

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450444

研究課題名(和文) 骨格筋分化を制御するコンドロイチン硫酸種の同定と機能の解明

研究課題名(英文) Identification and clarification of chondroitin sulfate subtype which controls skeletal muscle differentiation

研究代表者

保坂 善真 (HOSAKA, Yoshinao)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：00337023

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)の骨格筋分化に対する制御能を明らかにするため、骨格筋の分化過程を再現できる筋芽細胞C2C12に5種類のCS(CS-A、B、C、DおよびE)を添加し、一定期間分化誘導を行った。さらに、最も筋分化を抑制したCS種を使用し、濃度を変え分化誘導を行い、筋管中の核数から算出した筋管係数(FI)値を筋分化の評価指標とした。その結果、検索したすべてのCS種が筋管形成を抑制し、中でもCS-Eが顕著な抑制を示し、筋管の形成は濃度依存的であった。逆にCSプロテオグリカンのデコリンをC2C12でノックダウンすると、筋分化は逆に促進した。以上よりCSによる筋分化の制御機能が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the control ability of skeletal muscle differentiation of chondroitin sulfate (CS), five types of CS (CS-A, B, C, D and E) were added to myoblast C2C12 which can reproduce skeletal muscle differentiation process, and differentiation was carried out for a certain period of time. The value of myotube fusion index (FI) calculated from the number of nuclei in the myotubes was used as an index of muscle differentiation. As a result, all CS subtypes used in this research suppressed myotube formation, among which CS-E showed remarkable suppression. Moreover, myotube FI decreased concentration-dependent manner. Conversely, knocking down the decorin of CS proteoglycan of C2C12, the muscular differentiation promoted in reverse. From the above, it has clarified that CS have a strong potential to regulate the muscle differentiation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 筋分化 コンドロイチン硫酸 筋芽細胞

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸(CS)を筋芽細胞に作用させ筋分化を誘導すると分化が遅延し筋管形成が抑制され、逆に CS を分化環境から除去すると筋分化が促進するようだ。しかし複数ある CS のうち、どの CS 種が筋分化に影響を与え、いかなる機構で作用を發揮するのかは未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究では骨格筋分化に影響を及ぼす CS 種を同定し、その機能と作用機構を解明することを目的とする。具体的には、以下の課題、骨格筋分化を抑制する CS 種の同定と細胞応答の解明、筋分化へのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるデコリンの影響とその作用機構の解明、に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 骨格筋分化を抑制する CS 種の同定と細胞応答の解明

筋芽細胞の分化への関与が濃厚と考えられる CS 種を選定し、その存在下で分化誘導し、得られた細胞の応答と性状を比較解析し、筋芽細胞の分化を強力に抑制する糖鎖(CS)を決定し、分化誘導した細胞の性状を解析した。

CS-A、B、C、D および E の存在下で筋芽細胞である C2C12 を分化誘導したところ、CS-E を加えた場合、分化の指標である筋管の形成が有意に抑制されていたことより、CS-E を実験に用いた。コンドロイチナーゼ ABC (ChABC) で処理した二単糖 CS を使用した。

筋への分化能は、筋管あたりの核の数である筋管係数 (FI) 算出することで評価した。

(2) 筋分化への CS プロテオグリカンであるデコリンの影響とその作用機構の解明

CS プロテオグリカンのデコリン遺伝子発現をノックダウンした筋芽細胞 (DKm) を作成し、筋分化過程でのデコリンの役割を明らかにした。

C2C12 および DKm を分化誘導して一定期間経過後、形成された筋管を抗ミオシン重鎖抗体で染め出し FI 値を算出した。また、両細胞の、筋分化や細胞増殖に関連する因子 (myostatin、ActR-IIB、p21) のタンパク産生量を計測し、また、増殖性と細胞周期を検討、比較した。

