



筋ジストロフィーモデルラットの作製とラット間葉系前駆細胞クローンの樹立

東京大学大学院 農学生命科学研究科・獣医生理学教室

竹内 志帆、杉原 英俊、寺本 奈保美、山内 啓太郎

はじめに

骨格筋は、成人の体積において約40%を占め、運動機能を担う最大の組織である。一つの骨格筋は主に多核の筋線維が束になることで構成されているが、骨格筋内には筋線維以外にも単核の細胞が存在する。筋線維の外側にある基底膜と筋線維の細胞膜との間には筋衛星細胞（サテライト細胞）とよばれる組織幹細胞が存在している。筋衛星細胞は通常休止状態にあるが、筋線維が損傷を受けると活性化し、増殖・分化を経たのちに互いに融合することで多核の筋管細胞を形成する。この一連の過程を筋再生とよぶ。再生初期の筋管細胞では核が中心部に位置しているが、再生が進行するにつれて徐々に辺縁に移動し、成熟した筋線維となる。骨格筋はこのように高い再生能をもつため、損傷を受けてもその機能を補償することができる。

筋基底膜の外側の間質には、間葉系前駆細胞（mesenchymal

progenitor cells ; MPC）とよばれる細胞群が存在する。MPCも筋衛星細胞と同じく、筋損傷に反応して一過的に増殖し、筋衛星細胞の分化を促進する⁽¹⁾。一方で、MPCは脂肪細胞や線維芽細胞への分化能をもつ細胞でもある^(1,3)。ヒト筋ジストロフィーでは、MPCから分化した脂肪細胞や線維芽細胞が骨格筋内に出現し、これが骨格筋機能の低下に寄与すると考えられている。そのため、MPCの脂肪細胞・線維芽細胞への分化制御機構を解明することは筋ジストロフィー病態緩和のうえで重要である。

ヒト筋ジストロフィーとモデル動物

筋ジストロフィーは、比較的軽度のものから重度のものまで様々であるが、中でも重篤なデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、X染色体上にコードされているジストロフィン遺伝子の変異により、それに由来するジストロフ

インタンパク質が欠損し、筋線維細胞膜の構造的な安定性が失われることで生じる。DMDの発生頻度は、男子3500人に1人と高く、また、20～30代に呼吸不全で死亡するという症状の重篤さから難病に指定されており、多数の研究がおこなわれている。DMDの初期では損傷に対して十分な筋再生がおこるが、年齢を重ねる毎に次第に再生が追いつかなくなり、全身の骨格筋量低下にともない筋力低下が進行する。DMD患者の骨格筋では、筋線維の変性・壊死、中心に核をもつ再生筋線維、筋線維の大小不同に加え、健常者ではほとんどみられない線維組織や脂肪組織が出現する。

DMD研究を進める上での主なモデル動物としては、mdxマウスとCXMD犬がある。ヒトと同様にジストロフィンタンパク質を欠損しているmdxマウスは維持・繁殖が簡便であり、多くの研究者によって利用されているが、DMD患者と比較すると骨格筋再生能が高く、骨格筋の線維化・脂肪化の程度も低い。また、筋力についてもほとんど低下がみられず、DMDの病態進行を必ずしも反映しているとはいえない。一方で、CXMD犬は、骨格筋の再生、線維化や脂肪化がみられ、DMDの病態をよく反映しているが、実験動物としてはその維持・繁殖に多大な労力がかかるという問題点がある。我々は、新たなゲノム編集技術であるCRISPR/Casシステムを用いてラットジストロフィン遺伝子に変異を導入することにより、ジストロフィンタンパク質を欠損するラットを作製した⁽⁴⁾。作製したラットのうち、ある系統では、月齢の進行とともに脊

椎の後弯が生じ（図1A）、骨格筋内に線維組織及び脂肪組織がみられるようになる（図1B）。特に病態の進行した10ヶ月齢では筋力低下も顕著である（未発表）。このようにジストロフィンタンパク質欠損ラットは、mdxマウスよ

