

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：33930

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560372

研究課題名(和文)骨格筋細胞はアディポネクチンを分泌して糖脂質代謝を亢進するか？

研究課題名(英文) Does skeletal muscle cell-derived adiponectin stimulate glycolipid metabolism?

研究代表者

後藤 勝正(山下勝正)(Goto, Katsumasa)

豊橋創造大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70239961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨格筋細胞がアディポネクチンを分泌するか検討すると共に、骨格筋細胞に発現するアディポネクチンの生理学的意義を明らかにすることを目的とした。マウス筋芽細胞由来C2C12細胞を用いて、アディポネクチンあるいはアディポネクチン受容体1(AdipoR1)をそれぞれ単独あるいは同時に発現を抑制することで、筋細胞への分化の様相を観察した。アディポネクチンあるいはAdipoR1の発現を抑制すると、筋分化が部分的に抑制された。したがって、骨格筋細胞に発現するアディポネクチンは、自己分泌あるいは傍分泌様に振る舞い、自己の細胞サイズ(筋肉量)の制御を介して、糖脂質代謝を調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is generally accepted that adiponectin is exclusively synthesized in and secretes from adipocyte, and stimulates glycolipid metabolism in skeletal muscle cells via circulating blood. Even though recent studies demonstrate the expression of adiponectin in skeletal muscle cells, there is no report regarding a physiological role of adiponectin that is expressed in skeletal muscle cells. The purpose of this study was to investigate the physiological role(s) of skeletal muscle cell-derived adiponectin in skeletal muscle differentiation. Knockdown of adiponectin and/or adiponectin receptor 1 suppressed myogenic differentiation, in part. Evidences of this study indicated skeletal muscle-derived adiponectin persist or stimulate myogenic differentiation to modulate its size in autocrine or paracrine manner. Skeletal muscle derived adiponectin may regulate glycolipid metabolism in skeletal muscle cells via modulating muscle mass.

研究分野：骨格筋可塑性

キーワード：骨格筋細胞 分化 アディポネクチン アディポネクチン受容体 自己分泌 傍分泌

1. 研究開始当初の背景

(1) メタボリックシンドロームは、肥満、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧などの動脈硬化性疾患の危険因子が同一個人に集積した状態であり、加齢性筋肉減弱症(サルコペニア)と並び、国内・国外を問わず現代社会において早急に対策確立が望まれる課題である。

(2) アディポネクチンはインスリン感受性や糖脂質利用促進作用を持つことから、善玉アディポカインである。脂肪蓄積、高脂肪食、運動不足などの生活習慣は、脂肪細胞でのアディポネクチンの産生・分泌を減少させて血中アディポネクチン濃度の低下を、習慣的な運動は、逆に脂肪量を減少させて血中濃度を増加させて、インスリン感受性をもたらすと考えられる。しかし、運動負荷の影響について統一見解はない。

(3) 脂肪蓄積に伴う血中アディポネクチン濃度低下の機序ならびに運動によるアディポネクチン分泌促進機序は不明であり、アディポネクチン分泌調節の解明は重要な研究テーマであると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 現代社会において大きな問題となっているメタボリックシンドローム発症の共通基盤として、内臓脂肪蓄積によって引き起こされる脂肪細胞由来のアディポカインの分泌異常が挙げられる。我々は、筋芽細胞、筋管細胞および骨格筋細胞にアディポネクチンが発現することを確認すると共に、筋芽細胞から筋管細胞への分化によりアディポネクチン発現量が増加すること、また骨格筋細胞に発現するアディポネクチンは筋肥大(骨格筋量の増大)に伴って増加することを見出した(Goto et al., PLoS ONE, 2013)。

(2) 骨格筋は人体最大の組織であることから、骨格筋細胞がアディポネクチンを分泌できれば、運動による抗メタボリックシンドローム効果に対して新たな説明が可能となる。しかし、骨格筋細胞が発現するアディポネクチンはこれまで確認されておらず、その生理機能も不明である。

(3) そこで本研究では、骨格筋細胞がアディポネクチンを分泌するか検討すると共に、骨格筋細胞に発現するアディポネクチンの生理学的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞はマウス筋芽細胞株 C2C12 を用いた。C2C12 筋芽細胞を増殖培地(D-MEM high glucose、10% fetal bovine serum)で24時間培養後(分化誘導前)に、siRNA(タカラバイオ社、滋賀)をLipofectamine® RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific、MA、米国)を

