

TGF- β スーパーファミリー・サイトカイン Myostatin/growth differentiation factor 8 (GDF8) による筋の恒常性と代謝の制御

松田 修*, 高 飛, 西岡 敬介, 岸田 綱郎

京都府立医科大学大学院医学研究科免疫学

Regulation of Muscle Homeostasis and Metabolism by the TGF- β Superfamily Cytokine, Myostatin/growth Differentiation Factor 8 (GDF8)

Osam Mazda, Fei Gao, Keisuke Nishioka and Tsunao Kishida

Department of Immunology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

Myostatin は、筋の組織幹細胞であるサテライト細胞の増殖抑制、筋芽細胞から筋管への分化抑制等の作用を通じて、骨格筋組織の発生と再生を制御するサイトカインである。最近、Myostatin がカヘキシア等の病態にも重要な意義を有し、一方で糖脂質代謝を制御することも知られるようになってきた。Myostatin シグナルの抑制は、カヘキシアやサルコペニア等の筋萎縮性病態の予防と治療、肥満や糖尿病の制御等につながる可能性がある。

キーワード：ミオスタチン, TGF- β , サイトカイン, 筋芽細胞, サテライト細胞。

Abstract

Myostatin negatively regulates proliferation of satellite cells that are tissue resident stem cells in the skeletal muscle, as well as differentiation of myoblasts into myotubes. Myostatin is crucially involved in pathogenesis of some diseases including cachexia, while recent studies have clarified its important roles in the control of carbohydrate and lipid metabolism. Blocking of Myostatin signal may provide novel therapeutic modality to prevent and improve atrophic conditions in cachexia and sarcopenia, and to control obesity and diabetes as well.

Key Words: Myostatin, TGF- β , Cytokine, Myoblast, Satellite cell.

Myostatin の構造とシグナル伝達

Myostatin/growth differentiation factor 8 (GDF8)は、TGF- β スーパーファミリーのGDFファミリーに属するサイトカインであり、1997年にMcPherronらが、新規のTGF- β スーパーファミリー・メンバーをスクリーニングすることによって発見した¹⁾。その構造と機能には他のファミリーメンバーと多くの類似性がある²⁾。

ヒトMyostatinは、シグナル配列(アミノ酸残基1—20)、N末プロペプチドドメイン(アミ

ノ酸残基21—266)、およびC末端ドメイン(アミノ酸残基267—375)からなる前駆体ポリペプチドとして合成される(図1)³⁾。C末端ドメインには、保存された7つのシステイン残基を有するcystine-knotモチーフが存在し、このうち6つのシステイン残基は、Myostatinのフォルディングに重要な3つの分子内ジスルフィド結合に関与する(C281-C340, C309-C372, およびC313-C374)。他の1つのシステイン残基(C339)は分子間ジスルフィド結合に関与し、これにより前駆体ポリペプチドがホモ二量体化す

