

Title	HGF and IGF-1 is Present during the Developmental Process of Murine Masseter Muscle
Author(s)	野並, 幹三
Journal	歯科学報, 111(1): 114-115
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/2304">http://hdl.handle.net/10130/2304</a>
Right	

氏名(本籍)	野 並 幹 三 (高知県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 1869 号(甲第 736 号)
学位授与の日付	平成22年5月19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	HGF and IGF-1 is Present during the Developmental Process of Murine Masseter Muscle
掲載雑誌名	Journal of Hard Tissue Biology 第18巻 1号 1~6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

近年、筋の再生および筋肥大に至る過程で様々な成長因子が関与することが指摘されている。特に肝細胞増殖因子(HGF)が筋衛星細胞の活性と増殖に影響を与えていることが明らかとなった。さらにインスリン様成長因子-1(IGF-1)は筋芽細胞の増殖と分化を活性化していることが明らかとなった。しかし現在までマウス咬筋の発生過程におけるHGFとIGF-1の発現を明らかにした報告はない。さらには胎生期における筋線維特性の変化との関連を考察した報告もみられない。そこで本研究は胎生期における咬筋の形態観察を明らかにした後、各ステージにおけるHGFとIGF-1の発現について検索を行った。筋線維特性を検索するため、ミオシン重鎖の各Isoformの中で最も収縮速度が遅く、遅筋に属するMyHC-1、そして速筋に所属するMyHC-2a, MyHC-2d, MyHC-2bの構成比の変化を転写レベルで調べた。そしてHGFとIGF-1のマウス咬筋成長過程における筋組織形成、筋線維特性の獲得に対する役割の一端の解明を試みた。

#### 2. 研究方法

試料はICR系マウス(Sankyo Laboratory, Tokyo, Japan)を用いた。東京歯科大学動物実験指針に従い胎生14, 16, 18日のマウスを東京歯科大学動物実験指針に基づき、ペントバルビタールで深麻酔にて屠殺後、胎児を摘出した。試料数は形態観察のために胎生14日2匹, 16日2匹, 18日1匹の合計5匹を実験に供した。形態観察のために摘出した試料は4%パラホルムアルデヒドにて固定後、パラフィン包埋を行った。そして通法に従い頭部の薄切切片を作成し、H-E染色を施した。またタンパク解析、転写レベルの解析のために、まだ咬筋の大きさが小さい胎生14日, 16日のマウスはそれぞれ7匹, 18日のマウスは6匹, 合計20匹を実験に供した。左側咬筋はタンパク解析, 右側咬筋は転写レベルの解析に使用した。両実験ともに各マウス10サンプルを調整した。タンパク解析は、通法に従いウエスタンブロット法によるHGFとIGF-1のタンパク分析を行った。さらに各ステージにおけるIGF-1, HGF, MyHC-1, MyHC-2a, MyHC-2d, MyHC-2bに対するmRNAの発現をLightCycler™(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて定量化した。10サンプルの再現性を確認し、明らかに手技的なミスと思われるデータは削除した。その後データを平均し、そのマウスの値とした。それぞれの週齢の匹数の平均と標準偏差を最終的に図にまとめた。

### 3. 研究成績および結論

胎生14日においてメッセル軟骨の辺縁で下顎骨の形成がみられたが、咬筋の領域ははっきりと特定はできなかった。しかし胎生16日になると未熟な下顎骨の下部で成長した咬筋が確認され、胎生18日ではより成熟した咬筋を確認できた。HGF と IGF-1 のタンパクと mRNA は胎生14日で最も多く発現し、その後やや減少していた。ミオシン重鎖各 Isoform の検索結果であるが、MyHC-1 の mRNA の発現は胎生14日、16日、18日でほとんど差がみられなかった。MyHC-2a の mRNA の発現は胎生14日、16日ではほとんど差がなかった。しかし胎生18日で優位に多く発現していた。MyHC-2d の mRNA の発現は胎生14日、16日でほとんどみられなかった。しかし胎生18日で優位に多く発現していた。この傾向は MyHC-2a とほとんど変わらなかった。MyHC-2b の mRNA の発現は胎生14日に比べ16日で優位に多く発現がみられ、その後18日ではやや減少していた。よって筋線維特性を決定する MyHC のタンパク構成は胎生後期に大きく変化し、これまでの報告と比べると、出生直後の筋線維特性に極めて近い構成比に変化することが明らかとなった。これらの結果は、HGF と IGF-1 が筋前駆細胞から分化した筋芽細胞増殖のモデュレーターであり、その後の MyHC 構成変化へ重要な影響を与えている可能性を示唆していると考えられた。

### 論文審査の要旨

胎生期マウス咬筋の発育過程における成長因子の発現と筋線維特性の変化の関係を検討した報告がなかった。マウス胎生期に咬筋が形成されていく時期には、筋組織が自己分泌可能な成長因子 HGF と IGF-1 が関与していることが考えられた。そこで本論文は、胎生後期のマウスを実験材料とし、形態観察、成長因子 HGF および IGF-1 の発現、さらにはミオシン重鎖の各 Isoform の中で最も収縮速度が遅く、遅筋に属する MyHC-1、そして速筋に所属する MyHC-2a、MyHC-2d、MyHC-2b の構成比の変化を転写レベルで調べたものである。その結果、胎生14、16、18日の全てにおいて HGF と IGF-1 の発現がみられ、筋線維特性は胎生18日で生後の筋線維特性に大きく近づくということが明らかとなった。特に他の Isoform へ変化することが可能なフレキシブルタイプの MyHC-2d が大きく増加していた。この Isoform は、これまでの報告で授乳運動に重要な役割を担う可能性が高く、出生前にマウス咬筋はすでにこの Isoform を獲得し、出生後の授乳運動に備えているということが明らかとなった。今回の研究結果は HGF と IGF-1 が筋芽細胞増殖、分化に重要な役割を担い、その後の MyHC 構成変化へ影響を与えている可能性を示唆するものであった。

本審査委員会では、1) 成長因子の中で HGF と IGF-1 を選んだ理由について、2) 今回の観察結果と考察の理論展開について、3) 胎生18日で MyHC-2d が大きく増加した理由など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。