

機関番号：22604

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 年度～ 2010 年度

課題番号：21700657

研究課題名 (和文) 筋収縮によって骨格筋から分泌される新規生理活性物質の探索

研究課題名 (英文) Study on the skeletal muscle derived bioactive substances induced by muscle contraction

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・助教

研究者番号：60467412

研究成果の概要 (和文)：本研究では「筋収縮が引き金となって骨格筋細胞から種々のミオカインが分泌される」という作業仮説を検証した。まず、血液由来成分混入の可能性を排除するために培養細胞 (C2C12) を 5 日間分化させた後、両極に炭素電極を備えた電極から電気刺激 (50V, 3ms, 1Hz) を与えることによって、培養細胞株を収縮させるモデルを構築した。さらに、このモデル系をもちいて、収縮時に骨格筋から分泌される液性因子 (以下、ミオカイン) をプロテオミクス解析により探索・同定した。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, a novel muscle contraction system to explore the muscle derived bioactive substances induced by muscle contraction was developed. C2C12 cells were cultured in the 10%FBS, followed by differentiation in the 2% CS differentiation medium for the 5 days. Differentiated C2C12myotubes were then contracted by a specific contraction system equipped with the carbon electrode. The medium was concentrated and candidate myokines were identified by proteomic analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：スポーツ科学

キーワード：骨格筋、筋収縮

## 1. 研究開始当初の背景

運動は血糖および血圧の降下作用や脳・心臓血管疾患の予防のみならず、ある種の癌の

抑制作用や免疫力増進効果など、運動による脂肪減少に直接に起因するとは考え難い多

様な効果も認められている。近年、これまでは血球のみに由来すると考えられていた血中のインターロイキン-6 (IL-6) が、骨格筋にも由来していることが明らかになった。このような筋由来因子 (以下、ミオカイン) の発見はまだ多くはないが、骨格筋は人体に占める組織量が非常に大きく、成人では体重の40%を占めることを考えると、種々の「ミオカイン」を全身に供給する巨大な内分泌臓器として働いている可能性が考えられる。骨格筋は収縮するという特性を持つ。身体運動時には全身の様々な生理機能を調節する必要があるため、「筋収縮が引き金となって骨格筋細胞から種々のミオカインが分泌される」という作業仮説を立てることは妥当と考えられる。運動は健康の維持・増進に有効であるが、運動の恩恵効果をもたらす何らかの因子は、骨格筋細胞に由来する分泌ホルモンである可能性も否定できない。これまでに、上記の着想をもとにして preliminary な実験を行った。ラット後肢から灌流洗浄後の筋組織を摘出し、さらに生理食塩水で数回洗浄してから、培養液中で電気刺激を加えて強制収縮させた。培養液中の蛋白を濃縮沈殿させた後に SDS-PAGE で分子量により展開し、プロテオミクス解析によって培養液中の蛋白 (すなわち骨格筋から分泌された蛋白) を同定した。その結果、数十個の分泌 (様) 蛋白が同定された。しかし、同定された蛋白が予想を大きく超えて多かったことと、血液特異的蛋白も数種同定されたことから、筋摘出操作時の血液の汚染が筋組織内の微小血管に残存する血液混入の可能性を拭い去ることができな

かった。したがって、血液由来成分混入の可能性を排除しうる、新たな収縮実験モデルを構築する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究は、血液由来成分混入の可能性を排除するために培養細胞を用いた新たな筋収縮実験モデルを構築したうえで、収縮時に骨格筋から分泌される液性因子 (蛋白質) を探索・同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 課題1: 細胞培養系を用いた骨格筋収縮実験モデルの構築

マウス筋芽細胞 C2C12 を用い、細胞を10%の牛胎児血清入り基本培地で培養し、80-90%コンフルエントに達した時に培地を分化培地に変え、分化誘導を促した。分化した筋管細胞は炭素電極を備えた長方形型ディッシュにセットし、電気パルス発生装置により電気刺激(15分から6時間)を与えた(1Hz, 50V, 3ms duration, 997ms interval)。電気刺激した細胞を回収し、運動刺激などにより骨格筋でリン酸化が促進されるとして知られている、収縮マーカー蛋白質 (p38 や AMPK) のリン酸化をウェスタンブロッティング法により検討した。

### 課題2: 筋収縮によって培養液中に蓄積する分泌蛋白の同定

課題1で確立した筋収縮モデルを用いて、一定時間収縮させた細胞の培養液と、対照群として収縮させなかった細胞の培養液をそれぞれ回収した。VivaSpin-200 で遠心濃縮したのちに SDS-PAGE で分離した。分離された SDS ゲルを12分割したうえで酵素消化し、質量分析機を用いたプロテオミクス解析に供した。

