

学位論文題名

The role of decorin in the proliferation and differentiation of myogenic cells

(筋細胞の増殖および分化におけるデコリンの機能に関する研究)

学位論文内容の要旨

世界人口の急速な増加に伴って動物性タンパク質の需要は増加している。これを安定的に供給していくためには肉用家畜生産(食肉生産)の効率化が強く望まれている。食肉生産の技術的問題点の一つは、食肉の主体である家畜骨格筋をいかに効率よく肥大させるかであり、これを解決するためには家畜骨格筋の形成・肥大機構を解明することが重要である。骨格筋の形成過程では、中胚葉由来の筋細胞が分裂・増殖し、やがて細胞周期から逸脱して分化し互いに融合して筋管を形成する。筋管は成熟し筋線維となりこれが多数集合して骨格筋を形成する。筋細胞の増殖・分化はいくつかの増殖因子によって影響されることが明らかにされているが、これらの増殖因子の制御機構については未解明な部分が多い。

増殖因子の制御機構の一つとして細胞外マトリックスを介した調節機構が近年注目されている。細胞外マトリックスに存在するプロテオグリカンの一つであるデコリンは増殖因子・TGF- β に直接結合してその活性を制御することで非筋細胞の増殖・分化などに関わっていることが知られている。近年、筋細胞においてもデコリンが発現していることが報告されており、デコリンは筋細胞の成長にも関わっている可能性が示唆されているが、デコリンが筋細胞の増殖・分化のどの段階でどのように関与し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、本研究では、筋細胞で産生されるデコリンの機能を解明することを目的に、デコリンを過剰発現させた筋細胞およびデコリンを発現抑制した筋細胞を作出し、これらの増殖・分化能を詳細に調べることで、デコリンが筋細胞の増殖・分化に果たす役割を検討し、以下の知見を得た。

1. マウス骨格筋由来筋細胞株である C2C12 筋細胞を用いてデコリン過剰発現筋細胞を作出した。デコリン過剰発現筋細胞はコントロール C2C12 筋細胞に比べて、デコリン mRNA 発現量が約 5 倍に亢進し、分泌タンパク質量は約 4 倍に増加した。このデコリン過剰発現筋細胞を増殖培地で培養したところ、コントロールに比べて、細胞周期の G1 期から S 期への速やかな移行が認められ、細胞増殖速度の増加がみられた。以上の結果は、デコリンが筋細胞の増殖を促進していることを示唆している。
2. デコリン過剰発現筋細胞を分化培地で培養した場合、デコリン過剰発現筋細胞の融合開始(筋管形成開始)はコントロールに比べてやや遅くなったが、その後の筋管成熟

は速やかに進行し、培養 96 時間後にはコントロールに比べて肥大した筋管が多数認められた。また、筋分化の指標である筋管形成指数はデコリン過剰発現筋細胞がコントロールに比べて有意 ($P<0.01$) に高かった。さらに、筋分化時に発現する筋調節因子・myogenin の発現および細胞周期調節因子・p21 の発現はいずれもデコリン過剰発現筋細胞において亢進しており、デコリン過剰発現筋細胞では筋分化が促進されていることが示された。

