

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16491

研究課題名(和文) 運動効果獲得における骨髄中細胞の役割

研究課題名(英文) The role of bone marrow cells in obtaining the effect of exercise

研究代表者

只石 幹 (TADAISHI, MIKI)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50633799

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)：運動は全身の組織に影響を与えて、健康維持や疾病予防、生活の質の向上に寄与することが知られている。骨髄には多様な細胞種が存在し、近年では内分泌器官として働く可能性も示されているが、運動との関わりは明らかでない。そのため本研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。その結果、骨髄-骨-骨格筋の組織間相互作用の解析に有用な凍結組織切片の作成が可能であることが示された。加えて、運動負荷後には骨格筋と骨髄の両組織でmRNAレベルでの発現変動が認められる事が明らかとされ、運動は骨髄に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Exercise is known to influence whole body, contributing to health maintenance, disease prevention, improvement of quality of life. A variety of cell types are present in the bone marrow, and in recent years the possibility of working as an endocrine organ has also been shown, but the relationship with the exercise is not clear. Therefore, this study aimed to investigate the relationship between exercise and bone marrow. As a result, we established a method for preparing frozen tissue sections useful for analysis of bone marrow - bone - skeletal muscle crosstalk. In addition, expression change of mRNA level was observed after exercise in both skeletal muscle and bone marrow, indicating that exercise has an effect on bone marrow.

研究分野：栄養、代謝生理、食品機能

キーワード：骨髄 運動

1. 研究開始当初の背景

運動は身体活動によりエネルギー消費を増加するだけでなく、習慣的に継続することで体組成や組織の性質を変化させる。これら運動の効果は、健康維持や疾病予防、生活の質の向上に寄与することから、高齢化社会を迎える我が国において、その全貌・獲得機構を明らかにすることは有用と考えられる。加えて、運動は筋肉以外にも骨や脂肪といった全身の組織に影響をもたらすことが知られている。

骨髄は従来、血液や免疫系細胞を作り出す組織と考えられてきた。ヒトにおける移植技術も確立されており、血液難病や重度の免疫不全患者を対象に移植手術が行われている。また、詳細な機序は明確とされていないが、運動が移植後骨髄の細胞生存率を延長する効果を持つことも報告されている (M De Lisio et. al, Exp Hematol., 2013)。その一方で、骨髄中には血球・マクロファージ系へ分化する前駆細胞 (造血幹細胞) 以外にも、筋肉・脂肪・骨へと分化する間葉系の前駆細胞 (骨髄間質細胞) やそれらが分化した細胞が混在し、各組織の再構築 (リモデリング) 等に寄与することが知られている。このように多様な細胞種が混在している骨髄であるが、近年、骨髄中脂肪細胞の肥大化が血中へのタンパク質分泌を介して、肥満者の耐糖能異常に関与することが報告された (Cawthorn WP et al. Cell Metab., 2014)。このことから、生体において骨髄は内分泌器官としても機能すると推測されるが、その役割の多くは未解明である。加えて、運動も肥満者の脂肪細胞を小型化し、耐糖能異常を改善する効果を持つとされるが、その機構に骨髄の機能が関与することも推測される。

2. 研究の目的

上記の研究背景を受け、本研究では、「運動が骨髄中細胞に与える影響」と「運動効果獲得における骨髄細胞の役割」を明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

研究目的の達成には筋肉および骨髄での動態を評価することが必須であるため、初めに評価法を検討する必要があった。骨髄は強固な組織である骨の内部に存在するため、一般的な組織切片作成法を用いての観測が困難である。加えて従来、硬組織である骨・骨髄の切片作成では、薄切り前の脱灰処理が必要であり、骨周辺組織である筋肉は取り除かれていた。近年、Kawamotoらにより、脱灰処理の必要のない骨・骨髄凍結切片の作成法が確立された (Kawamoto T et al., Methods Mol Biol. 2014)。本研究では、この方法を参考に、脱灰処理を省略することで、筋肉と骨・骨髄を同時に解析可能なサンプルの作成を試みた。具体的には凍結の際に生じる組織のヒビ割れ(クラック)や、筋細胞中の凍結不

