

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500625

研究課題名(和文) 廃用性筋萎縮からの回復過程に対する分子生物学的研究

研究課題名(英文) Molecular biological studies on the recovery process from disuse atrophy

研究代表者

渡辺 正仁 (Watanabe, Masahito)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70084902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：培養筋芽細胞であるC2C12細胞を用いて、リアルタイムPCR法によりミオシン重鎖タイプI(MHC I)、熱ショック蛋白70(HSP70)インターロイキン-6(IL-6)のmRNA発現量を、種々の条件で測定した。培養液にIL-6またはLa3+を添加すると、MHC I、HSP70、IL-6のmRNA発現量が上昇した。また、カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリンAをLa3+と同時投与すると、これらのmRNA発現量増加が抑制された。したがって、C2C12細胞におけるMHC IのmRNA発現量増加にはIL-6ならびにカルシニューリン活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of IL-6 or La3+ on MHC I, HSP70, and IL-6 mRNA expression level using real-time PCR method in C2C12 skeletal muscle cells. First, we examined the effect of IL-6 on MHC I, HSP70, and IL-6 mRNA expression levels. These mRNA levels were significantly increased by the incubation with IL-6. Second, we examined the effect of La3+ on MHC I, HSP70, and IL-6 mRNA expression levels. These mRNA levels were significantly increased by the incubation with La3+. The effects of La3+ on these mRNA levels are considered as a result of calcineurin activation, because it was well known that La3+ stimulate the activity of calcineurin. La3+-induced upregulation of these mRNA levels were significantly attenuated by the application of calcineurin inhibitor, cyclosporin A. These results indicate that IL-6- and La3+/calcineurin-mediated mechanisms contribute to the upregulation of MHC I mRNA levels in C2C12 cells.

研究分野：解剖学

キーワード：ミオシン重鎖タイプI インターロイキン-6 熱ショック蛋白70 カルシニューリン

1. 研究開始当初の背景

長期臥床やギプス固定により身体活動量の低下や不動の状態が継続すると、廃用性筋萎縮が生じることが知られている。筋萎縮が生じると筋力が低下することで患者の移動能力などが低下し、日常生活動作が制限されるため患者のQOLは著しく低下する。この廃用性筋萎縮は、筋に再び適切な負荷(体重の再負荷, 活動量増加など)や刺激を与えることにより元の正常な状態に回復するが、患者にとっては大きな負担となる。臨床現場では、物理療法や運動療法などを実施して筋萎縮の改善を図ろうと努力しているが、それは統計学的手法による調査研究や経験則に基づくものが大半であり、分子生物学的なエビデンスに基づくものには到達していない。したがって、本研究は骨格筋細胞の肥大に関わるメカニズムを分子生物学的手法により検討する事で、廃用性筋萎縮からの回復を早める手法や廃用性筋萎縮を減弱させる手法を探索するものであり、将来的にはリハビリテーションにおける治療方法や廃用性筋萎縮の予防策の開発の一翼を担えるものと考えられる。

2. 研究の目的

本申請ではマウス骨格筋由来の培養細胞を用いて、筋萎縮からの回復メカニズムを分子生物学的に分析・検討した。古典的には、骨格筋細胞の肥大には成長ホルモンの作用により肝臓から放出されたり、骨格筋自身から放出されるインスリン様成長因子-1 (IGF-1) が最も重要な役割を果たしているものと考えられてきた。後者については、ストレッチやレジスタンストレーニングなどの機械的刺激を骨格筋に与えると、骨格筋細胞から IGF-1 が分泌されてオートクライン・パラクラインにより骨格筋細胞に作用し、骨格筋細胞において蛋白質合成が促進されるということである。しかし近年、運動負荷を与えると骨格筋細胞からサイトカインの一種であるインターロイキン-6 (IL-6) が放出されることが報告されている。インターロイキンとは本来、白血球の間で情報を伝達する蛋白質であり、筋運動により増加する IL-6 も筋の微小損傷に伴う免疫反応により産生されるものと考えられてきた。しかし、Pedersen ら (2008) は、運動により炎症とは無関係に骨格筋細胞から IL-6 が分泌されることを報告し、最近ではこれが筋サテライト細胞(筋芽細胞)を含む骨格筋細胞にオートクライン・パラクラインにより作用して骨格筋細胞の増殖・肥大に関わることが報告されており、「マイオカイン」という新たな言葉が生まれている。IGF-1 と IL-6 の分泌と作用に共通する因子として、Ca²⁺依存性タンパク脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの骨格筋細胞内における活性化があげられる。IGF-1 が骨格筋細胞に作用するとカルシニューリンが活性化して筋肥大に関わるとの報

