

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380176

研究課題名（和文） 筋発達制御因子・ミオスタチンのデコリンによる調節機構

研究課題名（英文） Regulation of myostatin activity by decorin

研究代表者

西邑 隆徳 (NISHIMURA TAKANORI)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10237729

研究成果の概要（和文）：

筋肉量や脂肪蓄積を制御する成長因子・ミオスタチンが細胞外マトリックス分子の一つであるデコリンによってどのように制御されているかを検討した結果、以下の成果を得た。

1. デコリンが筋細胞に対するミオスタチンの抑制効果に及ぼす影響

細胞外マトリックス (ECM) 成分のデコリンによるミオスタチン調節機構を解明することを目的に、デコリン過剰発現筋細胞を作製し、これに対してミオスタチンを添加したところ、ミオスタチンによる増殖抑制効果は、コントロール筋細胞に比べて低く抑えられていた。また、同様にミオスタチンによる分化抑制効果について検討した結果、デコリン過剰発現筋細胞はコントロール筋細胞に比べて、ミオスタチンの分化抑制程度が低かった。以上の結果は、筋細胞自らが産生するデコリンがミオスタチンの増殖・抑制作用を減ずる働きをしていることを示唆している。

2. 脂肪細胞に対するミオスタチンの作用およびデコリンによるその調節作用

ブタ脂肪前駆細胞株 (PSPA) を用いて脂肪前駆細胞に対するミオスタチンの作用を検討した結果、ミオスタチンは PSAP の分化を抑制することが示された。PSPA に対するミオスタチンの分化抑制効果は、デコリンを含むコラーゲンゲル中で PSPA を培養した場合には減少する傾向がみられた。このことは、ミオスタチンの脂肪前駆細胞に対する作用が細胞外マトリックスのデコリンによって調節されている可能性を示唆するものである。

3. 線維芽細胞におけるデコリン産生能に及ぼすミオスタチンの影響

線維芽細胞に対するミオスタチンの影響について検討した結果、ミオスタチンは線維芽細胞の増殖を抑制した。線維芽細胞の細胞表面にはミオスタチン受容体 ActRIIB が発現しており、ミオスタチンによる増殖抑制時には p21 の発現亢進がみられた。さらに、ミオスタチンが線維芽細胞の ECM 産生能に及ぼす影響を検討した結果、ミオスタチンはデコリンを含むいくつかの ECM 分子の発現を亢進することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to elucidate mechanisms by which decorin, a proteoglycan in the extracellular matrix (ECM), regulate the activity of myostatin that controls muscle cell growth.

1. Effect of decorin on the inhibitory action of myostatin to muscle cells

In order to better understand the role of decorin for myogenic cell growth, we generated stable clonal C2C12 myoblasts that were over-expressing decorin, and showed that decorin over-expressing cells had an increased rate of proliferation as compared to the control cells. Furthermore, we revealed that over-expression of decorin suppressed the activity of myostatin endogenously synthesized in C2C12 myoblasts and attenuated the signaling of exogenous myostatin. These results clearly show that decorin enhances the proliferation and differentiation of C2C12 myoblasts through suppressing myostatin activity

2. Effect of myostatin on the differentiation of preadipocyte and its regulation by decorin

In this study we investigated whether myostatin affects the differentiation of preadipocytes using porcine subcutaneous preadipocytes (PSPA). Myostatin suppressed the differentiation of PSPA in a dose dependent manner. This inhibitory action of myostatin on PSPA differentiation was attenuated by decorin in the collagen matrix. These results suggest that decorin plays an important role in controlling the suppressive action of myostatin on preadipocyte proliferation.

