

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 6 月 1 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790328

研究課題名（和文） マイオスタチンによる筋線維安定化制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） Myostatin regulate the glycolysis in muscle.

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

研究成果の概要（和文）：

マイオスタチンは骨格筋の形成を抑え、マイオスタチン機能を阻害すると著しい筋肥大を生じる。本研究でマイオスタチン阻害により肥大した骨格筋において代謝関連因子の分子変動が起きていることを明らかにした。さらにマイオスタチン阻害を行なった筋ジストロフィーモデルマウスにみられる症状の緩和は、筋線維の肥大による影響が大きく、筋線維の再生促進や筋線維の崩壊抑制によるものではない事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Myostatin is a potent negative regulator of skeletal muscle growth. In this study, we found that the muscle in myostatin knockout mice changed any metabolic associated factors. In addition we crossed myostatin knockout mice with mdx mice, a model for Duchenne muscular dystrophy. The muscle in crossed mice was showed hypertrophy and hyperplasia, but the ratio of regenerating muscle fiber was nearly identical to mdx mice. Improvement of muscular dystrophy was considered hypertrophy and hyperplasia of increased muscle.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学

1. 研究開始当初の背景

マイオスタチンは骨格筋の形成を強力に抑制する分泌型タンパク質である。牛、犬、

羊、魚類をはじめ、ヒトにおいてもマイオスタチン欠損により筋肥大することが報告されている。我々はこれまでの研究でマイオス

タチン特異的阻害分子の開発に取り組み、数種類の阻害分子を得ている。我々は、作製した阻害分子はマイオスタチン阻害効果によって筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) の病態を改善することを明らかにした。また、筋肉以外でのマイオスタチン阻害による作用として、脂肪蓄積の抑制、インスリン抵抗性の改善、骨再生の促進などの作用が報告されている。マイオスタチン欠損マウスにおける一番の特徴は著しい骨格筋の肥大であるが、そのメカニズムはいまだ明らかになっていない。筋芽細胞に作用し筋分化を抑制するという報告や、マイオスタチン欠損によりタンパク質合成が促進され筋肥大が生じるといった報告など様々で、未だその作用機序は明らかになっていない。現在、マイオスタチン機能阻害は筋疾患の治療法、メタボリックシンドロームの予防薬としても注目されている。

2. 研究の目的

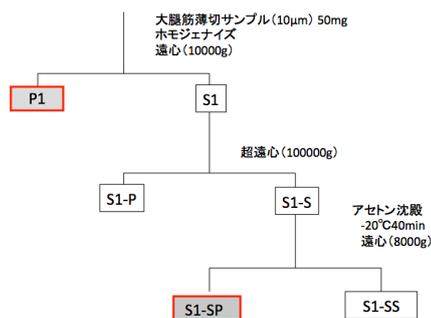
マイオスタチン阻害により肥大した骨格筋の詳細な機能解析を目的とする。

- (1) マイオスタチン阻害により肥大した骨格筋の分子変動をプロテオミクス解析の手法を用いて明らかにする。
- (2) マイオスタチン阻害を行なった筋ジストロフィーモデルマウスの骨格筋の詳細な形態解析を行なうことで、筋ジストロフィー症状の緩和メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マイオスタチン欠損マウスの骨格筋のプロテオミクス解析。マイオスタチン欠損マウスと野生型マウスの骨格筋を、プロテオミクスの手法を用い、変動タンパク質の網羅的解析を行う。骨格筋はアクチン、ミオシンなどの筋構成タンパク質が多く含まれるために未精製で2次元電気泳動を行なった場合、骨格筋構成タンパク質以外の分子を検出することは困難である。そのために2次元電気泳動前に骨格筋構成タンパク質を減らすためのサンプル精製が必要である。今回、超遠心法を用いた骨格筋分画法 (下図)、微量タン