りもヒトDMDと類似した病態進行を呈し、CXMD犬よりも維持・繁殖が容易であることから、今後筋ジストロフィー研究を進めていく上で極めて利用価値が高いと考えられる。しかし、その一方で、各細胞種に特異的な細胞膜表面抗原や、それを利用した細胞分離に使用可能な抗体など、マウスと比較してラットで使える研究ツールは限られているのが現状である。

我々が作製したジストロフィンタンパク質欠損ラットがmdxマウスと大きく異なる点の一つが、病態の進行とともにみられる線維組織及び脂肪組織の出現であり、これはin vivoにおけるこれら組織の出現機序を明らかにする上で大きく役立つと思われる。そこで我々は、ジストロフィンタンパク質欠損ラットに加えて、MPCの脂肪細胞・線維芽細胞への分化制御機構をin vitroの側面から解明するうえで有用な研究ツールとして、ラット骨格筋よりMPCクローンを樹立し、MPCの細胞膜上分子を認識する抗体を作製した。

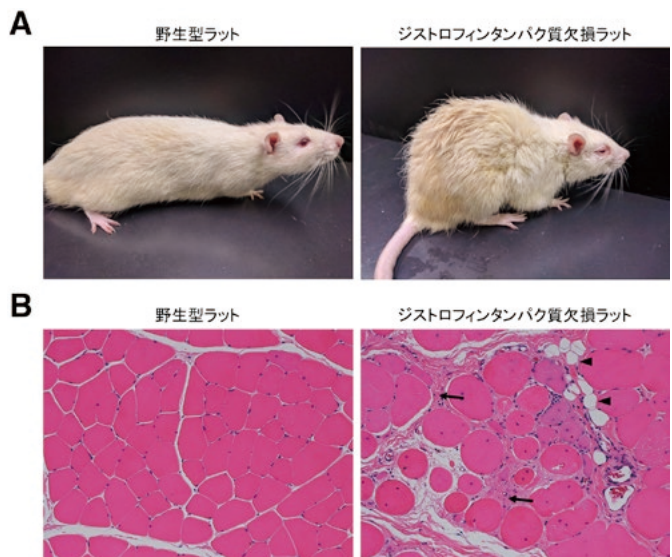


図1 野生型ラット及びジストロフィンタンパク質欠損ラット A)各遺伝子型ラットの外観。B)各遺伝子型ラット骨格筋のHE染色像。ジストロフィンタンパク質欠損ラットでは骨格筋間質に線維組織(矢印)や脂肪組織(矢頭)がみられる。

本稿では、これらのツールを用いて得られたMPCの分化制御機構に関する知見を紹介したい。

骨格筋MPCクローン2G11細胞

骨格筋MPCの分化制御機構を明らかにするため、ラットヒラメ筋より単核細胞を単離し、限界希釈によって各細胞をクローン化した。各クローンについて脂肪分化能の有無によるスクリーニングをおこなったところ、得られたクローンの一つ、2G11細胞は脂肪分化誘導に反応してオイルレッドで染色される脂肪滴を蓄積し、脂肪細胞マーカー（PPAR γ ）陽性を示すことが明らかになった⁽⁵⁾。さらに、2G11細胞に線維芽細胞分化誘導因子であるTGF β を添加すると、線維芽細胞マーカー（*Col1a1*、*Acta2*）の遺伝子発現量の上昇と、ストレスファイバー形成がみられた（図2）⁽⁶⁾。以上のことから、2G11細胞は脂肪細胞・線維芽細胞両者への分化能をもつラット骨格筋MPCクローンと位置付けた。

