

学 位 論 文 要 旨

氏 名 Mohamed Abdelhady Ali Mahdy

題 目 : A study on fibrosis and adipogenesis during muscle regeneration in mouse model

(マウス筋再生過程における線維化および脂肪化に関する研究)

論文要旨 :

Skeletal muscle regenerates efficiently in response to injuries. However, excessive accumulations of fibrous and fat tissue are characteristic features of some pathological disorders as myopathies and advanced cases of Duchenne muscular dystrophy. For better understanding of the process of muscle regeneration in a controlled and consistent manner, various experimental animal models have been used to mimic human injuries. Although *mdx* mouse is the most accepted genetic model for studying muscle dystrophy, it shows limited fibrosis in limb muscles at about two years old. Therefore, it is important to develop either a new protocol to enhance muscle fibrosis in *mdx* mice at young age or develop new experimental models for muscle fibrosis. Hence, developing muscle fibrosis model in normal non-dystrophic muscles is easy to perform and will evaluation of therapeutic treatment of fibrosis. The overall aim of this thesis is to investigate the detailed response of non-dystrophic muscle to injuries induced by cardiotoxin (CTX) and glycerol to determine the appropriate injury model for studying muscle fibrosis and adipogenesis.

In Chapter 1, the outcomes of regeneration following two experimental models of muscle injuries were demonstrated in non-dystrophic mice, in relation to changes in intramuscular connective tissue (IMCT). Skeletal muscle responses following both injuries were different; efficient regeneration with transient endomysial fibrosis following CTX injury, while impaired regeneration with adipocyte infiltration and progressive endomysial fibrosis following glycerol injury. The association of changes in regeneration process with the variations in IMCT structure suggests that IMCT plays an important role in controlling the efficiency of muscle regeneration following injury. Next, the effects of exogenous treatment of the profibrotic cytokine, transforming growth factor (TGF)- β 1, on muscle regeneration and adipogenesis were investigated. TGF- β 1 treatment suppressed muscle regeneration and adipogenesis and enhanced fibrosis. Our results suggest that TGF- β 1 has a more potent effect on the early stage than on later stage of muscle regeneration and adipogenesis. Moreover, combination of TGF- β 1 with glycerol-induced injury provides a simple model to enhance muscle fibrosis for future studies.

In Chapter 2, the early changes of muscle damage in response to CTX and glycerol injuries were studied in details by histological and ultrastructural analyses to further explain the difference in regeneration between the two injuries. The potential targets, the mechanisms of muscle damage and the time sequence of immune cell infiltration were different between the two injuries. Alterations of myofiber

(別紙様式第 3 号)

cell membrane, timing and degree of immune cells recruitment have a great impact on muscle degeneration. Moreover, these early events clarify the differential regeneration between the two injury models.

