OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	骨格筋線維化の原因細胞の同定と筋疾患治療に向けた研究
Author(s)	伊藤, 尊仁
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59425
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名	伊藤尊仁（いとうたかひと）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第　25168　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	骨格筋線維化の原因細胞の同定と筋疾患治療に向けた研究
論文審査委員	（主査） 教授　辻川　和丈 （副査） 教授　藤尾　慈　教授　堤　康央　教授　橋本　均

論文内容の要旨

組織線維化は急性および慢性的な傷害に対して組織再生不全が起こると，骨格筋を含む様々な組織で誘起される．線維化が誘起されると，正常組織が機能を持たない過剰な細胞外マトリックス（ECM）に置換されてしまうために組織機能不全をきたす．骨格筋における線維化は様々な進行性筋疾患で典型的な病理像として観察される．さらに，加齢性筋萎縮や，心不全を原因とした悪液質による筋萎縮などでも引き起こされることが知られている．筋線維化の進行は骨格筋機能すなわち運動機能の低下を意味し，日常生活を大幅に制限する要因となる．我が国で急速に高齢化が進行していること，心疾患の罹患率が増加傾向であることを考慮すると，骨格筋線維化機構を解明する意義・必要性は，筋疾患の治療法を開発する上では勿論のこと，アンチエイジングやQOLの向上へ向けても高まっていると言える．

デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は筋基底膜の裏打ちタンパク質であるジストロフィンの遺伝子変異により引き起こされる．DMD患者では，筋肉の崩壊・再生を繰り返すうちに進行性の筋力低下・筋萎縮を呈し，主病変として脂肪化や線維化が観察される．DMDの発症頻度は新生男児の3500人に1人と高く，予後不良であるため，これまでDMD治療法の確立を目的とした研究が様々な視点から試みられてきた．その中でDMDの進行と線維化の進行には相関性があることを踏まえると，筋線維化を標的とした治療はDMDの病態進行に対する有効な対症療法になると考えられる．さらに，将来的に遺伝子治療や細胞移植の実践を考慮すると，線維化の進行により蓄積したECMは治療の障壁となるため，細胞移植の際にはあらかじめ線維化を抑制しておくことが必要であると思われる．しかし，骨格筋線維化機構に関しての明確な知見はこれまでにほとんど得られていない．

近年まで骨格筋における線維化病態や脂肪化病態は，骨格筋の恒常性を維持している幹細胞である筋衛星細胞，あるいは筋衛星細胞が分化・活性化した筋系譜細胞が原因細胞ではないかと考えられてきた．しかし最近，我々の研究グループは，骨格筋内で異所性の脂肪形成を担う間葉系前駆細胞の存在を明らかにした．この細胞は，内皮系細胞マーカー CD31 陰性，血球系細胞マーカー CD45 陰性，間葉系幹細胞の細胞表面マーカー platelet-derived growth factor receptor α（PDGFRα）陽性で認識され，骨格筋間質部位に常在しており筋形成能を持たないことから，筋系譜細胞とは異なる細胞であることが証明されている．

以上より，脂肪化病態と共に骨格筋の間質で見られる線維化病態も，この PDGFRα 陽性間葉系前駆細胞が原因となっているのではないかと考え，骨格筋線維化の原因細胞の同定を試みた．さらに線維化を誘導するシグナル経路に着目し，DMD における抗線維化治療の実現へ向け研究を行った．

様々な組織で誘起される線維化は collagen type Ⅰ を中心とした ECM の蓄積を特徴とする．組織線維化が進行する際には，組織内に存在する fibroblast を中心とした間葉系細胞，あるいはそれが活性化した myofibroblast が ECM を産生する主要な細胞であることが広く知られている．そこで，骨格筋に存在している PDGFRα 陽性間葉系前駆細胞が脂肪細胞への分化能を有するだけではなく，collagen type Ⅰ 産生細胞として線維化の原因細胞となり得るか否かを調べる目的で in vitro において分化能を評価した．その結果，再生筋組織内に存在する単核細胞の中で PDGFRα 陽性間葉系前駆細胞のみが脂肪細胞および collagen type Ⅰ 産生細胞への多分化能を示した．

次に，in vivo で間葉系前駆細胞の線維化に対する能力を評価した．線維化筋組織から細胞を分取した後，線維化関連分子の発現を調べた．その結果，線維化筋組織内に存在する単核細胞の中で，PDGFRα 陽性間葉系前駆細胞のみが線維化関連分子を顕著に発現していた．さらに直接的に骨格筋線維化の原因細胞を同定するため，筋系譜細胞および間葉系前駆細胞を線維化筋組織へと移植し，組織学的解析を行った．その結果，筋系譜細胞を移植したものでは移植細胞が筋線維を形成していた．その一方で，間葉系前駆細胞を移植したものでは移植細胞が collagen type Ⅰ の蓄積する線維化部位に集積しており，その中には collagen type Ⅰ を発現しているものも観察された．以上の結果から，これまで考えられてきた筋系譜細胞ではなく，間葉系前駆細胞が骨格筋線維化の原因細胞であることが示された．

