

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18318

研究課題名（和文）敗血症性ミオパチー：骨格筋とレジデントマクロファージのクロストーク

研究課題名（英文）Septic myopathy: Cross-talk between skeletal muscle and resident macrophages

研究代表者

池尻 薫 (Ikejiri, Kaoru)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90813014

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋から放出されるミオカインであるイリシンは、間葉系細胞に発現するインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、 $\alpha 1 \beta 1$  のリガンドとして働き、骨、骨格筋、脂肪組織の代謝リモデリングに重要な役割を果たすことが近年明らかにされている。イリシンを介したリンパ球の接着には、 $\alpha 1 \beta 1$ 、 $\alpha 5 \beta 1$  だけでなく、白血球特異的な  $\alpha L \beta 2$  や  $\alpha 4 \beta 7$  を含む複数のインテグリンが関与することが示された。これらの結果は、イリシンが炎症を起こした血管系において、リンパ球の接着と移動を制御する重要な役割を担っている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではイリシンがインテグリン  $\alpha L \beta 2$  および  $\alpha 4 \beta 7$  の新規リガンドとして機能し、リンパ球の接着をサポートすることを明らかにした。炎症における白血球移動の制御において、イリシンが果たす生物学的役割については、まだ不明な点が多い。イリシンが代謝調節に重要な役割を果たすという証拠が増えてきているので、イリシンの生物学をさらに研究することで、イリシンが白血球移動の代謝調節の中心点にあることがわかり、新しい研究テーマとなる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Irisin, a myokine released from skeletal muscle, has recently been found to act as a ligand for the integrins  $\alpha 5 \beta 1$ ,  $\alpha 1 \beta 1$ , and  $\alpha 5 \beta 1$  expressed on mesenchymal cells, thereby playing an important role in the metabolic remodeling of the bone, skeletal muscle and adipose tissues. Here, we show that irisin supports the cell adhesion of human and mouse lymphocytes. Irisin represents a novel ligand for integrin  $\alpha L \beta 2$  and  $\alpha 4 \beta 7$ , capable of supporting lymphocyte cell adhesion independently of  $\alpha 1 \beta 1$  integrins. These results suggest that irisin may play an important role in regulating lymphocyte adhesion and migration in the inflamed vasculature.

研究分野：敗血症

キーワード：FNDC-5 LFA-1インテグリン ECM PBMC イリシン リンパ球 骨格筋 ICU-AW

## 1. 研究開始当初の背景

インテグリンは、細胞接着分子の最大のファミリーであり、様々な生理的・病理的過程において、相手細胞上や細胞外マトリックス (ECM) 中の同種のリガンドとの接着相互作用を媒介する。18 種類の インテグリンサブユニットと 8 種類の インテグリンサブユニットがあり、少なくとも 24 種類のインテグリンヘテロ二量体がヒトとマウスのほぼ全ての細胞型に発現している。これらのヘテロ二量体分子は、細胞上に発現するリガンドや ECM に沈着するリガンドと結合し、生物学的作用を発揮する。インテグリンを発現する細胞の種類によって、インテグリンを介した細胞接着は、創傷治癒、宿主防御、炎症、血栓症、癌転移など様々な生命現象に重要な役割を果たす。インテグリン L 2 (別名: リンパ球機能関連抗原 1, LFA-1) および 4 7 (別名: リンパ球パイエル板接着分子, LPAM-1) は、白血球、特にリンパ球にのみ発現するインテグリンのサブセットである。インテグリン L 2 は、内皮細胞上に発現する細胞間接着分子-1 (ICAM-1) を主要なリガンドとして結合する。このようにして、リンパ節を介したリンパ球の全身的な再循環と、炎症を起こした臓器への白血球の移動を制御している。インテグリン 4 7 は、腸管内皮細胞上に発現する粘膜アドレジン細胞接着分子-1 (MAdCAM-1) と結合し、腸管への組織特異的なリンパ球のホーミングを支配している。リンパ球上のインテグリン L 2 および 4 7 は、血管内皮細胞との接着相互作用を協同でサポートし、それによってリンパ節や炎症組織へのリンパ球の遊走を制御している。

