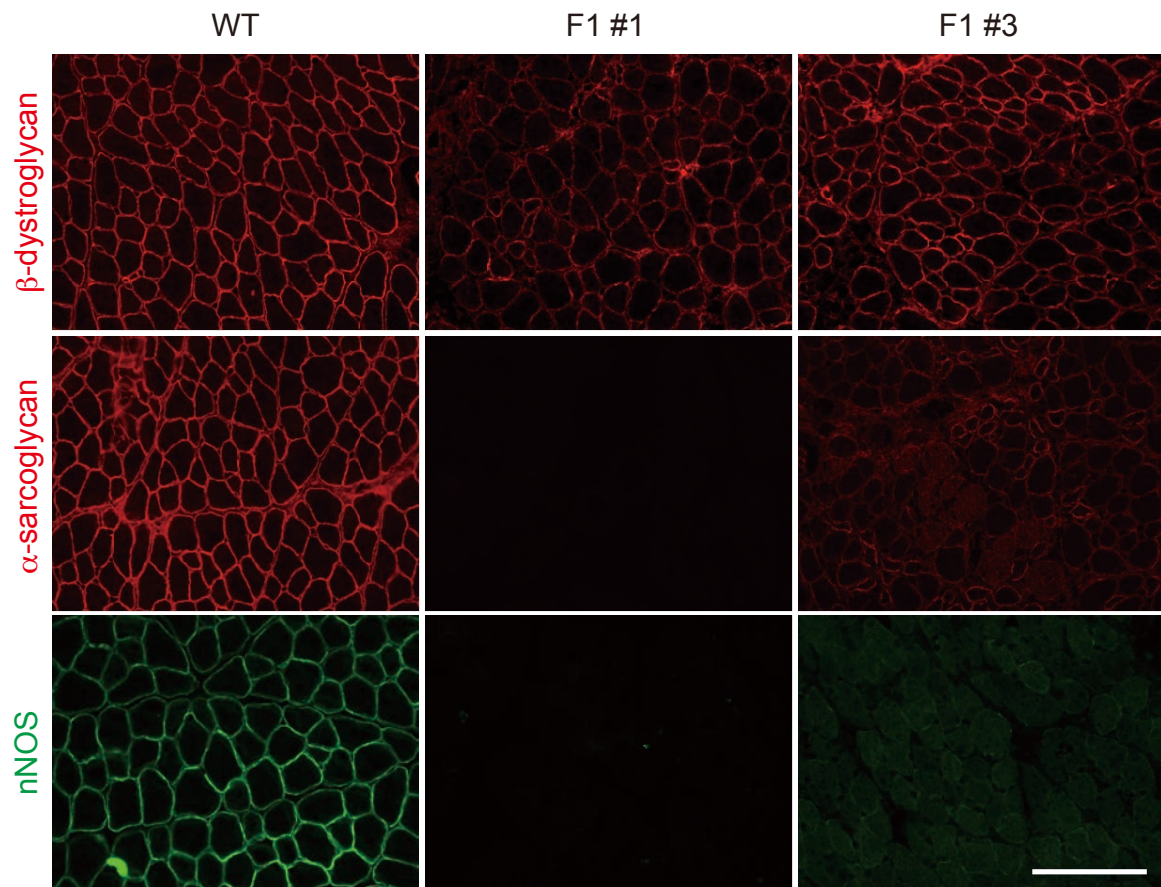


Fig. 3-20 F1 オス Dmd 変異ラット前脛骨筋における DGC 複合体因子の発現

1 ヶ月齢の野生型および F1 オス Dmd 変異ラット TA において免疫染色により β -dystroglycan、 α -sarcoglycan および nNOS の発現を調べた。Scale bar = 100 μ m。

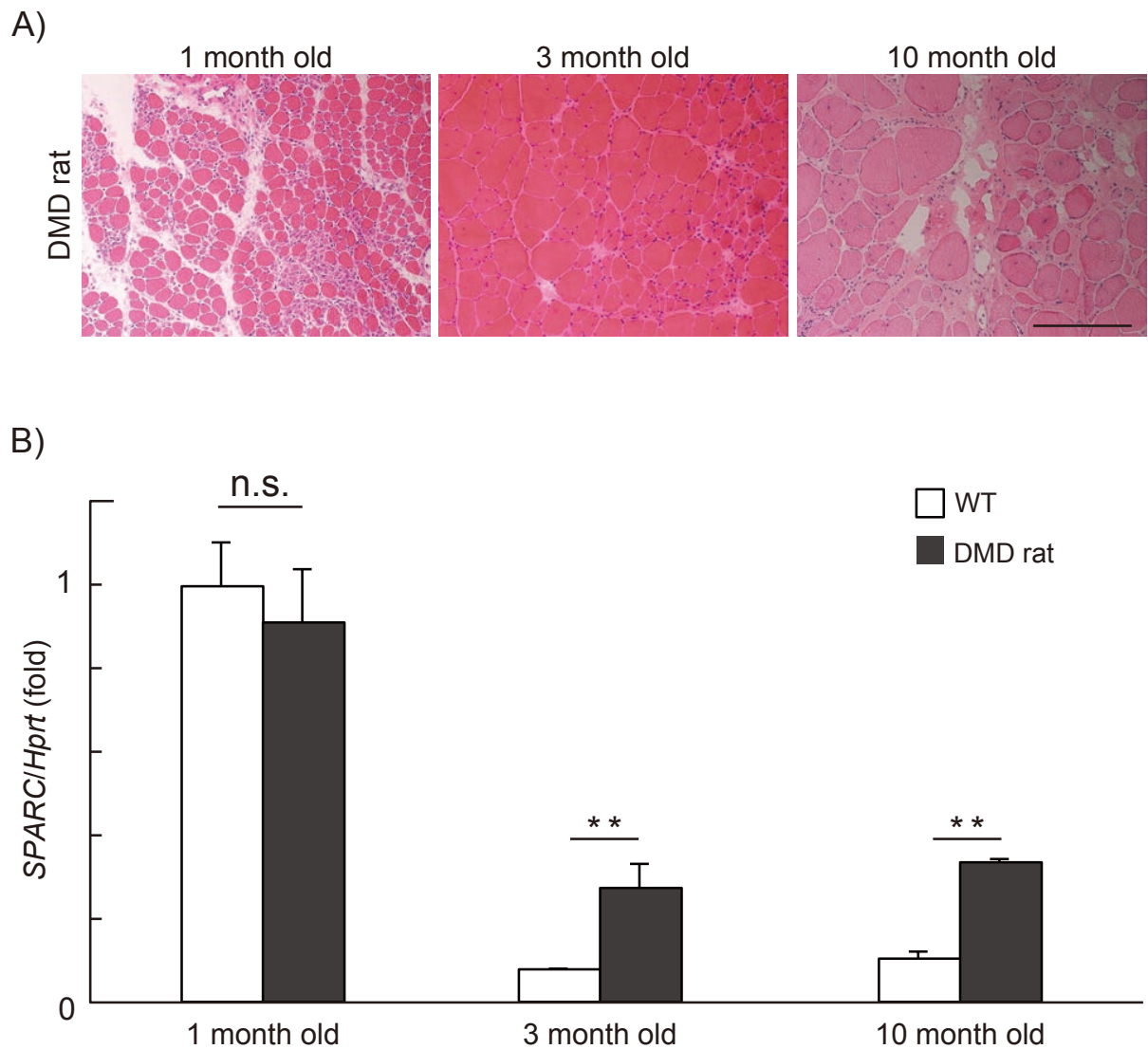


Fig. 3-21 DMD モデルラットにおける SPARC の mRNA 発現量

1、3 および 10 月齢の野生型 (WT) および out-of-frame *Dmd* 変異ラット (DMD rat) の TA における HE 染色像 (A) と SPARC の mRNA 発現量を qPCR により評価したもの (B)。Scale bar = 200 μ m。n = 3。**: p < 0.01。

