

図3 マイオスタチン阻害はLGMD1Cモデルマウス（変異caveolin-3）の筋萎縮を著明に改善する (A) 10週齢マウスの下肢骨格筋所見、変異caveolin-3マウスで認められた著明な筋萎縮はマイオスタチン阻害マウスとの交配により改善している。Bar, 5mm (B) 10週齢マウス骨格筋粗分画のイムノブロット解析：変異caveolin-3マウスで認められたリン酸化Smad2 (p-Smad2)量の増加は、マイオスタチン阻害により、ほぼ野生型レベルまで減少している。\* $P < 0.05$ , Bonferroni's test, 1-way ANOVA.

cardiotoxin筋注によって、コントロールマウスの骨格筋は1～3日で壊死に陥るが、その後約2週間で速やかに再生する。一方、TGF-β1シグナルの亢進したMarfan症候群モデルマウス、*mdx*マウスとも、cardiotoxin筋障害後の筋再生は極端に障害されていた。そこで、筋再生を担う筋衛星細胞について、その活性化マーカーM-cadherinによる免疫組織化学的解析をおこなった。Marfan症候群モデルマウスではcardiotoxin筋障害後のM-cadherin陽性筋衛星細胞数が著明に減少していた。このマウスにTGF-β1阻害中和抗体を投与すると、cardiotoxin筋障害後の筋再生が改善し、M-cadherin陽性筋衛星細胞数もほぼ正常化した。

以上の結果から、ミオパチーや筋ジストロフィーではTGF-β1シグナルの亢進による筋再生障害とい

う、今まで知られていなかった病態機構が考えられる。また降圧薬であるLosartanは、AT1受容体及びTSP-1を介してTGF-β1シグナルを抑制し、筋再生障害を改善するという、筋疾患の新規治療法となる可能性が示された。

### 3. 筋ジストロフィーと マイオスタチンシグナル

マイオスタチンは、1997年にMcPherronらによってクローニングされたTGF-βスーパーファミリー分子で、胎生マウスの筋節と成熟マウスの骨格筋にほぼ特異的に発現する<sup>9</sup>。また、マイオスタチンノックアウトでは骨格筋量が2～3倍に上昇し、骨格筋組織では筋線維数の増加 (hyperplasia) と筋線維

サイズの増加 (hypertrophy) が認められる。一方、マイオスタチンを持続的に分泌する細胞をヌードマウスに移植すると、癌悪疫質で認められるような著明な骨格筋萎縮をきたす<sup>9)</sup>。このことから、マイオスタチンは骨格筋特異的に発現し、骨格筋量を減少させるTGF- $\beta$ スーパーファミリー分子と考えられている。Piedmontese (ミスセンス変異) や Belgian blue (フレームシフト変異) という肉牛や、食用羊 (3プライム非翻訳領域の点突然変異: 新規miRNA標的配列出現), および7ヶ月で起立が可能なヒト乳児 (スプライシングドナーサイト変異) など骨格筋量の増加した生物でマイオスタチン遺伝子変異が確認されている<sup>10)</sup>。

2002年ペンシルバニア大学のKhuranaら<sup>11)</sup>が、マイオスタチン阻害マウスモノクローナル抗体をmdxマウスに3ヶ月間腹腔内投与すると、骨格筋量が増加し、筋細胞の変性と間質の線維化が著明に抑制されることを報告した。これを契機に、マイオスタチン阻害が筋ジストロフィーの治療法として注目を浴びるようになった。われわれが解析した常染色体優性肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 1Cモデル (変異caveolin-3) でもマイオスタチン阻害が極めて有効であった (図3)<sup>12)</sup>。一方、LGMD2Fモデル ( $\delta$ -sarcoglycan欠損) では、若年マウスには有効だが、中年ないし老年マウスには無効であり<sup>13)</sup>、メロシン欠損先天性筋ジストロフィー (MDC1A) では無効であるばかりでなく、マウスの寿命が短縮する<sup>14)</sup>と報告されている。また、マイオスタチンノックアウトマウスでは、dexamethazone誘発性筋萎縮が殆ど認められないことが報告され<sup>15)</sup>、マイオスタチン阻害はステロイドミオパチーに対しても著効する可能性が示された。

現在、米国及びヨーロッパでは、Wyeth社開発のヒト化マイオスタチンモノクローナル抗体(MYO-029)によるマイオスタチン阻害療法の臨床試験が、Becker型筋ジストロフィー、LGMD、および顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー患者を対象に進行中である。

## おわりに

TGF- $\beta$ ファミリーシグナルによる神経・骨格筋の制御機構と、疾患病態への関与が明らかとなってきた。将来のTGF- $\beta$ ファミリーシグナルを標的とした治療法の臨床応用にむけて、制御分子の開発や疾

患におけるシグナルの解析を中心として基礎研究者と臨床医との密接な協力によるアプローチが必要となる。

## 文献

- 1) Wyss-Coray T, Lin C, Yan F, et al. TGF- $\beta$ 1 promotes microglial amyloid- $\beta$  clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med* 7: 612-618, 2001.
- 2) Tesseur I, Zou K, Esposito L, et al. Deficiency in neuronal TGF- $\beta$  signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Inv* 116: 3060-3069, 2006.
- 3) Cohn R, Erp C, Habashi J, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- $\beta$ -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 13: 204-210, 2007.
- 4) Neptune E.R, et al. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat Genet* 33: 407-411, 2003.
- 5) McPherron A, Lawler A, Lee S. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 387: 83-90, 1997.
- 6) Zimmers T, Davies M, Koniaris L, et al. Induction of Cachexia in Mice by Systemically Administered Myostatin. *Science* 296: 1486-1488, 2002.
- 7) Schuelke M, Wagner K, Stolz L, et al. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *N Engl J Med* 350: 2682-2688, 2004.
- 8) Bogdanovich S, Krag TO, Bartin ER, et al. Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin inhibition. *Nature* 420:418-421, 2002.
- 9) Ohsawa Y, Hagiwara H, Nakatani M, et al. Muscular atrophy of caveolin-3-deficient mice is rescued by myostatin inhibition. *J Clin Inv* 116: 2924-2934, 2006.
- 10) Parsons S, Millay D, Sargent M, et al. Age-Dependent Effect of Myostatin Blockade on Disease Severity in a Murine Model of Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Am J Pathol* 168: 1975-1985, 2006.
- 11) Li Z, Shelton G, Engvall E. Elimination of Myostatin Does Not Combat Muscular Dystrophy in dy Mice but Increases Postnatal Lethality. *Am J Pathol* 166: 491-497, 2005.
- 12) Gilson H, Schakman O, Combaret L, et al. Myostatin Gene Deletion Prevents Glucocorticoid-Induced Muscle Atrophy. *Endocrinology* 148: 452-460, 2007.

## 細胞ニュース

### 「第11回 がん分子標的治療研究会」

がん分子標的治療研究会は下記の日程で学術総会を開催します。

会 期：2007年7月5日 (木)～6日 (金)

会 場：大阪国際交流センター

〒543-0001 大阪市天王寺区上本町8-2-6

TEL. 06-6772-5931

懇親会：都ホテル大阪

〒543-0001 大阪市天王寺区上本町6-1-55

TEL. 06-6773-1111

テーマ：POP研究—臨床からのメッセージ—

会 長：福岡 正博 (近畿大学医学部 堺病院長)

シンポジウム：「バイオマーカー研究の現状と展望」

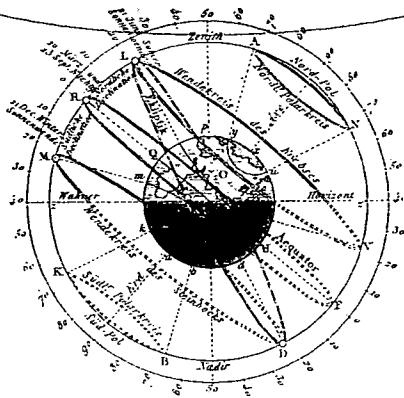
事務局：〒589-8511 大阪狭山市大野東377-2

近畿大学医学部 内科学 腫瘍内科部門 中川和彦

TEL：072-366-0221 (内線：3542)

※バックナンバーを会場で販売予定です。お立ち寄り下さい。

【解説】



# 骨格筋形成抑制因子，マイオスタチン 作用機序とその応用

土田邦博

生物の体のなかで最重量を占める骨格筋は、体のなめらかな動きや代謝を司る臓器である。骨格筋は、筋ジストロフィーなどの遺伝性の難病、肥満や糖尿病、老化、悪液質で萎縮、インスリン抵抗性、筋崩壊などの異常をきたす。マイオスタチンは、骨格筋から産生され、骨格筋の量や質を調節する分泌タンパク質である。その作用機序と制御を理解することで、ウシの産肉調節法開発や現状では治療方法のない筋疾患の治療法開発に結びつく可能性が高い。

1997年に、新しいTGF- $\beta$ ファミリーに属するペプチド性増殖因子の一つとしてGDF8 (growth and differentiation factor 8)が発見され、遺伝子破壊マウスが作製された。その表現型は、全身の骨格筋が著しく肥大するという今までに例のないものであった<sup>(1)</sup>。そのためGDF8は、骨格筋増殖抑制因子という意味で、マイオスタチン (Myostatin, MSTN) と呼称されるようになった (現在では、マイオスタチンもGDF8もともに使用されている)。

40年以上前に、ロンドン大学のBullough博士は、特定の組織から産生され、その組織の大きさを制御する物質の存在を想定し、「カロン」と呼ぶことを提唱し

た<sup>(2)</sup>。マイオスタチンは「骨格筋カロン」の概念と合致したホルモンであるといえる。農学的には健康志向に即した高品質肉の創製への応用が、そして医学的には筋ジストロフィーなどの治療法のない筋疾患への応用が考えられている興味ある細胞増殖因子がマイオスタチンである。

## マイオスタチン欠損による著しい筋肉の肥大

活性型のマイオスタチンが体内にない動物やヒトが自然界に存在する。ウシの例としては、Belgian Blue種やPiedmontese種が有名である。前者はウシマイオスタチン遺伝子の937番目から947番目までの11塩基の欠失によるフレームシフトで、成熟体領域の欠損が生じる。後者は、ウシマイオスタチン遺伝子の1,056番目のグアニンがアデニンに点突然変異した結果、成熟体領域内の313番目のシステインがチロシンに置換されている(C313Y)。その他にも、ウシではさまざまな遺伝子変異が知られており、程度の差はあれ筋肥大を生じる<sup>(3,4)</sup>。興味深いことに、東北大学農学研究科の山口教授らは、日本短角種でBelgian Blue種とまったく同じ変異をもつウシを発見している。このウシは、産肉量が正常牛に比べて2倍、100 kg程度増大している。2004年には、つ

Action and Regulation of Myostatin: A Negative Regulator of Skeletal Muscle Growth and Differentiation  
Kunihiro TSUCHIDA, 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

## 用語解説

**筋ジストロフィー:** 進行性に骨格筋組織の変性が生じ、筋力の低下と筋萎縮が著しくなり、随意運動が困難となる遺伝病の総称。最も頻度が高い病型は、X染色体劣性遺伝のデュシャヌ型であり、ジストロフィン分子の変異によって生じる。他に福山型先天性筋ジストロフィーなどの病型が知られている。

いにヒトでも、マイオスタチン遺伝子異常を呈する男児がドイツで見つかり報告された<sup>(5)</sup>。この男児は、新生児の頃より、手足の筋肉が発達しており、5歳にして3kgのダンベルを軽々と持ち上げるという。この男児はマイオスタチン遺伝子のイントロン部の点変異のため、スプライシング異常によって、体の中で成熟型マイオスタチンがつかられないことがわかっている。ちなみに、この男児は精神発達遅滞や心筋の異常は見られない。母親はヘテロ変異とされているが、運動選手として活躍したとのことなので、マイオスタチンは完全になくならなくても、産生量が減少することで筋力が上昇することが示唆される。