イリシンは、フィブロネクチンタイプ III ドメイン含有タンパク質 5 (FNDC5) の N 末端部分から分解される運動誘導性ペプチドで、細胞外に分泌されることにより、ミオカイン (骨格筋サイトカイン) として機能する。イリシンは、脂肪の褐変を誘導し、代謝性疾患を改善、抗腫瘍効果を示すことが知られている。近年、イリシンは V 5、V 1、5 1 などのインテグリンのサブセットに対する新たなリガンドとして作用し、代謝調節に重要な役割を果たすことが示されている。骨格筋から分泌されるイリシンは、骨細胞上に発現する V 5 インテグリンと結合し、それによって骨吸収を引き起こすスクレロステチンの産生を誘導する。また、イリシンは脂肪細胞前駆細胞に発現する V 5 および V 1 インテグリンと結合し、de novo ベージュ脂肪生成を媒介する。肥満や癌などの慢性炎症状態では、循環血中のイリシン濃度が増加することが報告されている。循環中のイリシンは、内皮細胞に発現する V 5 インテグリンと結合し、バリア機能を調節することができる。さらに循環中に増加したイリシンは、内皮細胞や ECM に沈着し、リンパ球の接着基質として働く可能性も示唆されている。しかし、リンパ球のインテグリン L 2 および 4 7 がイリシンに結合するかどうかは、まだ証明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では骨格筋とレジデントマクロファージのクロストーク同定のために、リンパ球とイリシンとの結合について検討した。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 組換えヒトイリシン-免疫グロブリン Fc 部分融合タンパク質 (イリシン-Fc) 発現ベクターの構築

イリシンの全配列を有する pHLSec2-irisin-his ベクターから KOD FX Neo 試薬 (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いてポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、制限酵素 HindIII および BamHI を用いた。HindIII 制限酵素部位 (5' GTTTAAACTTAAGCTTGCCACCATGGCATCCTT3') を有するフォワードプライマーおよび BamHI 部位 (5' GAGTTTTGTGCGATCCCTCTCATGGTCACCTC3') を有するリバースプライマーを使用した。Fc ベクタープラスミド (Addgene plasmid # 8636) のヒト免疫グロブリン -1 (IgG-1) の Fc 受容体をコードする遺伝子にインフレイム部位で Gibson Assembly を用いてサブクローニングし、イリシン-Fc タンパク質をコードする発現プラスミドベクターを構築した。

### 3.2. イリシン-Fc 融合タンパク質の発現と精製

Lipofectamine 2000 試薬 (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用いて、FreeStyle 293-F 細胞 (Thermo Fisher Scientific Japan, Tokyo, Japan) にイリシン-Fc プラスミドをトランスフェクションし、イリシン-Fc タンパク質の発現を誘導した。コントロールプラスミドとして、サブクローニングを行わない Fc プラスミドを用い、コントロール Fc タンパク質を産生させた。トランスフェクタントは無血清 Opti-MEM (Gibco, Invitrogen, Tokyo, Japan) 中で培養し、7 日後に上清を回収した。上清中に分泌された Irisin-Fc またはコントロール Fc タンパク質を、プロテイン A-アフィニティ Amicon Pro 精製システム (日本ミリポア、東京、日本) を用いて精製した。イリシン-Fc およびコントロール Fc タンパク質の純度は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) およびその後のクーマシーブリリアントブルー色素 (EzStain Aqua, ATTO, 大阪、日本) での染色によって決定した。

### 3.3. 細胞培養

Jurkat 細胞および TK1 細胞を 10%ウシ胎児血清 (FBS) (Equitech-Bio, Kerrville, TX)、ペニシリン (100U/mL) / ストレプトマイシン (100 µg/mL) (Nacalai Tesque, 京都, 日本) を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (Nacalai Tesque, 京都, 日本) 内で 5%CO<sub>2</sub> の大気中において 37 °C、およそ 80%コンフルエンスに到達するまで培養した。

