

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 長田洋輔

本論文「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」は、7章から成っており、第1章：序論、第2章：実験材料と方法、第3章：筋衛星細胞におけるスフィンゴミエリンの動態、第4章：S1P は筋衛星細胞活性化を媒介する、第5章：休眠状態の細胞に対する遺伝子ノックダウン方法の確立、第6章：リザーブ細胞に対し S1P 産生を誘導する成長因子の探索、第7章：総括となっている。

本論文は骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞が筋再生初期に活動を開始する過程、つまり筋衛星細胞活性化に着目し、スフィンゴ脂質による制御機構の解明を目的としたものである。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 (SM) は細胞膜の主要な構成要素である。SM は、脂質マイクロドメイン形成、セラミドやスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) の前駆体としての機能を持つが、筋衛星細胞活性化における役割についてはこれまでに報告がない。

第3章では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証するために、SM 結合タンパク質ライセニンを用いて細胞表面の SM の動態を調べた。SM の免疫細胞化学的検出により、マウス筋衛星細胞由来の細胞株 C2C12細胞培養系では休眠状態のリザーブ細胞が SM 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 SM を高レベルで発現することを示した。さらに、細胞表面の SM 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。

第4章では SM 代謝産物である S1P が筋衛星細胞活性化の制御因子として働く可能性に着目した。S1P はリザーブ細胞および筋衛星細胞に対して細胞分裂促進効果を示し、S1P

産生の阻害は筋衛星細胞活性化を顕著に抑制することを明らかにした。さらに、S1P 産生を阻害することによってマウス前頸骨筋における再生筋線維形成が大幅に抑制されたことから、筋再生における S1P シグナルの重要性が示唆された。また、ライセニンとバクテリア由来 SM 分解酵素を組み合わせることによって形質膜内外 SM の可視化を試み、血清添加10分後に形質膜内層で SM 分解が起こることを明らかにした。

第5章では、休眠状態のリザーブ細胞に対して siRNA による遺伝子ノックダウンを実現する方法を検討した。リザーブ細胞には通常のリポソームトランスフェクション法は有効でなかったが、穏やかなトリプシン処理を行うことにより siRNA の導入効率が大幅に改善することを発見し、アダプタータンパク質 Grb2 の効率的な発現抑制を示した。

第6章では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、上皮成長因子 (EGF) とインスリンを組み合わせることでリザーブ細胞の活性化が起こることを明らかにした。インスリンと EGF によるリザーブ細胞活性化はスフィンゴシンキナーゼ (SPHK) 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 SPHK 活性が上昇すること、EGF による ERK リン酸化は SPHK 阻害剤によって抑制されることを示した。さらに、S1P 受容体の1つである S1P2 が、EGF によるリザーブ細胞活性化、および S1P による ERK リン酸化に関与することを明らかにした。

第7章では以上の結果を総括し、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、持続させると考察している。

本論文により、S1P が筋衛星細胞の活性化に寄与することが明らかになった。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全容解明に向けて大きく前進することが期待される。したがって、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。