The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨格筋幹細胞の維持に働く分子の同定
Author(s)	山口, 賢彦
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59415
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【16】

氏　　名	山　口　賢　彦（やま　ぐち　まさ　ひこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５１７５　号
学位授与年月日	平成24年３月22日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学　位　論　文　名	**骨格筋幹細胞の維持に働く分子の同定**
論文審査委員	（主査） 教　授　辻川　和丈 （副査） 教　授　岡部　　勝　　教　授　八木　清仁　　教　授　水口　裕之

論　文　内　容　の　要　旨

体性幹細胞は増殖・分化して組織を構成する実質細胞になることによって，組織の機能を保持している．また体性幹細胞は自分自身を生み出す自己複製能を併せ持つことで分化による自身の枯渇を防ぎ，一生にわたりその数を維持している．体性幹細胞はこのような能力を有することから「(多)分化能と自己複製能を併せ持つ細胞」と定義され，骨髄，神経組織，毛包など多くの組織で同定されている．体性幹細胞は組織が傷害を受けると活発に増殖・分化して組織を修復するが，平常時では「静止期」で維持されている．「静止期」の体性幹細胞では細胞周期がG0期で停止しているが，最終分化した細胞とは異なり，未分化の状態で維持されている．体性幹細胞が「静止期」を維持できなくなると体性幹細胞が枯渇したり過剰に増殖したりするため，組織の萎縮や過形成，腫瘍形成を引き起こすと考えられる．従って体性幹細胞の「静止期」を維持する分子メカニズムを解明することは重要な課題である．体性幹細胞の「静止期」維持機構を解明するためには遺伝子の発現変化に着目する手法が採られている．具体的には「如何にして高い純度で静止期体性幹細胞と増殖・分化が進んだ体性幹細胞（もしくは前駆細胞）をそれぞれ分取するか」，そして各々分取した体性幹細胞（前駆細胞）に発現している遺伝子を網羅的に比較し「如何にして静止期に決定的に働く遺伝子を見出すか」に主眼が置かれている．

骨格筋幹細胞であるSatellite cellsにおいても，静止期維持機構を解明するためには静止期のsatellite cellsで発現している遺伝子･タンパク質を明らかにすることが必須である．現在までに静止期のsatellite cellsで発現している遺伝子・タンパク質としてCD34，Pax7，M-cadhorin，c-met，syndecan3/4などが明らかにされている．しかしこれらの遺伝子・タンパク質は静止期のsatellite cells特異的に発現しているわけではなく，satellite cellsの静止期を維持するといった報告もない．従ってsatellite cellsの静止期維持機構についてはほとんど理解が進んでいないのが現状である．理解が進まない最大の要因は静止期のsatellite cellsの遺伝子発現パターンの全体像が掴めておらず，着目すべき因子を見出せないためである．当研究室では静止期のsatellite cellsの性質解明に取り組み，世界で初めて静止期のsatellite cellsを単離することが可能なモノクローナル抗体SM/C-2.6 の作製に成功した．SM/C-2.6の作製に成功したことで骨格筋組織から高純度に静止期のsatellite cellsを分取することが可能となり，遺伝子発現パターンの全体像を掴むために最も重要な課題をクリアした．そ

して単離した静止期のsatellite cells，静止期のsatellite cellsを培養して増殖・分化させたcultured myoblasts，骨格筋内の非筋系譜細胞の3つの細胞集団を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い，静止期のsatellite cellsで特異的に高発現している遺伝子群を同定・報告している．本研究では静止期のsatellite cellsに特異的に高発現していた遺伝子群のなかでHesr3遺伝子とCalcitonin receptor遺伝子に着目した．Hesr3遺伝子とCalcitonin receptor遺伝子に着目した経緯は，Hesr3遺伝子が細胞の分化運命を決定づけるNotchシグナルのターゲット遺伝子であること，Calcitonin receptor遺伝子は多彩な作用を持つGタンパク共役型受容体の中で最も発現が高かったからである．そしてこれらHesr3遺伝子とCalcitonin receptor遺伝子がsatellite cellsの「静止期」維持に必要か否かについて検討を行った．

