

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：32650
 研究種目：若手研究（研究活動スタート支援）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890259
 研究課題名（和文） 骨髄 SP 細胞の筋線維分化過程解明へ向けた基礎研究プロジェクト
 研究課題名（英文） Fundamental research project to elucidate the process in which bone marrow side population (SP) cells differentiate into muscle fibers
 研究代表者
 岩沼 治 （IWANUMA OSAMU）
 東京歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：80506866

研究成果の概要（和文）：

加齢に伴う退行性変化として筋機能低下はよく知られている。その筋機能再活性のメカニズムの一端を解明するため、筋組織外に存在し筋分化に影響する骨髄 SP 細胞を用いて、分化を誘導する特異的なタンパクを追った。骨髄 SP 細胞を低血清培地にて培養し、様々な組合せの成長因子を加え観察した。その結果、TGF- β 1 が分化初期の段階に、IGF-1 がその後の分化段階に影響しているという筋機能再活性のメカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

The decrease in myofunction is a well known degenerative change with age. To elucidate the mechanisms of myofunctional reactivation, we investigated specific proteins that promote the differentiation of bone marrow side population cells, which influence muscle development. Bone marrow side population cells were cultivated in low serum media, to which various combinations of growth factors were added. As factors involved in myofunctional reactivation, TGF- β 1 and IGF-1 influenced the early and subsequent stages of differentiation, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,750,000	525,000	2,275,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨髄 SP 細胞、筋線維、筋分化、FACS、成長因子、筋特異的転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う退行性変化として骨格筋萎縮、筋機能低下はよく知られている。定期的な筋力トレーニングを行っていないと 30 歳を超えると 10 年おきに約 3~5% の筋量が減少し、60 歳を超えるとさらに減少率は加速することが報告されている (Melton LJ, et al., J Am Geriatr Soc, 2000)。これは、筋タンパク質の合成と分解のアンバランスによる筋タンパク質の減少が結果として筋萎縮を引き起こしている。口腔領域においても咀嚼機能や嚥下機能の衰えは周囲筋肉の萎縮が原因の 1 つではないのかとの議論がある。

筋機能再活性のメカニズムには筋肥大を起こす機構が重要である。すなわち筋タンパク質の合成が分解を上回り、新たに筋収縮タンパクを合成し、力を発揮できる筋線維特性に変化することである。近年、筋機能再活性のメカニズムにおいて今までの考えが大きく変わろうとしている。これまでは、筋力トレーニングなどの負荷増大における筋増量は、筋細胞数の増加はほとんど無く、それぞれの筋線維内で筋タンパク質の合成が盛んになった結果、筋線維の太さが増し、筋機能の向上がみられると考えられてきた。しかし、この現象に加えて骨格筋の幹細胞であるサテライト細胞が新たに筋線維を合成し、既存する筋線維に融合することが報告された。また、骨髄幹細胞である骨髄 SP 細胞が筋再生に影響を与えていることが報告された (Ferrari G, et al., Science, 1998)。しかし、この骨髄 SP 細胞のみで培養を行っても筋形成は起こらない。このことから、骨髄 SP 細胞が筋形成を起こすには、筋からある特定の物質が必要であるが、詳細な報告はないのが現状であった。

2. 研究の目的

骨髄 SP 細胞が正常な筋線維へ分化していく過程の詳細な報告は少なく、また筋機能再活性に大きな役割を呈している可能性があり、筋組織内に存在しない細胞が筋線維へ分化するメカニズムを解明することができれば、筋機能再活性に重要な基礎的データになることが予想される。そこで筋機能再活性に関与するメカニズムの一端を解明するため、骨髄 SP 細胞を筋線維へ分化させる特異的なタンパクを同定することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 SP 細胞の分画・単離

試料となる骨髄由来の SP 細胞の分画・単離には、FACSaria セルソーターを用いて行う。FACS 解析処理の処理は Goodell らの方法 (Goodell MA, et al., J Exp Med, 1996) を参考に行った。9 週齢 GFP 遺伝子組換えマウス (C57BL/6-Tg) の大腿骨 (5 匹分) から骨髄細胞を取り出し、細胞数を 1.0×10^6 個/ml になるように濃度調整し、Hoechst33342 を適量添加し染色した。この Hoechst33342 は単一の色素でありながら 350 nm の UV レーザーで励起されると青と赤の二つの蛍光を発色するが、これを利用し FACS により細胞分画を行う。SP 細胞は ABC トランスポーターなどの膜トランスポーターが発達しており、非常に効率よく Hoechst33342 を排出し、細胞分画で染色性の悪い細胞集団として回収可能となる。

(2) 単離した骨髄 SP 細胞が筋線維へ分化するかの確認

単離した骨髄 SP 細胞が筋線維へ分化するのかを確かめるため、マウス骨格筋筋芽細胞 (C2C12) と共培養を行い確認した。共培養した結果より、骨髄 SP 細胞が融合したと思

