

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	植 村 一 貴
論文審査担当者	主 査 樋 口 京 一 副 査 菅 野 祐 幸 ・ 杠 俊 介
論文題目	Myostatin promotes tenogenic differentiation of C2C12 myoblast cells through Smad3 (Myostatin は Smad3 を介して筋芽細胞株 C2C12 の腱細胞分化を誘導する)
(論文の内容の要旨)	<p>【背景と目的】腱は細胞や血管が乏しい組織であるため、一度損傷されると修復が困難である。これまで損傷した腱を修復するために様々な研究が行われてきたが、多くの研究は生体力学的な研究が中心であり、骨や軟骨などの他の間葉系組織と比較すると分子生物学的なアプローチによる研究は少なかった。近年、腱の発生や分化に関連する転写因子や増殖因子が注目されるようになってきているが、いまだ腱細胞の分化メカニズムは明らかになっていない。そこで、腱細胞の分化メカニズムを明らかにするため、多分化能を持つマウス筋芽細胞株 (C2C12) を用いて腱細胞への分化を促進する増殖因子を同定し、さらに腱細胞への分化を誘導するシグナル伝達経路を明らかにすることを目的に研究を行った。</p> <p>【方法と結果】まず初めに C2C12 とマウス胚細胞由来線維芽細胞株 C3H10T1/2 における、腱前駆細胞のマーカー (Scleraxis) の発現量の比較を行った。その結果、C2C12 では Scleraxis の発現が約 8 倍多く、同細胞株は腱前駆細胞と同様の性質を持つと考えられた。次に腱細胞の分化を誘導する増殖因子のスクリーニングとして、C2C12 を無血清培地で培養し、腱細胞の分化を誘導することが予想される増殖因子 (GDF-5、GDF-6、GDF-7、GDF-8 (Myostatin)) を添加、培養 5 日目に real-time PCR による腱細胞特異的マーカー (Tenomodulin) と筋細胞特異的マーカー (Myogenin, MyoD)、脂肪細胞特異的マーカー (CEBP β、PPAR γ) の定量を行った。その結果、いずれの増殖因子も Tenomodulin の発現を増加させたが、Myostatin を添加した際の発現量が最も高かった。また Myostatin の添加により、筋細胞特異的マーカー MyoD の発現は抑制され、脂肪細胞特異的マーカーの発現は増加しなかった。そこで最も Tenomodulin の発現を促進した Myostatin について、用量・時間による Tenomodulin 発現の変化の定量と、Tenomodulin と Myogenin の免疫染色を行った。経時的観察では Myostatin 添加 5 日目で Tenomodulin の発現が最高値となり、また用量依存的に Tenomodulin の発現が増加することも確認された。免疫染色では無血清培地のみでの培養では筋管細胞の形成を認めたが、Myostatin の添加により Myogenin の発現は減少し筋管細胞の形成が抑制され、Tenomodulin の発現を認めた。</p> <p>さらに Myostatin による腱細胞分化の誘導に関与するシグナル伝達経路を明らかにするため、Myostatin と共にシグナル伝達経路の阻害剤を添加して各マーカーの定量を行った。その結果、Smad2/3 を介する伝達経路を阻害する ALK 阻害剤により Tenomodulin の発現が有意に抑制され、Smad2/3 を介する伝達経路の腱細胞分化への関与が示唆された。そこで C2C12 に同シグナルの伝達因子である Smad2、Smad3 の siRNA を導入して同様に各マーカーを定量したところ、Smad3 の siRNA 導入により、Myostatin の刺激の有無にかかわらず Tenomodulin の発現は抑制された。これらの結果から、Myostatin は Smad3 を伝達因子として筋芽細胞から腱細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。</p> <p>【考察】本研究結果から C2C12 は腱前駆細胞の性質を持ち、さらに Myostatin の刺激により、筋細胞への分化が抑制され、腱細胞への分化が誘導される事が確認された。また Myostatin は Smad3 を介するシグナル伝達経路を活性化することにより筋芽細胞から腱細胞への分化を誘導していることも明らかとなった。また本研究により確立された腱細胞培養系は、今後腱細胞分化や腱損傷修復の分子生物学的な研究をさらに進めていく上で有用であると考えられる。</p>