

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09524

研究課題名(和文) オートクリン・パラクラリン因子BMP-3bが担う骨格筋恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of BMP-3b on regulating myogenesis of skeletal muscle stem cells

研究代表者

古株 彰一郎 (Kokabu, Shoichiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30448899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞C2C12とマウスサテライト細胞を用いた、CHO細胞由来ラットBMP-3bやマウスBMP-3b遺伝子の過剰発現はCAGA-luc活性やSmad 2/3シグナルの標的遺伝子であるPAI-1の発現を誘導した。2%ウマ血清含有培地で筋分化を誘導したところ、BMP-3bは濃度依存的に筋分化マーカーのMyogenin や Myosin heavy chainを減少させた。しかしながらALK4, 5, 7阻害剤のSB431542の添加によりBMP-3bの筋分化マーカー抑制効果は解除された。以上よりBMP-3bはサテライト細胞の分化を抑制することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は定常状態でも一定の割合で分解し減少し、骨格筋幹細胞であるサテライト細胞が増殖・分化することで減少した骨格筋量と同量の骨格筋を再生し、骨格筋の恒常性が維持される。サルコペニアなどの骨格筋萎縮性の疾患ではこの分解・減少と再生のバランスが崩れ、骨格筋の分解・減少が相対的に再生を上回ることで生じる。今回われわれはBMP-3bがサテライト細胞の分化を強力に阻害することを突き止めた。それとは逆に、BMP-3bの抗体は筋分化を強力に促進した。今後、BMP-3b抗体投与によりin vivoで加齢に伴う骨格筋量の減少が軽減されることが示されれば、BMP-3bがサルコペニアの予防や治療法の標的になり得る。

研究成果の概要(英文)：Real time PCR analysis revealed that BMP-3b mRNA is abundantly expressed in skeletal muscle tissue. Recombinant rat (rr) BMP-3b derived from CHO cells increased CAGA-luciferase activity as well as the expression levels of PAI-1, a Smad2/3 target gene. Treatment of C2C12 cells, or primary cultured satellite cells (SCs) with rrBMP-3b suppressed the expression of myogenic marker genes such as myogenin and myosin heavy chain. Furthermore, treatment of C2C12 cells with SB431542, kinase inhibitor of ALK4, 5 and 7, rescued the suppressive effect of BMP-3b on myogenesis. The expression levels of BMP-3b decreased with myogenesis of SCs. Moreover, rrBMP-3b also suppressed myogenesis in SCs. Treatment of SCs with a neutralizing antibody to BMP-3b also enhanced the myogenesis of SCs. Endogenous BMP-3b expressed by SCs physiologically regulates myogenesis.

研究分野：口腔科学

キーワード：BMP BMP-3b GDF10 サルコペニア 筋再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は定常状態でも一定の割合で分解し減少するが、骨格筋幹細胞が増殖・分化することで減少した骨格筋量と同量の骨格筋を再生し、骨格筋の恒常性が維持される。骨格筋の萎縮はこの分解・減少と再生のバランスが崩れ、骨格筋の分解・減少が相対的に再生を上回ることによって生じる。さらに、萎縮した骨格筋の線維間には脂肪組織が浸潤することが多い。骨格筋内に生じた脂肪は収縮に関与しないだけでなく、脂肪細胞から分泌された様々な因子が周囲の骨格筋に何らかの影響を与えている可能性がある。

BMP-3b は TGF super family に属するサイトカインで骨や脂肪組織に発現する。標的細胞の ALK4/acvr2a に結合し Smad2/3 のリン酸化を介して骨形成や、脂肪細胞の分化とエネルギー代謝を制御する。TGF super family に属する多くのサイトカインは骨格筋代謝に関与することが知られている。しかしながら BMP-3b は骨格筋に発現するにも関わらずその作用は不明である。

2. 研究の目的

骨格筋の代謝、特に骨格筋の再生における BMP-3b の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