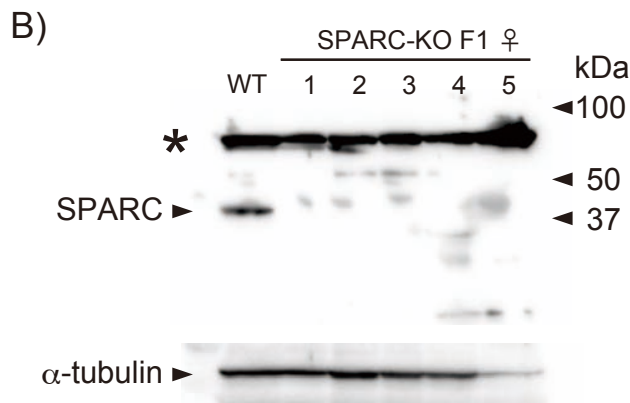
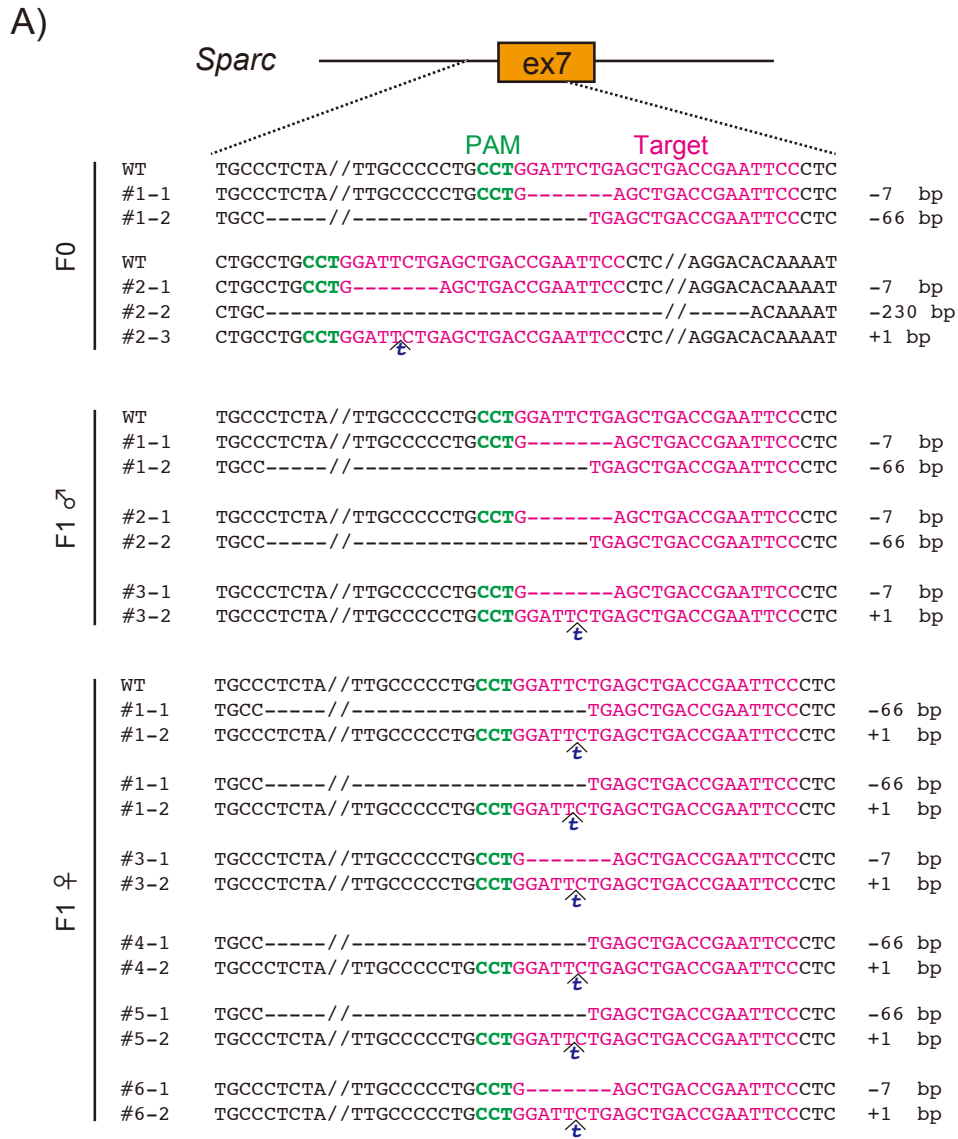


Fig. 3-22 CRISPR/Cas 法による SPARC-KO ラットの作成

(A) CRISPR/Cas 法により作出された SPARC-KO ラットの標的部位のシーケンス結果。

(B) F1 メス SPARC-KO ラット BPVC 投与 3 日後の TA における SPARC の発現をウェスタンブロットにより確認した。個体番号は (A) に示したものとは対応しない。*: 非特異的なバンド。

5 : BVPC 非投与。

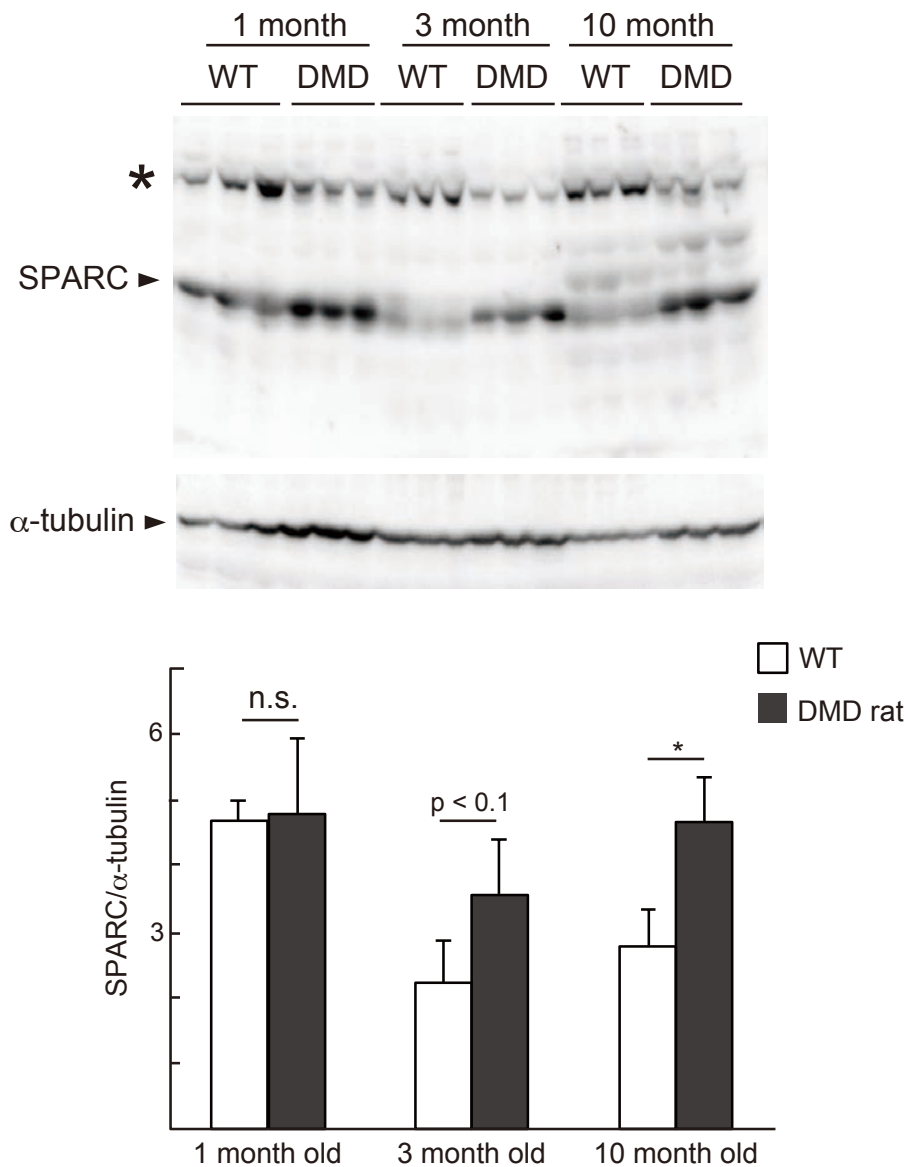


Fig. 3-23 DMD モデルラットにおける SPARC タンパク質の発現

1、3 および 10 ヶ月齢の野生型 (WT) および out-of-frame Dmd 変異ラット (DMD rat) の TA における SPARC の発現量をウェスタンブロットにより定量した。 n = 3。*: p < 0.05。