## マイオスタチンと筋分化、脂肪分化

骨格筋の起源は、胎児の体節と呼ばれる組織にある。成体では、筋線維の基底膜直下に存在する筋衛星細胞(サテライト細胞)が、骨格筋幹細胞として、筋損傷時や再生時の筋形成を担う重要な細胞である<sup>(6,7)</sup>。その他にも、骨髄や筋肉内のヘキスト色素を排出するSP(side population)細胞や中胚葉性血管芽細胞(メゾアンギオブラスト)が骨格筋幹細胞として機能しうることがわかっている。骨格筋幹細胞は、ヘリックス・ループ・ヘリックス型の転写因子である、MyoD, Myf5, myogeninなどが絶妙なタイミングで作用して、最終的に多核の筋

線維へと成熟していく<sup>(7)</sup>。マイオスタチンは、骨格筋幹細胞に働きかけて、幹細胞が筋分化し増殖するのを阻害すると考えられている(図1)<sup>(7~12)</sup>。

一方、マイオスタチン阻害により体脂肪が低下するが、その分子機構はいまだ不明である。マイオスタチンが脂肪細胞分化に直接関与する機構や、骨格筋量が増えエネルギーをより効率的に消費するため二次的に脂肪代謝が亢進する機構、あるいは全身の脂肪酸代謝や糖代謝が変化する機構が想定される。

## マイオスタチンと畜産学

上述の、Belgian Blue 種由来の牛肉は、欧米諸国では食されている。肉質は、肥大した肉は硬いという予想に反して、柔らかさを保っている。この原因の一つとして、筋線維周囲の結合組織の変化が考えられる。マイオスタチン阻害すると、骨格筋量の増大とともに、体脂肪の低下が見られ、骨格筋内脂肪蓄積も低下する。したがって、和牛の霜降り肉生産の向上には応用が難しいと思われる。しかし、加工牛肉や最近の健康志向から需要が伸びている、赤身肉に適度に脂肪のつきたいいわゆる「赤肉」の産生への応用には大いに期待がもたれている(表1)。早期に肉量が確保できるため、飼育日数の短縮、飼料代の軽減といった畜産農家への恩恵も考えられる。

表1 ■マイオスタチンを標的とした農学、医学分野への応用の可能性

- (1) 良質な産肉を供給するための畜産学的応用  
畜産農家の飼育日数の短縮
- (2) 筋ジストロフィーなどの神経筋疾患による筋萎縮の抑制
- (3) 糖尿病や肥満の新規治療薬
- (4) 癌や炎症性疾患末期の悪液質の防止
- (5) ドーピングに悪用されることへの懸念

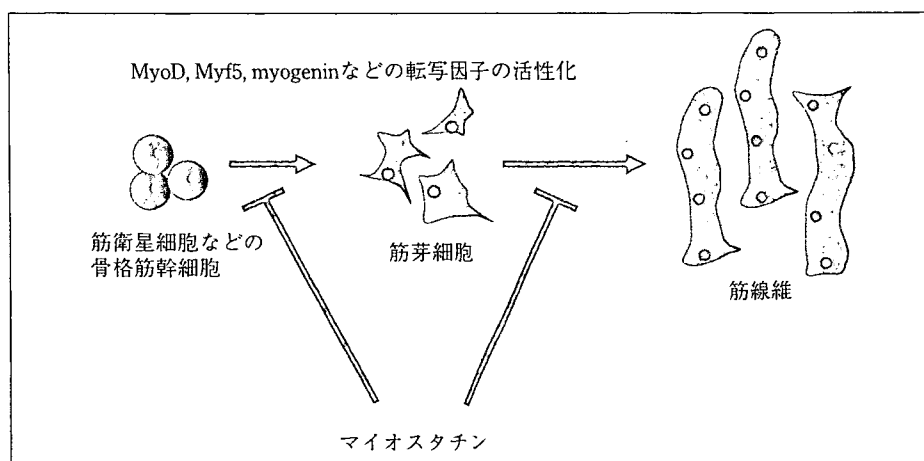


図1 ■マイオスタチンによる骨格筋の増殖抑制機構の概略図

## 現実化してきたマイオスタチン阻害による筋ジストロフィー治療法

骨格筋は、我々ヒトの種々の病態に関与している。遺伝性の骨格筋の変性を起こす疾患は難治疾患が多く、治療法のないものが多い。筋原性変性疾患である筋ジストロフィーはその代表的な病気である。また、骨格筋はインスリンの標的臓器でもあり、肥満・糖尿病の病態生理を考える上でも重要臓器である。さらには、老化によって起こる筋力の低下（サルコペニア）は、高齢社会において重要な問題である。したがって、マイオスタチンを軸として骨格筋の量的および質的な制御機構を明らかにし、調節可能な因子を開発していくことは、農学的な産肉向上への応用のみならず、医学的にも重要である。

マイオスタチンは筋ジストロフィーなどの先天性の筋疾患や、老化によって筋力低下した病態における格好の分子標的である。次に述べるように、近年、筋ジストロフィーがマイオスタチン阻害で治療できる可能性が高くなってきた。

一口に筋ジストロフィーといっても、実にさまざまな病型がある。最も有名なものは、X染色体遺伝のデュシャンヌ型筋ジストロフィーである。この病気は進行性に筋力低下を起こし、現状では治療方法は開発されていない。呼吸管理が進み、寿命自体は延びているが、悲惨な経過を辿る疾患である。家族の介護負担も甚大である。その他にも、細胞外基質タンパク質であるメロシン（ラミニンアルファ2）の異常によって生じる先天性筋ジストロフィーや、筋ジストロフィー症状とともに脳障害も高頻度で生じる福山型先天性筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィーと称される種々の病型、ミトコンドリア異常によって生じる脳筋症状、代謝性ミオパチーなど、実に多様な病型が知られている<sup>(7, 11~13)</sup>。これらの筋ジストロフィーは、たとえばデュシャンヌ型筋ジストロフィーのジストロフィン変異、福山型筋ジストロフィーのフクチン、肢帯型筋ジストロフィーのサルコグリカンやカベオリン3の変異など、原因分子の解析が進んでいる病型も多い。

筋ジストロフィーの治療法としては、理論的には、遺伝子治療、細胞治療、薬物治療が3つの柱である。遺伝子治療ではAAV（アデノ随伴）ベクターやレンチウイ

ルスベクターを用いた欠損遺伝子の補充療法に進展が見られる。細胞移植療法では、骨髄間質細胞や血管形成に関与する中胚葉性血管芽細胞（メゾアンギオブラスト）が移植細胞源として有望である<sup>(7)</sup>。

薬物療法としては、ステロイドホルモンが使用されるが、有効性や副作用の面で問題が多い。近年、マイオスタチン阻害によって筋萎縮を抑制し、さらに骨格筋への炎症性細胞浸潤を抑える治療法が有効であることがわかってきた。動物モデルを用いた研究では、表2に示すように、デュシャンヌ型筋ジストロフィーのモデルの*mdx*マウス<sup>(14~16)</sup>や肢帯型筋ジストロフィーで変異が見られるカベオリン3<sup>(17)</sup>やデルタサルコグリカン<sup>(18)</sup>変異マウスを用いた実験から、マイオスタチン阻害の有効性、すなわち筋萎縮の改善、筋力の改善、筋崩壊の抑制が報告されている。抗がん剤として有望視されているHDAC（ヒストンデアセチラーゼ）阻害剤が、骨格筋でマイオスタチン阻害分子であるフォリスタチンの誘導を介して筋細胞の融合を促進する機構も解析されている<sup>(19)</sup>。一方、先天性筋ジストロフィーのメロシン欠損のモデルマウス（*dy*マウス）では、マイオスタチン阻害すると、筋量は確かに増加するが、脂肪量が過度に低下するため、全身状態がむしろ悪化する<sup>(20)</sup>。

米国では、製薬会社のWyeth社が開発したヒト型マイオスタチン阻害抗体（MYO-029）の臨床治験が進行している<sup>(7)</sup>。108人の主に肢帯型筋ジストロフィーや顔面肩甲上腕型筋ジストロフィーを中心に安全性と有効性の検討のために投与が行なわれている。さらに、小児に発症するデュシャンヌ型筋ジストロフィーにもいよいよ臨床治験が行なわれる見込みである。有効な筋ジストロフィー治療薬が世に出るのも秒読みに入ってきた感がある。筆者らはフォリスタチンというペプチド性ホルモンのマイオスタチン阻害活性に着目し、筋ジストロフィーなどの筋疾患治療への応用研究を行なっているところである<sup>(21, 22)</sup>。

マイオスタチン阻害による筋量増大は筋疾患治療に応用できる一方で、ドーピングに濫用されるのではないかという社会的な懸念もある。オリンピックシーズンになると必ず問題となるドーピングであるが、ライバル選手より少しでも速く走ったり、筋力を上昇させたい運動選

表2 ■ 動物実験でマイオスタチン阻害の有効性が検証された筋ジストロフィーの病型

病型	変異分子	有効性
デュシャンヌ型筋ジストロフィー	ジストロフィン	有効
肢帯型筋ジストロフィー 1C	カベオリン3	有効
肢帯型筋ジストロフィー 2F	δ-サルコグリカン	初期に有効
先天性筋ジストロフィー	メロシン（ラミニンα2）	脂肪低下により悪化

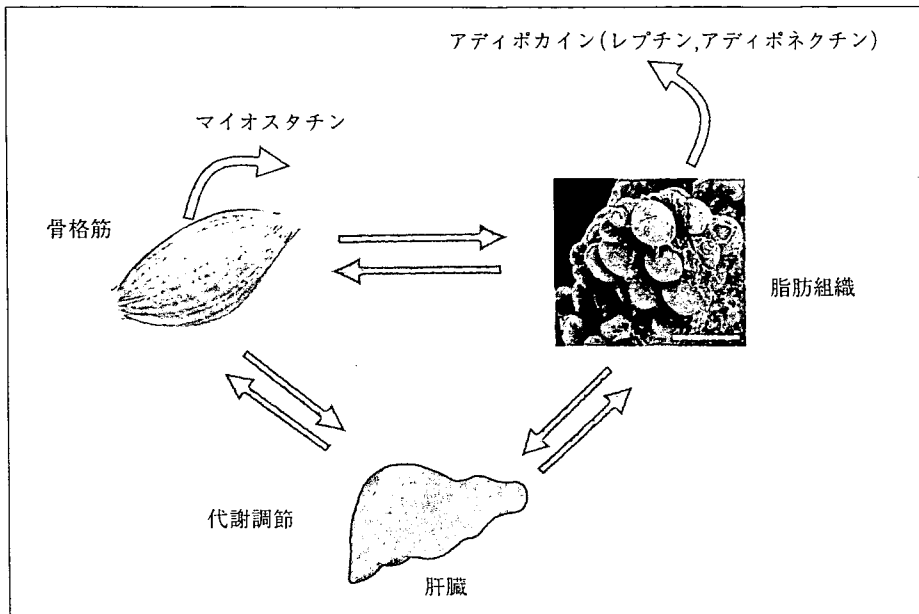


図2 ■骨格筋, 脂肪組織, 肝臓の相互作用

手にとって副作用のない筋肉増強剤は魅力的であり、マイオスタチンは運動生理学の立場からも注目を浴びている。

#### マイオスタチンと脂肪量低下, メタボリック症候群への応用

上述のように、マイオスタチン阻害により体脂肪量が低下する。マイオスタチンのノックアウトマウスでは、皮下脂肪と内臓脂肪の量が劇的に低下する。レプチンの低下や脂肪分化に必須の転写因子である C/EBP $\alpha$  や PPAR $\gamma$  の mRNA の低下が報告されている<sup>(23)</sup>。肥満・2型糖尿病のモデルマウスである KKAy マウスや ob/ob マウスはレプチン/レプチン受容体の遺伝子異常などによって摂食障害に起因した肥満と糖尿病を呈する。この肥満マウスで交配実験によってマイオスタチンを欠損させると、摂食量には変化が見られないが、脂肪が骨格筋に置き換わった体型になり、肥満や糖代謝の改善が見られる<sup>(24)</sup>。また、高脂肪食負荷による肥満も、マイオスタチン阻害により回避される<sup>(25, 26)</sup>。

