

令和元年6月10日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08077

研究課題名(和文) 骨格筋収縮依存的な分泌タンパク質による免疫機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of contraction-dependent myokines on the immune system

研究代表者

根建 拓 (Nedachi, Taku)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：50375200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：運動は骨格筋以外の組織に対しても影響を及ぼすが、そのメカニズムの一部として、運動による骨格筋分泌タンパク質(マイオカイン)の制御が注目を集めている。本研究では、運動時に生じる免疫機能変動に着目し、これを運動依存性マイオカイン産生の観点から明らかにすることを目的とした。本研究では、運動依存性マイオカインの網羅的探索を実施、運動によって減少するマイオカインとしてCCL5及びCXCL10を発見した。これらマイオカインの発現抑制を動物走行モデルで確認した後、産生制御メカニズムおよび生理作用を解明した。以上、CCL5及びCXCL10は、運動依存的な免疫機能制御を担う新規マイオカインであることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規同定されたCCL5については、運動によって血中濃度が変動することが明らかとなったため、運動マーカーとして使用できる可能性が高い。また、人為的にCCL5あるいはCXCL10発現を制御することで、運動依存的な免疫制御の一部を代替できる可能性もあり、これらのマイオカイン自体あるいは産生制御機構をターゲットとした創薬など多くの応用研究の展開が可能になったと考えられる。さらに、本研究によって運動依存性マイオカインに関する研究ストラテジーが確立されたため、今後は運動依存的な他の生理変化にも本ストラテジーを適応できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been widely recognized that skeletal muscle is an endocrine organ, producing numerous types of secreted proteins referred to as myokines that potentially transduce signals to other tissues/organs. The main aim of the present study was to identify novel myokines by our established method, which is composed of mouse C2C12 myotubes and an electrical pulse stimulator. Our initial screening suggested CCL5 and CXCL10 as a candidate novel myokine whose expression was reduced by skeletal muscle cell contraction. We further confirmed this reduction by animal experiments. Furthermore, we also analyzed the intracellular signaling pathways that are responsible for contraction-dependent CCL5 and CXCL10 reduction. Together with the known physiological functions of CCL5 and CXCL10, our results suggest that the reduction of these myokines may be involved in exercise-dependent regulation of the immune system.

研究分野：筋生物学

キーワード：骨格筋 運動 マイオカイン 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内外の研究動向

運動は、骨格筋での代謝を直接亢進させるとともに筋発達を促進して体全体での基礎代謝量を上昇させることが広く知られている。一方、近年、運動は骨格筋以外の組織に対しても影響を及ぼすことが明らかにされてきた。例えば、運動による免疫機能の調節、脂肪組織における脂肪分解の促進、脳神経系における神経新生の促進などが挙げられる。2003年、Pedersenらは骨格筋細胞からインターロイキン6(IL-6)が分泌されることを報告し、骨格筋で生じる収縮シグナルは、IL-6のような運動依存性分泌タンパク質(運動依存性マイオカイン)を仲介することで、他細胞に伝達されるというモデルを提唱した(Pedersen et al., J Muscle Res. Cell Motil. 24:113-119 (2003))。一方、運動依存性分泌タンパク質の種類、発現制御機構、生理作用については不明な点が多く残っていた。

