

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580147

研究課題名(和文) 様々な骨格筋収縮パターンを再現する培養細胞系の創製とその応用

研究課題名(英文) Application of in vitro C2C12 contractile model that mimics different types of exercise

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋における運動は、その収縮強度や収縮様式によって異なる生理作用を発揮すると考えられる。我々はマウス骨格筋細胞C2C12と電気パルス刺激などの物理的刺激を複合的に用いたin vitro擬似的運動刺激系を開発し、収縮強度や収縮様式に応答した骨格筋生理変化についての解析を行った。本研究では、特に収縮に応答した骨格筋分泌タンパク質に着目した解析を行った。その結果、激運動条件下においてC-CケモカインであるRANTESを含む複数の分泌タンパク質発現が抑制されることが明らかとなった。我々はさらにこのRANTES分泌抑制メカニズムについても解明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, by utilizing C2C12 contractile model, we attempted to mimic different types of exercise, such as vigorous exercise, and analyzed exercise-type dependent changes in cellular response, such as production of myokines. Differentiated C2C12 myotubes were subjected to different voltage, pulse frequency, duration of electrical pulse stimulation (EPS) to induce contraction, thereby analyzed secreted proteins by membrane antibody arrays. Several novel myokines, which were induced by vigorous exercise, were successfully identified by this method, particularly, we found two myokines, including RANTES, were significantly reduced by vigorous exercise. In addition, we found exercise-dependent AMP kinase activation was sufficient for reducing secreted RANTES levels. In conclusion, we identified RANTES as a novel myokine that secretion is reduced by vigorous skeletal muscle cell contraction, and this reduction is mediated by AMP kinase pathway.

研究分野：応用生物化学

キーワード：骨格筋 運動 分泌タンパク質

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。また、骨格筋以外の組織に対しても例えば、脂肪細胞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、免疫能の亢進など骨格筋のみならず、体全体に対して良好な影響を与える。一方、運動不足になると骨格筋での糖代謝関連の諸機能が低下して、メタボリック症候群発症の原因となりうることや、逆に運動過剰も筋破壊や免疫能の低下を促すなど体に悪影響を持つことが知られている。従って、異なる種類、強度の運動が、どのように骨格筋の生理を制御しているのかを分子レベルで解明することは、骨格筋における運動効果を解明、有効に活用する上で極めて重要である。しかし、このような運動依存的な生理的变化を惹起する分子メカニズムについては未だ不明な点が多い。その主な理由のひとつとして、運動の研究に適した優れた培養筋細胞系が存在しなかったため、研究手法が限定的であったことがあげられる。

申請者らは、培養筋管細胞 C2C12 の培養条件などを細かく検討することで、細胞深部にまで筋収縮に必須なサルコメラ構造を保持した高度発達型培養筋細胞系の構築に成功した。さらに、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* 擬似的運動刺激系を世界で初めて開発した。この擬似的運動刺激系は、(1) 安定的・均質的である培養細胞系の利点と(2) 持久運動に

よって筋肉で生じる生理変化と酷似した細胞応答を併せ持っており、筋肉において運動がどのような細胞応答を引き起こすのか、またそれはどのような機構を介しているのかを解析する上で極めて強力な系であった。

2. 研究の目的

今回の研究計画では、申請者らが開発した高度発達型培養筋細胞を用いて、生体での様々な収縮を培養細胞系で再現し、細胞内シグナル、生理応答が収縮様式によってどのように異なるのかを培養細胞レベルで解明することを目的とした。初年度に、各収縮様式を再現した実験系を構築し、次年度において収縮様式に応答した運動依存的分泌タンパク質発現制御などの生理応答を解析、さらにシグナル伝達などの定量的比較解析を行い、収縮様式に応答した生理変化の包括的理解を目指した。

3. 研究の方法

マウス骨格筋由来正常細胞 C2C12 を通常のプラスチックディッシュあるいはシリコンチャンパー上に播種、低血清条件下にて分化誘導を行った後、伸展刺激と矩形電気パルス刺激を適宜複合的に負荷した。その後、C2C12 筋管細胞内のタンパク質発現や収縮変動を生化学的方法で、遺伝子発現変化を定量PCR法で、また分泌タンパク質についてはELISA法を用いた解析を行い、収縮様式に応答した骨格筋細胞の生理変化の詳細を明らかにした。

4. 研究成果

まず、運動強度に応答したマウス骨格筋細胞

からの分泌タンパク質（運動因子）の同定を進めることを目的に抗体アレイ（Proteome Profiler）を用いた網羅的分析を行った。まず、マウス骨格筋細胞 C2C12 を分化誘導して筋管を形成させた後、種々の電氣的強度による電気パルス刺激(Electrical Pulse Stimulation; EPS)を付与した。その後、経時的に培養上清(Conditioned medium; CM)を回収した後に、抗体アレイに供した（図 1）。その結果、激運動と考えられる高電圧かつパルス頻度が高い条件によって、いくつかの骨格筋分泌タンパク質の分泌減少が認められ、特に、C-C ケモカインのひとつである RANTES は、その分泌量が半分以下に減少することが分かった。

