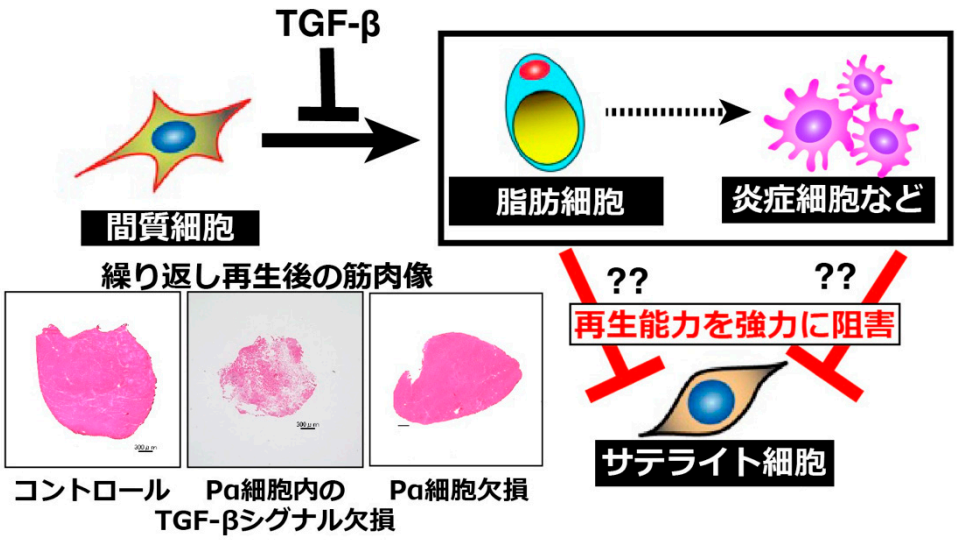
39　繰り返し筋再生能力を妨害する分子メカニズム解明	深田　宗一朗

【目的】骨格筋にはサテライト細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、骨格筋の再生能力を保証している。この再生過程で、サテライト細胞は自身の数を維持する（自己複製）能力があるため、繰り返しの損傷に対しても何度でも再生することができる。一方で、遺伝性筋疾患である筋ジストロフィーでは、欠損遺伝子に起因する慢性的な筋変性が再生能力を上回ることで、脂肪化・線維化を伴う進行性の病態を示すと考えられている。しかし、どのようなメカニズムによりサテライト細胞による再生能力が低下するのかについては分かっていない。本研究では、「なぜ本来優れた再生能力があるにもかかわらず、筋ジストロフィーでは筋再生能力が低下していくのか」について、独自のモデル動物を用いて明らかにし、遺伝子筋疾患治療法開発を目指した基礎研究を行う。

【方法】我々は間葉系前駆細胞（Pa 細胞）特異的に TGF-β シグナルの受容体である Tgfbr2 を欠損させた結果（cKO : *Pdgfra*^{CreERT}::*Tgfbr2* $^{flox/flox}$）、繰り返しの筋再生がほとんど起きず、脂肪細胞が蓄積することを観察していた。そこで、まず脂肪細胞由来因子が、サテライト細胞の増殖を抑制しているかについて検討を行った。さらに、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ（PPAR γ）のアンタゴニストである GW9662 を我々が樹立した重篤な筋ジストロフィーモデルマウスに投与することで、脂肪細胞の出現が筋ジストロフィー病態に与える影響を組織学的に検討した。また、どの時期からコントロール群と cKO の再生像に違いが出てくるのかを明らかにするために、筋損傷後のサンプルを回収し、real-time PCR により各種筋再生マーカーの発現を検討した。

【結果】脂肪細胞由来の培養上清を用いた検討を行ったところ、予想と異なり脂肪細胞由来の因子はサテライト細胞の増殖を促進していた。更に、GW9662 を 2 ヶ月間毎日投与した群においても、筋重量、筋力、組織学的な解析において顕著な改善は認められなかった。これらの *in vitro* および *in vivo* の結果より、脂肪細胞から分泌される因子が再生阻害因子でないことが明らかとなった。そこで、筋再生過程でどの時期から異常がでるのかについて検討を行ったところ、再生 7 日目に、脂肪細胞マーカーである Perilipin の発現増加がみられ、また筋再生過程で一過性に増加する Col1a1 の発現にもコントロール群と cKO 群で違いが認められた。