骨格筋分画法

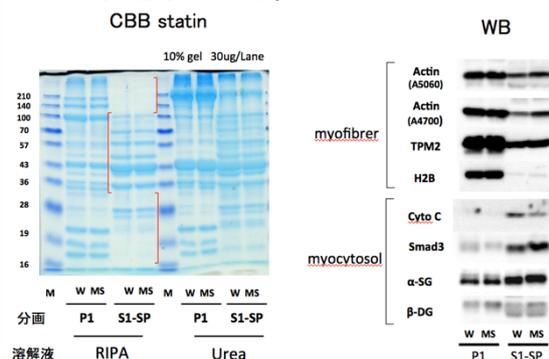


パク質の濃縮法の条件検討を行った。分離後 Western Blot 法により、筋構成タンパク質の存在量を確認した。得られたサンプル精製条件を用いて、筋構成タンパク質を除去し、2次元電気泳動によりタンパク質の分離を行い、質量分析器 (LC-MS) を用いてタンパク同定を行った。

(2) マイオスタチン欠損筋ジストロフィーモデルマウス (MSKO/mdx マウス) の骨格筋形態解析。マイオスタチン欠損マウスと、mdx マウスを交配し得られた MSKO/mdx マウスの筋病理形態を HE 染色、免疫染色法を用いて解析を行う。骨格筋線維が再生すると中心核筋線維を示す特徴を利用し、MSKO/mdx マウスと野生型マウスの前頸骨筋の再生筋線維の割合を測定する。加えて、筋線維数、筋線維面積の分布を明らかにすることで MSKO/mdx マウスの筋ジストロフィー病態改善効果と筋病理像の関係について調べた。

4. 研究成果

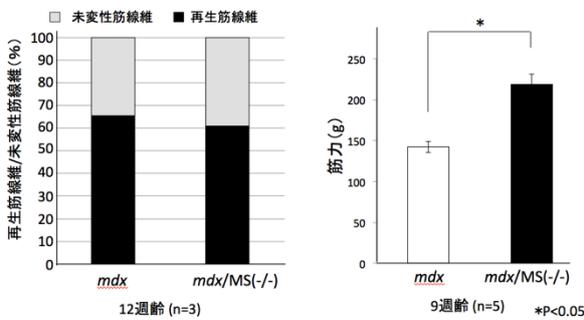
(1) マイオスタチン欠損マウスの骨格筋のプロテオミクス解析を行った結果、数種類のタンパク質の存在量の変動、タンパク質修飾の変化が確認された。まず初めに行なった骨格筋未精製サンプルにおいては、筋構成タンパク質である、actin、myosin、tropomyosin の存在量に変化が見られた。この結果はマイオスタチン欠損マウスの筋線維が速筋化するという報告と一致する結果であった。骨格筋の2次元電気泳動を行う場合、骨格筋構成タンパク質 (actin、myosin など) の存在量が多く、他に存在するタンパク質の検出が困難であった。そこで、超遠心を用いた骨格筋構成タンパク質を除く分離法と、微量タンパク質濃縮カラムを用いた精製を試みた。その結果、超遠心を用いた骨格筋分画法により骨格筋構成タンパク質の存在量を減らすことに成功した (下図左: CBB stain)。さらに、Western Blot 法により myofiber 分画、myocytosol 分画に存在するタンパク質の検出を行った結果、P1 分画で筋構成タンパク質である actin、TPM2 や核タンパク質である H2B が検出され、S1-SP 分画で CytoC、Smad3 が検出された (下図右: WB)。



