

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30日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590320

研究課題名（和文） マイオスタチンが織りなす骨格筋と脂肪組織の相互作用

研究課題名（英文） Communication between skeletal muscle and adipose tissues by myostatin

研究代表者

土田 邦博（TSUCHIDA KUNIHIRO）

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号：30281091

研究成果の概要（和文）：骨格筋由来の TGF- β ファミリー分子であるマイオスタチンが仲介する骨格筋と脂肪組織との相互作用の解明を行なった。マイオスタチン遮断法を開発し、独自に作製した筋量増大マウスを駆使し、マイオスタチン阻害により脂肪細胞のミトコンドリア数の増加、脂肪細胞の肥大化抑制や高脂肪食負荷時の脂肪肝の抑制を示した。脂肪組織と肝臓での効果は、骨格筋でマイオスタチンシグナルが抑制される事による副次的な効果である結果を得た。マイオスタチンと小分子 RNA に着目した研究を推進させ、マイオスタチンの刺激や阻害で、複数の小分子 RNA に発現変動が見られること、そして、それらが制御する分子の変動が、マイオスタチンによる筋肥大制御に関与している事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Myostatin, one of the TGF- β superfamily member, regulates skeletal muscle mass. It also regulates adipose tissue mass and homeostasis. We have devised the method to block myostatin function, and developed hypermuscular transgenic mice. By using the model, we have shown that adipose tissue in myostatin inhibited mice did not show hypertrophy due to increased numbers of mitochondria. Fatty liver induced by high fat diet feeding was prevented by myostatin inhibition, primarily due to blockade of myostatin signaling in skeletal muscle. Fatty acid composition in liver by high fat diet was different between wildtype and myostatin inhibited mice. We also discovered that expression of several miRNAs is altered by myostatin stimulation and/or inhibition, which could be responsible for actions of myostatin in regulating muscle homeostasis and dynamics of adipocyte growth and turnover.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：マイオスタチン、ホリスタチン、筋・脂肪、脂肪肝、マイクロ RNA、間葉系細胞分化

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、生体で最重量の組織であり、筋

収縮、体の動きや姿勢の維持、運動機能に関与する。さらに、肝臓と共に、インスリンの作用の主たる標的臓器であり、生体の代謝を中心とした恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年の解析から、骨格筋は収縮機能のみならず、内分泌臓器として種々のサイトカイン産生の場としての機能を有することが分かって来た。具体的には、インターロイキン類やケモカイン、TGF- β ファミリー等が骨格筋から産生され、骨格筋への作用に加えて、他臓器との相互作用を担っている。その中で、骨格筋から産生される TGF- β ファミリーに属するマイオスタチンは、筋量を負に制御している。実際に、ヒトを含めて、マウス、羊、短距離のレース犬、魚類等で、マイオスタチンが筋量や肉量を制御しており、マイオスタチンが遺伝子レベルあるいはタンパク質レベルで産生や機能が抑制されると、筋量が著しく増加する。マイオスタチンの産生や機能が阻害されると、内臓脂肪や皮下脂肪量が低下する事が知られている。しかしながら、その詳細な分子機構や、マイオスタチンが織りなす、骨格筋と脂肪組織や肝臓との相互作用に関する解析は十分とは言えない状況であった。

2. 研究の目的

研究代表者グループは、ホリスタチンと呼ばれる TGF- β ファミリーの阻害因子がマイオスタチンに対して強い阻害効果を持つ事に着目し、タンパク質工学の手法を用いて、マイオスタチン特異的な阻害分子 (FS I-I) を作製し、遺伝子発現動物を作製して来た。そして、このモデル動物を用いて、組織学的解析や筋力測定法、高脂肪食負荷等の研究手法を駆使して、骨格筋、脂肪組織、肝臓を中心にした研究を遂行した。

マイオスタチンが筋量を制御する機構については、いまだ不明点が多いのが現状である。そこで、マイオスタチンシグナルと小分子 RNA (マイクロ RNA, miRNA) の相関を明らかにする事で、その分子機構を解析する事とした。マイオスタチンの遺伝子ノックアウトマウスを開発元より入手し、大腿四頭筋や前頸骨筋から miRNA を抽出し、発現変動を示す miRNA の同定を試みた。筋芽細胞分化系や初代筋芽細胞系で、同定した miRNA が筋肥大関連分子の制御や分化に関与する機構の解明を目的とした研究を行なった。