脂肪組織は、生命活動に必要不可欠な臓器であるが、いわゆる生活習慣病によって量的および質的な異常をきたし、体脂肪が増加すると、メタボリック症候群をひき起こす。マイオスタチン阻害により、脂肪細胞の動態が劇的に変化することから、骨格筋と脂肪細胞の相互作用を考える上で重要な手がかりが得られるかも知れない(図2)。

#### おわりに

マイオスタチンは、その発見から10年を経えていないが、近年最も注目度が高いサイトカインの一つといえよう。ノックアウトマウスや自然発生の著しく筋肥大したウシを一目見れば強烈な印象を残す。筋肥大ばかりが目目されてきたが、マイオスタチン阻害による体脂肪の低下も著しい。マイオスタチンの生理作用を精査することで、生体内での骨格筋、脂肪細胞、肝臓の脂質代謝、糖代謝の上での相互の連携作用が浮かび上がってくることが期待できよう。農学的な応用と医学的な応用の面からもマイオスタチンは魅力的な研究素材である。高品質の産肉創製や筋ジストロフィー治療へのまったく新しい治療法への応用が考えられている。

#### 文献

- 1) A. C. McPherron & S. J. Lee: *Nature*, **387**, 83 (1997).
- 2) W. S. Bullough: *Cancer Res.*, **25**, 1683 (1965).
- 3) R. Kambadur, M. Sharma, T. P. Smith & J. J. Bass: *Genome Res.*, **7**, 910 (1997).
- 4) R. H. Bellinge, D. A. Liberles, S. P. Iaschi, P. A. O'Brien & G. K. Tay: *Anim. Genet.*, **36**, 1 (2005).
- 5) M. Schuelke, K. Wagner, L. E. Stolz, C. Hübner, T. Riebel, W. Kömen, T. Braun, J. F. Tobin & S. J. Lee: *New. Eng. J. Med.*, **350**, 2682 (2004).
- 6) F. S. Walsh & A. J. Celeste: *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1513 (2005).
- 7) K. Tsuchida: *Expert Opin. Biol. Ther.*, **6**, 147 (2006).
- 8) S. J. Lee: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **20**, 61 (2004).
- 9) K. Tsuchida: *Curr. Drug. Targets.*, **4**, 157 (2004).
- 10) J. V. Chakkalakal, J. Thompson, R. J. Parks & B. J. Jamin: *FASEB J.*, **19**, 880 (2005).

- 11) K. Patel & H. Amthor: *Neuromuscul. Disord.*, **15**, 117 (2005).
- 12) J. F. Tobin & A. J. Celeste: *Curr. Opin. Pharmacol.*, **5**, 328 (2005).
- 13) G. Carnac, S. Ricaud, B. Vernus & A. Bonnieu: *Mini Rev. Med. Chem.*, **6**, 765 (2006).
- 14) S. Bogdanovich, T. O. Krag, E. R. Barton, L. D. Morris, L. A. Whittemore, R. S. Ahima & T. S. Khurana: *Nature*, **420**, 418 (2002).
- 15) K. R. Wagner, A. C. McPherron, N. Winik & S. J. Lee: *Ann. Neurol.*, **52**, 832 (2002).
- 16) S. Bogdanovich, K. J. Perkins, T. O. Krag, L. A. Whittemore & T. S. Khurana: *FASEB J.*, **19**, 543 (2005).
- 17) Y. Ohsawa, H. Hagiwara, M. Nakatani, A. Yasue, K. Moriyama, T. Murakami, K. Tsuchida, S. Noji & Y. Sunada: *J. Clin. Invest.*, **116**, 2924 (2006).
- 18) S. A. Parsons, D. P. Millay, M. A. Sargent, E. M. McNally & J. D. Molkenin: *Am. J. Pathol.*, **168**, 1975 (2006).
- 19) G. C. Minetti *et al.*: *Nature Med.*, **12**, 1147 (2006).
- 20) Z. F. Li, G. D. Shelton & E. Engvall: *Am. J. Pathol.*, **166**, 491 (2005).
- 21) 土田邦博: *生化学*, **77**, 440 (2005).
- 22) K. Tsuchida, Y. Sunada, S. Noji, T. Murakami, A. Uezumi & M. Nakatani: *Mini Rev. Med. Chem.*, **6**, 1255 (2006).
- 23) J. Lin, H. B. Arnold, M. A. Della-Fera, M. J. Azain, D. L. Hartzell & C. A. Baile: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 701 (2002).
- 24) A. C. McPherron & S. J. Lee: *J. Clin. Invest.*, **109**, 595 (2002).
- 25) B. Zhao, R. J. Wall & J. Yang: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **337**, 248 (2005).
- 26) M. W. Hamrick, C. Pennington, C. N. Webb & C. M. Isaacs: *Int. J. Obes. (Lond)*, **30**, 868 (2006).

## プロフィール

西山 繁 (Shigeru Nishiyama) <略歴>1971年慶應義塾大学工学部応用化学科卒業/1973年同大学大学院工学研究科応用化学専攻修士課程修了/1976年同後期博士課程所定単位取得退学/1980年同大学工学部助手/1981年同大学理工学部助手(学部改組による)/1985年同講師/1991年同助教授/1997年同教授,現在にいたる。この間,1978年西ドイツ・ダルムシュタット工科大学アレキサンダー・フォン・フンボルト財団研究員(2年間),1977年工博(慶應義塾大学)<研究テーマと抱負>天然有機化合物の全合成を通じた新規人工生物活性物質の創製,真に環境に優しい化学合成法の開発<趣味>ウォーキング

二ノ宮裕三 (Yuzo Ninomiya) Vol. 37, No. 2, p. 139 参照

馬場 光久 (Mitsuhsa Baba) <略歴>1991年東京農工大学農学部環境保護学科卒業/1996年同大学大学院連合農学研究科博士課程中退/1996年北里大学獣医畜産学部助手/2000年同講師,現在にいたる。この間,1992~93年チェコ共和国・チェコ地質学研究所,1993年2~6月オランダ・ワーゲニンゲン農科大学土壌・地質学科,1999年農博(東京農工大学)<研究テーマと抱負>森林,草地における窒素動態と他の物質動態との関わり<趣味>オペラ鑑賞,彫刻

福森 義宏 (Yoshihiro Fukumori) <略歴>1975年大阪大学理学部生物学科卒業/1980年同大学大学院理学研究科生理学専攻博士後期課程修了(理博)/同年同大学理学部生物学科教務職員/1982年東京工業大学理学部化学科助手/1988年同助教授/1990年同大学生命理工学部生理学科助教授/1997年金沢大学理学部

生物学科教授/2004年同大学大学院自然科学研究科生命科学専攻教授,現在にいたる<研究テーマと抱負>磁性細菌の生理生化学,有鬚動物と微生物の共生,巨大ヘモグロビンの構造生物学<趣味>運動不足を解消するための自転車走行

藤田 泰太郎 (Yasutaro Fujita) <略歴>1969年京都大学農学部農芸化学科卒業/1974年同大学大学院農学研究科農芸化学専攻博士後期課程修了(農博)/1978年浜松医科大学助手/1987年福山大学工学部助教授/1989年同教授/2002年同大学生命工学部教授(改組による),現在にいたる。この間,1974年米国国立衛生研究所(NIH)客員研究員<研究テーマと抱負>枯草菌代謝制御ネットワークの解明,細菌の薬剤耐性遺伝子の探索とその成因の解明

前田 守弘 (Morihiro Maeda) <略歴>1991年京都大学工学部衛生工学科卒業/1993年同大学大学院工学研究科衛生工学専攻修士課程修了/同年農林水産省農業研究センター水質保全研究室研究員/2001年(独)農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センター資源循環・溶脱低減研究チーム主任研究員,現在にいたる。この間,1998年科学技術庁長期在外研究員(スウェーデン農科大学),2002年工博(京都大学)<研究テーマと抱負>畑地における硝酸性窒素溶脱のモニタリングとモデル化,環境と調和した農業の発展に真に役立つ研究をしたい<趣味>空手,ジョギング

安松 啓子 (Keiko Yasumatsu) <略歴>平成3年九州大学歯学部歯学科卒業,同年より歯学診療に携わり,11年九州大学大学院歯学研究科博士課程入学/15年同博士課程修了(歯博),同大学大学院学術研

究員を経て,現在,同特任講師<研究テーマと抱負>味覚関連蛋白質などの機能分析<趣味>料理

山本 兼由 (Kaneyoshi Yamamoto) <略歴>2000年近畿大学大学院農学研究科博士後期課程修了(農博)/同年科学技術振興事業団CREST博士研究員/2002年近畿大学農学部助手/2006年同講師,現在にいたる<研究テーマと抱負>細菌ゲノム機能の解明,転写制御の分子機構の解明

吉澤 史昭 (Fumiaki Yoshizawa) <略歴>1989年東京農工大学農学部農芸化学科卒業/1991年同大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了/1994年同大学大学院連合農学研究科生物工学専攻博士課程中退/同年岩手県立盛岡短期大学助手/1998年岩手県立大学盛岡短期大学部講師/2000年宇都宮大学農学部助教授,現在にいたる。1996~97年米国ペンシルバニア州立大学医学部博士研究員,1995年農博(東京農工大学)<研究テーマと抱負>アミノ酸による代謝調節機構の解明,最も古い栄養素であるアミノ酸が潜在的にもつ能力を新たに発掘することに魅力を感じている<趣味>美味しいものを採り当てること

渡辺 純 (Jun Watanabe) <略歴>2001年北海道大学大学院農学研究科博士後期課程修了(農博)/同年日本学術振興会特別研究員/2002年(独)食品総合研究所開放的融合研究員/2003年北海道大学創成科学共同研究機構特任助教授,現在にいたる<研究テーマと抱負>腸内細菌の宿主免疫応答への影響の解析,アレルギー抑制機能を有する食品の設計<趣味>自転車レース(自転車通勤でいい汗かいています)

# マイオスタチン阻害分子の開発の現状と 筋ジストロフィー治療実現への展望

藤田保健衛生大学 総合医科学研究所 難病治療学部門 教授 <sup>つちだ</sup> <sup>くにひろ</sup>  
**土田 邦博**



## 在宅ケアにおける筋力増強の意義

筋ジストロフィーに限らず、筋肉が障害される難病患者を在宅で看護する際には、患者さんの筋力の低下が重要な問題となります。骨格筋は維持するのに多くのエネルギーが必要で、手間がかかる臓器です。骨格筋は運動して鍛えると量が増加しますが、使わないと萎縮していきます。筋力を少しでも増加・増強させることが可能であれば、患者自身のQOLの改善と在宅ケアの面から見ても好都合です。介護者の負担を少しでも軽減出来ればこれに勝る福音はないでしょう。急激な高齢社会を迎えている日本の現状を見ても、筋ジストロフィーに限らず、在宅における筋力増強の意義は計り知れないものがあります。

## マイオスタチンとは

私たちヒトを含めて、生物の体の中には、蛋白質で出来た生理活性物質があり、細胞増殖因子あるいはホルモンといった名前と呼ばれています。細胞増殖因子は、とても数や種類が多く、ひとつひとつが生体内で重要な働きをしています。マイオスタチンもそういった細胞増殖因子の一つです。蛋白質の構造から見ると、腫瘍増殖因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ )ファミリーの仲間の一つです。TGF- $\beta$ ファミリーの中には、マイオスタチン以外にも、がん細胞の増殖を制御するTGF- $\beta$ 、骨形成作用の強力な骨形成因子、生殖腺の形成や生物の初期発生に重要なアクチビン、ノーダルなどが含まれます。

