

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850169

研究課題名(和文)反芻動物の筋組織発達におけるケメリンおよびその受容体の作用究明

研究課題名(英文)Effect of chemerin and chemerin receptor on development of ruminant skeletal muscle

研究代表者

宋 相憲 (SONG, SANG HOUN)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：50617074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ケメリンおよびケメリン受容体が反芻動物の骨格筋発達に及ぼす影響について調査した。その結果、1)脂肪細胞の脂質蓄積によりケメリン遺伝子発現量が変動した。2)ケメリンおよび筋細胞のケメリン遺伝子受容体の発現量により筋細胞の増殖・分化を制御した。3)肥育期間中のウシの筋組織でのケメリン受容体遺伝子発現量が変動した。

以上の結果は、肥育期間の脂肪組織から分泌するケメリンがその受容体を介して筋組織発達を調節する可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of chemerin and chemerin receptor on development of ruminant skeletal muscle.

<Results>

1)adipocyte chemerin mRNA expression was changed by induction of lipid accumulation. 2) chemerin receptor and chemerin regulated differentiation and proliferation of ruminant myocytes. 3)mRNA expression of chemerin receptor was changed during the fattening period. These results suggest that chemerin regulates the development of ruminant skeletal muscle via chemerin receptor.

研究分野：動物生理

キーワード：ケメリン ケメリン受容体 反芻動物 筋発達

## 1. 研究開始当初の背景

ケメリン (Chemerin) は、脂肪組織と肝臓で主に分泌され、その作用は、ケメリン受容体 (CKMR1) を介し、炎症反応や、脂質代謝、そして糖代謝などを調節する新規サイトカインとして知られている。また、ケメリン受容体は、肝臓組織および脂肪組織の他にも消化器官や筋組織に分布すると知られているが、ケメリン受容体が存在する組織に対するケメリンの作用については不明な点が多く残されている。特に、筋組織内には筋内脂肪細胞が存在することから、筋組織におけるケメリンの作用を明確にすることは重要と考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では反芻動物である日本黒毛和種牛およびそのモデル動物としてメンヨウの筋組織発達および筋内脂肪組織発達におけるケメリンの調節作用可能性に着目し、これまで知られているケメリンの代謝生理的作用と別に筋細胞の発達過程によるケメリンの応答反応を調査する共に、脂肪細胞、筋細胞の増殖および分化におけるケメリンの機能解析を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試試料

試料として日本黒毛和種去勢牛および反芻動物のモデル動物としてサフォーク去勢ヒツジから採取した異なる2ヶ所の筋組織 (半腱様筋、腰最長筋)、筋周囲脂肪組織および酵素処理法により単離した培養筋芽細胞および培養前駆脂肪細胞を作成し実験に用いた。

### (2) 筋芽細胞・脂肪前駆細胞の増殖および分化

培養筋芽細胞および前駆脂肪細胞の増殖培養は FBS が 10%、抗生物質が 1% 含まれた DMEM/F-12 培地下で 96 時間培養した。細胞数は Cell Counting Kit-8 (同仁化学社) を用いて比色法により測定した。筋芽細胞の筋分化誘導は、馬血清を 2%、抗生物質を 1% 含んだ DMEM 培地を用いて 5 日間行い、顕微鏡による観察および遺伝子発現分析を行った。前駆脂肪細胞の分化は、FBS10%、抗生物質 1%、インスリンを含む基本分化培地を用いて 12 日間分化刺激を行い、TZD、脂肪酸、ケメリンなどの添加による脂質蓄積を Oil red O 染色法による調査と共に Total RNA 抽出を行った。

### (3) 遺伝子発現量の調査

本実験に用いられた反芻動物の組織および培養細胞の遺伝子発現を調べるため、NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ社) および RNAiso Plus (タカラバイオ社) を用いて Total RNA 抽出し、RT-PCR 法によりケメリンとその受容体、筋発達関連遺伝子 (Myogenin, MyoD, Myf 5 など) の発現を調査した。(Real time PCR または 1.5% アガロースを用いた電気泳動法)

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪細胞におけるケメリン遺伝子の発現動態

反芻動物脂肪細胞の脂質蓄積量とケメリン遺伝子発現量の関連性を調査するためウシのモデル動物としてメンヨウの培養前駆脂肪細胞を用いた。INS, DEX, IBMX を含む分化培地を control とし、酢酸、デカン酸およびパルミチン酸をそれぞれ 100 $\mu$ M 含む 3 種類の分化培地下で 12 日間分化刺激を行った。その結果、脂肪酸処理による脂質蓄積の増加を観察し (図 1.a)、色素抽出法を用いた脂質蓄積調査でも脂肪酸添加により脂質蓄積が増加した (図 1.b)。さらに、ケメリン遺伝子の発現量は、脂質蓄積量と共に増加した (図 1.c)。

