

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700700

研究課題名(和文)チオレドキシンは筋収縮時に骨格筋から分泌される新規マイオカインである

研究課題名(英文)Thioredoxin is a myokine secreted by skeletal muscle

研究代表者

眞鍋 康子 (MANABE, YASUKO)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：60467412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チオレドキシンが骨格筋から分泌されるマイオカインであるかを検証した。培養骨格筋細胞は刺激を与えない状態でもチオレドキシンを分泌した。細胞を低強度の電気刺激で収縮させた時はチオレドキシンの分泌は増加しなかったが、高強度で刺激すると有意に分泌が増加した。一方、高強度刺激では細胞障害活性も増加しており、漏出による分泌の増加であると考えられた。さらに、チオレドキシンがエクソソーム経路で分泌されているかについて検証したが、エクソソーム画分には検出されず、別の経路で分泌されていることが示された。以上よりチオレドキシンは構成性に分泌されるマイオカインであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study investigated whether Thioredoxin (TRX) is one of the myokines secreted by skeletal muscle. Secretion of TRX was observed without any stimulation or with stimulation of the low intensity of electric pulse. On the other hand, that was increased with stimulation of the high intensity of electric pulse concomitantly with an increase in LDH activity, a marker of cell injury, suggesting that an increased secretion of TRX was attributed to the leakage due to the cell damages. We also studied whether TRX-1 was secreted via exosome vesicles, a major mechanism of unconventional secretion because TRX-1 is known as one of the secreted proteins without signal peptide sequence signaling. However, TRX-1 was not secreted via exosome vesicles. In summary, TRX is constitutively secreted myokine, but not regulated by the muscle contraction.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：マイオカイン 骨格筋 運動

## 1. 研究開始当初の背景

近年、筋収縮によって骨格筋からホルモン様の蛋白質が分泌されることが示唆され、総称してマイオカインと呼ばれている。しかし、過去の研究ではヒトを対象に血液や筋組織を解析しており、骨格筋からの分泌、あるいはマイオカインの存在について、明白な証拠は得られておらず、マイオカインの存在は仮説の域を出ていなかった。申請者は、培養骨格筋細胞を血液成分(血清)を使用せずに成熟(分化)させる培養条件を発見し、これらに電気刺激装置を組み合わせることで、筋細胞を生体外で収縮させることに成功した。この系を用いて筋収縮後に培養液を回収し、プロテオーム解析をしたところ、酸化・還元作用を有するレドックス制御スーパーファミリーに分類されるチオレドキシンの、グルタレドキシンの、およびペルオキシレドキシンの存在が同定された。また予備実験において、筋収縮がそれらの分泌を促進することが示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、プロテオーム解析で発見されたマイオカイン候補分子の中からチオレドキシンの分泌に注目し、その筋収縮による分泌の機序を解明することである。本研究の目的は以下の2つである。

- (1) チオレドキシンの分泌が骨格筋から構成性に分泌されるか、調節性に分泌されるかを明らかにする
- (2) チオレドキシンの分泌機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 培養骨格筋細胞(C2C12細胞)を成熟した筋管になるまで分化させた。分化5日目に、a) 収縮を与えないで1, 3または6時間置いた後に回収した上清、b) 様々な刺激条件によって電氣的に収縮させ、回収した上清を遠心濃縮し、それらに含まれるチオレドキシンの量をウェスタンブロッティングにより定量した。また、lactate dehydrogenase(LDH)活性を測定し細胞障害の指標とした。プロテアーゼ阻害剤を添加することによる分泌への影響は、培養上清中にプロテアーゼインヒビターカクテル(Sigma, St. Louis, MO)またはコントロールとしてDimethyl sulfoxideを終濃度0.75%になるように加えた。

(2) 分泌経路の検証のため、超遠心法により細胞の培養上清からエクソソームを分画し、ウェスタンブロッティングによりチオレドキシンの存在の有無を検証した。またチオレドキシンの分泌を阻害することが報告されているメチルアミン存在下における分泌も検証した。