マイオスタチンは、TGF- $\beta$ ファミリーに属する新しい因子を探すという研究の中から発見され、当初は、スクリーニングの8番目に見つかったことから、増殖分化因子8 (GDF8)と呼ばれていました。現在でも、GDF8と呼ばれることはありますが、骨格筋の増殖を強力に抑制する作用がとても強いた

め、マイオスタチンと名前がつけ直されました。マイオが筋肉を意味し、スタチンが抑制を意味しています(図1)。

マイオスタチンの産生場所は、骨格筋が主ですが、脂肪組織でも少量作られるようです。作用する部位も骨格筋が中心です。マイオスタチンは骨格筋で産生されたのち、局所(骨格筋)でも働きますが、血液中にも流れていきます。その点では、筋肉が産生する内分泌ホルモンとも言えます。

## マイオスタチンが働かなくなると 筋肉の量が増える

上述のように、マイオスタチンは骨格筋の増殖を強力に抑制する作用があります。その作用は劇的とさえ言えます。実験動物のマウスでは、ねらったひとつの遺伝子を破壊してその遺伝子の役割を研究する方法が可能です。ノックアウトマウスと呼ばれる方法です。アメリカの研究者がマウスのマイオスタチン遺伝子をノックアウトしたところ、体中の筋肉(骨格筋)が異常な程肥大することを見つけました。今から10年前の1997年のことです。

ヨーロッパに筋肉が増加した家畜ウシがいることが以前から知られていましたが、このウシではマイオスタチン遺伝子が変異して、正常なマイオスタチンが作られないことも分かってきました。日本の

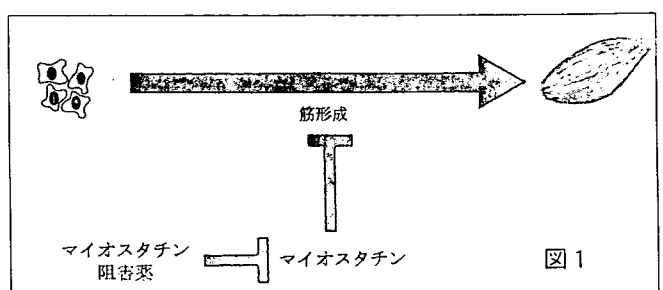


図1



ウシやイギリスの羊でもマイオスタチン変異することで筋肥大する種類が見つっています。ごく最近では、短距離のドッグレースで活躍する犬にもマイオスタチン遺伝子異常が見つっています。面白いことに、マイオスタチンのヘテロ変異種の犬は、筋肉もよく付いていて、レースで最も速く走れます。ホモ変異種は筋肉が付きすぎるためか、走る速度はヘテロ変異種ほど速くはありませんでした。このことは、マイオスタチンは完全になくなくても、筋肉の量が増加し早く走れるようになることを意味しています。

今から3年前には、マイオスタチン遺伝子の変異したドイツの男の子が報告されました。この男児は、運動選手として活躍した母親の子供で、新生児の頃より、手足の筋肉が良く発達していて5歳にして3Kgのダンベルを持ち上げる力があります。今のところ、体の筋肉が発達して、逆に体脂肪が落ちている以外には、知能の発達にも、心臓の機能にも問題はなさそうです。マイオスタチンがヒトの骨格筋の量も調節していることがわかってきたわけです。

## 筋ジストロフィーの治療法としての マイオスタチン阻害

マイオスタチンを働かなくすれば、筋肉の量が増えるのなら、なんらかの方法で、マイオスタチンを阻害すれば、筋肉がやせていく病気である筋ジストロフィーの治療にも使えるのではないかとこの発想が生まれてきました。

現在は、世界的にも抗体医薬品の開発がさかんですが、欧米の会社がマイオスタチンのヒト型抗体を開発しました。マイオスタチンを認識してその機能を阻害するモノクローナル抗体です。これは、欧米では、正常のボランティアの人や筋ジストロフィー患者さんに投与して安全性に問題がないかそして治療効果があるかについて臨床試験が行われています。

今まで、治療法がなかった筋ジストロフィーにもいよいよ治療薬が出てくる可能性が高くなってきました。試験の対象としては、ベッカー型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、

いくつかの種類の肢帯型筋ジストロフィーが対象となっています。108名の筋ジストロフィーの患者さんに投与されています。筋ジストロフィーで最も患者数が多く、症状の重いデュシェンヌ型筋ジストロフィーの患者さんにも投与が検討されています。

動物実験では、表1に示したように、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、カベオリン3変異やカルパイン3の変異による筋ジストロフィーでの有効性が示されています。デルタサルコグリカン変異による筋ジストロフィーも早期に治療すれば生存率が高まります。

マイオスタチン阻害療法は、筋ジストロフィー以外にも、筋萎縮性側索硬化症にも延命効果があるという報告があります。また、老化や廃用性筋萎縮、骨折後ギブス固定で生じる筋萎縮の防止にも応用出来る可能性があります。さらには、脳卒中後のリハビリにも効果があるかも知れません。

## マイオスタチン阻害分子の開発の現状

上記の抗体を開発した会社以外にも、様々な方法でマイオスタチンの作用を阻止する分子の開発が進んできています。欧米では、新興のベンチャー企業や大手の製薬会社がマイオスタチン阻害分子の開発に取り組んでいるようです。マイオスタチンは、われわれヒトの血液中にも検出されます。生化学の方法を用いて、血液の中で、マイオスタチンと結合している分子を探す研究が行われました。

この研究から、マイオスタチンが合成される際に切り離される部分(マイオスタチン前駆体ペプチド)やフォリスタチンと呼ばれるホルモンがマイオスタチンと結合することが分かってきました。これらの物質もマイオスタチンを阻害する能力があります。ですから、マイオスタチンを阻害するには、抗体以

表1 筋ジストロフィーの病型とマイオスタチン阻害の有効性

病型	遺伝形式	遺伝子座	遺伝子産物	マイオスタチン阻害の有効性 (動物実験)
デュシェンヌ	性染色体劣性	Xp21	ジストロフィン	抗体や阻害剤投与で有効
肢帯型1C (CAV3)	常染色体優性	3p25	カベオリン3	阻害剤投与や動物の交配実験で有効
肢帯型2A (CAPN3)	常染色体劣性	15q15-21	カルパイン3	遺伝子治療で有効
肢帯型2D (SGCA)	常染色体劣性	17q12-21	$\alpha$ サルコグリカン	遺伝子治療では有効性は認められない
肢帯型2F (SGCD)	常染色体劣性	5q33	$\delta$ サルコグリカン	早期治療が有効
先天性1A (LAMA2)	常染色体劣性	6q22	ラミニン $\alpha$ 2	体脂肪が減少。むしろ病態が悪化

表2 デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療法開発の現状

治療法	現状	特徴
ストップコドンの抑制	経口薬の初期臨床試験	ストップコドンが途中で入る患者にのみ有効
ウイルスベクターによる遺伝子治療	動物実験で有望	局所で効果 免疫反応の問題
細胞移植治療	中胚葉性血管芽細胞が有望	動脈投与の必要性 免疫反応の問題
マイオスタチン阻害療法	抗体が成人患者で臨床試験中	遺伝子治療との併用が望ましい

筋肉の幹細胞が枯れてなくなってしまうと病状が悪化してしまうのではという心配があります。特に、実験動物のマウスは再生能力が盛んですが、ヒトはマウスほどには活発ではありません。そのヒトで過度に筋衛星細胞が活性化

外にも、マイオスタチン前駆体ペプチド、フォリスタチンやその構造類似体、マイオスタチンの受容体を可溶性にした分子、マイオスタチン受容体の阻害剤など多くの方法があるわけです。近い将来には、こういった研究の中から、筋ジストロフィー患者さんに投与可能な薬が出来てくる可能性があります。

デュシェンヌ型筋ジストロフィーの治療法として、表2のような様々な方法の有効性を確かめようとする動きがあります。マイオスタチン阻害療法では、筋ジストロフィーの原因である遺伝子異常を直すことは出来ません。マイオスタチン阻害療法は、遺伝子を補う遺伝子治療や細胞移植治療と併用するとより効果的ではないかと言われています。つまり、変異してしまった遺伝子の異常は遺伝子治療や細胞移植で補ってやり、筋肉が萎縮していくのはマイオスタチン阻害療法で救おうという発想です。

## 今後の展望と問題点

実際に、患者さんを治療するまでには、マイオスタチン阻害療法がどの筋ジストロフィーの病型に適応があるのか、そしてどの段階で治療を開始するのが適当であるかをよく検討する必要があります。実験動物モデルを用いた研究では、有効な病型が多く報告されています。しかし、ラミニンが原因の筋ジストロフィーでは、マイオスタチンを阻害すると、脂肪量が落ちて、かえって全身状態が悪くなると報告されています(表1)。

骨格筋には、筋細胞膜直下に筋衛星細胞と呼ばれる幹細胞が存在しています。この細胞が、筋肉が障害された時に活性化され、筋線維を作り、他の筋線維と融合して数を増やしていつたりして再生を促しているわけです。マイオスタチンを遮断すると、筋再生が促され、筋衛星細胞が活性化すると考えられています。

長期にわたってマイオスタチンを遮断するとこの

してしまうと、筋衛星細胞が無くなってしまわないかという心配です。また、太い筋線維ほど障害されやすいとも言われており、『太ければ太い程良い』という訳ではないのかも知れません。また、マイオスタチン遺伝子が変異したウシやマウスでは、筋肉の量は増えるものの、持久力がなく疲れやすいとも言われています。

これは、主に早筋が増加するためだと考えられます。遅筋も含めたバランスの良い筋量の増加が望ましいでしょう。また、お年寄りで筋肉だけを増やすと、脆くなった骨や腱が増量した筋肉を支えきれなくなるのではと心配する研究者もいます。

マイオスタチン阻害療法が将来的に運動選手のドーピングに使われてしまうかも知れないという不安もあります。運動選手にとって、筋力が増やせることは、ライバルの選手に勝つためには魅力的です。オリンピックが開催されるたびに問題となるドーピングは、いくら取り締まっても、後を絶ちません。将来、マイオスタチンを阻害する薬や遺伝子治療を健康な人が使ってしまう危険性があります。

上記のような問題点も取り上げられてきていますが、筋肉がやせ細ってしまう筋ジストロフィーには、有効な治療法が存在しないのが現状です。

マイオスタチン阻害療法は、単独でも効果がありますが、ジストロフィンの遺伝子治療と組み合わせればより効果が高いと考えられています(表2)。筋量と筋力を上昇させる方法が開発され臨床の現場で使用可能になってくれば、在宅ケアの負担も少なくなっていくことが期待出来ます。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの責任分子であるジストロフィンが発見されて、今年で20年になります。ようやく、様々な試行錯誤の末、筋ジストロフィー治療に光がさしてきたように思われます。マイオスタチン阻害療法も含めて、一日も早く、筋ジストロフィーに有効な治療法が開発されることはこの難病を持つ患者、家族、そして医療に携わる人々の共通した願いです。

**ORIGINAL****Characterization of follistatin-related gene as a negative regulatory factor for activin family members during mouse heart development**