細胞はマウス長指伸筋から採取した初代培養サテライト細胞、サテライト細胞由来細胞株 C2C12 細胞およびマウス間葉系幹細胞株 10T1/2 を用いた。CHO 細胞由来ラット BMP-3b を使用した。また BMP-3b の過剰発現細胞の作製には、マウス BMP-3b をコードしたエクスペクションベクターをリポフェクション法でトランスフェクションした。

4. 研究成果

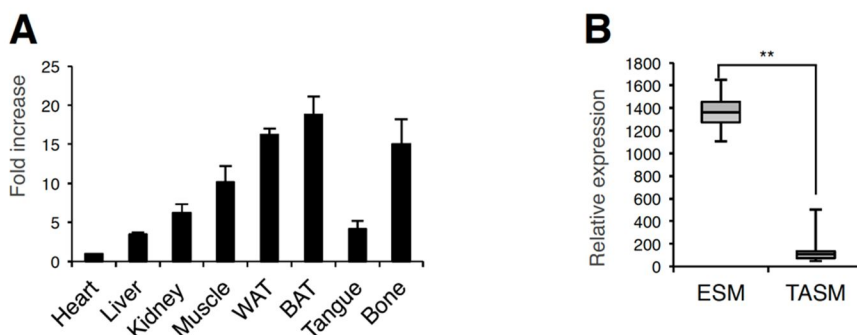


図1 : BMP-3b は骨格筋に発現する。

マウス各組織の BMP-3b の発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。骨格筋に発現する BMP-3b はすでに機能が知られている骨や WAT (白色脂肪組織) と同程度に存在するのが明らかとなった (A)。また、GEO を利用してデータベース解析したところ (GDS254)、ラットの眼輪筋 (EOM) の

