

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658222

研究課題名(和文) 脂肪細胞はなぜ筋肉内に脂肪組織を構築できるのか？ - 霜降り肉形成機構解明への挑戦 -

研究課題名(英文) Remodeling of the intramuscular connective tissues by adipocytes in skeletal muscle

研究代表者

西邑 隆徳(Nishimura, Takanori)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：10237729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：肉用家畜の肥育過程で霜降り肉が形成される際に、筋線維が充満した骨格筋内で「脂肪細胞がどのようにスペースを確保し脂肪組織を構築するのか？」という未解明課題を細胞培養法や筋肉内脂肪蓄積が優位となるモデルマウスを用いて追求した。脂肪細胞は骨格筋の支持組織である筋肉内結合組織上で増殖・分化し、成熟脂肪細胞が周辺の筋肉内結合組織構造を改変しているのが観察された。また、モデルマウスを用いた実験でも骨格筋内に脂肪組織が構築される際には、既存の筋肉内結合組織を改変している様子が観察された。以上の結果は、脂肪細胞が自らに適した環境に筋肉内結合組織を改変していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In well fattened beef cattle, the intramuscular fat deposits mainly in the intramuscular connective tissues (IMCT) between muscle fiber bundles, resulting in marbling in meat. However, it is still unknown how adipocytes grow in the niche between muscle fiber bundles. In this study, we investigated effects of adipocytes on the remodeling of IMCT in vitro and in vivo. First, we established a new cell culturing method using the intact IMCT as a scaffold for adipocytes and showed that adipocytes partially remodeled the IMCT after 14 days culturing. Next, we examined the structural changes in IMCT in glycerol-injected fatty degenerating muscle, which has been reported to induce adipose tissue development in skeletal muscle. We observed adipose tissues surrounding fibrous connective tissues particularly in the peripheral region of injected muscle at 10 days after injection. These results suggest that adipocytes could remodel the IMCT to the suitable environment for themselves.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：脂肪交雑 脂肪細胞 筋肉内結合組織 骨格筋 細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

筋肉内脂肪(脂肪交雑)は食肉の品質を決定する重要な要素である。霜降り牛肉は独特の食感とフレーバーを持つことから国内のみならず海外のマーケットでも需要が高く、我が国の農業戦略上、重要な輸出農産物の一つとして期待されている。

私たちは、これまで、家畜の成長に伴う筋肉内結合組織(IMCT)の変化を分子・細胞・組織レベルで詳細に検討し、筋肉内脂肪組織が発達した骨格筋(黒毛和種肥育牛の胸最長筋など)では、筋線維(束)を取り囲むIMCT構造が著しく変化していることを明らかにした(Nishimura et al., 1996; 1998; 1999; 2001; 2009)。しかし、そのメカニズムは不明であった。

成熟した骨格筋内で脂肪組織が蓄積するためには、既に構築されている筋線維(筋細胞)に適したIMCTを一旦破壊して「脂肪細胞に適した細胞外マトリックス」に再構築(リモデリング)することが必須となる。すなわち、脂肪細胞が増殖・分化できるようなスペースを骨格筋内に確保し、脂肪滴を蓄えた成熟脂肪細胞を支持するのに適した細胞外マトリックスへとリモデリングすることが必要不可欠である。脂肪細胞の増殖・分化のメカニズムおよびその調節機構に関しては、これまでに多くの研究成果が得られているが、骨格筋内で脂肪細胞が増殖・分化する際にIMCTをどのようにリモデリングするかについては未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、脂肪細胞によるIMCTリモデリング機構を解明することを目的に、(1)コラーゲンゲル中で培養した脂肪細胞がコラーゲンマトリックス構造に及ぼす影響を検討するとともに、(2)IMCTを培養基質とする*in vitro*脂肪細胞培養系を確立し、この新規培養系を用いてIMCTリモデリング様相を組織形態学的に検討した。さらに、(3)筋肉内脂肪組織形成を誘発する*in vivo*モデル系を用いて脂肪組織蓄積に伴うIMCTリモデリング様相を*in vivo*で検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)コラーゲンゲル中での脂肪細胞培養

コラーゲン溶液(Ⅰ型)を35 mm ディッシュに添加し、37 °C で1時間静置してゲル化させた後、このゲル上に3T3-L1脂肪前駆細胞を播種し10%FBS-DMEMで培養した。培養24時間後に、培養液を除去した後、同様にコラーゲン溶液を添加して細胞を挟むようにゲルを形成させた後、培地を添加して培養を継続した。また、脂肪細胞の産生するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がコラーゲンゲル構造に及ぼす影響を検討するために、MMP阻害剤(30 nM MMP Inhibitor あるいは27 nM GM6001)を含む培養液で同様の培養実