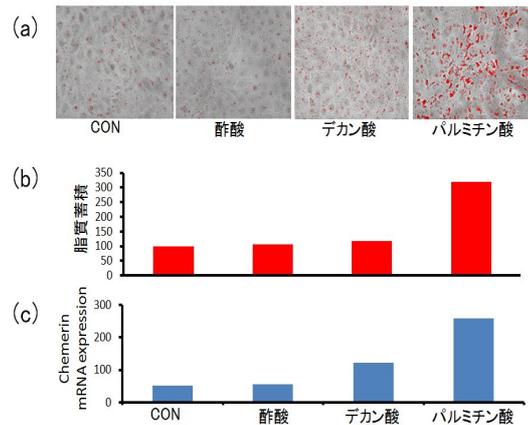
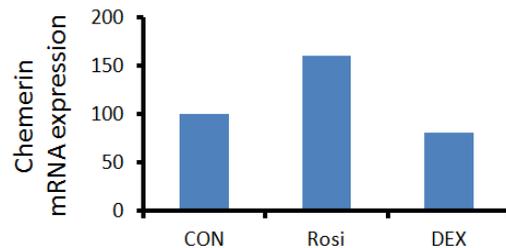


図 1. 培養脂肪細胞の脂質蓄積量におけるケメリン遺伝子の発現

脂肪細胞の分化においてマスター調節因子として知られている PPAR は、troglitazone や、rosiglitazone などの thiazolidinedione により発現誘導が可能であると知られている。一方、DEX(dexamethason)は、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を阻害することが報告されている。そこで、これらの物質が脂肪細胞のケメリン遺伝子発



現に及ぼす影響を調査した結果、12 日間の分化  
図 2. ケメリン遺伝子の発現に rosiglitazone および dexamethason の影響

誘導期間中のケメリン遺伝子の平均発現量が rosiglitazone により増加し、dexamethason により減少することから、脂肪細胞でのケメリン遺伝子発現は、脂質蓄積の増大、PPAR の発現および炎症反応にも深く関連している可能性が示唆された。

### (2) 筋細胞の増殖および分化におけるケメリン受容体 (CKMR1) の発現動態

ウシの筋組織を由来とする筋芽細胞を 96 時間培養を行った。ウシ筋芽細胞増殖は、培養開始

72 時間まで増殖率が増加し、その後、ゆるやかに増殖した（図 3 . a）。細胞増殖期間中におけるケメリン受容体遺伝子の発現量は、培養開始 48 時間まで増加し、その後 96 時間まで減少した（図 3 . b）。筋芽細胞を密集率が 90% 以上

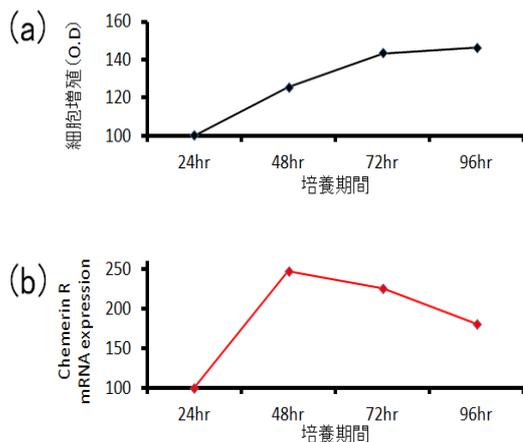


図 3 . ウシ筋芽細胞の増殖におけるケメリン受容体遺伝子の発現動態

の状態になってから筋分化誘導培地で 5 日間刺激後、筋関形成を観察し（図 4 . a）、筋分化関連因子である Myogenin、MyoD、Myf 5 およびケメリン受容体遺伝子の発現を調査した結果、

