

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)	幕 内 俊 介 (静岡県)
博士の専攻分野	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	甲 第 426 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 31 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	Function of miR-1 in the Differentiation of Mouse Tongue Striated Muscle Cell (マウスの舌横紋筋細胞分化における miR-1 の機能) 鶴見歯学 impress
論 文 審 査 委 員	主査 教授 里村一人 副査 教授 山根 明 副査 教授 大久保力廣

内 容 の 要 旨

【序論】

microRNA(miRNA, miR)は 20 から 25 塩基の一本鎖 RNA であり、遺伝子の発現を調節する機能を有する non-coding RNA の一種である。miRNA は様々な組織, 器官の発生調節に関与していることが報告されており、骨格筋の発生調節には miR-1、24、133、181、206、208 などが関与していることがすでに知られている。

骨格筋発生研究のための代表的なモデル系である C2C12 培養筋芽細胞系を用いて、骨格筋の発生調節には miR-1 が重要な働きをしていることが明らかにされている。すなわち C2C12 においては分化の進行にともなって miR-1 の発現が増加し、ヒストン脱アセチル化酵素 4 (Histone deacetylase 4, HDAC4) の抑制を介して筋分化関連遺伝子の発現を調節している Myocyte enhancer factor-2 (MEF2)を活性化することにより、分化を促進することが知られている。

舌は呼吸、嚥下、咀嚼など生物学的、発声など文化的に必須な活動において重要な働きをしている。また、舌は体幹や四肢の骨格筋と異なる特徴を持っている。例えば、舌筋は三次元的に運動することができる。体肢の骨格筋では成体になってから発現するミオシン重鎖が胎生時に発現している。筋形成やシナプス形成が体肢の骨格筋と比較して早く、出生時にはほぼ終了している。

しかし、舌筋の分化調節に関する研究は少なく、舌筋分化過程における miR の機能は明らかになっていない。また、上記のように舌筋は体幹や四肢の骨格筋とは異なる性質を持っているので、その発生機序も異なる調節がなされている可能性があり、miR-1 の機能も違っている可能性がある。本研究の目的はマウス胎仔の舌筋細胞分化における miR-1 の機能を明らかにし、体肢の骨格筋と比較することである。

【材料と方法】

胎齢 15 日マウス胎仔より摘出した舌に発現している miR をジェノパール microRNA チップ® (クラボウ) により網羅的に解析した。舌から miR を精製し、ループ型 RT プライマーを用いて逆転写を行い、cDNA を調整した。この cDNA を鋳型としてタックマンプロブを用いる Real-time PCR 法を行い、胎齢 11~15 日のマウス胎仔の舌における成熟 miR-1、24、133、199a-3P、199a-5P の発現量を測定した。胎齢 12~15 日のマウス胎仔の舌における miR-1 の局在性を *In situ* hybridization 法にて解析した。筋繊維の同定にはミオシン重鎖の免疫染色法を用いた。胎齢 11、13、15 日のマウス胎仔の舌における HDAC4、MEF2、My5、MyoD、Myogenin、muscle creatine kinase

(MCK)の発現を Western blotting 法により解析した。

胎齢 12 日のマウス胎仔から舌を摘出し、無血清化学合成培養液にて 2 日と 4 日間培養した。培養液に miR-1 の成熟を抑制するアンチセンスもしくはコントロールオリゴヌクレオチドを最終濃度が $5\mu\text{M}$ になるように添加した。導入試薬としてはエンドポーターを用いた。培養終了後、*In vivo* における実験で用いたのと同じ Real-time PCR 法を用いて miR-1 の発現量を解析することによりアンチセンスの効果を確認した。そして、Real-time PCR 法を用いて Myf5、MyoD、Myogenin、MCK、Western blotting 法を用いて HDAC4 の発現を解析し、アンチセンスによる miR-1 の成熟抑制が、舌筋細胞の分化に及ぼした影響を明らかにした。

【結果】

miR の網羅的解析では筋細胞の分化が急速に進行している胎齢 15 日のマウス胎仔の舌において miR-1、24、133a、199a-3p、199a-5p の高発現が認められた。網羅的解析による結果を確認するために Real-time PCR 法により miR-1、24、133a、199a-3p、199a-5p の発現解析を行った。miR-1、24 は胎齢 11 から 15 日にかけて舌筋細胞の分化が進行するにつれて発現量が増加した。miR-133a、199a-3p、199a-5p は分化が進行するにつれ発現量が減少した。*In situ hybridization* 法により miR-1 の発現が筋繊維に観察された。Western blotting 法による解析の結果、舌筋細胞の分化が進行しても HDAC4 の発現に顕著な差は認められなかった。これに対して、MEF2 は胎齢 11 より発現しており胎齢 15 日に顕著に増加した。Myf5 は胎齢 11 日に発現が認められ、胎齢 15 日で発現量が減少した。MyoD、Myogenin は舌筋細胞の分化の進行と共に発現量が増加した。MCK は胎齢 11、13 日では発現せず 15 日で発現が認められた。

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる miR-1 の抑制実験の結果では コントロール群は 2 日から 4 日にかけて miR-1 の発現量が増加したが、アンチセンス群では miR-1 の増加は抑制された。コントロール群とアンチセンス群の間で舌の形態に顕著な差は認められなかった。Real-time PCR 法による解析の結果から Myogenin、MCK ではアンチセンス群でもコントロール群と同様に培養 2 日から 4 日にかけて発現量が増加した。Myf5、MyoD ではコントロール群とアンチセンス群の間に顕著な差は観察されなかった。Western blotting 法による解析の結果、コントロール群とアンチセンス群の間で HDAC4 の発現に顕著な差は認められなかった。

【考察】

今回の *in vivo* の実験において舌筋細胞の分化の進行に伴って miR-1、MEF2 の発現量は増加したにもかかわらず、HDAC4 の発現量に顕著な差は認められなかった。この結果は舌では HDAC4 を介さない経路で MEF2 の発現が促進されている可能性を示唆している。

また、器官培養法を用いた実験において、アンチセンスにより miR-1 は抑制されたが、HDAC4 の発現には変化なく、また、Myogenin、MCK の発現は抑制されていなかった。この結果は miR-1 が抑制された舌においては他の miR が補償的に作用している可能性を示唆している。

【結論】

舌筋細胞の分化における miR-1 の機能は C2C12 など骨格筋細胞とは異なっている可能性が示唆された。