総括

SPARC の骨格筋における作用に関して、第一章では *in vivo* において SPARC が筋萎縮遺伝子 *atrogin1* の発現を抑制することで筋線維を保護する作用を持つこと、第二章では、骨格筋前駆細胞群 (SkM-PCs) では加齢に伴い SPARC の分化能調節作用に対して反応性が低下すること、さらにはこの低下に SPARC の内在化機構とその加齢性変化が関与することを示した。そして第三章ではこれまで実験に広く用いられてきた *mdx* マウスに比べてヒトの病態をよく反映する DMD モデルラットを作成し、このラットを用いて DMD 病態における SPARC の発現動態を明らかにした。以上の結果から、骨格筋で発現する SPARC は筋線維や筋衛星細胞、骨格筋内に存在する脂肪前駆細胞に作用し、骨格筋の恒常性を維持する作用を持ち、この SPARC の作用機構が破綻することがサルコペニアや DMD などの筋疾患の病態悪化に関与する可能性が示された (Fig. 4-1)。

本研究により脂肪分化に対する SPARC の作用機序とその加齢性変化については SPARC 内在化機構の関与が示唆された。一方で SPARC の筋分化に対する作用ならびにその加齢性変化についてはその作用機序も含め、詳細は依然として不明である。筋衛星細胞では細胞内への SPARC 取り込み量に加齢性変化がみられなかったことから、SPARC は脂肪分化抑制作用とは異なる機構で筋分化制御を行っているのかもしれない。骨格筋内に存在する脂肪前駆細胞 (FAPs) には筋衛星細胞の筋分化を促進する作用があること (Joe et al., 2010; Uezumi et al., 2010)、一方で、脂肪細胞が筋衛星細胞の筋分化を抑制することが報告されていることから (Takegahara et al., 2014)、筋衛星細胞の筋分化能を考える上で、FAPs との相互作用は無視できない。ショウジョウバエでは、多細胞組織を構築する際に異なる細胞間でみられる生存競争である細胞競合という現象の際に、勝者の細胞によってもたらされる細胞死から敗者の細胞を保護する作用をもつ因子として SPARC が同定された (Portela et al., 2010)。細胞競合の定義からは逸脱するが、神経細胞の樹状突起伸長に関して、神経栄養因子である Neutrophin とその受容体を発現する細胞と発現しない細胞を同一個体中に存在させるモザイクを再現した興味深い知見がある (Joo et al., 2014)。これによると、Neutrophin 受容体のノックアウトマウスでは樹状突起伸長は野生型に比

べて差異はないが、モザイク個体下において Neutrophin 受容体を持つ細胞が共存した場合、その受容体を持たない細胞の樹状突起の伸長が阻害される。これらを併せて考えると、脂肪前駆細胞において SPARC の内在化が亢進することで、共存する筋衛星細胞に対する SPARC の作用が失われ、その筋分化能を発揮できなくなるのかもしれない。もしこれが事実だとするならば、若齢時には SPARC の獲得には筋衛星細胞と脂肪前駆細胞間に競合はないが、内在化機構でみられたような加齢性変化によりこれらの細胞間に競合が生み出されることで、筋分化能の低下やそれに伴う筋再生能の低下が引き起こされるといった老化現象に対する見方もできる (Fig. 4-2)。筋衛星細胞と脂肪前駆細胞間の相互作用および細胞競合という観点から SPARC の関与を明らかにすることで、SPARC の筋分化制御機構について新しい知見が得られることを期待している。

次に第三章での、症状が重篤化した 10 ヶ月齢の DMD モデルラットにおいても SPARC の発現が亢進していた観察結果について考察したい。1961 年、初代培養細胞の増殖には分裂の限界があることが発見され (Hayflick and Moorhead, 1961)、この限界はヘイフリックの限界と名付けられた。この限界へと向かう進行は細胞老化とよばれ、DNA の末端に位置し、細胞分裂に従い短縮化することで細胞分裂の停止を引き起こすテロメアの減少により誘導される癌抑制遺伝子 p53、あるいは細胞外の種々のストレスにより誘導されるサイクリン依存性キナーゼインヒビターの p16 などの働きによって細胞増殖が停止する (Sherr & DePinho, 2000)。DMD においても、DMD 患者から単離した初代培養細胞中に含まれる筋芽細胞やそれ以外の細胞では分裂能が低下していること (Blau et al., 1983; Webster & Blau, 1990)、またテロメアの長さが DMD の病態進行によって短くなること (Decary et al., 2000)、そしてマウスにおいてテロメアの伸長を担うテロメラーゼの働きを抑制することで、mdx マウスの軽微な表現型が重篤化することが報告されている (Sacco et al., 2010)。Mdx マウスの骨格筋では、筋衛星細胞と同様に、筋線維の壊死に反応し FAPs の増殖能が促進される (Uezumi et al., 2011)。これらの知見を併せて考えると、DMD では断続的に発生する筋線維の壊死が引き金となり骨格筋中に存在しその再生を担う筋衛星細胞や FAPs など増殖能を有した細胞が盛んに増殖することにより、DMD 患者の骨格筋内で細胞老化が起こることが推察される。老齢マウスでも、30 ヶ月齢を過ぎた geriatric なマウスの骨格筋では、筋衛星細胞に細胞老化が起

こることが実験的に示されている (Sousa-Victor et al., 2014)。さらに、この老化細胞を生体から消失させることで、加齢に伴う筋線維の萎縮や運動機能の低下が回復すること (Baker et al., 2011)、また老化細胞は ECM 分解酵素や炎症性サイトカイン、成長因子を盛んに放出し、正常組織のニッチを変化させ、機能や構造に対し有害に作用することが明らかとなっている (Campisi, 2005; Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007)。これらの知見から、細胞老化は幹細胞を枯渇させるだけでなく、老化細胞自体が周囲の組織に悪影響を及ぼすことで個体の老化を引き起こしていると考えられる。以上のことから、加齢に伴い Skm-PCs において細胞老化が起こるとするならば、第二章で示した結果と同様に、SPARC に対する反応性は、病状が進行した DMD 患者の骨格筋でも低下することが予想される。10 ヶ月齢の DMD モデルラット骨格筋では、筋再生能が著しく低下し脂肪細胞の出現が顕著であるにもかかわらず、筋分化促進・脂肪分化抑制作用を持つ SPARC の発現量は増加していた。病態が進行した DMD モデルラットの Skm-PCs において SPARC の筋分化促進・脂肪分化抑制作用に対する反応性が低下したことにより、筋再生の低下や脂肪分化の促進を招いたと考えれば、前述した DMD モデルラットの表現型と SPARC の発現量の増加が説明できるものと思われる。

本稿の最後に、本研究を踏まえた上での骨格筋における SPARC の作用機序の解明について今後の展望に言及したい。線虫 (*Caenorhabditis elegans*) では、発生時に線虫体壁の筋細胞において SPARC の強い発現がみられるが、RNAi により SPARC の発現が抑制されると対照群に比べて体長が小さい個体あるいは発生時に致死になる (Fitzgerald & Schwarzbauer, 1998)。これとは対照的に、線虫よりも高等なマウスでは SPARC を欠損したものでも正常に出生し、筋骨格系に顕著な変化は示さない (Gilmour et al., 1998)。序論に述べたように、哺乳類のような高等動物では Hevin や SMOC といった、SPARC と高い相同性を示す SPARC ファミリータンパク質を有しており (Bradshaw, 2012)、一方で下等な線虫ではこのような SPARC ファミリーは存在しないとされている (Wilson et al., 2006)。このことから、進化の過程で SPARC の持つ作用がこれら SPARC ファミリーによって補完されるようになったと考えられる。したがって、哺乳類における SPARC の作用を考える上で SPARC ファミリーによる補完性は無視できない。この点にアプローチするため、近年開発された、簡便

