

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	鹿野耕平
学位論文題目			
<p>Transplantation of EphA7⁺ perivascular cells improves skeletal muscle regeneration of muscular dystrophy mouse model.</p> <p>EphA7陽性周細胞は、 筋ジストロフィーマウスモデルにおいて、骨格筋再生能を改善する</p> <p>共著者名 堀内 至、吉田 有里、早坂 太希、鹿原 真樹、富田 唯、澤田 潤、松尾 梨沙、 安田 哲、中島 恵一、中川 直樹、竹原 有史、長谷部 直幸、川辺 淳一</p> <p>論文投稿中</p> <p>研究目的</p> <p>筋ジストロフィー(筋ジス)症の中で、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は最も頻度の高い疾患であり、ジストロフィン遺伝子異常により筋細胞膜のジストロフィンが欠損し筋細胞膜の脆弱性を引き起こす。筋障害と筋幹細胞による筋再生が持続的かつ高頻度に繰り返し行われ、最終的に筋幹細胞の疲弊から呼吸筋を含む全身の筋が萎縮する難病である^[引用文献1]。</p> <p>筋再生維持に関わる筋幹細胞として筋衛星細胞(SCs)が知られているが、近年、SCs欠損マウスで、成体から老化にいたるまで骨格筋量が維持していることから、SCsだけではなく、毛細血管周細胞(PCs)・間葉系幹細胞(MSCs)などの非SCsの存在が示唆されている^[引用文献2]。非SCsは増殖性が高く、例えば、MSCなどは細胞療法として、骨格筋・心筋再生に検討されてきた。しかし、MSCは雑多な細胞集団から成り、幹・前駆細胞の含有率は低く、治療効果に限界がある。これらの限界を克服するため、代替の筋前駆細胞としてPCsが注目されている。</p> <p>これまでに数多くの多分化能を有するPCsが同定されてきたが、多分化能PCsを組織から選択的に分離できる適切なマーカーが存在しなかった。我々は、骨格筋組織を含む末梢組織のPCsからマーカーEphA7により血管新生および間葉系や神経系細胞への多分化能をもつ Capillary Stem Cells (CapSCs)を同定および分離することに成功した^[引用文献3]。</p> <p>本研究では、筋挫滅および筋ジス モデルマウスにおけるCapSCsの筋再生能を検証し、骨格筋再生における同細胞の役割、さらに同疾患病態での治療応用の可能性を検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

【実験1】GFPマウスの皮下脂肪組織から微小血管分画を調製し、EphA7⁺のNG2⁺周細胞(CapSCs)をFACSにより分離した。対照細胞としてEphA7⁻PCs(ctPCs)、及び脂肪組織MSCsである Adipose Stromal Cells(ASCs)を用いた。Cardiotoxin(CTX)によりC57BL/6マウスの腓腹筋を障害し、CapSCsまたは対照細胞を同部位へ導入し、3週間後にLectin-PEを循環還流し血管内皮を染色させた後、筋組織を摘出・固定した。HE・免疫染色による組織学的解析、CUBIC法により組織透明化後、共焦点顕微鏡により移植細胞由来のGFPの発現による筋組織の再生と血管再生の程度や両者の関係性について三次元的に観察・評価を行った。

【実験2】CapSCsの筋再生効果についてASCsと比較するために、実験1と同様の方法を用いて、筋組織へ導入した。導入3週間後に筋エコーによる筋面積の計測と分離した筋組織の湿重量を測定し、移植細胞由来GFP陽性の筋組織面積およびGFP遺伝子発現を免疫染色による組織学解析とPCR法にて定量比較・評価を行った。

【実験3】CapSCsの骨格筋分化能を評価するために、*in vitro*筋分化誘導実験を行なった。筋芽細胞株(C2C12)とCapSCs、ASCs、ctPCsとの共培養下で筋分化を誘導した。筋線維分化は、形態およびMyosin-heavy chain(MyHC)発現を免疫染色法により評価した。

【実験4】CapSCsの重症型筋ジストロフィーにおける治療効果を検証するためにmdx⁻/utro⁻マウスの四肢筋に、GFP発現するCapSCsあるいはASCsを導入し、実験2と同様に移植した細胞由来GFP筋組織面積および遺伝子発現を免疫染色による組織学解析とPCR法にて定量比較・評価を行った。

【実験5】CapSCsによる運動生理機能の改善効果を検証のため、mdx⁻/utro⁻マウスにCapSCs・ASCsを導入し、筋エコーによる面積評価・重量評価およびTreadmill歩行検査装置による600m歩行検査を行い比較評価した。

成 績

【実験1】 CapSCs移植群では中心核を伴う再生筋線維を多く認めた。また移植細胞由来のGFP陽性筋線維および血管を認め、CapSCsによる筋再生・血管新生への寄与が推察された。一方、ctPCs移植群では筋障害組織内の線維化が著明であった。

【実験2】 CapSCs群で移植細胞由来の筋線維の増加を有意に認め、組織内GFP mRNAの発現が有意に高かったことから組織内の細胞残存性が高いことがわかった。また、筋重量は、CapSCs群で高い傾向があり、エコー筋面積も有意にCapSCs群で増加していた。

【実験3】 C2C12との共培養により、CapSCs群でMyHC陽性の分化筋線維の割合が有意に増加した。またCapSCs群では、分化筋線維の中でGFPを発現した筋線維の割合が有意に高かった。