4. 研究成果

実験に用いたすべての CS 種 (CS-A、B、C、D および E) が筋管形成を抑制し、中でも CS-E が顕著な抑制を示した (図 1)。

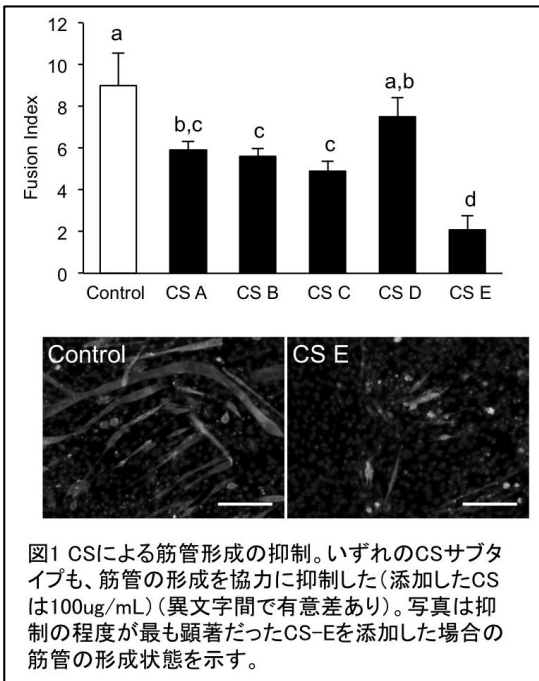


図1 CSによる筋管形成の抑制。いずれのCSサブタイプも、筋管の形成を協力に抑制した(添加したCSは100ug/mL)(異文字間で有意差あり)。写真は抑制の程度が最も顕著だったCS-Eを添加した場合の筋管の形成状態を示す。

続いて、濃度を変えて CS-E を添加して、筋芽細胞を分化誘導した結果、筋管の形成は濃度依存的に抑制された (図 2)。一方、ChABC で CS-E を分解すると筋管形成は抑制されなかった。

さらに CS-E が分化過程のどの時期に筋分化抑制を示すのか検討するため、分化培養期間を 3 日間毎に、前期 (分化誘導開始後 0-3 日) 中期 (同 4-6 日) 後期 (同 7-9 日) に分け CS-E を添加した結果、中期の CS-E 添加が最も筋分化を抑制された。以上から、CS の筋分化抑制機能が裏付けられ、CS は筋分化の中期に必要な機構を抑制すると考えた。

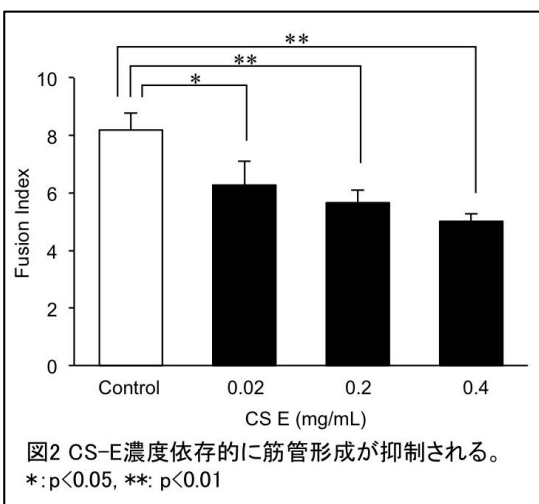
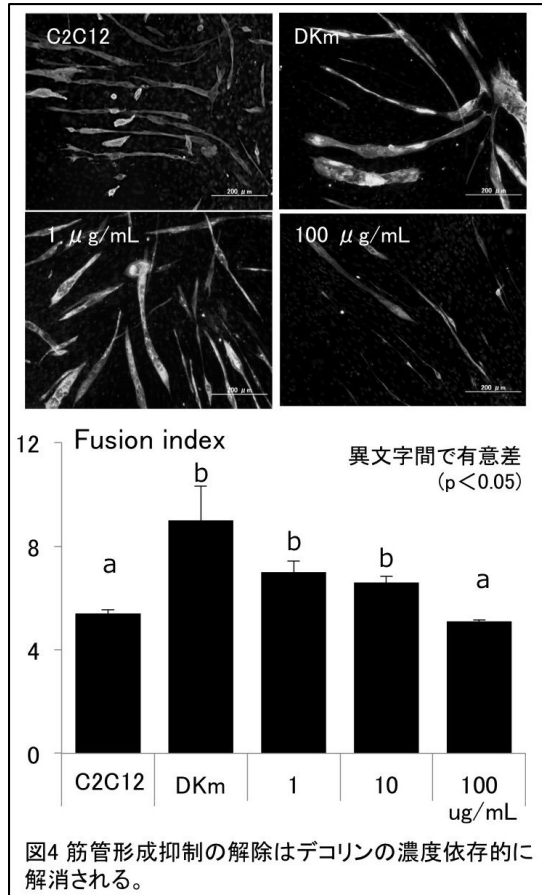
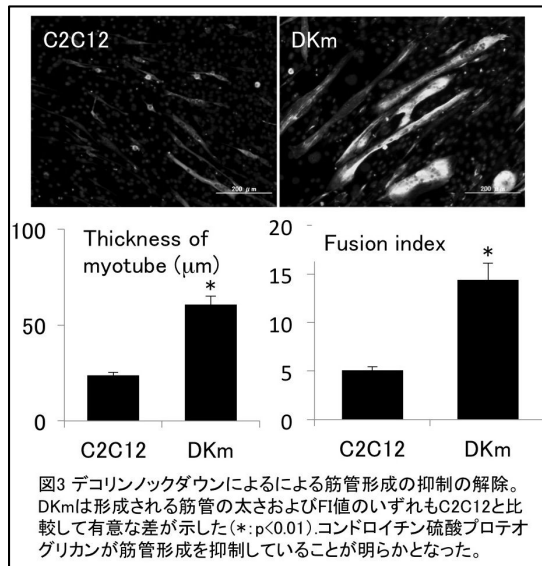


