

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780071  
 研究課題名 (和文) 運動依存的に産生される新規筋由来分泌タンパク質に関する研究  
 研究課題名 (英文) Characterization of novel exercise factors in skeletal muscle  
 研究代表者  
 根建 拓 (NEDACHI TAKU)  
 東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員  
 研究者番号：50375200

研究成果の概要 (和文)：研究代表者らが開発した培養細胞由来擬似的運動刺激系と細胞伸展刺激系を用いて、新規筋由来運動因子 (CXC ケモカイン) の産生制御機構・生理作用をはじめて明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文) We successfully extended the understandings of the fundamental characteristics of contraction- and stretch-inducible exercising factor (CXC chemokine) production and their potential roles in skeletal muscle cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：動物生化学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：動物細胞、運動、分泌因子、シグナル伝達、伸展

#### 1. 研究開始当初の背景

適度な運動は、筋肉での糖・脂質代謝を亢進させ、また筋発達を促して体全体の基礎代謝量を上昇させる。また、筋肉以外の組織においても、例えば脂肪組織での脂肪分解促進や、免疫能上昇などを介して体全体に対して良好な影響を与える。一方、運動が不足すると糖代謝関連の機能が低下してメタボリック症候群の発症要因となりうることや、逆に過剰な運動も筋破壊や免疫能の低下など体に悪影響をもたらすことが知られている。従

って、異なる運動強度によって変化する多彩な運動の生理作用をより細かな分子レベルで解明することは、運動効果をより深く理解するためのみならず、運動の利点をより有効に活用する上で極めて重要である。

しかし、このような運動依存的な生理的变化を惹起する分子メカニズムについては明らかとなっていないことが多い。特に、運動が筋肉のみならず他組織にまで影響を与える事実は、筋肉と他組織・臓器間に情報伝達ネットワークが存在することを示唆している

ものの、運動による筋収縮がどのように他の組織・臓器に影響を与えるのかについてはほとんど分かっていない。その主な理由のひとつとして、運動の研究に適した優れた培養筋細胞系が存在しなかったため、研究手法が限定的であったことがあげられる。

研究代表者らは、培養筋管細胞 C2C12 の培養条件などを細かく検討することで、細胞深部にまで筋収縮に必須なサルコメラ構造を保持した高度発達型培養筋細胞系の構築に成功した (Fig. 1, 2)。さらに、この細胞に電気パルス刺激を加えることによって人為的に収縮刺激のオン・オフをコントロールできる全く新しい *in vitro* 擬似的運動刺激系を世界で初めて開発した。この *in vitro* 擬似的運動刺激系とマイクロアレイ解析を駆使して、運動にตอบสนองして発現が変化する遺伝子を網羅的に解析した。これまで動物実験によって運動依存的に筋肉からの分泌が上昇するタンパク質として、いくつかのサイトカイン (IL-6, 8, 15) が報告されていたが、研究代表者らはこれらのタンパク質に加えて、新たに CXC ケモカインファミリー (CXCL1/KC, CXCL5/LIX など)、VEGF ファミリー、Wnt inhibitory factor など多数の分泌タンパク質をコードする遺伝子の発現が運動依存的に上昇することを初めて見出した。特に、ケモカインファミリーについては、リアルタイム PCR や細胞培養液中に放出されるケモカイン量の測定でも筋収縮によって上昇することが確認され、また、トレッドミルを用いた動物実験によっても運動依存的に血中濃度が上昇することを確認した。

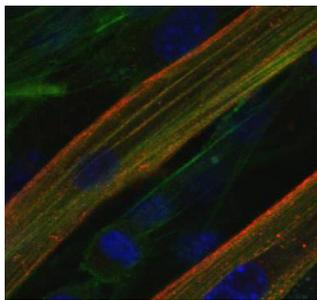


Fig. 1 既存の C2C12 筋管細胞

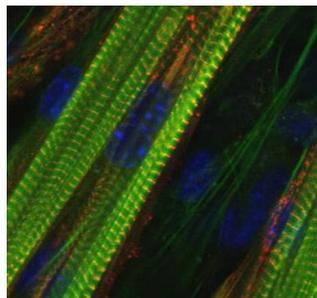


Fig. 2 高度発達型 C2C12 筋管細胞

## 2. 研究の目的

本研究計画では、研究代表者らが同定した運動依存的に発現上昇する分泌タンパク質に注目し、以下の 3 点を主要な目的とした。

(1) 筋収縮にตอบสนองした分泌タンパク質の産生制御機構の詳細について *in vitro* 擬似的運動刺激系の特長を生かした解析を行い、筋収縮に伴って活性化される  $Ca^{2+}$  依存的なシグナル伝達経路を中心にどのようなシグナル分子が関与しているのかを細胞生物学・生化学・分子生物学的手法を用いて明らかにする。