3. 研究の方法

マイオスタチンが完全に遮断されたモデルとしてマイオスタチンノックアウトマウスを用いた。マイオスタチンがホリスタチン誘導分子で阻害されたマウスは、研究代表者が独自に開発しているのでそれを用いた。野生型と筋肥大マウスに対して、数週間に渡り、

高脂肪食を負荷し、体重、脂肪量、筋量の変化、脂肪肝形成、脂肪酸組成の定量、電顕観察等の組織化学的解析を行なった。筋肥大が著しいマイオスタチンノックアウトマウスと野生型の前頸骨筋から小分子 RNA (miRNA) を抽出し、1.5 倍以上の発現変動の見られる分子を網羅的に探索した。miRNA486 など複数の分子に発現変動が観察されたため、定量 PCR 解析で発現変動を精査した。データベース解析を行ない、miRNA の標的となる候補分子検索を行ない、PTEN を中心とした Akt 経路の分子群が抽出された。

PTEN に関しては、さらにバイオフィォーマティクスの手法で、候補となる miRNA の同定を行なった。抽出された miRNA について、生理活性を評価するために、筋芽細胞に遺伝子導入し、筋管径の変化を測定した。

マイオスタチンは TGF- β ファミリーに属するサイトカインであり、TGF- β やマイオスタチンは種々の臓器で線維化 (fibrosis) に関与する事が知られている。これまでに骨格筋内に存在する間葉系幹細胞で脂肪変性に関与する細胞の同定に成功していた。この細胞に TGF- β を添加し、繊維芽細胞への分化能、細胞外基質の分泌能を測定した。

4. 研究成果

マイオスタチンが阻害され筋量が増加したモデルマウスは、高脂肪食負荷時においても、野生型に比較して、脂肪量の増加が抑制されており、筋量が増加傾向にある事が解析された。レプチン、総コレステロール、非必須遊離脂肪酸は減少傾向にあり、アディポネクチンは上昇が見られた。糖代謝の改善も見られた。さらに、野生型では、脂肪肝の形成が誘導されるが、マイオスタチン阻害では、脂肪肝は全く形成されず (図 1)、脂肪酸組成も、中性脂肪の上昇は見られず、オレイン酸等の増加が抑制されていた (表 1)。ステア

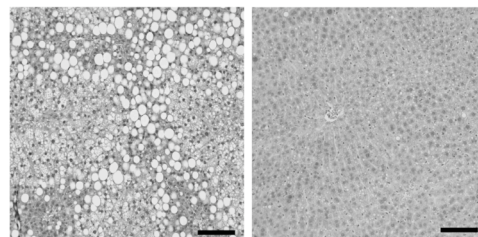


図1 高脂肪食負荷後の肝臓。
左、野生型。右、マイオスタチン阻害マウス。
スケールバー、100 μ m (文献4より引用)

ロイル CoA デサチュラーゼ-1 (Scd-1) などのメタボリック症候群の標的となる分子の発現も抑制傾向にあった。脂肪細胞の肥大化は抑制されており、ミトコンドリアの数が増加するという知見が得られた。マイオスタチンの下流で作用する Smad 分子のリン酸化を指標として解析し、マイオスタチン遮断により脂肪細胞に及ぼされる効果は、筋肥大によ

る副次的な効果である事が示唆された。研究代表者が発見したホリスタチン様ホルモンFLRGとアクチビンが虚血障害における心筋の虚血感受性に関与する事が示された。

マイオスタチン阻害で発現変動する複数のmiRNAを捉える事が出来た。その中で、miRNA486の発現は有意に上昇しており、筋芽細胞への導入系において、筋管径の増加作用を有していた。標的分子と考えられるPTENの発現低下や、S6キナーゼのリン酸化変化が観察された。