【実験4】 mdx⁻/Utrn⁻マウスへのCapSCs導入により、GFP陽性の再生骨格筋と再生筋におけるジストロフィンの発現を認め、ASCs群と比較し優れた筋面積の増加ならびに組織残存性を認めた。CapSCs群で筋線維の太い成熟した筋組織が増加していた。

【実験5】 CapSCs群において、筋エコー面積・筋重量が有意に増加した。CapSCs群で歩行距離が有意に改善した。また、各群間で体重変動は認めなかった。

考 案

我々が同定した毛細血管幹細胞CapSCsは、対照PCsあるいはASCsと比べ優れた骨格筋再生能を有し、筋ジストロフィーモデルの病態を改善する効果が確認された。

骨格筋線維は、多核細胞で、骨芽細胞同志が融合して、筋再生や筋肥大をもたらす。外来性CapSCが融合した筋繊維において、GFP遺伝子とジストロフィン蛋白が陽性になることから、CapSC由来の核が骨格筋線維に組み込まれ、正常なジストロフィン遺伝子を供給し、結果として再生筋繊維が強固になり、筋組織再生が促進したと考えられる。

In vitroの分化誘導実験では、CapSC単独培養では、明らかな筋芽細胞への分化は認めなかった。しかし、筋芽細胞との共培養で、CapSCのみ効率よく、筋繊維の分化促進効果、および筋線維への融合が確認され、CapSCs自体が筋芽細胞に分化し、筋繊維と融合していることが推測された。CapSCが筋芽細胞へ分化誘導させるために、既存筋線維から分布されるtrophic effectsなどが必要と推測された。

SC細胞もふくめ、幹細胞は組織内の特別な部位 (niche) に保持され、必要時に増殖しながら、適正な細胞分化機能を発揮する。移植したCapSCsは、骨格筋繊維に分化すると共に、毛細血管細胞として組織内に局在していることが観察された。筋繊維への分化能に加えて血管形成能は、組織再生において有効な効果であると考えられる。また、CapSCsは、もともと血管近傍で保持されていることから、移植CapSCの一部が毛細血管周囲に存在しているのは、毛細血管内で幹細胞として組織にとどまり、長期にわたり、組織リモデリング、再生に寄与しつづける可能性があり、今後、検討していく必要がある。

本筋ジスモデルは、重症な筋ジス症状を示し、生後1ヶ月で半数が死亡する。今回、CapSCsは、四肢筋に導入し、導入筋の肥大と筋力の向上が確認されたが、今後、静脈注射などCapSCsの全身投与を試み、全身筋再生と共に寿命への影響も含め、その治療効果を検討していく。

結 論

末梢組織内の微小血管のPCsの中から、EphA7で同定・分離されるCapSCsは、骨格筋再生・維持に関わる幹細胞の一つと推測された。また、対照細胞に比べ、優れた骨格筋再生能を持つことから、再生細胞製剤として筋ジストロフィーへの臨床応用も期待される

引 用 文 献

- [1] Shi X, Garry DJ, Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.*20 (2006) 1692-708.
- [2] Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity without affecting sarcopenia. *Nat med.*21 (2015):76-80.
- [3] Y. Yoshida, M. Kabara, K. Kano, K. Horiuchi, T. Hayasaka, Y. Tomita, N. Takehara, A. Minoshima, T. Aonuma, K. Maruyama, N. Nakagawa, N. Azuma, N. Hasebe and J.I. Kawabe, Capillary-resident EphA7⁺ pericytes are multipotent cells with anti-ischemic effects through capillary formation. *Stem Cells Transl Med.* (2019) (*in press*) 国際特許出願 (PCT・JP2016、072259)

参 考 文 献

- [1] A. Minoshima, M. Kabara, M. Matsuki, Y. Yoshida, K. Kano, Y. Tomita, T. Hayasaka, K. Horiuchi, Y. Saito, T. Aonuma, M. Nishimura, K. Maruyama, N. Nakagawa, J. Sawada, N. Takehara, N. Hasebe, J.I. Kawabe, Pericyte-Specific Ninjurin1 Deletion Attenuates Vessel Maturation and Blood Flow Recovery in Hind Limb Ischemia, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38 (2018) 2358-2370.
- [2] K. Maruyama, N. Nakagawa, T. Aonuma, Y. Saito, T. Hayasaka, K.Kano, K. Horiuchi, N. Takehara, JI. Kawabe, N. Hasebe. The antioxidant and DNA-repair enzyme apurinic/aprimidinic endonuclease 1 limits the development of tubulointerstitial fibrosis partly by modulating the immune system. *Sci Rep.* (2019) (*in press*)
- [3] Y. Tomita, K. Horiuchi, K. Kano, T. Tatsukawa, R. Matsuo, T. Hayasaka, Y. Yoshida, M. Kabara, S. Yasuda, K. Nakajima, N. Nakagawa, N. Takehara, A. Okizaki, N. Hasebe, JI. Kawabe. Ninjurin 1 mediates peripheral nerve regeneration through Schwann cell maturation of NG2-positive cells. *BBRC.* (2019) (*in press*).
- [4] K.Kano, T. Katayama, S. Takeguchi, A. Asanome, K.Takahashi, T. Saito, J. Sawada, M. Saito, R. Anei, K. Kamada, N. Miyokawa, H. Nishihara, N. Hasebe. Biopsy-proven case of Epstein-Barr virus (EBV)-associated vasculitis of the central nervous system. *Neuropathology.* 37 (2017):259-264.