

氏名(本籍)	中田和人(栃木県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第2,019号		
学位授与年月日	平成11年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Histochemical Studies on Fiber-Type Differentiation of Skeletal Muscles (骨格筋の繊維型分化に関する組織化学的研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄
副査	筑波大学教授	理学博士	小熊讓
副査	筑波大学教授	理学博士	堀輝三
副査	筑波大学教授	理学博士	牧岡俊樹

論文の内容の要旨

骨格筋細胞は細胞分化における「決定」と「特異的形質発現」の機構を解明するための典型として最も研究されてきた材料である。筋分化の決定を受けた筋細胞が将来、速筋になるか遅筋になるかといった「繊維型特異的形質発現機構」については、複雑な因果関係のために解明が困難であった。本研究ではこの繊維型特異的形質発現機構を明らかにすることを目的として、筋組織特異的アイソフォームを持つトロポニンT(TnT)をマーカーとして以下の解析を行った。

1) 速筋・遅筋キメラ筋繊維を用いた単一筋繊維内の形質発現の異質性と筋核間相互作用

筋繊維型(fiber-type)は、広義に、速筋型と遅筋型の2つに分類され、速筋繊維では速筋型アイソフォーム、遅筋繊維では遅筋型アイソフォームをそれぞれ発現している。しかしながら、筋繊維は筋分化の決定を受けた筋芽細胞が融合する事によって形成されるため、形質発現制御の異なる複数の核を持つ多核細胞体が存在するのではないかと推定される。この事を明らかにするため、ニワトリの混合筋(速筋繊維と遅筋繊維からなる筋組織)を調べあげたところ、背中の筋肉、菱形筋(rhomboides)からTnTアイソフォームの発現において速筋・遅筋キメラ筋繊維を見出す事ができた。このキメラ筋繊維はその全長に渡って速筋型アイソフォームを発現しているが、遅筋型アイソフォームの発現は繊維の一部でのみ観察された。また孵化直後の菱形筋を詳細に調べたところ、前述のような典型的なキメラ筋繊維の他に、特定の筋核の周囲の細胞質でのみ遅筋型アイソフォームを発現している筋繊維を見出す事ができた。これらの結果は、速筋型、遅筋型TnTを発現する2種の筋核が1つの細胞質を共有している直接的な証拠であり、このような状態にあってもそれぞれの筋核はその固有の制御に従った形質を安定的に発現できる事を示している。

2) 漿尿膜上培養法を用いたニワトリ筋細胞系列の解析

筋細胞には、筋発生に関わる筋芽細胞と、筋再生や筋成熟に関わる衛星細胞の2種が知られている。この解析ではニワトリ大胸筋に含まれる筋芽細胞と衛星細胞のTnTアイソフォームの発現の違いを明らかにするとともに、筋再生モデルを用いて細胞系列によって決定された速筋型TnTアイソフォームの発現を検証し、「ニワトリ骨格筋の漿尿膜上培養法」を確立して、以下のような結果を得た。

18日胚以降のニワトリ大胸筋をニワトリ胚の漿尿膜上に移植すると、筋繊維は一度変性し、その後、生き残った衛星細胞が新たに筋繊維を再生した。この再生筋繊維は、再生過程の初期から速筋型TnTのみを発現していた。ところが、筋発生過程にある10日胚の大胸筋は漿尿膜上に移植しても変性する事なくそのまま発生を続けた。一

方、14日胚のそれは一度変性し、その後、生き残った筋芽細胞から新たに筋繊維が分化した。しかし、10、14日胚の大胸筋は培養中に速筋型の他に遅筋型のTnTアイソフォームの発現を伴う時期があった。さらに正常発生中のニワトリ大胸筋のTnTアイソフォームの発現を調べたところ、速筋型から速筋+遅筋型を経て速筋型へと発現遷移していた。従って大胸筋の筋発生における遅筋型TnTアイソフォーム発現のON、OFFは筋芽細胞に内在的にプログラムされていると判断された。

3) ニワトリ骨格筋組織の砂囊漿膜下培養法の確立

前述の漿尿膜上培養法は培養期間が限定されてしまう欠点があった。そこで、培養期間が限定されないニワトリ骨格筋の砂囊漿尿膜上培養法を確立した。この培養法では、1) 衛星細胞の筋分化過程の解析が可能である。2) 外来の骨格筋細胞の混入がない。3) 運動神経からの影響がない。4) 生体循環系の一部として移植筋片を培養する事が可能である。5) 長時間の培養が可能である等の利点があった。このような利点から、骨格筋の砂囊漿尿膜下培養法は筋細胞系列によって決定されている形質発現の検証に最も適した培養法であるといえる。胚時期の骨格筋組織の砂囊漿尿膜下培養法を確立し、筋芽細胞、衛星細胞の細胞系列によって決定されたTnTアイソフォームの発現安定性を詳細に検討出来ることとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、個々の筋細胞核が速筋型・遅筋型の決定を受けていること、そのキメラ多核体が正常組織に存在すること、筋芽細胞と衛星細胞はアイソフォームの異なった発現様式をもっていること、神経の影響を受けないで生体内で長期間培養出来る系を確立したことなど、筋型の分化を研究するのに有意義な成果をあげている。これらの成果は本研究の目的達成と言う意味で評価出来るのみならず、その実験手法は他の研究にも影響を与える点で、優れた研究成果であると評価出来る。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。