

Regenerative motoneuritogenesis promoted by axon-guidance cue semaphorin 3A secretion from resident myogenic stem cells

ド, マイ コイ クイ

<https://hdl.handle.net/2324/1500774>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（農学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : ドクイ マイコイ

論文題名 : Regenerative motoneuritogenesis promoted by axon-guidance cue semaphorin 3A secretion from resident myogenic stem cells
(骨格筋の再生において、筋幹細胞から分泌される神経軸索ガイダンス因子 semaphorin 3A によって運動神経末端の筋線維接着が制御されている)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

運動神経支配の確立(運動神経末端の伸張と接着)は、筋の主体である筋線維の肥大・再生に不可欠である。また、食肉の品質(“キメ”の細かさや脂肪交雑の程度など)および機能性栄養成分の含量と深い関わりがある筋線維型(速筋型・遅筋型)も運動神経刺激の制御を受けることが知られている。従って、運動神経支配の確立を制御する分子機構を理解し、これを調節することが出来れば、食肉の生産量や品質の向上を目指す次世代型の食肉生産技術の開発に繋がると期待される。この制御機構を解明する意義は極めて大きいと言える。

運動や損傷に伴う骨肥大・再生の過程で、活性化・増殖・分化した筋幹細胞(衛星細胞)は筋線維に融合しその肥大・再生に寄与する他、互いに融合し新たに筋線維を形成することが知られている。また分化初期の衛星細胞は semaphorin 3A (Sema3A)と呼ばれる神経軸索ガイダンス因子を合成・分泌することをこれまでに明らかにしたことから、衛星細胞が運動神経末端の伸張と筋線維への接着を能動的に制御している可能性が考えられた。本研究ではこの作業仮説を実証するため、「衛星細胞における Sema3A 発現の調節機構」および「神経末端接着に対する Sema3A の生理機能」を明らかにすることを目的にした。得られた知見の概要は以下の通りである。

(1) 衛星細胞における Sema3A 発現の調節機構の解明 (第2-4章)

まず、Sema3A の発現を誘導する因子が肝細胞増殖因子(HGF)および線維芽細胞増殖因子 2 (FGF2)であることを、成熟ラットの骨格筋から単離した衛星細胞の初代培養系を用いて明らかにした。また、2つの誘導因子は共に約 150 pM でその効果が最大となる顕著な濃度依存性を示した。次に、これらの因子の細胞膜受容体を RNA 干渉法(RNAi 法)により調べ、膜貫通型プロテオグリカン(シンデカン)-2, 4 を同定した。HGF と FGF2 を添加する前に衛星細胞をヘパリチナーゼで処理すると HGF による Sema3A 発現効果が有意に減少すること、また同様に、コンドロイチナーゼ ABC で処理すると FGF2 の効果が減少することから、HGF と FGF2 はそれぞれシンデカン-2, 4 のヘパラン硫酸鎖とコンドロイチン硫酸鎖に結合すると考えられた。一方、Sema3A の発現を阻害する因子としてトランスフォーミング増殖因子 β 3 (TGF- β 3) を同定し、その効果は前述の HGF・FGF2 の 1-2 桁低い濃度で最大となることを明らかにした。HGF・FGF2 存在下でも TGF- β 3 は Sema3A の発現を完全に抑制することから、発現誘導因子 HGF・FGF2 と抑制因子 TGF- β 3 の濃度が上昇するタイムラグによって Sema3A の発現時期が調節されていると考えられた。事実、ラット後肢の下腿部筋を圧迫損傷させた筋損傷・再生モデルにおいて、衛星細胞周囲の HGF・FGF2 濃度は損傷後 2-8 日目に増加するのに対し、TGF- β 3 は 12 日目以降に濃度が上昇することを確認しており、このことは Sema3A 発現に関する HGF/FGF2/TGF- β 3 の時系列制御機構を支持している。

(2) 神経末端接着に対する Sema3A の生理機能の解明: RNAi 法を用いた knockdown 実験 (第5章)

衛星細胞が合成・分泌する Sema3A によって運動神経末端の筋線維への接着が制御されているかどうかを直接的に調べるため、Sema3A 特異的 siRNA を分化初期の衛星細胞(筋芽細胞)にトランスフェクションし Sema3A の発現を抑制した状態で筋線維を形成させる培養系を作出した。Sema3A 発現を knockdown すると、神経末端の接着に不可欠なアセチルコリン受容体(nAChR; シナプス後膜に特異的に局在するイオンチャネル)の発現およびその機能的凝集が阻害されることを見出した。アセチルコリン受容体の凝集に関与する細胞内因子 MuSK および rapsyn の発現には有意な変化は認められなかった。これらの重要な知見は、nAChR の 5 つのサブユニットなどの定量的 RT-PCR と western blotting、および nAChR に特異的に結合する α -bungarotoxin を用いた蛍光顕微鏡法により得られたものであり、これにより衛星細胞由来の Sema3A が運動神経末端の接着を制御していることが *in vitro* で実証された。Sema3A は忌避性の神経軸索ガイダンス因子であるので、分化初期の衛星細胞から Sema3A が合成・分泌されている間は神経末端の伸張や接着は抑制される一方、筋線維上で nAChR の機能的凝集をはじめとする神経末端接着の準備が進められていると予想された。この時系列制御モデルは、Sema3A により運動神経末端の接着時期と場所が調節されていること、即ち、衛星細胞が運動神経支配の確立に必須な役割を担っていることを提起するものである。この結論は、衛星細胞特異的に Sema3A 発現をコンディショナルノックアウトしたマウス(Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{lox}マウス)を用いた *in vivo* 筋損傷・再生実験において、運動神経末端の異形成(過度の分枝と伸張)およびシナプス構造の未発達が観察されたこととも符合した。

以上、本研究により、筋肥大・再生の過程で HGF・FGF2・シグナリング受容体シンデカン-2, 4 依存的に衛星細胞が合成・分泌する Sema3A によって運動神経支配の確立が制御されていることが明らかになった。