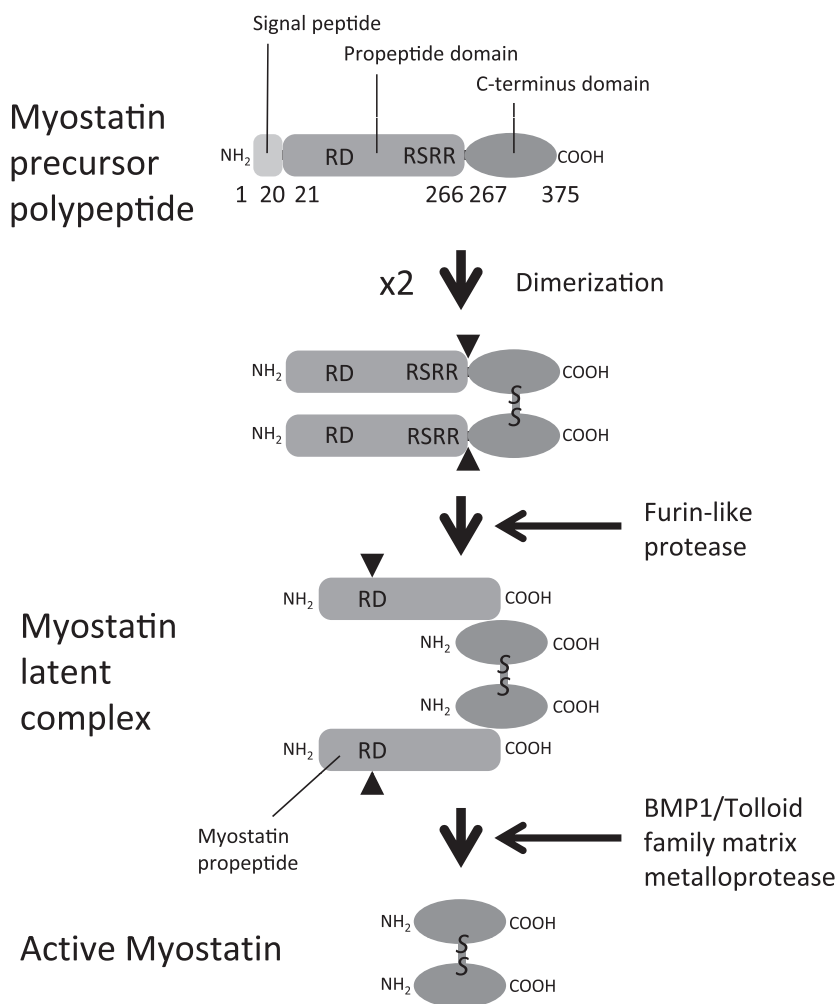


図1 Myostatinのプロセッシング. R: アルギニン残基, S: セリン残基, D: アスパラギン酸残基, SS: ジスルフィド結合.

る。小胞体において Furin ファミリーのプロテアーゼがRSRR配列(アミノ酸残基263—266)でN末端プロペプチドと2量体のC末端ペプチドに切断した後、これらのペプチドは非共有結合で会合した不活性な複合体を形成し、細胞外に分泌される。N末端プロペプチド(分子量27.8 kDa)は、活性型 Myostatin のレセプターへの結合に抑制的に働くことが、*in vitro* と *in vivo* の両方で示されている⁴⁾。BMP1/Tolloid ファミリーのマトリックス・メタロプロテアーゼがN末端プロペプチドを切断すると、活性型のリガンドである二量体C末端ペプチド(分子量25.0 kDa)となる⁵⁾。血清中では、活性型 Myostatin はプロペプチドまたは Follistatin と結合した複合体として存在し、Follistatin も Myostatin に対して抑制的に作用する⁶⁾。

Myostatin の細胞内シグナルは、他の多くの

TGF- β スーパーファミリーと同様に、標的細胞内で Smad 依存性および非依存性パスウェイを介して伝達される(図2)²⁾。すなわち、Myostatin に対するレセプターとして、II型レセプターである activin receptor type II B (ActRIIB または ACVR2B) と、I型レセプターである activin receptor type I (ActRI または ACVR1B) / ALK4 が関与するが、Myostatin の ActRIIB への結合により、ActRIIB の細胞内ドメインのリン酸化、ActRI の会合とリン酸化が起こる。活性化した ActRI B/ActRI は、Smad2 と Smad3 のリン酸化を介して、Smad4 の活性化と核内移行をもたらす。この ActRI B/ActRI による Smad2 と Smad3 のリン酸化は、Smad7 による負の制御を受ける。一方、ActRIIB の活性化は、Ras/MEK1/Erk1/2, TAK1/MKK6/p38MAPK, および TAK1/MKK4/JNK パスウェイの活性化を

