Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

P21 Deficiency Delays Regeneration of Skeletal Muscular Tissue

Chinzei, Nobuaki

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2015-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第6464号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006464

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

P21 Deficiency Delays Regeneration of Skeletal Muscular Tissue

P21 欠損は骨格筋再生を遅延させる

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
整形外科学
（指導教員：黒坂　昌弘教授）

鎭西　伸顕

【考察】

筋質重量や組織染色の結果ではWTマウスでは術後14日目で筋組織はほぼ回復するが、p21KOマウスでは回復が認められなかった。これらの結果よりp21KOマウスでは筋組織の回復が遅延することが確認できた。

一方、細胞周期の観点からは*Cyclin D1*の発現増加はWTマウスよりp21KOマウスで認められた。さらに、細胞増殖マーカーであるKi-67やPCNAの発現増加もp21KOマウスで認められたことより、p21KOマウスでは細胞増殖が亢進していることが確認できた。F4/80の発現増加もp21KOマウスで認められ、p21KOマウスにおける筋損傷後の免疫炎症反応の亢進が示唆された。筋合成過程において、myoblastの増殖によって細胞周期から脱却することがその後の筋分化に必要であり、p21はMyoDなどを通じてその重要な役割を担うとされている。*MyoD*や*Myogenin*の発現遅延がp21KOマウスで認められたことより、p21欠損が筋分化・筋再生に重大な影響を与えていることが証明された。

Satellite cellは基底膜に存在しており、筋再生を促進するとされている。我々の膜蛋白の組織染色や*Pax7*の発現結果より、基底膜レベルにおいてもp21KOマウスでの筋再生の遅延が確認された。以上の事から、筋損傷に伴い細胞増殖は亢進するが、p21KOマウスでは筋合成関連遺伝子の低発現に伴って、筋再生が遅延することが証明された。

このように筋再生が遅延するp21KOマウスにおいても、術後28日目にはほぼ筋再生が認められた。従ってp21欠損は筋損傷後の各再生段階に影響を与えていたが、筋再生には代償機構が存在している可能性が示唆される。一方、p21欠損自体にも他の細胞周期調節因子に代償される可能性が報告されている。従って、より複雑なメカニズムよって筋再生が制御されていることが示唆された。

【結語】

p21欠損は細胞増殖を亢進させるが筋分化を遅延させることにより、p21は筋再生に重要な役割を担う。

【目的】

頻度の高い外傷の一つである筋損傷は主に保存的治療を行うが、主に下腿筋に発生し易い為にスポーツ復帰や日常生活支障を来しやすい。従って筋損傷を早く確実に治すことが求められる。筋再生は損傷組織の壊死と炎症反応の惹起により始まるが、その過程は高度に制御調節されている。例えばMyoDはmesodermal somitic cellをmyoblastに誘導し、myogeninはmyoblastからmyocyteへの分化を誘導する。その後Myocyte同士が融合しmyofiberとなる。筋発生の後半においては、Pax7を主要なマーカーとするsatellite cellがmyofiberの成長へ関与している。一方、DNAレベルでは、外界からのストレスで損傷が起きると、細胞分裂周期を停止させることにより異常なDNA増殖を抑制する分子、即ちcyclin-dependent kinase inhibitorの一種としてp21が知られている。p21は特に細胞周期のG1において必要とされ、このように細胞周期調節を担う一方、近年は組織損傷後の役割に関する報告も散見される。筋組織関連においてはin vitroの報告は多いがin vivoでの報告は少なく、筋合成に関するp21の関与はいまだ不明な点が多い。従って我々は筋損傷の回復過程におけるp21の役割をp21ノックアウト(KO)マウスで検討した。

【方法】

マウス飼育

p21KOマウス(B6.129S6(Cg)-Cdkn1atm1Led87 /J)はJackson Laboratoryから購入した。ワイルドタイプ（WT）マウスにはC57BL/6Jを使用した。各々を交配させヘテロマウスを作成、さらにそのヘテロマウスを交配させ、litter mateとしての p21KOマウスとWTマウスを手に入れた。尚、マウスのgenotypingにはマウスの尾を用いた。