### 3.4. 末梢血単核細胞(PBMC)の調製

PBMCs の血液サンプルは、手順に対するインフォームドコンセントを得た後、クエン酸処理したチューブで健康なボランティアから採取した。血液サンプルは、Percoll Plus (GE Healthcare) の密度勾配遠心かけられ、1000 ×g で 20 分間遠心された。その後、PBMC を含む上清を回収し、1200 rpm で 5 分間遠心分離を行った。最後に、PBMC を HEPES 緩衝生理食塩水 (HBS) 中に懸濁した。三重大学医学部施設審査委員会は、本研究のプロトコルを承認した (承認番号: 3026)。

### 3.5. 細胞接着アッセイ

96 ウェル V 底プレートをを用いた細胞接着アッセイを用いて細胞とタンパクの結合実験を行った。Irisin-Fc およびコントロール Fc タンパク質を 10 µg/ml リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で調製し、タンパク質調製物の 100 µl アリコート各ウェルに分注した。10 µg/ml のウシ血清アルブミン (BSA) をネガティブコントロールとして使用し、1 µg/ml のヒト組換え ICAM-1-Fc キメラ蛋白 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、1 µg/ml ヒト組換え MAdCAM-1 Fc キメラ蛋白 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)、1 µg/ml マウス組み換え ICAM-1-Fc キメラタンパク質 (BioLegend, San Diego, CA, USA) または 1 µg/ml フィブロネクチン (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) をポジティブコントロールとして含んだ。プレートは 4 °C で一晩インキュベートし、PBS で 2 回洗浄した。その後、プレートは HBS 中 1%BSA により 37 °C で 1 時間ブロッキングされた。BCECF で標識した 2 × 10<sup>4</sup> PBMC または Jurkat 細胞を含む HBS の 100 マイクロリットルアリコートを、2.2 mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) または 5 mM MgCl<sub>2</sub> および 1 mM エチレンジアミン四酢酸 (EGTA) のいずれかの存在下で、各ウェル中に分注された。抗体阻害実験のために、BCECF で標識した細胞を 0.5 µg/ml のインテグリンに対するブロッキングモノクローナル抗体 (mAb) またはコントロール IgG と 37 °C で 10 分間インキュベートしてから各ウェルに分注した。その後、プレートを室温で 5 分間インキュベートし、スイングローター (EX-125, TOMY SEIKO, Osaka, Japan) を用いて、800rpm で 5 分間遠心分離を行った。V 底ウェルの直下に蓄積した非付着細胞を、2030 ARVO X-2 Multilabel Reader (PerkinElmer Japan, Kanagawa, Japan) で検出した。

## 4. 研究成果

### 4.1. イリシンは濃度依存的に lymphocytic jurkat 細胞と結合する。

イリシンタンパク質を Fc 融合タンパク質として哺乳類細胞株で組換え発現させた。イリシン-Fc 融合タンパク質と、参照用として培養上清に分泌された Fc タンパク質は、還元条件下での SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行った。その結果、イリシン-Fc および Fc タンパク質はそれぞれ 60 kDa および 36 kDa で移動し、グリコシル化により推算されるアミノ酸配列より大きな分子量を示した。

### 4.2. イリシンは Jurkat 細胞と TK-1 細胞と結合する。

イリシンとヒトリンパ球系 Jurkat 細胞との接着性相互作用を調べるために、イリシン-Fc タンパク質またはコントロール Fc タンパク質を 96 ウェルプレートの底に固定化した細胞接着アッセイを実施した。異なる濃度のリガンドを用いた Jurkat 細胞の細胞接着アッセイでは、固定化リガンドに対して濃度依存的なシグモイド状の結合曲線が見られた。ICAM-1 およびフィブロネクチンに結合する Jurkat 細胞は、2 µg/ml でプラトーに達し、1 µg/ml で約 50%の最大結合を示した。一方、イリシンと結合する Jurkat 細胞は、10 µg/ml でプラトーに達し、6 µg/ml で 50%の最大結合を示した。

### 4.3. リコンビナントインテグリン L 2 および 4 7 タンパク質とイリシンは結合する

イリシンとインテグリン L 2、4 7 との特異的な相互作用を確認するために、精製したリコンビナントインテグリンタンパク質を用いて ELISA 型の実験を行った。市販のマウス L 2、ヒト L 2、ヒト 4 7 の組み換えインテグリン蛋白を用いた。ICAM-1-Fc と MAdCAM-1-Fc は、それぞれ L 2 と 4 7 に良好な特異的結合を示した。イリシン-Fc は、コントロール Fc とは異なり、ヒトやマウスの L 2 およびヒトの 4 7 によく結合した。これらの結果は、イリシンとインテグリン L 2 および 4 7 との結合を立証している。