験を行った。

### (2)IMCT培養基質上での脂肪細胞培養

ラットの前脛骨筋を採取し、我々が開発した無固定細胞消化法(骨格筋試料を固定せずに、0.1 N NaOHに6日間浸漬した後に0.3 N NaOHに1日間浸漬して細胞成分を除去する方法)を用いて、IMCT標品を調製した。このIMCT標品をOCTコンパウンドに包埋し凍結した後、クリオスタットで厚さ300 μmの切片を作製した。これをエタノールで殺菌して培養基質(IMCT基質)とした。このIMCT基質上に3T3L1脂肪前駆細胞あるいはC2C12筋芽細胞を播種し培養した。脂肪前駆細胞は増殖培地で培養した後、脂肪分化誘導培地で2日間培養し、その後、脂肪分化維持培地に切り替えて培養を継続した。筋芽細胞は増殖培地で2日間培養した後、筋分化培地に切り替えて培養を継続した。経時的にIMCT培養基質を固定・染色し走査電子顕微鏡でその構造を観察した。

### (3)筋肉内脂肪組織形成を誘発する*in vivo*モデル実験

供試動物として8週齢の雄マウスを用いた。混合麻酔薬をマウス腹腔内投与した後、Uezumiらの方法(2010)に準じて、50%グルセロール溶液あるいは10 μM Cardiotoxin (CTX)溶液50 μlを前脛骨筋に注入した。注入後0、4、7、10および14日目に前脛骨筋を採取し、2.5%グルタルアルデヒドで固定した後、HE染色法ならびに走査電子顕微鏡観察法で、脂肪蓄積に伴う結合組織構造の変化を調べた。また、筋組織の再生の指標としてneonatal myosinの発現を、活性化した筋衛星細胞の指標であるSema3Aの発現を、それぞれの特異的抗体を用いた間接蛍光抗体法で調べた。なお、上記動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」(2002)に基づき、北海道大学実験委員会の承認を得て行った。

## 4. 研究成果

### (1)脂肪細胞がコラーゲンマトリックスに及ぼす影響

型コラーゲンゲル中で3T3-L1脂肪前駆細胞を培養し、その分化様相ならびにコラーゲンゲル構造の変化を観察した。培養6日目にはコラーゲンゲルが脂肪前駆細胞に覆われ、脂肪前駆細胞の周りに穴が見られていた。培養22日目には、成熟脂肪細胞の周りに細いコラーゲン線維のネットワークが認められ、コラーゲンゲル構造が脂肪細胞によってリモデリングされることが示された。

これらのゲル構造変化に脂肪細胞が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)によるものか否かを調べるために、MMP inhibitor あるいはGM6001を培地に添加し脂肪細胞をコラーゲンゲル内で培養した。し

かし、予想に反して、コラーゲンゲル構造に阻害剤無添加の対照区との差は見られなかった。以上の結果は、脂肪細胞が産生するMMPが直接的にコラーゲンゲル構造の改変に関わっているわけではないことを示唆している。

## (2) 脂肪細胞が IMCT 構造に及ぼす影響

IMCT 基質に脂肪前駆細胞あるいは筋芽細胞を播種して培養したところ、両細胞ともに6時間以内にIMCT基質に接着していることが確認でき、また、それぞれを分化誘導した結果、IMCT 基質上で脂肪前駆細胞は成熟脂肪細胞に、筋芽細胞は筋管に分化し、これらの細胞をIMCT 基質上で長期間培養することが可能であった。以上の結果、本研究で開発したIMCT 基質は脂肪細胞および筋細胞の培養に適していることが示された。

そこで、このIMCT 基質培養系を用いて、脂肪細胞が増殖・分化する間に、IMCT 構造がどのように変化するかを調べた。分化誘導後4日目では、増殖した脂肪前駆細胞が扁平になって、IMCT 基質の上に接着していた。しかし、細胞を播種していない対照区と比べ、脂肪前駆細胞を培養したIMCT 基質の構造に違いは見られなかった。分化誘導後10日目では、脂肪滴を蓄えて成熟した脂肪細胞がIMCT 基質に多数みられた。IMCT 基質を高倍率で観察すると、成熟脂肪細胞周囲のコラーゲン線維が凝縮しているのが観察された。分化誘導後14日目では、成熟脂肪細胞が集合してクラスターを形成しており、成熟脂肪細胞の周囲ではコラーゲン線維構造が疎な網目構造となっているのが観察された。これらの構造は、対照区では認められず、成熟脂肪細胞が自らに適したECM環境に既存のIMCTをリモデリングしたものと考えられた。

## (3) 生体骨格筋における脂肪蓄積が IMCT 構造に及ぼす影響

(1) および(2)で検討したin vitroモデル系は脂肪細胞がIMCT構造に及ぼす影響を比較的簡単に検討できる実験系であるが、生体内ではより複雑な環境下で骨格筋内に脂肪組織が蓄積し、それに伴うIMCTのリモデリングが起こっているものと思われる。そこで、生体内環境で筋肉内脂肪蓄積に伴うIMCTの構造変化を調べるために、Uezumiら(2010)の方法に従い、グリセロール注入マウス骨格筋をモデルに、脂肪細胞によるIMCTリモデリング様相を検討した。

まず、50%グリセロール(v/v)をマウスの前脛骨筋に注入し、その後凍結切片を作製してヘマトキシリン・エオジンで染色して観察した。比較対照として、カルディオトキシン(CTX)を注入して筋損傷を与えた場合の骨格筋の構造変化を同様に観察した。CTXを注入したマウス骨格筋は、注入後4日目には、