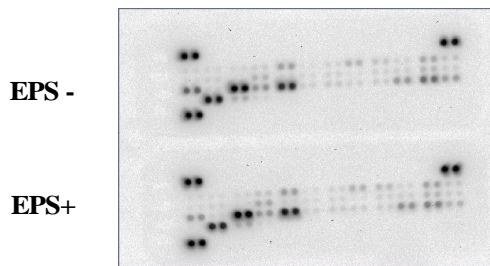


図 1 抗体アレイ法を用いた電気パルス依存的に分泌変動するタンパク質の解析

これまでに運動によって分泌上昇が確認されている因子は多数報告されているが（1,2 他）、運動によって分泌減少が認められる骨格筋分泌タンパク質が存在することが明らかとなった。さらに、我々はこの運動による RANTES 減少の分子メカニズムを明らかにすることを試みた。まず、定量 PCR による運動依存的な RANTES 遺伝子発現の増減を調べた結果、運動依存的な RANTES 分泌低下の少なくとも一部は遺伝子発現変化を介していることが分かった（図 2）。

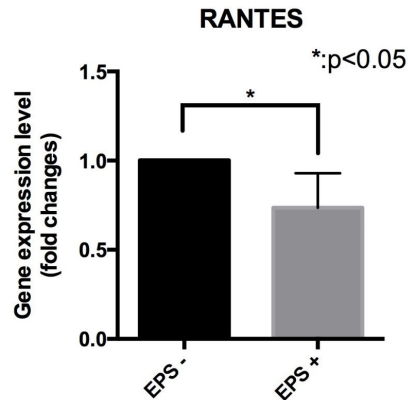


図 2 電気パルス刺激による RANTES 遺伝子発現の減少

次に運動による骨格筋内 AMPK の活性変化を調べたところ、C2C12 細胞の収縮によって強度依存的な AMPK 活性化が確認された。そこで EPS を負荷しない条件下において、AMP キナーゼ活性化剤である AICAR を添加し、AMPK を強制的に活性化した際に同様に RANTES の発現・分泌低下が認められた（図 3）。さらに、骨格筋からの RANTES 分泌を制御する他のシグナル伝達経路を解析した結果、PI3K についても RANTES 分泌量を制御する重要な因子であることも明らかとなった。

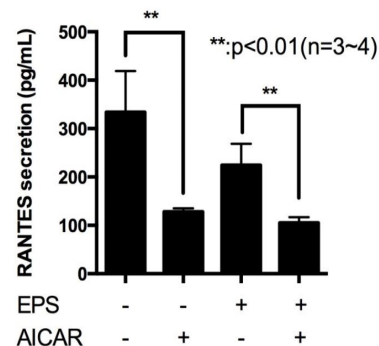


図 3 AMP キナーゼ活性化剤 AICAR による RANTES 発現減少

RANTES は、NK 細胞の活性化や B 細胞が

らの IgE 産生を制御していることが明らかとなっており、激運動時に見られる免疫変動の一部を説明する因子である可能性が考えられた。一方、C2C12 細胞をシリコンチャンバー上に播種し、C2C12 筋芽細胞の生着を確認したものの再現性の高い培養・分化方法の開発には至らなかった。同期システムの構築は進んでいるため、今後再現性の高い培養・分化方法を開発することによって、激運動の種類を変えた運動条件を設定し、どのような運動方法が運動因子産生を制御しているのか精査する必要がある。

以上、本研究では、微弱運動および激運動時において産生変化する新規骨格筋分泌タンパク質を複数同定することに成功し、さらにその産生制御機構を明らかにすることができた。このような骨格筋分泌タンパク質は、骨格筋での収縮シグナルを全身の組織および臓器に伝達している可能性が高く、運動依存的な全身的な生理変化の理解および健康分野への応用の基盤となるため、今後も本研究を継続していく価値が高いものであると考えられた。

<参考文献>

- (1) Nedachi T, et al., Am J Physiol Endocrinol Metab 1111295: E1191-1204, 2008
- (2) Peterson JM, Pizza FX. J Appl Physiol 106: 130-137, 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件) 全て査読有

- (1) Ogura Y, Sato K, Kawashima K, Kobayashi N, Imura S, Fujino K, Kawaguchi H, Nedachi

T. (2014) Subtoxic levels of hydrogen peroxide induce brain-derived neurotrophic factor expression to protect PC12 cells. **BMC Res Notes** 7: 840

DOI: 10.1186/1756-0500-7-840

- (2) Sato K, Yamanaka Y, Ishii M, Ishibashi K, Ogura Y, Ohtani-Kaneko R, Nishihara M, Nedachi T. (2014) Dual cell protective mechanisms activated by differing levels of oxidative stress in HT22 murine hippocampal cells. **Biosci Biotech Biochem** 78(9): 1495-1503

DOI: 10.1080/09168451.2014.936343

- (3) Sato T, Ito Y, Nedachi T, Nagasawa T (2014) Lysine suppresses protein degradation through autophagic-lysosomal system in C2C12 myotubes. **Mol Cell Biochem** 391: 37-46

DOI: 10.1007/S11010-014-1984-8

〔学会発表〕(計1件)

佐藤整、柴垣拓也、佐藤和典、根建拓「C2C12 筋管細胞における収縮依存的な RANTES の分泌制御」日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 26 日～3 月 29 日(岡山大学、岡山県岡山市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根建 拓 (Taku Nedachi)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号: 50375200

(2) 研究分担者

川口 英夫 (Hideo Kawaguchi)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号： 50416921