図2 CS-E濃度依存的に筋管形成が抑制される。
*: p<0.05, **: p<0.01

CS プロテオグリカンのデコリン遺伝子を、ノックダウンした細胞 DKm を筋分化

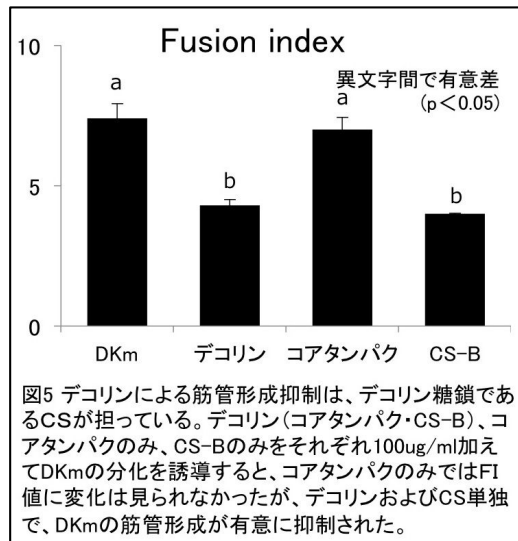
誘導すると、DKm は幅の太い筋管が早期から多数出現した。また、C2C12 と比較して有意に高い FI 値を示した (図 3)。



特異性の確認のために、DKm にデコリンを加えて分化を誘導すると、FI 値は、濃度依存的に低下し、筋管形成抑制の解除が、濃度依存的に解消された (過剰な筋管形成が抑制されるようになった) (図 4)。

これらのことから、CS プロテオグリカンであるデコリンが、筋管形成を負に制御していることが考えられた。

デコリンの筋管形成への作用部位を確認



するためにデコリン(コアタンパク・糖鎖)、デコリン糖鎖のCS-B、酵素処理で糖鎖を除去したコアタンパクをそれぞれDKmに加えて分化させると、前二者では分化は抑制され低いFI値を示したが、コアタンパクと反応させたDKmの分化は抑制されなかった。このことから、筋分化の制御はデコリン糖鎖が担っていることが示唆された(図5)。

さらに筋分化や増殖に関連する因子の産生量を両細胞で比較したところ、DKmでは筋管の形成を負に制御し、筋管の形成を抑制するmyostatinとその受容体であるActR-IIBがいずれもC2C12より低値を示した。すなわち、DKmではmyostatinとその受容体の産生が抑制されることで、筋管形成が促進していたと推測できる。また、興味深いことに、CS-Bを加えると、DKmのmyostatinの産生量がタンパクレベルで回復した。加えて、増殖性および細胞周期のS期の割合がDKmで高くなっていた。

以上より、CSは筋分化を負に制御する因子であること、また、その負の制御は、筋分化の抑制因子であるmyostatinを(直接的あるいは間接的に)調節することで、行っていると考えられた。

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)

- Warita, K., Oshima, N., Takeda-Okuda, N., Tamura, J., Hosaka, YZ.: Degree of Suppression of Mouse Myoblast Cell Line C2C12 Differentiation Varies According to Chondroitin Sulfate Subtype. *Marine Drugs*, **14**, E193-199 (2016). (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. デコリン糖鎖であるコンドロイチン硫酸 B による筋分化の制御 第 35 回日本糖質学会年会, 高知 (高知市文化プラザ), 2016 年 9 月 3 日, 保坂善真, 三宅耶衣, 割田克彦
2. デコリン糖鎖は myostatin 産生を調節して筋分化を負に制御する」第 12 回北海道結合組織勉強会, 江別 (酪農学園大学), 2016 年 7 月 9 日, 保坂善真
3. 筋分化におけるコンドロイチン硫酸の役割と機能の解明 日本解剖学会 第 70 回中国・四国支部学術集会, 松山 (愛媛大学), 2015 年 10 月 24 日, 大島奈々, 割田克彦, 田村純一, 保坂善真
4. 筋分化過程でのデコリンの機能と役割の解析 第 158 回日本獣医学会, 十和田 (北里大学), 2015 年 9 月 8 日, 三宅耶衣, 割田克彦, 西邑隆徳, 保坂善真

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

田村 純一 (TAMURA Jun-ichi)

鳥取大学・地域学部地域環境学科・教授

研究者番号: 30221401