

Title	Controlled differentiation of myoblast cells into fast and slow muscle fibers
Author(s)	松岡, 由和
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/1620">https://hdl.handle.net/11094/1620</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【22】

氏 名	松 岡 由 和
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 5 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 0 年 9 月 2 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 生命機能研究科生命機能専攻
学 位 論 文 名	Controlled differentiation of myoblast cells into fast and slow muscle fibers (筋細胞の速筋および遅筋への分化制御)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 倉 明 彦 (副査) 教 授 柳 田 敏 雄 教 授 難 波 啓 一

#### 論 文 内 容 の 要 旨

骨格筋は脊椎動物の体の大部分を占める組織であり、動物の運動に必要な器官である。骨格筋は多くの筋線維で構成されている。骨格筋は損傷を受けると、筋線維の形質膜と基底膜との間に存在する骨格筋衛星細胞と呼ばれる休止状態の未分化な細胞が活性化され、増殖を開始し筋芽細胞へと分化する。

この筋芽細胞は互いに融合することにより筋管を形成し、さらに、収縮蛋白質を合成して筋線維の再生が行われる。

骨格筋線維は速筋線維及び遅筋線維に分類することができる。それらの収縮速度は速筋線維では速く、遅筋線維は速筋に比べて遅い。一方で、速筋線維では解糖系をエネルギーの供給源としているのに対し、遅筋線維では酸化的リン酸化を主なエネルギーの供給源としており、遅筋線維は速筋線維に比べ長時間にわたり張力を発揮できる。また、速筋線維と遅筋線維では発現しているミオシン重鎖(MyHC)のタイプが異なっており、速筋線維では速筋型の、遅筋線維では遅筋型のMyHCが発現している。そのため、MyHCアイソフォームをマーカーとして筋線維の分類をすることが可能である。各骨格筋は、これら速筋線維および遅筋線維の含まれる割合により速筋および遅筋に分類される。発生時において、これら筋線維のサブタイプの形成は位置特異的に起こり、損傷からの再生後においてもサブタイプを維持することが知られている。しかしながら、この速筋線維および遅筋線維間の分化決定がどのように調節されているかは分かっていない。

そこで、本研究では筋芽細胞から筋線維へと分化する際サブタイプ間の分化が筋芽細胞の時点ですでに運命決定されているのか、あるいは筋管形成中に決定されるのかを明らかにし、再生時における筋線維サブタイプ間の維持機構を解明することを目的とした。ここでは、速筋および遅筋自身が筋線維のサブタイプ形成に影響を与えている可能性を検証するために、ニワトリの速筋ならびに遅筋から筋抽出液を作成し、この筋抽出液が筋芽細胞から各サブタイプへの分化にどのような影響を与えるかを与えるかを検討した。

まず、ニワトリ骨格筋を、速筋型MyHCおよび遅筋型MyCHに特異的な抗体を用いて、ウェスタンブロットングにより分類した。その結果、小胸筋は速筋、前広背筋は遅筋、縫工筋およびヒラメ筋は中間タイプであることが明らかにされた。次いで、それらより抽出液を作成した。さらに、ニワトリ胚後肢より取り出した筋芽細胞を分化培地中に各骨格筋抽出液を添加した状態で7日間培養し、各サブタイプへと分化させた。この際に、上記の各骨格筋抽出液を分化培地に加えたときの効果を、速筋型および遅筋型MyHCに対する抗体を用いて、免疫二重染色法およびウェスタンブロットングにより評価した。その結果、対照群では半数以上の筋管が速筋型のMyHCのみを、残りは速筋型と遅筋型のMyHCを同時に発現するのに対し、遅筋である前広背筋の抽出液を添加した群では、遅筋型のMyHCのみを発現する筋管が見られるようになり、また速筋型のMyHCのみを発現する筋管の割合が対照群と比較して減少した。反対に、速筋である小胸筋抽出液を添加した群では対照群に比べ速筋型のMyHCのみを発現する筋管の割合が増加した。中間型である縫工筋およびヒラメ筋の抽出液を添加した群においては、前広背筋の抽出液を添加した群よりも少ない割合ではあるが、遅筋型のMyHCのみを発現する筋管が出現した。この結果から、筋芽細胞は筋管形成時に筋線維からの影響を受けてサブタイプへの分化を制御している可能性が示唆された。

しかしながら、以上の実験で用いたニワトリ筋芽細胞には様々なタイプの筋芽細胞が含まれている可能性があり、あらかじめ遅筋タイプの筋線維に分化することが運命付けられている細胞が特異的に増殖および分化した結果なのか、それとも、遅筋抽出液中に含まれる成分により筋芽細胞の分化の方向性が遅筋タイプへと変えられたのかを判別することはできない。そのため、マウス筋芽細胞由来の株化細胞であるC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞のsingle cloneを用いて同様の実験を行った。その結果、前広背筋抽出液を添加した群では、遅筋型のMyHCを発現する筋管の割合が対照群と比較して有意に増加した。このことから、一つの筋芽細胞が速筋型および遅筋型の両方へと分化可能であり、遅筋への分化誘導が遅筋抽出液により起こることが示された。筋芽細胞を遅筋へと誘導する因子は分子量が約50Kの蛋白質で尿素変性後緩衝液に透析することにより活性を回復することから分泌性の蛋白質であると示唆された。

これらの結果から、筋細胞のサブタイプの分化はその環境により制御されることことが明らかになった。発生時においても、再生時と同じような制御機構が存在するものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

骨格筋は速筋線維と遅筋線維の集合である。発生時において、これら筋線維サブタイプの形成は位置特異的に起こり、損傷からの再生後においてもサブタイプを維持することが知られている。しかし、

この分化決定がどのように調節されているかは分かっていない。

松岡由和君はサブタイプ分化が筋芽細胞の時点ですでに運命決定されているのか、筋管形成中に決定されるのかを明らかにする目的で、ニワトリの小胸筋（ほぼ速筋線維から成る）ならびに前広背筋（ほぼ遅筋線維から成る）から筋抽出液を作成し、後肢筋（両者の混合）由来の筋芽細胞培養系に添加した。その結果、小胸筋抽出液添加群では対照群（筋抽出液無添加で自律分化させた群：速筋型筋管と中間型筋管の混合となった）に比べて、速筋型筋管の割合が増加した。逆に、前広背筋抽出液添加群では遅筋型筋管が含まれるようになった。縫工筋やヒラメ筋（後肢筋）の抽出液添加群では、前広背筋抽出液添加群より低い割合ながら、遅筋型筋管が生じた。したがって、筋芽細胞は筋管形成時に先に分化した筋線維からの影響を受けてサブタイプへの分化を制御されている可能性が示唆された。次に、マウス筋芽細胞由来の株化細胞であるC<sub>2</sub>C<sub>12</sub>細胞のsingle cloneを用いて同様の実験を行い、同等な結果をえた。これらの結果から、一つの筋芽細胞が速筋型および遅筋型の両方へと分化可能であり、遅筋への分化誘導が遅筋抽出液により起こることが示された。さらに、遅筋に誘導する因子の精製を試み、これが約50kDの蛋白質画分に含まれ、尿素変性後緩衝液に透析することにより活性を回復することから、分泌性の蛋白質であることが示唆された。

以上の結果から、筋線維のサブタイプ分化は環境因子により制御されることことが明らかになった。発生時においても、再生時と同じような制御機構が存在するものと推論される。

本論文は筋分化の機構に重要な新知見を加えるものであり、学位論文に値するものと認める。