2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２９ 年　 ６ 月 １３ 日現在

機関番号：２２６０４
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：１５Ｋ１６４８９
研究課題名（和文）筋収縮によるアセチルカルニチン排出機序の解明と生理作用の検討

研究課題名（英文）Mechanism of acetylcarnitine efflux by muscle contraction

研究代表者
古市　泰郎（Furuichi, Yasuro）

首都大学東京・人間健康科学研究科・助教

研究者番号：４０７３３０３５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：カルニチンは脂肪燃焼の他に、過剰に細胞内に蓄積した糖・脂質と結合してアセチルカルニチンに変換することでそれを緩衝する役割を担う。本研究は骨格筋収縮時のアセチル化動態を捉えることを目的とした。電気刺激によって筋収縮させると遅筋線維優位に骨格筋内へのカルニチンの取り込み、細胞内でのアセチル化が亢進することが明らかとなった。さらにマイオカインの分泌調節の検証を可能とする培養細胞の筋収縮システムを完成させ、アセチルカルニチンの分泌機序の解析を開始した。カルニチンの新たな生理学的意義を解明することは、健康医科学の分野の発展に貢献できると期待される。

研究成果の概要（英文）：In addition to fatty acid oxidation, carnitine acts as an acceptor of excess carbohydrates and lipids and form acetylcarnitine to relieve inhibition of glucose metabolism. The purpose of this study is to analyze carnitine dynamics during skeletal muscle contraction. Muscle contraction evoked by electrical stimulation in vivo increased the carnitine uptake and acetylation in preferred in slow type muscle fibers. We succeeded in developing a cultured myotube contraction system, which enables us to investigate contraction-induced myokine secretion, and are analyzing the mechanism of acetylcarnitine secretion from myotubes. To elucidate the new physiological significance of carnitine is expected to contribute to the development of the field of health science.

研究分野：運動生化学

キーワード：骨格筋　カルニチン　筋収縮　脂質代謝　マイオカイン

１．研究開始当初の背景

（1）ビタミン様物質「カルニチン」は、脂肪酸をミトコンドリアに運ぶ役割を担い、骨格筋の脂肪燃焼に働くことが知られる。一方で、カルニチンは悪性脂質の緩衝剤として新たな役割を担うことが分かってきた。糖や脂質が分解して生成される中間代謝物「アセチル CoA」は、重要なエネルギー基質でありながら、過剰に蓄積すると糖代謝を抑制し、糖尿病を引き起こす原因の 1 つである。このような状況でカルニチンは、悪性脂質であるアセチル CoA と結合して「アセチルカルニチン」という物質を生じさせることで、それを緩衝（無毒化）することが分かってきた。

（2）アセチルカルニチンは、カルニチンとは全く別の生理作用を発揮する。最も有名なのは、アルツハイマー病の改善など脳機能に対する効果で、神経細胞の保護作用や抗酸化作用を有する。興味深いことに、最近、骨格筋細胞内で生成されたアセチルカルニチンは、細胞外に排出されることが明らかとなった。この事実は、骨格筋の余剰なエネルギー基質はアセチルカルニチンとして血液中に放出され、他の臓器で新たな役割を演じることを想像させる。

（3）運動（筋収縮）は骨格筋におけるエネルギー代謝を亢進させるため、細胞内にアセチル CoA が大量に生成される。しかしながら筋収縮時のカルニチン動態については明らかになっていない。

２．研究の目的

（1）筋収縮時のカルニチン動態を明らかにするため、カルニチンのアセチル化、取り込みを測定する。

（2）骨格筋細胞からのアセチルカルニチンの分泌を測定するためには、他の組織や細胞の影響を受けない培養細胞の実験系が必要である。培養細胞の収縮システムを構築し、アセチルカルニチン分泌調節機序について検証する。

３．研究の方法

（1）麻酔下でマウスの下肢筋を電気刺激して筋収縮を引き起こした。収縮の直前に安定同位体標識のカルニチン（d3-carnitine）を頸静脈から投与し、外因性のカルニチンの動態解析を行った。筋収縮直後に骨格筋を摘出し、組織切片を作製した。質量分析イメージング法によって組織内のカルニチン及びアセチルカルニチンの局在を解析した。さらに、連続切片を用いてグリコーゲン量の低下や筋線維タイプを可視化した。

