

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15785

研究課題名(和文) 骨格筋が分泌する自然免疫分子による筋萎縮抑制効果の解明と食品成分による制御

研究課題名(英文) Inhibition of muscle atrophy by innate immune molecules secreted by skeletal muscle

研究代表者

近澤 未歩 (Chikazawa, Miho)

名城大学・農学部・助教

研究者番号：80757071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) は主に免疫細胞が分泌する自然免疫分子である。これまでの検討により、骨格筋がMFG-E8を分泌していることを新たに明らかにした。本研究では、MFG-E8の骨格筋における機能について解明することを目指し検討を行った。具体的には、MFG-E8が骨格筋分化・融合の亢進、骨格筋における炎症の抑制に寄与していることを予想し、骨格筋培養細胞、マウスを用いた検討を行った。結果、MFG-E8は分化時の筋細胞表面に結合することで筋融合を促進すること、筋融合時の過剰な炎症を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋の分化・融合が正常に行われることは、発生時に重要であることに加え、筋障害時における骨格筋の再生や運動時の筋増強にも関与する。筋融合が正常に行われないうことで再生が進まず、筋繊維の萎縮が進行することは、サルコペニアの発症の一因であると考えられている。骨格筋融合のメカニズムを明らかにすることは、筋融合や筋再生が速やかに行われない状態の高齢者などにおいて、筋機能を維持し、健康的な生活を送ることができるようになるための知見を得る上でも有効と考えられる。骨格筋においてMFG-E8の産生を誘導するような機能性食品、薬剤などを明らかにすることで、サルコペニア予防に寄与することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) is an innate immune molecule secreted by immune cells. Previous studies have revealed that skeletal muscle secretes MFG-E8. In this study, we aimed to elucidate the function of MFG-E8 in skeletal muscle. Specifically, we hypothesized that MFG-E8 contributes to the enhancement of skeletal muscle differentiation and fusion and to the suppression of inflammation in skeletal muscle. Therefore, we examined this hypothesis using cultured skeletal muscle cells and mice. The results suggest that MFG-E8 promotes muscle fusion by binding to the surface of myocytes during differentiation and suppresses excessive inflammation during muscle fusion.

研究分野：食品科学

キーワード：サルコペニア 筋融合 MFG-E8

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮の進行は、高齢者の寝たきりや要介護状態へと発展する。高齢化が進む現代において、サルコペニアなど筋萎縮の予防のための健康食品や食品成分への関心は高く、筋機能改善効果を持つ機能性食品の開発も期待される。

骨格筋は複数の細胞が融合することにより形成される多核細胞であり、融合の過程においては様々な分子やシグナル系が関与することが予想される。近年、骨格筋に発現する自然免疫受容体 BAI-1 が、分化時に生成するアポトーシス細胞を認識することで筋融合を促進することが確認された (Nature, 497: 263-267, 2013)。自然免疫系分子の筋融合に与える影響については多くが未解明であり、これを明らかにすることは筋形成のメカニズムの解明へと結びつくことが期待される。

そこで、自然免疫系の分泌分子や受容体について、リアルタイム PCR により骨格筋 (培養細胞・マウス) における発現を確認したところ、多くの分子が骨格筋においても発現しており、筋分化の過程において発現が変動することが確認された。その中から、骨格筋に高発現する分泌分子 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) に着目して検討を行った。その結果、MFG-E8 が C2C12 細胞 (マウス筋芽細胞株) により分泌されることを新たに明らかにし、さらに、筋分化の過程で、分泌された分子が分化中の筋細胞表面に結合することも確認した。このことより、従来マクロファージなどの免疫細胞が産生すると考えられていた自然免疫分子が骨格筋において分泌され、それが骨格筋、あるいは様々な組織において何らかの機能を担うことが予想された。

### 2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、骨格筋において産生される MFG-E8 がどのような機能を担うのか明らかにすることである。マクロファージにおいて、MFG-E8 はアポトーシス細胞の貪食促進、炎症抑制に寄与する。このことから、骨格筋においても、筋細胞間の橋渡しにより骨格筋融合を促進する作用、内因性抗原などの炎症分子に結合し、その除去を促すことで炎症や筋障害を抑制する作用があることを予想した。

骨格筋自体における自然免疫系の機能については、これまでに BAI-1 などいくつかの受容体について解析されているが、分泌分子については全く明らかにされていない。骨格筋における MFG-E8 の機能が解明され、免疫細胞以外の細胞における免疫系分子の活用が明らかになることは、基礎研究としても意義のあるものである。また、今回着目する MFG-E8 は分泌分子であるため、骨格筋以外の組織にも作用することが考えられる。骨格筋における発現や分泌の制御機構を明らかにすることで、新たなマイオカインとしての機能性が見出されることも期待される。

### 3. 研究の方法

MFG-E8 が 骨格筋分化・融合の亢進、骨格筋における炎症の抑制に寄与していることを予想し、骨格筋培養細胞、マウスを用いた検討を行った。

### 4. 研究成果

#### MFG-E8 と筋分化との関与の検討

#### a) C2C12 細胞を用いた MFG-E8 による分化促進効果検証

これまでの検討により、C2C12 筋芽・筋管細胞における MFG-E8 の分泌を確認したが、生体においても骨格筋が MFG-E8 を分泌するのか確認するため、マウス骨格筋よりサテライト細胞を単離後、分化誘導を行い、MFG-E8 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で、産生量を ELISA により検出した。その結果、MFG-E8 はサテライト細胞において発現しており、その発現量・産生量は分化誘導により増加することが確認された。

次に、MFG-E8 が筋分化を促進すると予想し、培養細胞における検討を行った。具体的には、C2C12 細胞において、リコンビナント MFG-E8 の投与による筋分化への影響について検討を行った。分化誘導の際にリコンビナント MFG-E8 を添加することで、筋分化マーカー (Myogenin, Myh3) の発現が亢進することをリアルタイム PCR で確認した。

#### b) MFG-E8 の分化細胞表面への結合確認

C2C12 細胞に分化を誘導させ、細胞表面への MFG-E8 の結合をフローサイトメトリーにより評価した。MFG-E8 は分化 3 日目において 50%以上の細胞の表面に結合していることが明らかになった。これは、C2C12 細胞自身が分泌した MFG-E8 が分化時の細胞表面に結合していることを示している。

#### MFG-E8 の筋炎症抑制効果の検討

#### c) MFG-E8 による C2C12 細胞の炎症抑制効果の検証

C2C12 細胞の分化誘導時には炎症応答が誘導されることが知られる。炎症は分化の進行に必要なものと考えられるが、過剰な炎症は組織障害などにつながると考えられる。C2C12 の分化誘導時にリコンビナント MFG-E8 を添加した際の炎症の進行について、Cleaved caspase-3 のウェスタンブロッティングにより評価した。リコンビナント MFG-E8 の添加により、Cleaved

caspase-3 の増加が抑制されていることが確認され、MFG-E8 が分化時の炎症を抑制する作用を持つことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

|   |                         |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Chikazawa Miho, Shimizu Makoto, Yamauchi Yoshio, Sato Ryuichiro   | 4. 巻<br>522             |
| 2. 論文標題<br>Bridging molecules are secreted from the skeletal muscle and potentially regulate muscle differentiation | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemical and Biophysical Research Communications   | 6. 最初と最後の頁<br>113 ~ 120 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bbrc.2019.11.010   | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|