

論文の内容の要旨

論文題目 Ectopic Calcification in Mdx Mouse Skeletal Muscle
(Mdx マウス骨格筋の異所的石灰化)

氏名 吉川 奈美子

背景

デュシャンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は、ジストロフィンタンパク質の欠損によって起こる進行性・致死性の筋疾患である。筋細胞膜にはジストロフィン糖タンパク質複合体(DGC)が存在し、細胞外マトリクスと細胞骨格を結合して筋細胞膜の安定を保っているが、ジストロフィンを欠損すると DGC が形成されず、筋細胞膜が脆弱になり筋収縮を繰り返すと筋細胞膜が損傷を受けやすくなる。そのため DMD では筋細胞の変性が筋衛星細胞の増殖・分化による筋再生を凌駕し、筋組織の恒常性が維持できなくなると共に、繊維芽細胞の増殖による繊維化が促進され、筋力の低下や筋萎縮が進行すると考えられている。

一方、DMD のモデル動物であるゴールデンレトリバー犬や mdx マウスの骨格筋内には筋組織の変性とともにカルシウムの沈着(異所的石灰化)が認められる。DMD に限らず、腎臓や血管などの異所的石灰化に関しては多くの報告があり、特に血管平滑筋細胞の石灰化は動脈硬化との関連が注目されている。従来、異所的石灰化はカルシウムの沈殿が生じる受動的な過程に過ぎないと考えられていた。しかし近年、血管の異所的石灰化部位に骨分化に関わる転写因子や細胞外マトリクスの発現が見られることから、血管平滑筋細胞が積極的に進行過程であることが明らかとなってきた。先行研究により、高濃度の無機リン酸(Pi)存在下でヒト血管平滑筋細胞の培養を行うと骨分化が誘導されカルシウムの沈着を生じることから、Pi は血管平滑筋細胞の骨分化を誘導する有力な因子であると考えられている。

私は、mdx マウス骨格筋に生じる異所的石灰化の発生メカニズムの解明を目的として、石灰成分の物質解析、筋組織内のカルシウム沈着に関する組織学的解析を行った。さらに、骨格筋組織内に存在する筋衛星細胞や株化筋細胞は骨格筋以外の中胚葉系細胞へと分化する能力があることが示されているため、mdx マウス骨格筋内では筋細胞の一部が骨分化するという仮説を立てて一連の実験を行った。

結果と考察

X線マイクロCT、電子顕微鏡を用いた観察

mdx マウスの下肢大腿部を高分解能のX線マイクロCT装置を用いて観察したところ、X線を強く吸収する微小構造が認められた。この構造を含む筋組織についてカルシウムを検出するコッサ染色法によって黒褐色に染色されたため、カルシウムの沈着であることがわかった。また、電子回折とエネルギー分散型X線分析から主成分がリン酸カルシウム結晶の一種であるヒドロキシアパタイト(HA)と判明した。この異所的石灰化はmdx マウスの骨格筋にのみ観察され正常対照のB10 マウスでは全く見られなかったことから、異所的石灰化と筋ジストロフィーとの関係が示唆された。

mdx マウスにおける血清 Pi 濃度の上昇

異所的石灰化の成分が HA であることから mdx マウスでは Pi やカルシウムの代謝に異常がある可能性が考えられた。血清中のリン酸およびカルシウムの濃度を測定したところ、mdx マウスと正常対照の B10 マウスとの間でカルシウムについて有意差は見られなかったが、Pi は mdx マウスが B10 マウスの 1.4 倍の濃度であることがわかった。mdx マウスでは骨格筋細胞内の Pi 濃度が運動によって上昇することが先行研究から示されている。また、DMD の患者や mdx マウスでは筋細胞膜の損傷部位からクレアチンキナーゼやミオグロビンなどの筋細胞内の分子が血液中に漏出する現象が知られており、Pi も同様に筋細胞内からの漏出によって血清中の濃度が上昇する可能性が考えられる。

先行研究から高濃度の Pi が血管平滑筋の骨分化を誘導することが報告されている。そこで私は mdx マウス骨格筋の異所的石灰化の原因が骨格筋細胞の高濃度の Pi による骨分化誘導にあると考え、培養細胞を用いてこの仮説の検証を行った。