良の程度が最も低い条件を検討した。

加えて、骨格筋と骨髄における運動効果を検討するため、種々のトレッドミル運動条件 (下表) における骨格筋および骨髄の変化を解析した。飼育期間中は摂食量、体重変化を測定し、試験終了の2日前に運動耐久試験を行った。各組織重量と mRNA 発現、凍結切片による組織染色等を行った。また単回負荷試験では運動終了直後、1 時間後、3 時間後、24 時間後に骨格筋と骨髄を摘出し、mRNA 発現の解析を行った。全ての試験において、運動負荷を行わない安静群 (Sed) を設け比較対象とした。

長期運動負荷試験

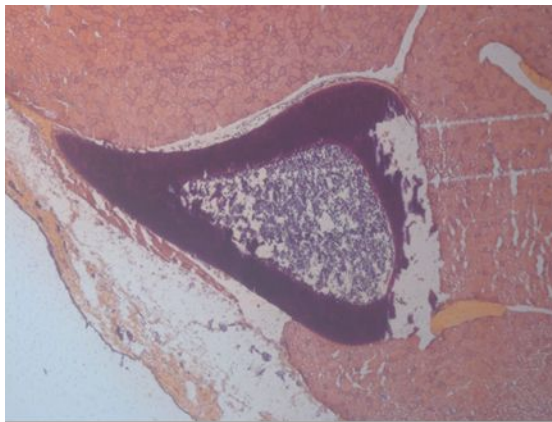
実施年度	飼料	運動速度 (m/min)	運動時間 (分/回)	運動頻度 (回/週)	期間 (週)
H27	MF	10	30	3	4
	MF	10	30	3	8
	MF	10	30	3	12
	MF	20	30	3	4
	MF	20	30	3	8
	MF	20	30	3	12
	MF	30	30	3	4
	MF	30	30	3	8
	MF	30	30	3	12
H28	MF	20	90	3	12
H29	AIN96G	20	90	5	8
	40%カゼイン食	20	90	5	8

単回運動負荷試験

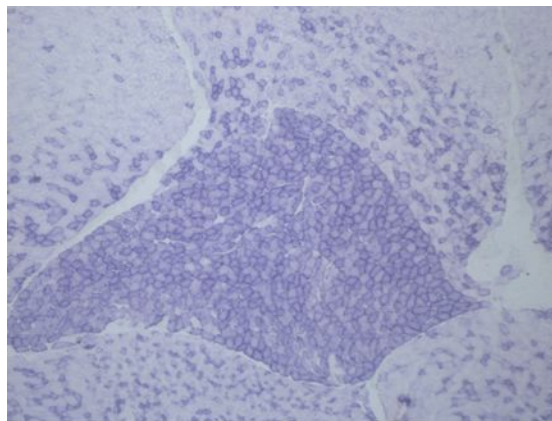
実施年度	飼料	運動速度 (m/min)	運動時間 (分/回)
H29	MF	20	90

4. 研究成果

凍結条件検討後に作成した組織切片を用いてヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色、コハク酸脱水素酵素 (SDH) 染色を行った (図)。HE 染色の結果、骨髄腔に多数のヘマトキシリン陽性細胞 (青紫色) の存在が認められた。加えて、SDH 染色では、ミトコンドリア含量の多い赤筋 (ヒラメ筋) でより濃い青色に染色され、筋線維 type による染め分けが可能であった。また、いくつかの抗体染色も可能である事が確認できた。これらのことから、骨格筋と骨髄の変化を同時に解析できる凍結切片の作成法を確立する事ができたと判断した。



