

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 23 年度博士課程 入学

氏 名 中村 克行

指導教員名 西原 眞杉

論文題目 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

骨格筋は体重のおおよそ 40%を占める器官であり、唯一の運動器官である。加齢に伴いこの骨格筋量が減少し筋力が低下する現象はサルコペニアと呼ばれ、老齢のヒトや動物において身体活動の低下を引き起こす。サルコペニアでは筋線維が萎縮するだけでなく、骨格筋内に脂肪細胞が浸潤し、この脂肪が筋組織に対して悪影響を及ぼす。またデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、X 染色体上に存在する Dystrophin 遺伝子 (*Dmd*) の変異に起因するヒトの遺伝性疾患で、筋組織の脆弱化に伴い運動不全や呼吸器機能低下、心不全といった重篤な症状を示す。この DMD が進行した際においても、筋線維の萎縮・減少だけでなく、骨格筋内に脂肪細胞が出現する。骨格筋には筋衛星細胞と呼ばれる、筋分化能を有し筋再生を司る幹細胞の他に、脂肪細胞への分化能を有する脂肪前駆細胞が存在する。ラットやマウス骨格筋より単離した骨格筋前駆細胞群 (Skeletal muscle derived progenitor cells, Skm-PCs) には筋衛星細胞以外にもこの脂肪前駆細胞が含まれている。加齢に伴い Skm-PCs の脂肪分化能が亢進することが知られており、このことは老齢個体の骨

骨筋内で脂肪蓄積がみられる現象と一致する。このような細胞の分化能は、ニッチと呼ばれる細胞外の微小環境により大きく影響を受ける。このニッチに含まれ、加齢に伴いマウス・ラット骨格筋でその発現量が減少する因子として、分泌性糖タンパク質である **Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)** に着目した。SPARC は非構造的細胞外マトリクス因子で、**collagen** や **integrin** と結合し、細胞に対して増殖抑制や接着阻害をはじめ様々な作用を示す。株化細胞を用いた実験では筋分化促進作用および脂肪分化抑制作用が報告されている。興味深いことに **DMD** 患者の骨格筋では筋線維や筋衛星細胞、それ以外の単核の細胞において SPARC の強い発現が認められている。そこで、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** といった加齢性・遺伝性の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 の役割とその作用機構を明らかにすることを目的とした。

第一章では、筋線維に対する SPARC の作用について、**in vivo siRNA** を用いて検討を行った。SPARC に対する siRNA を 8 週齢のオス **C57BL/6J** マウスの前脛骨筋へ導入したところ、2 日後にその発現量は約 70% 抑制された。SPARC を発現抑制した筋では、siRNA 導入 10 日後において遅筋型、速筋型の筋線維のうち特に速筋型で筋線維直径の有意な縮小が認められた。遅筋型、速筋型の筋線維の割合について、高齢者では遅筋型の割合が増加することが知られているが、今回、SPARC の発現抑制では筋線維型の割合に変化はみられなかった。また siRNA 導入 10 日後では SPARC 発現抑制群において筋萎縮遺伝子の一つである **atrogen1** の有意な発現量増加を認めた。この時、**atrogen1** の上流に位置する、トランスフォーミング増殖因子 **TGF β** のシグナル因子である **Smad3** のリン酸化が SPARC 発現抑制群で亢進していた。以上の結果から、骨格筋で発現する SPARC は **TGF β** シグナルを抑制し、**atrogen1** の発現を抑えることで、筋線維の萎縮に対し保護的な作用をもつ可能性が示された。このことは SPARC の発現低下が加齢に伴う筋萎縮の一因であることを示唆するものである。

第二章では、**Skm-PCs** における SPARC の発現量とその作用ならびにその加齢性変化について解析を行った。まず、若齢および老齢ラット由来の **Skm-PCs** において SPARC の発現量を調べたところ、その発現量に違いはみられなかった。そこで次に、SPARC に対する反応性に着目したところ、siRNA による内因性の SPARC の発現抑制した際、および SPARC のリコンビナントタンパク質を添加した際に若齢の細胞でみられた SPARC の筋分化促進・脂肪分化抑制効果が老齢ラット由来の細胞では消失していた。この SPARC に対する反応性低下の原因を探るべく、SPARC と結合する因子である **integrin α 5** の発現を siRNA で