高濃度 Pi による骨分化誘導と筋分化抑制

骨格筋細胞は分化多能性を持ち、筋衛星細胞やマウス筋芽細胞株 C2C12 は培養条件下で脂肪酸の添加によって脂肪細胞に、BMP-2 の添加によって骨芽細胞へと分化することが知られている。そこで C2C12 細胞を高濃度の Pi 存在下で培養したところ、ウェスタンブロットティングによって Runx2 の発現が、RT-PCR によってオステオカルシンの発現が認められた。Runx2 は骨分化に最も重要な役割をもつ転写因子で、I 型コラーゲンやオステオポンチン、オステオカルシンなど骨分化に必要なタンパク質の発現を直接活性化する機能をもつことが知られている。中でもオステオカルシンは細胞外マトリクスタンパク質のひとつであり、骨分化のマーカーとして利用されている。

高濃度の Pi 存在下で C2C12 細胞を培養すると、骨分化が誘導されるだけでなく、筋分化の抑制も認められた。ただし、骨分化の誘導は 3 から 5mM の Pi においても生じるが、5mM の Pi 存在下では筋分化と骨分化の両方が進行し、筋分化の抑制は 7mM 以上で初めて見られた。免疫染色法による観察から筋分化と骨分化はひとつの細胞で同時に起こるのではなく、それぞれが独立した細胞で起こることがわかった。mdx マウスの血清中の Pi 濃度は約 5mM であり mdx マウスの生体内では筋分化と骨分化の両方が起きていると考えられるため、C2C12 細胞の Pi に対する骨分化と筋分化の感受性の違いは mdx マウス生体内での状態と矛盾しないと考えられる。さらに、高濃度の Pi 存在下で C2C12 細胞におけるカルシウムの沈着が確認された。細胞外の Pi が骨格筋細胞の骨分化を誘導することを示したのは本研究が最初である。血管平滑筋では細胞膜上に存在するナトリウム依存性 Pi トランスポーターの一種 Pit-1 と異所的石灰化との関連が指摘されていることから、骨格筋でも Pit-1 の寄与が考えられる。

リン酸カルシウムによる骨分化誘導

リン酸ナトリウムと塩化カルシウムを培養液に添加して生じたリン酸カルシウムの沈殿とともに C2C12 細胞を培養したところ、Runx2 の発現の上昇がウェスタンブロットティングによって確認された。固体のリン酸カルシウムによって細胞の骨分化が誘導されたことから、mdx マウスの骨格筋内では異所的石灰化部位の周囲の細胞がさらに骨分化し石灰化を進行させるという局所的ポジティブ・フィードバックループが生じていることが示唆された。

細胞の骨分化によらない石灰化

mdx マウス骨格筋の凍結切片を作成しカルシウム塩やカルシウムイオンを検出するアリザリン S 染色を行うと、石灰化部位だけではなく石灰化が起きていない筋繊維も染色された。ジストロフィンを欠損した筋繊維ではカルシウムの調節に異常があり、変性した筋繊維の細胞内にはカルシウムイオンが蓄積していることが知られている。従って、mdx マウス骨格筋の異所的石灰化の原因として、骨分化した細胞によるカルシウムの沈着だけでなく高濃度の Pi とカルシウムイオンの共存によって生じるリン酸カルシウムの沈殿形成の可能性も考えられた。

低 Pi 餌による異所的石灰化の減少

mdx マウス骨格筋の異所的石灰化と血清中の Pi 濃度との関連を調べるため、Pi 含有量が通常の 1/9 である低 Pi 餌を mdx および B10 マウスに与えた。通常の餌を与えた mdx マウスの血清 Pi 濃度は B10 マウスよりも有意に高いが、低 Pi 餌を与えることで血清 Pi 濃度が通常の B10 マウスと同程度まで低下した。また、X 線マイクロ CT を用いた観察により、低 Pi 餌を与えると mdx マウス骨格筋内の異所的石灰化が劇的に減少することがわかった。これらの結果から異所的石灰化が血清 Pi 濃度の上昇によって生じることが示唆された。

結論

以上の実験の結果から、mdx マウス骨格筋に見られる異所的石灰化の原因は高濃度の Pi やリン酸カルシウムの沈着による筋芽細胞の骨分化誘導と、高濃度の Pi とカルシウムイオンの共存によるリン酸カルシウムの沈殿形成の結果生じたと考えられる。リン酸による筋芽細胞の筋分化抑制と骨分化誘導に関する知見、及び mdx マウス骨格筋の異所的石灰化についての詳細な解析は本研究が初めてのものである。また、老化関連遺伝子クロートの破壊により、マウス体内でリン酸濃度が上昇し異所的石灰化がおきることから、クロート遺伝子産物とジストロフィンとの間の機能的相関にも興味を持たれる。

mdx マウス骨格筋の異所的石灰化は、未だ解明が進んでいないリンのホメオスタシスに関する好適な実験系を提供すると共に、石灰化を筋変性指標とした筋ジストロフィーの発症機序の解明と治療法開発に役立つと思われる。