

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18028

研究課題名（和文）Myostatinによる未分化間葉系細胞の腱細胞への分化誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which Myostatin induces differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into tendon cells

研究代表者

北村 陽（Kitamura, Yo）

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00836033

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：マウス未分化間葉系幹細胞株C3H10T1/2を用い、未分化間葉系細胞から腱細胞への分化誘導を効率的に行う培養系を確立した。Myostatinは未分化間葉系細胞が腱細胞への分化誘導を促進することがReal time PCR法、免疫染色により明らかにすることができた。またMyostatinの拮抗蛋白であり、腱形成を抑制すると報告されているFollistatinの作用についてReal time PCR法にて検討した。FollistatinはMyostatinの腱分化誘導作用を抑制し、腱分化誘導を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱組織の恒常性維持や損傷後の修復において重要な役割をなす腱細胞に関する研究は、他の筋骨格系組織の細胞に比べ著しく遅れており、分化のメカニズムについても未だ不明な点が多い。その要因の一つとして腱細胞の分化を観察するための再現性の高い培養系が確立されていない点が挙げられる。本研究により、より未分化間葉系細胞をMyostatinの刺激により腱細胞へ分化させる培養系を確立したことで、さらなる研究により腱細胞の一連の分化メカニズムをより詳細に解明することが可能となり、将来的には腱治癒促進する創薬につながる可能性を期待できる。

研究成果の概要（英文）：Using the mouse undifferentiated mesenchymal stem cell line C3H10T1/2, we established a culture system to efficiently induce differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into tendon cells, and showed that Myostatin promotes differentiation of undifferentiated mesenchymal cells into tendon cells by Real time PCR and immunostaining. The effects of Follistatin, an antagonist protein of Myostatin that has been reported to inhibit tendon formation, were also examined by Real time PCR, suggesting that Follistatin may inhibit the induction of tendon differentiation by inhibiting the differentiation-inducing effect of Myostatin.

研究分野：整形外科

キーワード：腱分化 未分化間葉系細胞 Myostatin Follistatin

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腱組織の恒常性維持や損傷後の修復において重要な役割をなす腱細胞に関する研究は、他の筋骨格系組織の細胞に比べ著しく遅れており、分化のメカニズムについても未だ不明な点が多い。その要因の一つとして腱細胞の分化を観察するための再現性の高い培養系が確立されていない点が挙げられる。申請者らはこれまでに Myostatin(GDF8)の刺激により、マウス筋芽細胞株 C2C12 を腱細胞へ効率的に分化させる培養系を確立した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、より未分化な間葉系細胞を Myostatin の刺激により腱細胞へ分化させる培養系を確立し、腱細胞の一連の分化メカニズムをより詳細に解明することである。本研究によって、腱細胞分化をコントロールし腱組織を再生させる新たな治療法に向けた研究基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 未分化間葉系幹細胞から腱前駆細胞への分化を誘導する培養系の確立

マウス未分化間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 を低血清培地で培養し、TGF- 1,2,3, FGF2 および Myostatin の濃度ならびに刺激時間について検討を行う。腱前駆細胞への分化については、リアルタイム PCR による腱前駆細胞の分化マーカーである Scleraxis(Scx)の定量により評価し、腱細胞への分化については腱細胞の分化マーカーである Tenomodulin (Tnmd) の定量と免疫染色による組織学的評価を行う。その他、腱細胞の分化に重要な転写因子である Mohawk(Mkx)や軟骨細胞分化マーカー(Sox9, Sox5)、脂肪細胞分化マーカー(PPAR , CEBP1)、筋細胞マーカー(MyoD, Myogenin)についても定量を行う。

2) 腱細胞分化における Follistatin の Myostatin に対する拮抗作用の確認

Myostatin とそのアンタゴニストである Follistatin(FST)は筋細胞の分化を制御するタンパクとして知られている。Myostatin ノックアウトマウスでは筋組織が著しく発達する一方で、腱が低形成となることが報告されている。また、Follistatin は C3H10T1/2 において高発現し、腱においてもその発現が確認されている。上記の培養系において、Myostatin と共に Follistatin を添加し、リアルタイム PCR により腱細胞分化マーカーの発現を解析することにより、Follistatin が腱細胞分化に対して抑制効果を示すのかを確認する。

4. 研究成果

1) 未分化間葉系幹細胞から腱前駆細胞への分化を誘導する培養系の確立

C3H10T1/2 を用い、TGF- 1,2,3, FGF2 および Myostatin を添加後7日間培養した後、リアルタイム PCR により Scleraxis、Mohawk、Tenomodulin の発現を解析した。TGF- 1,2,3, FGF2 添加群では Scleraxis と Mohawk の発現量は増加したものの、Tenomodulin の発現はむしろ抑制されていた。一方、Myostatin を添加した群では Scleraxis、Mohawk の発現は増加し、さらに Tenomodulin の発現も増加していた。(図1)