に複数の遺伝子を標的とできる CRISPR/Cas 法に目をつけた。この手法では標的遺伝子に対して 100 数塩基の gRNA を一つ設計しこれを混ぜあわせて顕微注入するだけで、複数の遺伝子に変異を導入した個体を得られる。本研究においても 2 箇所を標的とし、得られた個体のうち約半数が 2 箇所とも変異が導入されたことを確認した。この手法を用いることで、SPARC と SPARC ファミリーを同時に欠損した個体が作成でき、骨格筋における SPARC の役割についてより詳細な知見が得られると思われる。本稿にデータは示さなかったが、本研究で作成された DMD モデルラットを用いて、DMD 病態下で SPARC とともに発現が上昇する SPARC ファミリー因子が複数すでに特定できている。またこれらの発現が上昇した複数の遺伝子に対して CRISPR/Cas 法を用いることで同時に変異を導入できることも確認している。ただし、この手法で複数の遺伝子を標的とした場合、その効率は著しく低下していた。また CRISPR/Cas 法に関しては in-frame 変異が混ざることや off-target 効果があること、さらに F0 ではモザイクが頻発する課題が残されている。ダブル KO、トリプル KO といった複数遺伝子を欠損した個体はこれまでそのほとんどがマウスを用いて行われてきた。しかし、今回、骨格筋の病態を反映させる上ではマウスよりもラットを用いた方がヒトに近い表現型を示すことが判明した。CRISPR/Cas 法が今後改良され、より簡便で効率のよいゲノム編集が可能となれば、3 つ以上の遺伝子の発現を同時に欠損したラットを得ることができであろう。そしてラットにおけるゲノム編集を通じてサルコペニアや DMD といったヒトの疾患への外挿可能な、SPARC ファミリーの存在によってこれまでマスクされていた骨格筋における SPARC の真の役割が明らかになることを期待している。

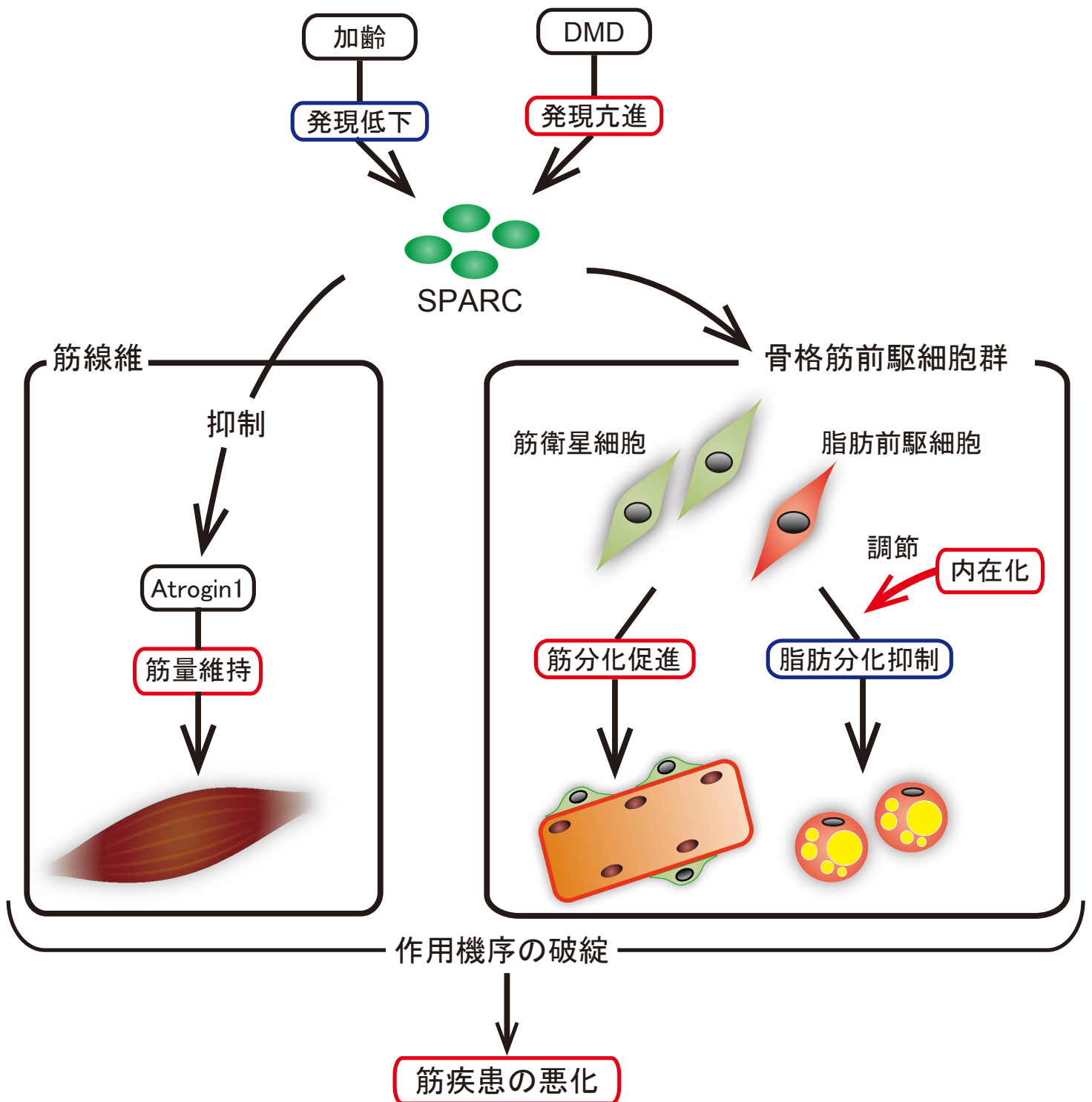


Fig. 4-1 骨格筋における SPARC の役割とその作用機構

SPARC は、atrogin1 の発現を抑制することで筋線維を萎縮から保護する作用を、また骨格筋前駆細胞群に対しては筋衛星細胞の筋分化促進、脂肪前駆細胞の脂肪分化を抑制することで骨格筋の恒常性を維持する作用を持つ。SPARC のこの作用が破綻することが筋疾患の病態悪化を引き起こす。

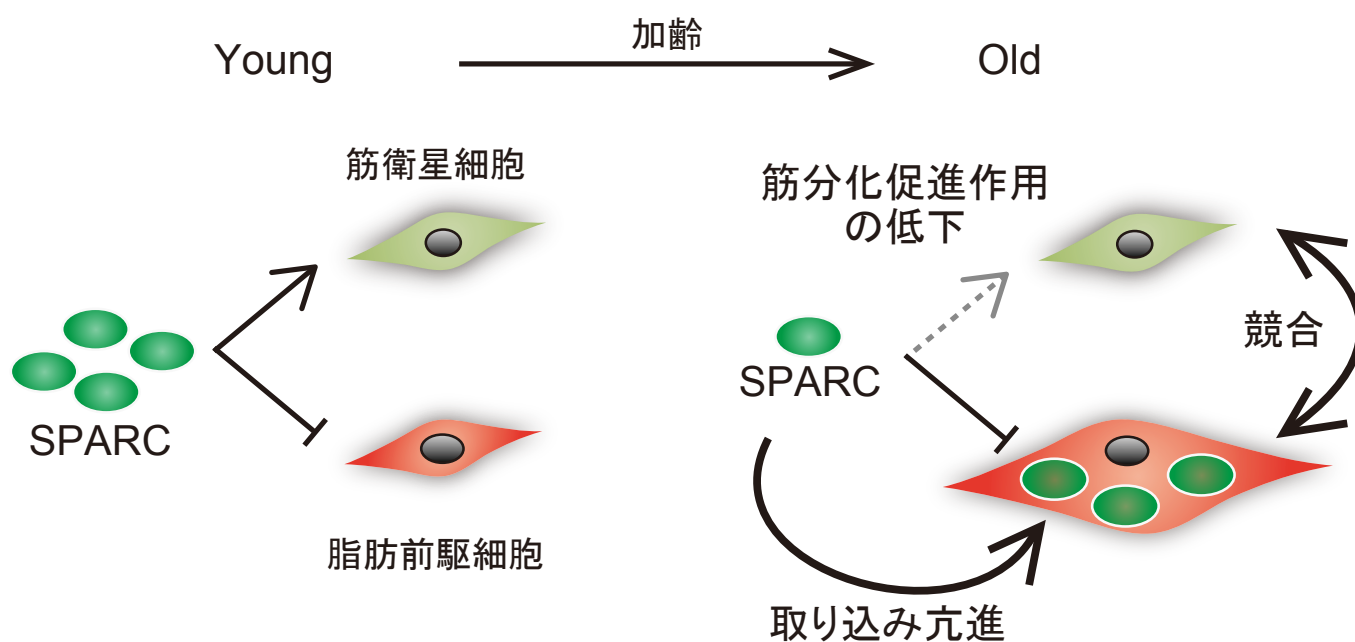


Fig. 4-2 細胞競合が SPARC の筋分化促進作用に対する
反応性低下に関与する可能性

脂肪前駆細胞における SPARC の取り込み亢進が筋分化促進作用を低下させる可能性を考えた。老齢個体中では SPARC の取り込みに関して筋衛星細胞と脂肪前駆細胞間で競合が起こり、脂肪前駆細胞において取り込みが亢進することで SPARC の筋衛星細胞に対する作用が低下する可能性が考えられる。

参考文献

Abbott, A., 2004. Laboratory animals: the Renaissance rat. *Nature*. 428, 464-6.