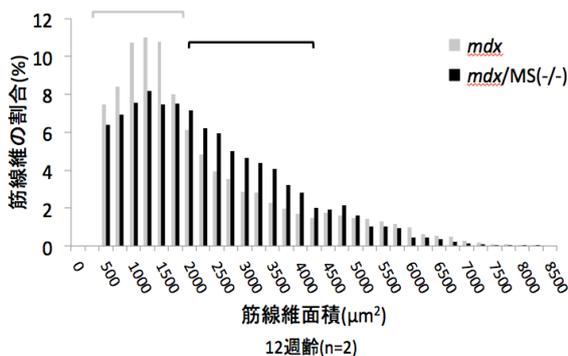
この精製法を用いて2次元電気泳動でタンパク分離を行い、変動分子の同定を行った所、代謝関連因子の分子変動が新たに明らかになった。この結果からマイオスタチン欠損マウスの筋で代謝の亢進が予想された。そこでマウスの呼吸代謝を調べた所マイオスタチン阻害マウスにおいて代謝の向上が確認された。マイオスタチン欠損マウスのプロテオミクス解析の結果から、肥大した骨格筋で解糖系の代謝が亢進しているという結果が得られた。さらにマイオスタチン欠損マウスと野生型マウスの骨格筋構成タンパク質の間に修飾の違いが確認された。

(2)MSKO/mdx マウスの筋組織形態解析から、MSKO/mdx マウスにおいても mdx と同程度の割合で再生筋線維が確認された(図上:左)。この結果から、筋ジストロフィーの特徴である筋線維の変性はMSKO/mdx マウスでも同様に生じる事が新たに明らかになった。MSKO/mdx マウスの筋ジストロフィーの病態の改善は、筋線維数の増加、筋線維面積の増加(図下)により全体の筋組織量が増加し、それにともない低下した筋力の回復が生じる(図上:右)と考えられる。MSKO/mdx マウスでは筋線維の崩壊は mdx マウスと同様に生じるが、骨格筋量の増加が筋ジストロフィー症状の緩和に働いているという事が明らかになった。

再生筋線維/未変性筋線維の割合 筋力測定(グリップ試験)



筋線維面積の分布



以上の結果から、マイオスタチン欠損マウスの骨格筋の特徴として、野生型マウスと比較して解糖系の代謝が亢進していることが明らかになった。この結果得てマイオスタチン阻害マウスの呼吸代謝を調べた所、野生型マウスよりも代謝が向上している事が明らかになり (Nakatani et al. AJP - Endocrinology and Metabolism, 2011)、骨格筋の分子変動の結果と一致していた。また、変動分子の修飾の変化、修飾部位も特定され、さらに今後解析を進めていく予定である。本研究で明らかになった代謝関連因子の変化は、マイオスタチン欠損マウスにおいて代謝が向上し、脂肪蓄積が抑えられる表現型の原因の一つであると考えられる。また、MSKO/mdx マウスの解析から、マイオスタチン阻害をおこなっても筋線維は同様に壊れることが明らかになった。筋ジストロフィーモデルマウスに見られる病態改善効果は筋線維の Hypertrophy と Hyperplasia による効果と考えられる。マイオスタチン阻害による筋肥大は様々な筋疾患、加齢による筋萎縮をはじめ、現在社会問題となっているメタボリックシンドロームの予防にも有効であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

①中谷直史、小久保正博、大澤裕、砂田芳秀、土田邦博

Follistatin-derived peptide expression in muscle decreases adipose tissue mass and prevents hepatic steatosis
American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism、査読あり、300(3)巻、2011、543-553

[学会発表] (計4件)

①中谷直史

Follistatin 改変体を用いたマイオスタチン阻害効果の応用
第136回内分泌セミナー(招待講演)、2011年12月3日、東京都千代田区丸の内2-1-1 明治安田生命ビル

②中谷直史

フォリスタチン改変体分子を用いたマイオスタチン阻害とその医学応用
第43回藤田学園医学会、2011年10月6日、藤田保健衛生大学500ホール

③中谷直史

骨格筋が他臓器へ及ぼす影響 ~筋肥大マウスを用いた解析~
第32回日本肥満学会、2011年9月23日、淡

路夢舞台国際会議場

④中谷直史

筋形成とエネルギー代謝 ～マイオスタチンを標的とした肥満抑制効果～（筋肉細胞）
第 31 回日本肥満学会（招待講演）、2010 年
10 月 2 日、前橋テルサ

〔その他〕

ホームページ等

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

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