Yuka Takehara-Kasamatsu<sup>1,2</sup>, Kunihiro Tsuchida<sup>1,3</sup>, Masashi Nakatani<sup>1,3</sup>, Tatsuya Murakami<sup>3</sup>, Akira Kurisaki<sup>1</sup>, Osamu Hashimoto<sup>4</sup>, Hideyo Ohuchi<sup>5</sup>, Hitomi Kurose<sup>5</sup>, Kazuhiro Mori<sup>2</sup>, Shoji Kagami<sup>2</sup>, Sumihare Noji<sup>5</sup>, and Hiromu Sugino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Enzyme Research, The University of Tokushima, Tokushima, Japan, <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan ; <sup>3</sup>Division for Therapies Against Intractable Diseases, Institute for Comprehensive Medical Sciences, Fujita Health University, Toyoake, Japan ; <sup>4</sup>Laboratory of Experimental Animal Science, Kitasato University, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Towada, Japan ; and <sup>5</sup>Department of Biological Science and Technology, Faculty of Engineering, The University of Tokushima, Tokushima, Japan

**Abstract :** Follistatin-related gene (FLRG) encodes a secretory glycoprotein that has characteristic cysteine-rich follistatin domains. FLRG protein binds to and neutralizes several transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily members, including myostatin (MSTN), which is a potent negative regulator of skeletal muscle mass. We have previously reported that FLRG was abundantly expressed in fetal and adult mouse heart. In this study, we analyzed the expression of FLRG mRNA during mouse heart development. FLRG mRNA was continuously expressed in the embryonic heart, whereas it was very low in skeletal muscles. By contrast, MSTN mRNA was highly expressed in embryonic skeletal muscles, whereas the expression of MSTN mRNA was rather low in the heart. *In situ* hybridization and immunohistochemical analysis revealed that FLRG expressed in smooth muscle of the aorta and pulmonary artery, valve leaflets of mitral and tricuspid valves, and cardiac muscles in the ventricle of mouse embryonic heart. However, MSTN was expressed in very limited areas, such as valve leaflets of pulmonary and aortic valves, the top of the ventricular and atrial septa. Interestingly, the expression of MSTN was complementary to that of FLRG, especially in the valvular apparatus. Biochemical analyses with surface plasmon resonance biosensor and reporter assays demonstrated that FLRG hardly dissociates from MSTN and activin once it bound to them, and efficiently inhibits these activities. Our results suggest that FLRG could function as a negative regulator of activin family members including MSTN during heart development. *J. Med. Invest.* 54 : 276-288, August, 2007

**Keywords :** FLRG, myostatin, activin, follistatin, heart

Received for publication March 30, 2007 ; accepted May 7, 2007.

Address correspondence and reprint requests to Yuka Takehara-Kasamatsu, Department of Pediatrics, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Kuramoto-cho, Tokushima 770-8503, Japan and Fax : +81-88-631-8697.

**INTRODUCTION**

The TGF- $\beta$  superfamily consists of multifunctional proteins including TGF- $\beta$ s, activins, and bone morphogenetic proteins (BMPs), which regulate the growth, differentiation, metabolism, and apoptosis of

various cell types (1-4). The cellular functions and signaling of these proteins are regulated in diverse manners, intracellularly and extracellularly. During investigations of regulatory mechanisms for activin functions, we have identified a mouse follistatin-like protein, which was most likely a mouse homologue of the human follistatin-related gene (FLRG) (5, 6). Although FLRG was originally cloned at the breakpoint of the chromosomal rearrangement in a B cell chronic lymphocytic leukemia carried at t(11; 19) (q13; p13) translocation (7), the physiological function has not been identified.

Follistatin (FS) is a single chain protein and has three cysteine-rich FS domains, which are presumed to be growth factor binding motifs (8, 9). In fact, FS binds to activins with high affinity, and prevents their binding to receptors, thereby neutralizing all aspects of biological activities of activins (4, 10, 11). FS also functions as a BMP binding protein, although the affinity for BMPs is much lower than that for activins (12). We have previously reported that FLRG protein has domain structures similar to FS and shows high affinity for activins and BMPs like FS (5, 13).

Recently, both FS (14, 15) and FLRG (14, 16) protein have been shown to bind to myostatin (MSTN), which is another member of the TGF- $\beta$  superfamily. MSTN, also known as growth and differentiation factor 8 (GDF-8), is almost exclusively expressed in developing and adult skeletal muscle, and functions as a negative regulator of skeletal muscle mass by controlling myoblast proliferation (17, 18); however, several lines of evidences suggested that MSTN plays a broader role other than the inhibition of skeletal muscle cell growth. Sharma, *et al.* showed that MSTN mRNA was detected in fetal and adult heart tissues, and this gene was upregulated in cardiomyocytes bordering an infarct area (19). Moreover, Cook, *et al.* found that MSTN regulated cardiomyocyte growth through modulation of serine-threonine kinase AKT signaling by using MSTN-null mice (20, 21).

In this study, we explored the role of FLRG in the heart during mouse development. We studied the expression of FLRG in heart by RNA *in situ* hybridization and immunohistochemistry. We also analyzed the expression of FLRG and MSTN genes by using *in vitro* P19CL6 cardiomyocyte differentiation system. Biochemical analyses with reporter assay and binding assay suggested that FLRG could function as a negative regulator of activin family members during heart development.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals*

Pregnant wild-type ICR mice were purchased from Japan CLEA (Tokyo, Japan). Embryos were retrieved by Caesarian section from pregnant female mice anesthetized with diethylether, followed by cervical dislocation. All animal experiments in this study were performed in accordance with the guideline principles of The Institutional Animal Care and Oversight Committee and were approved by The Committee for the Care and Use of Animals in The University of Tokushima Faculty of Medicine.

Hearts and skeletal muscles of hind limbs were dissected from each embryo (E10.5, E12.5 and E14.5), newborn (P1, P3, P8, and P15) and adult (pregnant female). The hearts were rinsed with sterile RNase free phosphate-buffered saline (PBS) containing 10 U/ml heparin, and then used for RNA isolation.

### *Cell culture and cardiomyocyte differentiation*

P19CL6 cells were purchased from RIKEN Gene Bank (Tsukuba, Japan). Cells were cultured essentially as described previously (22). Briefly, the cells were grown in a 100-mm tissue culture grade dish under adherent conditions in growth medium ( $\alpha$ -MEM) supplemented with 10% FCS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ g/ml). For the induction of cardiomyocyte differentiation, P19CL6 cells were plated at a density of  $3.7 \times 10^5$  in a 60-mm tissue culture grade dish in growth medium containing 1% dimethyl sulphoxide (DMSO). The medium was changed every two days. The first day of DMSO treatment was designated day 0, and days of differentiation were counted consecutively.

### *RNA isolation and RT-PCR analysis*

For the semi-quantitative analysis of FLRG and MSTN mRNA expression, total RNA was extracted from mouse hearts, skeletal muscles, or cultured P19CL6 cells with TRIzol reagent (Gibco BRL), and each sample was treated with RNase-free DNase I. First-strand cDNA was synthesized in a 20  $\mu$ l reverse transcriptase (RT) reaction with 3  $\mu$ g of total RNA using SuperScript III (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. One  $\mu$ l of the RT reaction was amplified by PCR with 0.25 U of ExTaq DNA polymerase (Takara) in 25  $\mu$ l of a reaction mixture containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each dNTP and 0.5  $\mu$ M of oligonucleotide primers. The primers used for RT-PCR analysis are shown in Table 1.  $\beta$ -actin amplification was

Table 1 Oligonucleotide primers used for RT-PCR in this study

Gene	GenBank Accession No.	Primer sequence
FLRG	AB024429	F: 5'-ACTCTGTGGCAACAACAACG-3' (621-640) R: 5'-TTCTCTTCCCTCTGCTGG-3' (742-761)
MSTN	NM_010834	F: 5'-GCACTGGTATTTGGCAGAGTA-3' (702-722) R: 5'-CACACTCTCCTGAGCAGTAAT-3' (1026-1046)
Nkx 2.5	X75415	F: 5'-TCTCCGATCCATCCCACTTTATTG-3' (1368-1391) R: 5'-TTGCGTTACGCACTCACTTTAATG-3' (1566-1589)
GATA4	NM_008092	F: 5'-AGCAGGACTCTTGGAACAGC-3' (1872-1891) R: 5'-CAGGCAGGTGGAGAATAAGG-3' (2214-2233)
$\beta$ -actin	NM_007393	F: 5'-CCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGC-3' (785-807) R: 5'-TGCTGATCCACATCTGCTGGAAG-3' (1133-1155)

The sequence of forward (F) and reverse (R) strand primers are shown together with GenBank accession numbers relating to the DNA sequences from which they were obtained.

used as an internal control. Full-length cDNA clone for FLRG in pBluescript vector (Stratagene) and a HindIII-BamHI fragment of MSTN in pBluescript vector were used as positive controls (data not shown). PCR programs were as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 60°C for 1 min (for FLRG cDNA amplification, the annealing temperature was set at 57°C) and 72°C for 1 min. Amplified products (20  $\mu$ l) were resolved by 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and photographed under UV light.

#### RNA in situ hybridization

Mouse embryos were fixed in 4% paraformaldehyde and dehydrated before embedding in paraffin. *In situ* hybridization was performed on 5- $\mu$ m-thick paraffin sections as described (23). The full-length cDNA clone for FLRG in pBluescript vector, a HindIII-BamHI fragment of MSTN in pBluescript vector, full-length cDNA clone for mouse activin A in pGEM-T-Easy vector (Promega), a NcoI-SpeI fragment of mFS in pGEM-T-Easy vector, and a BamHI-HindIII fragment of GDF-11 in pBluescript vector were used to prepare the probe. Digoxigenin-labeled RNA probes were prepared according to the standard procedure. In parallel with antisense probes, the corresponding sense probes were used as negative controls.

#### Immunohistochemistry

Mouse embryos and hearts dissected from adult mice were fixed in 4% paraformaldehyde and dehydrated before embedding in paraffin wax. Serial sections were then cut at 8  $\mu$ m by cryostat, and mounted on 3-aminopropyltriethoxysilane-coated glass slides. After deparaffinization and rehydration, sections were treated with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100% methanol for 30 min at -20°C, and then boiled in 10 mM sodium citrate

buffer (pH 6.0) for 5 min. The sections were washed by TBST (0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline) and then blocked with 1.5% BSA in PBS for 1 hr at room temperature. The samples were then incubated with 1:100 diluted anti-mouse FLRG monoclonal antibody or 1:100 diluted anti-MSTN monoclonal antibody (clone JA16; Wyeth Research) in blocking buffer overnight at 4°C. Staining without primary antibodies was used as a negative control. The sections were washed with three changes of TBST, incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 45 min at room temperature, and then visualized by ImmunoPure Metal Enhanced DAB substrate Kit (PIERCE, Rockford, IL). The sections were also counterstained with hematoxylin.

#### Purification of human FLRG protein

Bovine activin A was conjugated to affigel-10 column (BioRad) in 0.5 M NaHCO<sub>3</sub> (pH 8.0) buffer at room temperature for 1 hr and then at 4°C overnight. The activin A-conjugated column was equilibrated with a binding buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.15 M NaCl and 0.03% CHAPS) before use.

CHO cells stably expressing human FLRG were grown in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FCS until confluency, and then conditioned with serum-free EC-CELL301 medium. The conditioned medium was first fractionated by ammonium sulfate precipitation (30-80%), and then passed through an activin A-conjugated column at a flow rate of 0.2 ml/min. Columns were washed with binding buffer, and then eluted with elution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.0 M NaCl, 0.03% CHAPS containing 1 M Guanidine-HCl). Eluted proteins were concentrated by ultrafiltration, and the buffer was changed to PBS containing 0.03% CHAPS. Samples were resolved by 12.5% SDS-PAGE and blotted onto a PVDF membrane.

FLRG protein was detected with anti-human FLRG antibody followed by enhanced chemiluminescence (ECL) reaction.

#### Surface plasmon resonance (SPR) biosensor analysis

All measurements were performed using a BIACORE X system (Biacore AB). For immobilized samples, proteins were dissolved in 20 mM sodium acetate (pH 4.5) at a concentration of 10  $\mu$ g/ml and immobilized on sensor chip CM5 at a flow rate of 5 ml/min at 25°C. The immobilized ligands were regenerated after each cycle using a 40 ml injection of 10 mM HEPES (pH 7.4) / 2 M guanidine-HCl. The kinetic parameters, association rate constant ( $k_{on}$ ) and dissociation rate constant ( $k_{off}$ ) were determined using BIA evaluation software version 3.0 (Biacore AB).