本研究ではイリシンがインテグリン L 2 および 4 7 の新規リガンドとして機能し、リン

パ球の接着をサポートすることを明らかにした。炎症における白血球移動の制御において、イリシンが果たす生物学的役割については、まだ不明な点が多い。イリシンが代謝調節に重要な役割を果たすという証拠が増えてきているので、イリシンの生物学をさらに研究することで、イリシンが白血球移動の代謝調節の中心点にあることがわかり、新しい研究テーマとなる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Darkwah Samuel, Park Eun Jeong, Myint Phyo Kyaw, Ito Atsushi, Appiah Michael G., Obeng Gideon, Kawamoto Eiji, Shimaoka Motomu	4. 巻 9
2. 論文標題 Potential Roles of Muscle-Derived Extracellular Vesicles in Remodeling Cellular Microenvironment: Proposed Implications of the Exercise-Induced Myokine, Irisin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 634853 ~ 634853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.634853	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Kawamoto Eiji, Park Eun Jeong, Shimaoka Motomu	4. 巻 1
2. 論文標題 Methods to Study Integrin Functions on Exosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 265 ~ 281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0962-0_15	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ikejiri Kaoru, Akama Yuichi, Ieki Yohei, Kawamoto Eiji, Suzuki Kei, Yokoyama Kazuto, Ishikura Ken, Imai Hiroshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Veno-arterial extracorporeal membrane oxygenation and targeted temperature management in tricyclic antidepressant-induced cardiac arrest	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e24980 ~ e24980
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000024980	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ikejiri Kaoru, Suzuki Kei, Ishikura Ken, Imai Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Endovascular Cooling Catheter-Related Thrombosis After Targeted Temperature Management for Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Case Report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Therapeutic Hypothermia and Temperature Management	6. 最初と最後の頁 244 ~ 247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/ther.2019.0044	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Mizutani Akane Unno, Shindo Akihiro, Arikawa Shigeo, Shimada Takuya, Matsuura Keita, Ikejiri Kaoru, Suzuki Kei, Imai Hiroshi, Tomimoto Hidekazu	4. 巻 18
2. 論文標題 Reversible splenial lesion in a patient with new-onset refractory status epilepticus (NORSE)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eNeurologicalSci	6. 最初と最後の頁 100220 ~ 100220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ensci.2019.100220	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ikejiri Kaoru, Suzuki Kei, Ito Asami, Yasuda Kazunari, Shindo Akihiro, Ishikura Ken, Imai Hiroshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Invasive Salmonella Enteritidis infection complicated by bacterial meningitis and vertebral osteomyelitis shortly after influenza A infection in an immunocompetent young adult	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 269 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.08.001	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔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 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	島岡 要  (Shimaoka Motomu)  (40281133)	三重大学・分子病態学・教授    (14101)	
研究協力者	川本 英嗣  (Kawamoto Eiji)  (20577415)	三重大学医学部附属病院・救命救急センター・講師    (14101)	
研究協力者	朴 恩正  (PARK Eun Jeong)  (20644587)	三重大学・分子病態学・准教授    (14101)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高娃 阿栄 (Gaowa Arong)  (50643805)	三重大学・分子病態学・助教  (14101)	
研究協力者	赤間 悠一 (Akama Yuichi)  (40763313)	三重大学医学部附属病院・救命救急センター・助教  (14101)	
研究協力者	伊藤 亜紗実 (Ito Asami)  (80740448)	三重大学医学部附属病院・救命救急センター・助教  (14101)	
研究協力者	江角 亮 (Esumi Ryo)  (50813028)	三重大学医学部附属病院・救命救急センター・助教  (14101)	
研究協力者	新貝 達 (Shinkai Toru)  (40860672)	三重大学医学部附属病院・救命救急センター・助教  (14101)	

## 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