### 課題3; 同定された蛋白がミオカインであるかの確認

課題2で同定された蛋白のうち、分泌(様)蛋白のみを *in silico* 分析により選び出した。*in silico* 分析には分泌シグナル配列の有無をアミノ酸配列上から予測できる Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) と、従来の分泌経路とは異なる形式で分泌される可能性の高い蛋白質を予測できる SecretomeP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>)を用いて解析した。次に、選ばれた蛋白質群の中からいくつかの蛋白質を選定し、実験的に収縮による分泌上昇が観察されるかの検討を行った。細胞を収縮させたのちに、培養上清を回収し、遠心濃縮により約10倍に濃縮したサンプルをウェスタンブロッティングに供した。

さらに、目的とする蛋白質の cDNA を PCR を用いて骨格筋からクローニングした。cDNA にはマーカーとして HA タグを付加した。HA タグをつけた cDNA は大量調整して、マウスの前脛骨筋、腓腹筋に *in vivo* electroporation 法により過剰発現させた。蛋白の発現を待ってから、麻酔下で坐骨神経に電気刺激を与えることで、筋収縮を行う *in situ* 強制筋収縮実験を行ったのちに、採血した。また、骨格筋は摘出して発現レベルの確認を行った。

#### 4. 研究成果

### 課題1; 細胞培養系を用いた骨格筋収縮実験モデルの構築

細胞収縮装置は、以下の図の用にセットアップした。細胞は、炭素電極を備え付けた心筋培養細胞用に開発された C-dish (Ion Optix Corporation) を用い、これに 1Hz, 50V, 3ms duration, 997 ms interval で刺激を与える

ことにより、より約80%以上の細胞を収縮させることが可能となった。

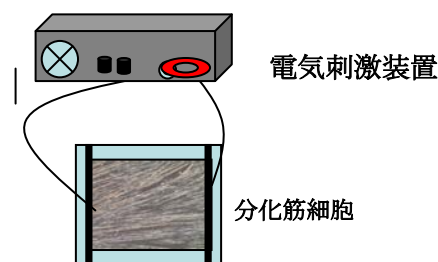


図1 筋細胞収縮系

この系を用いて、ある一定時間収縮させた細胞、コントロールとして収縮させていない細胞を回収し、筋収縮時に顕著なリン酸化が観察されるとして知られている代表的なリン酸化タンパク質、AMPK や p-38 のリン酸化をウェスタンブロッティングによって検討したところ、収縮15分から顕著なリン酸化が観察された(図2)。以上の結果から、筋細胞収縮系が *in vivo* 運動モデルと同様な結果を得られることが示唆された。

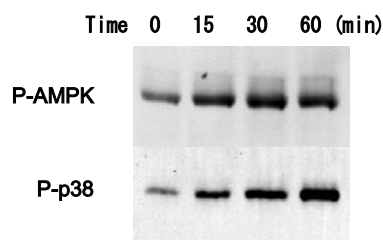


図2 収縮後のリン酸化 AMPK とリン酸化 P-38 のウェスタンブロッティング。サンプルは15, 30 または 60 分間収縮させた直後に回収した。

### 課題2; 筋収縮によって培養液中に蓄積する分泌蛋白の同定

プロテオミクスの手法を用いて、細胞を収縮させた細胞、ならびに収縮させていない上清を回収し、濃縮したのちに、プロテオミクス解析に供し、そのタンパク質リストを得た。

その結果、収縮させなかった細胞の培養上清から得られた蛋白質は合計で、342 個、収縮させた群から得られた蛋白質は 428 個、重複するものを考慮すると全部で 471 種類の蛋白質が検出された。その蛋白質リストには、細胞骨格など、細胞破片のコンタミネーションなどの蛋白質も含まれる。そこで、得られたリストの中から、分泌蛋白質を選別するために、*in silico*分析 (Signal P, secretome P) を行った。その結果、非収縮群では 165 個、収縮群では 204 個の分泌蛋白質の候補リストを得ることができた。

### 課題 3: 同定された蛋白がミオカインであるかの確認

課題 2 で、複数の分泌蛋白質候補リストの中から、近年、心臓で分泌蛋白質として報告された、macrophage migration inhibitory factor (MIF) についての解析を進めた。まず、実際に骨格筋に発現しているかを、ウェスタンブロッティングで確認した (data not shown)。骨格筋での MIF の発現が確認できたため、MIF が収縮によって分泌されるかについて、細胞収縮実験により確認した。C2C12 細胞を 6 時間収縮させた群、させていない群の培養上清を濃縮し、ウェスタンブロッティング法により検討した。その結果、収縮群で有意 MIF の上昇が確認された (図 3)。

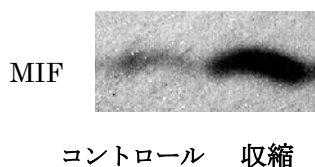


図 3 6 時間収縮後の培養上清における MIF の上昇。代表的なウェスタンブロッティングを示した。

次に、骨格筋に発現している MIF cDNA を PCR

を用いてクローニングした。この方法でクローニングされた MIF はこれまで他の臓器で報告されている MIF の配列と完全に一致していた。また、クローニングした MIF は、内因性 MIF と区別するために、HA タグを付加した。