Anderson, J.L., Head, S.I., Rae, C. and Morley, J.W., 2002. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain*. 125, 4-13.

Anderson, J.E., 2006. The satellite cell as a companion in skeletal muscle plasticity: currency, conveyance, clue, connector and colander. *J Exp Biol*. 209, 2276-92.

Atorrasagasti, C., Peixoto, E., Aquino, J.B., Kippes, N., Malvicini, M., Alaniz, L., Garcia, M., Piccioni, F., Fiore, E.J., Bayo, J., Bataller, R., Guruceaga, E., Corrales, F., Podhajcer, O. and Mazzolini, G., 2013. Lack of the matricellular protein SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) attenuates liver fibrogenesis in mice. *PLoS One*. 8, e54962.

Baker, D.J., Wijshake, T., Tchkonina, T., LeBrasseur, N.K., Childs, B.G., van de Sluis, B., Kirkland, J.L. and van Deursen, J.M., 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*. 479, 232-6.

Banks, G.B. and Chamberlain, J.S., 2008. The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr Top Dev Biol*. 84, 431-53.

Beggs, A.H., Hoffman, E.P., Snyder, J.R., Arahata, K., Specht, L., Shapiro, F., Angelini, C., Sugita, H. and Kunkel, L.M., 1991. Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet*. 49, 54-67.

Beggs, M.L., Nagarajan, R., Taylor-Jones, J.M., Nolen, G., Macnicol, M. and Peterson, C.A., 2004. Alterations in the TGFbeta signaling pathway in myogenic progenitors with age. *Aging Cell*. 3, 353-61.

Beytia Mde, L., Vry, J. and Kirschner, J., 2012. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myol*. 31, 4-8.

Birkenmeier, E.H., Gwynn, B., Howard, S., Jerry, J., Gordon, J.I., Landschulz, W.H. and McKnight, S.L., 1989. Tissue-specific expression, developmental regulation, and genetic mapping of the gene encoding CCAAT/enhancer binding protein. *Genes & Development*. 3, 1146-1156.

Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E. and Davies, K.E., 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*. 82, 291-329.

Blaschuk, K.L. and Holland, P.C., 1994. The regulation of alpha 5 beta 1 integrin expression in human muscle cells. *Dev Biol*. 164, 475-83.

Blau, H.M., Webster, C. and Pavlath, G.K., 1983. Defective myoblasts identified in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80, 4856-60.

Blitzer, J.T. and Nusse, R., 2006. A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol*. 7, 28.

Bodine, S.C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V.K., Nunez, L., Clarke, B.A., Poueymirou, W.T., Panaro, F.J., Na, E., Dharmarajan, K., Pan, Z.Q., Valenzuela, D.M., DeChiara, T.M., Stitt, T.N., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J., 2001. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*. 294, 1704-8.

Bradshaw, A.D., 2012. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. *Int J Biochem Cell Biol*. 44, 480-8.

Bradshaw, A.D., Graves, D.C., Motamed, K. and Sage, E.H., 2003. SPARC-null mice exhibit increased adiposity without significant differences in overall body weight. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100, 6045-50.

Brekken, R.A. and Sage, E.H., 2001. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. *Matrix Biol*. 19, 816-27.

Bucci, C., Thomsen, P., Nicoziani, P., McCarthy, J. and van Deurs, B., 2000. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 11, 467-80.

Burks, T.N. and Cohn, R.D., 2011. One size may not fit all: anti-aging therapies and sarcopenia. *Aging (Albany NY)*. 3, 1142-53.

Burks, T.N. and Cohn, R.D., 2011. Role of TGF-beta signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle*. 1, 19.

Busch, E., Hohenester, E., Timpl, R., Paulsson, M. and Maurer, P., 2000. Calcium affinity, cooperativity, and domain interactions of extracellular EF-hands present in BM-40. *J Biol Chem*. 275, 25508-15.

Campisi, J., 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell*. 120, 513-22.

Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F., 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8, 729-40.

Carlson, B.M. and Faulkner, J.A., 1989. Muscle transplantation between young and old rats: age of host determines recovery. *Am J Physiol*. 256, C1262-6.

Carlson, M.E., Conboy, M.J., Hsu, M., Barchas, L., Jeong, J., Agrawal, A., Mikels, A.J., Agrawal, S., Schaffer, D.V. and Conboy, I.M., 2009. Relative roles of TGF-beta1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell*. 8, 676-89.

Caswell, P.T. and Norman, J.C., 2006. Integrin trafficking and the control of cell migration. *Traffic*. 7, 14-21.

Caswell, P.T., Vadrevu, S. and Norman, J.C., 2009. Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10, 843-53.

Chakkalakal, J.V., Jones, K.M., Basson, M.A. and Brack, A.S., 2012. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature*. 490, 355-60.

Cheetham, S., Tang, M.J., Mesak, F., Kennecke, H., Owen, D. and Tai, I.T., 2008. SPARC

promoter hypermethylation in colorectal cancers can be reversed by 5-Aza-2'deoxyctidine to increase SPARC expression and improve therapy response. *Br J Cancer*. 98, 1810-9.

Chlenski, A., Guerrero, L.J., Salwen, H.R., Yang, Q., Tian, Y., Morales La Madrid, A., Mirzoeva, S., Bouyer, P.G., Xu, D., Walker, M. and Cohn, S.L., 2011. Secreted protein acidic and rich in cysteine is a matrix scavenger chaperone. *PLoS One*. 6, e23880.

Cho, W.J., Kim, E.J., Lee, S.J., Kim, H.D., Shin, H.J. and Lim, W.K., 2000. Involvement of SPARC in in vitro differentiation of skeletal myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 271, 630-4.

Clark, R.A., 2008. Synergistic signaling from extracellular matrix-growth factor complexes. *J Invest Dermatol*. 128, 1354-5.

Clarke, B.A., Drujan, D., Willis, M.S., Murphy, L.O., Corpina, R.A., Burova, E., Rakhilin, S.V., Stitt, T.N., Patterson, C., Latres, E. and Glass, D.J., 2007. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*. 6, 376-85.

Clavel, S., Coldefy, A.S., Kurkdjian, E., Salles, J., Margaritis, I. and Derijard, B., 2006. Atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1 are up-regulated in aged rat Tibialis Anterior muscle. *Mech Ageing Dev*. 127, 794-801.

Cohen, S., Brault, J.J., Gygi, S.P., Glass, D.J., Valenzuela, D.M., Gartner, C., Latres, E. and Goldberg, A.L., 2009. During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*. 185, 1083-95.

Conboy, I.M., Conboy, M.J., Wagers, A.J., Girma, E.R., Weissman, I.L. and Rando, T.A., 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*. 433, 760-4.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A. and Zhang, F., 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 339, 819-23.

- Conner, S.D., and Schmid, S.L., 2003, Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422, 37-44.
- Davis, R.L., Weintraub, H. and Lassar, A.B., 1987. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 51, 987-1000.
- Decary, S., Hamida, C.B., Mouly, V., Barbet, J.P., Hentati, F. and Butler-Browne, G.S., 2000. Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord*. 10, 113-20.
- Delany, A.M., Amling, M., Priemel, M., Howe, C., Baron, R. and Canalis, E., 2000. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest*. 105, 1325.
- Disanza, A., Frittoli, E., Palamidessi, A. and Scita, G., 2009. Endocytosis and spatial restriction of cell signaling. *Mol Oncol*. 3, 280-96.
- Dityatev, A., Seidenbecher, C.I. and Schachner, M., 2010. Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci*. 33, 503-12.
- Du, J., Chen, X., Liang, X., Zhang, G., Xu, J., He, L., Zhan, Q., Feng, X.Q., Chien, S. and Yang, C., 2011. Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108, 9466-71.
- Duff, S.E., Li, C., Garland, J.M. and Kumar, S., 2003. CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*. 17, 984-92.
- 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.
- Elabd, C., Cousin, W., Upadhyayula, P., Chen, R.Y., Chooljian, M.S., Li, J., Kung, S., Jiang, K.P. and Conboy, I.M., 2014. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nat Commun*. 5, 4082.

