

## 論文の内容の要旨

論文題目 スフィンゴシン-1-リン酸による筋衛星細胞活性化の制御機構に関する研究

氏名 長田洋輔

### 背景・目的

骨格筋はわれわれが体を動かすため、姿勢を維持するため、呼吸をするために働く。骨格筋の機能は筋線維と呼ばれる巨大な細胞が担っている。成体の骨格筋は安定な組織であり、消化器や皮膚の上皮組織のように日常的な細胞が入れ替わりは起こらない。しかし、過負荷や損傷などの刺激が加わることで骨格筋は驚異的な再生能力を発揮する。骨格筋の再生能は骨格筋特異的な幹細胞である筋衛星細胞によって行われる。筋衛星細胞とは筋線維の基底膜直下に存在する単核の細胞であり、平静時には活動を休止している。筋損傷などの刺激により筋衛星細胞は活性化され、細胞分裂を開始する。筋衛星細胞の細胞分裂によって産生された筋前駆細胞は、分化・融合して新たな筋線維の形成あるいは既存の筋線維の修復を行う。

筋衛星細胞が筋再生に動員されるためには休眠状態から活性化状態への移行が必要になる。筋細胞の増殖・分化については長年の研究により多くの重要な情報が蓄積されてきたが、筋衛星細胞活性化については基礎的な事柄についても十分な知見が得られていない。これまでに、筋衛星細胞の活性化は筋前駆細胞の増殖とは異なるメカニズムによって制御される可能性が指摘されている。また、骨格筋組織中には線維芽細胞など非筋細胞も存在しているため、正常な筋再生の際には筋衛星

細胞に特異的な活性化が起こる必要があると考えられている。私は単一筋線維培養系あるいは筋衛星細胞由来の細胞株 C2C12を用いて、筋衛星細胞活性化の制御機構について研究することとした。

本研究ではスフィンゴ脂質が筋衛星細胞の活性化を制御する可能性に着目した。スフィンゴ脂質はセラミド骨格を持つ脂質の総称であり、その一種であるスフィンゴミエリンは細胞膜の主要な構成要素である。スフィンゴミエリンは形質膜上でコレステロール、他のスフィンゴ脂質、タンパク質と会合して脂質マイクロドメインを形成する。さらに、生理活性を持つスフィンゴ脂質セラミドやスフィンゴシン-1-リン酸 (sphingosine-1-phosphate, S1P) の前駆体でもある。スフィンゴ脂質はさまざまな細胞機能の発現に関与していることが明らかにされはじめている。

近年、特定の遺伝子産物の機能を調べる上で低分子干渉 RNA (small interfering RNA, siRNA) を用いた遺伝子ノックダウンが広く利用されるようになった。特にリポトランスフェクション法は特別な施設・装置を必要とせず、簡便かつ迅速に siRNA を細胞に導入することができる。しかし、通常のリポトランスフェクション法は休眠状態の C2C12細胞に対しては有効に働かなかった。休眠状態の細胞に対する siRNA 導入法を確立することができれば、筋衛星細胞の活性化を研究するために極めて有用な手段となると考えた。

そこで、本研究では筋衛星細胞活性化にスフィンゴ脂質が関与する可能性について検討し、スフィンゴ脂質代謝系による筋衛星細胞活性化の制御機構を明らかにすることを目的とした。その過程では、休眠状態の筋細胞に対する siRNA 導入法を確立し、遺伝子ノックダウン法を活用して研究を進めることとした。

## 実験結果・考察

スフィンゴ脂質が筋衛星細胞の活性化に関与する可能性を検討するために、はじめに細胞表面のスフィンゴミエリンの動態を調べることにした。スフィンゴミエリンはカベオラやラフトといった脂質マイクロドメインの構成要素として働くとともに、生理活性を持つ脂質の前駆体でもある。スフィンゴミエリン結合タンパク質ライセニンによってスフィンゴミエリンの免疫細胞化学的検出を試みたところ、C2C12細胞培養系では休眠状態のリザーブ細胞がスフィンゴミエリンを高レベルで発現すること、単一筋線維培養系では休眠状態の筋衛星細胞がスフィンゴミエリンを高レベルで発現することを発見した。さらに、細胞表面のスフィンゴミエリンは筋衛星細胞あるいはリザーブ

細胞活性化の過程で減少することを明らかにした。このことはスフィンゴミエリンが筋衛星細胞の活性化あるいは自己複製に関与する可能性を示唆しており、本研究ではスフィンゴ脂質代謝と筋衛星細胞活性化の関係に注目して研究を進めた。

