

**博士（人間科学）学位論文 概要書**

**Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote  
muscle regeneration by stimulating proliferation  
and migration of myoblasts**

**骨格筋由来 CD31(-) CD45(-) SP 細胞による  
筋芽細胞の増殖及び遊走の促進**

**2008年 7月**

**早稲田大学大学院人間科学研究科**

**本橋 紀夫**

**Motohashi Norio**

**研究指導教員：今泉 和彦 教授**

**【研究の背景と目的】** 骨格筋はヒトの体の約 40%の体積を占める最も大きな臓器である。この骨格筋は激運動や筋疾患により、損傷・壊死を生じた際に速やかに再生されることが知られている。しかし、デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)では骨格筋膜直下の細胞骨格タンパク質のジストロフィンが欠損するため筋膜が脆弱となり、筋の変性と壊死が著明に惹起される。このような遺伝性疾患ではジストロフィンの発現と筋再生能を回復させるため、正常ジストロフィン遺伝子を持つ筋衛星細胞が移植されてきた。筋衛星細胞は通常静止期にあり、筋再生時に活性化した筋衛星細胞（筋芽細胞）となる。筋衛星細胞を DMD の筋に移植すると、互いにあるいは傷害された筋線維と融合して筋再生を促進するが、その効率は極めて低く筋張力は回復しない。一方、骨格筋中には DNA 結合色素である Hoechst33342 を効率よく排出する Side population (SP) 細胞が存在し、この SP 細胞は幹細胞の性質を持つと考えられている。この SP 細胞を血管内皮マーカーの CD31 および血球系マーカーの CD45 の発現により 3 つの亜分画に分けると、再生骨格筋では正常骨格筋において極めて少ない集団であった CD31(-)CD45(-)分画の増加することを Uezumi らは報告している (2006)。この分画の SP 細胞は他の分画に比べ増殖能が高く、*in vitro* で骨細胞や脂肪細胞に分化し、筋芽細胞と共培養すると、筋管を形成する。更にこの分画の SP 細胞を移植すると骨格筋に分化することが示されている。しかし、その移植効率は非常に低いことも知られている。そこで本研究では、この分画の SP 細胞の筋再生における機能的役割について詳しく検討した。**【結果】** Green fluorescent protein (GFP)トランスジェニックマウス (GFP-Tg)から筋衛星細胞と CD31(-) CD45(-) SP 細胞をセルソータで単離し、免疫不全 *NOD/scid* マウス及びジストロフィン欠損 *mdx* マウスの骨格筋に移植した。*NOD/scid* マウスの骨格筋には、移植前日にカルジオトキシンを局所投与し、壊死を引き起こした。移植は i) GFP-Tg 由来の培養筋衛星細胞（筋芽細胞）の単独移植、および ii) GFP-Tg

由来筋芽細胞と C57BL/6 マウス由来 CD31(-) CD45(-) SP 細胞との共移植を行い、2 週間後、GFP 陽性細胞の筋線維再生への寄与率を評価した。単独移植に比べ、CD31(-) CD45(-) SP 細胞と共移植した GFP 陽性筋芽細胞はより多くの GFP 陽性筋線維を形成していた。これらの結果から、この SP 細胞は、筋線維に分化する能力は必ずしも高くないが、筋芽細胞の生着あるいは増殖を促進している可能性が示唆された。次に、この SP 細胞と筋芽細胞の共移植によって筋線維形成を促進するメカニズムを明らかにするため、移植 72 時間後に GFP 陽性細胞数を計測した。すると共移植筋では単独移植筋に比べ、より多くの GFP 陽性細胞が認められ、広範囲に分布していた。M 期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 抗体で免疫染色を行ったところ、CD31(-) CD45(-) SP 細胞と共移植した場合、単独移植した時に比べ M 期にある GFP 陽性の細胞の割合が高かった。更に、網羅的遺伝子解析を行った結果、この SP 細胞ではマクロファージや筋芽細胞と比較すると、細胞外マトリックス、細胞膜タンパク質およびサイトカイン遺伝子群が高く発現していた。Matrix metalloproteinase (MMP)-2 は、SP 細胞で特に発現が高く、*In situ* gelatin zymography 法でもこの SP 細胞で高い MMP 活性が認められた。MMP-2 が筋芽細胞の遊走能促進に直接関与しているか否かを調べるため、MMP-2 ノックアウト (MMP-2<sup>-/-</sup>) マウス由来の CD31(-) CD45(-) SP 細胞を用いて共移植実験を行ったところ、C57BL/6 マウス由来 CD31(-) CD45(-) SP 細胞と共移植した場合に比べ、GFP 陽性細胞はあまり広範囲に広がっていなかった。

【まとめ】以上の結果から、CD31(-) CD45(-) SP 細胞は筋芽細胞の増殖や遊走、細胞外マトリックスのリモデリングを促進する事によって筋再生を惹き起こす機能的役割を担っていることが強く示唆された。CD31(-) CD45(-) SP 細胞が筋再生を促進するメカニズムをより明らかにし、筋の損傷や壊死の回復過程を詳細に明らかにすることが今後の重要課題である。