

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)	阿保 徳寿 (神奈川県)
博士の専攻分野	博士 (歯学)
学 位 記 番 号	甲 第 415 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	IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a β_2 -adrenergic agonist. (インスリン様増殖因子とマイオスタチンの伝達経路はクレンプテロール、 β_2 アゴニスト、による骨格筋の肥大の初期および後期でそれぞれ誘導される) Cell Biochemistry and Function、第 30 巻、第 8 号、671 頁～676 頁掲載 平成 24 年 6 月 14 日発行
論 文 審 査 委 員	主査 教授 奥村 敏 副査 教授 山根 明 副査 教授 濱田良樹

内 容 の 要 旨

【序論】

β_2 アゴニストであるクレンプテロールはヒラメ筋、腓腹筋、長指伸筋、咬筋など骨格筋の肥大を引き起こすことはよく知られているが、クレンプテロールによって引き起こされる肥大の詳細なメカニズムは明らかになっていない。しかしながら、インスリン様増殖因子 (IGF) がクレンプテロールによる骨格筋の肥大において促進因子として機能していることが報告されている。

TGF β スーパーファミリーのメンバーであるマイオスタチンは筋成長の抑制因子であり、マイオスタチン欠損マウスの筋繊維は顕著な肥大を示す。最近、トランスフォーミング増殖因子 β (TGF β)、肝細胞増殖因子、繊維芽増殖因子などの増殖因子ネットワークがクレンプテロールによるラット咬筋肥大の誘発に関連していることが示唆されており、マイオスタチンも咬筋の肥大の誘発への関与の可能性が考えられる。

咬筋は体幹や四肢の筋とは異なる特徴を持っている。また、ラットにおける、クレンプテロールの骨格筋肥大作用は体肢の筋や心筋よりも咬筋の方が大きいことが報告されている。よって、ラット咬筋はクレンプテロールによる骨格筋の肥大の調節機序研究のための興味深いモデル系であると思われる。

本研究においては、クレンプテロールの咬筋の肥大調節機序において、マイオスタチンが抑制因子として、IGF が促進因子として機能しているという仮説を検証するため、マイオスタチンの発現量、IGF やマイオスタチンのシグナル伝達経路について調べた。

【方法】

雄性ウイスター系ラット 8～9 週齢に 3、7、14、21 日間 30 μ g/ml のクレンプテロールを経口投与し、コントロール群には純水を投与した。投与終了後、すべてのラットはエーテル麻酔下で放血致死させ、咬筋を摘出し、その重量を測定した。ウェスタンブロッティング解析用の筋標本は液体窒素を用いて急速に凍結し、使用まで -80°C にて保存した。組織学的解析用の咬筋標本は 4%パラホルムアルデヒド中で固定した。

咬筋標本から 2% SDS 溶液を用いて蛋白質を抽出、SDS-PAGE 法により分離後、ウェスタンブロッティング法を用いて Myostatin、ActRII、TGF β RI、TGF β 1～3、Activin A の発現量、smad2/3、IGFR、akt のリン酸化レベルを解析した。 β III チュブリンをローディングコントロールとして使用した。

ラット右咬筋のほぼ中央部付近で厚さ 10 μ の凍結切片を製作し、マイオスタチン、ACTR II B に対する抗体を用いて免疫染色を行った。一次抗体を正常 IgG や PBS に置き換えて染色操作を行い、非特異的な染色がないことを確認した。NADH-TR 染色により筋繊維タイプ II A/X と II B を可視化し、筋繊維最小直径を測定した。NADH-TR 染色では、タイプ II A/X 繊維は II B 繊維よりも濃染するため、染め分けることができる。1 匹のラットの 50 本の繊維の最小直径を計測し、その平均値をそのラットの代表値として用いた。1 群に 5 匹のラットを用いた。

