

論文審査の結果の要旨

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)

論文提出者 吉川 奈美子

本論文は Duchenne 型筋ジストロフィー(DMD) のモデル動物である mdx マウスの骨格筋に見られる異所的石灰化の形成機構を研究したものである。 mdx マウスの骨格筋はヒトの DMD と同様、筋の細胞死や変性を呈する。その原因は筋細胞膜の裏打ちタンパク質 dystrophin の欠損により細胞膜が脆弱となり、収縮運動により細胞膜が破断したためと考えられている。 さらに筋ジストロフィー筋では筋変性が引き金となり筋衛星細胞の活性化と新しい筋ファイバー形成が盛んに起きている。 一方、mdx マウスや他の DMD モデル動物では、骨格筋内においてカルシウム塩の沈着(異所的石灰化)が認められるが、その機構は不明である。 また、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞は培養条件下で骨形成タンパク質(BMP)-2あるいは-4存在下に骨分化を起し、インスリンやリノレン酸の存在下で脂肪分化を起こすなど分化多能性を持つことが知られている。 しかし、この筋衛星細胞の分化多能性は培養条件下のみ認められる性質か、生体内でも認められるかどうかは分かっていない。

本論文提出者は、mdx マウスの骨格筋に認められる異所的石灰化が筋衛星細胞の骨分化によるものであるとの仮説をたて、異所的石灰化の形成機構を検討した。 その結果、1) mdx マウスの骨格筋における異所的石灰化はヒドロキシアパタイト(リン酸カルシウム結晶の一種)の沈着によるものであること、2) mdx マウスの血清中の無機リン酸濃度が対照マウスに比べ 1.4 倍高く、mdx マウスでは高リン酸血症が起きていること、3) mdx マウス血清と同程度の無機リン酸を加えた培養液中で筋芽細胞を培養すると骨分化特異的転写因子や特異的マトリクスタンパク質を発現し、リン酸カルシウムを沈着することを見出した。 これは異所的石灰化に筋芽細胞の無機リン酸による骨分化誘導が関与していることを示唆している。 さらに、4) 低リン酸含有飼料を

mdx マウスに与えることで異所的石灰化が抑制されたことから、骨格筋における異所的石灰化は制御可能であることを示した。

第一部では mdx マウスの骨格筋に生じる異所的石灰化の特性について述べている。まず、X線マイクロCT装置により、mdx マウスの下肢大腿部の骨格筋組織内に異所的石灰化が非侵襲的に観察することを見出した。この異所的石灰化は対照の B10 マウス骨格筋では全くみられなかった。また、エネルギー分散型 X 線分析法および X 線結晶回折法により、この異所的石灰化の主成分はリン酸カルシウム結晶の一種、ヒドロキシアパタイトと特定した。異所的石灰化部位はマクロファージの集積が認められたことから筋変性にともなう炎症との関連を認めた。さらに RT-PCR 法により骨分化マーカーの一つである osteocalcin との発現が mdx マウス骨格筋においてのみ起きていることを認めた。一方、先行研究から無機リン酸が骨芽細胞の分化を促したり、血管平滑筋細胞を骨分化させることが知られている。そこで、mdx マウスの血清中の無機リン酸濃度を測定したところ、B10 マウスの 1.4 倍あり、mdx マウスでは高リン酸血症が起きていることが示唆された。しかし、高リン酸血症をもたらす要因の一つと考えられる血中 FGF-23 の低下は認められず、むしろ上昇していたことから、FGF-23 は血中リン酸濃度を下げる方向で働いているにも関わらず、別の要因で血中リン酸濃度が上昇しているものと考えられた。

第二部では、高濃度無機リン酸を含む培養条件下における筋衛星細胞の骨分化について検討した。通常、の細胞培養液中の無機リン酸濃度は 1mM である。そこで、1 から 7mM の異なる濃度のリン酸を含む分化培養液中で筋芽細胞株 C2C12 を培養した。筋分化の指標として筋管細胞の形成と筋分化特異的転写因子 myogenin の mRNA 量、骨分化は骨分化特異的転写因子である Runx2 と骨特異的マトリクスタンパク質 osteocalcin の発現を RT-PCR 法と Western blot 法および蛍光抗体法、光学顕微鏡観察により調べた。その結果、1mM のリン酸を含む培養液中では筋分化のみが起きるが、3mM 以上では筋芽細胞の筋分化が抑制されはじめるとともに骨分化指標の発現が始まり、さらにリン酸濃度が高くなるにつれて骨分化が促進される 7mM では筋分化は阻止されることを見出した。また、この場合、筋分化と骨分化は同一の細胞では共発現せず、異なった細胞で起きることが示された。この骨分化は高リン酸濃度培養液中で

培養された初代筋芽細胞においても認められ、骨分化とカルシウムの結晶形成が認められた。Mdx マウスの血清無機リン酸濃度は 3.7mM であることから、mdx マウスの骨格筋組織内では一部の筋衛星細胞が骨分化を始めたため異所的石灰化が起きたと考えられる。BMP-2,-4 などの成長因子による筋芽細胞の骨分化は既に知られているが、無機リン酸により筋芽細胞の分化運命の骨分化への転換を示したのは本論文が最初である。

次にマウスの生体内における無機リン酸の果たす役割を調べるため、通常のマウス飼料のリン酸濃度の 1/9 しか含まない低リン酸含有飼料を mdx マウスに離乳前から 2 か月間摂食させる実験を行った。その結果、低濃度リン酸飼料を与えられた mdx マウスでは高リン酸血症が改善され、異所的石灰化も劇的に減少することが見出された。このことから、高濃度の無機リン酸が筋衛星細胞の骨分化の引き金となり、異所的石灰化が起きることが明らかとなった。

本論文は、mdx マウス骨格筋における異所的石灰化が高濃度の無機リン酸により筋衛星細胞の分化運命の筋分化から骨分化への転換によって生じたものであることを *in vitro* と *in vivo* 両方から証明した興味深い研究といえる。mdx マウスに見られる高リン酸血症がなぜ起きるのか、あるいは、異所的石灰化と炎症との関連など今後明らかにしなければならない点はあるが、今まで *in vitro* においてのみ認められた筋芽細胞の骨細胞への分化運命の変更が *in vivo* でも起きる可能性を示した最初の論文であり、しかも骨分化の引き金が高濃度のリン酸であることを示した点で本論文は高く評価できる。異所的石灰化は組織内の炎症や痛みの原因と言われており、筋の異所的石灰化機構を解明すれば筋ジストロフィーの症状軽減につながる新たな治療法につながる知見を得ることができると思われる。さらに、筋ジストロフィー筋における異所的石灰化は本研究において示されたようにマイクロ X 線 CT 装置により非侵襲的に画像化し、石灰化を定量することが可能である。したがって異所的石灰化は遺伝子導入や幹細胞移植、さらに薬物投与などによる筋ジストロフィー治療効果の判定指標としても有効である。今後、本研究が筋ジストロフィーの病態解明や治療法の開発研究にも貢献することが期待される。

以上をもって、本審査委員会は博士(学術)の学位にふさわしいものと認定する。

[文責 松田良一(主査)]