(2) 同定した運動によって発現上昇する分泌タンパク質の生理的な役割を明らかにする。特に分泌タンパク質の筋肉に対するオートクリン的な作用を探索する。(3) 分泌タンパク質の産生と外的環境とのクロストーク、特に培養筋細胞への力学的刺激によって分泌タンパク質の産生がどのように変化するのかについて解明する。研究期間終了後に以上の研究結果を総括し、これまで未知の部分が多かった運動依存的に産生される新規筋由来分泌タンパク質の生理的意義について考察する。

## 3. 研究の方法

まず、研究代表者が開発した *in vitro* 擬似的運動刺激系を用いて、分泌タンパク質の産生制御機構について生化学・分子生物学的解析を行うこととした。特に、運動依存的な  $Ca^{2+}$ -Calmodulin シグナル伝達系活性化、筋収縮によるエネルギー消費の増大に伴う AMP kinase 系の活性化、さらには筋収縮に付随して生じる伸展刺激 (ストレッチ) によるストレス応答性 MAP kinase 系の活性化などについて、どの経路が運動因子産生に重要な役割を果たしているかを明らかにすることを最重点課題とした。

次に、運動依存的に発現変化する分泌タンパク質の生理的意義、特に運動によって発現が顕著に上昇するケモカインの生理的意義を解析することとした。差しあたって、高度発達型培養筋細胞に対する CXCL1/KC と CXCL5/LIX の効果について、特に cAMP シグナルが重要な役割を果たすことが報告されている糖・脂質代謝、筋分化を中心に生理作用解析を行った。

最後に、運動効果における外的環境の影響について特に糖代謝系と分泌タンパク質を中心とした解析を行った。特に高度発達型培養筋細胞に対する力学的刺激が運動因子産生にどのような影響をどのようなメカニズムで持つのかについて生化学的・分子生物学的解析を行った。

## 4. 研究成果

2008 年度:

2008 度は、研究代表者らが開発した *in*

*in vitro* 擬似的運動刺激系を用いた分泌タンパク質（運動因子）の産生制御機構について解析を行った。まず、*in vitro* 擬似的運動刺激系の電気パルス刺激（EPS）条件を細かく検討した結果、より生理的な持久運動効果を発現しうる培養条件・電気パルス刺激条件を見出すことができ、これを報告した（Nedachi 他、AJPEM, 2008）。次に、様々な条件で EPS 後、培養液中に含まれる分泌タンパク質の量的変動を解析した結果、刺激開始 30~60 分後に分泌量の増加が観察される運動因子（CXC ケモカイン群など）と、12 時間以上の刺激によって初めて分泌増加が観察されるもの（IL-6 など）の二つのタイプが存在することがわかった（Fig. 3）。