筋損傷モデル作成とサンプル回収

週齢10週のp21KOマウス(n=9)とWTマウス(n=9)の右下腿筋に0.5%塩酸ブピバカインを0.1mL注射し、筋損傷モデルを作成した。処置なしのマウスをコントロールとし、処置したマウスは術後3日、14日、28日での計4 time pointで安楽死させ、sampleを回収した。各マウスの体重とsampleの筋質量の測定を行った後、sampleから蛋白及びRNAを抽出し、cDNAを合成した。さらにパラフィン組織標本も作製した。

検討項目

各筋は、HE染色の他、膜蛋白関連遺伝子（Laminin, Dystrophin）を蛍光免疫染色で、細胞増殖能（Ki67,PCNA）を免疫染色で評価した。さらに炎症の指標として、マクロファージの代表的なマーカーであるF4/80の免疫染色も評価した。Real-time PCR法では2群間の細胞周期や筋合成に関する遺伝子発現を比較した。細胞周期の指標としてCyclinD1を、筋合成の指標としてMyoD、myogenin、Pax7の発現を検討項目とした。また抽出した蛋白はwestern blot法で2群間の筋合成に関する遺伝子(MyoD, myogenin, Pax7）の発現を比較した。

【結果】

筋質重量

各time pointでの2群間の平均筋質重量をTable 1に示す。筋質重量体重比はコントロール、術後3日、28日では2群間に有意差はなかったが、術後14日ではp21KOマウスのほうが有意に減少していた。

HE染色

p21KOマウスは筋組織の再生がWTマウスと比較して遅延していた（Fig. 1)。炎症反応は共に術後3日で強く認められた（Fig. 1A)。WTマウスでは術後14日で筋組織はほぼ再生していたが、p21マウスでは遅延していた（Fig. 1B)。

膜蛋白関連遺伝子の発現

LamininとDystrophinの蛍光免疫染色ではp21KOマウスの筋組織の再生がWTマウスと比較して遅延していた（Fig. 2)。術後3日では共に膜構造は再生していなかった（Fig. 2B）が、WTマウスでは術後14日でほぼ再生した（Fig. 2C)。p21マウスは術後28日でほぼ再生した（Fig. 2D)。LamininとDystrophinの相対的な発現の定量結果では、共に術後3日で最低となり、WTマウスでは術後14日で発現が増加した(Figs. 2E and 2F）。

*Cyclin D1*の発現

*Cyclin D1*の発現は術後3日で共に増加した。p21マウスはどのtime pointでもWTマウスより発現が増加していた（Fig. 3)。

Ki-67の発現

Ki-67の発現は2群間でコントロール、術後3日の両方で有意に違いが見られた（Figs. 4A and 4B）。Ki-67陽性細胞数でも術後3日で共に有意に増加していた。

PCNA と F4/80 の発現

PCNAの発現は2群間共に術後3日の方がコントロールよりも有意に増加していた。さらにp21KOマウスの方がWTよりも有意に増加していた（Figs. 5A and 5B）。同一切片においてのF4/80の発現も術後3日のp21KOマウスで最も増加していた（Figs. 5C and 5D）。

筋合成関連遺伝子の発現

WTマウスでは*MyoD*と*myogenin*の発現ピークは術後3日目に認められたが、p21KOマウスでは術後14日目に認められた（Figs. 6A and 6B）。ピークレベルもp21KOマウスの方が低値であった。*Pax7*の発現ピークは、WTマウスでは術後3日目に認められたが、p21KOマウスでは発現レベル自体が低値であった（Fig. 6C)。

Western blot法による筋合成関連蛋白の検討

WTマウスではMyoD, myogenin, Pax7のいずれも術後3日目で蛋白発現が増加していたが、p21KOマウスでは増加が見られなかった（Fig. 7)。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2528 号	氏 名	鎮西 伸顕
論文題目 Title of Dissertation	P21 Deficiency Delays Regeneration of Skeletal Muscular Tissue P21 欠損は骨格筋再生を遅延させる		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 副 査 Vice-examiner 副 査 Vice-examiner	奇的浩人 味木徹夫 青井貴之	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