筋線維がほとんど崩壊し、間質には多くの細胞が集まっていた。7日後には、中心核を有する再生している筋線維が観察され筋再生が始まっており、また、間質には結合組織様の線維状構造が見られた。注入後10日目では筋再生が進んでおり、間質が少なくなり、中心核を有する筋線維や複数核を持つ筋線維が密に集合している様子が認められた。注入14日目では、ほぼ注入前の太さの筋線維が密に集合しており、筋再生がほぼ完了していた。一方、グリセロールを注入した場合は、注入後4日目では、一部に筋線維の崩壊がみられるものの、まだ形状を保った筋線維が多く見られ、CTX注入の場合のような劇的な筋線維の分解は見られなかった。しかし、筋線維の間隙が広まっており、筋線維を取り囲む結合組織構造も壊れているようであった。グリセロール注入後7日目では、間隙が多く見られ、間隙には線維状の構造が見られ、また、中心核を有する筋線維がまばらに存在しているのが観察された。グリセロール注入後10~14日目には、再生した筋線維の間に脂肪細胞が集合しているのが観察された。

次に、グリセロール注入後の骨格筋の構造変化をSEMで観察した。グリセロール注入前の骨格筋では、筋線維が密に集合した筋線維束が明瞭に見られた。グリセロール注入後2~4日目には筋線維が萎縮・崩壊し間隙が多く見られた。7日目以降には間隙に球状の細胞が見られるようになり、14日目にはさらに大きくなった球状の細胞が間隙を埋めるように存在しているのが見られた。さらに高倍率で観察したところ、注入後4~7日目には筋線維間に生じた間隙に小さな粒状の構造が見られ、10日目になると、筋線維間に詰まっていた線維状物質が見えなくなり、20 μm程度の球状の細胞と思われる構造物が筋線維間に多くみられた。14日目になると、これらがクラスター状に集合し、そのクラスターの表面にコラーゲン線維様の線維構造、あるいはこれらを覆う膜様構造も認められた。

さらに、グリセロール注入によって脂肪組織新生が進行する骨格筋では結合組織構造がどのように変化するかを細胞消化/SEM法で検討した。注入前の骨格筋では筋内膜の蜂の巣状構造および筋周膜の層構造が明瞭に認められた。CTX注入した場合は、4日目に筋内膜構造の崩壊が認められたが、7日目には既に筋内膜の蜂の巣構造が見られ、その後日数の経過に伴って、筋内膜の鞘が大きくなっていくのが観察された。一方、グリセロールを注入した場合は、4~7日目には筋内膜の鞘構造が崩壊し蜂の巣状構造がほとんど見られなかった。10日目以降には筋内膜の蜂の巣状構造が見られるようになったが、一部崩壊している部分が見られた。高倍率で観察すると、CTX注入筋では筋再生に伴って筋内膜の鞘構造が速やかに再生されているのに対して、グリセロール注入筋では、筋内膜の鞘構

造が再形成されない部分があり、そこではコラーゲン細線維の疎な膜構造が見られた。

グリセリン注入筋では、筋組織の再生の指標となる neonatal myosin 陽性細胞は注入後 7 日目および 10 日目で検出できたが、14 日目では検出できなかった。一方、筋量抑制因子であるミオスタチンはグリセリン注入後 4 日目から検出されはじめ、7 日目にピークを迎えたが 10 日以降は検出できなくなった。また、グリセリン注入によって筋衛星細胞が短期間で一時的に活性化した。すなわち活性化した筋衛星細胞の指標である Sema3A が、注入後 4 日目に組織全体で検出できたが、それ以降は検出レベルが低くなり、10 日目以降は検出できなくなった。一方、脂肪細胞でも Sema3A の分布が確認できた。これらの結果は、筋衛星細胞が損傷後の骨格筋内での脂肪分化に關与する前駆細胞の 1 つであるかもしれないこと、そして、これらがミオスタチンの産生動態と同期していたことから、脂肪の蓄積がミオスタチンの制御下にある可能性を示唆している。

#### 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 1 件)

Hosaka Yoshinao Z, Ishibashi Mika, Wakamatsu Jun-ichi, Uehara Masato, Nishimura Takanori. Myostatin regulates proliferation and extracellular matrix mRNA expression in NIH3T3 fibroblasts. Biomedical Research, 2012, 33, 355-361. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

松本しおり、若松純一、西邑隆徳。筋細胞との共培養が脂肪前駆細胞の分化に及ぼす影響。第 116 回日本畜産学会大会 (2013 年 3 月 27-30 日、安田女子大学、広島市) 口頭発表

雷 暁瑩・鈴木健司・若松純一・西邑隆徳：筋肉内結合組織を培養基質とした脂肪細胞培養系の確立。第 117 回日本畜産学会大会 (2013 年 9 月 9-10 日、新潟大学、新潟市) 口頭発表

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし。

#### 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

保坂 善真 (HOSAKA Yoshinao)

鳥取大学・農学部共同獣医学科・教授

研究者番号：00337023