## 4. 研究成果

### (1) チオレドキシンの構成性分泌

チオレドキシンは2つのサブタイプの存在が知られている。1, 3または6時間静置した細胞から得られた培養骨格筋細胞の上清では、チオレドキシンの1, 2ともに時間依存的な分泌が観察された(図1)。これは、チオレドキシンの1, 2が、少なくとも構成性に分泌されるマイオカインであるということを示している。以降の実験は主に細胞質に存在するとされているチオレドキシンの1に関して実施した。

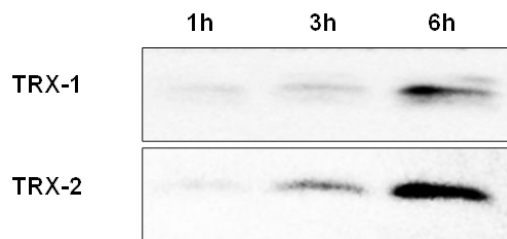


図1 チオレドキシンの1または2の時間経過ごとの分泌。培地を交換してから、1, 3, 6時間静置後の細胞培養上清を回収し、ウェスタンブロッティングに供した。

### (2) チオレドキシンの電気刺激による分泌調節

分化させた培養骨格筋細胞を様々な刺激電圧・時間(10V・1時間, 10V・3時間, 30V・3時間, または12V・24時間)で収縮させ、収縮により分泌の増加が観察されるかの検証を行った。

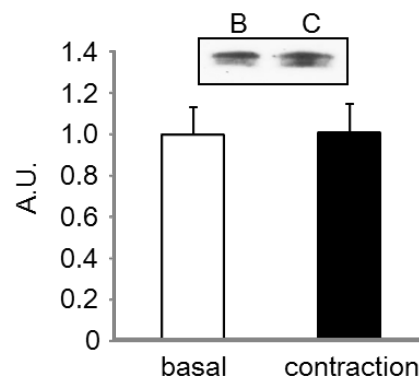


図2 電気刺激によるチオレドキシンの分泌

C2C12細胞は10Vで1時間収縮させ、上清を回収・濃縮しウェスタンブロットに供した(n=4-5)。

図2に10V・1時間刺激をした時に上清に検出されたチオレドキシンの定量値を示し

た。収縮によるチオレドキシンの分泌増加は観察されなかった。また、他の刺激時間でも、分泌の増加は観察されなかった (data not shown)。

筋収縮による分泌が見られない原因として、収縮でプロテアーゼが同時に分泌され、それらによりチオレドキシンの分解が起きている可能性も考えられた。そこで、プロテアーゼ阻害剤を培地に混在させ、分泌の検証を行った。図3に示すように、プロテアーゼ阻害剤存在下では、安静時・収縮時にかかわらず、プロテアーゼ阻害剤を混在させない時よりも多くのチオレドキシンの検出された。これは、チオレドキシンの構成性に分泌されると同時に分解も進んでいることを示している。一方、プロテアーゼ阻害剤の存在下においても収縮による分泌の増加は観察されなかった (図3)。

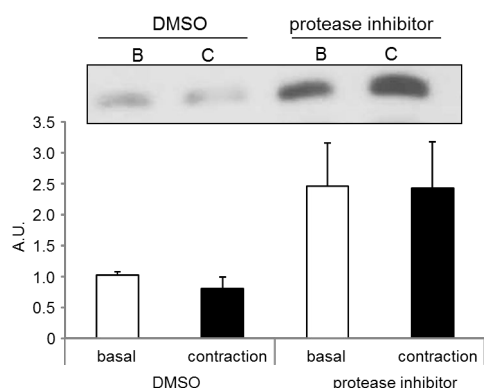


図3 プロテアーゼインヒビター存在下におけるチオレドキシンの分泌 (n=9-10)。

次に、より激しい条件 (50V・1時間) で細胞を収縮させチオレドキシンの分泌が増加するかを検証した。その結果、培養上清への分泌の有意な増加が検出された (図4a)。しかし、これらの激しい刺激条件下では同時に細胞障害の指標である LDH 活性の有意な上昇も観察された (図4b)。激しい刺激によるチオレドキシンの分泌の増加は、細胞の損傷による漏出と考えられる。