処置 ジェノタイプ	正常食		高脂肪食	
	野生型	マイオスタチン阻害	野生型	マイオスタチン阻害
C140	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
C160	13.1 ± 7.2	10.5 ± 4.9	20.2 ± 4.9	10.5 ± 2.8
C161	2.1 ± 1.7	1.3 ± 0.9	3.8 ± 1.1	1.5 ± 0.6
C180	3.0 ± 0.4	3.3 ± 1.0	3.5 ± 0.4	3.2 ± 0.1
C181	27.1 ± 22.1	21.4 ± 17.3	57.8 ± 12.0	23.1 ± 9.4
C182	7.2 ± 2.1	6.7 ± 2.0	8.9 ± 2.7	6.4 ± 1.5
C201	0.3 ± 0.5	<i>n.d.</i>	1.1 ± 0.2	<i>n.d.</i>
C203n-6	0.1 ± 0.2	0.1 ± 0.2	0.4 ± 0.3	<i>n.d.</i>
C204n-6	3.0 ± 1.0	3.4 ± 1.5	3.9 ± 0.2	3.6 ± 0.1
C226n-3	3.4 ± 0.9	3.6 ± 1.0	3.1 ± 0.7	3.5 ± 0.3
Total	59.3 ± 35.9	50.3 ± 28.1	102.7 ± 22	51.8 ± 14.9
			<i>n.d.</i> 検出されず	($\mu\text{g}/\text{mg}$)

表1 高脂肪食負荷後の肝臓内脂肪酸組成 (文献4より引用)

筋の脂肪化や線維化は、筋疾患や老化で観察される病態であるが、QOLを低下させる重要な症状に繋がる。マウスやヒトの骨格筋標本を用いて、筋衛星細胞とそれとは異なる脂肪分化能の高い間葉系幹細胞をセルソーターで分画し、培養や移植に用いる手法を確立した。間葉系幹細胞は、TGF- β の刺激で繊維芽細胞様に分化し、コラーゲンやマトリックメタロプロテアーゼの分泌が増加する。同一の間葉系幹細胞から、脂肪細胞と線維化を担う細胞の両者が産み出される事を示した。また、同細胞は、骨形成因子の刺激や骨分化培地では、骨形成能を示し、至適条件下では、軟骨分化能も有していた。

骨格筋と脂肪細胞の相互作用を担う分泌因子の探索のために、血清や骨格筋から希少分子を濃縮し、解析する手法を開発した。

本研究を通して、全体として、マイオスタチンが織りなす骨格筋と脂肪組織および肝臓との相互作用が明らかとなり、近年メタボリック症候群の解析で重要視されている、組織間相互作用の一端を明らかにする事ができたと言える。関連分野の国内外の招待講演も増えており、インパクトのある研究成果が産み出されたと言えよう。今後、プロテオミクス解析等を取り入れる事により、組織間相互作用の実体をより具体的に明らかにする研究へと発展させていくことが期待される。

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12件)

① Y. Ohsawa, T. Okada, S. Nishimatsu, M. Ishizaki, T. Suga, M. Fujino, T. Murakami, M. Uchino, K. Tsuchida, S. Noji, A.

Hinohara, T. Shimizu, K. Shimizu, Y. Sunada. An inhibitor of transforming growth factor beta type I receptor ameliorates muscle atrophy in a mouse model of caveolin 3-deficient muscular dystrophy. Lab. Invest. 査読有、(2012) (in press)

② A. Uezumi, T. Ito, D. Morikawa, N. Shimizu, T. Yoneda, M. Segawa, M. Yamaguchi, R. Ogawa, M. M. Matev, Y. Miyagoe-Suzuki, S.-I. Takeda, K. Tsujikawa, K. Tsuchida, H. Yamamoto, S. Fukada. Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. J. Cell Science 査読有、124(Pt21), 3654-3664 (2011)

③ M. Nakamura, Y. Tahara, Y. Ikehara, T. Murakami, K. Tsuchida, S. Iijima, I. Waga, M. Yudasaka. Single-walled carbon nanohorns as drug carriers: adsorption of prednisolone and anti-inflammatory effects on arthritis. Nanotechnology 査読有、22(46), 465102 (2011)

④ M. Nakatani, M. Kokubo, Y. Ohsawa, Y. Sunada, K. Tsuchida. Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol. 査読有、300(3), E543-553 (2011)