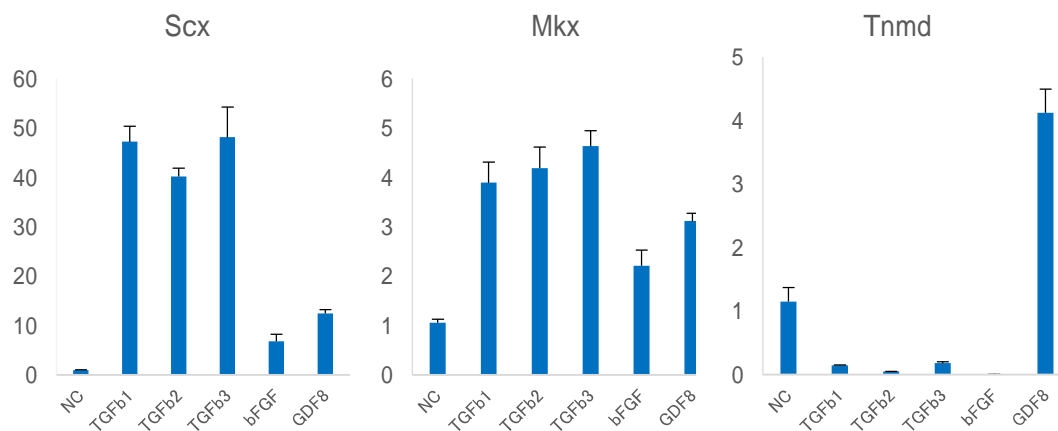


図1 各増殖因子添加による腱細胞分化マーカーの発現

また C3H10T1/2 に Myostatin を添加し 7 日間培養後、リアルタイム PCR を用いて Tenomodulin 以外の腱細胞マーカーである collagen1 鎖 (Col1 1)、Tenascin C (Tnc) の発現も解析した。その結果、いずれのマーカーも Myostatin 添加群で有意に発現が増加していた (図 2)。

さらに、同培養系において、他の間葉系細胞の分化マーカーについても発現を解析したところ、Myostatin 添加により脂肪細胞分化マーカー (PPAR , CEBP1)、筋細胞マーカー (MyoD, Myogenin) の発現は変化がなかったが、軟骨細胞分化マーカー (Sox9, Sox5) の発現は増加していた (図 3)。