これまでの研究

近年、我々は、全く新しい研究系を用いて、運動因子を多数同定することに成功した。本研究に重要な役割を担ったのは、我々が世界に先駆けて開発した高度発達型培養筋細胞系および、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* 擬似的運動刺激系であった(Nedachi et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 295(5): E1191-E1204 (2008))。本系は、動物走行モデルと同様の生理変化を示す特性に加え、骨格筋細胞のみから構成される系であるため、骨格筋由来の分泌タンパク質を高精度に解析する目的において極めて強力な研究ツールとなる。申請者は、この *in vitro* 擬似的運動刺激系とトランスクリプトーム解析を組み合わせ、CXCL1/KC および CXCL5/LIX など複数のケモカインが骨格筋収縮によって発現増加することを見出し、さらに、このケモカイン産生を制御する複数の細胞内メカニズムおよび運動依存的に産生されたケモカインの生理的意義を明らかにしている(Nedachi et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 295(5): E1191-E1204 (2008), Nedachi et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 297(4): E866-E878 (2009), Farmawati et al., Endocrine J 60(2):137-47 (2013))。これらの結果および他の研究成果を併せると、「適切な運動は、骨格筋からのケモカインやサイトカイン産生上昇を介して免疫系細胞を誘引するとともに活性を調節する」という運動依存的な免疫機能制御の一部を説明する作業仮説を考えることができた。

2. 研究の目的

強度や長時間の運動は免疫機能低下を引き起こすことが知られている。例えば、激運動時に血液中における一過的なNK細胞の数と機能が観察されるが、運動後には、逆にその数と機能は基底値以下となり、結果的に免疫機能低下が生じる。しかし、なぜ運動強度や時間に依存して正反対の免疫機能制御が生じるかは不明であり、運動生理学上の重要な未解決課題のひとつとして残されている。本研究では、申請者が開発した *in vitro* 擬似的運動刺激系を駆使して、この運動時に生じる免疫機能変動の分子基盤を運動依存性マイオカイン産生の観点から明らかにし、さらに、その制御方法を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究計画では、電気パルス刺激(EPS)を負荷したあるいは負荷していないC2C12筋管細胞の培養上清について、抗体アレイを用いた免疫機能変動に重要と考えられる運動依存性マイオカインの網羅的同定を行った。同定した運動依存性マイオカインについては、ELISAにて確認後、定量PCRによって各マイオカインの遺伝子発現変化を評価した。また、同定した運動依存性マイオカインは、トレッドミルあるいはランニングホイールを用いたマウス走行モデルにて、個体レベルでの運動依存的な発現変動を確認した。さらに、同定した運動依存性マイオカインの発現メカニズムについて、生化学的・分子生物学的手法を用いた解析を行った。

4. 研究成果

新規運動依存性マイオカインの探索および検証

まず、骨格筋細胞C2C12に対してEPSを負荷し、24時間の収縮誘導を行った後に培養上清を回収、抗体アレイ法によるマイオカイン分泌量の変化を測定した結果、運動によって chemokine (C-C motif) ligand 5 (CCL5), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10), macrophage-colony

stimulating factor (M-CSF) and Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2/MIP-2)の分泌変動が観察された。特に CCL5/RANTES および CXCL10/IP10 は、これまでに報告の少ない、運動によって分泌「減少」するタイプのマイオカインであった。次に、これらマイオカインの分泌変動を定量的に評価するため、ELISA による解析を実施した。その結果、収縮刺激によって C2C12 筋管細胞から分泌される CCL5 は約 50%、CXCL10 は約 75% に減少することが明らかとなった。さらに定量 PCR 法により、これらの変化は遺伝子発現レベルで生じていることも明らかとなった (図 1)。

動物走行モデルを用いた運動による骨格筋内マイオカイン発現量の変動

次に、動物走行モデルを用いて、血中および骨格筋内の中のマイオカイン量あるいは遺伝子発現量を測定した。CCL5 については、ランニングホイールによる自発走行によって、主に速筋における遺伝子発現量が減少、血中濃度も低下することが明らかとなった。一方、CXCL10 については、トレッドミルによる強制走行実験において、血中濃度に有意な差は見られなかったものの、遅筋を中心に遺伝子発現量が減少することが明らかとなった。以上、細胞系で見られた収縮依存的な CCL5 および CXCL10 減少は動物モデルでも観察できることが示された。