Ervasti, J.M., 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 108-17.

Ezratty, E.J., Bertaux, C., Marcantonio, E.E. and Gundersen, G.G., 2009. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol.* 187, 733-47.

Feng, Y., Press, B. and Wandinger-Ness, A., 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol.* 131, 1435-52.

Fitzgerald, M.C. and Schwarzbauer, J.E., 1998. Importance of the basement membrane protein SPARC for viability and fertility in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 8, 1285-8.

Foletta, V.C., White, L.J., Larsen, A.E., Leger, B. and Russell, A.P., 2011. The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy. *Pflugers Arch.* 461, 325-35.

Forbes, G.B. and Reina, J.C., 1970. Adult lean body mass declines with age: some longitudinal observations. *Metabolism.* 19, 653-63.

Frydelund-Larsen, L., Penkowa, M., Akerstrom, T., Zankari, A., Nielsen, S. and Pedersen, B.K., 2007. Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol.* 92, 233-40.

Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. and Sander, J.D., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol.* 31, 822-6.

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

Fukada, S., Morikawa, D., Yamamoto, Y., Yoshida, T., Sumie, N., Yamaguchi, M., Ito, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K. and Yamamoto, H., 2010. Genetic background affects properties of satellite cells and mdx phenotypes. *Am J Pathol.* 176, 2414-24.

Geurts, A.M., Cost, G.J., Freyvert, Y., Zeitler, B., Miller, J.C., Choi, V.M., Jenkins, S.S., Wood, A., Cui, X., Meng, X., Vincent, A., Lam, S., Michalkiewicz, M., Schilling, R., Foeckler, J., Kalloway, S., Weiler, H., Menoret, S., Anegon, I., Davis, G.D., Zhang, L., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Urnov, F.D., Jacob, H.J. and Buelow, R., 2009. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science*. 325, 433.

Gilmour, D.T., Lyon, G.J., Carlton, M.B., Sanes, J.R., Cunningham, J.M., Anderson, J.R., Hogan, B.L., Evans, M.J. and Colledge, W.H., 1998. Mice deficient for the secreted glycoprotein SPARC/osteonectin/BM40 develop normally but show severe age-onset cataract formation and disruption of the lens. *EMBO J*. 17, 1860-70.

Glass, D.J., 2003. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat Cell Biol*. 5, 87-90.

Gopinath, S.D. and Rando, T.A., 2008. Stem cell review series: aging of the skeletal muscle stem cell niche. *Aging Cell*. 7, 590-8.

Gu, Z., Noss, E.H., Hsu, V.W. and Brenner, M.B., 2011. Integrins traffic rapidly via circular dorsal ruffles and macropinocytosis during stimulated cell migration. *J Cell Biol*. 193, 61-70.

Haber, C.L., Gottifredi, V., Llera, A.S., Salvatierra, E., Prada, F., Alonso, L., Sage, E.H. and Podhajcer, O.L., 2008. SPARC modulates the proliferation of stromal but not melanoma cells unless endogenous SPARC expression is downregulated. *Int J Cancer*. 122, 1465-75.

Haga, Y., Miwa, N., Jahangeer, S., Okada, T. and Nakamura, S., 2009. CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis. *EMBO J*. 28, 1197-207.

Hayflick, L. and Moorhead, P.S., 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25, 585-621.

Henderson, D.M., Belanto, J.J., Li, B., Heun-Johnson, H. and Ervasti, J.M., 2011. Internal

deletion compromises the stability of dystrophin. *Hum Mol Genet.* 20, 2955-63.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr. and Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell.* 51, 919-28.

Hu, Q., Moerman, E.J. and Goldstein, S., 1996. Altered expression and regulation of the alpha 5beta1 integrin-fibronectin receptor lead to reduced amounts of functional alpha5beta1 heterodimer on the plasma membrane of senescent human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res.* 224, 251-63.

Ikeda, A., Chang, K.T., Matsumoto, Y., Furuhata, Y., Nishihara, M., Sasaki, F. and Takahashi, M., 1998. Obesity and insulin resistance in human growth hormone transgenic rats. *Endocrinology.* 139, 3057-63.

Ikeda, A., Matsuyama, S., Nishihara, M., Tojo, H. and Takahashi, M., 1994. Changes in endogenous growth hormone secretion and onset of puberty in transgenic rats expressing human growth hormone gene. *Endocr J.* 41, 523-9.

Imanaka-Yoshida, K. and Aoki, H., 2014. Tenascin-C and mechanotransduction in the development and diseases of cardiovascular system. *Front Physiol.* 5, 283.

Jacob, H.J., 1999. Functional Genomics and Rat Models. *Genome Research.* 9, 1013-1016.

Jang, Y.C., Sinha, M., Cerletti, M., Dall'Osso, C. and Wagers, A.J., 2011. Skeletal muscle stem cells: effects of aging and metabolism on muscle regenerative function. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 76, 101-11.

Joe, A.W., Yi, L., Natarajan, A., Le Grand, F., So, L., Wang, J., Rudnicki, M.A. and Rossi, F.M., 2010. Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol.* 12, 153-63.

Jogo, M., Shiraishi, S. and Tamura, T.A., 2009. Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett.* 583, 2715-9.

Joo, W., Hippenmeyer, S. and Luo, L., 2014. Neurodevelopment. Dendrite morphogenesis depends on relative levels of NT-3/TrkC signaling. *Science*. 346, 626-9.

Jørgensen, L.H., Petersson, S.J., Sellathurai, J., Andersen, D.C., Thayssen, S., Sant, D.J., Jensen, C.H. and Schroder, H.D., 2009. Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) in human skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*. 57, 29-39.

Kamei, Y., Miura, S., Suzuki, M., Kai, Y., Mizukami, J., Taniguchi, T., Mochida, K., Hata, T., Matsuda, J., Aburatani, H., Nishino, I. and Ezaki, O., 2004. Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated Type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control. *J Biol Chem*. 279, 41114-23.

Kelly, K.A., Allport, J.R., Yu, A.M., Sinh, S., Sage, E.H., Gerszten, R.E. and Weissleder, R., 2007. SPARC is a VCAM-1 counter-ligand that mediates leukocyte transmigration. *J Leukoc Biol*. 81, 748-56.

Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Cirak, S., Glover, A., Guglieri, M., Feng, L., Hollingsworth, K.G., Hunt, D., Jungbluth, H., Roper, H.P., Quinlivan, R.M., Gosalakkal, J.A., Jayawant, S., Nadeau, A., Hughes-Carre, L., Manzur, A.Y., Mercuri, E., Morgan, J.E., Straub, V., Bushby, K., Sewry, C., Rutherford, M. and Muntoni, F., 2011. Muscle histology vs MRI in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*. 76, 346-53.

Koenig, M., Monaco, A.P. and Kunkel, L.M., 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*. 53, 219-28.

Kos, K. and Wilding, J.P., 2010. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 6, 225-35.

Kupprion, C., Motamed, K. and Sage, E.H., 1998. SPARC (BM-40, osteonectin) inhibits the mitogenic effect of vascular endothelial growth factor on microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 273, 29635-40.

Kzhyshkowska, J., 2006. Stabilin-1, a homeostatic scavenger receptor with multiple functions. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 10.

Kzhyshkowska, J., 2010. Multifunctional receptor stabilin-1 in homeostasis and disease. *ScientificWorldJournal*. 10, 2039-53.

Lagirand-Cantaloube, J., Offner, N., Csibi, A., Leibovitch, M.P., Batonnet-Pichon, S., Tintignac, L.A., Segura, C.T. and Leibovitch, S.A., 2008. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J*. 27, 1266-76.

Li, W., Teng, F., Li, T. and Zhou, Q., 2013. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*. 31, 684-6.

Li, Y.P., Chen, Y., John, J., Moylan, J., Jin, B., Mann, D.L. and Reid, M.B., 2005. TNF α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle. *FASEB J*. 19, 362-70.