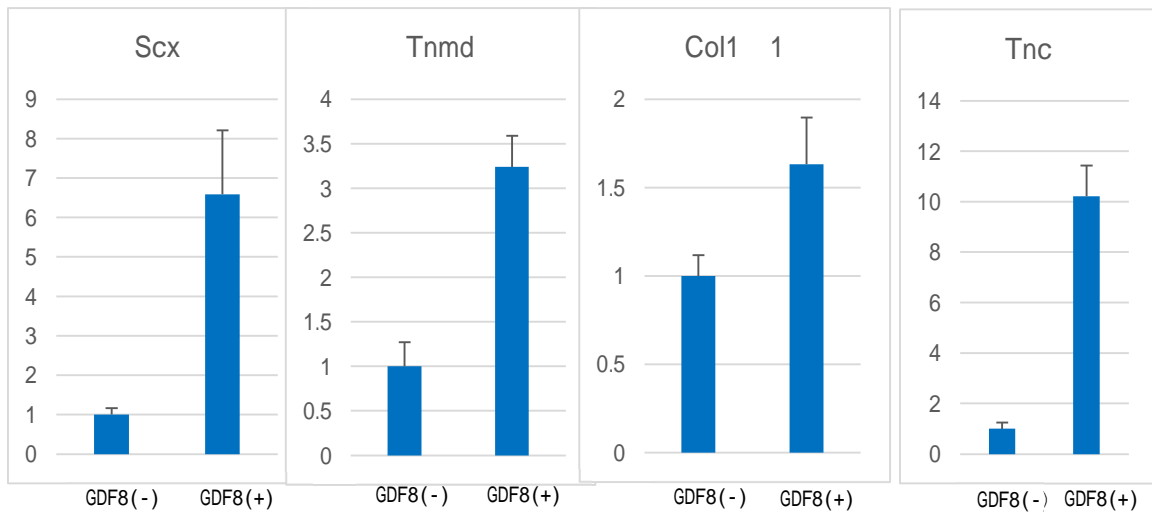


図 2 Myostatin 添加による腱細胞分化マーカーの発現

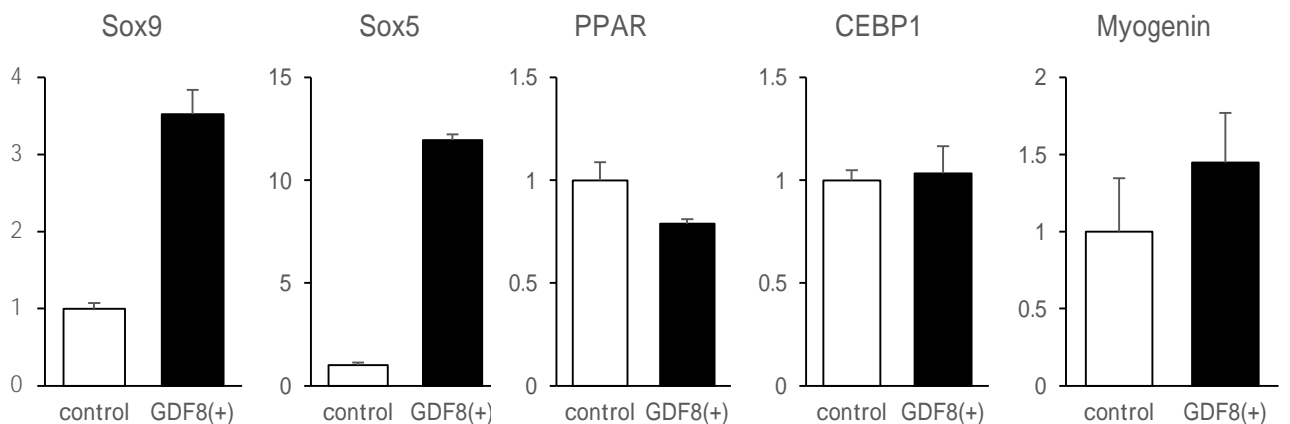


図 3 Myostatin 添加による各間葉系細胞分化マーカーの発

免疫染色により Tenomodulin の発現を確認したところ (図 4)、Myostatin を添加し 7 日間培養した群では、添加していない群に比べて Tenomodulin の発現が増加していた。

2) 腱細胞分化における Follistatin の Myostatin に対する拮抗作用の確認

C3H10T1/2 に Myostatin のみを添加した群、Follistatin のみを添加した群、Myostatin と Follistatin を両方添加した群を 7 日間培養した後、リアルタイム PCR を用いて Tenomodulin の発現量を比較した (図 5)。その結果 Myostatin のみ添加した群では Tenomodulin の発現は増加したが、Myostatin と Follistatin を両方添加した群では Tenomodulin の発現は抑制されていた。また Follistatin の

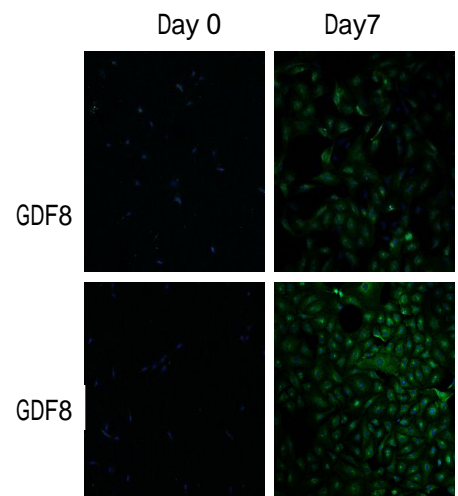


写真 1 免疫染色による tenomodulin の発現

みを添加した群も Control 群に比べて Tenomodulin の発現は抑制されていた。

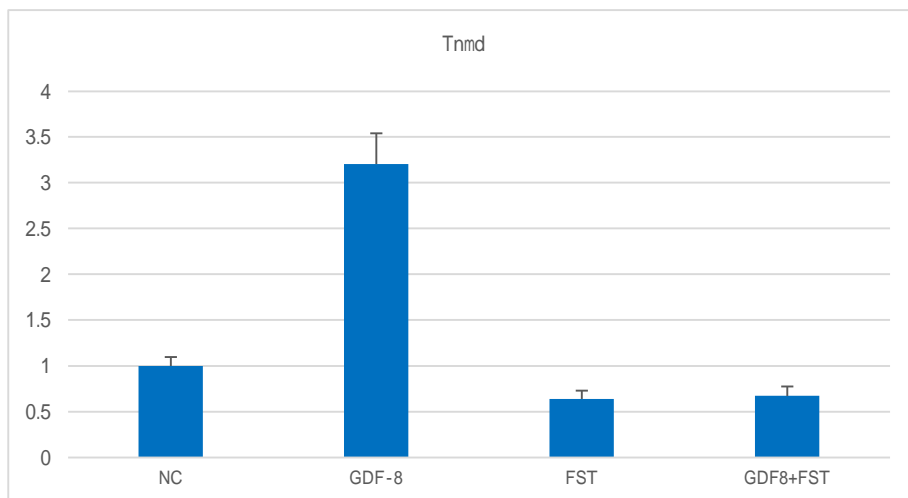


図 5 Myostatin/Follistatin 添加による腱分化マーカーの発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北村 陽
2. 発表標題 Myostatinによる未分化間葉系幹細胞の 腱細胞への分化誘導
3. 学会等名 第139回中部整形外科災害外科学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------