The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	間葉系前駆細胞を介した骨格筋の過負荷応答
Author(s)	金重, 紀洋
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/88003
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　金重　紀洋　　）	
論文題名	間葉系前駆細胞を介した骨格筋の過負荷応答

論文内容の要旨

骨格筋が持つ特徴のひとつは優れた可塑性であり，その代表例として，骨格筋にかかる物理的負荷が増大した状態（過負荷）に対する筋肥大による適応反応が挙げられる．過負荷時に認められる筋肥大には，タンパク質合成経路の活性化だけでなく，筋収縮機能を担う多核筋細胞である筋線維の核数（筋核数）の増加が重要であることが指摘されている．筋線維に既に存在する核は分裂しないため，筋核数の増加には骨格筋固有の組織幹細胞である筋幹細胞(Muscle Satellite cells; MuSC)が活性化・増殖し，筋線維へ融合することによる新たな核の供与が必須である．従って，過負荷筋におけるMuSCの制御機構の解明は，効率的な筋肥大がどのようにして誘導されているかを理解するために極めて重要と考えられるが，現状それらには不明な点が多い．MuSCは，通常は，未分化かつ静止期（細胞周期のG0期）を維持した状態で筋線維と基底膜の間の空間に存在しているが，骨格筋が損傷を受けた際には，MuSCは速やかに活性化し，増殖・分化・融合の過程を経て新たな筋線維を形成することで骨格筋の再生に寄与する．過負荷筋におけるMuSC活性化・増殖のメカニズムとして，このような筋線維の損傷が考えられるが，興味深いことに，MuSC活性化を引き起こす骨格筋の大きな傷害や筋線維の死滅は過負荷筋では認められないことが報告されている．他のメカニズムとしては，過負荷応答初期に認められる骨格筋の浮腫や筋線維から放出される分泌因子などが寄与する可能性が報告されているが，依然として過負荷筋におけるMuSCの制御機構に対する理解は不十分である．

間葉系前駆細胞(platelet derived growth factor receptor alpha陽性細胞；Ｐα陽性細胞）は骨格筋間質に存在する多分化能を有する細胞であり，骨格筋に対して生理的・病的双方の役割を担うことから近年大きな注目を集めている．即ち，生理的には骨格筋恒常性や筋再生機構の維持に重要である反面，加齢等に伴う骨格筋の線維化や脂肪蓄積の原因細胞として，骨格筋の質低下に繋がる病的な側面も併せ持つことが報告されている．一方で，過負荷筋におけるＰα陽性細胞の役割については報告がなく，現状不明である．

以上のような背景から，申請者は，過負荷筋におけるMuSCの制御機構としてＰα陽性細胞の役割を検討するとともに，MuSCとＰα陽性細胞の機能的連関について，その分子メカニズの探索と生理学的意義の解明を試みた．

過負荷筋におけるMuSCやＰα陽性細胞の解析を実施するためにTenotomyモデルを用いた．Tenotomyでは，後肢背部に位置する３種類の協働筋のうち，腓腹筋およびヒラメ筋と踵骨をつなぐ腱を切除することにより，残った足底筋に過剰な負荷がかかり代償的な筋肥大が誘導される．

過負荷筋中のＰα陽性細胞の動態を観察したところ，Tenotomyにより足底筋中のＰα陽性細胞は一過性の増殖，細胞サイズや粒度の増加を示し，活性化していることが示唆された．こそで，後天的なＰα陽性細胞の除去が可能なＰαDTAマウスを用いて，過負荷筋におけるＰα陽性細胞活性化の意義を検討したところ，ＰαDTAマウスではTenotomy後のMuSCの活性化・増殖が抑制された結果，MuSCによる新たな筋核の供与が抑制されることが明らかとなった．加えて，過負荷による長期的な筋肥大を評価するのに適したモデルであるSynergist ablation (SA) の解析を実施した結果，ＰαDTAマウスではSAによる筋肥大が抑制されることが示された．これらの結果から，Ｐα陽性細胞は過負荷筋におけるMuSCの制御を介して効率的な筋肥大に寄与すると考えられた．

過負荷筋においてMuSCを制御するために重要なＰα陽性細胞内のシグナル伝達機構を明らかとするため，RNA sequencingによる網羅的遺伝子解析を実施したところ，Tenotomy後の足底筋から単離したＰα陽性細胞では機械刺激応答に関与することが知られるYea-associated protein 1　(Yap1)シグナルの活性化が示唆された．実際，Tenotomy後の足底筋では，Ｐα陽性細胞におけるYap1の核移行が観察された．そこで，Yap1シグナルの役割を検証するため，Yap1に加え，Yap1と補完的に働くことが知られているPDZ-binding motif (Taz)にも注目し，Ｐα陽性細胞特異的Yap1/Taz二重欠損マウス (Y/T-cdKOマウス)を作製して解析を実施した．その結果，Y/T-cdKOマウスではTenotomy後に認められるMuSC増殖の抑制と筋核供与の低下が確認された．加えて，Y/T-cdKOマウスはSAによる長期的な筋肥大が抑制される

