

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06442

研究課題名(和文) 運動による骨格筋由来エクソソームの制御および機能変化の解明

研究課題名(英文) Exercise-dependent regulation of skeletal muscle-derived exosomes

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨格筋より分泌されるエクソソームが運動によってどのような制御を受けているか明らかにすることを目的とした。まず、電気刺激(EPS)をC2C12筋管細胞に負荷し、分泌されるエクソソームの量的、質的变化を精査した結果、いくつかのmiRNA内包量がEPS刺激によって変動していることがわかった。これらのmiRNAのうち複数は筋分化関連遺伝子を標的としており、実際、EPS処理を行った筋管細胞から分泌されたエクソソームは、筋芽細胞の分化を調節していた。すなわち、骨格筋は収縮することにより、放出されるエクソソームの内包miRNAプロファイルを変化させ、筋分化を制御している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

適切な運動を行うことは、骨格筋の量や質を改善するなど多くの利点があるが、適切な運動がどうやって健康を促進するのかについてはまだ不明な点が多く残っている。今回の研究では、骨格筋から放出される「細胞外小胞」という小分子の性質が運動によって変化し、この性質の変化によって骨格筋の量が調節されているのではないかと新しい結果を得た。骨格筋の量は加齢によって減少することが分かっており、これが加齢にともなう転倒しやすくなる原因のひとつではないかと考えられている。本研究をさらに進めることで、加齢にともなう骨格筋量減少を防ぐ方法の開発につながっていくものと期待される。

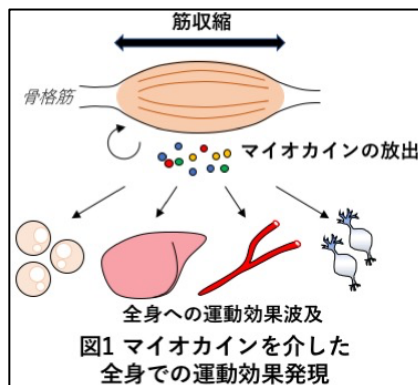
研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to focus on exosomes, which are a type of EVs, and to clarify how exosomes secreted by skeletal muscle are regulated by exercise. Initially, we applied electrical pulse stimulation (EPS) to C2C12 myotubes to induce cell contraction, and exosomes secreted into the culture supernatant were analyzed. RNA-seq analysis revealed numerous types of miRNAs are present in exosomes, and some miRNAs are fluctuated by EPS. Some of these miRNAs have been reported to target muscle differentiation-related genes, suggesting that exercise-dependently released exosomes may be involved in muscle differentiation. In fact, we found that exosomes secreted from EPS-treated C2C12 myotube cells regulate the expression of differentiation-related genes in myoblasts. Overall, it can be speculated that exercise promotes qualitative changes in released exosomes from skeletal muscles, especially changes in the encapsulated miRNA profile, thereby controlling muscle differentiation.

研究分野：細胞生物学

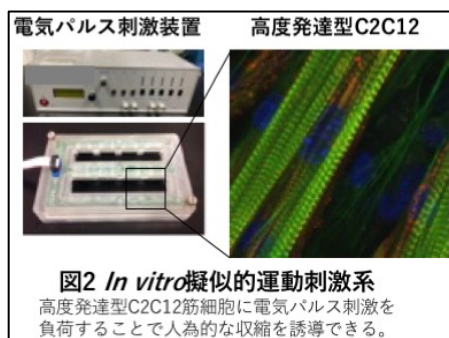
キーワード：骨格筋 エクソソーム miRNA 運動

### 1. 研究開始当初の背景

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。一方、運動効果は骨格筋のみならず他の組織/器官においても発現する。例えば、運動によって、脂肪組織における脂肪分解の促進、近傍血管系の制御、脳神経系における神経新生の促進、皮膚組織の機能制御などが生じる。2000年、Pedersenらは、運動依存的に血中インターロイキン6 (IL-6)量および骨格筋内IL-6 mRNAが増加することを報告し、骨格筋で生じる収縮シグナルは、IL-6のような骨格筋に由来するタンパク質やペプチド (マイオカイン) を仲介することで、他組織や器官に伝達されるという仮説を提唱した<sup>1)</sup> (図1)。



他方、報告者は、全く新しい研究系を用いて、運動依存的に分泌変動するマイオカインを多数同定することに成功してきた<sup>2-5)</sup>。本研究に重要な役割を担ったのは、報告者らが世界に先駆けて開発した、培養骨格筋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 *in vitro* 擬似的運動刺激系である (図2)。