間質細胞特異的な Tgfbr2 欠損でみられる繰り返しの再生異常



39. 繰り返し筋再生能力を妨害する分子メカニズム解明

深田　宗一朗

大阪大学 大学院薬学研究科 再生適応学分野

Key words：筋再生，サテライト細胞，間質細胞，脂肪細胞，筋ジストロフィー

緒　言

骨格筋にはサテライト細胞と呼ばれる幹細胞が存在し、骨格筋の再生能力を保証している。この再生過程で、サテライト細胞は自身の数を維持する（自己複製）能力があるため、繰り返しの損傷に対しても何度でも再生することができる。一方で、遺伝性筋疾患である筋ジストロフィーでは、欠損遺伝子に起因する慢性的な筋変性が再生能力を上回ることで脂肪化・線維化を伴う進行性の病態を示すと考えられている。しかし、どのようなメカニズムによりサテライト細胞による再生能力が低下するのかについては分かっていない。更に言えば、脂肪化・線維化と再生能力の因果関係を調査した研究は存在しない。我々のグループは、マウスおよびヒトにおいて Platelet-derived growth factor receptor alpha（Pdgfrα）陽性の骨格筋常在性の間葉系前駆細胞を同定し、サテライト細胞ではなくこの間葉系前駆細胞が骨格筋内の脂肪化・線維化の原因細胞であることが報告されている［1，2］。一方で、この間葉系前駆細胞は正常な再生時においては、サテライト細胞の増殖を促進することが報告されている。力学的負荷依存的なサテライト細胞の増殖に間葉系前駆細胞が必須であることも報告されている［3］。つまり、間葉系前駆細胞はサテライト細胞の増殖促進（再生促進）、脂肪化・線維化などの瘢痕形成（再生不全）の両方に働く、二面性を持った細胞である。しかし、 間葉系前駆細胞の二面性がどのように制御されているかという重要な問題に対して説明できるメカニズムは明らかとなっていない。

TGF-βは線維化を誘導する主たるサイトカインである。我々は間葉系前駆細胞特異的に TGF-βシグナルの受容体である Tgfbr2 を欠損させた結果、繰り返しの筋再生がほとんど起きず、サテライト細胞数が枯渇していくこと、つまり自己複製が阻害されることを見出した（未発表データ）。更に、このマウスでは、再生 1 回後でも脂肪細胞の蓄積が見られるが、再生 3 回後では、筋組織の大半が脂肪細胞で埋め尽くされた。一方、間葉系前駆細胞自体を除去したマウスでは、繰り返しの再生による再生異常（筋重量低下、筋線維径の減少）は観察されたが、間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスのような、顕著な再生不全は観察されなかった。この二つの結果は、1. 脂肪細胞の出現により、サテライト細胞に異常が無くとも再生能が劇的に阻害される 2. 生理的な再生過程において、TGF-βは間葉系前駆細胞の二面性に関わる因子であり、また脂肪細胞分化を抑制していることを示唆している。つまり、TGF-βシグナル欠損により脂肪細胞へと分化した間葉系前駆細胞が分泌する因子が、直接または、免疫担当細胞などを介して間接的にサテライト細胞に働き、その筋再生能力・自己複製を劇的に阻害していると考えられる。実際に病態の進行した筋ジストロフィーや老化筋においても脂肪細胞は検出されるため、慢性的な筋変性でみられる再生能力の低下は、脂肪細胞の出現が直接の原因である可能性が考えられた。そこで、本研究課題では、脂肪細胞が分泌する因子が筋再生に及ぼす影響と、脂肪細胞を標的とした筋ジストロフィー治療の可能性を検証した。

方　法

1. 脂肪細胞が筋再生を劇的に阻害する分子メカニズム解明

C57BL/6 マウスより間葉系前駆細胞を FACS Melody を用いて単離した。単離した間葉系前駆細胞を 6-well dish に播種して 4 日間、増殖培地で培養後、脂肪分化誘導培地、脂肪分化維持培地で培養した。培地の組成の影響を排除するために、増殖培地又は、脂肪分化維持培地後に、1 日間 5%HS-DMEM で培養後の上清をコンディションメディウムと

した。コントロールとしては、間葉系前駆細胞を培養していない 5%HS-DMEM を用いた。回収したコンディションメディウムで初代培養マウス筋芽細胞を培養し、筋芽細胞の増殖に与える影響を Real-time Glo（Promega）を用いて検討した。

2. 脂肪細胞を標的にした筋ジストロフィー治療の検討

脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ（PPARγ）のアンタゴニストである GW9662 を、我々が樹立した重篤な筋ジストロフィーモデルマウスに 4 週齢から 10 週齢の 6 週間、毎日投与することで、脂肪細胞の出現が筋ジストロフィー病態に与える影響を組織学的に検討した。GW9662 は 5 mg/mL の溶液を−30℃で保存し、使用時に PBS にて 0.1 mg/mL とし、マウス体重 1 g あたり、10 μL の量を投与した。また、Grip テストなどの筋力測定機器を用いて、脂肪細胞除去が筋機能に与える影響も同時に検討した。