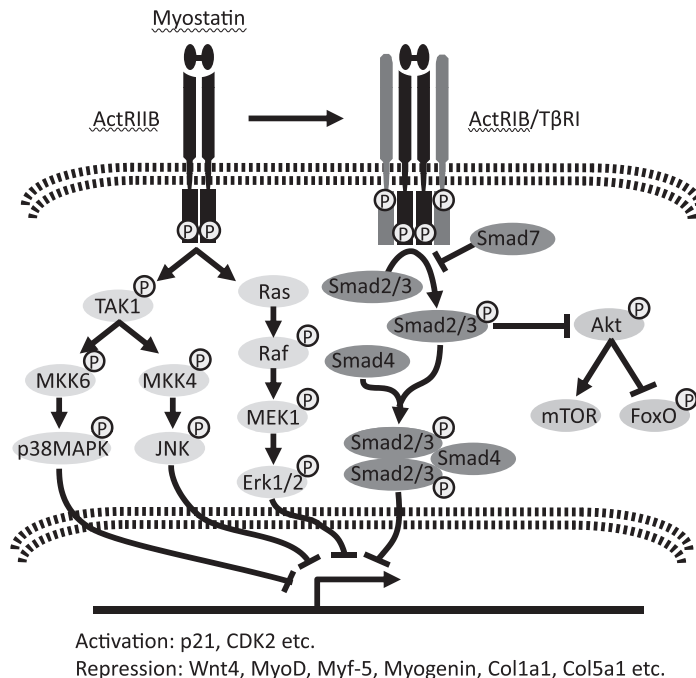


図2 Myostatin シグナル伝達。活性型 Myostatin が II 型レセプターである ActRIIB に結合後、ActRI の会合と活性化が起こり、Smad 依存性パスウェイの活性化が起こる(中央)。一方、ActRIIB の活性化は Smad 非依存性パスウェイの活性化をもたらす(左)、これらの結果、筋の分化を誘導する遺伝子群の発現が抑制される。Smad パスウェイの活性化はまた、Akt を抑制し、Insulin-like growth factor 1 (IGF1) シグナル(略)を抑制することでも筋肥大を負に制御する。

もたらす。これらの結果、さまざまな標的遺伝子の転写活性が制御される。

Myostatin と骨格筋の発生と再生

Myostatin は主として骨格筋から産生される²⁾。Myostatin のノックアウト (KO)・マウスは野生型より体重が約 30% 大きく、骨格筋が 2 倍以上に増大している。この筋量の増大は、肥大 (hypertrophy) と過形成 (hyperplasia) の両方によるものである¹⁾。その後、同様のフェノタイプを示すウシ^{7,8)}、ヒツジ⁹⁾、イヌ¹⁰⁾ さらにヒト¹¹⁾ において Myostatin 遺伝子に突然変異があることが報告された。200 年以上前から知られていた *Belgian Blue* と呼ばれる筋肉量の多いウシは Myostatin 遺伝子の C 末端領域に 11 塩基の欠損を有する^{7,8)}。“bully” *whippet* と呼ばれていた筋肉量が多く獰猛なイヌは Myostatin の 313 番目のアミノ酸残基のノンセンス変異のホモザイゴートであり、ヘテロザイゴートでも野生型より筋量が多く走る能力も高い¹⁰⁾。ヒトではドイツで見出された、出生直後から筋肥大が著明であった 1 例で、Myostatin 遺伝子領域の第 1 イントロンのスプライス・ドナー・サイトに点突然変異が存在し、スプライシングの異常から Myostatin のトランケーションが起きることが見出された。したがって、Myostatin は、筋組織の発生において細胞の増殖と分化を負に制御するサイトカインであると考えられるようになった。さらに、成獣マウスにおいても、Myostatin シグナルを抑制すると筋が増大することから、生後の成熟した筋組織においても、Myostatin は筋組織の細胞増殖と分化を抑制し恒常性維持に関与していると考えられる^{12,13)}。我々は、成獣マウスの筋の Myostatin 発現を抑制すると、筋肥大にともなって筋力も増強することを認めている (Kishida et al., 未発表データ)。

