

# 細胞外マトリックスを介した ミオスタチンの活性制御機構に関する研究

## 学位論文内容の要旨

ミオスタチンは筋細胞の増殖・分化を抑制し骨格筋量を規定している増殖因子である。ミオスタチンは筋細胞で産生され、活性のない潜在型として細胞外マトリックスに分泌された後、酵素的分解を受け活性型ミオスタチンとなる。この活性型ミオスタチンが、筋細胞表面に存在する受容体に結合することでシグナルが核に伝わり筋細胞の増殖や分化が制御されている。ミオスタチンが筋細胞の増殖や分化を抑制する機構については明らかにされつつあるが、細胞外マトリックスに分泌されたミオスタチンの活性がどのように調節されているかについてはほとんど明らかになっていない。細胞外マトリックスは細胞の物理的支持だけでなく、細胞の接着、移動、増殖、分化などに重要な役割を果たしている。近年、いくつかの細胞外マトリックス分子は増殖因子と相互作用し、その活性を調節していることが明らかにされている。そこで、本論文では、細胞外マトリックス成分を介したミオスタチンの活性制御機構を明らかにすることを目的として、活性型ミオスタチンと相互作用する細胞外マトリックス成分の探索ならびにミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性に及ぼす細胞外マトリックス成分の影響を検討し、以下の知見を得た。

1. 活性型ミオスタチンと相互作用する細胞外マトリックス成分を表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置を用いてスクリーニングした結果、**Small leucine-rich proteoglycans** ファミリーに属するデコリンおよびフィブロモデュリンは活性型ミオスタチンと亜鉛イオン存在下且つ中性 pH 域で相互作用したが、同じファミリーに属するピグリカンについては活性型ミオスタチンとの相互作用は認められなかった。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカンならびに糖タンパク質であるラミニンおよびフィブロネクチンも活性型ミオスタチンと亜鉛イオン存在下且つ中性 pH 域で相互作用することが明らかとなった。
2. 活性型ミオスタチンと相互作用を示した細胞外マトリックス成分について、反応速度論的解析を行った結果、解離定数はデコリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニンおよびフィブロネクチンで  $10^8$  M、フィブロモデュリンで  $10^{10}$  M であった。また、デコリンからグリコサミノグリカン鎖を除去したコアタンパク質についても活性型ミ

オスタチンとの相互作用が認められ、その解離定数、結合速度定数および解離速度定数はグリコサミノグリカン鎖が結合したデコリンとほとんど同じであった。以上の結果は、活性型ミオスタチンはコアタンパク質を介してデコリンと結合していることを示唆している。

3. 本研究で調べた細胞外マトリックス成分と活性型ミオスタチンとの相互作用には 10  $\mu\text{M}$  以上の亜鉛イオンの存在が必須であったが、他の 2 価金属イオン (カルシウムやマグネシウム) 存在下では両者の相互作用は認められなかった。近年、亜鉛イオンと結合するいくつかの細胞外マトリックス成分が報告されており、これらの細胞外マトリックス成分は亜鉛イオンが結合するとその高次構造が変化することが明らかにされている。亜鉛イオンが結合した細胞外マトリックス成分はその高次構造が変化したことで活性型ミオスタチンと相互作用できるようになったものと考えられた。
4. 活性型ミオスタチンと相互作用することが明らかになった細胞外マトリックス成分を対象に、これらの細胞外マトリックスがミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性に及ぼす影響について  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  筋細胞を用いて検討した。まず、活性型ミオスタチンと相互作用を示した細胞外マトリックス成分を活性型ミオスタチンと一緒に亜鉛イオンを含む培地に添加して筋細胞の増殖を調べた結果、いずれの細胞外マトリックス成分を添加してもミオスタチンによる筋細胞増殖阻害作用を抑制することはできなかった。この実験系では、細胞外マトリックス成分は遊離の状態では培地中に存在しており、両者が相互作用したとしても活性型ミオスタチンの受容体への結合を阻害できなかったのかもしれない。そこで、生体における細胞外マトリックスと筋細胞の位置関係を考慮に入れた筋細胞培養系を確立し、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンがミオスタチンを捕捉することによって筋細胞増殖阻害活性を抑制するかどうかを検討した。その結果、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンによって活性型ミオスタチンの培地中へ拡散は抑制され、ミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性は抑制された。以上の結果は、細胞外マトリックスに固定化されているデコリンが活性型ミオスタチンを捕捉してその受容体への結合を制御することでミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用を調節している可能性を示唆するものである。

本研究では、活性型ミオスタチンと相互作用するいくつかの細胞外マトリックス成分を初めて見いだした。また、筋細胞培養系を用いて、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンが活性型ミオスタチンを捕捉することによってミオスタチンの筋細胞への作用を抑制することを明らかにした。ミオスタチンは筋細胞で産生され細胞外マトリックスに分泌された後、オートクリンあるいはパラクリンによって筋細胞に働く。筋形成時の骨格筋組織の細胞外マトリックスにはデコリンが豊富に存在していることが明らかにされている。したがって、筋形成時の骨格筋組織でミオスタチンとデコリンが細胞外マトリックスで物理的に相互作用できる可能性は高く、本研究の結果は、細胞外マトリックスによる活性型ミオスタチンの捕捉がミオスタチンの活性制御機構の一つとして存在している可能性を強く示唆するものである。