＜Hesr3＞ C57BL/6 miceの骨格筋組織からflow cytometry法によって静止期のsatellite cellsとcultured myoblastsを各々調製した．そして1から3まであるHesr family遺伝子についてmRNAの発現を比較した．その結果，静止期のsatellite cellsではHesr3遺伝子に加えHesr1遺伝子の発現も高かった．またHesr2遺伝子についてはいずれの細胞においても発現していなかった．Satellite cellsにおけるHesr1及びHesr3遺伝子の機能を検討するため，Hesr1(-/-) miceとHesr3(-/-) miceを用いて骨格筋組織，satellite cellsの数・性質について検討したが異常はみられなかった．Hesr1とHesr3は互いに機能を補完することが報告されており，Hesr1(-/-) mice及びHesr3(-/-) miceでは骨格筋における表現型異常がみられなかった可能性がある．そこでHesr1(-/-)Hesr3(-/-) mice（以下dKO mice）を作製した．Control miceとdKO miceのsatellite cell数を比較するため，flow cytometry法により骨格筋組織における単核の細胞中のsatellite cellsの割合について解析した．その結果dKO miceにおけるsatellite cellsの割合は顕著に低下していた．ここでflow cytometry法による解析からdKO miceのsatellite cellsは細胞が大きいことも明らかとなった．Satellite cellsが大きくなるのは，「静止期」を脱した時にみられる特徴である．そこで筋分化マーカーであるMyoD，増殖マーカーであるKi67に対する抗体を用いて前脛骨筋を免疫組織化学染色した．生後7，28，56日と経時的にKi67(+) and/or MyoD(+) satellite cellsとKi67(-)MyoD(-) satellite cellsの割合を定量した結果，control miceではKi67(-)MyoD(-) satellite cellsの割合が週齢を経るにつれて顕著に上昇していた．この結果は生後satellite cellsが増殖・分化して筋線維を形成する一方（分化に伴いPax7は発現しなくなる），一部の細胞は静止期に移行するためと考えられる．一方でdKO miceでは生後56日目になってもKi67(-)MyoD(-) satellite cellsの割合は低いままであった．従ってdKO miceでは生後の骨格筋成長過程においてsatellite cellsが「静止期」へ移行できないことが明らかとなった．以上よりdKO miceのsatellite cellsは「静止期」に移行できず，また数が減少していることが明らかとなった．次にdKO miceのsatellite cell数が減少した原因を検討した．減少した主な原因として1) apoptosisによる細胞死と，2) 分化・融合による枯渇の2つが挙げられる．まずapoptosisによる細胞死の可能性について検討するため，dKO miceの骨格筋組織をTUNEL染色した．しかしapoptosis細胞（TUNEL陽性細胞）は確認できなかった．次に分化・融合が起こり枯渇していった可能性について検討した．マウスにEdUを投与して細胞周期がS期の細胞をラベルし，2-3週間後前脛骨筋を摘出し凍結切片を作製した．その後組織染色を行いEdUを検出した．その結果EdUによってラベルされたsatellite cellsがその後筋線維へと分化・融合した組織染色像が，dKO miceにおいて高頻度で観察された．以上よりdKO miceでは分化・融合によりsatellite cellsが枯渇してくことが明らかとなった．

＜Calcitonin receptor＞ Satellite cellsにおけるCalcitonin receptorの機能を検討する目的で，Satellite cells特異的Calcitonin receptor欠損マウス(以下cKO mice)の骨格筋組織，satellite cell数に異常がみられるか検討した．まず生後12-13週齢における筋重量/体重比をcKO miceとcontrol mice間で比較した．その結果前脛骨筋，腓腹筋，大腿四頭筋のいずれの骨格筋においても有意な差はなかった．次にflow cytometry法にて骨格筋組織における単核の細胞中のsatellite cellsの割合を定量した．その結果cKO miceのsatellite cellsの割合が有意に減少していた．またHesr1(-/-)Hesr3(-/-) miceではsatellite cellsの減少と共に細胞が大きくなっていたが，cKO miceのsatellite cellsでは細胞の大きさに異常はみられなかった．以上よりCalcitonin receptorは筋形成時には関与しておらず，Hesr1/Hesr3とは異なる機構によりsatellite cellsの「静止期」を制御していることが示唆された．

論文審査の結果の要旨

優れた再生能を有する組織の 1 つである骨格筋において，骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は筋組織が傷害を受けた時には増殖・分化して組織を修復するが，平常時では細胞周期が G0 期で停止し，かつ，未分化の状態で維持されている．筋衛星細胞が静止期を維持できなくなると筋衛星細胞が枯渇して筋組織が萎縮し，逆に過剰に増殖すれば筋組織の過形成・腫瘍形成が起こる．従って筋衛星細胞が静止期を維持することで骨格筋は恒常性を維持していると考えられるが，その分子メカニズムは全く明らかになっていない．

本論文では，細胞の分化運命を決定づける Notch シグナルのターゲット遺伝子である *Hesr1/Hesr3* と，多彩な生理作用を持つ G タンパク共役型受容体*Calcitonin receptor* に着目し，筋衛星細胞の静止期維持に必要か否か検討した．その結果，*Hesr1*(-/-) mice 及び *Hesr3*(-/-) mice では骨格筋組織における異常はみられなかったが，*Hesr1*(-/-)*Hesr3*(-/-) mice の筋衛星細胞は生後の骨格筋成長過程において静止期に移行できず，分化・融合が亢進することで枯渇していることを明らかにした．また，筋衛星細胞特異的に Calcitonin receptor を欠損させたマウスでは筋衛星細胞の数が有意に減少していることも突き止めた．以上より Hesr1/Hesr3 と Calcitonin receptor はいずれも筋衛星細胞の数を制御していることを明らかにした．

筋衛星細胞の静止期と増殖・分化を制御することは筋ジストロフィーに対する幹細胞移植治療の改善にも繋がる．現在の細胞移植治療では静止期の筋衛星細胞は生着率が良いが移植に十分な細胞数を確保できないこと，一方で筋衛星細胞を培養すると細胞数は増やせるが生着率が下がるという問題点がある．筋衛星細胞の静止期と生着率には正の相関があることから，本研究を発展させることにより生着率を高める分子を見出すことが可能となる．そして筋衛星細胞を培養して数を増やした後に生着率を高める分子を作用させることで，効率よく筋衛星細胞を移植する手法の確立が期待される.以上のように重要かつ応用性が期待できる知見を得た本論文は，博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。