Osaka University Knowledge Archive

Title	周期的伸展刺激が骨髄由来間質細胞の骨格筋分化に及ぼす影響
Author(s)	小林, 宗正
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49799
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、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

【11】

氏　　名	小（こ）　林（ばやし）　宗（むね）　正（まさ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２２８３３　号
学位授与年月日	平成21年３月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学　位　論　文　名	**周期的伸展刺激が骨髄由来間質細胞の骨格筋分化に及ぼす影響**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　矢谷　博文 （副査） 教　授　阪井　丘芳　　講　師　佐藤　　淳　　講　師　松本　卓也

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

顎口腔機能の要である咀嚼筋，舌は，咀嚼，嚥下，構音など生体機能の発現に重要な役割をはたしている。腫瘍などにより咀嚼筋，舌切除術を受けた患者の義歯治療は非常に困難であり，義歯安定性の低下により患者の QOL に大きい影響を及ぼす。

Tissue Engineering（組織工学）による咀嚼筋，舌組織の再生は，低侵襲による再建と，QOL を回復できる可能性を含んでいる。骨髄由来間質細胞（Bone Marrow Stromal Cells：BMSC）は多分化能を有しており，再生医療への応用が期待されているが，この細胞を効率的に骨格筋に分化誘導する技術は確立されていない。生体内の骨格筋組織は，細胞が一方向に一様に配向しており，骨格筋分化過程においては，細胞融合が起点となり筋管細胞形成へと誘導される。また，生体内では伸展と弛緩を繰り返しており，組織内の細胞はそれによる力を受けていることから，我々は *in vitro* における周期的伸展刺激が，BMSC の骨格筋分化を促進する可能性に着目した。本研究の目的は，*in vitro* における周期的伸展刺激が BMSC の骨格筋分化に及ぼす影響を検討することである。

［方法］

成体マウス大腿骨骨髄から BMSC を単離し，それを長期継代培養から自然不死化クローン細胞株を樹立し実験に用いた。この細胞を，フィブロネクチンでコートしたシリコンシート上に播種し，カスタムメイドの周期的伸展装置で 0.17 Hz，10％の一軸方向伸展刺激を与えた。最初にこの周期的伸展刺激が，BMSC

の配向，増殖，運動に及ぼす影響を評価した。細胞配向実験では，伸展刺激前，伸展刺激培養および静的培養 48 時間後の細胞の長軸と，伸展方向とのなす角度を Image J にて測定した。また，各培養条件下における細胞のアクチン線維をファロイジン染色し，免疫蛍光観察を行った。細胞増殖，運動の評価は，培養 24，48，72 時間後の DNA 定量および細胞接着面積の比較により行った。

次に，周期的伸展刺激が骨格筋分化に及ぼす影響を検討する目的で，骨格筋誘導培地中で周期的伸展刺激培養および静的培養を行い，周期的伸展刺激が骨格筋分化に及ぼす影響を検討した。各培養条件下で 3，5，7 日後に細胞からトータル RNA を抽出し，伸展刺激応答遺伝子（tension-induced/inhibited protein：TIP1, TIP3），小胞体ストレスマーカー遺伝子 （GRP78），および骨格筋関連遺伝子 （MyoD，Myf5，myogenin，MRF4）の発現を RT-PCR 解析にて検討した。また，これらの培養条件下における myogenin、myosin のタンパク質発現を，免疫蛍光観察により評価した。

［結果および考察］

BMSC に周期的伸展刺激を 48 時間与えた結果，細胞の向きは伸展方向に対して 0〜30 度に集束し，細胞内のアクチン線維が伸展方向へ一様に配向した像が観察された。この結果から，BMSC は周期的伸展刺激を加えることにより，一方向に一様に配向することが示された。細胞増殖実験の結果，周期的伸展刺激培養 48, 72 時間後の細胞増殖は静的培養と比較して有意に抑制された（48 時間：$P<0.05$，72 時間：$P<0.001$）。細胞運動実験の結果，周期的伸展刺激培養 48，72 時間後における細胞移動面積は静的培養の場合と比較して有意に小さく（$P<0.01$），周期的伸展刺激による細胞運動の抑制を認めた。骨格筋分化誘導培地中における 5 日間の周期的伸展刺激培養の結果，伸展方向と平行方向に多核筋管様細胞が観察された。一方，静的培養条件ではこのような細胞形態は観察されなかった。RT-PCR 解析の結果，周期的伸展刺激による TIP1，GRP78 の発現亢進，および TIP3 の発現低下が認められた。また，周期的伸展刺激培養により，細胞は Myf5，myogenin，MRF4 の mRNA 発現を亢進した。さらに，免疫蛍光観察の結果，周期的伸展刺激培養細胞には，静的培養細胞よりも，myogenin，myosin の強いタンパク質発現が観察された。

本研究の結果から，周期的伸展刺激は，BMSC を一方向に一様に配向させ，細胞増殖および細胞運動を抑制することが明らかとなった。また，周期的伸展刺激は，BMSC の骨格筋系への分化を促進することが明らかとなった。

この一因として，周期的伸展刺激の細胞配向作用および細胞増殖，運動の制御が細胞同士の接触を促し，その結果，骨格筋分化過程における細胞融合が促進されたことが考えられる。また，機械的刺激に応答する TIP1, TIP3 などの細胞内因子が働き，骨格筋分化誘導に効果的に作用した可能性が考えられる。今後，これらの機構の詳細を明らかにすることで，機械的刺激による BMSC の骨格筋細胞への分化誘導技術が再生医療へと発展することが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は周期的伸展刺激が骨髄由来間質細胞の骨格筋分化に及ぼす影響について検討を行ったものである。

その結果，周期的伸展刺激は骨髄由来間質細胞の骨格筋分化を促進することが明らかとなった。

以上の結果は，これまで困難であった骨髄由来間質細胞の効率的な骨格筋分化誘導を可能とする新たな技術として，組織工学に貢献し，再生医療へ応用されることが期待され，博士（歯学）の学位取得に値するものと認める。