頻度の高い外傷の一つである筋損傷は、下腿筋に発生し易い為に日常生活支障を来しやすい。筋損傷後の筋再生は損傷組織の壊死と炎症反応の惹起により始まるが、その過程は高度に制御調節されている。一方、DNA レベルにおいて、外界からのストレスで損傷が起きると、細胞分裂周期を調節し異常な DNA 増殖を抑制する分子の一つとして p21 が知られており、近年は組織損傷後の役割に関する報告も散見されている。しかし筋合成に関する p21 の関与は未だ不明な点が多く、研究者らは筋損傷の回復過程における p21 の役割をノックアウト(KO)マウスで検討した。

筋損傷モデル作成とサンプル回収

週齢 10 週の p21KO マウス(n=9)と WT マウス(n=9)の下腿筋に、0.5%塩酸ブピバカインを 0.1mL 注射し筋損傷モデルを作成した。処置なしマウスをコントロールとし、処置したマウスは術後 3 日、14 日、28 日で安楽死させ sample を回収した。各マウスの体重と sample の筋質量の測定を行った後、sample から蛋白及び RNA を抽出した。パラフィン組織標本も作製した。

検討項目

各筋は HE 染色の他、膜蛋白関連遺伝子（Laminin, Dystrophin）を蛍光免疫染色で、細胞増殖能（Ki67、PCNA）、炎症の指標（F4/80）を免疫染色で評価した。Real-time PCR 法では 2 群間の細胞周期（CyclinD1）や筋合成関連遺伝子（MyoD、myogenin、Pax7）の発現を比較した。抽出した蛋白でも western blotting 法で MyoD、myogenin、Pax7 を比較した。

筋質重量

筋質重量体重比は術後 14 日では p21KO マウスのほうが有意に減少していた。他の日数では 2 群間の有意差はなかった。

HE 染色および膜蛋白関連遺伝子の蛍光免疫染色

WT マウスでは術後 14 日で筋組織はほぼ再生していたが、p21 マウスでは筋組織の再生が遅延していた。

Cyclin D1 の発現

Cyclin D1 の発現は共に術後 3 日で共に増加した。p21 マウスはどの日数でも WT マウスより発現が増加していた。

Ki-67 の発現、PCNA と F4/80 の発現

Ki-67、PCNA、F4/80 の発現及び各々の陽性細胞数は 2 群間共に術後 3 日の方がコントロールよりも有意に増加していた。さらに p21KO マウスの方が WT マウスよりも有意に増加していた。

筋合成関連遺伝子の発現

p21KO マウスでは WT マウス比べて MyoD と myogenin の発現ピークは遅延しており、ピークレベルも p21KO マウスの方が低値であった。Pax7 の発現も p21KO マウスではそのレベル自体が低値であった。

Western blotting 法による筋合成関連蛋白の検討

WT マウスでは MyoD, myogenin, Pax7 のいずれも術後 3 日目で蛋白発現が増加していたが、p21KO マウスでは増加が見られなかった。

筋質重量や組織染色の結果より p21KO マウスでは筋組織の回復が遅延することが確認できた。細胞周期の観点からは Cyclin D1 や Ki-67、PCNA の発現増加が p21KO マウスで認められたことより、p21KO マウスでは細胞増殖が亢進していることが確認できた。F4/80 の発現増加も p21KO マウスで認められ、p21KO マウスにおける筋損傷後の免疫炎症反応の亢進が示唆された。筋合成過程において、myoblast の増殖によって細胞周期から脱却することがその後の筋分化に必要であるが、本研究では MyoD や Pax7 などの筋合成関連遺伝子の発現遅延が p21KO マウスで認められた。以上の事から、p21 欠損は細胞増殖を亢進させるが筋分化を遅延させることにより、p21 は筋再生に重要な役割を担うことが証明された。

本研究は p21 がマウスの筋損傷モデルにおいて、筋再生・筋分化に重大な影響を与えていることを研究したものである。筋組織関連の研究は従来、in vivo での報告は少なく、本研究は p21KO マウスを用いてこれらの関連因子を詳細に報告したものである。p21 と筋損傷後の再生過程の関連を明らかにすることは、細胞周期と筋再生・分化の更なる綿密な関連を明らかにし、新たな治療アプローチへの手がかりの一つと成り得る重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。