Liberali, P., Kakkonen, E., Turacchio, G., Valente, C., Spaar, A., Perinetti, G., Bockmann, R.A., Corda, D., Colanzi, A., Marjomaki, V. and Luini, A., 2008. The closure of Pak1-dependent macropinosomes requires the phosphorylation of CtBP1/BARS. *EMBO J*. 27, 970-81.

Liu, J., DeYoung, S.M., Zhang, M., Zhang, M., Cheng, A. and Saltiel, A.R., 2005. Changes in integrin expression during adipocyte differentiation. *Cell Metab*. 2, 165-77.

Liu, W., Liu, Y., Lai, X. and Kuang, S., 2012. Intramuscular adipose is derived from a non-Pax3 lineage and required for efficient regeneration of skeletal muscles. *Dev Biol*. 361, 27-38.

Lundberg, I.E., 2000. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep*. 2, 216-24.

Mak, K.L., To, R.Q., Kong, Y. and Konieczny, S.F., 1992. The MRF4 activation domain is required to induce muscle-specific gene expression. *Mol Cell Biol*. 12, 4334-46.

Mali, P., Aach, J., Stranges, P.B., Esvelt, K.M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L. and Church, G.M., 2013a. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 31, 833-8.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E. and Church, G.M., 2013b. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339, 823-6.

Mauro, A., 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 9, 493-5.

Mendias, C.L., Gumucio, J.P., Davis, M.E., Bromley, C.W., Davis, C.S. and Brooks, S.V., 2012. Transforming growth factor-beta induces skeletal muscle atrophy and fibrosis through the induction of atrogen-1 and scleraxis. *Muscle Nerve.* 45, 55-9.

Moravec, R., Conger, K.K., D'Souza, R., Allison, A.B. and Casanova, J.E., 2012. BRAG2/GEP100/IQSec1 interacts with clathrin and regulates alpha5beta1 integrin endocytosis through activation of ADP ribosylation factor 5 (Arf5). *J Biol Chem.* 287, 31138-47.

Motamed, K., Blake, D.J., Angello, J.C., Allen, B.L., Rapraeger, A.C., Hauschka, S.D. and Sage, E.H., 2003. Fibroblast growth factor receptor-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation and the promotion of skeletal myoblast differentiation by SPARC: a role for protein kinase A. *J Cell Biochem.* 90, 408-23.

Nakamura, A. and Takeda, S., 2011. Mammalian models of Duchenne Muscular Dystrophy: pathological characteristics and therapeutic applications. *J Biomed Biotechnol.* 2011, 184393.

Nie, J., Chang, B., Traktuev, D.O., Sun, J., March, K., Chan, L., Sage, E.H., Pasqualini, R., Arap, W. and Kolonin, M.G., 2008. IFATS collection: Combinatorial peptides identify alpha5beta1 integrin as a receptor for the matricellular protein SPARC on adipose stromal cells. *Stem Cells.* 26, 2735-45.

Nie, J. and Sage, E.H., 2009a. SPARC functions as an inhibitor of adipogenesis. *J Cell Commun Signal.* 3, 247-54.

Nie, J. and Sage, E.H., 2009b. SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem.* 284, 1279-90.

Nishijo, K., Hosoyama, T., Bjornson, C.R., Schaffer, B.S., Prajapati, S.I., Bahadur, A.N., Hansen, M.S., Blandford, M.C., McCleish, A.T., Rubin, B.P., Epstein, J.A., Rando, T.A., Capecchi, M.R. and Keller, C., 2009. Biomarker system for studying muscle, stem cells, and cancer in vivo. *FASEB J.* 23, 2681-90.

Norose, K., Clark, J.I., Syed, N.A., Basu, A., Heber-Katz, E., Sage, E.H. and Howe, C.C., 1998. SPARC deficiency leads to early-onset cataractogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 2674-80.

Nowak, K.J. and Davies, K.E., 2004. Duchenne muscular dystrophy and dystrophin: pathogenesis and opportunities for treatment. *EMBO Rep.* 5, 872-6.

Pattison, J.S., Folk, L.C., Madsen, R.W., Childs, T.E. and Booth, F.W., 2003. Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracellular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiol Genomics.* 15, 34-43.

Petersson, S.J., Jørgensen, L.H., Andersen, D.C., Nørgaard, R.C., Jensen, C.H., Schröder, H.D., 2013. SPARC is up-regulated during skeletal muscle regeneration and inhibits myoblast differentiation. *Histol Histopathol.* 11, 1451-60.

Podhajcer, O.L., Benedetti, L.G., Girotti, M.R., Prada, F., Salvatierra, E. and Llera, A.S., 2008. The role of the matricellular protein SPARC in the dynamic interaction between the tumor and the host. *Cancer Metastasis Rev.* 27, 691-705.

Portela, M., Casas-Tinto, S., Rhiner, C., Lopez-Gay, J.M., Dominguez, O., Soldini, D. and Moreno, E., 2010. Drosophila SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition. *Dev Cell.* 19, 562-73.

Porter, P.L., Sage, E.H., Lane, T.F., Funk, S.E. and Gown, A.M., 1995. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem.* 43, 791-800.

Porter, P.L., Sage, E.H., Lane, T.F., Funk, S.E. and Gown, A.M., 1995. Distribution of SPARC in normal and neoplastic human tissue. *J Histochem Cytochem.* 43, 791-800.

Press, B., Feng, Y., Hoflack, B. and Wandinger-Ness, A., 1998. Mutant Rab7 causes the accumulation of cathepsin D and cation-independent mannose 6-phosphate receptor in an early endocytic compartment. *J Cell Biol.* 140, 1075-89.

Raines, E.W., Lane, T.F., Iruela-Arispe, M.L., Ross, R. and Sage, E.H., 1992. The extracellular glycoprotein SPARC interacts with platelet-derived growth factor (PDGF)-AB and -BB and inhibits the binding of PDGF to its receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89, 1281-5.

Rentz, T.J., Poobalarahi, F., Bornstein, P., Sage, E.H. and Bradshaw, A.D., 2007. SPARC regulates processing of procollagen I and collagen fibrillogenesis in dermal fibroblasts. *J Biol Chem.* 282, 22062-71.

Rivera, L.B. and Brekken, R.A., 2011. SPARC promotes pericyte recruitment via inhibition of endoglin-dependent TGF- β 1 activity. *J Cell Biol.* 193, 1305-19.

Rosen, G.D., Sanes, J.R., LaChance, R., Cunningham, J.M., Roman, J. and Dean, D.C., 1992. Roles for the integrin VLA-4 and its counter receptor VCAM-1 in myogenesis. *Cell.* 69, 1107-19.

Rosenberg, I.H., 1989, Summary comments. *Am J Clin Nutr* 50, 1231-1233

Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., Shkreli, M., Delp, S., Pomerantz, J.H., Artandi, S.E. and Blau, H.M., 2010. Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell.* 143, 1059-71.

Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., Walsh, K., Schiaffino, S., Lecker, S.H. and Goldberg, A.L., 2004. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* 117, 399-412.

Sartori, R., Milan, G., Patron, M., Mammucari, C., Blaauw, B., Abraham, R. and Sandri, M., 2009. Smad2 and 3 transcription factors control muscle mass in adulthood. *Am J Physiol Cell Physiol.*

296, C1248-57.

Sasaki, T., Gohring, W., Mann, K., Maurer, P., Hohenester, E., Knauper, V., Murphy, G. and Timpl, R., 1997. Limited cleavage of extracellular matrix protein BM-40 by matrix metalloproteinases increases its affinity for collagens. *J Biol Chem.* 272, 9237-43.

Sastry, S.K., Lakonishok, M., Thomas, D.A., Muschler, J. and Horwitz, A.F., 1996. Integrin alpha subunit ratios, cytoplasmic domains, and growth factor synergy regulate muscle proliferation and differentiation. *J Cell Biol.* 133, 169-84.

Schmalbruch, H. and Lewis, D.M., 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve.* 23, 617-26.

Scime, A., Desrosiers, J., Trenz, F., Palidwor, G.A., Caron, A.Z., Andrade-Navarro, M.A. and Grenier, G., 2010. Transcriptional profiling of skeletal muscle reveals factors that are necessary to maintain satellite cell integrity during ageing. *Mech Ageing Dev.* 131, 9-20.