3. shRNA を用いてデコリン発現抑制させた C2C12 筋細胞 (以下、デコリン発現抑制筋細胞) を作出し、その増殖・分化能をコントロール C2C12 筋細胞と比較検討した。デコリン発現抑制筋細胞はコントロールに比べて増殖速度が有意 ($P<0.01$) に低下した。また、デコリン発現抑制筋細胞の筋管形成指数はコントロールに比べて有意 ($P<0.01$) に低く、myogenin の発現量も低下した。以上の結果は、デコリンが筋細胞の増殖・分化を促進することを示唆している。
4. デコリンが筋細胞の増殖・分化を促進する機構を明らかにするために、筋細胞増殖・分化阻害因子であるミオスタチンに着目し、筋細胞に対するミオスタチンの作用へのデコリンの影響について検討した。まず、デコリン過剰発現がミオスタチン発現に及ぼす影響を検討した結果、デコリン過剰発現はミオスタチン発現に影響しなかった。すなわち、デコリン過剰発現による筋細胞増殖・分化促進は筋細胞増殖・分化阻害因子であるミオスタチンの発現低下によってもたらされたものではないことが示唆された。次に、ミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用に及ぼすデコリンの影響を検討した結果、デコリンはミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用を抑制した。そこで、筋細胞に対するミオスタチンのシグナル量がデコリンによって影響されるか否かについてレポーターアッセイで検討した結果、デコリン過剰発現筋細胞ではコントロールに比べてミオスタチンシグナル量が低下していることが明らかになった。さらに、ミオスタチンの細胞内シグナル伝達分子である Smad2 のリン酸化を調べた結果、デコリン過剰発現筋細胞はコントロールに比べてそのリン酸化程度が低かった。以上の結果は、筋細胞で産生され分泌されたデコリンがミオスタチンの活性を調節していることを示唆している。
5. デコリンは非筋細胞に対して EGFR あるいは IGFIR を受容体とするシグナル分子として働くことが報告されている。そこで、筋細胞に対してもシグナル分子として働く可能性を検討した。デコリンを添加した培地で筋細胞を培養し EGFR および IGFIR の活性化を調べた結果、いずれの受容体もデコリンによって活性化せず、デコリンがこれらの受容体を介して筋細胞にシグナルを伝達している可能性は低いと考えられた。

本研究では、筋細胞で産生され細胞外マトリックスに分泌されたデコリンが筋細胞増殖・分化阻害因子であるミオスタチンの活性を抑制することで筋細胞の増殖・分化を調節していることを初めて明らかにした。筋発生や出生後の筋肥大、筋損傷後の筋再生時など、筋細胞の増殖・分化の促進が必要な場面では、筋肥大を阻害する因子の働きを抑制することが必要となる。本研究の結果は、細胞外マトリックス分子であるデコリンが筋肥大阻害因子を抑制することで筋形成・肥大に寄与していることを示唆するものである。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 西 邑 隆 徳
副 査 教 授 服 部 昭 仁
副 査 教 授 中 村 富美男
副 査 助 教 若 松 純 一

学 位 論 文 題 名

The role of decorin in the proliferation and differentiation of myogenic cells

(筋細胞の増殖および分化におけるデコリンの機能に関する研究)

本論文は、4章から成り、図 30、文献 202 を含む総頁数 123 の英文論文であり、他に参考論文 2 編が付されている。

世界人口の急速な増加に伴って動物性タンパク質の需要は増加している。これを安定的に供給していくためには食肉生産の効率化が強く望まれている。すなわち、食肉の主体である家畜骨格筋をいかに効率よく肥大させるかが問題であり、これを解決するためには家畜骨格筋の形成・肥大機構を解明することが重要である。骨格筋の形成・肥大は筋細胞の増殖・分化によってもたらされるが、その増殖・分化の制御機構は不明な点が多い。近年、細胞外マトリックスは細胞の支持だけでなく、細胞の増殖、分化、遊走など様々な細胞活動に深く関わっていることが明らかにされつつある。しかし、筋細胞の増殖・分化に及ぼす細胞外マトリックスの影響についてはほとんど検討されていない。本研究では、細胞外マトリックス分子・デコリンに焦点を当てて、デコリンが筋細胞の増殖・分化に及ぼす影響とそのメカニズムを検討し、以下の知見を得ている。