筋収縮による MIF の分泌の上昇が、運動後の血液中で観察されるかを検討するため、HA タグ付けた MIF-cDNA をマウス骨格筋 (前脛骨筋と腓腹筋) に *in vivo* electroporation 法によりトランスフェクションした。回復後、*in situ* contraction 法によりマウスを麻酔下においてまま、坐骨神経に刺激を与え筋収縮させた。収縮直後に、マウスの血液を回収し、ウェスタンブロッティングに供した。また、骨格筋も摘出し、筋における HA タグ付きの MIF の発現をウェスタンブロッティング法にて確認した。その結果、骨格筋中の HA-MIF の過剰な発現が観察され、*in vivo* electroporation 法による過剰発現が可能ながことが示された (図 4)。

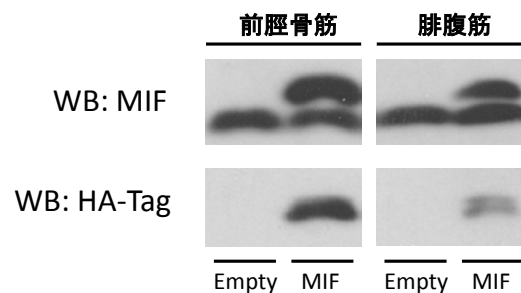


図 4 前脛骨筋、腓腹筋における HA-MIF の発現 (上) MIF 抗体で検出 (下) HA 抗体で検出したウェスタンブロッティング

一方で、採取した血液を同様にウェスタンブロッティング法で確認したところ、血液サンプルでは HA 抗体に対するバンドが検出できなかった。これは、HA タグを N 末に付加したことにより、正常状態より分泌が阻害されて検出限界以下であった可能性、発現に *in*

*vivo* electroporation 法を用いたことで、部位により MIF 発現にばらつきがあり血液で検出できるまでの発現が得られなかった可能性、*in situ* contraction による筋収縮時間が 15 分と短かったために、MIF 分泌が検出限界以下だった可能性等、が考えられる。今後、上記 3 つの点を改善し、さらに研究を進める予定である。

## 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 6 件)

- 1) 眞鍋康子, 豊田太郎, 土屋美穂, 藤井宣晴. 運動の糖代謝に対する急性効果の分子メカニズム. 内分泌・糖尿病・代謝内科, 2010, 31(5): 415-420
- 2) Matsumura S, Yoneda T, Aki S, Eguchi A, Manabe Y, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T., Intragastric infusion of glucose enhances the rewarding effect of sorbitol fatty acid ester ingestion as measured by conditioned place preference in mice., *Physiol.Behav.*, 査読有, 99, 509-14, 2010
- 3) Palacios M.O., Carmona J.J., Michan S., Chen Y.K., Manabe Y., Ward III L. J., Goodyear LJ., and Tong Q., Diet and exercise signals regulate SIRT3 and activate AMPK and PGC-1 $\alpha$  in skeletal muscle., *AGING*, 査読有 2009 1, 771-783
- 4) Mizushige T, Saitoh K, Manabe Y, Nishizuka T, Taka Y, Eguchi A, Yoneda T, Matsumura S, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T., Preference for dietary fat induced by release of beta-endorphin in rats., *Life Sci*. 査読有; 2009, 84(21-22):760-5.
- 5) Yoneda T., Saitou K., Asano H., Mizushige T., Matsumura S., Eguchi A., Manabe Y., Tsuzuki S., Inoue K., Fushiki T. Assessing palatability of long-chain fatty acids from the licking behavior of BALB/c mice., *Physiol.Behav.*, 査読有 2009; 96, 735-741
- 6) Saitou K, Yoneda T, Mizushige T, Asano H, Okamura M, Matsumura S, Eguchi A, Manabe Y, Tsuzuki S, Inoue K, Fushiki T., Contribution of gustation to the palatability of linoleic acid., *Physiol Behav.*; 査読有 2009; 96, 142-8.

[学会発表] (計 2 件)

1) Yasuko Manabe, Syouta Miyatake, Ai Okeda, Taemi Nakano, Michael M. Hirshman\*, Laurie J. Goodyear, Nobuharu Fujii Development of the cultured-muscle cell (C2C12) contraction system by electric stimulation, Inaugural International Academy of Sportology, 3月5日 2011年 東京

2) 眞鍋康子, 骨格筋研究における新規収縮モデル系とその応用, 分子骨格筋代謝研究会, 5月22日, 2010年, 京都

[図書] (計 3 件)

- 1) 眞鍋康子 (伏木亨, 吉田宗弘編著)、光生館、改訂 基礎栄養学、2010, pp9-22 摂食行動
- 2) Manabe Y., Matsumura S., & Fushiki T (J.P. Montmayeur, J. Coutre (eds)), Taylor and Francis Group, Fat Detection, 2009, pp 243 Fat Detection: taste, texture, and post ingestive effects
- 3) 眞鍋康子 (大野秀樹、木崎節子編著) ナップ、運動と免疫、2009、p p 247 運動とビタミンと免疫、p p 258 運動とダイエットと免疫、p p 265 運動と疲労・オーバートレーニングと免疫

[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://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/>

## 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・助教  
研究者番号: 60467412