BMP-3b の発現量は前脛骨筋 (TASM) より多いことがわかった (B)。

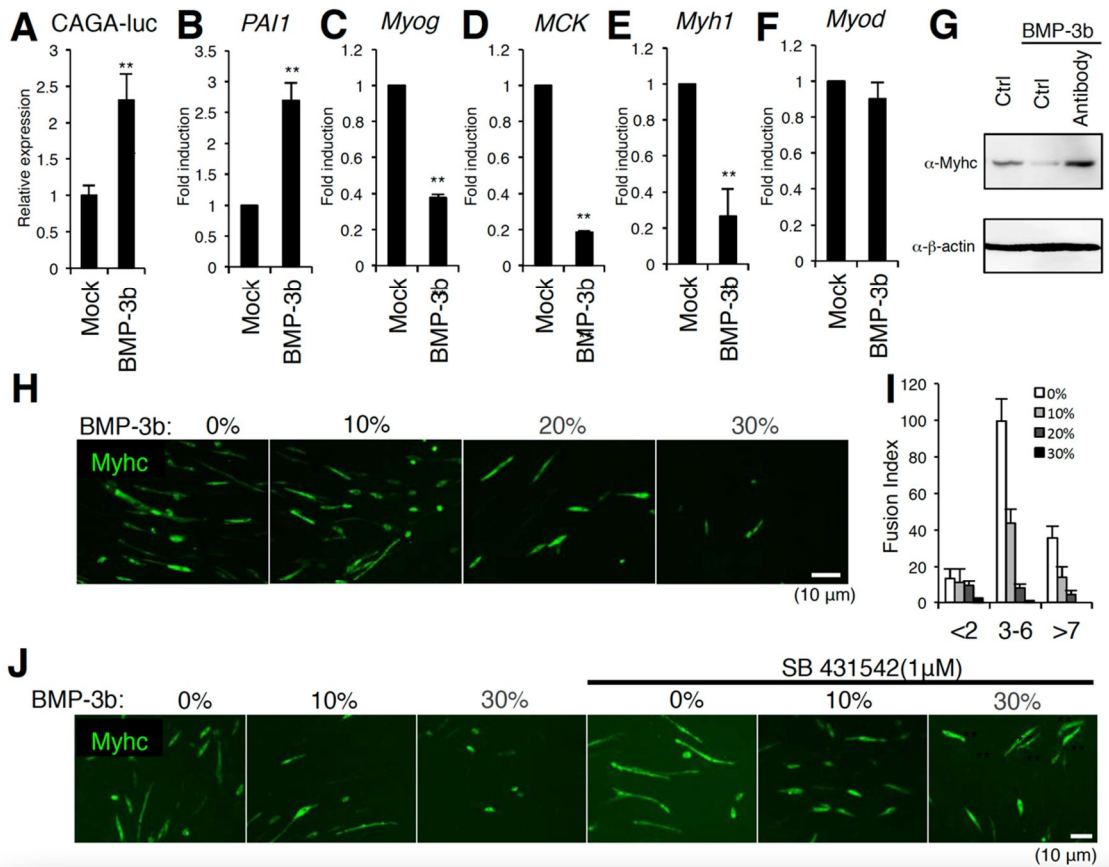


図 2 : BMP-3b は筋分化を抑制する。

マウス BMP-3b 遺伝子の過剰発現は CAGA-luciferase 活性や Smad 2/3 シグナルの標的遺伝子である PAI-1 の発現を誘導した。2%ウマ血清含有培地で筋分化を誘導したところ、BMP-3b は濃度依存的に筋分化マーカーの Myogenin (Myog)や Myosin heavy chain の mRNA やタンパク量を減少させた。しかしながら、ALK4, 5, 7 阻害剤の SB431542 の添加により BMP-3b の筋分化マーカー抑制効果は解除された。サテライト細胞の分化に伴い BMP-3b の mRNA 量は減少した。さらに BMP-3b は濃度依存的に Myog や Myhc の発現量を減少させた。また BMP-3b に対する抗体を添加するとサテライト細胞の分化は亢進した。以上より、BMP-3b はサテライト細胞の分化を抑制することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 古株 彰一郎, 宮脇 有希, Addison WN, 松原 琢磨, 中道 敦子	4. 巻 45
2. 論文標題 BMP-3bが担う骨格筋再生機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 74-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 古株 彰一郎, 宮脇 有希, Addison WN, 松原 琢磨, 中道 敦子	4. 巻 21
2. 論文標題 BMP-3bは骨格筋の再生を制御する	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 地域ケアリング	6. 最初と最後の頁 80-82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Miyawaki A, Addison WN, Matsubara T, Habu M, Mitsugi S, Tominaga K, Kokabu S
2. 発表標題 BMP-3b suppresses myoblast differentiation
3. 学会等名 12th JKBT the 2nd Asian Symposium on cutting-edge Biotechnology and Chemistry (2nd ASCBC) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮脇 有希, Addison WN, 松原 琢磨, 古株 彰一郎
2. 発表標題 BMP-3bは骨格筋再生を制御する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮脇 有希, 松原 琢磨, 土生 学, 三次 翔, 富永 和宏, 古株 彰一郎
2. 発表標題 BMP-3bは骨格筋の再生を制御する
3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyawaki A, Addison WN, Matsubara T, Habu M, Mitsugi S, Tominaga K, Kokabu S
2. 発表標題 BMP-3b regulates regeneration of skeletal muscle
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kokabu S, Matsubara T
2. 発表標題 BMP-3b suppresses the myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kokabu S, Miyawaki A, Matsubara T
2. 発表標題 BMP-3b regulates the myogenic differentiation of skeletal muscle satellite cells.
3. 学会等名 12th International BMP conference 2018 in Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古株彰一郎, 中富 千尋, 松原 琢磨
2. 発表標題 BMP-3b による骨格筋幹細胞分化制御機構
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松原 琢磨 (Matsubara Takuma) (00423137)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (27102)	
研究分担者	日野 純 (Hino Jun) (40260351)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・室長 (84404)	
研究分担者	小野 悠介 (Ono Yusuke) (60601119)	熊本大学・発生医学研究所・准教授 (17401)	
研究分担者	松尾 拡 (Matsuo Kou) (70238971)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	人見 涼露 (Hitomi Suzuro) (70548924)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	マギル大学			
米国	ハーバード大学			