骨格筋は中胚葉節の皮筋節より発生する筋芽細胞が増殖を繰り返した後、互いに細胞融合して多核の筋管となり、さらに収縮能を有する筋線維に成熟する¹⁴⁾。一方、生後の成熟した筋組織では、筋線維の細胞膜と基底膜の間に存在するサテライト細胞が組織固有の幹細胞として機

能している^{15,16)}。サテライト細胞は基本的に細胞周期が休止した状態にあるが、筋組織に傷害が加わると少数のサテライト細胞が活性化して増殖し、筋芽細胞を生み出して筋組織の再生に寄与する。微小な筋の傷害と再生は、生涯を通じて常時起こっていると考えられている。一方、大きな筋の損傷が起きると、多くのサテライト細胞が活性化して増殖し、生じた筋芽細胞はさらに増殖を繰り返して細胞数を増す。これらの筋芽細胞はすでに存在している筋線維と融合し、あるいは互いに細胞融合して新しい筋線維を形成することで、筋の損傷の修復に関与する。このような筋の発生と再生は、微小循環や炎症応答、そして液性因子によって精緻に制御されている。この液性因子として、TGF- β 、fibroblast growth factors (FGFs)、hepatocyte growth factor (HGF)、insulin-like growth factor (IGF)に加えて、Myostatin が重要な役割を果たしている^{15,16)}。

Myostatin がマウス筋芽細胞株である C2C12 細胞に作用すると、cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor である p21 の発現増強、Cdk2 の発現と活性の抑制、Rb たんぱくのリン酸化レベルの低下が起これ、細胞周期の G1 から S 期への移行が抑制される¹⁷⁾。Myostatin はまた、Erk1/2 の活性化を介することによっても C2C12 細胞の分化を抑制する¹⁸⁾。マウスのサテライト細胞に対しても、Myostatin は Smad3 の活性化を介して p21 の発現増強と、Cdk2 の発現と活性の抑制を誘導し、細胞周期の休止期にとどめる¹⁹⁾ と同時に、Pax7 の発現を抑制してサテライト細胞の自己複製を抑制する²⁰⁾。Myostatin はまた、Smad3 依存性に MyoD、Myf5 と myogenin の発現を抑制し、筋管への分化を抑制する²¹⁾。

Myostatin シグナルの遺伝的な欠損が、筋の著明な肥大と過形成をもたらすこと、また成獣マウスにおいても、Myostatin シグナルを *in vivo* で抑制することで筋の増大がもたらされることは前述のとおりである^{12,13)}。しかし後者の機構としては、サテライト細胞の増殖よりも早く肥大が起これると報告されている²²⁾。さらにサテライト細胞の増殖と過形成は、Myostatin シ

グナル抑制による生後の筋の増大には必須ではないことが示されている²³⁾.

ヒト細胞に対する Myostatin の作用に関しては、最近 McFarlane らは、Myostatin がヒトのプライマリーの筋芽細胞に作用すると、p21 の発現が増強し、さらに Notch シグナルの活性化による Hes1, Hes5 と Hey1 の発現増強を介した筋芽細胞の増殖抑制が誘導されることを示した²⁴⁾. 我々は、ヒト iPS 細胞から筋芽細胞への分化誘導においても Myostatin が産生され、Myostatin シグナルがオートクライン/パラクライン的に作用して、未分化な筋芽細胞の増殖抑制と MyoD と Myo5a の発現低下による筋芽細胞分化の抑制がもたらされることを報告した²⁵⁾.

筋管に成長ホルモンが作用すると、Myostatin の発現が抑制されると報告されており、成長ホルモンによる筋の同化作用の少なくとも一部は、Myostatin を介している可能性がある²⁶⁾. また、グルココルチコイドは筋に作用して Myostatin の発現を増強すること、この Myostatin がグルココルチコイドによる筋萎縮に関与しているとの報告がある²⁷⁾.