本系は、動物モデルと同様の筋収縮依存的な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、骨格筋由来分泌因子のみを高精度に解析する目的において極めて強力なツールとなる。報告者は、この *in vitro* 擬似的運動刺激系を用いて、IL-6 の他に CXCL1/KC、CXCL5/LIX、CXCL10/IP-10、CCL5/RANTES など多数のマイオカインが骨格筋収縮によって分泌制御されることを証明し、さらに、この産生を制御する複数の細胞内メカニズムや、運動依存的に制御されるマイオカインの生理的意義を明らかにしてきた<sup>2-5)</sup>。

一方、細胞からはタンパク質のみならず、細胞外分泌小胞 (Extracellular vesicles; EVs) なども分泌される。このような EVs の中で、特にエクソソーム<sup>\*</sup>は、近接する、あるいは遠距離に存在する細胞に運搬され、エンドサイトーシスあるいは細胞膜との直接融合により、小胞含有物 (miRNA やタンパク質など) を輸送する重要な細胞間コミュニケーション因子であることが分かってきた。しかし、骨格筋から直接分泌されるエクソソーム (筋エクソソーム) が、運動依存的な他組織/器官の生理変化に関与しているかは全く不明である。 (\*厳密には Microvesicles を含む)

(参考文献) (1) Pedersen *et al.*, *J Muscle Res Cell Motil.* 24:113-9, 2003, (2) Nedachi *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 295:E1191-204., 2008, (3) Nedachi *et al.*, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297:E866-78., 2009, (4) Ishiuchi *et al.*, *Biosci Biotechnol Biochem.* 82:97-105., 2018, (5) Ishiuchi *et al.*, *Cytokine.* 108:17-23., 2018

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、運動による筋エクソソームの制御および機能変化を明らかにすること

であった。すなわち、筋収縮に応答した筋エクソソームの形態および量的・質的な変化を解明、さらに運動依存的な筋エクソソームの機能変化を明らかにすることで、運動による筋エクソソームの性質変化を総合的に理解することを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 筋収縮に応答した筋エクソソームの形態および量的・質的な変化

*In vitro* 擬似的運動を負荷した、あるいは負荷していない C2C12 筋管細胞の培養上清より、超遠心法を用いてエクソソーム画分を精製、透過型電子顕微鏡による形態観察、動的散乱法 (Dynamic Light Scattering; DLS) による粒子径分布・粒子量解析に供し、*in vitro* 擬似運動の効果を確認した。次に、精製した筋エクソソームから total RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて含有される miRNA をはじめとする核酸の網羅的解析を行った。解析結果は deep analysis に供し、筋収縮によって変化が観察された miRNA の標的 mRNA 予測、および GO 解析、pathway 解析などを実施した。

#### (2) 筋エクソソームの融合効率および生理的意義の解明

筋収縮を行った、あるいは行っていない筋細胞に由来するエクソソームを精製、蛍光標識し、筋芽細胞に添加することで融合効率を解析する。融合効率は、共焦点顕微鏡を用いた観察により評価した。次に、筋エクソソームを各種細胞に添加し、その生理的意義を解析した。筋細胞については、筋芽細胞の増殖および分化などの解析を行った。

さらに、観察された筋エクソソーム依存的な各種細胞の生理変化がなぜ生じるのかを明らかにするため、運動依存的に変動する筋エクソソーム miRNA が筋芽細胞に移送されるとの仮説のもと、miRNA あるいはアンチセンス miRNA を C2C12 細胞に導入、生理変化を解析した。

#### (3) 運動によるマウス血中エクソソーム動態の解析

マウスに強制走行を負荷、あるいは自発走行を行わせた後、血清からエクソソームを精製、*in vitro* 擬似的運動刺激で差が見られた筋エクソソームの含有 miRNA の変化が血液サンプルに反映されるか調べた。

### 4. 研究成果

まず、骨格筋細胞 C2C12 培養上清から超遠心法を用いてエクソソーム (骨格筋エクソソーム) を精製し、TEM, DLS, WB など多面的な方法で精製度確認を行った (Fig. 3)。エクソソーム放出動態について収縮刺激の効果を解析したところ、収縮によって放出エクソソーム径が変化する可能性を見出した。