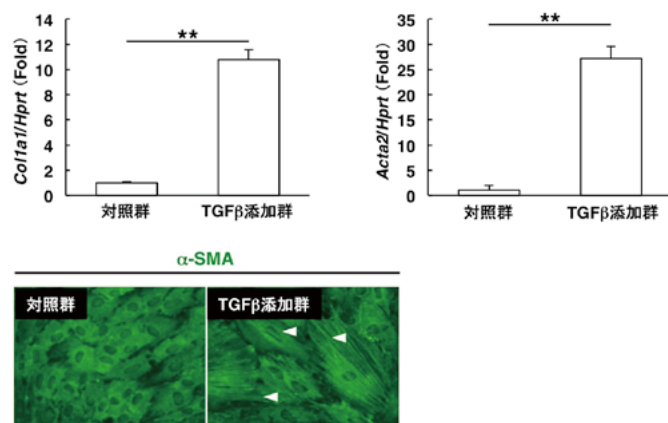


図2 2G11細胞の線維芽細胞分化能

2G11細胞はTGFβ添加により、A)線維芽細胞マーカー(*Col1a1*, *Acta2*)の遺伝子発現量の上昇と、B)ストレスファイバー(白矢頭)形成を示す。★★、 $P < 0.01$, Student's t-test(文献6より改変して引用)

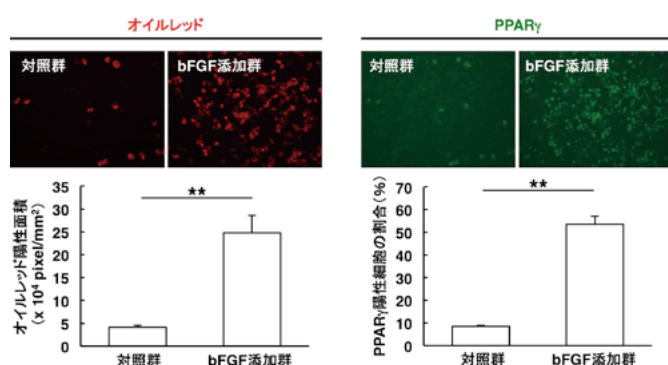


図3 2G11細胞の脂肪分化能におけるbFGFのプライミング効果
脂肪分化誘導に先立ち、bFGFで前処理をおこなうと2G11細胞の脂肪分化能は大きく上昇する(オイルレッド染色およびPPARγの免疫染色を指標とした)。★★、 $P < 0.01$, Student's t-test(文献6より改変して引用)

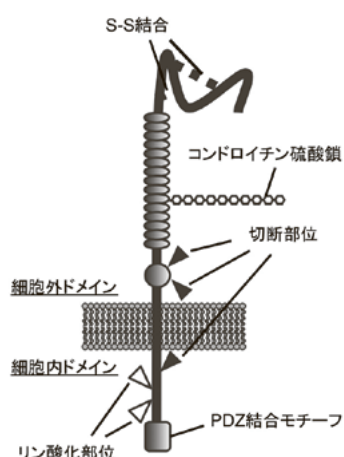


図4 CSPG4分子の構造

細胞外ドメインにはコンドロイチン硫酸鎖付加部位に加え、遊離型CSPG4を生じるプロテアーゼ切断部位がある。一方、細胞内にはリン酸化を受ける部位や、他の細胞内タンパク質と共役して細胞内情報伝達の制御に関与すると考えられるPDZ結合モチーフが存在する。

それではDMDではどのような機序により脂肪細胞の出現がおこるのであるのか?我々は以前、Ex vivoで損傷した骨格筋由来の培養細胞では脂肪分化能が著しく亢進していることを報告した⁽⁷⁾。骨格筋の損傷・再生にとってもなって発現が上昇する成長因子であるbFGFは、マトリゲルとともに皮下投与すると脂肪組織の形成を促進することが報告されている⁽⁸⁻¹¹⁾。