告があり、さらに運動等による細胞内 Ca²⁺濃度上昇時にはカルシニューリンが活性化し、転写因子である NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) を活性化して IL-6 が産生されることが知られている。このように、筋細胞を肥大させる因子である IGF-1 の作用と IL-6 の産生には、Ca²⁺/カルモジュリン-カルシニューリン系を介した細胞内情報伝達機構と深く関わっていることから、骨格筋細胞の肥大過程には細胞内カルシニューリン活性化が重要な役割を果たしているものと考えられる。そこで本研究では、IGF-1、IL-6 およびカルシニューリン活性化が、どのような細胞内情報伝達機構を介して骨格筋における収縮蛋白および関連蛋白質の増加に関わるかを明らかにするため、マウス骨格筋由来の培養細胞である C2C12 細胞を用いてさまざまな条件下にリアルタイム PCR 法を行い、IL-6、熱ショック蛋白 70 (HSP70)、ミオシン重鎖アイソフォーム I (MHC I) の骨格筋細胞における mRNA 発現量を測定した。

3. 研究の方法

実験には、マウス骨格筋由来の筋芽細胞である C2C12 細胞を用いた。この細胞は培養液 (D-MEM) に 15% の牛胎児血清 (FCS) を加えて培養すると未分化のまま筋芽細胞として増殖するが、FCS 濃度を 2% に低下させると筋管形成を行い、骨格筋に分化する性質を有している (図 1)。本研究においては、IGF-1 (10 nM)、IL-6 (20 ng/ml)、La³⁺ (10 μM)、クロロゲン酸 (100 mg/ml)、シクロスポリン A (5 μM) 投与の効果を検討するために、C2C12 細胞を筋管形成誘導時にこれらの薬剤を投与して 24 時間培養し、リアルタイム RT-PCR 法により、MHC I、IL-6、HSP70 の mRNA 発現量を測定した。

試料として採取した細胞より抽出したトータル RNA の逆転写を行い、これを鋳型としたコンベンショナル PCR 法により増幅したうえで、アガロースゲル上で電気泳動を行った。定量 RT-PCR 法では、MHC I、IL-6、HSP70 および GAPDH のプライマーと蛍光プローブの作製には TaqMan 法を用い、LightCycler Nano (Roche) を用いた増幅を行った。なお、本研究ではサイクル比較法 (Ct 法) による相対定量を行った。

(図 1)

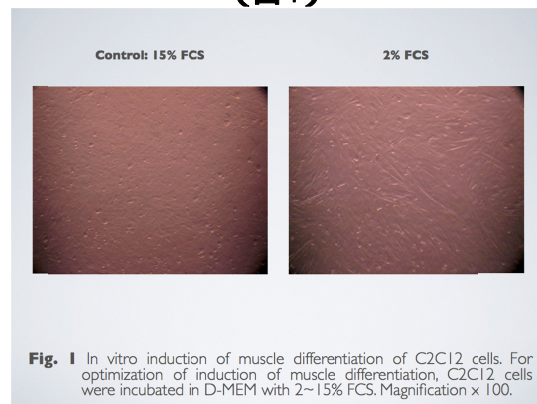


Fig. 1 In vitro induction of muscle differentiation of C2C12 cells. For optimization of induction of muscle differentiation, C2C12 cells were incubated in D-MEM with 2~15% FCS. Magnification x 100.