用いてトランスフェクションし、アディポネクチンおよびアディポネクチン受容体1のどちらか一方の遺伝子、あるいは両方の遺伝子のノックダウンを試みた。なお本研究では、siRNA 導入時間は24時間に設定した。siRNAのトランスフェクション24時間後、分化培地(D-MEM low glucose、2% horse serum)へ交換することによりC2C12細胞に筋管細胞への分化を誘導した。分化誘導1日後、3日後および5日後に細胞を回収し、分析サンプルとした。なお、siRNAの対照には、non-targeting RNA(タカラバイオ)を同様に処理したサンプルを用いた。

(2) 本研究で用いたsiRNAによるアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体1のノックダウン効率を、mRNAおよびタンパクの両レベルで評価した。サンプル中のmRNA発現量は、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ転写反応にて評価した。なお、内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を用い、GAPDHに対する各mRNA発現レベルの相対的発現量を評価した。

また、アディポネクチンおよびアディポネクチン受容体1タンパク発現量の評価は、ウエスタンブロット法を用いて行った。化学発光法で得られたシグナルは、内在性コントロールであるGAPDHに対する相対的発現量で示した。

(3) 倒立顕微鏡(CK40-F100、オリンパス、東京)を用いて、アディポネクチンおよびアディポネクチン受容体1の単独ノックダウンならびに両分子の同時ノックダウンがC2C12細胞の分化に及ぼす影響を形態的に評価した。ノックダウン前およびノックダウン後のC2C12細胞の分化レベルを、筋管細胞の形成および筋管細胞の直径について、直接倍率20倍あるいは40倍で継続的に観察・評価した。また、必要に応じて画像撮影を行った。

(4) さらに、各サンプル中の筋タンパク量(Bradford法)ならびに筋特異的タンパク質であるクレアチンキナーゼ(CK)活性値(外注:株式会社以外社LSIメディエンス)およびタンパク発現量(ウエスタンブロット法)を測定することで、筋分化に及ぼすアディポネクチンおよびアディポネクチン受容体1ノックダウンの影響を評価した。

(5) 全ての測定値は、平均±標準誤差(means ± SEM)で示し、グループ間の測定値の差の検定は、Student's *t*-testあるいは時間(ノックダウン後のサンプリング時間)と処置(siRNAによるノックダウン)を要因とする二元配置分散分析にて行った。二元配置分散分析にて有意差が認められた要因については、多重比較検定(Tukey-Kramer)を用いて、グループ間の比較を行った。有意水準は

p<0.05 とした。

4. 研究成果

(1) 未分化の C2C12 筋芽細胞において、アディポネクチンの発現が mRNA およびタンパクの両レベルで確認された。本研究で用いた RNA 干渉法により、アディポネクチン発現量は、mRNA レベルで約 60%、タンパクレベルで約 40%低下した (p<0.05)。

顕微鏡画像の解析より、アディポネクチンのノックダウンにより、筋管細胞の形成が抑制される傾向が観察された。筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴い、筋タンパク量は徐々に増加した。筋管細胞への分化直前にアディポネクチンをノックダウンすることで、筋タンパク量の増加が有意に抑制された (p<0.05)。このアディポネクチンノックダウンによる筋タンパク増加の抑制は、筋管細胞への分化誘導 3 日後に顕著に認められ、アディポネクチンノックダウンにより筋タンパク量が 10%抑制された。

(2) 未分化の C2C12 筋芽細胞において、アディポネクチン受容体 1 の発現が mRNA およびタンパクの両レベルで確認された。本研究で用いた RNA 干渉法により、アディポネクチン受容体 1 発現量は mRNA レベルで約 80%、タンパクレベルで約 60%低下することが確認された (p<0.05)。

顕微鏡画像の解析より、アディポネクチン受容体 1 ノックダウンにより、筋管細胞の形成が抑制される傾向が観察された。筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴う筋タンパク量の増加は、筋管細胞への分化直前にアディポネクチン受容体 1 をノックダウンすることで、有意に抑制された (p<0.05)。このアディポネクチン受容体 1 のノックダウンによる筋タンパク増加の抑制は、筋管細胞への分化誘導 1 日後および 5 日後に顕著に認められ、アディポネクチン受容体 1 ノックダウンにより筋タンパク量が分化誘導 1 日後で約 10%、5 日後で約 10%それぞれ抑制された。

