



博士 (人間科学) 学位論文 概要書

骨格筋の発生における
アクチビン/フォリスタチン系の役割に関する研究

2000年1月

早稲田大学大学院人間科学研究科

塩塚 政孝

指導教授 木村一郎

骨格筋の発生におけるアクチビン／フォリスタチン系の役割に関する研究

早稲田大学大学院人間科学研究科
指導教授

塩塚 政孝
木村 一郎

本研究は、骨格筋発生過程におけるアクチビン／フォリスタチン系、肝細胞成長因子のはたらきについて、発生プログラムの進行という時間的視点と、“個”の統一性の中における筋細胞についての空間的な視点から、培養系を用いて形態学的・生化学的・分子生物学的・免疫組織化学的手法により解析、検討したものである。また、これらの解析に先立ち、初代培養骨格筋筋原細胞の増殖と分化に対する液性因子の作用を明確に調べるために必須と考えられる無血清培養系の確立と、筋発生の初期段階を観察するために必須と考えられる体筋組織の培養系の確立をも意図としたものである。

① 初代培養筋原細胞の増殖と分化のための無血清培養液の開発

1963年にKonigsbergが *in vitro* でニワトリ胚筋芽細胞を筋管細胞に分化させることに成功して以来、骨格筋筋原細胞の培養系は筋発生の研究のみならず、最も有用な細胞分化の制御のモデル研究系としても用いられてきた。しかしながら、従来の細胞培養法で一般に用いられてきた培養液は、血清や各種組織抽出液の添加が必須であったため、多くの問題点を抱えている。この問題点を克服するため、完全に既知の成分のみから構成される無血清培養液の開発を試みた。本研究で確立した、完全に既知の生理的な物質から構成された無血清培養液、DTIBF (DMEMを基本培養液とし、30 μ g/ml Transferrin, 10 μ g/ml Insulin, 1mg/ml BSA, 10ng/ml FGF-2を添加したものは、従来の血清含有培養液に匹敵するニワトリ初代筋原細胞の増殖と分化を実現した。その有用性はこれまでに報告されている無血清培養系のどれよりも高いものと考えられ、夾雑する線維芽細胞の増殖を抑え、テスト物質の影響を鋭敏に評価もできる。この培養系は培養筋細胞を用いる研究者にとってきわめて有用なツールとなり、今後の筋発生における細胞成長因子等の液性因子による制御機構の解明、筋発生の基礎研究に大きく貢献するものとなることは疑いないと思われる。

② 筋原細胞の発生と分化に対するアクチビンAの作用

細胞増殖・分化因子としてさまざまな生命現象の場で多彩な役割を演じており、強力な中胚葉誘導活性をもつことで関心を集めているアクチビンについて、その筋発生に対する作用を検討した。その結果、

濃度依存的に筋分化とMyoD1の発現を抑制すること、その抑制作用はフォリスタチンによって中和され、従来TGF- β で報告されているのと同様に筋分化のコミットメントの過程で起こること等が明らかとなった。中胚葉性の細胞の一つである筋原細胞に対するアクチビンAの作用を解析したのは、本研究が初めてである。

③ 培養筋原細胞における発生段階依存的なアクチビンAの作用

発生過程における同一細胞系譜上で、アクチビンの多岐にわたる生理作用はいかに変動していくのか、また、アクチビンAの筋分化抑制作用に対する筋原細胞の感受性は発生段階に依存してどのように変化していくのか、という点に焦点をおき、発生段階の異なる筋原細胞のアクチビンAに対する応答性の相違・変動を解析した。その結果、アクチビンAに対する感受性は発生初期において高く、発生が進行するにつれて低下することが明らかになった。これは、アクチビンAが筋発生を制御する因子のひとつとして筋発生過程の円滑な進行の鍵となる可能性を強く示唆している。

④ 筋原細胞の発生と分化に対するフォリスタチンの作用

アクチビン結合タンパク質であり、その活性調節因子として注目されるフォリスタチンについて、その筋発生に対する作用を検討した。その結果、濃度依存的に筋分化を促進すること、この促進作用は筋管細胞の成長の段階で起こること、筋細胞系譜のより初期の細胞ほど顕著にみられること、筋原細胞に存在するフォリスタチン様因子SPARCも同様の作用があること、そしてアクチビンAは筋原細胞に存在すること等が明らかになった。アクチビン/フォリスタチンが筋発生の重要な調節因子である可能性が本研究により、初めて示唆された。

⑤ 筋原細胞の発生と分化に対する肝細胞成長因子の作用

上皮-間葉相互作用において形態形成因子とされ、骨格筋発生への関与が強く示唆されている肝細胞成長因子/分散因子(HGF/SF)の作用について、筋発生の特に初期段階に注目し、ニワトリ3.5日胚体筋組織を用いて検討した。その結果、HGF/SFは筋発生初期段階においては運動性を促進するモートゲンとしてはたらく、体節組織から遊走する筋原細胞の分散の促進を引き起こすことを確認した。本研究は、この様相を*in vitro*において初めて示したものである。(1946字)