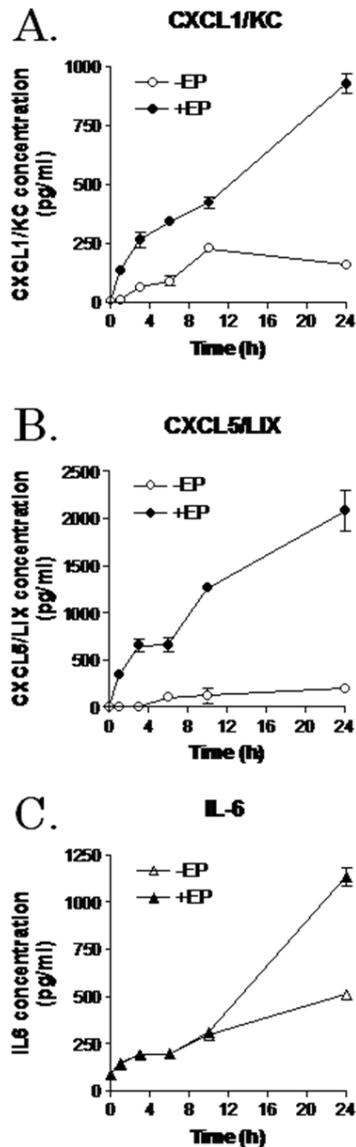


Fig. 3 電気パルス刺激にตอบสนองした CXC ケモカイン群と IL-6 産生の経時的変化

さらに、電気パルス刺激活性化されるシグナル分子の生理的意義について調べた。まず、

EPS 開始後 15~30 分で  $Ca^{2+}$  依存的に活性化される JNK が CXC ケモカイン群の産生に重要であることを発見した。一方、IL-6 の産生については JNK による制御を受けず、 $Ca^{2+}$  依存的な calcineurin や NFAT 系転写因子の関与が示唆された。まとめると、運動依存的に活性化される複数のシグナル伝達経路は異なる運動因子の産生調節を担うことが初めて示された（Fig. 4; Nedachi 他、AJPEM, 2009）。

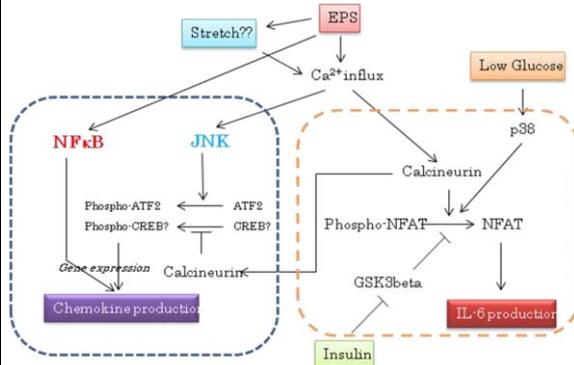


Fig. 4 作業仮説：電気パルス依存的な運動因子の産生は、複数のシグナル伝達経路を介している

さらに、運動因子の生理作用についても解析を進め、CXC ケモカイン群が筋芽細胞の遊走と筋分化を正に制御していることを発見した（Fig. 5; Nedachi 他、AJPEM, 2009）。

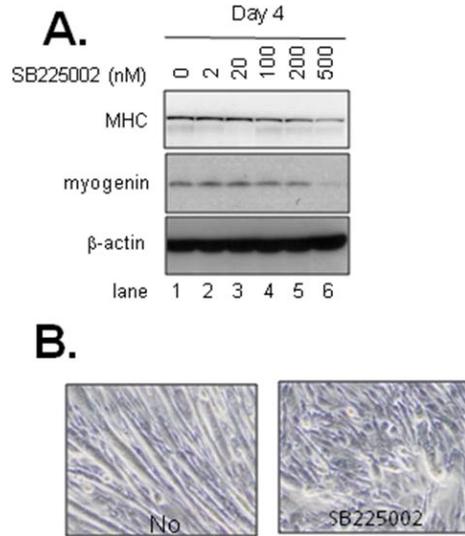


Fig. 5 CXC ケモカインアンタゴニスト SB225002 による筋分化の抑制

A: SB225002 が筋分化マーカータンパク質の発現に及ぼす影響

B: SB225002 による筋管形成の阻害

また本研究結果は、甲状腺細胞増殖に関する研究にも大きく貢献した (Fukushima 他、Endocrinology, 2008)。本年度の研究成果によって、新規運動因子の産生制御機構と生理作用の一端が明らかとなった。

### 2009 年度

2009 年度は、この筋管細胞において運動依存的に活性化される JNK の機能をさらに詳細に解析した。まず、筋管細胞内 JNK 量を RNA 干渉によって減少させたのち、擬似的運動刺激を行ったところ、運動因子の産生は観察されなくなり、この分子の生理的重要性を強く補強する結果を得た (Fig. 6)。