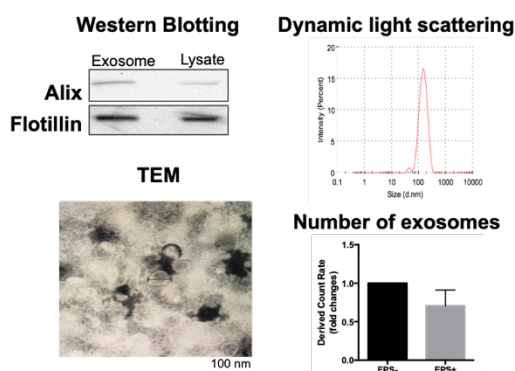


Fig. 3 Purification of exosomes derived from C2C12 myotubes

次に、次世代シーケンサーによる精製エク

ソソーム内包 miRNA を解析した結果、収縮刺激依存的に含有量が減少する miRNA を 5 種類同定することに成功、特に収縮刺激後に骨格筋エクソソームに含まれる miR-222-3p 量は顕著に減少することが明らかとなった (Fig. 4)。そこで、これら収縮依存的に内

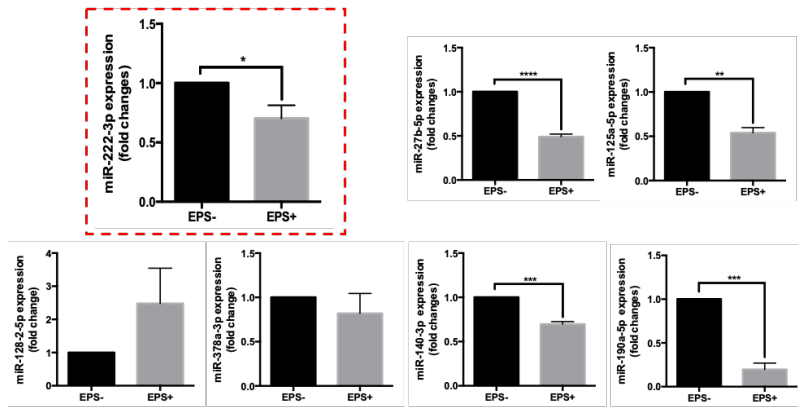


Fig. 4 Exosomal miRNA profiles in C2C12 myotubes

包量が変動するエクソソーム miRNA の生理的意義を検討することとした。まず、筋エクソソームが筋芽細胞に伝達されることを細胞生物学的手法によって確認した後 (Fig. 5)、EPS 処理あるいは無処理の培養上清より精製したエクソソーム (Exo- EPS+, Exo-EPS-) の筋芽細胞における生理的意義を比較解析した。その結果、Exo-EPS+ 添加群では、Exo-EPS- 添加群と比較して、マイオスタチン (MSTN) 遺伝子発現量が 2 倍以上上昇し、さらに MyoD 遺伝子発現量が 0.8 倍程度まで減少することが明らかとなった。すなわち、運動依存的に放出するエクソソームは、筋芽細胞の分化を抑制することが示唆された。さらに、これら一連の変化が、エクソソームが内包する miRNA の量的変化に起因するのかを確認するため、C2C12 筋芽細胞へ miR-222-3p inhibitor を導入し、擬似的に運動依存的なエクソソーム伝達による miR-222-3p が減少する状態を再現した。その後、各種筋分化マーカーの発現を観察した結果、miR-222-3p 量の減少は、筋分化を抑制することが示された (Fig. 6)。

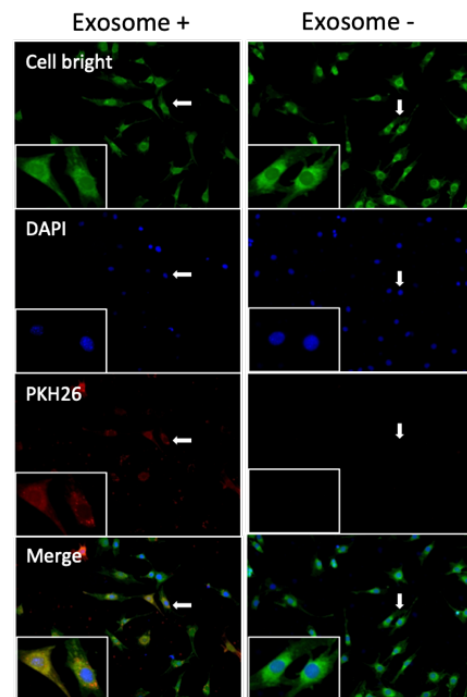


Fig. 5 Internilization of C2C12 myotube-derived exosomes into C2C12 myoblasts

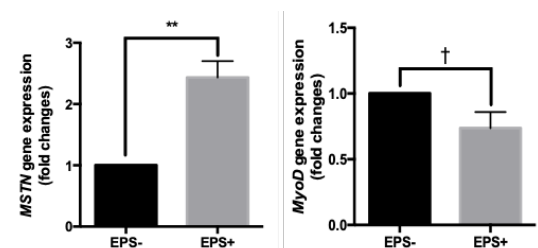


Fig. 6 Exo-EPS+ enhances MSTN expression

最後に、C2C12 細胞において観察された運動依存的な筋エクソソーム内包 miR-222-3p の変化が動物個体の血中エクソソーム動態に反映されるか確認した。C57BL/6J マウス (雄、8 週齢) を Running Wheel を用いた自由走行、あるいは Treadmill を用いた強制走行に供し、血清からエクソソームを精製後、エクソソーム内包 miRNA の解析を行ったところ、血中エクソソーム内包 miR-222-3p について運動依存的な変動は観察されなかったことが明らかとなった (data not shown)。

