

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	酒 井 大 史
論文題目	Fetal Skeletal Muscle Progenitors Have Regenerative Capacity After Intramuscular Engraftment in Dystrophin Deficient Mice. (胎生期骨格筋前駆細胞は、筋内移植によりジストロフィン欠損マウスの骨格筋再生に寄与する)		
(論文内容の要旨)			
ジストロフィントタンパク質の欠損を原因とする Duchenne muscular dystrophy (DMD) は、進行性の筋力低下がみられる遺伝性筋疾患である。DMD では、壊れた筋組織内で、骨格筋の成体組織幹細胞である筋衛星細胞 (satellite cell, SC) が増殖し、互いに細胞融合して筋管を形成するという筋再生が繰り返されている。DMD に対する治療法として、正常ジストロフィン遺伝子をもった細胞を再生筋へと移植し、正常筋組織に置換する、細胞移植療法が有効である。 細胞移植におけるSCの骨格筋再生能は、マウスを用いた多数の研究で検証されている。SCは、転写因子Pax3 を発現する細胞に由来することが遺伝学的に証明されており、解剖学的にも、16.5 日胚において、基底膜直下のPax3 陽性細胞として認められる。しかし、胎生期のPax3 陽性細胞が、SCと同様に、骨格筋再生能をもつかは不明であった。そこで、本研究では、Pax3 遺伝子座に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を挿入した遺伝子改変マウス (Pax3^{GFP/+}マウス) をもちいて、16.5 日胚から胎生期骨格筋前駆細胞 (fetal skeletal muscle progenitor, FMP) を単離し、その性質と骨格筋再生能を評価し、さらに、成体骨格筋から単離したSCと比較した。 GFP の発現を指標に、セルソーターによって FMP と SC を単離し、培養すると、培養 1 日目には、両者とも骨格筋特異的な転写因子 MyoD を発現し、培養 7 日目には、多核の筋管を形成した。このことから、培養下では、FMP は SC とほぼ同等の筋形成能を有することが確認された。次に、両者を、DMD モデル動物のジストロフィン欠損マウスへ移植し、ドナー由来のジストロフィン陽性筋線維数を定量することで、骨格筋再生能を比較した。その結果、FMP が、個体レベルで骨格筋再生能をもち、さらに、SC と同様に、基底膜と筋細胞膜の間に位置する成体の骨格筋幹細胞のニッチを占有する能力をもつことが証明できた。しかし、SC を移植した場合に比べ、その再生効率と占有率は有意に低かった。 次に、骨格筋再生能に影響を及ぼす可能性のある因子として、骨格筋分化決定因子である MyoD に着目した。SC では、発生過程で MyoD が一過的に発現し、成体になると MyoD タンパク質の発現が消失する。一方、FMP では MyoD を発現した経歴を持つ細胞はその約半数であることが確認された。そこで、MyoD 発現経歴を有する FMP (MyoD 陽性 FMP) と MyoD 発現経歴を持たない FMP (MyoD 陰性 FMP) の骨格筋再生能を比較した。両者をジストロフィン欠損マウスへ移植すると、MyoD 陽性 FMP を移植した場合に、より多くのジストロフィン陽性筋線維が認められた。また、MyoD 陰性 FMP、MyoD 陽性 FMP、SC の三者の遺伝子発現を定量的 PCR で解析でしたところ、骨格筋分化の指標である MyoD、Myogenin の発現が、MyoD 陽性 FMP ならびに SC で高かった。 以上の結果から、SC と同様に、FMP も骨格筋再生能をもつことが証明された。			

また、ジストロフィン欠損マウスへの移植において、Pax3 を発現する細胞集団の中で、骨格筋への生着効率には MyoD の発現経歴が影響を及ぼすことが示唆された。FMP と SC の詳細な骨格筋再生能の比較と機能解析は、DMD を含む筋ジストロフィーに対する細胞治療ならびに再生医療の研究・開発に貢献できると期待される。 (論文審査の結果の要旨) 骨格筋組織幹細胞である筋衛星細胞 (satellite cell, SC) は、転写因子Pax3 を発現する中胚葉細胞に由来し、成体の筋形成・再生を担うとともに、移植による骨格筋再生能をもつ。それに対し、胎生期の筋形成を担うPax3 陽性細胞が、SCと同様に、骨格筋再生能をもつかは不明であった。そこで、<i>Pax3^{GFP/+}</i>マウスをもちいて、胎生期骨格筋前駆細胞 (fetal skeletal muscle progenitor, FMP) を単離し、デュシェンヌ型筋ジストロフィーのモデル、ジストロフィン欠損マウスへ移植することで、その筋再生能を評価し、成体のSCと比較した。その結果、16.5 日胚から単離したFMPは、その再生効率と占有率は、SCと比較して有意に低かったものの、骨格筋再生能をもち、筋衛星細胞のニッチを占有する能力をもつことが証明できた。一方で、MyoD発現経歴を有するFMP (MyoD陽性FMP) は、MyoD発現経歴を持たないFMP (MyoD陰性FMP) よりも有意に高い骨格筋再生能を示した。MyoD陰性FMP、MyoD陽性FMP、SCの遺伝子発現の解析と合わせて、骨格筋への生着効率にはMyoDの発現経歴が影響を及ぼすことが示唆された。 以上の研究は、骨格筋組織幹細胞による再生機構の解明に貢献し、今後の骨格筋再生医療の開発・研究に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 25 年 5 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			