FLRG protein was purified as described above. Bovine activin A and human FS-288 were purified as described previously (24). Human MSTN, GDF-11 and BMP proteins were either from R&D systems or Wyeth Research.

#### Luciferase assays

HEK293 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma), supplemented with 10% FCS. Cells plated at a density of  $4 \times 10^4$  in a 24-well dishes were transfected with 500 ng of CAGA-luc reporter DNA, and 200 ng of the cytomegalovirus promoter- $\beta$ gal (CMV- $\beta$ gal) DNA by the calcium phosphate precipitation method (25). Twenty-four hours after transfection, the cells were stimulated with activin A (20 ng/ml), TGF- $\beta$ 1 (15 ng/ml), MSTN (20 ng/ml) or GDF-11 (20 ng/ml) in media containing 1% FCS for 24 hr. In order to study whether FS or FLRG has inhibitory effects on activin A, TGF- $\beta$ 1, MSTN or GDF-11, FS or FLRG proteins were simultaneously added to these stimulants. Luciferase activity was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity as described previously (26).

## RESULTS

### Expression of FLRG and MSTN mRNAs in heart and limbs during mouse development

First, we analyzed the expression of FLRG during cardiac muscle development in mouse. For this purpose, we purified hearts mRNAs from mouse embryos, newborn littermates and adult mice, and performed RT-PCR analysis with the set of primers listed in Table 1. In adult mice, FLRG mRNA was

abundantly expressed in the heart (Fig. 1A), as we reported previously (5). During development, FLRG mRNA was continuously expressed in the heart from the early embryonic stage (E10.5) to adult (Fig. 1A, upper panel). When we analyzed the expression of MSTN, one of the binding partners for FLRG, MSTN mRNA was also expressed in the heart during the early embryonic stage (E10.5-14.5). The expression, however, dropped after birth, and then later gradually increased but did not reach to the expression level at E10.5 (Fig. 1A, middle panel).

When the expressions of these genes were analyzed in skeletal muscle obtained from the hind limbs of the same animals, we found that skeletal muscle constantly expressed MSTN mRNA during development (Fig. 1B, middle panel). In contrast to the heart, however, a very limited amount of FLRG mRNA was expressed in skeletal muscle during embryogenesis. The expression of FLRG mRNA was transiently increased in embryos at E14.5, and then decreased after birth (Fig. 1B, upper panel). These results raised the possibility that FLRG may regulate the development and maintenance of heart tissue, similarly as MSTN regulates the growth and differentiation of skeletal muscles.

### Expression of FLRG and MSTN mRNAs in differentiating P19CL6 cells

To verify the characteristic expression of FLRG and MSTN mRNAs during heart development, we took advantage of the P19CL6 *in vitro* cardiomyocyte differentiation system. The P19CL6 cell line is a sub-

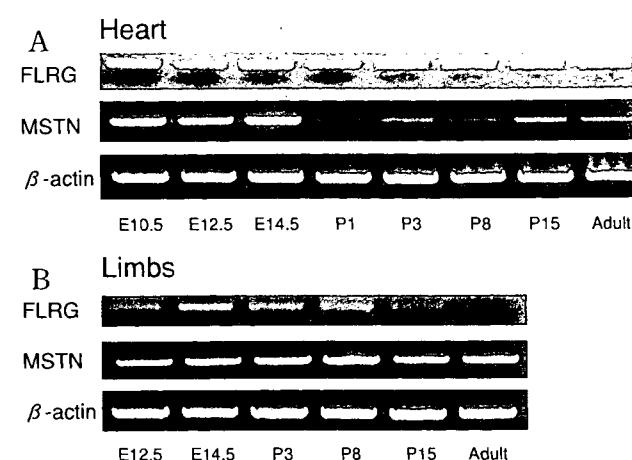


Fig. 1 Expression profiles of FLRG and MSTN mRNAs in heart and limb during mouse development.

Mouse heart ventricles and skeletal muscle of hind limbs were collected from embryos (E10.5, E12.5, and E14.5), newborns (P1, P3, P8 and P15) and adults (pregnant female). Total RNAs were isolated from each sample and RT-PCR was performed to detect FLRG and MSTN mRNAs expression.  $\beta$ -actin was used as the internal control.

line of P19 embryonic carcinoma stem cells. This cell line shows efficient differentiation into beating cardiac myocytes after induction with DMSO (22). When we cultured P19CL6 in the presence of 1% DMSO, the first contraction was observed at some part of the restricted area of the sheet on day 12. On day 14, almost all parts of the sheet beat synchronously. Under these conditions, the expression of FLRG, MSTN, and early cardiac-specific regulatory genes, *nkx2.5* and *gata4*, were analyzed by RT-PCR in four stages (day 4, 8, 12, 16). As previously reported (27), cells expressed *gata4* as early as 4 days after DMSO treatment, and then *nkx2.5* was detected at day 8 (Fig. 2), suggesting that P19CL6 cells specifically differentiated to cardiomyocytes. FLRG mRNA was detected at day 4, and continued to be expressed after synchronous beating occurred. On the other hand, the expression of MSTN mRNA was observed after day 12, concurrently with spontaneous beating. In control P19CL6 cells, we failed to detect either FLRG mRNA expression by RT-PCR, or FLRG protein by Western blotting, although we detected the expression of FLRG protein in cardiogenic P19CL6 cells on day 6 by immunofluorescence (data not shown). These results further strengthen the hypothesis that MSTN and the binding protein, FLRG, are involved in the cardiomyogenesis of this

cell line.

#### RNA *in situ* hybridization of FLRG and MSTN mRNAs in the mouse embryonic heart

In order to analyze the localization of FLRG and MSTN mRNAs in the mouse embryonic heart, *in situ* hybridization was performed with E14.5 mouse embryos, which express both genes (Fig. 1A).

FLRG mRNA was clearly detected in the smooth muscle of the aorta (Fig. 3G, H, I) and pulmonary

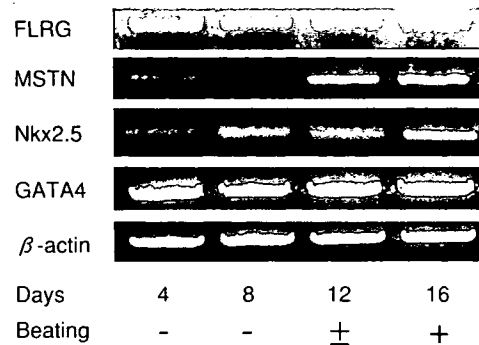


Fig. 2 Expression of FLRG and MSTN mRNAs during *in vitro* cardiomyocyte differentiation in P19CL6 cells.

Cardiomyocyte differentiation was induced in P19CL6 cells by adding 1% DMSO to the growth medium. Twelve days after DMSO treatment, the first contraction was observed in some part of the restricted area of cells. Temporal changes of the expression of FLRG, MSTN, Nkx2.5, and GATA4 mRNAs were analyzed by RT-PCR.  $\beta$ -actin was used as the internal control.

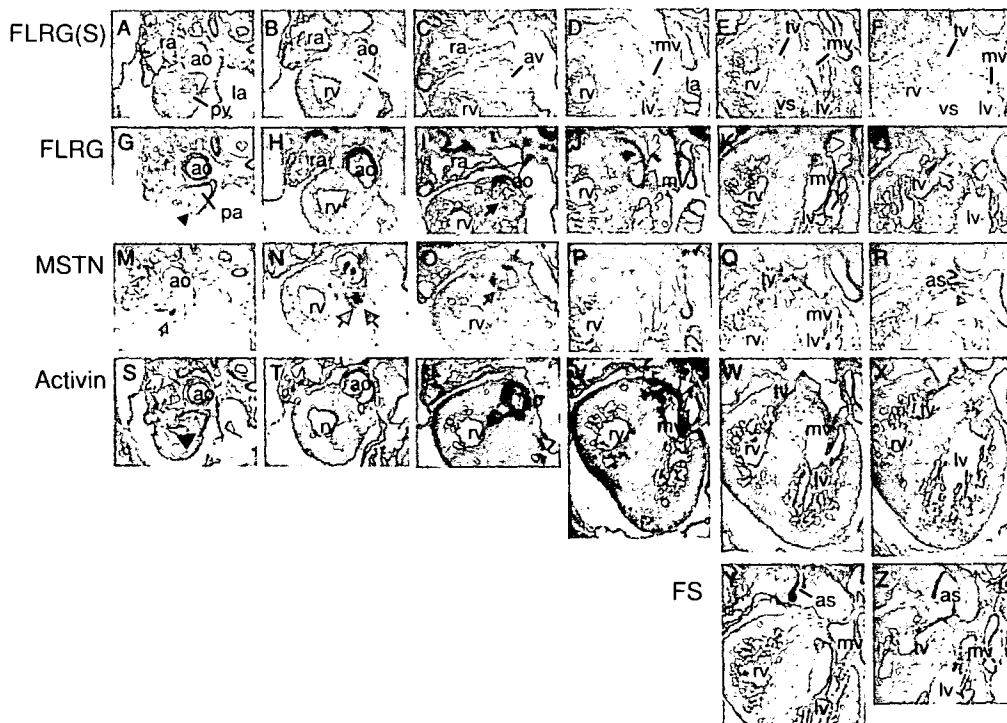


Fig. 3 Localization of FLRG, MSTN, activin, and FS mRNAs in mouse embryonic heart.

Serial sections of E14.5 mouse heart were analyzed by RNA *in situ* hybridization. Localization of FLRG (G-L), MSTN (M-R), activin (S-X), and FS (Y, Z) mRNAs is shown. Sense signals of FLRG (A-F) were shown as the controls. ao indicates aorta; as, atrial septum; av, aortic valve; la, left atrium; lv, left ventricle; mv, mitral valve; pa, pulmonary artery; pv, pulmonary valve; tv, tricuspid valve; ra, right atrium; rv, right ventricle; vs, ventricular septum.

artery (Fig. 3G). The mRNA was also detected in valve leaflets of the mitral valve (Fig. 3J, K, white arrow) and tricuspid valve (Fig. 3L, white arrow). Besides these tissues, FLRG mRNA was widely expressed in cardiac muscles of the ventricle. Since FLRG protein binds to MSTN and neutralizes the functions, we expected that these two mRNAs either colocalized or were adjacent to each other. The expression of MSTN mRNA was, however, quite distinct and was detected in the valve leaflets of the pulmonary valve (Fig. 3M, N, red arrow) and aortic valve (Fig. 3N, O, blue arrow). FLRG mRNA was not detected in these tissues (Fig. 3G, I, black arrows). MSTN mRNA was also detected at the top of the ventricular septum (Fig. 3Q, yellow arrow) and in the atrial septum (Fig. 3R, brown arrow).

According to the previous report, activin and FS mRNAs were also expressed in the E10.5-12.5 mouse embryonic heart (28). Thus, we further analyzed the expression of these genes with the same samples. In our study with E14.5 mouse embryos, activin mRNA was strongly expressed in the smooth muscle of the aorta (Fig. 3S, T, U) and pulmonary artery (Fig. 3S), and the valve leaflets of the mitral valve (Fig. 3V, W, white arrow) and tricuspid valve (Fig. 3W, X, white arrow). On the other hand, FS mRNA was detected at the atrial septum, as described previously (28), and was also detected at mitral and tricuspid valves (Fig. 3Y and Z). These results indicated that expression profiles of FLRG and activin mRNAs resembled each other, and that the expression of MSTN mRNA was complementary to that of FLRG.