健康人において、血清中の Myostatin レベルと筋量は逆相関する²⁸⁾. レジスタンス運動によって、筋の Myostatin の mRNA 発現と血清 Myostatin レベルが低下すると報告されている²⁹⁻³²⁾. 血清 Myostatin レベルは高齢者では高く、また 25-hydroxycholecalciferol (25OHD) 値と正に相関する³³⁾. Myostatin 遺伝子の多型 (K153R) が、高齢女性の筋量と相関する可能性がある³⁴⁾.

Myostatin を抑制することが、筋ジストロフィーやサルコペニアの治療に繋がる可能性があり、Duchenne 型筋ジストロフィーのモデルである dystrophin 欠損 mdx マウスにて Myostatin の抑制が筋の増大をもたらしたと報告されている¹²⁾.

Myostatin とカヘキシア

廃用性筋萎縮、カヘキシア、COPD、血液透析、HIV 感染、老化によるサルコペニアなど、筋萎縮を伴うさまざまな病態において、Myostatin

の発現と血清 Myostatin レベルの亢進が認められている²⁷⁾²⁸⁾³⁵⁻³⁷⁾.

Myostatin 遺伝子を導入した CHO 細胞をマウスに移植すると、筋萎縮、脂肪萎縮、体重減少、低血糖といったカヘキシア様の病態が見られ、逆にカヘキシア様の病態は Myostatin プロペプチドまたは Follistatin の投与で抑制できると報告されている³⁸⁾. Myostatin によるカヘキシア誘導のメカニズムとしては、筋特異的 E3 リガーゼである atrogen-1 と muscle RING-finger protein 1 (MuRF1) の発現誘導によるユビキチン・プロテアソーム・パスウェイの活性化、および IGF-I/PI3K/Akt パスウェイの抑制によるオートファジー・リソソーム・パスウェイの活性化が、筋のたんぱく分解系を亢進させることが関与すると示唆されている³⁹⁾.

Myostatin は、骨格筋以外にも心筋と脂肪から微量に産生されるが、うっ血性心不全では心筋細胞からの Myostatin 産生が亢進し、血清中の Myostatin 濃度が上昇する⁴⁰⁾. Heineke らは、心筋細胞特異的に Myostatin をノックアウトしたマウスでは、圧負荷により心不全を誘導しても骨格筋の萎縮が起きないこと、逆に心筋特異的に Myostatin を強発現するトランスジェニックマウスでは、心不全を誘導しなくても骨格筋と心筋の萎縮が誘導されることを示した⁴¹⁾. 心不全による骨格筋の萎縮は Myostatin に対する中和抗体で抑制された. これらのことから、心不全にともなうカヘキシアには Myostatin が重要な役割を果たすと考えられる.

Myostatin と糖脂質代謝の制御

Myostatin の筋に対する作用の発見の契機となったのは、前述のように Myostatin KO マウスが骨格筋の増大というフェノタイプを示したことであったが、このマウスはまた、脂肪組織の減少を呈する¹⁾⁴²⁾⁴³⁾. さらに、高脂肪食餌を投与しても、野生型と比較して耐糖能が極めて高く、筋と肝臓のインスリン抵抗性が著明に低く、脂肪組織の増大が抑制されており、肥満に抵抗性である⁴⁴⁾⁴⁵⁾.