われる GFP 陽性の筋管様細胞が確認された。また、筋線維へ分化しているのかを確かめるため筋転写調節因子の 1 つである MyoD にて免疫染色を行い、同じ GFP 陽性筋管様細胞が染色された。以上より得られた骨髄 SP 細胞が筋線維へ分化することが確認できた。

(3) 骨髄 SP 細胞を筋線維へ分化する因子の検索

骨髄 SP 細胞を単独で播種し、低血清培地の中に筋線維へ分化する際に必要と思われるタンパクを様々な組合せで添加し、骨髄 SP 細胞が筋線維へ分化するのかどうかを確かめた。その際、形態学的な変化を観察するため倒立顕微鏡による観察を、筋線維へ分化しているかを確認するために筋特異的タンパク質 (MyoD) が存在しているかどうかを確認するため免疫染色を行い確認した。また、遺伝子レベルにおいても筋線維へ分化しているか確認するため、得られた細胞から RNA を抽出するため QIAGEN 社製の RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。次に得られた total RNA を TOYOBO 社製の ReverTra Ace- α -を用いて逆転写を行い、cDNA を作製し LightCycler を用いて筋特異的タンパク質 (myosin, MyoD, myogenin) の mRNA の発現量を確認し、比較検討した。

4. 研究成果

今回の研究では、低血清培地に添加する筋肉の成長に影響があるといわれているタンパクとして、TGF- β 1、IGF-1、HGF の 3 つの成長因子に的を絞って、様々な組合せで添加し筋線維へ分化するか観察した。

(1) 形態学的観察と免疫染色の結果

TGF- β 1 を加えていないものは何も添加していないものと同様、変化はみられなかった。しかし、TGF- β 1 を加えたものにおいて骨髄 SP 細胞同士が融合した像が観察され、また

TGF- β 1 と IGF-1 を加えたものでは、SP 細胞同士が融合した像の数が多く確認することができた。また MyoD にて免疫染色を行うと融合した細胞が陽性を示した。

(2) 遺伝子レベルでの結果

TGF- β 1 を添加していないものは、何も添加していないものと同様に 3 つの物質 (myosin, MyoD, myogenin) について発現はわずかであった。しかし、TGF- β 1 を添加したものは TGF- β 1 を添加していないものと比較して、すべての物質において優位な発現が認められた。また、TGF- β 1 と IGF-1 を加えたものでは他の条件に比べて優位に多くの発現が認められた。これは、形態学的観察と免疫染色の結果とほぼ同様の結果を認められた。

また、TGF- β 1 と IGF-1 を時間差で添加して培養を行ったが、TGF- β 1 を先に添加して後に IGF-1 を加えた方が、IGF-1 を先に加えたものよりも若干ではあるが骨髄 SP 細胞が癒合したと思われる像が多く確認された。

以上の結果より、TGF- β 1 が骨髄 SP 細胞を筋線維へ分化する初期段階において必要な因子ではないのかと考えられた。また IGF-1 はその後の分化を誘導する因子として働くのではないのかと考えられた。

今回の研究により骨髄 SP 細胞の筋機能再活性の一端について明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Honda, H., Abe, S., Ishida, R., Watanabe, Y., Iwanuma, O., Sakiyama, K., Ide, Y. Expression of HGF and IGF-1 during regeneration of masseter muscle in mdx mice. *J Muscle Res Cell Motil* (査読あり) 31(1), 2010, 71-77.

- ② Abe, S., Soejima, M., Iwanuma, O., Saka, H., Matsunaga, S., Sakiyama, K., Ide, Y. Expression of myostatin and follistatin in Mdx mice, an animal model for muscular dystrophy. Zoolog Sci (査読あり) 26(5), 2009, 315-320.
- ③ Abe, S., Rhee, S., Iwanuma, O., Hiroki, E., Yanagisawa, N., Sakiyama, K., Ide, Y. Effect of mechanical stretching on expressions of muscle specific transcription factors MyoD, Myf-5, myogenin and MRF4 in proliferated myoblasts. Anat Histol Embryol (査読あり) 38(4), 2009, 305-310.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 岩沼 治、岸 飛鳥、菊地昭仁、阿部伸一、井出吉信、骨髄由来 SP 細胞の筋線維への分化について、第 115 回日本解剖学会全国学術集会、2009 年 3 月 28 日、盛岡市
- ② 岩沼 治、岸 飛鳥、菊地昭仁、阿部伸一、井出吉信、マウス骨髄由来間葉系幹細胞の筋線維への分化について、第 289 回東京歯科大学学会、平成 22 年 5 月 9 日、東京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩沼 治 (IWANUMA OSAMU)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80506866

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：