In conclusion, the data presented in this thesis provide a thorough understanding of the relationship between muscle regeneration and alteration of IMCT structure on one hand and the relationship between outcome of regeneration and early events following injury on the other hand. The glycerol-injured model provides a suitable model to study muscle fibrosis and adipogenesis for future research on defective regeneration in normal mice. In addition combination of glycerol and TGF- β 1 treatment might be an alternative to enhance muscle fibrosis in non-dystrophic muscle which could be applied in genetically modified mice in future research.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Mohamed Abdelhady Ali Mahdy
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 保坂 善真
	副 査：鳥取大学 教授 山野 好章
	副 査：鳥取大学 教授 森田 剛仁
	副 査：鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副 査：鳥取大学 准教授 割田 克彦
題 目	A study on fibrosis and adipogenesis during muscle regeneration in mouse model (マウス筋再生過程における線維化および脂肪化に関する研究)
審査結果の要旨： Mohamed Abdelhady Ali Mahdy 氏の博士課程における研究は、薬剤誘導性の筋損傷を惹起させ、筋組織の損傷から修復・再生に至る一連の過程を形態学的側面から詳細に解析、比較しその変遷を明らかにしたものである。 第 1 章では使用する薬剤による筋組織の損傷と再生過程の違いを比較するために、薬剤誘導性筋損傷実験で広く使用されるカルディオトキシン (CTX) と、筋再生過程で特徴的な形態の変化が観察されることが明らかになったグリセロールを用いた。これらの薬剤をマウスの前脛骨筋に注入し、その後定期的 (注入 4、7、10 および 14 日後) に採取し組織を解析した。注入 4 日後の組織損傷の程度は CTX 注入したものがグリセロール注入したものより重度であった。いずれの薬剤でも核が細胞の中心にある Neonatal な筋線維は、注入 7 日後から観察されはじめたが、注入 10 および 14 日後では再生された筋線維の密度や線維の直径は CTX を注入した筋がグリセロールを注入したものより高くなっていた。興味深いことにグリセロール注入では、CTX 注入では確認されなかった多数の脂肪細胞が筋肉内に形成されていた。電子顕微鏡による超微形態学的な観察では CTX 注入では早期 (注入 4 および 7 日後) では筋線維間結合組織 (IMCT) である筋内膜が肥厚したが、グリセロール注入では観察期間を通して筋内膜の厚さに大きな変化はみられなかった。線維芽細胞は、筋再生時に活性化する筋衛星細胞の増殖や筋細胞への分化を制御していることが報告されている。IMCT 中の線維芽細胞に由来する何らかの因子が筋衛星細胞に作用し筋組織の再生を誘導したと考えられるが、グリセロール注入した筋では筋内膜の変化は乏しく、筋衛星細胞の増殖や筋細胞への分化が進まなかったと考えられる。また、筋肉内に脂肪細胞が形成されたことも筋再生が促進しない可能性として考えられた。	

第 1 章では、注入 4 日後以降の筋組織の再生過程の差異を明らかにしてきたが、4 日後ですでに使用する薬剤 (CTX とグリセロール) によって、筋組織に形態学的な違いが現れることが明らかとなった。注入直後から 4 日後までの筋組織の形態を理解することが、第 1 章で明らかにした注入試薬による筋組織形態の違いの理解につながると考えた。第 2 章では注入直後 (1、6、12、24 時間および 4 日後) の前脛骨筋の筋組織の変化を光学顕微鏡および電子顕微鏡で検索し、その特徴を解析するとともに 4 日後以降の筋組織の変化との関連について検討した。CTX を注入すると 1 時間後には筋線維中に膨化したミトコンドリアが集積しはじめ、24 時間後には膨化の程度が重度となった。一方、グリセロールを注入すると 1 時間後には筋線維中に顆粒が増加し、また 1-12 時間後にかけて筋線維の基底膜や細胞膜が局所的に破綻していた。また、CTX 注入ではグリセロール注入よりもより早期に、そしてより多数の炎症性細胞 (好中球やマクロファージ) を損傷部に遊走させていた。活性化した筋衛星細胞は CTX およびグリセロールのいずれの処置でも 6 時間後から観察され始めたが、同細胞の活性度を表す指標の細胞長や核/細胞質比は CTX 注入 4 日後で有意な差を示したことから、グリセロールを注入した場合より筋再生への移行がスムーズに行われていることが示唆された。また、4 日後には CTX 注入では線維芽細胞が、グリセロール注入では脂肪細胞前駆細胞が多数観察された。このように薬剤によって形態的な違いが筋組織に現れたことは、筋線維の損傷が異なる機構で誘導されたことを意味する。すなわち、CTX とグリセロールではダメージを与える組織内の構造対象が異なり、前者は筋線維のミトコンドリアであり、後者は基底膜や細胞膜が破綻することで引き起こされる細胞内浸透圧の変化であると考えられた。

以上の結果は、CTX およびグリセロール注入後の筋組織の再生の過程を、経時的に形態学的手法を用いて比較解明したものである。筋組織に損傷が誘導される機構が、使用した薬剤によって異なることに加え、筋組織の再生過程で惹起される組織的な変化 (線維化および脂肪化) について最も詳細な解剖学的知見を提供している。本研究によって明らかにした 2 種の薬剤誘導性筋損傷の機構とその後の筋再生過程の知見は、将来の筋組織の生理学的・病理学的研究や損傷、修復、再生機構の解明に大いに寄与するものと考えられる。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認める。