新規運動依存的なマイオカイン発現制御メカニズムの解明

最後に、骨格筋収縮に伴うどのようなメカニズムによって、CCL5 あるいは CXCL10 の発現が減少するのかを調べた。まず、C2C12 細胞において収縮依存的に活性化するシグナル伝達経路をウエスタンブロット法を用いて調べたところ、既報通り、Ca²⁺ 依存性シグナル、AMPK およびストレス応答性 MAPK の活性化が確認された。そこで、両マイオカインの発現減少に關与するシグナルの同定を試みた結果、CCL5 発現減少には AMPK 活性化が、CXCL10 発現減少には p38 MAPK 活性化が重要であることが分かった (図 2)。

まとめ

本研究によって、運動によって分泌減少する新規マイオカイン CCL5 および CXCL10 を新規同定することに成功した。これまでに報告されているこれらのマイオカインの性質から、運動依存的な免疫制御に關与している可能性は高いと考えられる。さらに、CXCL10 分泌減少の生理的意義については解析を進めており、この運動による CXCL10 減少は、血管新生を促進することも明らかとした。これらのマイオカイン抑制は、トレッドミルあるいはランニングホイールを用いた動物個体を用いた走行実験でも確認することができた。興味深いことに、運動依存的な CCL5 遺伝子発現低下は速筋を中心に観察されたのに対して、CXCL10 遺伝子発現低下は遅筋を中心に観察された。さらに、運動によって血中 CCL5 濃度が有意に低下することも明らかとなった。併せると、C2C12 細胞系で観察された電気パルス刺激依存的な CCL5 および CXCL10 分泌

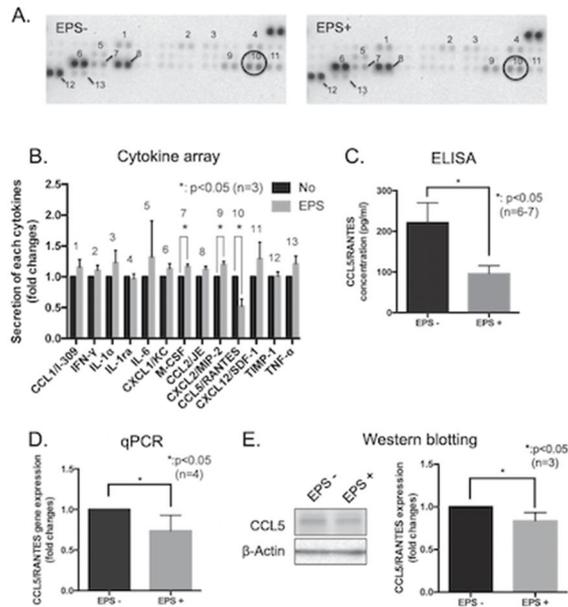


図 1 抗体アレイ法による新規運動依存的なマイオカインの同定 (Ishiiuchi Y, et al. (2018) Cytokine 108: 17-23)

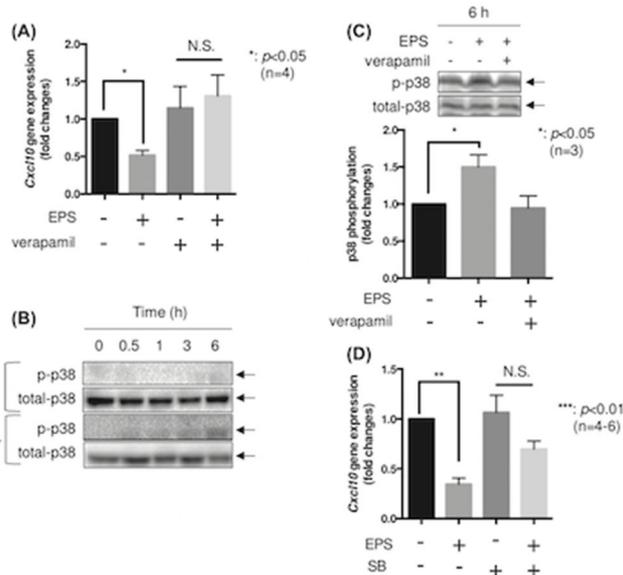


図 2 収縮依存的な CXCL10 発現減少を制御する分子メカニズムの探索 (Ishiiuchi Y, et al. (2018) Biosci Biotech Biochem 82(1):97-105)