そこで、脂肪分化誘導に先立ち、bFGFで前処理したところ、2G11細胞の脂肪分化能は大きく上昇した(図3)。また、このような効果は他の成長因子ではみられなかった。我々はbFGF前処理によるこのような効果をbFGFのプライミング効果と名付けた⁽¹²⁾。この結果より、生体内では筋損傷・再生に伴うbFGFの発現上昇によりMPCがプライミング効果を受け、その後の何らかの脂肪分化誘導刺激によって骨格筋内の脂肪細胞に分化する可能性が考えられる。

骨格筋MPC細胞膜表面抗原の探索と抗原の同定

前述したbFGFだけでなく、TGFβも筋再生に伴い発現量が上昇する成長因子である^(9, 13)。このことは、筋再生時にMPCはbFGFとTGFβの両者が存在する環境におかれることを意味している。この両者が同時に存在する環境下でのMPCの分化方向はどのような機序により決定されているのだろうか?これら成長因子の作用は受容体を介して発現することを踏まえると、MPCの細胞膜表面分子の中に、成長因子の受容や作用発現を制御する分子が存在する可能性が考えられる。

そこで、我々はマウスに2G11細胞を免疫し、MPCの細胞膜表面分子を認識するモノクローナル抗体を作製することで、成長因子によるMPCの分化制御に関与する膜表面分子の探索を試みた。その結果、得られたモノクローナル抗体のうち5C12抗体はコンドロイチン硫酸プロテオグリカン4(CSPG4)を認識することが判明した⁽⁶⁾。

CSPG4は分子量約260 kDaの1型膜貫通タンパク質で、細胞膜上では細胞外ドメインがコンドロイチン硫酸鎖による修飾を受け、約300 kDaの分子として発現している(図4)。CSPG4は、成長因子や細胞外マトリクスとの結合やリン酸化などによる細胞内シグナル制御により、細胞増殖、細胞伸展、細胞遊走、分化などに関与することが知られている⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。また、CSPG4はプロテアーゼによる切断を受け、細胞膜上から遊離して機能をもつことも報告されている⁽¹⁷⁾。以上のことから、CSPG4が骨格筋MPCの分化においても機

能をもつことが予想されたため、2G11細胞を用いてCSPG4の発現抑制実験をおこない、脂肪分化能・線維芽細胞分化能に与える影響を調べた⁽⁶⁾。

骨格筋間葉系前駆細胞の線維芽細胞分化・脂肪分化におけるCSPG4の機能

脂肪分化誘導前の2G11細胞にsiRNAを導入し、あらかじめCSPG4の発現を抑制したところ、bFGF前処理による脂肪分化能の亢進が消失した(図5A)。一方、脂肪分化誘導開始と同時にCSPG4を発現抑制しても脂肪分化能の低下はみられなかった(図5B)。このことから、CSPG4はbFGFのプライミング効果発現に関与することが明らかになった。

一方、TGF β 誘導性の線維芽細胞への分化能については、CSPG4の発現抑制により、線維芽細胞マーカーである*Col1a1*の発現量には変化はみられなかったが、*Acta2*の発現量増加が阻害されていた(図6A)。また、これとともにストレスファイバー形成がみられなくなっていた(図6B)。これらの結果から、CSPG4はTGF β による線維芽細胞分化に伴う*Acta2*の発現やストレスファイバー形成に関わることが明らかになった。CSPG4が実際にMPCの分化方向決定に関与するかどうかについては現在研究が進行中である。

今後の展望

ラット骨格筋MPCクローン2G11細胞およびMPCの細胞膜表面に存在するCSPG4に特異的な抗体5C12の作製と、これらを用いて得られたMPCの脂肪分化・線維芽細胞分化制御機構に関する知見

を紹介した。

多くの筋疾患では線維化は生じるものの、脂肪化がみられるものは少ない。骨格筋内に線維組織と脂肪組織が同時にみられるという点においても、筋ジストロフィーは特徴的である。MPCは線維芽細胞分化能と脂肪細胞分化能の両者を併せもつが、筋ジストロフィーの病態下での分化制御機構については未解明の点が少ない。

