

Title	Expression of Myostatin and Follistatin in Mdx Mice , an Animal Model for Muscular
Author(s)	添島, 正和
Journal	歯科学報, 110(4): 544-545
URL	http://hdl.handle.net/10130/2010
Right	

氏名(本籍)	添 島 正 和 (熊本県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 1847 号(乙第 731 号)
学位授与の日付	平成21年9月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Expression of Myostatin and Follistatin in <i>Mdx</i> Mice, an Animal Model for Muscular
掲載雑誌名	Zoological Science 第26巻 5号 315~320頁 2009年
論文審査委員	(主査) 井出 吉信教授 (副査) 下野 正基教授 柳澤 孝彰教授 東 俊文教授 井上 孝教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

サテライト細胞は生後の筋組織の中に存在し、筋肥大または修復など必要に応じて筋前駆細胞へ分化する。この過程を制御する物質は成長因子と細胞外基質である。TGFファミリーに属する myostatin は筋組織に発現し、成長因子の働きを制御することが知られている。近年の研究で分泌された糖タンパクである follistatin が myostatin のシグナル伝達経路での新しい分子として特定され、follistatin は myostatin に結合することで myostatin の活性を制御する可能性が示唆された。そして間接的に筋前駆細胞の増殖と分化に関与していると考えられるようになった。しかし、筋再生時における myostatin と follistatin の発現を調べた報告は少なく不明な点がある。そこで本研究では、筋ジストロフィーモデルマウスである mdx マウスを用いて筋再生過程における myostatin と follistatin の発現を調べた。

2. 研究方法

観察材料は、生後2, 3, 4, 9週齢の mdx マウスおよびコントロールマウス(B10)を用いた。東京歯科大学動物実験指針に従い深麻酔にて屠殺後、試料を摘出した。観察部位は前脛骨筋(以下TA)とし、左側のTAをタンパクの形態学的観察および dystrophin タンパクの有無の確認のために用いた。TAは摘出後、直ちに液体窒素で急速凍結した。試料は実験使用時まで-80℃のイソペンタン中で保存した。形態観察および免疫組織化学的検索では、クライオスタットを用いて筋線維束の長軸に直交する厚さ8μmの連続凍結切片を作製した。そして通法に従いH-E染色および免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学的染色では一次抗体として anti-dystrophin (Abcam ab15277)を用いた。また右側のTAを myostatin と follistatin タンパクの発現および転写レベルでの検索に用いた。タンパクの発現は Western blotting 法を用いた。転写レベルでの検索では、各ステージにおける myostatin と follistatin に対する mRNA の発現を LightCycler™ (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて通法に従い定量化した。

3. 研究成績および結論

H-E染色の結果、2週齢では mdx マウスおよびコントロールマウスに形態学的な違いはみられなかった。しかし3週齢 mdx マウスにおいて通常の細胞と形態が異なり、細胞が壊死したのではないかと思われる部位が観察された。さらに4週齢 mdx マウスでは中心核を有する再生筋が多く観察され、9週齢ではほとんどの

細胞が中心核を有する再生筋に置き換わっていた。また、*mdx* マウスではすべてのステージで dystrophin タンパクの発現が観察されなかった。すなわち今回観察を行った *mdx* マウス前脛骨筋には膜タンパクである dystrophin が欠如し、筋壊死が広範囲に生じ再生が活発に行われたと思われた。この再生過程における筋発育、分化制御因子である myostatin, follistatin の発現を Western blotting 法で検索した結果、コントロールでは2週齢に myostatin および follistatin の発現はみられなかった。しかし *mdx* マウスでは2週齢に myostatin の強い発現がみられ、follistatin もわずかに発現していた。また3週、4週齢においては *mdx* マウス、コントロールマウスともに発現がみられ、やや *mdx* マウスの方が強いのではないかという傾向が観察された。9週齢においてはどちらも発現がみられなかった。転写レベルの観察では myostatin および follistatin とともに2、3、4週の *mdx* マウスでコントロールに比べ優位に発現していた。今回の結果より、筋の壊死から再生過程で、骨格筋形成抑制因子の中で特に筋細胞から分泌される myostatin が重要な役割を呈していることが明らかとなった。さらには筋細胞以外から分泌される follistatin もその過程に必要な有力なタンパクであることも明らかとなり、筋成長制御因子が細胞内外から筋の再生に影響を与え、正常な筋再生が行われることの一環が明らかとなった。

論文審査の要旨

筋再生時の myostatin, follistatin の発現を同時に経時的に観察した報告がなかった。筋の再生には IGF-1 などの成長因子の発現が必須であるが、同時にその過剰発育を制御する筋発育、分化制御因子の発現がみられる可能性が考えられた。本論文は筋が成長期に活発に壊死から再生を繰り返す筋ジストロフィーモデルマウス (*mdx* マウス)を用い、筋再生時の筋発育、分化制御因子である myostatin, follistatin の発現を観察したものである。その結果、形態観察では2週齢では *mdx* マウスおよびコントロールマウスに形態学的な違いはみられなかった。しかし3週齢 *mdx* マウスにおいて通常の細胞と形態が異なり、細胞が壊死したのではないかとと思われる部位が観察された。さらに4週齢 *mdx* マウスでは中心核を有する再生筋が多く観察され、9週齢ではほとんどの細胞が中心核を有する再生筋に置き換わっていた。そして *mdx* マウスでは組織上で筋再生が多く起こったと考えられた生後2~4週で、コントロールに比べ myostatin, follistatin が優位に発現していた。そして筋再生がほぼなくなる生後9週齢の成獣では *mdx* マウス、コントロールマウスとも myostatin, follistatin の発現はみられなかった。本論文の研究結果は、筋の正常な再生には成長因子だけでなく、myostatin, follistatin などの筋、分化抑制因子の発現が重要であることを示唆するものであった。

本審査委員会では、1) 実験対象とした筋ジストロフィーモデルマウスについて、2) 今回の観察結果と考察の理論展開について、3) 今回観察対象とした myostatin, follistatin と関連する TGF- β ファミリーの関係について質問がなされたが、概ね妥当な解答が得られた。今後の研究課題として、今回の実験で観察した物質の組織上での局在に関する検討が要望されたが、本研究で得られた結果は、今後の歯科医学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。