

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19559

研究課題名（和文）運動による新規中性脂肪低下メカニズムの解明～骨格筋アポリポ蛋白C2システムを中心に～

研究課題名（英文）A triglyceride metabolism by exercise through apolipoprotein C2 pathway

研究代表者

小松 知広（Komatsu, Tomohiro）

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：80838756

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）：本研究は、C2C12マウス筋芽細胞、ヒトiPS細胞由来骨格筋細胞、野生型マウスの骨格筋において、これまで存在が報告されていない脂質代謝因子アポリポ蛋白C2の存在を明らかにした。さらに、野生型マウスを回転ホイールで自発運動させると、運動後に血液中で中性脂肪低下、骨格筋でアポリポ蛋白C2増加を見出した。しかし、骨格筋でこの脂質代謝機構について、リパーゼを中心に検討したが解明に至らなかった。ヒトリコンビナントアポリポ蛋白C2を野生型マウスへ投与すると、自発的運動と同様に血液中の中性脂肪が低下し、骨格筋のアポリポ蛋白C2発現が増加傾向を示し、これらの結果は運動を模倣した効果であ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

本研究は、血液中のリポ蛋白に存在し脂質代謝因子（特に、中性脂肪分解）として知られるアポリポ蛋白C2が骨格筋に存在することを初めて明らかにした。さらに運動に伴い血液中の中性脂肪が低下し、かつ骨格筋でアポリポ蛋白C2が増加することが明らかになった。アポリポ蛋白C2を野生型マウスに投与すると、血液中の中性脂肪と骨格筋アポリポ蛋白C2が運動後と同様な傾向を示した。アポリポ蛋白C2と関連する骨格筋の脂質代謝機構が未解明であるが、これらの結果から、将来的に骨格筋でこの新規脂質代謝機構を解明することで運動効果を楽しむ創薬に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study using C2C12 mouse myoblastoma cells, human iPS cell-derived myocytes and skeletal muscle from wild-type C57BL6J mice, revealed the existence of apolipoprotein C2 in skeletal muscle. Interestingly, in vivo study using wild-type mice showed that the plasma triglyceride level was decreased and apolipoprotein C2 expression in skeletal muscle was elevated after voluntary exercise training with rotating wheel. Administration of recombinant human apolipoprotein C2 proteins in wild-type mice significantly suppressed plasma triglyceride, and increased apolipoprotein C2 in skeletal muscle as voluntary exercise training. These observations suggest that induction of apolipoprotein C2 may have a similar effect to exercise on lipids metabolism in skeletal muscle.

研究分野：脂質代謝

キーワード：中性脂肪 運動 骨格筋 アポリポ蛋白C2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋では、運動によりエネルギー源として脂質利用が増加するが、脂質代謝メカニズムに不明な点が多い。運動によりリポ蛋白リパーゼ (Lipoprotein lipase: LPL) を活性化して血液中の脂肪酸が増加するが、アポリ蛋白 (アポ蛋白) C2 は LPL による血液中の脂質水解作用を補助する役目がある。近年アポ蛋白 C2 を模倣した人工アポ蛋白 C2 ペプチド投与は、血液中で脂質 (中性脂肪) を代謝させ下肢骨格筋へ取り込ませ、骨格筋へのエネルギー分配に関与することが報告された。研究開始当初に骨格筋の脂質代謝に関してアポ蛋白 C2 に注目した報告がなかったが、それまでに骨格筋でのアポ蛋白 C2 の存在や運動による影響を構想していたため、アポ蛋白 C2 を中心とした新規の骨格筋脂質代謝機構の解明を目指して研究を開始した。