これら多くの未解決の問題について、我々が作製したジストロフィンタンパク質欠損ラットやラット骨格筋MPCクローン2G11細胞を有効に利用することで明らかにしていきたい。

新たなゲノム編集技術により、ラットを含む多様な動物種での遺伝子改変が容易になっている。今回紹介したジストロフィンタンパク質欠損ラ

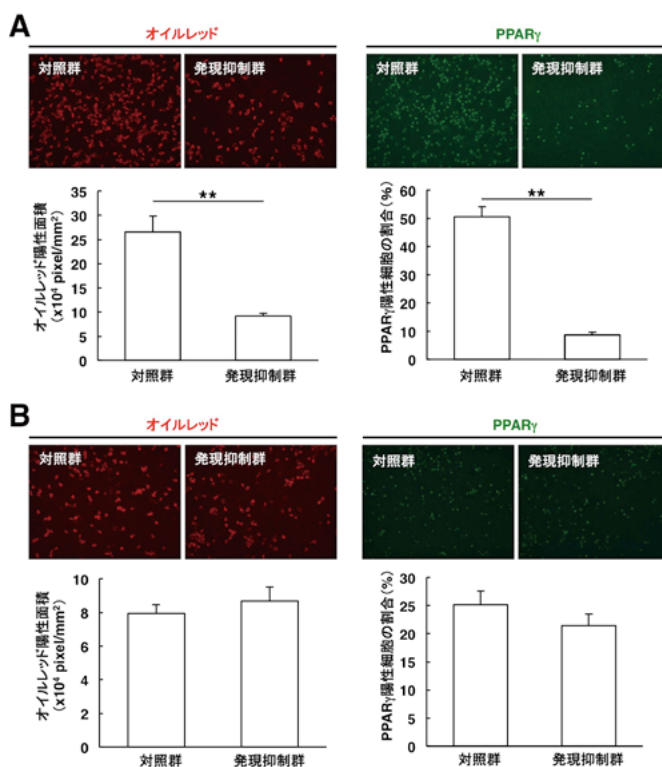


図5 CSPG4発現抑制時の脂肪分化能

A) 脂肪分化誘導に先立ちCSPG4の発現をsiRNAにより抑制した場合、2G11細胞の脂肪分化能が低下する。B) 脂肪分化誘導開始と同時にCSPG4の発現を抑制した場合は脂肪分化能に変化はみられない。ともにオイルレッド染色およびPPAR γ の免疫染色を指標とした。★★、 $P < 0.01$ 、Student's t-test (文献6より改変して引用)

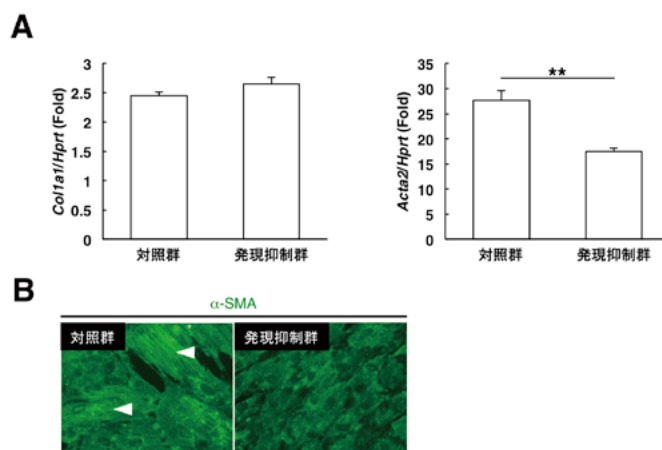


図6 CSPG4発現抑制時の線維芽細胞分化

A) siRNAによりCSPG4を発現抑制した2G11細胞ではTGF β 添加による線維芽細胞マーカー*Col1a1*の発現量には変化はなく、*Acta2*の発現量増加が阻害される。B) CSPG4発現抑制群ではTGF β 添加によるストレスファイバー(白矢頭)形成がみられない。★★、 $P < 0.01$ 、Student's t-test (文献6より改変して引用)

