

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790330

研究課題名(和文)骨格筋を起点とした分泌因子による組織間クロストークの解明

研究課題名(英文)The search for myokines in mouse model of hypertrophy.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋肥大マウス(マイオスタチン欠損マウス)を用いた骨格筋分泌因子の探索を行なった。マウス骨格筋、血清を用いて分子スクリーニングを行った。骨格筋においては筋構成分子であるアクチン、ミオシンの量が非常に多く、これを分離するため様々な方法を試みたが、プロテオミクスを用いたスクリーニングを行う精度までの精製には至らなかった。血清サンプルは、微量タンパク質濃縮カラム、血清主要構成分子除去カラムを用いた2つの方法で生成を行い、いくつかの分子同定に成功した。中でも、骨形成に関連した分子が同定され、マイオスタチン欠損マウスにおいて骨解析を行った所、骨量の増加を確認することが出来た。

研究成果の概要(英文)：Myostatin is a potent negative regulator of skeletal muscle. In this study, we find the myokines from myostatin deficient mouse. Muscle and serum from MSTN(-/-) mouse were purified any methods. Muscle purified was difficult, because muscle was including any actin and myosin. Serum from MSTN(-/-) was purified two affinity columns. The result of purified, we found a bone related molecule. The femur of Bone mineral density in MSTN(-/-) mouse was increased.

研究分野：生化学

キーワード：マイオスタチン プロテオミクス 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

マイオスタチンは、TGF- β スーパーファミリーの一角で、骨格筋形成を強力に抑制する働きを持つ分泌型タンパク質である。マイオスタチン欠損による筋肥大は、牛、犬、羊、馬をはじめ魚類でも確認されており、ヒトにおいてもマイオスタチンが欠損することで筋肥大を生じることが明らかになっている。このマイオスタチンの働きを阻害することで生じる筋肥大を、医療応用や畜産へ応用できないかという研究が進められている。実施者は医療応用を目的に研究を進めており、これまでにマイオスタチン阻害分子が筋ジストロフィーモデルマウスにおいて病態改善効果があることを明らかにしてきた。またマイオスタチン阻害分子による筋肥大マウスにおいて、摂食性肥満の予防効果があることも示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、骨格筋分泌因子の探索とその作用について明らかにすることを研究目的とした。

申請者の研究室では、作製したマイオスタチン阻害マウスと、マイオスタチン欠損マウスの2系統の筋肥大マウスを所持しており、骨格筋量が増加することで骨格筋分泌因子が増加しているのではないかと予想し、これらのマウスを用いて骨格筋分泌因子の探索を計画した。

3. 研究の方法

1. 筋肥大マウスの骨格筋、血清をサンプルとし精製条件の最適化、2次元展開、タンパク回収後分子同定を行う。

骨格筋サンプル

これまでに検討した超遠心法を用いて精製を行った。骨格筋サンプルはアクチン、ミオシンが多いためそのままのサンプルではプロテオミクスは難しい。超遠心を用いた精製

法は、筋構成タンパク質、核タンパク質と、その他のタンパク質に分離し、二次元展開し、差のあるタンパク質を質量分析器(MALDI)を用い分子同定を行う。

血清サンプル

血清には、アルブミン、IgGなどの主要タンパク質成分が大量に存在するために、2つの方法を用い精製を行なう。1つは血清主要構成タンパク除去カラム(sigma: SEP-110)を、もうひとつは微量タンパク質濃縮カラム(BioRad: Proteominer)を用いてサンプル調製を行なう。その後、差のあるタンパク質を質量分析器を用いて分子同定を行う。

2. マウスの骨解析

マイオスタチン欠損マウスの大腿骨遠位の骨病理標本をヒストフィルム(ワトソン)を用いて作製し、HE染色を行った後で、大腿骨遠位の各位置での皮質骨、海綿骨の形態を観察する。

小型動物用CT(リガク R_mCT2)を用いて、マイオスタチン欠損マウスと野生型マウスの大腿骨遠位を比較する。CT画像から骨密度や海綿骨、皮質骨の微小構造について解析を行う。

4. 研究結果

マイオスタチン欠損マウスの筋(大腿四頭筋)を超遠心による精製を行った後、2次元展開を行い変動分子を探索したが、分泌タンパク質を同定することは出来なかった。原因として、超遠心による骨格筋主要構成タンパク質の分離が完全ではなく、サンプル中に骨格筋主要構成タンパク質が目的とする分子よりも多く存在し、2次元展開した時のスポットの多くが骨格筋主要構成タンパク質であったことが考えられる。しかし、骨格筋主要構成タンパク質以外のタンパク質も検出されたことから分泌因子以外の分子探索には超遠心法は有効なのかもしれない。

血清のプロテオミクスは、血清主要タンパ

ク質除去カラム (Sigma : SEP-110)、微量タンパク質濃縮カラム (BioRad : Proteominer) をそれぞれ用いて精製を行なった。血清主要タンパク質除去カラムは、マウス血清・血漿中の、アルブミン (67kDa)、IgG (H鎖50~77 kDa、L鎖25kDa)、フィブリノーゲン (α 鎖66kDa、 β 鎖54.5kDa、 γ 鎖49kDa)、トランスフェリン (80kDa)、 α 1-アンチトリプシン (52kDa)、ハプトグロビン、IgM(900kDa)の7種に結合し、血清主要成分の85%を除去することが出来る。血清主要タンパク質除去の精製を行ったサンプルではSDS-PAGEの結果から血清主要タンパク質が除かれていることが確認され、大部分のアルブミン、IgGなどのタンパク質が除かれている事がわかる(図1左)。血清主要タンパク質除去カラムで精製したサンプルを2次元展開後、野生型マウスの結果と比較して差のあるスポットを回収、質量分析器を用いて分子同定を行なった。その結果、脂質関連分子の変動が多数確認された。これは、脂肪量が少ないというマイオスタチン阻害マウスのフェノタイプに一致する結果であった (Nakatani et al. AJP Endocrinol Metab. 2011)。