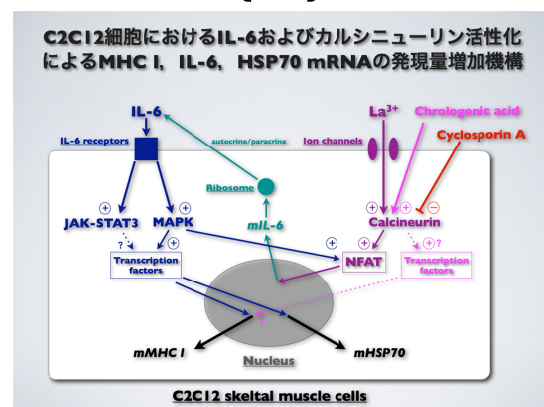
4. 研究成果

本研究では、筋芽細胞である C2C12 細胞を、2%FCS を添加した細胞培養液中で培養することにより骨格筋細胞に分化させ、この培養液中に IL-6、IGF-1、 La^{3+} 、シクロスポリン A、クロロゲン酸を投与し、MHC I、HSP70、IL-6 の mRNA 発現量変化をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。骨格筋に投与することにより筋肥大が生じることが知られている IGF-1 投与では、MHC I および HSP70 の mRNA 発現量はコントロール条件よりも低下し、IL-6 の mRNA 発現量はほとんど変化しなかった。このことは、少なくとも C2C12 細胞においては MHC I および HSP70 mRNA 発現量増加に IGF-1 が関与していないことを示している。次に、運動時など細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇時に骨格筋より産生され、オートクライン・パラクラインにより骨格筋細胞に作用するサイトカインである IL-6 を投与すると、MHC I、HSP70、IL-6 の mRNA 発現量はコントロール条件に比べ著明に上昇した。さらに、細胞内 Ca^{2+} を低下させる目的で、 Ca^{2+} 透過性チャネルである TRP チャネルを阻害することが知られている La^{3+} を培養液に投与すると、MHC I、HSP70、IL-6 の mRNA 発現量はコントロール条件に比べ著明に上昇した。 La^{3+} は試験管内において Ca^{2+} 依存性の脱リン酸化酵素であるカルシニューリンを Ca^{2+} 非依存性に活性化することが報告されているため、培養液中にカルシニューリンの阻害剤であるサイクロスポリン A を加え、 La^{3+} との同時投与の作用を検討した。 La^{3+} とサイクロスポリン A を同時投与すると、MHC I と HSP70 ではコントロール条件よりも mRNA 発現量が増加するものの、 La^{3+} の単独投与よりも有意に mRNA 発現量が低下した。また、IL-6 の mRNA 発現量は La^{3+} とサイクロスポリン A の同時投与においてコントロール条件よりもその発現量が明らかに低下した。したがって、 La^{3+} にはカルシニューリン活性化作用があり、カルシニューリンの活性化により MHC I、IL-6、HSP70 の mRNA 発現量が増加することが明らかになった。カルシニューリンの活性化により転写因子 NFAT が活性化され、IL-6 の産生が行われることはよく知られた事実であることから、この実験結果より細胞内に流入した La^{3+} がカルシニューリンを Ca^{2+} 非依存性に活性化した結果、転写因子 NFAT の活性化を介して IL-6 が産生され、IL-6 がオートクライン・パラクラインにより作用して MHC I、IL-6、HSP70 の mRNA 発現量を増加させた可能性が考えられる。そこで、カルシニューリン活性化剤として知られているクロロゲン酸を培養液に投与したところ、MHC I mRNA 発現量のみが増加し、IL-6 および HSP70 mRNA 発現量は殆ど変化を見せなかった。したがって、 La^{3+} によるカルシニューリン活性化が強力であったため MHC I、IL-6、HSP70 のすべての mRNA 発現量を増加させ、クロロゲン酸はポリフェノールであるために細胞膜透過性が低く十分にカルシニューリンが活

性化されず IL-6 および HSP70 mRNA 発現量を増加させるに至らなかった可能性が示唆された (図 2)。

本研究において得られた最大の知見は、 La^{3+} およびクロロゲン酸の投与によるカルシニューリン活性化が MHC I の mRNA 発現量の増加に関与する可能性が示唆されたことである。したがって今後の検討課題の第一は、細胞外への La^{3+} の投与がどのような経路を介して細胞内に流入するかを解明することである。一般的には La^{3+} は Ca^{2+} 透過性チャネルである TRP チャネルの非特異的阻害剤として用いられており、これ以外の経路、例えば電位依存性 Ca^{2+} チャネル等を介して細胞内に流入した可能性が示唆される。したがって、電位依存性 Ca^{2+} チャネル阻害剤と La^{3+} を同時投与してその効果が減弱するかを観察し、流入経路を明らかにしなくてはならない。第二は、細胞内で活性化したカルシニューリンがどのような経路を介して MHC I、IL-6、HSP70 の mRNA 発現量を増加させるかと言うことである。活性化したカルシニューリンは転写因子である NFAT を活性化することはよく知られた事実である。また本研究で明らかになったように、カルシニューリン阻害剤であるサイクロスポリン A の作用が IL-6 の mRNA 増加に対して著明な抑制作用を有していることから、現時点ではカルシニューリンの活性化が NFAT 活性化を生じさせ、その結果 IL-6 の mRNA 発現量が増加して IL-6 が骨格筋細胞から放出され、これがオートクライン・パラクラインにより骨格筋細胞に作用した結果 MHC I や HSP70 の mRNA が増加したものと推察される。そこで、培養液にカルシニューリン活性化剤としての La^{3+} と IL-6 受容体抗体を同時投与して骨格筋細胞に IL-6 が作用しない状態での各 mRNA 発現量を測定することで、この仮説が正しいか否かを検討しなくてはならない。将来、これらの検討を行うことにより、カルシニューリン活性化による骨格筋肥大のメカニズムを解明するという意義とともに、動物実験においてカルシニューリン活性化剤により筋肥大を人工的に生じさせることができれば、廃用性筋萎縮を予防する治療法開発の手がかりが得られるものと考え