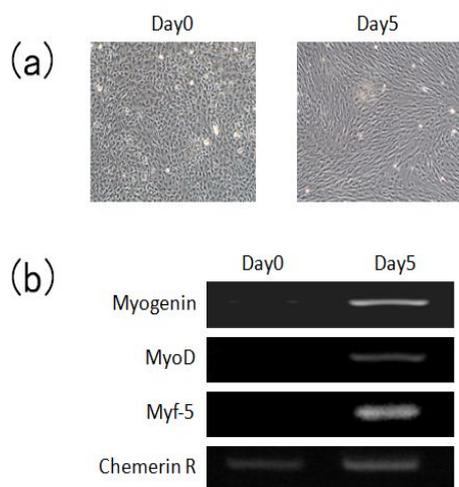


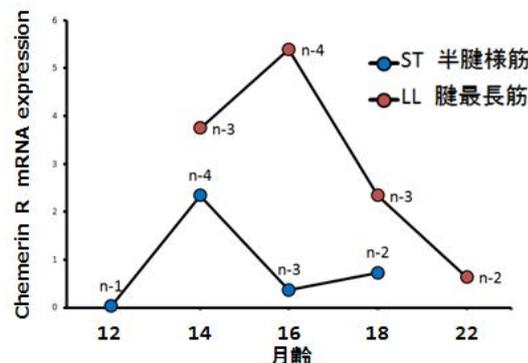
図 4 . ウシ筋芽細胞の分化におけるケメリン受容体遺伝子の発現動態

筋分化誘導により筋分化関連遺伝子と共にケメリン受容体遺伝子発現が増加した（図 4 . b）。これらの結果は、筋細胞の増殖・分化過程においてもケメリン受容体の発現が密接な関連性を持つことが示唆された。

### (3) ウシの肥育期間における筋組織でのケメリン受容体の発現変動調査

肥育期間中の 12~22 ヶ月齢のウシ（1 4 頭）半腱様筋および腰最長筋におけるケメリン受容体の発現量変化は、肥育開始 2 ヶ月目から増加し、その 2 ヶ月後から減少する傾向がみられた。異なる両筋組織でのケメリン受容体遺伝子の発現量は、

半腱様筋より腰最長筋の方が高い値をしめした（図 5）。肥育期は全体の飼育期間において最も筋内脂肪含量が増大する期間であると知られて



おり、半腱様筋および腰最長筋での筋内脂肪形  
図 5 . ウシ肥育期間中の筋組織におけるケメリン受容体

成量異なることから、反芻家畜の脂肪組織および筋組織の間ではケメリンおよびケメリン受容体を媒介する細胞調節機構が存在する可能性が考えられる。

### (4) 筋芽細胞の増殖に及ぼすケメリンの影響

ウシ筋芽細胞の増殖におけるケメリンの影響を調べるため、基本増殖培地、10 $\mu$ g/ml のケメリンを含む増殖培地および NETA (alphanaphthoyl ethyltrimethylammonium iodide) を同時に処理し、24 時間増殖培養を行った（図 6）。その

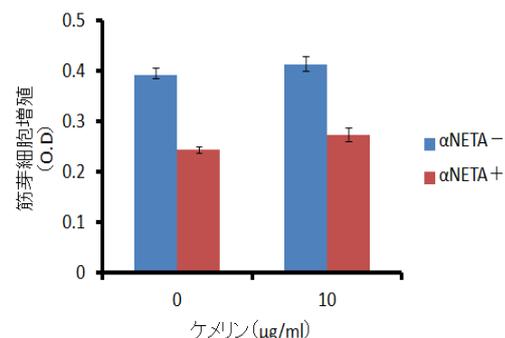


図 6 . 筋芽細胞の増殖におけるケメリンおよび NETA の影響

結果、ケメリン処理区細胞の増殖は、ケメリン無処理区の細胞増殖量と比べ増加の傾向が見られた。さらに、ケメリン受容体の阻害剤として知られている

NETA の処理は、細胞の増殖を有意に減少した。

NETA およびケメリンを同時に処理した実験区での細胞増殖は、NETA のみ処理区と比べ細胞数増加の傾向が見られた。培養前駆脂肪細胞を用いた実験でも筋芽細胞での実験と同様な結果が得られたことから、ケメリンは筋・脂肪細胞の増殖を促進する機能を持つ可能性が考えられた。

### (5) 前駆脂肪細胞および筋芽細胞の分化に及ぼすケメリンの影響

前駆脂肪細胞の脂質蓄積および筋芽細胞の分化におけるケメリンの影響を調査した。10 $\mu$ g/ml の

ケメリンを含む脂肪細胞分化誘導培地で 12 日間分化刺激を与え、oil red o 染色抽出による吸光度分析では、ケメリン処理区の脂質蓄積量がケメリン無処理区と比べ、脂質蓄積量の有意に増加

