HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	脂肪細胞が筋細胞の分化ならびに筋肉内結合組織構造に及ぼす影響［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	徐, 康珉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13584号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/73910
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Seo_Kangmin_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博　士（農学）　　氏 名：徐 康珉（ソ　カンミン）

脂肪細胞が筋細胞の分化ならびに筋肉内結合組織構造に及ぼす影響

日本の代表的な肉用牛である黒毛和牛は、脂肪交雑が良く入った霜降り肉を生産することで有名ある。脂肪交雑とは骨格筋内に脂肪組織が蓄積した状態を言い、その程度は食肉の柔らかさや風味など肉質に大きく影響する。しかし、脂肪交雑の形成メカニズムについては不明な点が多く、黒毛和牛による霜降り肉生産の効率化のためには、その解明が期待されている。

骨格筋内に蓄積する脂肪組織は、単房性脂肪滴を含む成熟脂肪細胞が集合して構成されており、主に筋線維間および筋線維束の間隙、すなわち筋内膜や筋周膜（筋肉内結合組織；IMCT）に発達する。骨格筋は運動を司る器官であり、その実質細胞は収縮タンパク質を内在した筋細胞（筋線維）である。骨格筋内に脂肪組織が過度に発達すると、筋細胞の集合体である筋組織の割合が減少し、骨格筋としての機能が阻害されることになる。したがって、通常は、骨格筋内における脂肪組織の発達（脂肪細胞の活動）は制御されているはずである。しかし、肥育した黒毛和牛のように骨格筋内に脂肪組織が著しく発達する際には、これらのバランス制御が崩れて、脂肪細胞の活動が亢進されるのではないかと予想される。そこで、本研究では、骨格筋内における脂肪組織の形成・発達機構を解明することを目的に、脂肪細胞が筋細胞（筋線維）に及ぼす影響を *in vitro* 共培養系で検討するとともに、脂肪細胞が IMCT をリモデリングする様相を IMCT モデル培養系を用いて検討し、以下の知見を得た。

１．3T3-L1 前駆脂肪細胞を分化誘導した脂肪細胞を C2C12 筋細胞とセルカルチャーインサートを用いて共培養した結果、筋管形成率および筋管直径は単独培養した C2C12 筋細胞に比べて小さく、脂肪細胞との共培養によって筋細胞の分化は抑制された。また、10 日間分化誘導した成熟脂肪細胞と培養した筋細胞の方が 5 日間分化誘導した脂肪細胞と共培養したものに比べて筋管形成率と筋管直径が小さかったことから、脂肪細胞の成熟が進むと筋細胞の分化抑制効果が大きくなることが示された。脂肪細胞と共培養した筋細胞では、筋分化転写因子である MyoD および Myogenin の発現量低下、ならびに筋収縮タンパク質であるミオシン重鎖の発現量低下がみられた。また、骨格筋形成抑制因子である Myostatin の発現亢進、ならびに筋萎縮・分解に関連する Ubiquitin E3 ligases である Atrogin-1 と MuRF-1 の発現誘導が認められた。以上の結果は、脂肪細胞は筋細胞の分化を抑制するとともに、筋萎縮を促進していることが示唆された。

２．脂肪細胞の筋細胞に対する分化抑制作用は、脂肪細胞が分泌する液性因子を介していることが予想されたので、共培養下での脂肪細胞と筋細胞における炎症性サイトカインの発現及び分泌パターンを調べた。共培養期間中、脂肪細胞における TNF-α および IL-6 の発現量は mRNA およびタンパク質レベルで大きな変化はみられなかった。一方、脂肪細胞と共培養した筋細胞における IL-6 の発現量は単独培養した筋細胞に比べてタンパク質レベルで有意（$p<0.05$）に高く、また、培養液中の IL-6 量も有意（$p<0.05$）に高かった。以上の結果から、脂肪細胞は自ら IL-6

を産生するとともに、共存する筋細胞における IL-6 の発現亢進および分泌促進をしていることが明らかになった。そこで、この作用機序を明らかにするために、IL-6 に対する中和抗体を添加した培養液を用いて脂肪細胞と筋細胞の共培養を行った結果、筋管形成率および筋管の直径は対照区に比べて有意（$p<0.05$）に大きかった。以上の結果は、脂肪細胞は筋細胞からの IL-6 の発現および分泌を誘導し、IL-6 は自己分泌的に筋分化の抑制に働いていることが示唆された。

３．先述したように、脂肪細胞との共培養によって筋管が細くなる現象が見られたことから、 この形態的変化に筋管の筋線維型の変換、すなわち遅筋型の筋管は細く、速筋型は太いことから筋管の遅筋化が起こったのではないかと予想された。そこで、形成された筋管の筋線維型組成の変化と遅筋型筋管の形成誘導因子である Sema3A の発現レベルを調べた。脂肪細胞との共培養によって Sema3A のタンパク質発現量は増加したが、予想に反して、遅筋型ミオシン重鎖の発現量は変化せず、むしろ速筋型のミオシン重鎖の発現量が増加する傾向にあった。脂肪細胞との共培養によって筋管が細くなるのは筋線維型の変化（遅筋化）を伴わないと考えられた。

４．脂肪組織は筋線維束間および筋線維間に形成されることから、脂肪細胞は筋内膜や筋周膜といった筋肉内結合組織（IMCT）を足場に増殖・分化し、自らに適した細胞外環境に IMCT をリモデリングするのではないかと予想された。 そこで、生体骨格筋の高次構造を維持した IMCT 基質上で脂肪細胞を長期間（40 日間）培養し、脂肪細胞が IMCT 構造に及ぼす影響を検討した。脂肪細胞は IMCT 基質によく接着し増殖・分化すること、IMCT 基質を構築するコラーゲン線維上を遊走し線維束間に浸潤すること、また、このような脂肪細胞の活動に伴って IMCT 基質を構築していたコラーゲン線維の高次構造が崩壊していくことが観察された。脂肪細胞は I 型、III 型等の線維形成コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス（ECM）成分を分泌しており、一方で、ECM を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）を分泌している。骨格筋内で脂肪細胞が増殖・分化し成熟脂肪細胞が脂肪組織を構築する際には、脂肪細胞が分泌する MMPs 等を用いて既存の IMCT を分解するとともに、脂肪細胞自らが産生する ECM で脂肪細胞を支持する結合組織を構築していくものと推察された。

本研究では、脂肪細胞が筋細胞の分化を抑制するだけでなく、萎縮（分解）を誘導することを明かにした。さらに、脂肪細胞は筋細胞の IL-6 産生･分泌を惹起し、自己分泌的に筋細胞の分化を抑制するとともに筋萎縮を誘導する可能性を示した。さらに、脂肪細胞が IMCT をリモデリングすることで、骨格筋内に脂肪組織を構築していることを *in vitro* で実証した。本研究により、食肉の品質の重要決定因子である骨格筋内脂肪組織の形成・発達メカニズムの一端が明らかになった。