

審査の結果の要旨

氏名 中村 克行

加齢に伴い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。また、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は Dystrophin 遺伝子 (*Dmd*) の変異に起因するヒトの遺伝性疾患で、運動不全や心不全などの重篤な症状を示す。骨格筋前駆細胞群 (Skeletal muscle derived progenitor cells, Skm-PCs) には筋分化能を有し筋再生を司る筋衛星細胞以外にも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格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に大きな影響を与える細胞外微小環境 (ニッチ) に含まれ、加齢に伴い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 Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) がある。本研究では、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。また siRNA 導入 10 日後では筋萎縮遺伝子の一つである *atrogin1* の有意な発現量増加を認めた。この時、*atrogin1* の上流に位置する 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、*atrogin1* 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、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。さらに、SPARC の作用は integrin $\alpha 5$ を介したもの

であること、老齢ラット由来の細胞ではその発現量が減少していることが明らかになった。また、加齢に伴いクラスリンの発現量が増加し、SPARC の内在化が亢進していることが示された。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、近年開発された遺伝子改変技術である CRISPR/Cas 法を用いて *Dmd* 変異ラットを作出した。この 3 ヶ月齢の *Dmd* 変異ラットでは、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。さらに 10 ヶ月齢 *Dmd* 変異ラットでは筋再生能の著しい低下や、脂肪細胞の浸潤などの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、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 atrogen1 の発現を抑制することで筋線維を保護する作用をもつこと、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。また、DMD モデルラット骨格筋では SPARC の発現が高いにもかかわらず筋再生能が低下しており、DMD 病態下においても SPARC に対する反応性の低下が生じていることが示唆された。本研究により、SPARC は骨格筋を構成する細胞群に対しその恒常性を維持する作用を持ち、その破綻により筋疾患が増悪することが示唆された。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。