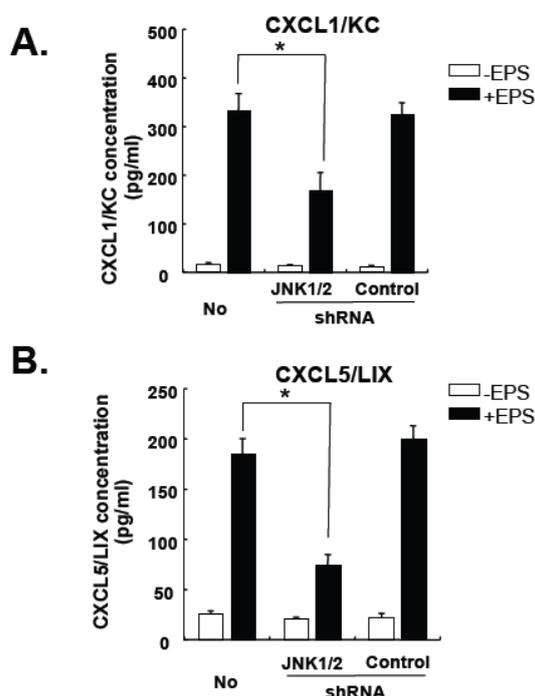


Fig. 6 電気パルス刺激依存的な運動因子産生に対する JNK1/2 shRNA の効果

次に、培養筋管細胞を物理的に伸展させることによって、このような運動因子の産生が観察されるのかを検討した。その結果、運動因子 CXC ケモカイン群の産生は伸展刺激によっても観察され、さらにこの伸展依存的な運動因子の産生は JNK の特異的阻害剤によって抑制されることが明らかとなった (Fig. 7)。

すなわち、運動依存的な分泌タンパク質産生の一部は、収縮に付随して生じる筋管細胞の伸展に依存していることがはじめて明らかとなった (Nedachi 他、AJPEM, 2009)。

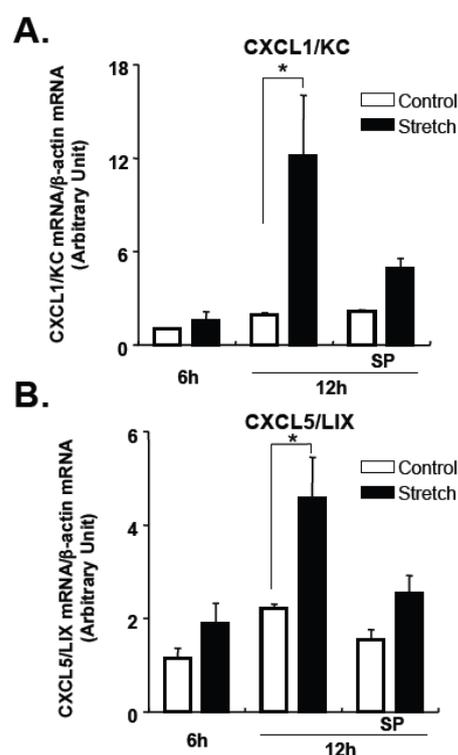


Fig. 7 伸展 (ストレッチ) 刺激に応答した JNK 依存的な運動因子の産生上昇

また、本年度の研究成果は、脳神経保護機能を持つプログランユリンの産生制御機構解明にも貢献した (Suzuki 他、JRD, 2009, 根建他、実験医学, 2009)。

以上、2 年間の本研究によって、今まで全く不明であった (1) 新規筋由来運動因子の産生制御機構、(2) 収縮と伸展刺激の比較解析が完了し、当該領域に大きく貢献できたと考えている。

### 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 5 件)

(1) Nedachi T, Hatakeyama H, Kono T, Sato M, Kanzaki M: Am J Physiol Endocrinol Metab 297(4):E866-878, 2009

(2) Suzuki M, Lee HC, Kayasuga Y, Chiba S, Nedachi T, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M: J Reprod Dev 55(4): 351-355, 2009

(3) 根建 拓, 河合隆徳, 西原真杉: 実験医学 27(9):1345-1349, 2009

(4) Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M: Am J Physiol Endocrinol Metab 295(5):E1191-204, 2008

(5) Fukushima T, Nedachi T, Akizawa H, Akahori M, Hakuno F, Takahashi S: Endocrinology 149(7): 3729-42, 2008

〔学会発表〕(計1件)

(1) Nedachi T et al. 68<sup>th</sup> American Diabetes Association Scientific Sessions. San Francisco, USA, 2008

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

根建 拓 (NEDACHI TAKU)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任研究員

研究者番号：50375200