

Title	Mouse C2 myoblast cells resist HVJ (Sendai virus) -mediated cell fusion in the proliferating stage but become capable of fusion after differentiation.
Author(s)	平山, 恵津子
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43054
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	平山 恵津子
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 14837 号
学位授与年月日	平成 11 年 5 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Mouse C2 myoblast cells resist HVJ (Sendai virus)-mediated cell fusion in the proliferating stage but become capable of fusion after differentiation. (マウス C2 筋芽細胞の分化過程における HVJ (センダイウイルス) による融合感受性の変化)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 上田 重晴 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

[目的]

骨格筋筋芽細胞の分化過程は、筋芽細胞の融合による筋管形成や筋特異的蛋白質の発現等、その現象が顕著であるばかりでなく、in vitro でも良く再現できる点から高等動物細胞の分化機構を解析する上で良い実験系である。近年、MyoD、myogenin 等の筋分化制御因子の同定により分化初期の解析は著しく進展しているが、筋分化過程の内でも最も顕著な現象である、筋芽細胞の融合による筋管形成機構は未だほとんど解明されていない。また、筋ジストロフィー症等の筋疾患には難病が多く、筋分化機構の解析はこの様な疾患の治療法開発のための基礎研究としても意義深い。

筋芽細胞の分化、特にその融合による筋管形成及び筋管の成熟機構を解析すべく、ウズラ胚筋芽細胞 (quail myoblast; QM) をラウス肉腫ウイルス (RSV) の温度感受性変異株で形質転換した、QM-RSV 細胞を作製した。QM-RSV 細胞は、感染 RSV の許容温度である 35.5°C では癌細胞の性質を示し増殖を繰り返すが、非許容温度の 41°C では分化誘導され、一連の素反応を経て、融合し筋管を形成すると共に筋特異的蛋白質を合成し、筋線維へと分化成熟する。

筋管の形成及び成熟機構を解析する一環として、センダイウイルス (HVJ) で、未分化 QM-RSV 細胞を強制的に融合させ、一連の分化プログラムを無視した人工筋管を作製し、41°C での分化誘導により得られた自然発生筋管と比較検討している。その過程でマウス由来株化筋芽細胞、C2 細胞を同様に HVJ 処理し人工筋管の作製を試みたところ、未分化 C2 細胞では細胞融合が全く見られないというユニークな現象を見出した。そこで、分化過程における細胞膜特性に注目しこの現象を詳細に調べた。

[方法ならびに成績]

未分化 C2 細胞に HVJ を作用させると、細胞膜にウイルス粒子が吸着するにも拘わらず、細胞融合は全く見られず、QM-RSV 細胞の場合のような人工筋管は全く得られなかった。通常の細胞融合反応に用いる 10 倍量の HVJ (細胞 1 個当たり 10,000 個以上のウイルス粒子) を作用させても細胞融合は見られず、未分化 C2 細胞は細胞融合に極めて強い抵抗性を示す、固い安定した膜特性を有することが分かった。C2 細胞を分化誘導すると、約 72 時間目までに自然発生的に筋管を形成することから、分化過程において C2 細胞はその膜特性を“融合しやすく”変化させることが推察され

る。そこで、分化誘導開始後経時的に細胞を HVJ で処理したところ、分化誘導48時間目で細胞融合による人工筋管が出現し、分化過程において C2 細胞の HVJ による融合感受性が高まることが示唆された。さらにこのことを確かめるため、C2 細胞とエールリッヒ腹水癌細胞との HVJ による雑種細胞の形成を試みたところ、未分化 C2 細胞では雑種細胞が形成されないのに対し、分化誘導した細胞では48時間目から雑種細胞の形成が見られるようになり、C2 細胞が分化反応の進行と共に細胞膜特性を融合しやすく変化させることが明らかになった。

HVJ による細胞融合反応では、HVJ の作用により細胞膜の脂質二重層が一度崩壊した後、急速に修復される過程で膜融合が起こる。この修復には Ca^{2+} が必須で、従って、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) 存在下では細胞融合は見られず、細胞は致死する。この現象を利用して、分化過程における C2 細胞の膜特性の変化をさらに具体的に観察した。未分化 C2 細胞を EDTA 存在下 HVJ 処理すると、細胞融合が見られないばかりではなく致死細胞も認められないのに対し、分化誘導した C2 細胞は EDTA に感受性で、HVJ により死に至った。このことから、C2 細胞は分化過程で、HVJ によりその細胞膜の脂質二重層構造が崩壊するような変化が起こり、これが筋管形成のための細胞融合に関連することが示された。

QM-RSV 細胞でも、分化誘導により HVJ による融合感受性が高まることから、筋芽細胞が融合による筋管形成に向けて、その膜特性を融合しやすく変化させることは一般的である可能性が高い。

[総括]

本研究では、骨格筋筋芽細胞の筋管形成機構を解析する一環として、細胞膜特性の変化を HVJ による融合感受性を指標に検討した。その結果、筋芽細胞が一般にその分化過程で、細胞膜特性を融合しやすく変化させることが明らかとなった。この変化には細胞膜脂質や裏打ち蛋白質の組成や分布の変化が起因すると考えられ、これを解明することは筋芽細胞の融合による筋管形成機構を解析する上で大きな手がかりを与えるものと思われる。

論文審査の結果の要旨

骨格筋筋芽細胞を分化誘導すると、増殖停止、細胞の再配置といった一連の素反応を経て、分化のある段階に達すると細胞相互が一斉に融合し筋管を形成すると共に、筋特異的蛋白質を合成し筋線維へと成熟する。本論文では、この筋管形成機構を解析する一環として、センダイウイルス (HVJ) を用いた細胞融合により人工筋管を作製すべく、マウス株筋芽細胞 C2 細胞の細胞融合を試み、ユニークな知見を得ている。すなわち、未分化 C2 細胞に HVJ を作用させると、細胞表面にウイルス粒子が吸着するにも拘わらず細胞融合は起こらず、さらに、通常用いる量の10倍(細胞1個当たり10,000個以上)の HVJ を作用させても融合細胞は得られず細胞変性も見られない、一般の培養細胞には認められないユニークな現象を認めた。申請者はこの現象を解析し、筋芽細胞の細胞膜特性が分化誘導により大きく変化するという、筋管形成に極めて重要な反応を明らかにした。

未分化 C2 細胞を分化誘導すると約72時間までに融合し筋管を形成する。このことは、分化誘導により C2 細胞の細胞膜が融合しやすい状態に変化することを示唆する。そこで、この“融合しやすさ”を検証するため、分化誘導開始後経時的に C2 細胞を HVJ で処理したところ、分化の進行に伴い次第に HVJ で融合するようになった。形質転換ウズラ胚筋芽細胞 QM-RSV 細胞においても、分化誘導により HVJ による細胞融合反応に対し感受性が高まることが確認された。また、筋芽細胞と他の体細胞との雑種細胞形成の手法により、筋芽細胞が分化過程での筋管形成に向け、その細胞膜特性を融合しやすく変化させることを明らかにした。さらに、HVJ による細胞融合反応に Ca^{2+} が必須であることを利用し、C2 細胞に分化過程で HVJ によりその細胞膜の脂質二重層が崩壊するような変化が起こり、これが筋管形成のための細胞融合に関連することを EDTA を用い実際に示した。

筋芽細胞の融合による筋管形成は“fusion burst”と呼ばれる程劇的な現象であるが、多くの研究者の努力にも拘わらず未だほとんどその機構は解明されていない。上記の内容から成る本論文はこの解明に道筋をつけるもので、学位論文に十分値すると考える。