組織線維化を誘導する因子として TGF-β および PDGF が知られている．実際に DMD 患者の筋組織において，TGF-β や PDGF，PDGF 受容体の発現が高いことが報告されている．そこで，間葉系前駆細胞に対する TGF-β，PDGF の作用を in vitro で検討した．その結果，これらの因子の作用により間葉系前駆細胞の増殖および線維化関連分子の発現が促進していた．

得られた結果を踏まえ，PDGF/PDGFR シグナルおよび間葉系前駆細胞を標的とする DMD 治療法の有効性を調べるため，間葉系前駆細胞に対する PDGF の増殖および線維化関連因子の発現促進作用を，チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブが in vitro で抑制するか否かを検討した．また，*mdx* マウスより重篤な病態を示す DMD モデルマウスである DBA/2-*mdx* マウスにイマチニブを投与したときの筋線維化に対する影響を評価した．その結果，イマチニブは PDGF/PDGFR シグナルの阻害を介して間葉系前駆細胞における増殖・線維化関連因子の発現を抑制し，DBA/2-*mdx* マウスにおいて線維化病態を含む筋ジストロフィー病態を下肢筋において改善した．

本論文では，骨格筋に常在している PDGFRα 陽性間葉系前駆細胞が脂肪化病態と共に線維化病態の原因細胞であることを明らかにし，同細胞を標的とした DMD 治療法としてイマチニブの有効性を示した．間葉系前駆細胞は，このように病態形成を担う一方で，通常の筋再生過程では再生促進的役割も担う．この二つの側面がどのように制御されているかを明確にすることが，間葉

系前駆細胞を DMD 治療の標的とするにあたり最も重要な課題である．今後，間葉系前駆細胞を標的とした筋疾患の新たな治療法の開発につながることが期待される．

論文審査の結果の要旨

骨格筋線維化はデュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) を主とする進行性筋疾患や加齢性筋萎縮などで誘起される。筋線維化の進行は運動機能の低下を意味し、日常生活を制限する要因となる。我が国で高齢化が進行していることを考慮すると、筋線維化機構を解明する必要性は、筋疾患の治療法を開発する上では勿論のこと、アンチエイジングや QOL の向上に向けても高まっている。

DMD は新生男児の 3500 人に 1 人の割合で発症し、予後不良であるため、これまでに治療法の確立を目指した研究が世界中で試みられてきた。DMD 患者の骨格筋では主病変として間質部位に線維化や脂肪化が観察され、線維化病態の進行は DMD の進行と相関性があることが報告されている。従って、筋線維化を標的とした治療は DMD に対する有効な対症療法となりうるが、骨格筋線維化に関しての明確な知見はほとんど得られていない。

近年まで骨格筋線維化病態や脂肪化病態は、骨格筋の恒常性を維持する筋衛星細胞が原因であると考えられてきた。しかし最近、骨格筋内で脂肪化病態の形成を担う間葉系前駆細胞の存在が明らかにされた。そこで本論文では、脂肪化病態同様に間質部位で誘起される線維化病態についてもこの間葉系前駆細胞が原因になっているのではないかとの仮説を立て、骨格筋線維化の原因細胞の同定を試みた。さらに、間葉系前駆細胞の筋線維化病態に対する機能を評価した後、同細胞の細胞表面マーカーとして用いている PDGFRα 分子に着目し、新規 DMD 治療法を模索した。

その結果、筋衛星細胞ではなく、間葉系前駆細胞が線維化病態の原因細胞であることを明らかにした。また、チロシンキナーゼ阻害薬イマチニブを用いた PDGFRα の阻害が DMD の対症療法として有効である可能性を示した。しかし、イマチニブが多様な作用を有することを考慮すると、ジストロフィー病態下においてイマチニブが悪影響を及ぼす可能性は否定できず、より PDGFRα に特異的で安全性の高い薬剤・抗体の開発へ期待を高める結果となった。一方、間葉系前駆細胞は病態形成を担うとともに、筋再生促進という側面も持つと考えられていることから、これらの役割がどのように制御されているかを明確にすることが、今後間葉系前駆細胞を DMD の治療標的とするにあたり最も重要な課題となることも示した。よって本論文は、間葉系前駆細胞を標的とした筋疾患の新規治療法の開発へとつながる重要な知見を示しており、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。