Sekiguchi, M., Zushida, K., Yoshida, M., Maekawa, M., Kamichi, S., Yoshida, M., Sahara, Y., Yuasa, S., Takeda, S. and Wada, K., 2009. A deficit of brain dystrophin impairs specific amygdala GABAergic transmission and enhances defensive behaviour in mice. *Brain.* 132, 124-35.

Serrano, A.L., Mann, C.J., Vidal, B., Ardite, E., Perdiguero, E. and Munoz-Canoves, P., 2011. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. *Curr Top Dev Biol.* 96, 167-201.

Sherr, C.J. and DePinho, R.A., 2000. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell.* 102, 407-10.

Shibata, S., Ueno, C., Ito, T., Yamanouchi, K., Matsuwaki, T. and Nishihara, M., 2010. Skeletal muscle growth defect in human growth hormone transgenic rat is accompanied by phenotypic changes in progenitor cells. *Age (Dordr).* 32, 239-53.

Sinha, M., Jang, Y.C., Oh, J., Khong, D., Wu, E.Y., Manohar, R., Miller, C., Regalado, S.G.,

Loffredo, F.S., Pancoast, J.R., Hirshman, M.F., Lebowitz, J., Shadrach, J.L., Cerletti, M., Kim, M.J., Serwold, T., Goodyear, L.J., Rosner, B., Lee, R.T. and Wagers, A.J., 2014. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle. *Science*. 344, 649-52.

Smith, C.A., Stauber, F., Waters, C., Alway, S.E. and Stauber, W.T., 2007. Transforming growth factor-beta following skeletal muscle strain injury in rats. *J Appl Physiol* (1985). 102, 755-61.

Socha, M.J., Said, N., Dai, Y., Kwong, J., Ramalingam, P., Trieu, V., Desai, N., Mok, S.C. and Motamed, K., 2009. Aberrant promoter methylation of SPARC in ovarian cancer. *Neoplasia*. 11, 126-35.

Song, M.Y., Ruts, E., Kim, J., Janumala, I., Heymsfield, S. and Gallagher, D., 2004. Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am J Clin Nutr*. 79, 874-80.

Sousa, L.P., Lax, I., Shen, H., Ferguson, S.M., De Camilli, P. and Schlessinger, J., 2012. Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109, 4419-24.

Sousa-Victor, P., Gutarra, S., Garcia-Prat, L., Rodriguez-Ubreva, J., Ortet, L., Ruiz-Bonilla, V., Jordi, M., Ballestar, E., Gonzalez, S., Serrano, A.L., Perdiguero, E. and Munoz-Canoves, P., 2014. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 506, 316-21.

Stitt, T.N., Drujan, D., Clarke, B.A., Panaro, F., Timofeyeva, Y., Kline, W.O., Gonzalez, M., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J., 2004. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 14, 395-403.

Takegahara, Y., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Nakano, S. and Nishihara, M., 2014. Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner. *Exp Cell Res*. 324, 105-14.

Taylor-Jones, J.M., McGehee, R.E., Rando, T.A., Lecka-Czernik, B., Lipschitz, D.A. and Peterson, C.A., 2002. Activation of an adipogenic program in adult myoblasts with age. *Mech Ageing Dev.* 123, 649-61.

Tesson, L., Usal, C., Menoret, S., Leung, E., Niles, B.J., Remy, S., Santiago, Y., Vincent, A.I., Meng, X., Zhang, L., Gregory, P.D., Anegon, I. and Cost, G.J., 2011. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol.* 29, 695-6.

Thomas, D.R., 2010. Sarcopenia. *Clin Geriatr Med.* 26, 331-46.

Tintignac, L.A., Lagirand, J., Batonnet, S., Sirri, V., Leibovitch, M.P. and Leibovitch, S.A., 2005. Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 280, 2847-56.

Tripathi, R. and Mishra, R., 2010. Interaction of Pax6 with SPARC and p53 in brain of mice indicates Smad3 dependent auto-regulation. *J Mol Neurosci.* 41, 397-403.

Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. and Tsuchida, K., 2010. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat Cell Biol.* 12, 143-52.

Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M.M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., Tsuchida, K., Yamamoto, H. and Fukada, S., 2011. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J Cell Sci.* 124, 3654-64.

Vainzof, M., Ayub-Guerrieri, D., Onofre, P.C., Martins, P.C., Lopes, V.F., Zilberztajn, D., Maia, L.S., Sell, K. and Yamamoto, L.U., 2008. Animal models for genetic neuromuscular diseases. *J Mol Neurosci.* 34, 241-8.

Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.H., Yuan, H.T., Libermann, T.A., Stillman, I.E., Roberts, D., D'Amore, P.A., Epstein, F.H., Sellke, F.W., Romero, R., Sukhatme, V.P., Letarte, M. and Karumanchi, S.A., 2006. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 12, 642-9.

Visser, M., Pahor, M., Taaffe, D.R., Goodpaster, B.H., Simonsick, E.M., Newman, A.B., Nevitt, M. and Harris, T.B., 2002. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 57, M326-32.

Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F. and Jaenisch, R., 2013. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell.* 153, 910-8.

Webster, C. and Blau, H.M., 1990. Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat Cell Mol Genet.* 16, 557-65.

Weintraub, H., Davis, R., Tapscott, S., Thayer, M., Krause, M., Benezra, R., Blackwell, T.K., Turner, D., Rupp, R., Hollenberg, S. and et al., 1991. The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage. *Science.* 251, 761-6.

Williams, K.C. and Coppolino, M.G., 2011. Phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and its vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7)-dependent trafficking facilitate cell invasion and migration. *J Biol Chem.* 286, 43405-16.

Willmann, R., Possekel, S., Dubach-Powell, J., Meier, T. and Ruegg, M.A., 2009. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord.* 19, 241-9.

Wilson, M.J., Bowles, J. and Koopman, P., 2006. The matricellular protein SPARC is internalized in Sertoli, Leydig, and germ cells during testis differentiation. *Mol Reprod Dev.* 73, 531-9.

Wright, W.E., Sassoon, D.A. and Lin, V.K., 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell.* 56, 607-17.

Yamanouchi, K., Yada, E., Hozumi, H., Ueno, C. and Nishihara, M., 2004. Analyses of hind leg

skeletons in human growth hormone transgenic rats. *Exp Gerontol.* 39, 1179-88.

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

Zhou, L., Porter, J.D., Cheng, G., Gong, B., Hatala, D.A., Merriam, A.P., Zhou, X., Rafael, J.A. and Kaminski, H.J., 2006. Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 16, 32-8.

Zoico, E., Rossi, A., Di Francesco, V., Sepe, A., Oliosio, D., Pizzini, F., Fantin, F., Bosello, O., Cominacini, L., Harris, T.B. and Zamboni, M., 2010. Adipose tissue infiltration in skeletal muscle of healthy elderly men: relationships with body composition, insulin resistance, and inflammation at the systemic and tissue level. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 65, 295-9.

鈴木隆雄、島田裕之：サルコペニアの基礎と臨床，新興交易株式会社医書出版部：2-9，2011

中村 克行 2011 卒業論文「老化に伴う骨格筋減弱症サルコペニアの分子機構に関する研究」

謝辞

本研究を遂行するにあたり、何不自由ない研究環境を与えてくださり、その中で終始暖かいご指導・ご鞭撻いただきました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室 西原真杉教授に心から感謝いたします。

研究室でのこの 7 年間、日々の熱心なご指導だけでなく、国内・国外問わず数多くの学会でご一緒させていただき、研究の基礎からすべてご教授賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科獣医生理学研究室 山内啓太郎准教授に心から感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、DMD モデルラットの作成にご助力いただいただけでなく、遺伝子工学・発生工学の基礎からお教えいただき、またその手法のトレーニングを賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科応用遺伝学研究室 藤井渉助教、またその環境を与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応用遺伝学研究室 内藤邦彦教授に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、学部の頃から技術指導をしていただき、また多くの時間を研究室でともにし、数々の議論をいただきました中野真一博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行に際し、終始暖かい励ましを戴きました東京大学農学部獣医生理学研究室寺本奈保美さんと杉原英俊君を始め、獣医生理学研究室の皆様から心からお礼を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、精神的な支えとなり、終始暖かい励ましをくださいました家族の皆様から心から感謝いたします。

最後に、本研究は実験動物の尊い生命の犠牲により遂行されました。ここに深い感謝の意を示すとともに心よりご冥福をお祈りいたします。