統計学的解析には Tukey の方法および Mann-Whitney の方法を用いた。

【結果】

ラットの体重はコントロール群、クレンプテロール群の両群で徐々に上昇したが、実験期間を通して両群の間に有意差は無かった。しかし、咬筋重量は投与開始 3 日目から 21 日目においてコントロール群と比較してクレンプテロール群は 28%～46% ($p<0.01$) 大きかった。クレンプテロール群の咬筋は投与開始 3 日目から 14 日目までの間で 32% ($p<0.01$) 増加したが、14 日目から 21 日目の間では増加しなかった。14 日目から 21 日目の間に筋繊維の肥大が停止したことを確認するため、タイプ II A/X と II B の筋繊維の最小直径を測定した。クレンプテロール群のタイプ II A/X と II B 繊維の最小直径は両者とも 14 日目と 21 日目の間で統計学的に有意な差は無かった。以上の結果から、クレンプテロール投与は 14 日目までラット咬筋の肥大を引き起こすが、14 日目以降は肥大が停止することが示された。

マイオスタチンの発現レベルおよびマイオスタチンのシグナル伝達因子である smad2/3 のリン酸化レベルを調べた。投与 14 日目までにコントロール群と比較して、クレンプテロール群のマイオスタチン発現レベルの上昇は認めなかったが、21 日目に 122% ($p<0.05$) 増加した。smad2/3 のリン酸化レベルもマイオスタチンの発現レベルと同様に投与 21 日目で 93% ($p<0.05$) 増加した。クレンプテロール投与がマイオスタチンの受容体である ActRII、TGF β RI の発現レベルや分布、またはマイオスタチンと受容体を共有する TGF β 1、2、3、Activin A の発現レベルを増加させることにより smad2/3 のリン酸化レベルを増加させる可能性も考えられるので、これらの発現レベルおよび分布について調べた。21 日目で ActRII、TGF β RI の発現レベルや分布または TGF β 1、2、3、Activin A の発現レベルにクレンプテロール群とコントロール群の間で顕著な違いは認められなかった。以上の結果から、クレンプテロール投与が投与開始 14 日～21 日の間でマイオスタチンの発現レベルの増加を引き起こし、その増加がシグナル伝達経路を活性化 (smad2/3 のリン酸化レベルの上昇) したことが示唆された。

IGF のシグナル伝達経路を構成するインスリン様増殖因子受容体 (IGFR1) や akt1 のリン酸化レベルを調べた。投与開始 3、7 日目において、IGFR1 のリン酸化レベルはコントロール群に比べ、クレンプテロール群がそれぞれ 71% ($p<0.01$)、25% 増加していた。akt1 のリン酸化レベルはコントロール群に比べ、クレンプテロール群はそれぞれ 216% ($p<0.01$)、113% ($p<0.05$) 増加していた。これらの結果から、クレンプテロール投与が投与開始から 7 日目の間で IGF のシグナル伝達経路を活性化したことが示唆された。

【考察】

本研究において、クレンプテロール投与開始から 14 日目までラット咬筋が肥大し、その後、肥大は停止した。クレンプテロール投与開始 21 日目において、マイオスタチン発現量が増加し、シグナル伝達が活性化されていた。一方、ActRII、TGF β RI の発現レベルや分布または TGF β 1、2、3、Activin A の発現レベルに顕著な差は認められなかった。また、マイオスタチン欠損マウスは骨格筋の肥大を誘発し、過剰発現マウスは骨格筋の萎縮を誘発するということが報告されている。以上より、クレンプテロール投与開始 14 日～21 日目における咬筋の肥大停止にマイオスタチンが機能していると考えられる。また、様々な骨格筋の肥大において、IGF の発現レベルが増加していることが報告されている。本研究で、IGF のシグナル伝達経路は投与開始 3～7 日目で活性化されており、この活性化がクレンプテロールによる咬筋の肥大に機能していると考えられる。

【結論】

クレンプテロール投与初期の咬筋の肥大には IGF が、後期の肥大の停止にはマイオスタチンが機能していることが示唆された。このマイオスタチンによる咬筋肥大の停止は、過剰な筋肥大から筋繊維を保護する働きをしているものと思われる。