#### *Immunohistochemical analysis of FLRG protein in fetal and adult mouse hearts*

We further analyzed the tissue distribution of FLRG protein in the fetal and adult mouse heart by immunohistochemistry with a monoclonal anti-mouse FLRG antibody (5, 29). In E13.5 mouse embryos, which also express both FLRG and MSTN mRNA, FLRG protein was detected clearly in the heart muscle of the atrium with anti-FLRG antibody, and rather diffusely in the ventricle (Fig. 4A and B). Other tissues, such as the lung (Fig. 4B) and metanephros (Fig. 4C), were also stained but rather weakly. In adult mouse hearts, similar immunoreactivity was observed as in embryonic hearts, although the expression of FLRG in the ventricle was as strong as in the atrium (Fig. 4E and F). As in our previous report (29), FLRG was widely detected in adult heart muscles but not in the nuclei of cardiomyocytes

(data not shown). On the other hand, no signal was detected in the vascular smooth muscle of the aorta (Fig. 4D, arrow) and pulmonary artery (Fig. 4D), or in the pulmonary valve leaflets (Fig. 4D, black arrowhead) of adult mice. In the mitral valve, however, FLRG staining was detected in the upper layer of the valve leaflets (Fig. 4F, asterisks).

In order to confirm the expression of FLRG and MSTN protein in valvular apparatus in the mouse embryonic heart, we further analyzed the localization of these proteins by immunohistochemistry (Fig. 5). To do this, we used the JA16 monoclonal antibody against MSTN, which was previously reported (14, 16, 30). In the E12.5 embryonic heart, both FLRG and MSTN proteins were clearly detected in cardiomyocytes of the atrium and ventricles (Fig. 5A and D), and their respective immunoreactivity resembled each other. In the region of the outflow tract cushion, however, the subcellular localization of FLRG protein was different from that of MSTN. FLRG protein was mainly detected in the nucleus (Fig. 5B and C, yellow-dotted area) as previously reported with human granulosa cells and several other cell lines (13, 31). In contrast, MSTN protein was found in the cytosol of the outflow tract cushion cells (Fig. 5E and F, yellow-dotted area). The role of FLRG localized in the nuclei of the cells in this tissue remains to be determined. Interestingly, conspicuous FLRG signals were also detected at the top of the outflow cushion, where the pulmonary valve (Fig. 5B, pink arrowheads) and aortic valve (Fig. 5C, green arrowheads) would be formed, and MSTN message was also detected at the surface of these valve leaflets (Fig. 5E, pink arrows and Fig. 5F, green arrows). These findings suggest that FLRG and MSTN could regulate not only cardiomyogenesis but also valvulogenesis during cardiac development.

In order to test the involvement of other activin and FS members for valve formation, we carefully compared these expressions by *in situ* hybridization with the E14.5 embryonic heart (Fig. 6). The expression patterns of activin and FLRG were very similar (Fig. 6A and E), but not identical (Fig. 6G). Interestingly, FLRG mRNA was localized rather complementary to MSTN mRNA around the aortic valve (Fig. 6D, E, G). Similarly, the expression of GDF-11 mRNA was complementary to that of activin (Fig. 6A and B). This mRNA expression profiling suggests that activin family members including MSTN and two regulatory factors, FLRG and FS, are cooperatively involved in valvulogenesis during heart development.



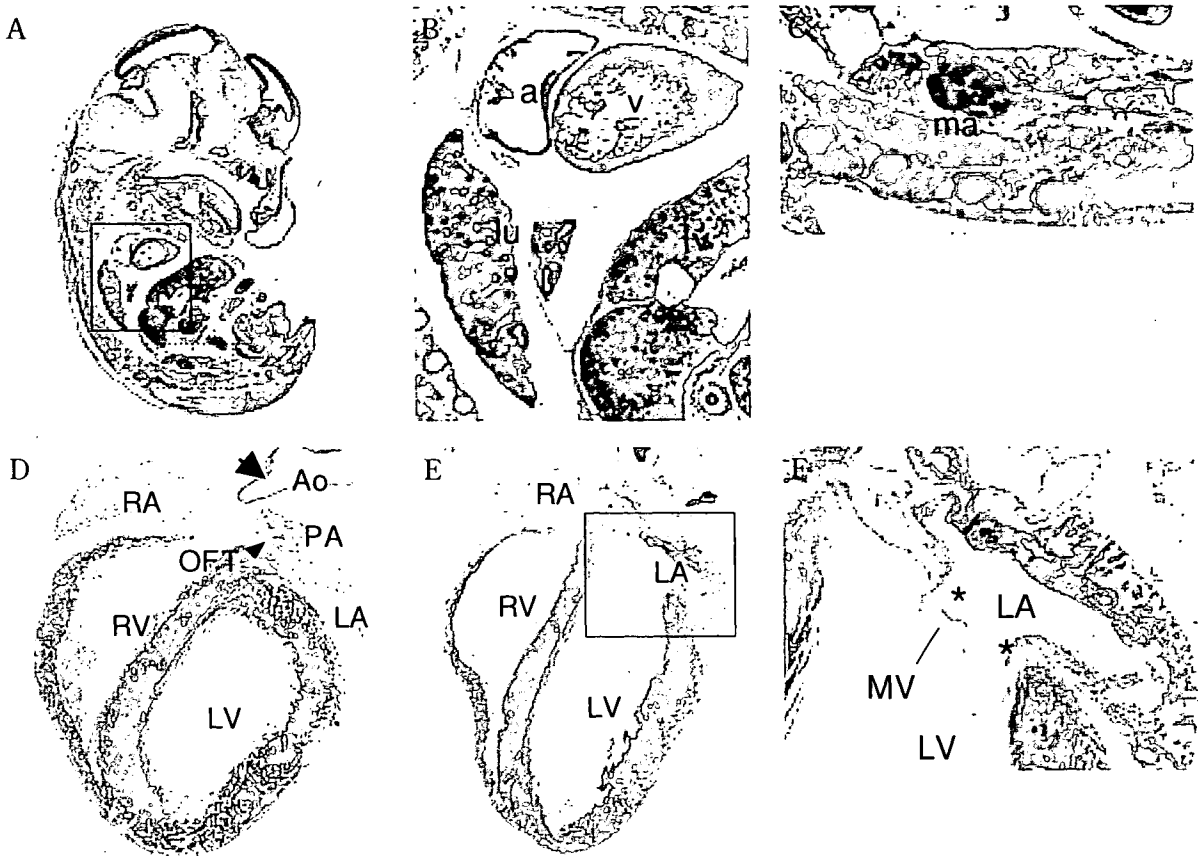


Fig. 4 Immunohistochemical analysis of FLRG protein in fetal and adult mouse heart.

A-C : Sagittal section of E13.5 mouse embryo (A) and enlargement of boxed area in A (B), dotted area in A (C). D, E : Coronal sections of mouse adult heart. F : Enlargement of mitral valve of adult mouse (boxed area in E). RA indicates right atrium ; LA, left atrium ; RV, right ventricle ; LV, left ventricle ; Ao, aorta ; PA, pulmonary artery ; OFT, outflow tract ; MV, mitral valve ; a, atrium ; v, ventricle ; lu, lung ; lv, liver ; ma, metanephros.

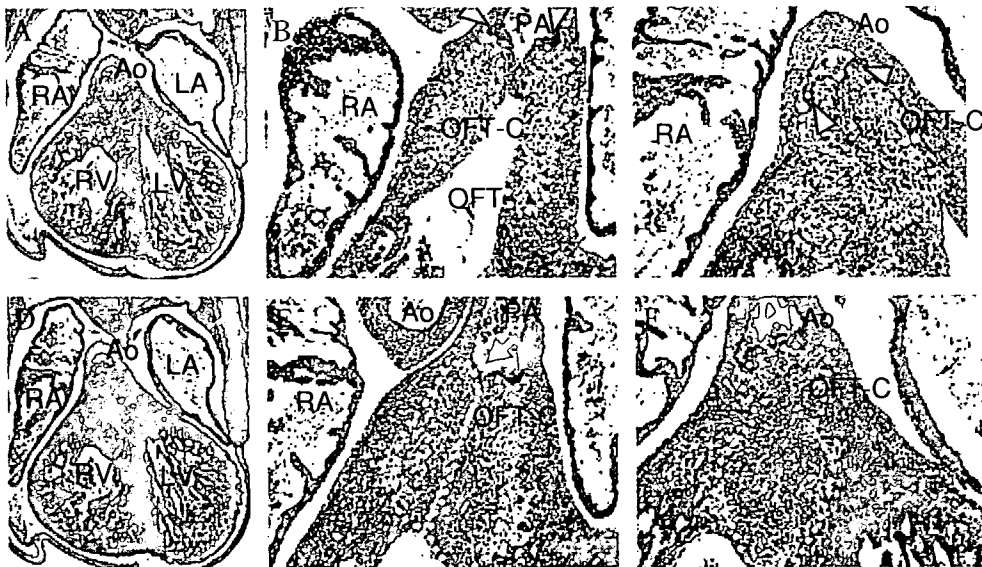


Fig. 5 Localization of FLRG and MSTN proteins in valvular apparatus of E12.5 embryonic heart.

Immunohistochemical analysis of FLRG (A-C) and MSTN (D-F) proteins in embryonic heart. A, D : Coronal sections of E12.5 mouse embryonic heart. B, E : Enlargement of outflow tract of right ventricle. C, F : Enlargement of aortic valve. RA indicates right atrium ; LA, left atrium ; RV, right ventricle ; LV, left ventricle ; Ao, aorta ; PA, pulmonary artery ; OFT, outflow tract ; OFT-C, outflow tract cushion.

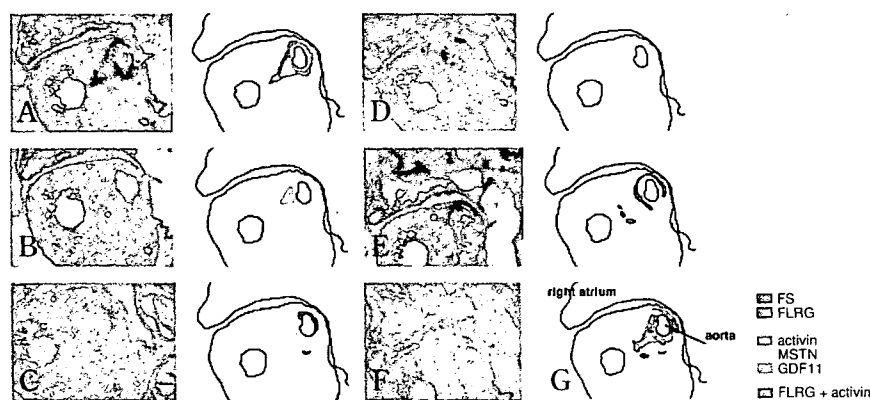


Fig. 6 mRNA expression of activin and FS members around aorta and aortic valve leaflets.

RNA *in situ* hybridization analysis of serial sections around aorta of E14.5 mouse heart. Localization of activin (A), GDF-11 (B), FS (C), MSTN (D), and FLRG (E) mRNAs are shown. Sense signal of FLRG (F) is shown as the control. Localization of each mRNA is respectively indicated in the illustration next to each photograph. These expression patterns were merged as shown in G.