アディポネクチン受容体 1 ノックダウン実験では、筋芽細胞から筋管細胞への分化を、筋特異的タンパク質の 1 つである CK 活性により評価した。一般に、CK 活性は CK タンパク発現量に比例して増加する。したがって、CK 活性が高いことは、分化がより進行していることを意味する。本研究では、non-targeting RNA をトランスフェクションした細胞では、分化誘導後、徐々に CK 活性の増加が観察された。しかし、アディポネクチン受容体 1 をノックダウンすると、CK 活性は抑制された (p<0.05)。アディポネクチン受容体 1 ノックダウンによる CK 活性の抑制は、分化誘導 3 日後で 35% (p<0.05)、5 日後で 45% (p<0.05)それぞれ認められた。

(3) 本研究では、2 種類の siRNA を同時にトランスフェクションすることで、アディポネ

クチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウンを試みた。2 種類の siRNA をトランスフェクションしたそれぞれの分子のノックダウン効率 (mRNA レベル) は、アディポネクチンで約 60% (p<0.05)、アディポネクチン受容体 1 で 85% (p<0.05)であった。これらのノックダウン効率は、それぞれの分子を単独でノックダウンした場合 (アディポネクチン: 約 60%、アディポネクチン受容体 1: 約 80%)と同程度であった。したがって、本研究で用いた 2 種類の siRNA を用いた 2 分子の同時ノックダウンによりアディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 は、問題なくノックダウンができたと考えた。

顕微鏡画像の解析より、アディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウンにより、筋管細胞の形成が抑制される傾向が観察された。この抑制傾向は、両分子をそれぞれ単独でノックダウンした際と同定であった。筋芽細胞から筋管細胞への分化に伴う筋タンパク量の増加は、筋管細胞への分化直前にアディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 を同時にノックダウンすることで、有意に抑制された (p<0.05)。このアディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウンによる筋タンパク増加の抑制は、筋管細胞への分化誘導 3 日後に顕著に認められ、分化誘導 3 日後で 10%の抑制が観察された。この抑制傾向は、両分子をそれぞれ単独でノックダウンした際と同定であった。

アディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウン実験では、筋芽細胞から筋管細胞への分化を、CK 発現量から評価した。前述した様に、CK 発現量の増加は筋管細胞への分化レベルの指標となる。本研究では、non-targeting RNA をトランスフェクションした細胞では、分化誘導後、徐々に CK 発現量の増加が観察された。アディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウンにより、CK 発現量の増加が有意に抑制された (p<0.05)。このアディポネクチンとアディポネクチン受容体 1 の同時ノックダウンによる CK 発現量増加の抑制は、筋管細胞への分化誘導 5 日後に顕著に認められ、約 25%の発現抑制が認められた。

(4) 以上の結果より、アディポネクチンあるいはアディポネクチン受容体 1 を単独でノックダウンすると、筋管細胞への分化が抑制された。さらに、アディポネクチンおよびアディポネクチン受容体 1 の 2 分子を同時にノックダウンしたところ、両分子を単独ノックダウンした際に認められたのと同程度の筋管細胞への分化の抑制が観察された。したがって、筋芽細胞に発現したアディポネクチンは、オートクリンあるいはパラクリン様に振る舞い、筋芽細胞に発現するアディポネクチン受容体 1 を介して筋管細胞への分化を維持あるいは促進する作用を持つことが明らかに

なった。

これまでアディポネクチンは脂肪細胞で排他的に産生され、血液循環を介して標的組織である骨格筋や肝臓に作用すると考えられてきたが、標的組織である骨格筋細胞自身がアディポネクチンを産生・分泌して自己のサイズ(骨格筋量)を制御することで、糖脂質代謝を調節していることが示唆された。

<引用文献>

Goto, A., Ohno, Y., Ikuta, A., Suzuki, M., Ohira, T., Egawa, T., Nakai, A., Sugiura, T., Yoshioka, T., Ohira, Y., and Goto, K.: Up-regulation of adiponectin expression in antigravitational soleus muscle in response to unloading followed by reloading, and functional overloading in mice. PLoS ONE, 8: e81929, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0081929

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Ohno, Yoshitaka, Sugiura, Takao, Ohira, Yoshinobu, Yoshioka, Toshitada, Goto, Katsumasa, Loading-associated expression of TRIM72 and caveolin-3 in antigravitational soleus muscle in mice, *Physiological Reports*, 2 巻, e12259, 2014, 査読有

doi: 10.14814/phy2.12259

Fujiya, Hiroto, Ogura, Yuji, Ohno, Yoshitaka, Goto, Ayumi, Nakamura, Ayane, Ohashi, Kazuya, Uematsu, Daiki, Aoki, Haruhito, Musha, Haruki, Goto, Katsumasa, Microcurrent electrical stimulation facilitates regeneration of injured skeletal muscle in mice, *Journal of Sports Sciences and Medicine*, 14 巻, 297-303, 2015, 査読有