ことが明らかとなった．

Ｐα陽性細胞が過負荷筋においてMuSC増殖を促進するメカニズムを探索するため，Tenotomy後の足底筋から単離したＰα陽性細胞のRNA sequencingデータを分析し，Thrombospondin-1(Thbs1)に注目した．Thbs1はTenotomyにより足底筋で発現上昇したが，ＰαDTAマウスやY/T-cdKOマウスではその発現上昇が抑制された．また，Tenotomy後の足底筋を観察したところ，Thbs1はMuSCと共局在したため，Ｐα陽性細胞由来Thbs1がMuSCに直接作用する可能性が考えられた．そこで，単離したＰα陽性細胞の培養上清を単離筋線維に処置することにより筋線維上に存在するMuSCの増殖を評価した結果，Thbs1欠損マウス由来のＰα陽性細胞の培養上清では野生型由来に比べMuSCの増殖が抑制された．続いて，Thbs1の受容体を探索したところ，MuSCに高発現するCD47が同定された．MuSC特異的CD47欠損マウス（CD47-cKOマウス）を作製して解析したところ，CD47-cKOマウスではTenotomy後に認められるMuSC増殖の抑制と筋核供与の低下が認められた．さらに，CD47-cKOマウスでもSAによる長期的な筋肥大が抑制されることが示された．以上の解析結果から，過負荷によりＰα陽性細胞からYap1/Taz依存的に放出されたThbs1は，CD47を介してMuSC増殖を促進し，筋核の供与を介して効率的な筋肥大に寄与していると考えられた．

CD47アゴニストである合成ペプチドPKHB1を，TenotomyやSA処置をしていない野生型マウスに投与したところ，MuSCの増殖は観察されなかったため，Thbs1/CD47シグナルによるMuSC増殖には過負荷による別の要素が必要と考えられた．そこで過負荷筋のMuSCを解析したところ，MuSCの静止期維持に重要なカルシトニン受容体(CalcR)の発現がTenotomyにより低下することが明らかとなった．この結果を踏まえ，定常状態で飼育したMuSC特異的カルシトニン受容体欠損マウス(CalcR-cKOマウス)にPKHB1を投与したところ，MuSCの増殖と筋核の供与が観察された．この結果から，Thbs1/CD47シグナルによりMuSCが増殖するためにはCalcRの発現低下が必要と考えられた．

本研究で見出された知見を総括すると，Ｐα陽性細胞は過負荷筋において，Yap1/ Taz-Thbs1-CD47シグナルを介してMuSCの増殖を誘導し，効率的な筋肥大を可能にしていることが明らかとなった．以上の研究成果は，Ｐα陽性細胞が骨格筋の機械刺激を感知し，MuSCの動態を制御するという新たな概念を構築する基盤となることが期待される．

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　金重　紀洋　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	辻川　和丈
	副 査　教授	藤尾　慈
	副 査　教授	水口　裕之

論文審査の結果の要旨

骨格筋は主として筋線維と呼ばれる多核細胞で構成されている臓器であり，外的・内的要因によりその量・質が変化する事が知られている。例えば，寝たきりなどの不動化や糖尿病・ガンなどの疾患により筋線維のサイズが減少する筋萎縮が見られる。また，加齢に伴う筋萎縮（サルコペニア）は世界中の先進国で問題になっており，治療法開発が切望されている。一方で，筋萎縮とは反対に骨格筋への負荷を増大させると筋線維サイズの増大，筋肥大が起きる。筋肥大のメカニズムとしては，mTOR系の活性化による同化作用の亢進・異化作用の抑制と，筋線維核の増加である。筋線維核は骨格筋幹細胞である筋サテライト細胞が増殖・分化することで供給される。しかし，負荷依存的に筋サテライト細胞が増殖するメカニズムはこれまで不明であった。医療薬学専攻（4年制）の金 重 紀 洋 さ ん は，様々な遺伝子改変動物を用いて，負荷依存的な筋サテライト細胞の増殖には間質に存在する間葉系前駆細胞（別名 FAP:fibro-adipogenic progenitor）が必須であることを見出した。更に，メカニカルセンサーとして働く転写共役因子Yap1/Tazが負荷依存的に間葉系前駆細胞内で活性化し，マトリセルラータンパクであるThrombospondin-1の発現を誘導することで，筋サテライト細胞上のCD47受容体を介してその増殖を誘導することを明らかにした。これまでは，筋線維が力学的な負荷を感知する事が知られていたが，筋サテライト細胞の制御に関しては，筋線維ではなく間葉系前駆細胞が必須であることを証明した。

以上、これらの成果は従来の力学的負荷による筋肥大メカニズムの概念を大きく塗り替える成果であり，また国際的な学術雑誌に掲載されたことより、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。