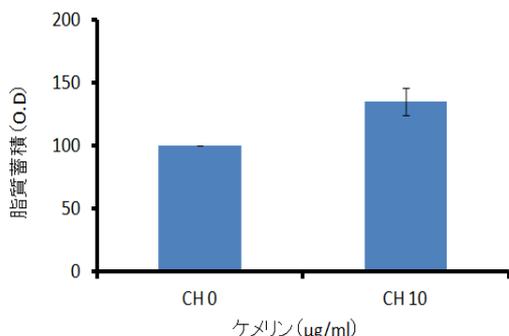


図 7 . 脂肪前駆細胞の脂質蓄積におけるケメリンの影響

した (図 7)。脂肪細胞分化関連遺伝子である PPAR 2 遺伝子発現量はケメリン刺激により分化 6 日まで増加、12 日目まで減少する傾向が見られ (図 8)、αP2 遺伝子の発現量はαNETA 処理

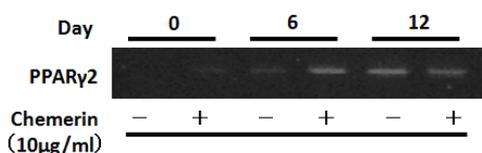


図 8 . 脂肪前駆細胞の PPAR 2 遺伝子発現に及ぼすケメリンの影響

により減少した (図 9)。さらに、筋芽細胞の分化関連因子として知られている MyoD および Myf-5 遺伝子の発現もケメリンを含む筋分化培地による刺激により増加する傾向が見られた (図 10)。

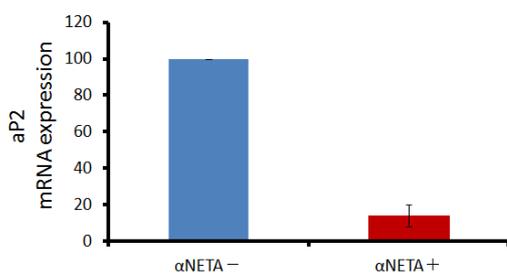


図 9 . 脂肪前駆細胞の aP2 遺伝子発現におけるケメリン受容体阻害剤の影響

本実験の結果から得られた実験結果をまとめると、反芻動物の栄養状態による体内循環脂肪酸の変化、脂肪の分化程度によりケメリンを分泌し、自己分泌による前駆脂肪細胞の増殖・脂質蓄積量を調節する可能性、そして、筋組織の増殖・筋分化を制御する機能を持つことが分かった。さらに、ケメリン作用には、ケメリンの有無と共にケメリン受容体の発達程度も重要であることが示唆された。以前、ケメリンは成熟脂肪細胞での脂質分解を誘導することが報告されているが、成熟以前の段階の細

胞においては脂質蓄積を高める可能性が本研究により確認したことから、ケメリンの脂質分解および脂質蓄積機能は、脂肪細胞内の脂質蓄積含量、又は、脂肪細胞の成熟程度により変化することが

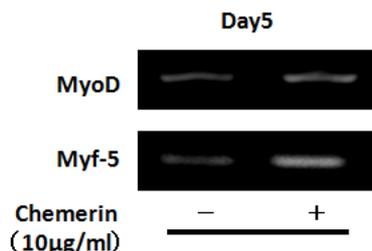


図 10 . 筋細胞の筋分化関連遺伝子発現に及ぼすケメリンの影響

考えられる。さらに、ウシの筋組織におけるケメリン受容体の発現が、栄養状態および脂肪組織の含量が異なる部位によって増減したことはケメリンが反芻動物の脂肪組織および筋組織の割合を調節する因子の一つであることを示唆する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 宋 相憲・就 哲也・松本卓也 . メンヨウ前駆脂肪細胞の増殖および分化におけるケメリンの影響 . 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市) . 2015 年 12 月.
2. 木下晋吾・一戸俊義・宋 相憲 . 異なる炭素鎖長の脂肪酸が反芻動物前駆脂肪細胞の脂質蓄積に与える影響 . 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市) . 2015 年 12 月.
3. 就 哲也・一戸 俊義・宋 相憲 . 反芻動物前駆脂肪細胞の分化過程におけるパルミチン酸およびデキサメタソンの chemerin 遺伝子の発現調節 . 第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会 (神戸市) . 2015 年 12 月.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

宋 相憲 (SONG SANG HOUN)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号 : 50617074