

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 大竹 洋平

本研究は、多細胞生物の組織構築において重要な役割を演じている細胞外基質（ECM）とその分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の基質酵素関係の生理的意義を、骨格筋組織を評価系として解析し、下記の結果を得た。

1. 細胞培養系における骨格筋分化過程は、細胞増殖および分化のそれぞれに特異的な指標分子の発現より、増殖期・伸長期・融合期の連続した3期に区分され、群特異的 MMP 阻害剤を用いた実験から、骨格筋分化には伸長期特異的な MMP 活性要求性を示した。伸長期において MMP 活性を阻害した場合、筋芽細胞より筋管細胞が形成される細胞融合を伴った形態的分化が特異的に阻害され、一方でサルコメア構成分子など成熟骨格筋機能を担う分子の発現誘導は全く影響が認められなかった。同様の形態的分化阻害作用は siRNA 法により膜型 MMP である MT1-MMP を特異的に発現抑制した際にも観察され、群特異的 MMP 阻害剤を用いた場合との比較より、伸長期において筋細胞の形態的分化に関わる MMP 活性の約 50% を MT1-MMP の酵素活性が担っていることが明らかとなった。
2. 引き続き伸長期における MMP の基質分子について、筋細胞の形態的分化に役割を果たしているか検討した。フィブロネクチンは広範な組織に発現している ECM 分子で、筋管細胞形成に阻害的作用を持つとの文献的報告があり、かつ MT1-MMP を含め複数の MMP の切断分解基質である。そこで MMP 群が伸長期においてフィブロネクチンを分解し、その阻害作用を解除することで、間接的に筋管細胞の分化に促進的作用をもたらすのではないかという作業仮説を立て、その検証を行なった。阻害機序や特異性の異なる複数の MMP 阻害剤と、siRNA による特異的発現抑制法を用い、フィブロネクチンの筋分

化に伴う経時的变化を評価した。フィブロネクチンは筋分化に伴って MMP 依存的に経時的に減少した。またフィブロネクチンの減少度と形態的分化の阻害強度は正に相関していた。これにより MT1-MMP を含む MMP 活性が筋細胞の形態的分化を制御する際の分解基質の一つがフィブロネクチンである可能性が示唆された。

3. 上記機構において中心的役割を示す MT1-MMP に特に注目して、生体組織における生理的意義を遺伝子欠損マウスにて評価した。全身性の遺伝子欠損マウスでは、筋線維の直径が微小であるなど骨格筋組織の発達異常が認められた。このことは、他組織における異常を起因とした二次的な影響を排除することは出来ないが、MT1-MMP の生理的重要性を示唆した。加えて、MT1-MMP 欠損組織では中心核を有する筋線維が認められ、内性的に筋再生が誘導される筋ジストロフィーにおける再生筋線維像と類似していた。成熟骨格筋において筋基底膜を構成し組織特異的な ECM であるラミニン2は既知の筋ジストロフィー関連細胞外分子として知られるが、MT1-MMP により生理的に分解されることが明らかとなった。この現象の意義は未だ不明であるが、MT1-MMP がラミニン2の切断を介して筋線維の細胞接着を調整することが組織の恒常性維持に関わる可能性があり、今後の評価対象として興味深い。

以上、本論文は骨格筋分化過程で複数種類の ECM と MMP との基質酵素関係が存在することを示し、それらが機能的に重要である可能性を明らかにした。また特に膜型 MMP である MT1-MMP が骨格筋分化において重要であることを *in vivo* のモデルシステムを用いて示した。本研究はこれまで報告の無かった、骨格筋組織における ECM 分解の重要性を複数のアプローチにより示し、MMP 依存的に ECM 分子の組織特異的制御が行われることを明らかにした点で先駆的であり、当該研究分野に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと評価できる。