1. マウス骨格筋由来筋細胞株である C2C12 筋細胞を用いてデコリン過剰発現筋細胞を作出した。デコリン過剰発現筋細胞はコントロール C2C12 筋細胞に比べて、デコリン mRNA 発現量が約 5 倍に亢進し、分泌タンパク質量は約 4 倍に増加した。このデコリン過剰発現筋細胞を増殖培地で培養したところ、コントロールに比べて、細胞周期の G1 期から S 期への速やかな移行が認められ、細胞増殖速度の増加がみられた。以上の結果は、デコリンが筋細胞の増殖を促進していることを示唆している。
2. デコリン過剰発現筋細胞を分化培地で培養した場合、デコリン過剰発現筋細胞の融合開始(筋管形成開始)はコントロールに比べてやや遅くなったが、その後の筋管成熟は速やかに進行し、培養 96 時間後にはコントロールに比べて肥大した筋管が多数認められた。ま

た、筋分化の指標である筋管形成指数はデコリン過剰発現筋細胞がコントロールに比べて有意に高かった($P < 0.01$)。さらに、筋分化時に発現する筋調節因子・myogenin の発現および細胞周期調節因子・p21 の発現はいずれもデコリン過剰発現筋細胞において亢進しており、デコリン過剰発現筋細胞では筋分化が促進されていることが示された。

3. miRNA を用いてデコリン発現を抑制させた C2C12 筋細胞(以下、デコリン発現抑制筋細胞)を作出し、その増殖・分化能をコントロール C2C12 筋細胞と比較検討した。デコリン発現抑制筋細胞はコントロールに比べて増殖速度が有意に低下した($P < 0.01$)。また、デコリン発現抑制筋細胞の筋管形成指数はコントロールに比べて有意に低く($P < 0.01$)、myogenin の発現量も低下した。以上の結果は、デコリンが筋細胞の増殖・分化を促進することを示唆している。
4. デコリンが筋細胞の増殖・分化を促進する機構を明らかにするために、筋細胞増殖・分化阻害因子であるミオスタチンに着目し、ミオスタチンの筋細胞への作用に対するデコリンの影響について検討した。まず、デコリン過剰発現がミオスタチン発現に及ぼす影響を検討した結果、デコリン過剰発現はミオスタチン発現には影響しなかった。すなわち、デコリン過剰発現による筋細胞増殖・分化促進は筋細胞増殖・分化阻害因子であるミオスタチンの発現低下によってもたらされたものではないことが示唆された。次に、ミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用に及ぼすデコリンの影響を検討した結果、デコリンはミオスタチンの筋細胞増殖阻害作用を抑制した。そこで、筋細胞に対するミオスタチンのシグナル量がデコリンによって影響されるか否かについてレポーターアッセイで検討した結果、デコリン過剰発現筋細胞ではコントロールに比べてミオスタチンシグナル量が低下していることが明らかになった。さらに、ミオスタチンの細胞内シグナル伝達分子である Smad2 のリン酸化を調べた結果、デコリン過剰発現筋細胞はコントロールに比べてそのリン酸化程度が低かった。以上の結果は、筋細胞で産生され分泌されたデコリンが細胞外マトリックスでミオスタチンの活性を調節していることを示唆している。
5. デコリンは非筋細胞に対して EGFR あるいは IGFIR を受容体とするシグナル分子として働くことが報告されている。そこで、筋細胞に対してシグナル分子として働く可能性を検討した。デコリンを添加した培地で筋細胞を培養し EGFR および IGFIR の活性化を調べた結果、いずれの受容体もデコリンによって活性化せず、デコリンがこれらの受容体を介して筋細胞にシグナルを伝達している可能性は低いと考えられた。

以上のように、本論文は、筋細胞で産生され細胞外マトリックスに分泌されたデコリンが増殖・分化阻害因子であるミオスタチンの活性を抑制することで筋細胞の増殖・分化を調節していることを初めて明らかにし、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。本研究の成果は、家畜骨格筋肥大機構の解明や筋ジストロフィーなどの筋疾患の治療方法開発への応用研究に繋がるものであり、その学術的意義は大きい。

よって審査員一同は、岸岡康博が博士(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。