Egawa, Tatsuro, Goto, Ayumi, Ohno, Yoshitaka, Yokoyama, Shingo, Ikuta, Akihiro, Suzuki, Miho, Sugiura, Takao, Ohira, Yoshinobu, Yoshioka, Toshitada, Hayashi, Tatsuya, Goto, Katsumasa, Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 309 巻, E651-E662, 2015, 査読有

doi: 10.1152/ajpendo.00165.2015

Ohno, Yoshitaka, Egawa, Tatsuro, Yokoyama, Shingo, Nakai, Akira, Sugiura, Takao, Ohira, Yoshinobu, Yoshioka, Toshitada, Goto, Katsumasa, Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of

mice, *Acta Physiologica*, 215 巻, 191-203, 2015, 査読有

doi: 10.1111/apha.12600

Ohira, Takashi, Kawano, Fuminori, Ohira, Tomotaka, Goto, Katsumasa, Ohira, Yoshinobu, Responses of skeletal muscles to gravitational unloading and/or reloading, *Journal of Physiological Sciences*, 65 巻, 293-310, 2015, 査読有

doi: 10.1007/s12576-015-0375-6

Goto, Ayumi, Egawa, Tatsuro, Sakon, Ichika, Oshima, Rieko, Ito, Kanata, Serizawa, Yasuhiro, Sekine, Keiichi, Tsuda, Satoshi, Goto, Katsumasa, Hayashi, Tatsuya, Heat stress acutely activates insulin-independent glucose transport and 5'-AMP-activated protein kinase prior to an increase in HSP72 in rat skeletal muscle, *Physiological Reports*, 3 巻, e12601, 2015, 査読有

doi: 10.14814/phy2.12601.

後藤 勝正, 骨格筋細胞由来アディポネクチンとその生理学的意義, *細胞*, 47 巻, 517-520, 2015, 査読有

[学会発表](計48件)

伊藤 理香, 横山 真吾, 大野 善隆, 江川 達郎, 鈴木 美穂, 生田 旭洋, 杉浦 崇夫, 大平 充宣, 吉岡 利忠, 後藤 勝正: 骨格筋細胞由来アディポネクチンが筋細胞の分化に及ぼす影響, 第 69 回日本体力医学会大会, 2014 年 9 月 19 日 ~ 2014 年 9 月 21 日, 長崎大学文教キャンパス(長崎県長崎市)

伊藤 理香, 杉浦 崇夫, 吉岡 利忠, 後藤 勝正, アディポネクチン受容体欠損は骨格筋細胞分化を抑制する, 第 23 回日本運動生理学会大会, 2015 年 7 月 25 日 ~ 2015 年 7 月 26 日, 日本体育大学東京世田谷キャンパス(東京都世田谷区)

伊藤 理香, 横山 真吾, 大野 善隆, 江川 達郎, 宅和 美穂, 生田 旭洋, 杉浦 崇夫, 大平 充宣, 吉岡 利忠, 後藤 勝正, 骨格筋細胞の分化におけるアディポネクチン - アディポネクチン受容体 1 シグナルの関与, 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年 9 月 18 日 ~ 2015 年 9 月 20 日, 和歌山県民文化会館・ホテルアパローム紀の国(和歌山県和歌山市)

後藤 勝正, 骨格筋細胞に発現する adiponectin についての一考察, 第 4 回骨格筋生物学研究会, 2016 年 3 月 4 日 ~ 2016 年 3 月 6 日, 松本大学(長野県松本市)

[その他]

ホームページ等

豊橋創造大学大学院健康科学研究科生体機能学分野・豊橋創造大学保健医療学部 生理学研究室業績ページ

http://www.sozo.ac.jp/professor/goto_katsumasa/publications.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 勝正 (山下勝正) (GOTO, Katsumasa)
豊橋創造大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70239961

(2) 連携研究者

大野 善隆 (OHNO, Yoshitaka)
豊橋創造大学・保健医療学部・講師
研究者番号：80440808

横山 真吾 (YOKOYAMA, Shingo)
豊橋創造大学・保健医療学部・助教
研究者番号：30706859

江川 達郎 (EGAWA, Tatsuro)
豊橋創造大学・健康科学研究科・学振特別
研究員 (PD)
研究者番号：00722331