2. 研究の目的

運動により骨格筋内の脂質利用率が上昇する際に、血液中の脂質代謝物や骨格筋内の脂肪滴がエネルギー源として利用されるが、それぞれ LPL や脂肪中性脂肪リパーゼ (ATGL) 等リパーゼ等が作用する機序が報告されている。しかし、骨格筋におけるアポ蛋白 C2 の存在やアポ蛋白 C2 に関連する骨格筋脂質代謝機構について不明であり、その機構の解明および運動やアポ蛋白 C2 投与が誘導する中性脂肪低下 (脂質代謝亢進) 作用の骨格筋への影響について解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

野生型マウス (C57BL/6J)、骨格筋細胞 (マウス C2C12 細胞、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞) を用いて、骨格筋におけるアポ蛋白 C2 の存在を検討し、運動が骨格筋でのアポ蛋白 C2 およびその脂質代謝機構へ及ぼす影響について検討した。さらに、野生型マウスにおいて、脂質代謝異常・耐糖能異常を呈した正常状態と異なる状況下で、運動効果に関して検討した。また、アポ蛋白 C2 を野生型マウスへ投与することで血液中の脂質を代謝させ、それがマウス骨格筋へ与える影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋におけるアポ蛋白 C2 の存在の検討、運動が及ぼすマウス骨格筋アポ蛋白 C2 への効果およびアポ蛋白 C2 を介した脂質代謝機構の解明

本研究では、マウス骨格筋細胞、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞、野生型マウスの骨格筋において、これまで存在が報告されていない脂質代謝因子アポリ蛋白 C2 の存在を明らかにした。次に、野生型マウスを通常食にて通常飼育群もしくは回転ホイールを用いた自発運動群の 2 群へわけ、12 週齢から 6 週間実施して比較検討した。通常飼育群では、体重が増加したが血液中の脂質 (中性脂肪) は開始前後で変化を認めなかった (図 1)。一方、自発運動群では、通常飼育群と比較して体重が低下傾向を示し、血液中の脂質 (中性脂肪) は有意に低下した (図 1)。下肢骨格筋において、アポ蛋白 C2 の mRNA レベルは腓腹筋で通常飼育群と比較し、2 倍程度の上昇を認め、その存在と持続運動による増加が認められた (図 2)。

さらに、野生型マウスに高脂肪食 (High Fat Diet32, 日本クレア) 負荷し脂質異常・耐糖能異常を呈する状態となった後、高脂肪食群もしくは高脂肪食および回転ホイールを用いた自発運動群の 2 群へわけ、12 週齢から 6 週間実施して比較検討した。両群で、体重が増加したが自発運動群で高脂肪食群に対して有意差を持って体重が低値を示した。一方、血液中の脂質 (総コレステロール、中性脂肪) は、両群に有意差を認めなかった。下肢骨格筋において、アポ蛋白 C2 mRNA レベルが両群で有意差を認めず、高脂肪食による脂質異常・耐糖能異常を呈した状態では正常状態で見られた自発運動によるアポ蛋白 C2 mRNA レベル上昇がキャンセルされた結果であった。