一連の結果より、運動依存的に質的变化を生じる筋エクソソームは、運動による筋分化を負に調節している可能性が示唆された。一般に骨格筋への運動負荷は、筋肥大のトリガーになることが知られており、これは運動による血中 MSTN 濃度の減少が一因とされている。一方、本研究の知見からは、運動は同時に筋エクソソーム内の miR222-3p 量を調節することで筋芽細胞の MSTN 遺伝子発現を上昇させ、過剰な骨格筋肥大を抑制するメカニズムを同時に稼働していることが明らかとなった (Fig. 7)。

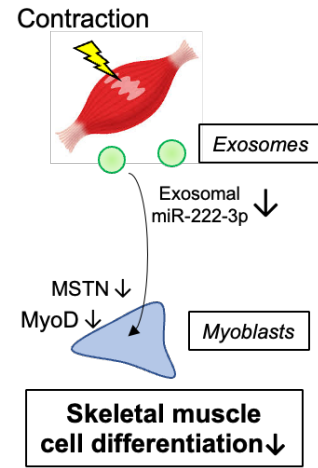


Fig. 7 Working hypothesis

本研究計画では筋エクソソームに着目した研究を展開し、骨格筋から直接放出されるエクソソームの放出動態及び内包 miRNA が収縮刺激依存的に変化することを明らかにした。また、筋エクソソームの生理作用も収縮刺激依存的に変化する可能性を示した。今後、さらに筋エクソソームの解析が進むことで筋萎縮への新たな治療ターゲットの発見や、骨格筋と全身との情報伝達のさらなるメカニズム解明に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ishiuchi-Sato Yuri、Hiraiwa Erika、Shinozaki Ayaka、Nedachi Taku	4. 巻 84
2. 論文標題 The effects of glucose and fatty acids on CXCL10 expression in skeletal muscle cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2448 ~ 2457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1814127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishiuchi-Sato Yuri、Nedachi Taku	4. 巻 68
2. 論文標題 Possible involvement of CXC motif chemokine ligand 10 in exercise-induced collagen production of mouse dermal fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1359 ~ 1365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ21-0275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimoda Ayumu、Tanabe Takemi、Sato Tsubasa、Nedachi Taku	4. 巻 85
2. 論文標題 Hydrogen peroxide induces progranulin expression to control neurite outgrowth in HT22 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2103 ~ 2112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤（石内）友里、根建 拓
2. 発表標題 運動制御性マイオカインを介した皮膚機能制御の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 飛翔、下田 歩夢、宮西伸光、根建 拓
2. 発表標題 マウスHT22細胞における酸化ストレス依存的な糖鎖修飾の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 翼空、森 彩乃、吉川 綾乃、佐藤（石内） 友里、根建 拓
2. 発表標題 マウス真皮線維芽細胞における温熱依存的なコラーゲン産生調節
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田 圭吾、大川 俊也、渡邊 拓実、佐藤（石内） 友里、根建 拓
2. 発表標題 短期温熱処理による骨格筋マイオカインの動態変化
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根建 拓
2. 発表標題 収縮する骨格筋細胞を駆使することで明らかとなった新規運動効果
3. 学会等名 生物工学会Webシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤(石内) 友里、根建 拓
2. 発表標題 運動依存的なマイオカイン発現変化による皮膚機能制御の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮下 千穂、郡司 美里、石内 友里、根建 拓
2. 発表標題 骨格筋における暑熱依存的なエクソソーム放出の生理的意義
3. 学会等名 42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 根建 拓、石内友里	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー・リサーチ	5. 総ページ数 362
3. 書名 骨格筋研究を核とした筋スマート社会	

1. 著者名 Nedachi T	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer Nature Singapore Pte Ltd.	5. 総ページ数 183
3. 書名 Progranulin and Central Nervous System Disorders	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 熱中症マーカー及びその利用	発明者 根建 拓	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-099156	出願年 2019年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	宮西 伸光  (Miyanishi Nobumitsu)  (80372720)	東洋大学・食環境科学部・教授    (32663)	

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