Myostatin と LDL レセプターをダブル・ノッ

クアウトしたマウスは、LDLレセプター単独のノックアウト・マウスに比して高脂肪食餌誘導性の肥満に抵抗性で、インスリン抵抗性が低く、耐糖能が高いのみならず、肝臓の脂肪酸の β 酸化が高く、脂肪肝に抵抗性であった。さらにVLDL分泌が低く、VLDL、LDLコレステロール、遊離脂肪酸、および中性脂肪のレベルが低値で、動脈硬化に抵抗性であった⁴⁶⁾。糖脂質代謝の改善は、他の2つの肥満モデル、すなわち *Agouti lethal yellow* マウスと *ob/ob* マウスを、Myostatin KO マウスに掛け合わせたダブル・ノックアウトでも示されている⁴³⁾⁴⁷⁾。

Myostatin KO マウスにおける糖脂質代謝の改善のメカニズムとして、高脂肪食餌を投与したMyostatin KO マウスは野生型に比し、内臓脂肪と骨格筋におけるTNF- α の産生が低く、血漿TNF- α レベルが低いので、慢性炎症が抑制されている可能性がある⁴⁴⁾。また、脂肪への直接的な作用と筋への作用を介した代謝制御のさまざまなメカニズムが示唆されている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。

ヒトにおいては、血清中のMyostatinレベルは、BMI、皮下脂肪、内臓脂肪量に逆相関する³³⁾。また血漿と筋のMyostatinレベルが2型糖尿病と相関すると報告されている⁵¹⁾。

ま と め

Myostatin は筋の増殖と分化のみならず、糖脂質代謝にも重要な役割を果たすサイトカインであり、さらに骨再生の制御にも関与する⁵²⁾。Myostatin シグナルをブロックする手段として、Myostatin に結合してそのレセプターとの結合を抑制するたんぱく、すなわち Myostatin プロペプチド（とくにプロテアーゼで切断されない変異を導入した Myostatin プロペプチド）、Follistatin, Follistatin-like 3, growth and differentiation factor-associated serum protein 1 (GASPI) や、可溶性レセプター (ActR2B-Fc 融合たんぱく)、中和抗体等があり、マウス等においては上述のように、成獣でも Myostatin シグナルを抑制することで筋と糖脂質代謝のホメオスタシス維持等の効果があることが、さまざまな系で示されている¹²⁾¹³⁾³⁸⁾⁴⁹⁾。このような手段は、カヘキシアやサルコペニアの予防と治療、肥満や糖尿病の制御等につながる可能性がある。

ライオン株式会社、公益財団法人鈴木健三記念医科学応用研究財団より研究費を受けている。

文 献

- 1) McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997; 387: 83-90.
- 2) Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9306-9311.
- 3) Starck CS, Sutherland-Smith AJ. The C313Y Piedmontese mutation decreases myostatin covalent dimerisation and stability. *BMC Res Notes* 2011; 4: 442.
- 4) Thies RS, Chen T, Davies MV, Tomkinson KN, Pearson AA, Shakey QA, Wolfman NM. GDF-8 propeptide binds to GDF-8 and antagonizes biological activity by inhibiting GDF-8 receptor binding. *Growth factors* 2001; 18: 251-259.
- 5) Lee SJ. Genetic analysis of the role of proteolysis in the activation of latent myostatin. *PLoS One* 2008; 3: e1628.
- 6) Cash JN, Rejon CA, McPherron AC, Bernard DJ, Thompson TB. The structure of myostatin:follistatin 288: insights into receptor utilization and heparin binding. *EMBO J* 2009; 28: 2662-2676.
- 7) Grobet L, Martin LJ, Poncelet D, Pirottin D, Brouwers B, Riquet J, Schoeberlein A, Dunner S, Menissier F, Massabanda J, Fries R, Hanset R, Georges M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat Genet* 1997; 17: 71-74.
- 8) McPherron AC, Lee SJ. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 12457-12461.
- 9) Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen JM, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J,