### (3) 分泌メカニズムの検証

チオレドキシンの一般的な分泌蛋白質が持つN末端分泌シグナル配列が無いため、これまで知られている分泌タンパク質とは異なった新規のメカニズムで分泌されると考えられる。近年、そのメカニズムとしてエクソソームによる分泌経路が知られている。エクソソームは直径 100nm 以下の小胞で、多くの細胞が分泌し遠隔臓器への

情報伝達を担っていることが示唆されている。そこで、チオレドキシンのエクソソームにより分泌されているかについての検証を行った。

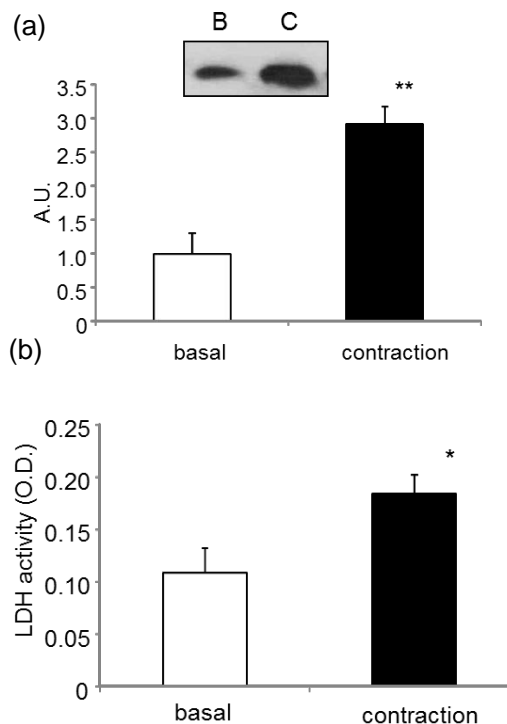


図4 激しい刺激条件下におけるチオレドキシンの分泌増加。C2C12細胞は50Vで6時間刺激した(n=4, \*; p<0.05)。

超遠心法でエクソソームを分画したところ、図5aに示されるようにエクソソーム画分の指標となる Alix のバンドが得られ、分画が正確に行われていることが示された。一方、チオレドキシンのエクソソーム画分には検出されず、それ以外の上清画分に観察された。これらの結果は、チオレドキシンのエクソソームとは別の経路で分泌されていることを示す。また、以前の報告にメチルアミン処理がチオレドキシンの分泌を阻害するとの報告があることから、メチルアミン存在下でチオレドキシンの分泌が阻害されるかの検証を行ったが、分泌の阻害は見られなかった (図5b)。従って、チオレドキシンの分泌は、これまで知られている経路とは全く別の経路を通して分泌されていることが示唆される。チオレドキシンの分泌は、他の細胞においてもその分泌メカニズムは明らかにならず、骨格筋に関しても新規の経路で分泌されている可能性がある。

