

論文の内容の要旨

応用動物科学専攻

平成10年度博士課程進学

氏名 添田知恵

指導教官 東條英昭

論文題目

哺乳類骨格筋の再生過程における *c-ski* 遺伝子の役割に関する研究

筋衛星細胞は紡錘形の単核細胞であり、成体の骨格筋組織中では筋線維と基底膜との間に存在する。これらは成体骨格筋組織の発達及び再生に重要な役割を果たすことが知られている。成体内においては、筋衛星細胞は通常、休止状態にあり、さまざまな刺激により活性化される。この時、活性化された筋衛星細胞は筋前駆細胞と呼ばれ、増殖、分化して、新たな筋線維を形成、または付加できる。この機構によって、骨格筋組織は、発達及び組織の修復を行っている。

骨格筋は、ターンオーバーの遅い組織であるにもかかわらず、再生能が高いことが知られている。しかし、筋衛星細胞の機能を制御する機構は複雑で、その詳細な機構の解析が多くの研究者の関心を集めている。

一方で、*c-ski* 遺伝子は、1987年に繊維芽細胞を筋細胞に形質転換させる能力をもつがん原遺伝子として同定された。*c-ski* 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスは、タイプ IIb 型（速筋型）の骨格筋が肥大する表現型を示す。また、そのノックアウトマ

ウスでは、神経系及び、骨格筋の発生に異常が生じる。そのため、c-ski 遺伝子は、骨格筋に関係の深い遺伝子であることが考えられるが、成体骨格筋における c-ski 遺伝子の詳細な機能はほとんどわかっていない。最近では、転写調節因子としてさまざまな核内タンパク質と結合していることが報告されている。そのため、c-ski 遺伝子産物は、従来考えられていた以上にさまざまな細胞種の増殖及び分化に関与し、多様な機能を持つことが示唆される。

そこで、本研究では、哺乳類骨格筋組織に注目し、再生過程での骨格筋細胞における c-ski 遺伝子の役割について検討した。

まず、ラット大腿四頭筋に高濃度の塩化ナトリウム溶液を注入し、人工的に組織を破壊して、その後の再生過程を観察した。再生誘発から 2 日後には、壊死部組織に単核の細胞が集合し、3 日後には、筋管細胞が形成され、2 週間後には、ほぼ再生を完了することが組織学的に観察できた。そこで、この過程での c-ski mRNA の発現変化をノーザンブロット法により解析した結果、c-ski mRNA の発現量は、再生から 2 日目に最大になり、その後減少することが示された。このとき、in situ ハイブリダイゼーション法により、c-ski mRNA が、壊死部組織に局在していることが判明した。さらに、免疫染色では、Ski タンパク質が増殖中の筋細胞内に発現していることが示されたため、Ski と筋細胞の増殖について検討することにした。

ラット骨格筋組織由来の細胞株である L6 細胞を用いて、筋細胞における c-ski 遺伝子の詳細な役割を検討した。培養系における筋細胞は、培養条件により、休止状態、増殖期及び分化期を誘導できる。L6 細胞は、このうち、増殖期にもっとも c-ski mRNA の発現が高く、Ski タンパク質も増殖期にのみ、L6 細胞の核内に局在がみられた。

次に、増殖期の筋細胞における c-ski 遺伝子の役割について検討するため、c-ski アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて、in vitro で増殖期の筋細胞に導入したところ、増殖が抑制される傾向がみられた。さらに詳細な解析をするために、c-ski アンチセンス RNA 発現ベクターを構築し、筋細胞の増殖における c-ski 遺伝子発現の抑制実験を行ったところ、L6 細胞の増殖は、c-ski のアンチセンスを発現している細胞において、有意

に低下ることが判明した。

さらに、細胞の増殖が抑制された原因を追求するために、c-ski アンチセンスを発現させた筋細胞の細胞周期を FACSscan を用いて解析したところ、アポトーシスを起こしている細胞群がみられた。また、TUNEL 法を用いた場合にも、アンチセンスを発現している細胞内でのみ、アポトーシス細胞を検出できた。このことから、c-ski 遺伝子の発現が増殖期の筋細胞の生存維持に関与することが示唆された。さらに詳細な解析をするために、EGFP-ski アンチセンスを発現するベクターを構築し、セルソーターを用いて、EGFP 陽性細胞のみを回収し、アポトーシス関連遺伝子の発現を解析した。その結果、ski アンチセンスを発現している細胞内で、bcl-2 遺伝子の発現が抑制されていることが確認された。このことから、c-ski 遺伝子が、アポトーシス抑制遺伝子である bcl-2 に関与し、細胞の生存に関わる可能性が示された。

以上のことから、骨格筋再生過程で発現が誘導された c-ski 遺伝子は、再生に重要な役割を果たす筋衛星細胞の増殖期における生存の維持において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。