

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中野 真一

正常な骨格筋は筋線維から構成されているが、筋ジストロフィーや加齢性の筋萎縮症であるサルコペニア、あるいは和牛でみられる霜降り肉などでは骨格筋内に脂肪組織が蓄積し、これが骨格筋機能の低下を招く。骨格筋内に見られる脂肪組織は、筋衛星細胞とは異なる間葉系幹細胞がその起源であることが示唆されている。申請者の研究室で得られたラット骨格筋細胞のクローンの1つである2G11細胞は、高度な脂肪分化能を示すとともに筋芽細胞との共培養条件下では筋管細胞を形成することから、骨格筋内多能性幹細胞の分化制御機構を検討する上で極めて有用な細胞であると考えられる。幹細胞の分化能を制御するニッチの構成成分には細胞外マトリックスや成長因子が含まれるが、中でも塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) は骨格筋内で発現が認められ、様々な細胞に対して増殖・分化活性を示す成長因子である。本研究の第一章では、bFGFにより2G11細胞の分化能がどのように制御されているかを明らかにすることを試みた。続く第二章では、モノクローナル抗体の作製による2G11細胞特異的表面抗原の探索を行った。

第一章では、脂肪分化誘導前もしくは脂肪分化誘導期間中の培地中へのbFGFの添加の有無が、2G11細胞の脂肪分化能に与える影響を検討した。その結果、2G11細胞の脂肪分化能には増殖培地中で維持する際のbFGF添加が必要であることが示された。そこでこのようなbFGFの作用をプライミング効果と名付けた。脂肪分化転写因子群の発現パターンを調べたところ、bFGF前処理を行わない群では脂肪分化過程初期におけるC/EBP $\beta$ と $\delta$ の発現は正常にみられたものの、それらにより続いて誘導されるC/EBP $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ の発現が著しく低下していた。2G11細胞において発現するFGF受容体 (FGFR) を調べたところ、FGFR1、1c、2b、2c、3が発現していることが判明した。これらのFGFRをsiRNAにより発現抑制したところ、FGFR1およびFGFR2cを発現抑制した場合に限りFGFによるプライミング効果が消失した。さらに、FGFR1の下流ではbFGFによりErk1/2-MAPK、Akt、PLC $\gamma$ の3つの経路が活性化したが、FGFR2cの下流ではbFGFにより活性化する既知の経路はなく、未知のシグナル伝達経路の存在が示唆された。DNAチップによる網羅的な解析の結果、bFGF刺激により特異的に発現変動する因子が転写因子を含め多数存在することが判明した。これらの転写因子がFGFR1またはFGFR2cの下流でC/EBP $\beta$ および $\delta$ によるC/EBP $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ の発現誘導機構に関与することで、bFGFによるプライミング効果が発現していることが示唆された。

第二章では、2G11 細胞を抗原としてマウスに免疫することにより、モノクローナル抗体を作製した。その結果、2G11 細胞を特異的に認識する 5C12 抗体および 5G11 抗体の 2 つの抗体が得られた。さらに、骨格筋初代培養細胞中に含まれ、いずれかの抗体に陽性を示す細胞は全て脂肪分化能を有することが明らかとなった。また、両抗体が認識する抗原はともに 2G11 細胞の分化前後を通じて発現していたことから、脂肪細胞系譜の新たなマーカーとなる可能性が示された。5C12 抗体が認識する抗原は一部の筋管細胞や脂肪細胞で発現する一方、5G11 抗体が認識する抗原は筋管細胞では発現が認められなかったが、全ての脂肪細胞で発現が認められた。以上の結果より、2 つの抗体はそれぞれ異なる分子を認識していることが示唆された。ウェスタンブロッティングを行ったところ、5C12 抗体が認識する抗原は約 350kDa であり、5G11 抗体が認識する抗原は約 70kDa および 55kDa であった。また、5C12 抗体が認識する抗原は膜に局在していたが、5G11 抗体が認識する抗原は膜以外にも核や細胞質にも発現していることが確認された。

以上、本論文では骨格筋多能性幹細胞 2G11 において FGF シグナルが脂肪分化能維持作用をもつことを見いだした。また、骨格筋内に存在し脂肪分化能をもつ細胞に特異的に発現すると考えられる表面抗原を認識するモノクローナル抗体の取得に成功した。これらの結果は、骨格筋内に出現する脂肪細胞の出現機序の一端を明らかにするとともに、骨格筋内に存在する脂肪分化能をもつ細胞の動態を追跡することを可能とするものである。FGF シグナルや本モノクローナル抗体が認識する抗原に着目することで、今後骨格筋内脂肪蓄積機構の解明やその人為的制御の新たな方法論の確立に繋がると期待され、学術的、応用的意義は少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。