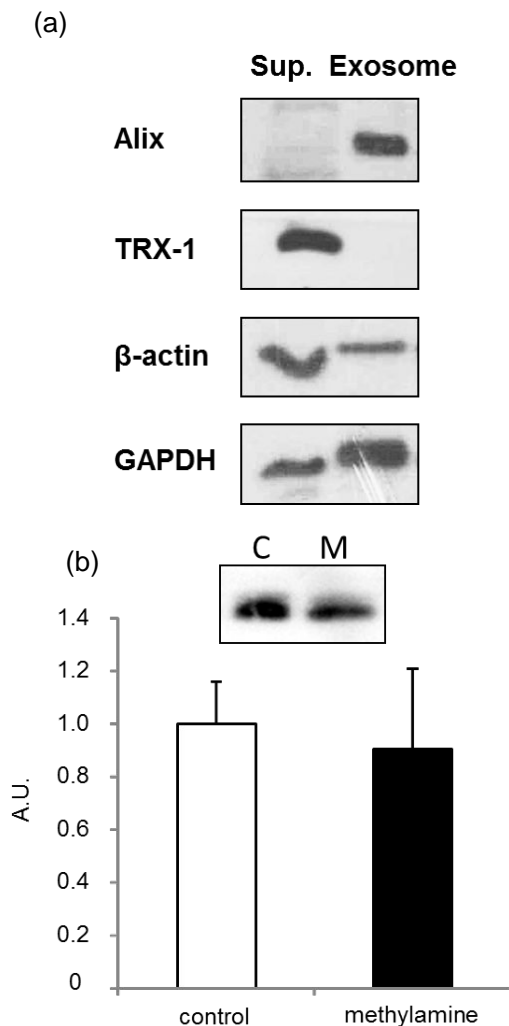


図5 チオレドキシンの分泌経路  
 (a)各画分におけるチオレドキシンの。エクソソーム画分ではチオレドキシンは検出されなかった。  
 (b)メチルアミン存在下でのチオレドキシンの分泌 (n=4)。メチルアミンはチオレドキシンの分泌に影響しなかった。  
 Sup; 上清画分 Exosome; エクソソーム画分

## 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 14件)

Macrophage migration inhibitory factor diminishes muscle glucose transport induced by insulin and AICAR in a muscle type-dependent manner, Miyatake S, Manabe Y, Inagaki A, Furuichi Y, Takagi M, Taoka M, Isobe T, Hirota K, Fujii NL., *Biochem Biophys Res Commun*, 444, 496-501, 2014 doi: 10.1016

Manabe Y, Miyatake S, Takagi M. Myokines: Do they really exist?. *J.Phys.Fit.Sport.Med.*, 1(1) 51-58, 2012

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jp fsm/1/1/1\\_51/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jp fsm/1/1/1_51/_pdf)

Manabe Y, Miyatake S, Takagi M, Nakamura M, Okeda A, Nakano T, Hirshman MF, Goodyear LJ, Fujii NL. Characterization of an Acute Muscle Contraction Model using Cultured C2C12 Myotubes. *PLoS ONE*,7(12):e52592, 2012 doi: 10.1371/

糖尿病における運動とマイオカイン, 眞鍋康子, 藤井宣晴, *Diabetes Frontier*, 24, 174-179, 2013  
<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ai1diafd&vo=24&nu=2>

〔学会発表〕(計 17件)

マイオカイン研究のアプローチとその解析方法, 眞鍋康子, 2014年日本農芸化学学会, 東京, 2014年3月30日

骨格筋から分泌されるマイオカインの *in vivo* 機能スクリーニングシステムの構築 - ショウジョウバエ遺伝学の応用 -, 眞鍋康子, 片倉健悟, 山田健一郎, 古市泰郎, 坂井貴臣, 藤井宣晴, 第3回 TOBIRA 研究交流フォーラム, 東京, 2014年2月1日

An acute muscle contraction model using cultured C2C12 myotubes, Shouta Miyatake, Yasuko Manabe, Mayumi Takagi, Mio Nakamura, Ai Okeda, Taemi Nakano, Michael F. Hirshman, Laurie J. Goodyear, Nobuharu L. Fujii, 第65回日本細胞生物学会, 名古屋, 2013年6月19-21日

〔図書〕(計 3件)

糖尿病の分子標的と治療薬辞典, 眞鍋康子, 藤井宣晴, 第3章 筋肉, pp114-127, 春日雅人監修, 綿田裕孝, 松本道宏編集, 羊土社, 東京, 2013年6月

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/index.html>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

眞鍋 康子 (MANABE, Yasuko)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授  
 研究者番号: 60467412

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し