抑制した際の SPARC の作用を調べたところ、筋分化促進作用についてはその一部が、脂肪分化抑制作用は完全に消失したことから、SPARC の作用は integrin $\alpha 5$ を介したものである可能性が示された。この integrin $\alpha 5$ の発現量を若齢および老齢ラット由来の Skm-PCs 間で比較したところ、老齢ラット由来の細胞ではその発現量が減少しており、integrin $\alpha 5$ 発現量の低下が SPARC に対する反応性低下の一因となることが示唆された。

SPARC の作用を仲介する integrin については細胞内へと内在化する機構が存在する。そこで、この内在化機構に着目し、蛍光標識した SPARC を用いて加齢に伴う SPARC 反応性低下の機序についてさらなる解析を試みた。Skm-PCs に蛍光標識したリコンビナント SPARC を添加したところ、SPARC は integrin $\alpha 5$ 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。また、この内在化は clathrin 依存性エンドサイトーシスであることも判明した。次にこの内在化の加齢性変化を調べたところ、老齢ラット由来の筋芽細胞では若齢のものと同程度であったものの、脂肪前駆細胞では若齢のものに比べて SPARC の取り込みが亢進しており、同時に clathrin タンパク質の量が増加していた。さらに、siRNA により clathrin の発現を抑制することで SPARC の内在化を阻害したところ、SPARC の脂肪分化抑制作用が増強される結果が得られた。このことから、Skm-PCs において、加齢に伴う SPARC の脂肪分化抑制作用に対する反応性の低下は、clathrin 発現量の増加による SPARC 内在化の亢進に起因することが示唆された。以上の結果から、加齢に伴い integrin $\alpha 5$ の発現量が低下するだけでなく、その内在化が亢進することにより SPARC に対する反応性が低下し、Skm-PCs の脂肪分化能亢進を引き起こすことが示唆された。

第三章では、DMD における SPARC の発現動態を調べるため、まず、これまで広く研究に用いられてきた mdx マウスの、表現型が軽微であるという欠点を克服すべく、新規の DMD 疾患モデル動物として *Dmd* 変異ラットの作成を試みた。近年開発された遺伝子改変技術である CRISPR/Cas 法を用い、ラット *Dmd* のエクソン 3 および 16 を標的とした結果、F0 世代において目的の部分に変異の導入が確認され、Dystrophin タンパク質の発現が欠損していた。この 3 ヶ月齢のオス *Dmd* 変異ラットでは、骨格筋における筋線維の壊死ならびにそれに伴う筋線維の再生像がみられた。また他の筋組織においても、横隔膜筋線維の壊死・再生、ならびに心筋の壊死や炎症細胞の浸潤像が観察された。この変異は次世代へと伝わるものであり、F1 世代の骨格筋においても、筋線維の壊死・再生像が観察された。さらに 10 ヶ月齢 *Dmd* 変異ラット骨格筋では筋再生能の著しい低下や、脂肪細胞の浸潤など、mdx マウスではみられない重篤な表現型を示した。次にこの *Dmd* 変異ラットの各月齢における SPARC の発現量を調べたところ、1 ヶ月齢では mRNA、タンパク質レベルで SPARC の発現が高く、野生型では 3 ヶ月齢以降、その発現が低下するのに対し、*Dmd* 変異ラット

では3、10ヶ月齢どちらにおいてもその発現が高い状態で維持されていた。以上の結果から、*Dmd*変異ラットはヒトのDMDの病態をよく反映するモデルであり、SPARCの発現がDMD病態の進行の際に一貫して高い水準で維持されることが明らかとなった。

以上、本研究により、SPARCが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、Skm-PCsでは加齢に伴いSPARCの作用を仲介するintegrin $\alpha 5$ の発現量が低下することに加え、その内在化が亢進することでSPARCに対する反応性が低下することを示した。SPARCの発現量は加齢に伴い骨格筋で低下することから、SPARCの筋線維保護作用の低下とSkm-PCsに対する筋分化促進・脂肪分化抑制作用の減弱が併発することで、骨格筋量の減少や脂肪細胞の浸潤など、サルコペニアの病態悪化に関与している可能性が考えられる。またDMDモデルラット骨格筋ではSPARCの発現が高いにも関わらず、筋再生能が低下し脂肪細胞の浸潤が顕著であったことは、DMD病態下においてもSPARCに対する反応性の低下がSkm-PCsに生じ、これがDMD病態を悪化させることを示唆している。以上本研究により、SPARCは骨格筋を構成する筋線維、筋衛星細胞および脂肪前駆細胞に対しその恒常性を維持する作用を持ち、その作用機序の破綻により筋疾患の病態が悪化する可能性が示された。