3. Effects of myostatin on the cell growth and the synthesis of ECM in fibroblasts.

First, we investigated whether myostatin affects the proliferation of 3T3L1 fibroblasts, and revealed that myostatin decreased the proliferation of fibroblast. Moreover, myostatin receptor, activin receptor type-2B (ActRIIB), was found to be distributed on fibroblasts and it was also clarified that myostatin increased the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 (p21). These results suggested that myostatin inhibits fibroblast proliferation by the same mechanism as that for inhibition of myoblast proliferation. We also showed that myostatin increased the mRNA of decorin, biglycan and collagen (types I, IV and V) in fibroblasts. The results suggest that myostatin regulates ECM synthesis in fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生理、筋発達

1. 研究開始当初の背景

家畜骨格筋の発達程度は食肉の量と質を決定する。骨格筋を構成する筋組織、脂肪組織および結合組織の形成・発達は筋細胞、脂肪細胞および線維芽細胞が其々担っており、これらの細胞の増殖や分化が組織発達に大きく影響する。一般に、細胞の増殖・分化は成長因子とその調節因子によって制御されており、骨格筋の発達機構を解明するためには、筋細胞、脂肪細胞および線維芽細胞の増殖・分化を制御している成長因子の調節機構を解明することが極めて重要である。

ミオスタチンは筋肥大を「負」に制御している成長因子で、脂肪蓄積にも影響することから、家畜の筋肉量と脂肪蓄積を制御する、すなわち、食肉の「量と質」を決定する最重要因子といえる。ミオスタチンは細胞外に分泌された後、自己分泌、傍分泌あるいは内分泌的に標的細胞に作用するが、標的細胞の受容体に結合するまでに必ず細胞外マトリックスを通過する。いくつかの成長因子は細胞外マトリックス分子と相互

作用することによってその働きが調節されることが知られている。しかし、ミオスタチンが細胞外マトリックスでどのように調節されているかについては未解明である。

デコリンはプロテオグリカンの一種であり、筋組織中では主に筋内膜と筋周膜のコラーゲン細線維に結合して細胞外マトリックス分子として存在している。我々は、近年、デコリンがミオスタチンと相互作用することを明らかにしたが、骨格筋を構成する各種細胞に対するミオスタチンの作用にデコリンがどのように関与するかについては検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では、筋肉量や脂肪蓄積を制御する成長因子として知られているミオスタチンが筋細胞、脂肪細胞および線維芽細胞に作用する際に、細胞外マトリックス分子・デコリンによってどのように制御されているかを主として検討し、デコリンによるミオスタチン調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) デコリンが筋細胞に対するミオスタチンの抑制効果に及ぼす影響

筋細胞の増殖・分化に対するミオスタチンの抑制作用をデコリンがどのようなメカニズムで制御しているかを解明するため、以下の実験を行った。①デコリン過剰発現あるいは発現抑制筋細胞を用いて、ミオスタチンに対する反応性を検討した。②遊離型デコリン存在下でのミオスタチンシグナル量の変化をレポーターアッセイで調べた。

2) 脂肪細胞に対するミオスタチンの作用およびデコリンによるその調節作用

研究分担者（中島）が株化した梅山豚およびLWD交雑豚の背部皮下脂肪組織由来の脂肪前駆細胞株（MSPA および PSPA）を用いて、①ミオスタチンが MSPA および PSPA の増殖・分化に及ぼす影響ならびに PPAR γ などの脂肪分化マーカーの発現様相を検討した。また、②デコリン含有コラーゲンゲル中で両細胞を培養し、ミオスタチンを添加した場合の増殖・分化能をデコリン不含ゲルの場合と比較検討した。

3) 線維芽細胞におけるデコリン産生能に及ぼすミオスタチンの影響

NIH3T3L1 線維芽細胞を用いて、ミオスタチンが、①ミオスタチンが増殖に及ぼす影響ならびに、②細胞外マトリックス分子産生能に及ぼす影響を検討した。

4. 研究成果

1) デコリンが筋細胞に対するミオスタチンの抑制効果に及ぼす影響

デコリンが筋細胞の分化に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、デコリンの過剰発現または発現抑制が筋芽細胞の分化に及ぼす影響ならびにその作用機構について検討した。発現ベクターを導入してデコリンを過剰に発現する C₂C₁₂ 筋芽細胞を作成したところ、その分化は促進された。siRNA 導入による一時的なデコリンの発現抑制は C₂C₁₂ 筋芽細胞の分化に影響を及ぼさなかったが、miRNA 発現ベクターを導入して長期的にデコリンの発現を抑制させた C₂C₁₂ 筋芽細胞を作成したところ、その分化は抑制された。これらのことから、デコリンは筋細胞の分化を促進することが示唆された。