（2）電気刺激システムによって骨格筋培養細胞を筋収縮させた。株化細胞 C2C12 の他、マウス下肢筋から体性幹細胞を初代培養し、筋管細胞を得た。無血清培地に交換して１時間筋収縮させ、細胞懸濁液と培養上清を回収した。質量分析やウエスタンブロッティングによって分泌物や発現タンパク質を定量した。

４．研究成果

（1）生体内のカルニチン動態
　質量分析でカルニチン種を測定すると内因性カルニチンは *m/z* 162、アセチルカルニチンは *m/z* 204 として検出された。1 時間の *in situ* 筋収縮によってアセチルカルニチンは局所的に増加していた。連続切片を用いてミオシン重鎖 I の免疫染色をしたところ、アセチルカルニチンが増加していた部位は遅筋線維が集中している場所であることが分かった。
　d3-carnitine は *m/z* 165 のシグナルとして検出された。これもアセチルカルニチンと同様に筋収縮で増加し、さらに遅筋線維が集中している部位に局在していた。したがって、筋収縮は遅筋線維特異的にカルニチンのアセチル化を亢進させ、さらにカルニチンの細胞内輸送を促進させていることが示された。また、細胞内に取り込まれたカルニチンは 1 時間の間にアセチル化し、*m/z* 207 の d3-acetylcarnitine として検出された。筋収縮は即時的に骨格筋内でアセチルカルニチンを生成することが示された。

（2）培養細胞の筋収縮システムの構築
　筋収縮によって骨格筋細胞からアセチルカルニチンが排出（分泌）されることを示すために、骨格筋の培養細胞株 C2C12 の筋収縮システムを構築した。分泌調節の指標には、運動で血液中の濃度が増加する分子として報告されているインターロイキン-6（IL-6）を用いた。C2C12 を 1 時間収縮させ、培養上清中に分泌された IL-6 をウエスタンブロッティングで定量した。無血清培地に交換した直後は大量のタンパク質群が分泌され、筋収縮による分泌変化が検出できなかったが、それを取り除いた後に筋収縮させると IL-6 分泌量が増加した。このとき細胞は障害を受けていないことが確認されたため、急性収縮による調節性分泌を評価できる実験系が確立したと結論付けた。

（3）初代培養細胞によるアセチルカルニチン分泌機構の検討
　カルニチントランスポーター（OCTN2）の発現をウエスタンブロッティングで検出したところ、C2C12 ではその発現が欠損している可能性が示された。そこで、マウス骨格筋から体性幹細胞であるサテライト細胞を初代培養し、それを増殖、分化させて筋管細

胞を得た。OCTN2 は組織同様に発現していることが確認され、カルニチンの輸送実験には初代培養細胞を使用する必要があることが分かった。さらに、カルニチン輸送やアセチル化は遅筋線維で優位であることから、遅筋タイプの初代培養細胞の構築に取り組み、それに成功した。現在は、遅筋初代細胞の収縮システムを用いて培養細胞におけるカルニチン動態を解析している。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　9　件）

① 古市泰郎：筋収縮によるマイオカイン分泌調節証明のための課題. 日本運動生理学雑誌, 2017.査読無, in press.

② Mandai S, Furukawa S, Kodaka M, Hata Y, Mori T, Nomura N, Ando F, Mori Y, Takahashi D, Yoshizaki Y, Kasagi Y, Arai Y, Sasaki E, Yoshida S, Furuichi Y, Fujii NL, Sohara E, Rai T, Uchida S: Loop diuretics affect skeletal myoblast differentiation and exercise-induced muscle hypertrophy. Sci Rep, 7: 46369, 2017. 査読有, DOI: 10.1038/srep46369

③ Takakura H, Ojino M, Jue T, Yamada T, Furuichi Y, Hashimoto T, Iwase S, Masuda K: Intracellular oxygen tension limits muscle contraction-induced change in muscle oxygen consumption under hypoxic conditions during Hb-free perfusion. Physiol Rep,5(2): e13112, 2017. 査読有, DOI: 10.14814/phy2.13112

④ Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. Anal Biochem, 497: 36-38, 2016. 査読有, DOI: 10.1016/j.ab.2015.10.010

⑤ Inagaki A, Maruo K, Furuichi Y, Miyatake S, Tamura K, Fujii NL, Manabe Y: An improved glucose transport assay system for isolated mouse skeletal muscle tissues. Biosci Biotechnol Biochem, 18: 1-7, 2016. 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2016.1210503

⑥ Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki Y, Furuichi Y, Nabeshima YI. Effects of 17β-Estradiol and Androgen on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle. Endocrinology, 157: 4691-4705, 2016. 査読有, DOI: 10.1210/en.2016-1261

⑦ Yamada T, Takakura H, Jue T, Hashimoto T, Ishizawa R, Furuichi Y, Kato Y, Iwanaka N, Masuda K: Myoglobin and the regulation of mitochondrial respiratory chain complex IV. J Physiol, 594: 483-495, 2016. 査読有, DOI: 10.1113/JP270824

⑧ 古市泰郎, 藤井宣晴： マイオカインによるサテライト細胞の制御機構. 基礎老化研究, 40: 27-33, 2016. 査読有, http://www.jsbmg.jp/products/products_back2016.html

⑨ Takakura H, Furuichi Y, Yamada T, Jue T, Ojino M, Hashimoto T, Iwase S, Hojo T, Izawa T, Masuda K: Endurance training facilitates myoglobin desaturation during muscle contraction in rat skeletal muscle. Sci Rep, 5: 9403, 2015. 査読有, DOI: 10.1038/srep09403

〔学会発表〕（計　8　件）

① Fujii NL, Manabe Y, Furuichi Y: Discovery of muscle contraction regulated myokine secretion in C2C12 myotubes. 第 6 回国際医科学ネットワークフォーラム, 2016 年 11 月, 松本.

② 古市泰郎：骨格筋がトレーニング効果を獲得する仕組みを細胞レベルで考える. 第 59 回サッカードクターセミナー（招待講演）, 2016 年 10 月, 金沢.

③ 古市泰郎, 眞鍋康子, 宮田楓, 佐藤帆浪, 高木麻由美, 青木美穂, 藤井宣晴: IL-15 は急性筋収縮によって分泌促進されるマイオカインである. 第 71 回日本体力医学会大会, 2016 年 9 月, 盛岡.

④ 古市泰郎：動きを捉えて見えてきた L-カルニチンの新たな役割. 日本スポーツ栄養学会第 3 回大会（シンポジウム), 2016 年 7 月, 松山.

⑤ 古市泰郎：良質な筋肉を作るには？～ミートではなくマッスルの話～. 食品産業技術研究会（招待講演), 2016 年 7 月, 東京.

⑥ 古市泰郎, 眞鍋康子, 高木麻由美, 青木美穂, 藤井宣晴: IL-6 は筋収縮のカルシウム放出をトリガーとして分泌促進される. 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年 9 月, 和歌山.

⑦ 古市泰郎: 急性収縮によってマイオカインが分泌調節されることの証明. 日本体育学会第66回大会 (シンポジウム), 2015年8月, 東京.

⑧ 古市泰郎, 眞鍋康子, 増田和実, 藤井宣晴: 筋収縮はカルニチンの取り込みとアセチル化を促進させる. 第23回日本運動生理学会大会, 2015年7月, 東京.

〔図書〕(計 2 件)

① Furuichi Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Role of mechanical muscle contraction in glucose homeostasis. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 155-169, 2016.

② 眞鍋康子, 古市泰郎: 7章-1 身体運動に伴う生体機能適応を支える分子機構. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, 163-170, 2016.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：骨格筋初代細胞の培養液
発明者：古市泰郎、眞鍋康子、藤井宣晴
権利者：首都大学東京
種類：特許
番号：特願2016-124210
出願年月日：平成28年 6月23日
国内外の別： 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/index.html

６. 研究組織

(1)研究代表者
古市 泰郎 (FURUICHI, Yasuro)
首都大学東京・大学院人間健康科学研究科・助教
研究者番号：４０７３３０３５

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者