

Title	Increased expression of decorin during the regeneration stage of mdx mouse
Author(s)	廣瀬, 大希
Journal	歯科学報, 111(6): 626-627
URL	http://hdl.handle.net/10130/2670
Right	

氏名(本籍)	ひろせだい き 廣瀬大希 (新潟県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1875号(乙第741号)
学位授与の日付	平成22年11月10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	Increased expression of decorin during the regeneration stage of mdx mouse
掲載雑誌名	Anatmical Science International 第84巻 305~311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、myostatinを制御するいくつかの因子に関する報告がなされるようになった。細胞外マトリックスの一種であるdecorinは、細胞骨格である。decorinはmyostatinと同時期に筋細胞で産生されるタンパク質で、胎児期・出生後においてmyostatinと同様の発現パターンを示すと報告された。その後、myostatinに結合することでmyostatinの活性を制御している可能性が報告された。しかし、筋再生時におけるDecorinとMyostatinの発現を調べた報告は少なく発現時期、局在など不明な点がある。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DecorinとMyostatinの発現を調べた。

2. 研究方法

観察材料は、生後2, 3, 4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を形態学的観察およびDecorin, Myostatin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-decorin(10μg/ml, R & D Systems AF1060)およびanti-myostatin(10μg/ml, CMN AB3239)を用いた。また右側のTAをDecorinおよびMyostatinの転写レベルでの検索に用いた。各ステージにおけるDecorinおよびMyostatin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た。すなわち今回観察を行った *mdx* マウス前脛骨筋では、筋壊死が広範囲に生じ再生が活発に行われていたと思われた。この再生過程における筋発育、分化制御因子である Decorin, myostatin の mRNA の発現を検索した結果、コントロールマウス2週齢および3週齢では Decorin および Myostatin の発現に差はみられなかった。しかし4週例になると *mdx* マウスが Decorin および Myostatin とともに優位に増加していた。今回の結果より、筋の壊死から再生過程で、多くの再生筋が成熟へ向かう4週例という時期に、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 Decorin は細胞外から Myostatin を制御し、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端が明らかとなった。

論文審査の要旨

mdx マウス筋再生時の decorin, myostatin 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 decorin, myostatin 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4週でコントロールに比べ decorin, myostatin は、優位に発現していた。また decorin は再生初期と思われる小さい細胞を取り囲むように発現していた。しかし myostatin は細胞質に限局して発現していた。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、decorin, myostatin などの筋発育、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動物について、2) 今回の観察結果と考察の理論展開について、3) サテライト細胞が組織切片上で特定可能か、4) decorin の局在と myostatin に対する作用機序、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作用メカニズムの解明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。