そこで、デコリンによる筋分化促進機構の解明を目的として、デコリンのミオスタチンを介した作用を検討した。ミオスタチン存在下でデコリン過剰発現筋細胞を分化誘導して培養したところ、デコリン過剰発現筋細胞はミオスタチンの分化抑制作用を阻害した。デコリン過剰発現筋細胞の外因性ミオスタチンに対する感受性の低下は、筋細胞から細胞外に分泌されたデコリンがミオスタチンと相互作用することで、その活性を制御している可能性を示唆するものである。

次に、デコリンがミオスタチンシグナルに及ぼす影響をレポーターアッセイによって調べたところ、デコリンはミオスタチンシグナルを直接的には抑制しなかった。しかし、C₂C₁₂ 筋芽細胞にデコリンを添加して培養すると、Akt の活性化が確認された。この結果は、遊離型のデコリンがシグナル分子として筋細胞に対して働く可能性を示唆するものであり、デコリンによるシグナルがミオスタチンによるシグナルとクロストークしているのかもしれない。本研究成果は、ミオスタチンによる筋細胞制御機構、すなわち、筋肥大抑制機構にデコリンが関与していることを示唆するものである。現在、これらの研究成果を2編の論文に纏め国際学術誌に投稿中である。

2) 脂肪細胞に対するミオスタチンの作用およびデコリンによるその調節作用

ミオスタチンの脂肪細胞に対する作用については不明な点も多い。そこで、本研究では、まず、ミオスタチンが脂肪前駆細胞に及ぼす影響を検討した。梅山豚およびLWD交雑豚の背部皮下脂肪組織由来の脂肪前駆細胞株（MSPA および PSPA）を増殖培地、あるいは分化培地で培養したところ、両者ともミオスタチンの添加によって増殖・分化が抑制された。このとき、ミオスタチンによる増殖・分化抑制効果は PSPA の方が MSPA に比べて大きかった。また、ミオスタチン添加条件下における脂肪細胞の TG 蓄積量は MSPA の方が PSPA に比べて多かった。以上の結果から、MSPA は PSPA よりもミオスタチンの作用を受けにくく、ミオスタチン存在下では、MSPA の方が PSPA に比べて分化能が高くなるのではないかと考えられた。

2) 脂肪細胞に対するミオスタチンの作用およびデコリンによるその調節作用

そこで、ミオスタチンのアンタゴニストであるフォリスタチンの遺伝子発現量を測定したところ、MSPA の方が PSPA よりも発現量が多かった。また、背部皮下脂肪組織におけるフォリスタチン遺伝子の発現量は、生後1日齢において梅山豚の方がランドレース豚に比べて有意に多く、この時期の脂肪細胞は梅山豚の方がランドレース豚より顕著に大きかった。以上の結果は、皮下脂肪細胞の肥大に脂肪細胞自身が産生するフォリスタチンが関与している可能性を示唆している。

本研究成果、MSPA は PSPA に比べて①増殖・分化能が低いこと、しかし、②ミオスタチンの影響を受けにくく、ミオスタチン存在下では脂肪蓄積能が高くなることが明らかになり、ミオスタチンに対する脂肪細胞の応