(図 2)



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 3 件)

1. Mori Y., Yamaji J., Hiroshima R., Nakano T., Miyazaki A., and Watanabe M.: IL-6- and calcineurin-mediated but not IGF-1-mediated mechanisms contribute to the upregulation of MHC I and HSP70 mRNA levels in C2C12 cells. *Neuromuscular Disorders*, 24(9-10): 877-878 (2014)

2. 森 耕平, 野村卓生, 明崎禎輝, 片岡紳一郎, 中俣恵美, 浅田史成, 森 禎章, 甲斐 悟, 渡辺正仁: “太極拳ゆったり体操の3ヶ月継続は心臓足首血管指数を改善するか? 無作為化比較試験” *運動疫学研究* 15 (2): 71-81 (2013)

3. Watanabe M., Ito Y., Fujioka S., Mori Y.: “GABA_B receptor immunopositive cells found in the mouse pulmonary alveolar epithelium were Type II.” *Journal of Allied Health Science* 4 (2): 17-23 (2013)

[学会発表](計 7 件)

1. Mori Y., Yamaji J., Hiroshima R., Nakano T., Watanabe M., and Miyazaki A.: “Enhancement of myosin heavy chain class I (MHC I) mRNA expression in C2C12 myocyte by La³⁺.” 第 92 回日本生理学会大会 (20150321-20150323). 神戸

2. 森 禎章, 山路純子, 廣島玲子, 中野 禎, 渡辺正仁: “培養骨格筋細胞におけるミオシン重鎖タイプIの mRNA 発現量増加因子の検討” *保健医療学学会第 5 回学術集会* (20141130). 大阪

3. Tashiro-Yamaji J., Mori Y., Hiroshima R., Watanabe M., and Miyazaki A.: “Enhancement of myosin heavy chain class I (MyHC I) mRNA expression in C2C12 myocyte by chlorogenic acid.” 19th International Congress of World Muscle Society. (20141007-20141011). ベルリン

4. 廣島玲子, 森 禎章, 山本真紀, 早崎華, 山路純子, 渡辺正仁: “筋萎縮からの回復において3種の治療法が筋タンパク質に与える影響” 第 4 回総合福祉学会. (20140305-20140305). 柏原

5. Mori Y., Yamamoto M., Hiroshima R., Nakano T., and Watanabe M.: “Ca²⁺-calmodulin/calcineurin mediated signaling pathways are essential for upregulation of MHC I mRNA levels in C2C12 cells.” XXXVII Congress of the

International Union of Physiological Sciences. (20130721-20130726). パーミンガム

6. 森 禎章, 山路純子, 山本真紀, 廣島玲子, 中野 禎, 渡辺正仁: “Effect of intracellular Ca²⁺ on myosin heavy chain I, HSP70, and IL-6 mRNA levels in C2C12 cells.” 第 90 回日本生理学会. (20130327-20130329). 東京

7. 森 禎章, 山路純子, 山本真紀, 廣島玲子, 渡辺正仁: “ハビリテーションと先端医療の最前線-骨格筋細胞増殖過程における細胞内情報伝達機構の役割-” 第 3 回総合福祉学学会・シンポジウム. (20130306-20130306). 大阪

[図書](計 3 件)

1. 渡辺正仁, 森 禎章: “超カラー図解 看護自己学習 解剖生理学” 金芳堂. 323 ページ. (2013)

2. 渡辺正仁, 森 禎章, 山路純子: “医療・福祉系学生のための専門基礎科目 改訂 2 版” 金芳堂. 717 ページ. (2103)

3. 渡辺正仁: “PT・OT 自己学習 解剖学” 金芳堂. 304 ページ. (2012)

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺正仁 (Masahito Watanabe)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 70084902

(2) 研究分担者

森 禎章 (Yoshiaki Mori)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 70268192

山路純子 (田代純子) (Junko Yamaji)

関西福祉科学大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号: 40340559

山本真紀 (Maki Yamamoto)

関西福祉科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号: 60240123

廣島玲子 (Reiko Hiroshima)

関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授
研究者番号：40404777