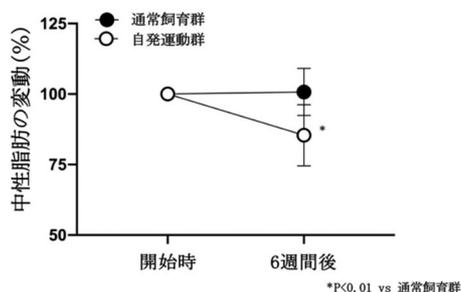


図1. 運動による野生型マウスの血液中の中性脂肪低下効果

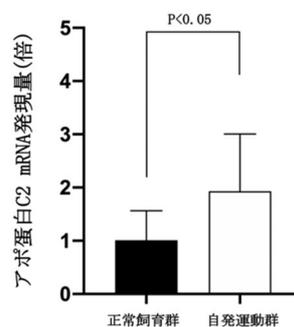


図2. 運動によるマウス骨格筋アポ蛋白C2への効果

先に実施した通常食での通常飼育群と自発運動群の 2 群において、通常飼育群に対して運動後の下肢骨格筋でアポ蛋白 C2 と関連する因子を検討したところ、LPL が両群で不変、ATGL が両群で不変もしくは増加と骨格筋部位により異なる傾向を示しアポ蛋白 C2 と一致した変動が認められなかった。また、肝臓でアポ蛋白 C2 の上流因子として知られる Liver X receptor など脂質代謝関連因子を検討したものの同様に下肢骨格筋で部位により一致した結果が得られなかった。これらのことから、運動により骨格筋アポ蛋白 C2 mRNA レベルが増加することは明らかとなったが、その脂質代謝機構に関わる因子については不明であった。

(2) 運動が及ぼすマウス・ヒト骨格筋細胞におけるアポ蛋白 C2 への影響

電気刺激装置を用いて電気刺激にて骨格筋細胞の筋収縮を惹起した運動モデル細胞実験を行い、アポ蛋白 C2 の存在や発現様式を検討した。マウス C2C12 骨格筋細胞(骨格筋分化後の筋管細胞)では、電気刺激 3 日間実施後のアポ蛋白 C2 mRNA レベルは、電気刺激しない群の C2C12 骨格筋細胞より約 85% 減少を認めた(図 3)。一方、ヒト iPS 細胞由来骨格筋細胞(筋管細胞)では、電気刺激 5 日後においてアポ C2 mRNA レベルは、両群で差を認めなかった(図 4)。従って、アポ蛋白 C2 は mRNA レベルでマウス・ヒト骨格筋細胞で存在が認められたものの、マウスおよびヒトの骨格筋細胞で電気刺激による運動模倣モデルの実験では、生体で得られた骨格筋アポ蛋白 C2 上昇効果が認められなかったことから、この細胞実験はマウス運動実験を模倣した実験系として適していないと考えられた。

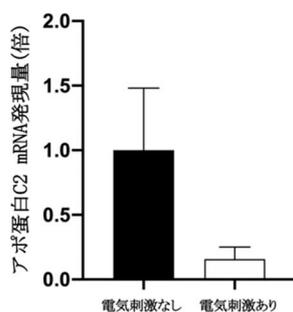


図3. 電気刺激による筋収縮(運動)モデルによるマウス骨格筋細胞(C2C12細胞)のアポ蛋白C2への効果

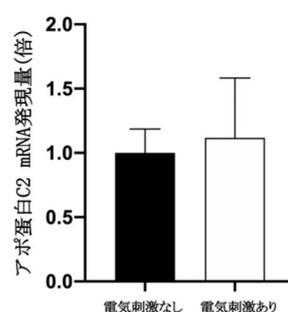


図4. 電気刺激による筋収縮(運動)モデルによるヒトiPS細胞由来骨格筋細胞のアポ蛋白C2への効果

(3) アポ蛋白 C2 投与によるマウス骨格筋への影響

ヒトアポ蛋白 C2 は LPL を補助して中性脂肪を低下させる機能を有しており、その機能を保持したヒトアポ蛋白 C2 模倣ペプチドの作製を 6 種類検討したが、3 種類で合成不能、残り 3 種類で合成可能であった。アポ蛋白 C2 の中性脂肪水解能は、中性脂肪を含む人工カイロミクロンを水解させ産生される遊離脂肪酸を計測して評価した。ヒトリコンビナントアポ蛋白 C2 は LPL の機能に加えてさらに中性脂肪水解能を示したが、合成した 3 種類のヒトアポ蛋白 C2 模倣ペプチドは中性脂肪水解作用を示さなかったため生体もしくは細胞実験へ応用できなかった(図 5)。