答性の差異が、脂肪細胞の肥大や背脂肪厚の増加といった梅山豚における脂肪組織の発達に影響している可能性が示唆された。

デコリンを含むコラーゲンゲル中で PSPA を培養し、これに外因性のミオスタチンを添加したところ、コラーゲンのみのゲル中で培養した対照区に比べて、PSPA の分化が促進した。以上の結果は、脂肪細胞の細胞外マトリックスに存在するデコリンが、ミオスタチンを補足することによって、その作用を調節している可能性を示唆するものである。今後は、脂肪細胞の細胞外マトリックス環境を *in vitro* で再現した実験系を確立して、ミオスタチンのリザーバーとしてのデコリンを含む細胞外マトリックスの機能を検討する必要がある。現在、これらの研究成果を 1 編の論文に纏め国際学術誌に投稿中である。

3) 線維芽細胞における「デコリンによるミオスタチン調節機構」の解明

骨格筋の形成・肥大機構については、その実質細胞である筋細胞の動態に焦点を当てた多くの研究が行われてきたが、筋組織を支持している筋肉内結合組織の形態形成機構、すなわち、筋肉内結合組織を構成する ECM 成分を産生する線維芽細胞の動態に着目した研究は少ない。本研究では、骨格筋量を負に制御しているミオスタチンについて、線維芽細胞の増殖とデコリンなどの細胞外マトリックス産生能に及ぼす影響を中心に検討した。

まず、ミオスタチンが線維芽細胞の増殖にどのように影響するのか検討するため、NIH3T3 線維芽細胞を用いて細胞の様相を観察し細胞数を調べたところ、ミオスタチンの濃度によって NIH3T3 線維芽細胞の増殖に及ぼす影響は異なり、ミオスタチン低濃度 (ng/ml レベル) では増殖促進に、高濃度 (数 µg/ml レベル) では増殖抑制に働く可能性が示唆された。また、間接蛍光抗体法により NIH3T3 線維芽細胞はミオスタチンの受容体である ActRIIB を発現していること、さらに、ミオスタチンが NIH3T3 線維芽細胞の p21 発現を亢進することが明らかになり、ミオスタチンは線維芽細胞に対しても筋細胞に対するのと同様のメカニズムで細胞の増殖を抑制していることが示唆された。しかし、低濃度でみられたミオスタチンの増殖促進作用が同じ受容体 (ActRIIB) を介しているのかどうかは不明で、今後の検討課題である。

次に、ミオスタチンが線維芽細胞の主な役割である細胞外マトリックス産生能に及ぼす影響を検討した。RT-PCR 法により、ミオスタチンは NIH3T3 線維芽細胞の細胞外マトリックス分子の発現に影響することが示唆された。以上の研究成果は、ミオスタチンが線

維芽細胞の増殖や細胞外マトリックス産生に影響することを国内外で初めて示したもので、現在、2 つの論文として纏め国際学術誌に投稿中である。今後は、線維芽細胞が産出・分泌する細胞外マトリックス分子が細胞外でどこに蓄積し、パラクリン、エンドクリン的に作用するミオスタチンにどのように働くかを蛍光イメージング技術などにより解析することで、細胞外マトリックス (デコリンなど) によるミオスタチン活性制御機構の全容が更に詳細に解明されるものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

(1) 齊藤 央・若松純一・西邑隆徳、ブタ皮下脂肪前駆細胞の分化に及ぼすミオスタチンの影響、2011、日本畜産学会第 114 回大会

(2) 佐竹光平・若松純一・西邑隆徳、脂肪細胞におけるフォリスタチンおよびデコリンの発現、2011、日本畜産学会第 114 回大会

(3) 藤田有加・中島郁世・千国幸一・若松純一・西邑隆徳、ブタ皮下脂肪前駆細胞株の増殖・分化に及ぼすミオスタチンの影響、2009、日本畜産学会第 111 回大会

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西邑 隆徳 (NISHIMURA TAKANORI)
北海道大学大学院農学研究院・教授
研究者番号：10237729

(2) 研究分担者

中島 郁世 (NAKAJIMA IKUYO)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・畜産草地研究所・主任研究員
研究者番号：60355063

保坂 善真 (HOSAKA YOSHINAO)
鳥取大学農学部・准教授
研究者番号：00337023