

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏名(本籍) 青山佳代子(神奈川県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第414号
学位授与年月日 平成26年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Bone morphogenetic protein-2 functions as a negative regulator in the differentiation of myoblasts, but not as an inducer for the formations of cartilage and bone in mouse embryonic tongue
(BMP-2は、マウス胎仔の舌において軟骨・骨形成への誘導因子としてではなく、筋芽細胞分化の負の調節因子として機能する)
BMC Developmental Biology Vol.11-44 平成23年7月7日発行
論文審査委員 主査 教授 下田信治
副査 教授 山根 明 副査 教授 中村芳樹

内容の要旨

【緒言】

骨誘導因子 (bone morphogenetic protein: BMP) は、トランスフォーミング増殖因子βファミリーに属し、異所性に骨を誘導する因子として発見され、現在では骨格筋の発生を含む多くの生物学的機能の調節に重要な役割を果たしていることが知られている。BMPは、骨格筋発生の過程において、体節での筋前駆細胞の発生に重要な役割を果たしていることが報告されているが、それ以外の発生過程でのBMPの機能は知られていない。しかし、すでにBMPおよびその受容体が最終分化過程(筋管形成)にある舌筋細胞に発現していることは報告されている。また、インスリン様増殖因子(IGF)が舌筋細胞の分化を促進し、肝細胞増殖因子(HGF)が舌筋細胞の分化を抑制するなどいくつかの増殖因子が舌筋細胞の分化を調節していることもすでに報告されている。これらの結果から、BMPが舌筋細胞の最終分化過程に何らかの役割を果たしていることが考えられる。本研究の目的は、器官培養システムを使用することによってマウス胎仔の舌の最終分化過程においてBMP-2の機能を明らかにすることである。

【材料および方法】

器官培養

胎齢13日のマウス胎仔より舌を摘出し、フィルターの上へのせ、無血清化学合成培養液(BGJb)中で8日間培養した。BMP-2の機能を促進するため培養液中に4 μ g/mlのrecombinant BMP-2(reBMP-2)またはVehicleを添加した。また、BMP-2の機能を抑制するため25nMのBMP-2 small interfering RNA (siRNA)またはNon target control (NTC)を培養液に添加した。

mRNA・蛋白質発現解析

Real time PCR 法により筋分化マーカーである MyoD、Myogenin、MCK (muscle creatine kinase)、筋抑制因子である inhibitor of DNA binding/differentiation 1 (Id1)、また軟骨、骨分化マーカーである Runx2、Osteocalcin、ALP (alkaline phosphatase)、Collagen II、Collagen X、細胞増殖マーカーである Cyclin D1、CDK4 (cyclin dependent kinase)、ハウスキーピング遺伝子である GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) の mRNA の発現解析を行った。また Western blotting 法により筋分化マーカーである Myogenin、fast myosin heavy chain (fMyHC)、ハウスキーピング遺伝子である β III-tubulin の蛋白質の発現解析を行った。

組織学的解析

8日間の培養後、舌中央部付近の矢状断面の凍結切片を作成し、BMP-2、筋分化マーカーである Myogenin、fMyHC の免疫染色を行った。また、石灰化硬組織の検出のため Alizarin red 染色、軟骨組織の検出のため Alcian blue 染色を行った。

【結果】

8日間培養した胎齢 13 日の舌の形態、サイズに Vehicle 群と reBMP-2 群の間で顕著な差異は認められなかった。reBMP-2 群における GAPDH、Cyclin D1、CDK4 の mRNA 発現量は Vehicle 群と統計学的に有意差は認められなかった。reBMP-2 群における骨格筋の最終分化のマーカーである Myogenin と MCK の mRNA 発現量は、Vehicle 群と比較すると統計学的に有意な減少が認められた ($p<0.01$)。しかし、reBMP-2 処理は軟骨、骨の分化マーカーの mRNA 発現量には影響を与えなかった。また、軟骨、骨の分化マーカーと比較して筋分化マーカーの mRNA 発現量は顕著に高かった。reBMP-2 群における Myogenin、fMyHC の陽性細胞および蛋白質発現量はいずれも Vehicle 群と比較して reBMP-2 群の方が減少していた。Alizarin red 陽性細胞は Vehicle 群、reBMP-2 群の舌においてともに観察されなかった。また、きわめて染色性の弱い Alcian blue 陽性細胞が Vehicle 群、reBMP-2 群ともわずかに観察されたが 2 群の間に大きな差は無かった。

BMP-2 siRNA 群における BMP-2 mRNA 発現量は、NTC 群と比較して統計学的に有意に減少したが ($p<0.05$)、BMP-4 mRNA 発現量には変化はなかった。また、NTC 群と比較して BMP-2 siRNA 群は BMP-2 陽性細胞および蛋白質発現量は減少していた。しかし NTC 群と BMP-2 siRNA 群の間で舌の形態、サイズ、GAPDH、Cyclin D1、CDK4 の mRNA 発現量に有意な差は認められなかった。BMP-2 siRNA 群においては骨格筋の分化のマーカーである Myogenin と MCK の mRNA 発現量は NTC 群と比較して統計学的に有意に増加していた ($p<0.01$)。しかし、軟骨、骨の分化マーカーの mRNA 発現で両群の間に有意な差は認められなかった。また、軟骨、骨の分化マーカーと比較して筋分化マーカーの mRNA 発現量は顕著に高かった。BMP-2 siRNA 群では Myogenin、fMyHC 陽性細胞および蛋白質発現量が NTC 群と比較して増加していた。

筋分化の抑制因子である Id1 の mRNA 発現量は Vehicle 群と reBMP-2 群の間で、NTC 群と BMP-2 siRNA 群の間で統計学的に有意な変化は認められなかった。

【考察】

本研究において、recombinant BMP-2 は骨格筋細胞分化のマーカーの発現を抑制したが、BMP-2 siRNA はそれらを促進した。また、軟骨と骨の形成は reBMP-2 群で観察されず、Runx2、Osteocalcin、ALP のような骨形成マーカーの転写レベルは Myogenin、MCK その他の筋形成マーカーより顕著に低かった。これらのデータは、BMP-2 は舌筋細胞の最終分化過程において、負の制

御因子として機能しており、骨形成の誘導因子として機能していないことが示唆された。このような、筋形成に関する遺伝子の活性と、骨形成に関するサイレンシングはエピジェネティックな制御に関連があるかもしれない。この点を明らかにするためには更なる研究が必要である。

【結論】

BMP-2 は舌筋細胞の最終分化過程において、負の制御因子として機能しており、骨形成の誘導因子として機能していないことが考えられた。