- Charlier C, Georges M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nat Genet* 2006; 38: 813-818.
- 10) Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG, Ostrander EA. A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Genet* 2007; 3: e79.
- 11) Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hubner C, Riebel T, Komen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N Eng J Med* 2004; 350: 2682-2688.
- 12) Amthor H, Hoogaars WM. Interference with myostatin/ActRIIB signaling as a therapeutic strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther* 2012; 12: 245-259.
- 13) Lee SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 61-86.
- 14) Messina G, Cossu G. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes Dev* 2009; 23: 902-905.
- 15) Karalaki M, Fili S, Philippou A, Koutsilieris M. Muscle regeneration: cellular and molecular events. *In Vivo* 2009; 23: 779-796.
- 16) Kang JS, Krauss RS. Muscle stem cells in developmental and regenerative myogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010; 13: 243-248.
- 17) Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J Biol Chem* 2000; 275: 40235-40243.
- 18) Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Zhu D. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res* 2006; 66: 1320-1326.
- 19) McCroskery S, Thomas M, Maxwell L, Sharma M, Kambadur R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. *J Cell Biol* 2003; 162: 1135-1147.
- 20) McFarlane C, Henneby A, Thomas M, Plummer E, Ling N, Sharma M, Kambadur R. Myostatin signals through Pax7 to regulate satellite cell self-renewal. *Exp Cell Res* 2008; 314: 317-329.
- 21) Langley B, Thomas M, Bishop A, Sharma M, Gilmour S, Kambadur R. Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* 2002; 277: 49831-49840.
- 22) Wang Q, McPherron AC. Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation. *J Physiol* 2012; 590: 2151-2165.
- 23) Lee SJ, Huynh TV, Lee YS, Sebald SM, Wilcox-Adelman SA, Iwamori N, Lepper C, Matzuk MM, Fan CM. Role of satellite cells versus myofibers in muscle hypertrophy induced by inhibition of the myostatin/activin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: E2353-2360.
- 24) McFarlane C, Hui GZ, Amanda WZ, Lau HY, Lokireddy S, Xiaojia G, Mouly V, Butler-Browne G, Gluckman PD, Sharma M, Kambadur R. Human myostatin negatively regulates human myoblast growth and differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 301: C195-203.
- 25) Gao F, Kishida T, Ejima A, Gojo S, Mazda O. Myostatin acts as an autocrine/paracrine negative regulator in myoblast differentiation from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 431: 309-314.
- 26) Liu W, Thomas SG, Asa SL, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S, Ezzat S. Myostatin is a skeletal muscle target of growth hormone anabolic action. *J Clin Endocr Metab* 2003; 88: 5490-5496.
- 27) Schakman O, Gilson H, Kalista S, Thissen JP. Mechanisms of muscle atrophy induced by glucocorticoids. *Horm Res* 2009; 72 Suppl 1: 36-41.
- 28) Gonzalez-Cadavid NF, Taylor WE, Yarasheski K, Sinha-Hikim I, Ma K, Ezzat S, Shen R, Lalani R, Asa S, Mamita M, Nair G, Arver S, Bhasin S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14938-14943.
- 29) Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA. Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228: 706-709.
- 30) Walker KS, Kambadur R, Sharma M, Smith HK. Resistance training alters plasma myostatin but not IGF-1 in healthy men. *Med Sci Sport Exer* 2004; 36: 787-793.
- 31) Jones SW, Hill RJ, Krasney PA, O'Conner B, Peirce