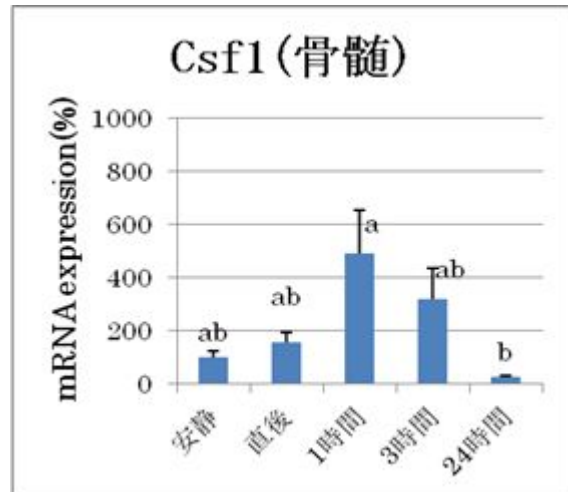
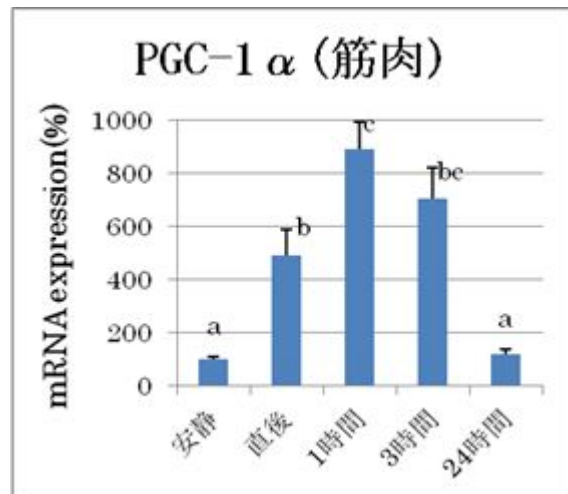
HE染色



SDH染色

長期的な運動負荷試験では、平成 27 年度の予備検討の結果を基に運動条件の設定を行った。30 m/min の運動速度では、トレッドミル運動中の事故やケガのリスクが高く、8 週以上のトレーニングには適さないと判断されたため、平成 28 年度以降の実験では運動速度を 20 m/min に設定した。加えて試験に用いた 7 週齢の雄性 C57BL/6J マウスは、90 分間の 20 m/min トレッドミル運動を完走できる事も確認した。平成 27 年度においては 8 週目以降の体重減少等、一部で運動効果が確認できたものの、骨格筋や骨髄における遺伝子・タンパク質レベルでの変動は見られなかった。この結果を受け、平成 29 年度でマウスの飼料組成に着目し、通常食である AIN-96G とタンパク質源であるカゼイン含有量を増加させた 40%カゼイン食摂取群を設け、両群における運動トレーニング効果を検討した。その結果、最終体重および各組織重量において安静群と比較し、有意な差は認められず、高カゼイン食摂取により運動トレーニングによる体重減少が改善された。一方で、骨格筋および骨髄中細胞の mRNA 発現においては、明確な変動を示す遺伝子は見つげられず、引き続きタンパク質レベルでの解析を行う予定である。

単回運動負荷試験においては、トレッドミル運動後の骨格筋と骨髄において経時的な遺伝子発現の変動を解析した。その結果、骨格筋 PGC-1 と骨髄 Csfl mRNA においては、いずれも運動終了から 1 時間後で有意な増加が認められた(図)。加えて、それら mRNA 発現の増加は運動終了から 1 時間後をピークとし、時間経過と共に安静時レベルまで戻る現象が確認された。



これらの結果から骨髄中細胞においても骨格筋と同様の変動パターンを示す遺伝子が存在することが示された。

本研究成果により、骨髄-骨-骨格筋の組織間相互作用の解析に有用な凍結組織切片の作成が可能であることが示された。加えて、運動負荷後には骨格筋と骨髄の両組織で mRNA レベルでの発現変動が認められる事が明らかとされた。今後はマイクロアレイ等を用いた運動により変化する骨髄中細胞遺伝子の網羅的スクリーニングや骨髄への運動シグナル伝達機構の検討を行って行く計画である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
只石 幹 (TADAISHI MIKI)  
東京農業大学・応用生物科学部・助教  
研究者番号：50633799

(2)研究分担者  
(3)連携研究者  
(4)研究協力者