⑤ M. Ishikawa, N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K. Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda, A. Tabuchi. Involvement of the SRF coactivator megakaryoblastic leukemia in the activin-regulated dendritic complexity of rat cortical neurons. J. Biol. Chem. 査読有、285(43), 32734-32743 (2010)

⑥ S.-J. Lee, Y.-S. Lee, T. A. Zimmers, A. Soleimani, M. M. Matzuk, K. Tsuchida, R. D. Cohn, E. R. Barton. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. Mol. Endocrinol. 査読有、24(10)、1998-2008 (2010)

⑦ T. Murakami, W. Wijagkanalan, M. Hashida, K. Tsuchida. Intracellular drug delivery by genetically engineered high density lipoprotein nanoparticle. 査読有、Nanomedicine 5(6), 867-879 (2010)

⑧ A. Uezumi, S. Fukada, N. Yamamoto, S. I. Takeda, K. Tsuchida.

Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. Nature Cell Biology 査読有、12(2)、143-152 (2010)

⑨ K. Jinno, T. Takahashi, K. Tsuchida, E.

Tanaka, K. Moriyama. Acceleration of palatal wound healing in Smad3-deficient mice. *J. Dental Res.* 査読有、88(8)、757-761 (2009)

⑩ Y. Oshima, N. Ouchi, M. Shimano, D.R. Pimentel, K.N. Papanicolaou, K.D. Panse, K. Tsuchida, E. Lara-Pezzi, S.-J. Lee, K. Walsh. Activin A and follistatin-like 3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation* 査読有、120(16)、1606-1615 (2009)

⑪ H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K. Tsuchida, J. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.* 査読有、297(1)、157-164 (2009)

⑫ K. Tsuchida, M. Nakatani, K. Hitachi, A. Uezumi, Y. Sunada, H. Ageta, K. Inokuchi. Activin signaling as an emerging target for therapeutic interventions. *Cell Commun. Signal* 査読有、7(1)、15 (2009)

[学会発表] (計21件)

① 池田大樹、上田洋司、土田邦博、山田治基変形性関節症の軟骨細胞に対する網羅的プロテオミクス解析 愛知、3月10日(2012)

② 常陸圭介、土田邦博 マイオスタチン欠損骨格筋肥大におけるmicroRNAの役割 第34回日本分子生物学会年会横浜、12月16日(2011)

③ 上住聡芳、土田邦博 Interaction between non-myogenic mesenchymal progenitors and muscle cells. 第34回日本分子生物学会年会(招待講演) 横浜、12月16日(2011)

④ K. Tsuchida. Characterization of follistatin and novel mesenchymal stem cells regulating skeletal muscle mass and fat mass. International Conference on Muscle Wasting 2011 Ascona, Switzerland、9月22日(2011)

⑤ 常陸圭介、土田邦博 骨格筋量調節に関わるマイクロRNAの解析 第3回RNAi研究会 広島、8月26日(2011)

⑥ 大石央代、上住聡芳、金治有彦、土田邦博、山田治基 ヒト骨格筋由来幹細胞の骨分化についての検討 第29回日本骨代謝学会 大阪、7月28日(2011)

⑦ K. Tsuchida. Signal transduction pathway through activin receptors is a therapeutic target for muscle wasting disorders. TGF- β Down Under, Melbourne, Australia, March 20-22 (2011)

⑧ 土田邦博 骨格筋と脂肪細胞の臓器間クロストークによる脂肪細胞の動態解析 第7回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎、2月25-27日(2011)

⑨ M. Ishikawa, N. Nishijima, J. Shiota, H. Sakagami, K. Tsuchida, M. Mizukoshi, M. Fukuchi, M. Tsuda, A. Tabuchi. Actin-binding coactivator MKL is involved in activin-induced transcriptional activity and alteration of dendritic morphology in rat cortical neurons. BMB2010 第33回日本分子生物学会年回、第83回日本生化学会大会 合同大会 神戸、12月7-10日(2010)

⑩ 村上達也、土田邦博、Wassana WIJAGKANALAN、橋田 充、姜 舜徹、今堀 博 高比重リポタンパク質のメゾ制御 BMB2010 第33回日本分子生物学会年回、第83回日本生化学会大会 合同大会 神戸、12月7-10日(2010)