3. 筋再生に違いがでる時期の特定

コントロール（*Pdgfra*^{CreERT}::*Tgfbr2*$^{+/+}$::*Rosa-YFP*）および、Pa-cKO（*Pdgfra*^{CreERT}::*Tgfbr2*$^{flox/flox}$::*Rosa-YFP*）マウスにカルジオトキシンを投与して、前脛骨筋に損傷を与え、投与後 3、5、7、14 日後に前脛骨筋を摘出し、RNA を抽出後、リアルタイム PCR を用いて、*Dystrophin*、*Myoz*、*Pax7*、*MyoD*、*myogenin*、*Myh3* などの筋再生マーカーおよび、脂肪マーカーである *Perilipin*、線維化マーカーである *Col1a1* の発現を検討した。

結　果

1. 脂肪細胞分泌因子はサテライト細胞の増殖を促進する

脂肪細胞のコンディションメディウムを用いて、初代培養マウス筋芽細胞の増殖に与える影響を検証した。その結果、予想に反して脂肪細胞のコンディションメディウムを用いた場合の方が、筋芽細胞の増殖が顕著に高かった。現在、筋芽細胞の分化・融合に与える脂肪細胞のコンディションメディウムの影響を検証している。

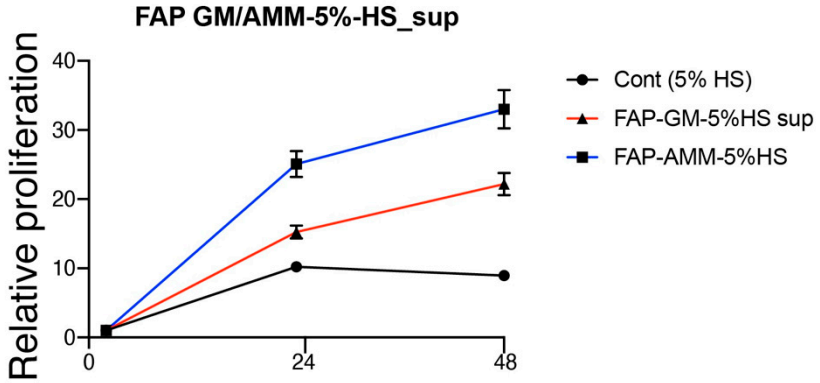


図 1. 脂肪細胞由来因子が筋芽細胞の増殖に与える影響

間葉系前駆細胞を脂肪分化に誘導を 5%HS で 1 日間培養したコンディションメディウム（FAP-AMM-5%HS）と間葉系前駆細胞を増殖培地で培養後 5%HS で 1 日間培養したコンディションメディウム（FAP-GM-5%HS）さらには細胞が入っていない well で 1 晩インキュベートした 5%HS（Cont）が、筋芽細胞の増殖与える影響。横軸は時間、縦軸は培養開始 2 時間の値を 1 とした場合の相対値。

2. 脂肪細胞分化抑制剤は、筋ジストロフィーの表現型を改善しない

GW9962 を 6 週間の連続投与後に解析した結果、解剖時の体重はコントロール群と GW9962 投与群で大きな違いはなかった。また、摘出した三箇所の筋（TA：前脛骨筋、GC：腓腹筋、Qu：大腿四頭筋）の重量を体重で補正した値について、若干の増加傾向はあったが顕著な違いは観察できなかった。さらに、筋力についてもコントロール群と GW9962 投与群で大きな違いはなかった。つまり、GW9962 により脂肪細胞への分化を抑制しても重篤な筋ジストロフィーモデル（DBA/2-mdx）マウスの表現型は改善しないことから、*in vivo* においても脂肪細胞が筋再生を妨害している強力な要因でないことが予想された。