ットのように、これまでマウスにおける遺伝子改変でその機能が予想されてきたタンパク質であっても、遺伝子改変ラットを改めて作

製することで異なる知見が得られる可能性は今後も十分にある。また、ラットはマウスよりもサイズが大きいことから、血液や臓器などサンプル量が多く得られることも利点である。このような利点を最大に活かすためにも、ゲノム編集技術だけでなく、今回紹介した細胞クローンや抗体のように、ラットで使用可能な研究ツールの今後ますますの充実が望まれる。

参考文献

1. Joe et al., Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 153-163.
2. Uezumi et al., Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 12 (2010) 143-152.
3. Uezumi et al., Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 124 (2011) 3654-3664.
4. Nakamura et al., Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* 4 (2014) 5635.
5. Murakami et al., Establishment of bipotent progenitor cell clone from rat skeletal muscle. *Anim. Sci. J.* 82 (2011) 764-772.
6. Takeuchi et al., Roles of chondroitin sulfate proteoglycan 4 in fibrogenic/adipogenic differentiation in skeletal muscle tissues. *Exp. Cell Res.* 347 (2016) 367-377.
7. Yamanouchi et al., Ex vivo bupivacaine treatment results in increased adipogenesis of skeletal muscle cells in the rat. *Anim. Sci. J.* 84 (2013) 757-763.
8. DiMario et al., Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science*. 244 (1989) 688-690.
9. DO et al., Time-coordinated prevalence of extracellular HGF, FGF2 and TGF- β 3 in crush-injured skeletal muscle. *Anim. Sci. J.* 83 (2012) 712-717.
10. Kawaguchi et al., De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 1062-1066.
11. Kimura et al., Time course of de novo adipogenesis in matrigel by gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng.* 8 (2002) 603-613.
12. Nakano et al., Basic fibroblast growth factor is pro-adipogenic in rat skeletal muscle progenitor clone, 2G11 cells. *Anim. Sci. J.* 87 (2016) 99-108.
13. Barros Maranhão et al., Changes in caldesmon, TNF- α , TGF- β and MyoD levels during the progression of skeletal muscle dystrophy in mdx mice : a comparative analysis of the quadriceps, diaphragm and intrinsic laryngeal muscles. *Int. J. Exp. Pathol.* 96 (2015) 285-293.
14. Biname et al., NG2 Regulates Directional Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells via Rho GTPases and Polarity Complex Proteins. *J. Neurosci.* 33 (2013) 10858-10874.
15. Kucharova & Stallcup, The NG2 proteoglycan promotes oligodendrocyte progenitor proliferation and developmental myelination. *Neuroscience*. 166 (2010) 185-194.
16. Eisenmann et al., Melanoma chondroitin sulphate proteoglycan regulates cell spreading through Cdc42, Ack-1 and p130cas. *Nat. Cell Biol.* 1 (1999) 507-513.
17. Sakry et al., Oligodendrocyte Precursor Cells Synthesize Neuromodulatory Factors. *PLoS One*. 10 (2015) e0127222.

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

Göttingen MinipigsTM

Global Standard



利点

- ・豊富なBackground dataが検索可能
- ・遺伝管理 ①小型 ②大人しい性格 ③白色皮膚
- ・Technical & Scientific support



オリエンタル酵母グループは研究者様をTotalサポートいたします

- <器材> 飼育ケージ・経口投与器具・保定器具
 <実験動物用飼料> ミニブタ用飼料、特別注文飼料、ドライフルーツ
 <生体材料> 血液・皮膚・臓器
 <ミニブタ受託試験> <ミニブタ受託飼育> <トレーニングサービス>



オリエンタル酵母工業株式会社

バイオ事業本部

〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3-6-10

TEL : 03-3968-1192 / FAX : 03-3968-4863

URL : <http://www.oyc-bio.jp>