

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	玄 太裕
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 堀田 正人 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 江尻 貞一 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 田沼 順一 (外部審査) 武庫川女子大学院健康スポーツ科学研究科 教授 山添 光芳
論文題目	
低出力パルス超音波はマウス筋芽細胞の分化を促進する	
論文内容の要旨	
<p>【目的】</p> <p>低出力パルス超音波 (low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS) は組織再生を促進すると考えられ、広く臨床で応用されている。口腔内には様々な組織があり、それぞれの細胞に対して LIPUS がどのような影響を与えるのかは、詳細に報告されていない。そこで、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 が筋分化する過程における LIPUS の作用に着目した。本実験では LIPUS を照射し分化誘導 2・3・5・7 日後の遺伝子とマイクロ RNA (miRNA) の発現をリアルタイム PCR 法を用いて定量し、LIPUS 照射が筋線維へ分化中の C2C12 細胞の遺伝子と miRNA 発現パターンにどのような影響を与えるか検討した。</p> <p>【材料および方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 細胞培養と LIPUS の照射 12 穴プレートに 2.8×10^4 cells/cm² の細胞密度で C2C12 細胞を播種し、翌日、分化誘導培地に交換した。分化誘導 17 時間後に骨折治療装置 (BR Sonic Pro, 伊藤超短波) を用いて LIPUS を照射した (3MHz, 70mW/cm², 15 分間)。照射群, 非照射群ともに分化誘導 18・20・23・28 時間後, 2・3・5・7 日後にトータル RNA を採取した。 2. 免疫染色と von Kossa 染色 分化誘導 4 日後に C2C12 細胞の免疫染色を行った。一次抗体には抗ヒトミオシン重鎖モノクローナル抗体 (抗 MHC 抗体), 二次抗体には Alexa Fluor 488 標識 Anti-mouse IgG を用いた。DAPI 含有蛍光退色防止剤で封入し, 蛍光顕微鏡で観察した。また, 分化誘導 7 日後の C2C12 細胞に von Kossa 染色を行い, 観察した。 3. mRNA の定量解析 抽出したトータル RNA から cDNA を合成した。遺伝子の転写量を定量的に解析するためにリアルタイム PCR を実施した。得られた値は, 比較 C_T 法により相対定量した。結果は標的遺伝子発現を β-actin 発現量で正規化し, さらに標準サンプル (増殖培地で対数増殖している C2C12 細胞) との比率として示した。 4. miRNA の定量解析 トータル RNA から一本鎖 cDNA を合成し, リアルタイム PCR を実施した。リアルタイム PCR によって得られた値は, 比較 C_T 法により相対定量した。結果は標的遺伝子発現を U6 snRNA 発現量で正規化し, さらに標準サンプルとの比率として示した。 	

【結果】

1. C2C12 細胞の免疫染色および von Kossa 染色の顕微鏡観察の結果から LIPUS 照射により非照射群に比べて MHC 陽性細胞が多数確認でき、陽性細胞の長径も有意に長かった。また、C2C12 細胞にカルシウム沈着による von Kossa 染色陽性反応は確認できなかった。
2. mRNA 解析から、ERK5 の転写量は LIPUS 照射によりピークを迎える分化誘導 23 時間後の発現量が 1.7 倍、分化誘導 7 日後に 3 倍程度増強された。Klf2 は分化誘導 23 時間後に 1.7 倍増強された。Cdh15 は分化誘導 23 時間後に 1.8 倍程度、分化誘導 7 日後にも 2 倍程度増強されていた。MyoD は分化誘導 23 時間後に 2.4 倍程度、分化誘導 3 日後から 5 日後にも増強された。Myogenin は分化誘導 3 日後から 7 日後に最大 3.5 倍増強された。MCK は分化誘導 28 時間後のより早い時期から最大 2 倍程度の増加が認められた。
3. miRNA の定量解析から miRNA-499 は LIPUS 照射により分化誘導 7 日後に約 1.7 倍増強されたが miRNA-1b, miRNA-27a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-133a, miRNA-135b, miRNA-206, miRNA-208b, miRNA-486a については LIPUS 照射による影響を認めなかった。

【考察】

筋芽細胞が筋に分化するためには細胞が融合して線維状の多核細胞を形成し、筋特異的な遺伝子の発現が必要である。LIPUS 照射による筋分化促進作用がどの段階を促進するか知るために、これらに関連する遺伝子発現量を解析した。細胞融合に関するシグナル促進因子の ERK5、転写活性因子の Klf2、これらの下流因子として細胞接着因子 Cdh15 と筋特異的な遺伝子の転写活性因子として MyoD、Myogenin、分化最終段階で発現される遺伝子の MCK を選んだ。解析した結果、各々の遺伝子発現が盛んなタイムポイントとほぼ一致して、細胞融合に関する各シグナル促進因子、筋特異的な遺伝子ともに LIPUS 照射により発現が促進していた。また、筋肉中のクレアチンからクレアチンリン酸を作る酵素で、筋肉が本来の働きをするために必要な MCK も LIPUS 照射により分化段階の早期に発現促進が見られ、筋として機能する細胞がより早く完成していることが示唆された。C2C12 細胞は速筋と遅筋の両方に分化すると考えられる。miRNA-499 は筋細胞の速筋への分化を抑制することで遅筋への分化を促進する。LIPUS 照射により miRNA-499 の発現が促進されたことから遅筋の割合が多くなる可能性が示唆された。

【結論】

LIPUS 照射の C2C12 細胞に与える影響について検討した結果、LIPUS 照射により C2C12 細胞の筋細胞への分化が促進され、骨細胞に分化することはなかった。ERK5-Klf2-Cdh15 の経路を介して筋分化過程における細胞融合を促進し、MyoD、Myogenin 等の転写活性因子を介して筋特異的なタンパク質の発現を促進していた。また、MCK の転写促進が分化段階の早期に認められたことから、筋細胞がより早く完成することが示唆された。さらに miRNA-499 の発現増強から筋細胞の遅筋への分化が促進されていることが示唆された。