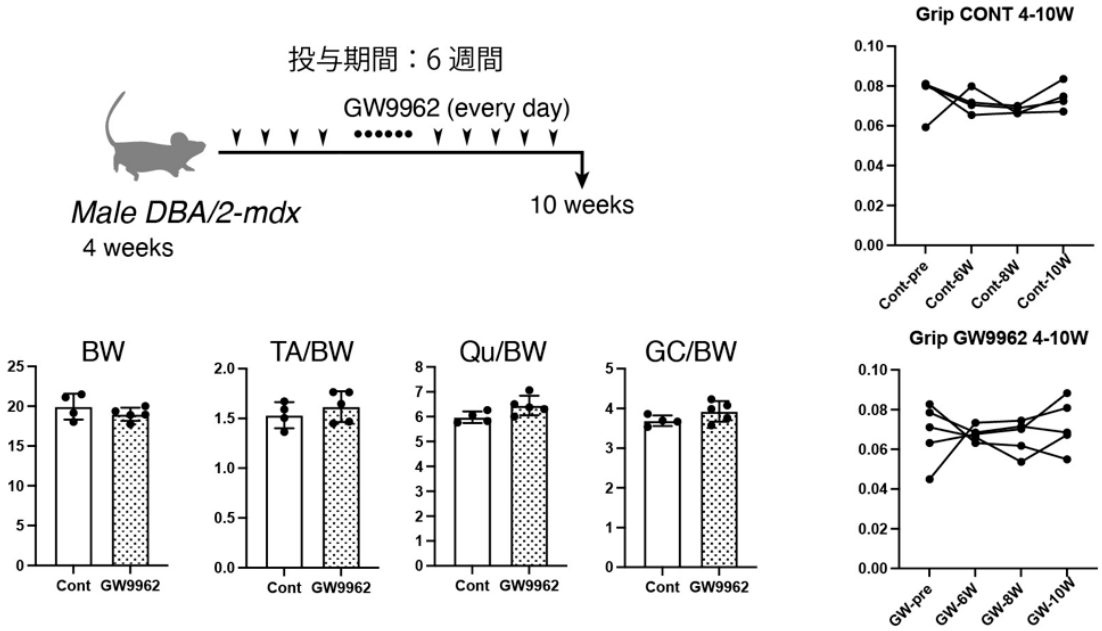


図 2. PPARγアンタゴニストが筋ジストロフィー病態に及ぼす影響の検討
DBA/2-mdx マウスに Control（Cont）および PPARγアンタゴニスト（GW9962）を 6 週間、毎日投与した際の筋力の推移及び解剖時の体重および筋重量。

3. 間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスは再生 7 日目から脂肪マーカーの発現増加がみられる

1、2 の結果より、予想に反して、脂肪細胞が直接筋再生を強力に妨害しているとは考えにくい。そこで、別の可能性として、病的な間葉系前駆細胞の出現により、他の細胞が影響を受け、筋再生を妨害している可能性および、*in vitro* では再現できていない間葉系前駆細胞の特徴がある可能性が考えられた。しかし、一度の再生実験に組織学的には顕著な再生不全は観察されないため、間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスにおいて、Control の再生過程と比較して、違いが出てくる時間の検討を行った。まず、組織学的検討と一致して、各種再生マーカーに関しては Control と間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスとで顕著な違いは認められなかった。一方で、脂肪細胞のマーカーについては、間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスでのみ再生 7 日目で増加傾向が確認された。また、線維化マーカーである Col1a1 については、コントロールマウスでは再生 7 日目に一過性の発現を示したのに対して、間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスではその発現増加は観察されなかった。以上の結果は、再生 7 日目にコントロールマウスと間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスでは再生環境の違いが起き、その後のサテライト細胞の自己複製に影響を与えていることが予想された。また、コントロールマウスの 7 日目での Col1a1 の発現のちがいは、間葉系前駆細胞が発現する Tgfbr2 が Col1a1 の発現に関与しており、TGF-βの一過性のシグナルは筋再生に必須であることが予想された。これに一致して、活性化 TGF-βが再生 5 日目から 7 日目に増加することが報告されている［4］。

