

氏名	大石 央代
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第 1033 号
学位授与の日付	平成25年10月 9 日
学位論文題名	Osteogenic Differentiation Capacity of Human Skeletal Muscle-Derived Progenitor Cells 「ヒト骨格筋由来幹細胞の骨分化能について」 PLoS ONE 8(2): e56641. 2013. 2
論文審査委員	主査 教授 山田 治 基 副査 教授 原田 信 広 教授 吉田 俊 治

## 論文内容の要旨

### 【はじめに】

異所性骨化(heterotopic ossification: HO)は人工股関節全置換術(total hip arthroplasty: THA)の術後合併症の一つであり、術後の関節拘縮を生じることが臨床的に大きな問題となる。HOの発生機序は依然として不明であるが、近年、骨格筋由来幹細胞の異常な骨分化能に起因することが示唆されている。骨格筋には筋衛星細胞と間葉系幹細胞の2種類の幹細胞が存在するが、間葉系幹細胞がHOの発生に関与することを示す報告はこれまでにない。

### 【目的】

本研究の目的は、ヒト骨格筋由来PDGFR(platelet derived growth factor receptor)  $\alpha^+$  間葉系幹細胞がHO発生に関与しているか否か、そして骨格筋由来間葉系幹細胞の骨分化過程においてmiRNAが関与しているか否かについて検討することである。

### 【方法】

ヒト正常骨格筋の新鮮凍結切片を作成し、筋由来幹細胞のマーカーであるPDGFR  $\alpha$  と筋衛星細胞のマーカーであるCD56に対する免疫染色を行い、ヒト骨格筋における2つの幹細胞の局在を検討した。さらにヒトHO組織の切片にPDGFR  $\alpha$  に対する免疫染色を行い、HO組織中のPDGFR  $\alpha^+$ 細胞の局在についても検討した。次に筋由来間葉系幹細胞と筋衛星細胞の*in vitro*での骨分化能を検討する目的で、ヒト骨格筋よりPDGFR  $\alpha^+$ 細胞とCD56<sup>+</sup>細胞を単離し、骨分化誘導を行った。骨分化の評価はalkaline phosphatase (ALP) 染色、alizarin red S染色で行い、定量比較のためALP活性の測定も行った。さらに*in vivo*での骨分化能を検討する目的で、PDGFR  $\alpha^+$ 細胞またはCD56<sup>+</sup>細胞をそれぞれハイドロキシアパタイトが含まれたscaffoldに播種後マウスの皮下に移植し、移植後8週目にH-E染色を行い、骨分化の程度を組織学的に評価した。最後にヒト骨格筋由来PDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化過程におけるmiRNAの関与を検討するために、PDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化誘導前、誘導後1週および2週時の培養細胞よりtotal RNAを抽出し、マイクロアレイを用いてmiRNAの発現を網羅的に解析した。アレイ解析で発現が上昇していたmiRNAについてはqRT-PCRを行っ

てmiRNAの変動の有無を確認し、さらにmiRNA inhibitorをPDGFR  $\alpha^+$ 細胞にtransfectionして骨分化誘導を行った後にALP染色とalizarin red S染色を行い、骨分化が抑制されるか否かについても検討した。

### 【結果】

ヒト骨格筋において、マウスと同様にCD56<sup>+</sup>細胞は筋細胞の基底膜の内側に存在し、PDGFR  $\alpha^+$ 細胞は筋組織の間質に存在していた。また、ヒトHO組織においても通常の筋組織と骨化巣の境界部にPDGFR  $\alpha^+$ 細胞が多数存在していることが明らかとなった。次に、PDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化能については、*in vitro*ではALP染色では7日目より、alizarin red S染色でも14日目より強染が認められたこと、そして*in vivo*での組織学的評価ではPDGFR  $\alpha^+$ 細胞移植片で骨様組織が認められたことから、ヒト骨格筋由来PDGFR  $\alpha^+$ 細胞は*in vitro*、*in vivo*ともに骨分化能を有することが示された。最後に、PDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化誘導後のmiRNAのアレイ解析とqRT-PCRの結果からmiR-146b-5pと-424の発現が骨分化誘導後に有意に上昇していることが明らかとなり、miR-146b-5pと-424のinhibitorをPDGFR  $\alpha^+$ 細胞にtransfectionして骨分化誘導を行った後に骨分化評価を行った結果、alizarin red S染色では誘導開始後2週時に強染されなかったことから、miR-146b-5pと-424の発現が骨格筋由来間葉系幹細胞の骨分化過程やHOの発生において関与していることが示唆された。

### 【考察】

本研究により、ヒト骨格筋由来PDGFR  $\alpha^+$ 間葉系幹細胞がHO発生に関与していること、さらに骨格筋由来間葉系幹細胞の骨分化過程やHOの発生においてmiR-146b-5pと-424が関与していることが明らかとなった。miR-146b-5pはTRAF6(TNF receptor-associated factor 6)とIRAK1(interleukin-1 receptor-associated kinase 1)、miR-424はIRAK2とIKK  $\beta$  (I  $\kappa$  B kinase  $\beta$ )をそれぞれ阻害することが報告されている。これらはいずれもNF- $\kappa$ B signalを亢進するmediatorで、NF- $\kappa$ B signalは骨分化を抑制することが報告されており、miR-146b-5pと-424はNF- $\kappa$ Bシグナルを抑制することでPDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化を促進することが示唆された。

### 【結語】

ヒト骨格筋HO発生にはPDGFR  $\alpha^+$ 間葉系幹細胞の骨分化異常が関与しており、miR-146b-5pと-424をターゲットとした治療法が確立されればHOの発生を抑制できる可能性がある。

## 論文審査結果の要旨

HOはTHAの術後合併症の一つであるが、その発生機序は依然として不明である。本研究では、ヒト骨格筋由来PDGFR  $\alpha^+$ 間葉系幹細胞がHO発生に関与しているか否か、そして骨格筋由来間葉系幹細胞の骨分化過程におけるmiRNAの関与を検討した。その結果、ヒトHO組織において通常の筋組織と骨化巣の境界部にPDGFR  $\alpha^+$ 細胞が多数存在し、このヒト骨格筋由来PDGFR  $\alpha^+$ 細胞は*in vitro*、*in vivo*ともに骨分化能を有することが示された。PDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化誘導後のmiRNAアレイ解析およびqRT-PCRの結果とinhibitorをPDGFR  $\alpha^+$ 細胞にtransfectionして骨分化誘導を行った結果から、miR-146b-5pと-424の発現が骨格筋由来間葉系幹細胞の骨分化過程において関与していることが示唆された。以上の結果は、R-146b-5pと-424は最終的にNF- $\kappa$ Bシグナルを抑制することでPDGFR  $\alpha^+$ 細胞の骨分化を促進することが示唆された。審査では、miR-146b-5pと-424をターゲットとした治療により、HOの発症を抑制できる可能性、将来の再生医療において骨組織を再生する際に骨格筋由来間葉系幹細胞を細胞供給源として使用する可能性を示唆しており、学位論文としての価値があるものと判断された。