# 学位論文審査の要旨

主 査 助 教 授 西 邑 隆 徳  
副 査 教 授 服 部 昭 仁  
副 査 教 授 中 村 富美男  
副 査 教 授 島 崎 敬 一

学 位 論 文 題 名

## 細胞外マトリックスを介した ミオスタチンの活性制御機構に関する研究

本論文は、4章から成り、図30、表2、文献70を含む総頁数102の和文論文であり、他に参考論文1編が付されている。

骨格筋量を規定している増殖因子であるミオスタチンは、筋細胞で産生され細胞外マトリックスに分泌された後、オートクリン的に筋細胞に働き、その増殖や分化を抑制する。ミオスタチンが筋細胞の増殖や分化を抑制する機構については明らかにされつつあるが、細胞外マトリックスに分泌されたミオスタチンの活性がどのように調節されているかについてはほとんど明らかになっていない。そこで本論文では、細胞外マトリックス成分を介したミオスタチンの活性制御機構を明らかにすることを目的として、ミオスタチンと相互作用する細胞外マトリックス成分の探索ならびにミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性に及ぼす細胞外マトリックス成分の影響を検討し、以下の知見を得ている。

1. ミオスタチンと相互作用する細胞外マトリックス成分を表面プラズモン共鳴法による分子間相互作用解析装置を用いて探索した結果、small leucine-rich proteoglycan ファミリーに属するデコリンおよびフィブロモデュリンはミオスタチンと亜鉛イオン存在下且つ中性 pH 域で相互作用した。しかし、同じファミリーに属するビグリカンについてはミオスタチンとの相互作用は認められなかった。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニンおよびフィブロネクチンもミオスタチンと亜鉛イオン存在下且つ中性 pH 域で相互作用することが明らかとなった。
2. ミオスタチンと相互作用を示した細胞外マトリックス成分について、反応速度論的解析を行った結果、解離定数はデコリン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、ラミニンおよびフィブロネクチンで  $10^{-8}$  M、フィブロモデュリンで  $10^{-10}$  M であった。また、デ

コリンからグリコサミノグリカン鎖を除去したコアタンパク質についてもミオスタチンとの相互作用が認められ、その解離定数、結合速度定数および解離速度定数はグリコサミノグリカン鎖が結合したデコリンとほとんど同じであった。以上の結果から、ミオスタチンはコアタンパク質を介してデコリンと結合していることが示唆された。

3. 本研究で調べた細胞外マトリックス成分とミオスタチンとの相互作用には  $10 \mu\text{M}$  以上の亜鉛イオンの存在が必須であったが、他の 2 価金属イオン (カルシウムやマグネシウム) 存在下では両者の相互作用は認められなかった。近年、亜鉛イオンと結合するいくつかの細胞外マトリックス成分が報告されており、これらの細胞外マトリックス成分は亜鉛イオンが結合するとその高次構造が変化することが明らかにされている。亜鉛イオンが結合した細胞外マトリックス成分はその高次構造が変化することでミオスタチンと相互作用できるようになったものと考えられた。
4. 細胞外マトリックス成分がミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性に及ぼす影響について  $\text{C}_2\text{C}_{12}$  筋細胞を用いて検討した。ミオスタチンと相互作用を示した細胞外マトリックス成分をミオスタチンと一緒に亜鉛イオンを含む培地に添加して筋細胞の増殖を調べた結果、いずれの細胞外マトリックス成分を添加してもミオスタチンによる筋細胞増殖阻害作用を抑制することはできなかった。この実験系では、細胞外マトリックス成分は遊離の状態では培地中に存在しており、両者が相互作用したとしてもミオスタチンの受容体への結合を阻害できなかったものと考えられた。
5. 生体における細胞外マトリックスと筋細胞の位置関係を考慮に入れた筋細胞培養系を確立し、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンがミオスタチンを捕捉することによって筋細胞増殖阻害活性を抑制するかどうかを調べた。その結果、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンによってミオスタチンの培地中へ拡散は抑制され、ミオスタチンの筋細胞増殖阻害活性は抑制された。以上の結果から、細胞外マトリックスに固定化されているデコリンがミオスタチンを捕捉してその受容体への結合を制御することでミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用を調節していることが明らかとなった。

以上のように、本論文は、ミオスタチンと相互作用するいくつかの細胞外マトリックス成分を初めて見だし、また、新たに開発した筋細胞培養系を用いて、コラーゲンマトリックスに固定化されたデコリンがミオスタチンを捕捉することによってミオスタチンの筋細胞への作用を抑制することを示し、細胞外マトリックスを介したミオスタチンの活性制御機構に関する新知見を得ている。

よって審査員一同は、三浦孝之が博士(農学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。