減少は、個体レベルでも運動依存的な骨格筋内遺伝子発現変化として観察される生理現象であることが考えられた。

本研究によって、CCL5 や CXCL10 といった運動抑制性マイオカインを新規に発見、さらに、報告されているこれらケモカインの性質を併せ、運動依存的な免疫機能調節機構の一端が明らかとなったと考えられる。今後、これらマイオカインネットワークの研究をさらに進めることで、運動依存的な免疫機能調節をはじめとする全身への運動効果伝達メカニズムがさらに明らかになることが期待される。さらに、本研究によって、新規運動依存性マイオカインの研究ストラテジーを提示することもできたため、本分野に一定の貢献があったと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Ishiuchi Y, Sato H, Komatsu N, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T. (2018) Identification of CCL5/RANTES as a novel contraction-reducible myokine in mouse skeletal muscle. *Cytokine* 108: 17-23 査読有
- (2) Ishiuchi Y, Sato H, Tsujimura K, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T. (2018) Skeletal muscle cell contraction reduces a novel myokine, chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10): Potential roles in exercise-regulated angiogenesis. *Biosci Biotech Biochem* 82(1):97-105. 査読有
- (3) Ariga M, Yoneyama Y, Fukushima T, Ishiuchi Y, Ishii T, Sato H, Hakuno F, Nedachi T, Takahashi SI. (2017) Glucose deprivation attenuates sortilin levels in skeletal muscle cells. *Endocr J.* 64(3):255-268. 査読有
- (4) Kawashima KI, Ishiuchi Y, Konnai M, Komatsu S, Sato H, Kawaguchi H, Miyanishi N, Lamartine J, Nishihara M, Nedachi T (2016) Glucose deprivation regulates the progranulin-sortilin axis in PC12 cells. *FEBS Open Bio* 7: 149-159 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) Yuri Ishiuchi, Kei Sato, Natsuki Fujinuma, Marie Miegeli, Taku Nedachi (2018) Temperature-dependent secretome profiling in C2C12 myotubes: potential roles of CXCL10 reduction by heat-dependent stress. 2018 ASCB | EMBO Annual Meeting (国際学会)
- (2) 根建 拓「運動によって制御される骨格筋分泌因子群～マイオカインと細胞外小胞～」第1回筋スマート社会コンソーシアム(大阪) 2018年9月7日
- (3) 石内友里、根建 拓「運動依存的な新規マイオカインの分泌変化及び発現制御メカニズム」第4回日本筋学会(倉敷) 2018年8月10日, 11日
- (4) Ishiuchi Y, Sato H, Matsuwaki K, Yamanouchi K, Kawaguchi H, Nishihara M, Nedachi T. (2016) Identification of CXCL10 as contraction-reduced myokine in mouse skeletal muscle. 2016 EMBO Annual Meeting
- (5) Sato H, Ishiuchi Y, Kawaguchi H, Nedachi T. (2016) Mechanism of contraction-dependent CCL5 reduction in C2C12 myotubes. 2016 EMBO Annual Meeting

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 根建 拓、石内友里 (2019) 運動依存性マイオカインと代謝機能「骨格筋研究を核とした筋スマート社会」株式会社 シーエムシー・リサーチ (印刷中)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.toyo.ac.jp/~nedachi/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川口 英夫
ローマ字氏名：Hideo Kawaguchi
所属研究機関名：東洋大学
部局名：生命科学部
職名：教授
研究者番号(8桁): 50416921

研究分担者氏名：加藤 和則
ローマ字氏名：Kazunori Kato
所属研究機関名：東洋大学
部局名：理工学部
職名：教授
研究者番号(8桁): 60233780

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。