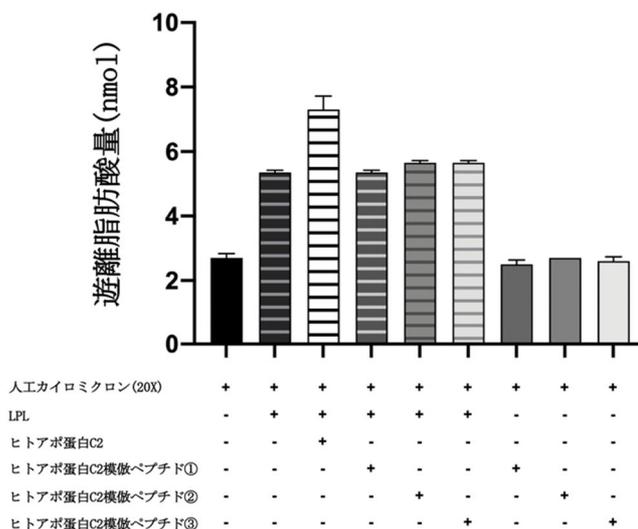


図5. アポ蛋白C2およびアポ蛋白C2模倣ペプチドによる中性脂肪水解効果(遊離脂肪酸測定)

次に、通常食で飼育した野生型マウスに対し、コントロール(リン酸緩衝生理食塩水投与)群もしくはヒトリコンビナントアポ蛋白 C2 投与群の 2 群に分け、投与後(15分~24時間)の継時的な血液中の脂質変化および投与後 3 日後の下肢骨格筋への影響について検討した。血液中の中性脂肪は、ヒトリコンビナントアポ蛋白 C2 投与群で投与後 15 分から中性脂肪が 30-50%程度まで減少し 24 時間後まで持続した(図 6)。一方、下肢骨格筋(腓腹筋)では、コントロール群と比較して、ヒトリコンビナントアポ蛋白 C2 投与群で骨格筋でのアポ蛋白 C2 mRNA レベルが上昇傾向を示した(図 7)。

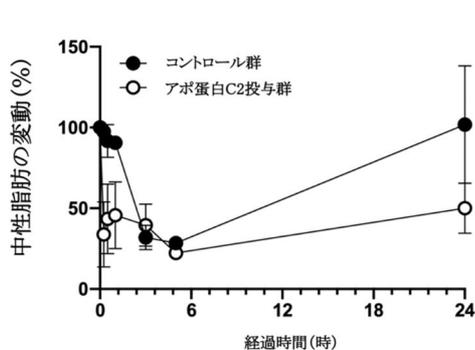


図6. アポ蛋白C2投与による野生型マウスの血液中の中性脂肪低下効果

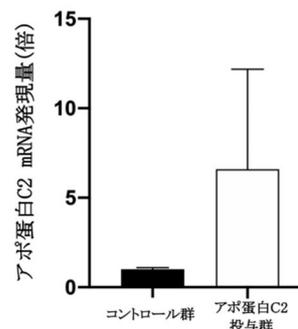


図7. アポ蛋白C2投与による野生型マウスの骨格筋のアポ蛋白C2への効果

ヒトリコンビナントアポ蛋白 C2 投与によるマウス骨格筋の結果は、マウスが運動することで血液中の中性脂肪が低下すること(図 1)および骨格筋アポ蛋白 C2 mRNA レベルが上昇する(図 2)ことと同様な傾向を示した。従って、脂質異常症や耐糖能異常を呈していない正常状態において、アポ蛋白 C2 投与による血液中の中性脂肪を代謝させ骨格筋へ取り込ませる作用が、骨格筋へ運動効果を模倣させる働きがある可能性を示唆した。ただし、アポ蛋白 C2 を介した脂質代謝機構は未解明であり、また評価するマウス数の蓄積やアポ蛋白 C2 投与の用量・回数などについて検討の余地があり、解明のため今後更なる研究が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tomohiro Komatsu, Shihoko Nakashima, Satomi Abe, Takahiro Iwamoto, Yoshinari Uehara
2. 発表標題 HDL mimetics promotes mitochondrial function in mouse myoblast cells.
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------