- N, Greenhaff PL. Disuse atrophy and exercise rehabilitation in humans profoundly affects the expression of genes associated with the regulation of skeletal muscle mass. *FASEB J* 2004; 18: 1025-1027.
- 32) Hulmi JJ, Ahtiainen JP, Kaasalainen T, Pollanen E, Hakkinen K, Alen M, Selanne H, Kovanen V, Mero AA. Postexercise myostatin and activin IIb mRNA levels: effects of strength training. *Med Sci Sport Exer* 2007; 39: 289-297.
- 33) Szulc P, Schoppet M, Goettsch C, Rauner M, Dschietzig T, Chapurlat R, Hofbauer LC. Endocrine and clinical correlates of myostatin serum concentration in men—the STRAMBO study. *J Clin Endocr Metab* 2012; 97: 3700-3708.
- 34) Seibert MJ, Xue QL, Fried LP, Walston JD. Polymorphic variation in the human myostatin (GDF-8) gene and association with strength measures in the Women's Health and Aging Study II cohort. *J Am Geriatr Soc* 2001; 49: 1093-1096.
- 35) Hayot M, Rodriguez J, Vernus B, Carnac G, Jean E, Allen D, Goret L, Obert P, Candau R, Bonnieu A. Myostatin up-regulation is associated with the skeletal muscle response to hypoxic stimuli. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332: 38-47.
- 36) Ma K, Mallidis C, Bhasin S, Mahabadi V, Artaza J, Gonzalez-Cadavid N, Arias J, Salehian B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocr Metab* 2003; 285: E363-371.
- 37) Zachwieja JJ, Smith SR, Sinha-Hikim I, Gonzalez-Cadavid N, Bhasin S. Plasma myostatin-immunoreactive protein is increased after prolonged bed rest with low-dose T3 administration. *J Gravit Physiol* 1999; 6: 11-15.
- 38) Zimmers TA, Davies MV, Koniaris LG, Haynes P, Esquela AF, Tomkinson KN, McPherron AC, Wolfman NM, Lee SJ. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science* 2002; 296: 1486-1488.
- 39) Lokireddy S, Wijesoma IW, Bonala S, Wei M, Sze SK, McFarlane C, Kambadur R, Sharma M. Myostatin is a novel tumoral factor that induces cancer cachexia. *Biochem J* 2012; 446: 23-36.
- 40) Breitbart A, Auger-Messier M, Molkentin JD, Heineke J. Myostatin from the heart: local and systemic actions in cardiac failure and muscle wasting. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 300: H1973-1982.
- 41) Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, Sargent M, York A, Welle S, Molkentin JD. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation* 2010; 121: 419-425.
- 42) Lin J, Arnold HB, Della-Fera MA, Azain MJ, Hartzell DL, Baile CA. Myostatin knockout in mice increases myogenesis and decreases adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 701-706.
- 43) McPherron AC, Lee SJ. Suppression of body fat accumulation in myostatin-deficient mice. *J Clin Invest* 2002; 109: 595-601.
- 44) Wilkes JJ, Lloyd DJ, Gekakis N. Loss-of-function mutation in myostatin reduces tumor necrosis factor alpha production and protects liver against obesity-induced insulin resistance. *Diabetes* 2009; 58: 1133-1143.
- 45) Hamrick MW, Pennington C, Webb CN, Isales CM. Resistance to body fat gain in 'double-muscled' mice fed a high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* 2006; 30: 868-870.
- 46) Tu P, Bhasin S, Hruz PW, Herbst KL, Castellani LW, Hua N, Hamilton JA, Guo W. Genetic disruption of myostatin reduces the development of proatherogenic dyslipidemia and atherogenic lesions in Ldlr null mice. *Diabetes* 2009; 58: 1739-1748.
- 47) Wolff GL, Roberts DW, Mountjoy KG. Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol Genomics* 1999; 1: 151-163.
- 48) Guo T, Jou W, Chanturiya T, Portas J, Gavrilova O, McPherron AC. Myostatin inhibition in muscle, but not adipose tissue, decreases fat mass and improves insulin sensitivity. *PLoS One* 2009; 4: e4937.
- 49) McPherron AC. Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2010; 10: 217-231.
- 50) Elliott B, Renshaw D, Getting S, Mackenzie R. The central role of myostatin in skeletal muscle and whole body homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)* 2012; 205: 324-340.
- 51) Brandt C, Nielsen AR, Fischer CP, Hansen J, Pedersen BK, Plomgaard P. Plasma and muscle myostatin in relation to type 2 diabetes. *PLoS One* 2012; 7: e37236.
- 52) Kellum E, Starr H, Aronleut P, Immel D, Fulzele S,

Wenger K, Hamrick MW. Myostatin (GDF-8) deficiency increases fracture callus size, Sox-5 expression, and callus bone volume. *Bone* 2009; 44: 17-23.