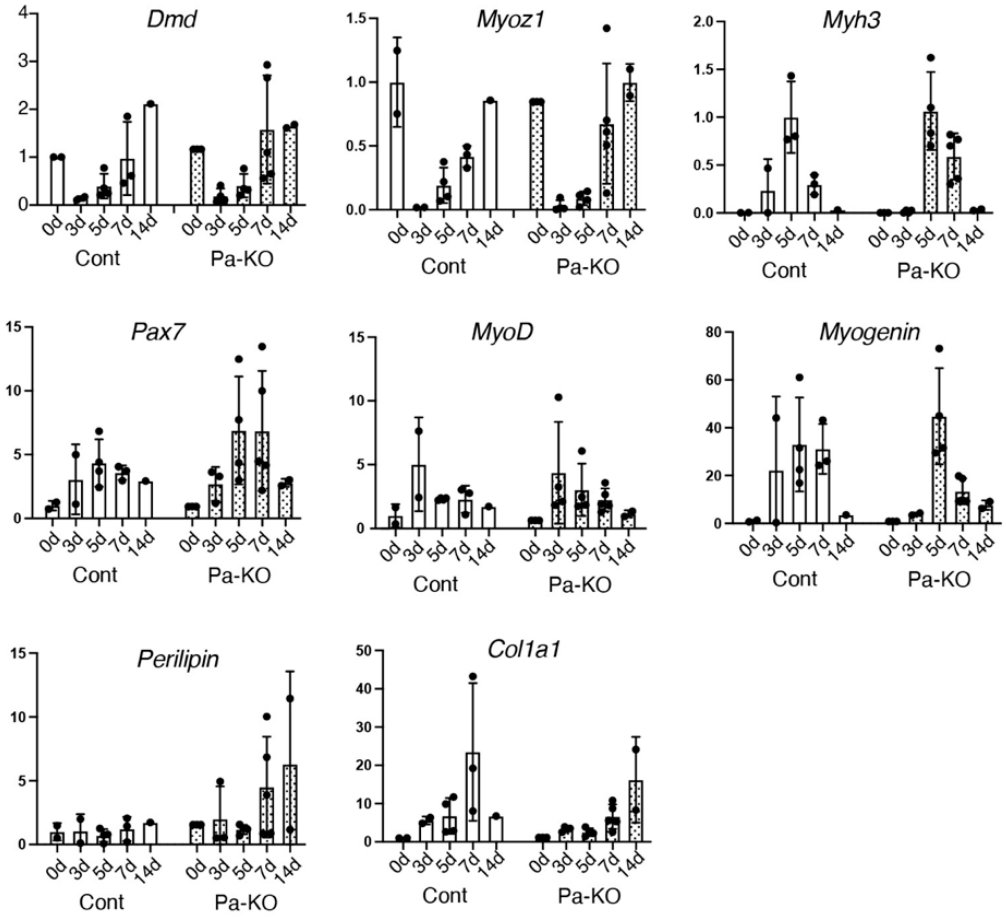


図 3. 間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスにおける筋再生、脂肪化、線維化マーカーの遺伝子発現時期

Control (Cont) および Pa-cKO マウスにカルジオトキシンを用いて筋損傷を誘導後、3、5、7、14 日目前脛骨筋を採取し、筋再生関連遺伝子 (Dmd、Myoz1、Myh3、Pax7、Myod、Myogenin)、脂肪 (Perilipin)、線維化 (Col1a1) の発現をリアルタイム PCR により測定した結果。内部標準遺伝子で補正後、Cont の非損傷筋 (0 d) を 1 とした時の相対値。

考　察

間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 欠損マウスの表現型は、脂肪細胞を含む病態形成細胞の出現により、サテライト細胞の再生能力が劇的に制限される。この結果を踏まえて、脂肪細胞から分泌する因子がサテライト細胞の増殖、分化、自己複製のいずれかに影響を与えていると予想された。しかし、*in vitro* の結果では、脂肪細胞由来の培養上清はむしろ、サテライト細胞の増殖を促進していた。また、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPARγ の阻害剤も重篤な筋ジストロフィーマウスモデルにおける筋力低下や筋重量低下を改善できなかった。この結果は、Tgfbr2 欠損により出現する細胞の真の特徴を *in vitro* では再現できていない可能性や、脂肪細胞の出現により浸潤してくる血液系の細胞が、サテライト細胞の再生能力を妨害している可能性を示唆している。

間葉系前駆細胞特異的な Tgfbr2 の筋組織全体の遺伝子発現の結果より、損傷後 7 日目で Perilipin と Col1a1 の違いが観察されていることから、損傷 7 日目を構成する細胞群の解析が今後、再生妨害因子の同定に必要であると考えられた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院薬学研究科再生適応学分野の教室員により実施された。

文　献

1) Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Takeda S, Tsuchida K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. Nat Cell Biol. 2010 Feb;12(2):143-52. doi: 10.1038/ncb2014. Epub 2010 Jan 17. PMID: 20081842

2) Uezumi A, Ito T, Morikawa D, , et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. J Cell Sci. 2011 Nov 1;124(Pt 21):3654-64. doi: 10.1242/jcs.086629. Epub 2011 Nov 1. PMID: 22045730

3) Kaneshige A, Kaji T, Zhang L, , et al., Relayed signaling between mesenchymal progenitors and muscle stem cells ensures adaptive stem cell response to increased mechanical load. Cell Stem Cell. 2022 Feb 3;29(2):265-280.e6. doi: 10.1016/j.stem.2021.11.003. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34856120

4) Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, et al., Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. Nat Med. 2015 Jul;21(7):786-94. doi: 10.1038/nm.3869. Epub 2015 Jun 8. PMID: 26053624