*Inhibitory effect of FLRG protein on MSTN and other activin family member signaling*

To elucidate the roles of FLRG, we compared the affinity of FLRG for MSTN and other TGF- $\beta$  superfamily member proteins. First, we prepared recombinant FLRG protein by transient transfection of Chinese hamster ovary (CHO) cells with a human FLRG (hFLRG) expression plasmid followed by partial purification by passing the conditioned medium through an activin A-conjugated column. Purified hFLRG protein was resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with the monoclonal anti-human FLRG antibody. As shown in Fig. 7, recombinant hFLRG protein with an apparent molecular mass of 37 kDa was generated. Next, we performed surface plasmon resonance (SPR) biosensor analysis using a BIACORE system. We also used human FS-288, which is the splicing isoform of FS that has stronger inhibitory activity against activin than the other isoform, FS-315 (32, 33). FLRG or FS-288 was immobilized on a BIACORE sensor chip, and then MSTN protein and other TGF- $\beta$  superfamily members were injected to flow over the sensor chip as analytes. As shown in Table 2, the affinity ( $K_d$ ) of MSTN for FLRG was comparable with that for FS-288. Activin showed around 10 times higher affinity than MSTN for FLRG or FS-288. In

contrast, BMP2 showed 10 times lower affinity for these proteins. Interestingly, the dissociation constant ( $k_{off}$ ) of MSTN indicated that MSTN slowly dissociates from FLRG or FS-288 than other TGF- $\beta$  superfamily members. These results suggested that MSTN did not efficiently bind to FLRG or FS as activin did due to its low association constant ( $k_{on}$ ),

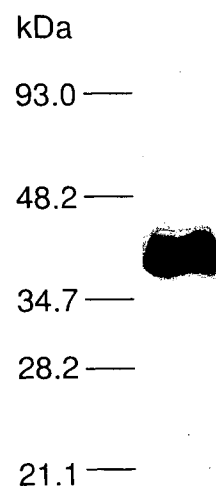


Fig. 7 Recombinant human FLRG protein purified through an immobilized activin column.

Human FLRG protein, secreted by CHO cells, was partially purified by passing through the activin column. The sample was resolved by 12.5% SDS-PAGE and blotted with anti-human FLRG antibody. The signal was detected by enhanced chemiluminescence. Molecular mass markers are indicated on the left.

Table 2 Kinetic rate constants of FLRG/FS-288 and Activin A, BMP-2, MSTN, GDF-11 binding

Analyte	Ligand	$k_{on}$	$k_{off}$	$K_d$
MSTN	FLRG	$5.73 \times 10^4$	$9.40 \times 10^{-4}$	$1.64 \times 10^{-8}$
Activin A	FLRG	$1.68 \times 10^6$	$1.24 \times 10^{-3}$	$7.36 \times 10^{-10}$
BMP-2	FLRG	$3.26 \times 10^5$	$3.95 \times 10^{-2}$	$1.21 \times 10^{-7}$
GDF-11	FLRG	$9.14 \times 10^4$	$4.10 \times 10^{-3}$	$4.49 \times 10^{-8}$
MSTN	FS-288	$5.29 \times 10^4$	$6.51 \times 10^{-4}$	$1.23 \times 10^{-8}$
Activin A	FS-288	$8.31 \times 10^5$	$1.43 \times 10^{-3}$	$1.72 \times 10^{-9}$
BMP-2	FS-288	$4.48 \times 10^5$	$6.90 \times 10^{-2}$	$1.36 \times 10^{-7}$
GDF-11	FS-288	$2.61 \times 10^5$	$1.29 \times 10^{-3}$	$4.95 \times 10^{-9}$

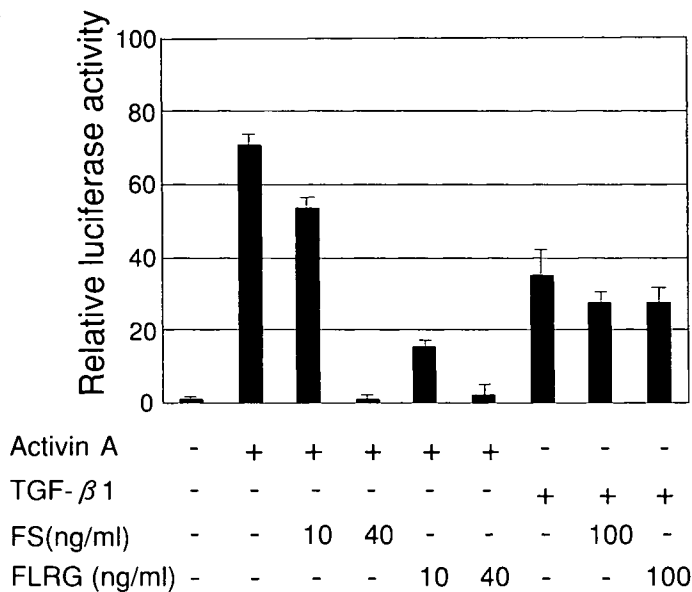
General curve fitting was performed for 12.5-200 nM of analyte. A 1 : 1 binding with mass transfer was used as a model.

whereas once MSTN bound to FLRG or FS, these complexes could be stable.

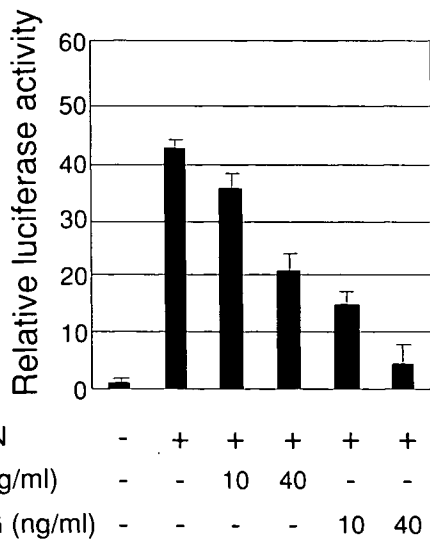
Next, we examined the inhibitory effect of hFLRG and hFS on activin A- or TGF- $\beta$ 1-induced signaling with human embryonic kidney (HEK293) cells transfected with a Smad-specific reporter plasmid, 12 $\times$ CAGA-luc. Both hFLRG and hFS decreased

the activin A-induced 12 $\times$ CAGA-luc transcriptional activities in a dose-dependent manner, whereas these proteins failed to inhibit the TGF- $\beta$ 1-induced signal (Fig. 8A). We also observed that hFLRG has a stronger inhibitory effect than hFS on activin signaling. Similar inhibitory effects of FLRG either on MSTN- or GDF-11-induced signaling were observed

A



B



C

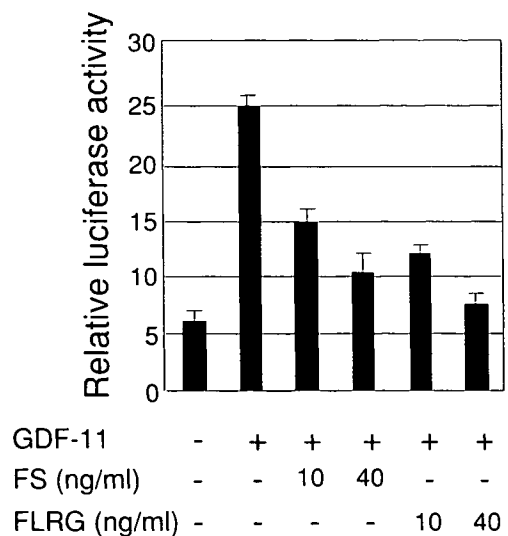


Fig. 8 Inhibition of ligand-dependent transcription by FLRG or FS.

A, Inhibition of activin A or TGF- $\beta$ 1 signaling by hFLRG or hFS protein in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with CAGA-luc and CMV- $\beta$ gal, and cultured with activin A (20 ng/ml) or TGF- $\beta$ 1 (15 ng/ml) with or without different concentrations of hFLRG or hFS proteins for 24 h. The luciferase activity of each cell lysate was measured and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. The mean  $\pm$  SE of triplicate determination is shown.

B, C, Inhibition of MSTN or GDF-11 signaling by hFLRG or hFS protein in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with CAGA-luc and CMV- $\beta$ gal, and cultured with MSTN (20 ng/ml) or GDF-11 (20 ng/ml) as described in A.

in a dose-dependent manner (Fig. 8B and C). These results suggested that FLRG expressed in the heart could negatively regulate the activin family members including MSTN during heart development.

## DISCUSSION

In this study, we demonstrated that FLRG mRNA was constantly expressed in the heart, whereas it was expressed in skeletal muscles at a very low level, during various stages of mouse development. In contrast, MSTN was stably expressed in skeletal muscles but not in the heart during development (Fig. 1). The high expression of FLRG mRNA in cardiac tissue was also confirmed by *in vitro* cardiomyocyte differentiation using P19CL6 cells (Fig. 2). We have previously shown that human FLRG mRNA was abundantly expressed in the heart, and was detected in skeletal muscle at a low level (5). Further detail expression analyses of these genes during embryogenesis encouraged us to hypothesize that FLRG and MSTN have functional roles during cardiomyogenesis.

Various members of the TGF- $\beta$  superfamily, including activins and BMPs, are involved in cardiac development. In particular, activin has been shown to regulate cardiac myogenesis in the early stage of chick embryogenesis (34, 35). MSTN is well known as a potent negative regulator for skeletal muscles; therefore, MSTN has been considered to function specifically in skeletal muscles. However, other groups have shown that MSTN mRNA is also expressed in the heart (19). Moreover, a recent study revealed that the expression of MSTN increases in hypertrophied cardiomyocytes (20, 36). This raises a possibility that MSTN may function as a negative feedback regulator to counteract these pathological phenomenon. These observations further support our hypothesis that MSTN also plays some roles during heart development.

During chick skeletal muscle development, the activity of MSTN is regulated by a neutralizing factor, FS. FS, which increases muscle mass by inhibiting the MSTN-dependent growth arrest of skeletal muscles (37). Since another neutralizing factor, FLRG, is also expressed and shows a distinct expression during heart development, both FLRG and FS may be cooperatively involved in the regulation of cardiac tissues.

The members of the TGF- $\beta$  superfamily are capable of inducing the transformation of endocardial

cells into mesenchymal cells, which initiates atrioventricular (AV) cushion formation (38-40). Activin  $\beta$ A has been reported to be expressed in mesenchymal cells of the AV cushion, and to induce endothelial-to-mesenchymal transformation (EMT) (41). When we analyzed the expression of activin mRNA in E14.5 mouse embryos by *in situ* hybridization, it was mainly detected in smooth muscle of the aorta and pulmonary artery, some valve leaflets, and cardiac muscles in the ventricle. Intriguingly, the localization of activin mRNA in great arteries or valvular structures was quite similar to that of FLRG mRNA, but did not completely overlap with that of MSTN mRNA (Fig. 6). The localization of MSTN mRNA was rather complementary to that of FLRG mRNA (Fig. 6D and E). Amthor, *et al.* also described similar complementary expressions of MSTN and FS mRNAs during wing and interlimb somite development in chick embryos. They demonstrated that FS prevented the inhibiting effect of MSTN on skeletal muscle development both *in vivo* and *in vitro* (37). Combining these findings, we speculate that during heart development, MSTN could be involved in aortic valve or pulmonary valve formation in cooperation with the negative regulator in the heart, FLRG. We have also shown that GDF-11, a close family member of MSTN, is expressed in similar tissues as MSTN (Fig. 6). No cardiac anomaly of MSTN-knockout mice could be due to compensation of MSTN absence by GDF-11 (17).

By using the surface plasmon resonance biosensor analysis, we have shown that the dissociation constant of MSTN against FLRG or FS-288 was low compared to other TGF- $\beta$  family members. This suggests that MSTN hardly dissociate from FLRG or FS-288, thus MSTN can form a stable complex with these molecules. Intriguingly, Hill, *et al.* previously reported that the MSTN complex immunopurified from serum with anti-MSTN monoclonal antibody contained FLRG but not FS, indicating that MSTN forms a complex with FLRG but not FS *in vivo* (16). FS-288 has much higher affinity against activin than the major form, FS-315 (32, 33). Moreover, FS-288 also binds to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface, and therefore functions to sequester activin family members more tightly in the extracellular matrix (32). Based on this information, our data suggest that MSTN is not only neutralized by forming a stable complex with FLRG in serum but also negatively regulated by FS-288 expressed locally during heart development.

Recently, regenerative medicine has attracted