

2008年7月7日

人間科学研究科長 殿

## 本橋 紀夫氏 博士学位申請論文審査報告書

### 記

1. 申請者氏名 本橋 紀夫
2. 論文題名 **Muscle CD31(-) CD45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts.**
3. 本文

ヒトの骨格筋は体重の約 40-45% を占める最大の臓器である。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。しかし、Duchenne 型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy : DMD) では骨格筋膜直下の細胞骨格タンパク質の dystrophin が欠損するため筋膜が脆弱となり、筋の変性と壊死が惹起される。このような遺伝性疾患では dystrophin の発現と筋再生能を回復させるため、正常な dystrophin 遺伝子を持つ筋衛星細胞が移植されてきた。

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、この細胞は幹細胞としての役割を一部担っていると考えられている。この SP 細胞を血管内皮マーカーの CD31 と血球系のマーカーの 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 CD31(-)CD45(-)分画が増加することが知られている。この SP 細胞は増殖能が高く、骨細胞や脂肪細胞に分化すると共に、筋芽細胞と共培養すると筋管を形成する。更にこの細胞を移植すると骨格筋に分化することも示されているが、その移植効率は非常に低いとされている。このような背景の下に、本研究では、CD31(-)CD45(-)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ている。

本論文ではまず、Green fluorescent protein (GFP)トランスジェニック(GFP-Tg)マウスから筋衛星細胞と CD31(-)CD45(-) SP 細胞を単離し、この細胞を免疫不全 *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 GFP-Tg 由来の培養筋衛星細胞 (筋芽細胞) の単独移植および 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、その 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。その結果、CD31(-)CD45(-) SP 細胞と共移植した GFP 陽性筋芽細胞は、単独移植に比べてより多くの GFP 陽性線維の形成がみられた。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機構を明確にするため、移植 72 時間後に GFP 陽性細胞数を計測した。その結果、共移植筋では単独移植筋に比べてより多くの GFP 陽性細胞が広範囲に認められた。分裂期から増殖期にかけて GFP 陽性の細胞の割合は CD31(-)CD45(-) SP 細胞と共移植した方が単独移植した場合より明らかに高かった。さらに、この SP 細胞では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。特に細胞外マトリックスを分解する

Matrix metalloproteinase (MMP)-2はSP細胞で特に発現が高く、このSP細胞で高いMMP活性が認められた。そして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しらべた。そのため、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結果、C57BL/6マウス由来のCD31(-)CD45(-) SP細胞と共移植した場合に比べてGFP陽性細胞は広範囲に広がっていないことを観察した。

本論文では、これらの結果より、CD31(-)CD45(-) SP細胞が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ことによって筋再生を引き起こすことが強く示唆されている。今後の重要な検討課題として、CD31(-)CD45(-) SP細胞が筋再生を促進する機構をより明確にし、筋の損傷や壊死の回復過程を詳細に明らかにすることを強調している。これらの研究成果は健康・生命医科学領域の分野のみならず多くの筋科学の学際領域に多大な貢献をすることが十分に期待できる。

本研究の成果は、The American Society for Investigative Pathology (USA) から刊行されている原著論文【Motohashi N, Uezumi A, Yada E, Fukada SI, Fukushima K, Imaizumi K, Miyagoe-Suzuki Y and Takeda S : Muscle SD31(-)CD(45(-) side population cells promote muscle regeneration by stimulating proliferation and migration of myoblasts. *American Journal of Pathology*, 172 : in press (2008)】を新たに再構成・加筆し、学位論文として取り纏めたものである。

博士学位申請論文審査会 (2008年7月2日 (水) 14時30分 - 15時30分、100号館・第一会議室) では、本橋 紀夫氏より上記の内容をパワーポイントにて説明を受け、その後質疑応答が実施された。その結果、本人の研究発表はきわめて明快かつ簡潔であり、各審査員の質疑に対する応答についても適切できわめて理解しやすいものであった。その後、審査員全員で本論文の内容の妥当性について慎重に審議した。その結果、本論文の構成とその内容が極めて妥当であり、研究の背景と目的、方法、結果、考察および結論の記述内容についても適切であると意見が一致した。以上の内容を総合的に判定した結果、本提出論文が本研究科の博士 (人間科学) として妥当であることを審査員全員一致で判定した。

#### 4. 本橋 紀夫 氏 博士学位申請論文審査委員会

主任審査員	早稲田大学 教授	医学博士 (大阪大学)	今泉 和彦 印
審査員	早稲田大学 教授	理学博士 (東京大学)	木村 一郎
審査員	早稲田大学 教授	博士 (医学) (京都府立医科大学)	永島 計
審査員	国立精神・神経センター神経研究所 部長		
		医学博士 (信州大学)	武田 伸一
審査員	国立精神・神経センター神経研究所 室長		
		博士 (医学) (九州大学)	鈴木 友子