S1P は多くの細胞に対して細胞分裂促進効果を示すことが知られている。本研究では、S1P がリザーブ細胞および筋衛星細胞に対しても細胞分裂促進効果を示すことを明らかにした。その一方で、スフィンゴ脂質代謝系の阻害剤を用いて S1P 産生の阻害を行うと、血清によって誘導される筋衛星細胞活性化が顕著に抑制された。カルジオトキシン注射によりマウス前頸骨筋の変性を引き起こすと、通常であれば7日後には中心核を持つ幼弱な筋線維が多数形成される。ところが、S1P 産生を阻害すると再生筋線維形成が大幅に抑制され、生体内での筋再生における S1P シグナルの重要性を示唆する結果を得ることができた。また、ライセニンとバクテリア由来スフィンゴミエリン分解酵素を組み合わせることによって形質膜内外のスフィンゴミエリンの可視化を試み、血清添加10分後に起こるスフィンゴミエリンの分解が形質膜内層で起こることを明らかにした。

筋衛星細胞活性化の分子機構を解明するためには、siRNA を用いた遺伝子ノックダウンが有効であると考えた。リザーブ細胞に対して通常の方法で siRNA 導入を試みても遺伝子ノックダウンは起こらなかったが、穏やかなトリプシン処理を行うことで siRNA の導入効率が大幅に改善し遺伝子発現の効果的な抑制を確認することができた。

血清によって誘導される筋衛星細胞およびリザーブ細胞の活性化が S1P によって媒介されることがわかったため、より詳細な分析を実施するために無血清培養条件下でリザーブ細胞の活性化を引き起こす成長因子等を探索した。その結果、上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF) あるいは血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) とインスリンを組み合わせることによって血清と同等にリザーブ細胞の活性化を引き起こすことを明らかにした。そして、EGF によって誘導されるリザーブ細胞活性化はスフィンゴシンキナーゼの阻害剤および遺伝子ノックダウンによって抑制されること、EGF 添加によりリザーブ細胞のスフィンゴシンキナーゼ活性が上昇することがわかった。また、EGF によって誘導される ERK1/2 のリン酸化は、スフィンゴシンキナーゼの阻害によって抑制された。S1P は細胞内セカンドメッセンジャーとして、あるいは細胞表面の S1P 受容体 (S1P1~S1P5) のリガンドとして機能する。本研究では、EGF によって誘導されるリザーブ細胞活性化は S1P2 のアンタゴニストによって抑制されること、細胞外に加えた S1P は S1P2

依存的に ERK リン酸化を引き起こすことを明らかにした。これらの結果から、EGF は S1P 産生を引き起こし、S1P は S1P 受容体を介する情報伝達系により、筋衛星細胞活性化シグナルの増強、拡散、そして持続させることに役立っていると考えた。

## まとめ

スフィンゴミエリンが休眠状態の筋衛星細胞において高レベルで発現し、筋衛星細胞活性化の過程で減少することを明らかにした。このことからスフィンゴミエリンが筋衛星細胞の活性化あるいは休眠状態の維持に関与する可能性が示唆されたため、本研究ではスフィンゴミエリン代謝が筋衛星細胞活性化の制御に関与する可能性について詳細に検討した。

阻害剤および siRNA を用いた実験から血清あるいは EGF によって誘導される筋衛星細胞の活性化が S1P によって媒介されることを明らかにした。EGF が SPHK 活性を上昇させること、S1P が S1P 受容体を介して ERK リン酸化を引き起こすこと、アンタゴニストによる S1P 受容体の阻害によりリザーブ細胞活性化が抑制されたことなどから、S1P は EGF 刺激を受けた筋衛星細胞によって産生・分泌され、筋衛星細胞表面に存在する S1P 受容体を介して活性化シグナルを増強、拡散、持続させると考えた。

筋衛星細胞活性化に関与する遺伝子産物の機能を解析するために、休眠状態の細胞であるリザーブ細胞に対して siRNA を導入する方法を確立した。通常の方法でリポトランスフェクション法を行った場合、休眠状態のリザーブ細胞に対しては十分な siRNA 導入は起こらなかったが、穏やかなトリプシン処理を施すことによって siRNA 導入効率が劇的に改善し、効果的な遺伝子ノックダウンが実現できることを発見した。このことは筋衛星細胞の活性化ばかりでなく自己複製においても極めて有効な手段となることが期待される。

本研究により、S1P はポジティブ・フィードバック・ループによって EGF シグナルを増強し、筋衛星細胞を効率的に活性化させることが示唆された。筋衛星細胞活性化における S1P の役割を明らかにしたのは本研究が初めてであり、筋衛星細胞活性化を制御する分子機構の解明に向けて大きく前進すると期待している。進行性筋疾患や加齢に伴う筋再生能の低下は筋衛星細胞の量的低下でなく、質的低下による部分が大きいとする報告がある。本研究で得られた知見は、そのような場面に応用することで筋再生能の回復に役立つ可能性も考えられる。