⑪ 上田洋司、井ノ口馨、土田邦博 新しい躁鬱病モデル動物を用いたプロテオミクス解析 Neuro2010 第33回日本神経科学大会 神戸、9月2-4日(2010)

⑫ 常陸圭介、土田邦博 マイオスタチン欠損骨格筋肥大におけるマイクロRNAの役割 第2回日本RNAi研究会 広島、8月26-28日(2010)

⑬ K. Tsuchida. Neuromuscular diseases and behavior of progenitor cells. The 3rd Pan Pacific Symposium on Stem Cells Research. Taiwan, April 16-19 (2010)

⑭ 土田邦博 骨格筋と脂肪細胞の相互作用解析と筋疾患治療への応用(独)東京都健康長寿医療センター研究所、理研播磨研究所合同公開カンファレンス 東京、4月12日(2010)

⑮ 土田邦博 マイオスタチン・シグナリングと骨格筋/脂肪組織の相互作用 ワークショップ「細胞による機械的ストレス感知の分子機構」 第32回日本分子生物学会年会 横浜、12月10日(2009)

⑯ 中谷直史、土田邦博 マイオスタチン機能阻害マウスにおける脂肪組織の減少 第14回アディポサイエンス研究会 大阪、8月22日(2009)

⑰ A. Uezumi, S. Fukada, H. Yamada, S. Takeda, K. Tsuchida. Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. *Making Muscle in the Embryo and the Adult*. New York, U.S.A. May 28-June 2 (2009)

⑱ H. Gilson, O. Schakman, S. Kalista, P. Lause, K. Tsuchida, J.P. Thissen. Follistatin induces muscle hypertrophy

through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin. 91th Annual Meeting of Endocrine Society. June 10-13 (2009)

⑱ 上住聡芳、深田宗一郎、山田治基、西野一三、武田伸一、土田邦博 Mesenchymal progenitors distinct from muscle satellite cells contribute to ectopic fat formation in skeletal muscle. 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日 (2009)

⑳ 池本円、上住聡芳、土田邦博、深田宗一郎、橋本有弘 Age-related changes in prospectively isolated muscle satellite cells 第7回幹細胞シンポジウム 東京、5月15-16日 (2009)

㉑ 土田邦博、中谷直史、上住聡芳、常陸圭介 マイオスタチン阻害による脂肪量低下と脂肪肝抵抗性の分子機構 第82回日本内分泌学会学術総会 群馬、4月23-25日 (2009)

[図書] (計7件)

① 上住聡芳、深田宗一郎、土田邦博 骨格筋内脂肪形成のメカニズム Modern Physician 特集 サルコペニアの診かた 第31巻第11号 pp1313-1315 (2011)

② 上住聡芳、土田邦博 骨格筋内脂肪の形成に寄与する間葉系前駆細胞の同定 日本老年医学会雑誌 48 (2), 99-103 (2011)

③ 上住聡芳、深田宗一郎、土田邦博 骨格筋内在性の間葉系前駆細胞 生体の科学(医学書院) 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ 62 (2), 157-160 (2011)

④ 川上恵美、田中栄二、砂田芳秀、土田邦博、野地澄晴 マイオスタチンの発現抑制による治療 生体の科学(医学書院) 特集 筋ジストロフィーの分子病態から治療へ 62(2), 146-150 (2011)

⑤ H. Ageta, K. Tsuchida. Multifunctional roles of activins in the brain. Vitamins and Hormones Vol. 85: Activins and Inhibins 85, 185-206 (2011)

⑥ 上住聡芳、中谷直史、常陸圭介、土田邦博 老化や疾患における骨格筋の萎縮と治療への応用 基礎老化研究 34(4), 5-11 (2010)

⑦ A. Uezumi, K. Tsuchida. Roles of mesenchymal progenitors, distinct from satellite cells, in muscle pathology and physiology. In Muscle Cell Physiology (Edited by Y. Ohira) Osaka University Press pp109-119 (2009)

[その他]

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/na>

[nbyou/Top.html](#)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土田 邦博 (TSUCHIDA KUNIHIRO)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・教授

研究者番号 : 30281091

(2) 研究分担者

中谷 直史 (NAKATANI MASASHI)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号 : 00421264

常陸 圭介 (HITACHI KEISUKE)

藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号 : 10508469