微量タンパク質濃縮カラム (BioRad : Proteominer) を用いて精製を行ったサンプルでは、未精製血清ではアルブミン、IgGのような存在量の多いタンパク質のバンドが太く見られるが、微量タンパク質濃縮カラムを用いると、もともと存在量が多いタンパク質は減少し、逆に存在量が少ないタンパク質は濃縮され新たにバンドが検出されるようになった (図1右)。精製サンプルを2次元展開し、差分の見られたスポットを質量分析器を用いて分子同定を行った所、骨に関する分子が同定された。そこでマイオスタチン欠損マウスの大腿骨を用い、骨解析を行った。

骨組織の組織標本を作製し形態観察を行うまでに時間を要したが、ヒストフィルムによるフィルム法を用いることで組織標本を作製

することが出来た。野生型マウスとマイオスタチン欠損マウスの大腿骨遠位の骨組織像を比較した所、マイオスタチン欠損マウスで海綿骨の増加が確認された (図2)。そこでより詳細な骨構造の比較を行うために小型動物用マイクロCTを用い骨解析を行った。その結果、骨病理像と同様、海綿骨の増加が確認され (図3)、骨密度の増加が確認された。これらの結果から、マイオスタチン欠損マウスにおいて骨強度の増加が予想される。血清プロテオミクスから同定された因子が直接作用しているかはまだ明らかではないが、骨形成の促進に関与している可能性がある。しかし、骨の強度は筋の物理的なストレッチにも深く関連しているため解釈は複雑であると考えられる。

血清主要タンパク質除去の精製の問題点として、サンプル血清のスタートボリュームが血清10 μ lであるため、微量タンパク質の量が検出限界以下の可能性がある。今後はカラム精製を多数回行いタンパク量を増やす、もしくは血清主要タンパク質除去後に微量タンパク濃縮を組み合わせるなど行うことで、更に血清中の変化を細かく捉えることが出来るかもしれない。また、骨格筋から分泌する因子の一部は運動後に上昇することが明らかになっているので、運動後の血液の変化についても同様のスクリーニングを行う予定である。

図1

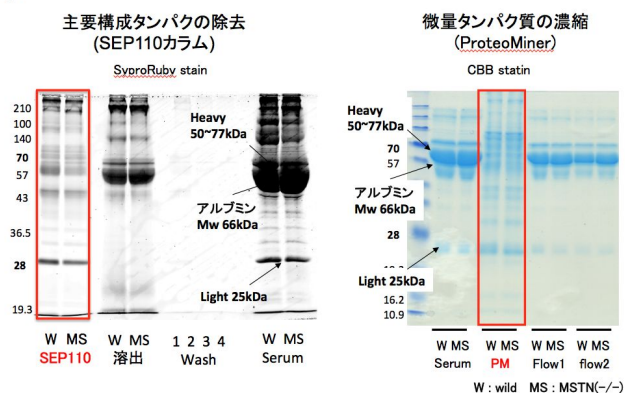


図2

HE染色
大腿骨遠位

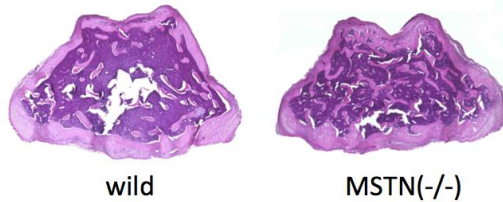
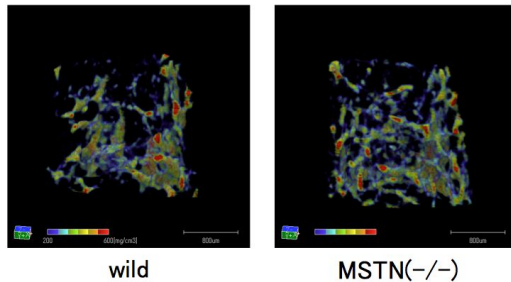


図3

CT解析
大腿骨遠位の海綿骨を抽出



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 2 件)

Uezumi A, Fukada S, Yamamoto N, Ikemoto-Uezumi M, Nakatani M, Morita M, Yamaguchi A, Yamada H, Nishino I, Hamada Y, Tsuchida K
Identification and characterization of PDGFR α + mesenchymal progenitors in human skeletal muscle.
Cell death & disease 5 e1186 2014 (査読あり)

Hitachi K, Nakatani M, Tsuchida K
Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression.
Nanoscience and Nanotechnology Letters 5(3)402-407 2013 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

中谷直史
骨格筋分泌因子の探索
第 33 回日本肥満学会、2012 年 10 月 11 日、
ホテルグランヴィア京都

中谷直史
骨格筋分泌因子の探索
第 35 回日本肥満学会、2014 年 10 月 24 日、
宮崎シーガイアコンベンションセンター

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
総合医科学研究所・難病治療学研究部門
<http://info.fujita-hu.ac.jp/~nanbyou/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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