

令和 2 年 9 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19920

研究課題名(和文)骨格筋から発見された新規マイオカイン分子の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of novel myokine

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・准教授

研究者番号：60467412

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：新規マイオカイン候補(#30020)が、骨格筋でタンパク質に翻訳され、分泌され、生理的な役割を生じさせるかどうかを検証した。ヒト骨格筋では#30020の遺伝子発現が確認されたが、マウスなどの動物種では発現が確認されなかった。ヒト骨格筋細胞やマウス骨格筋へ#30020を強制発現させることにより、タンパク質発現の検証を試みた。強制発現させた#30020のタンパク質発現は確認されたが、内因性のタンパク質の発現の確認(検出)はできなかった。またヒト骨格筋細胞の上清中への分泌も検出できなかった。以上のことより、#30020がタンパク質として分泌され、生理的役割を担っている可能性は低いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト骨格筋特異的に発現し、分泌構造を有するタンパク質#30020が新規のマイオカイン候補として挙がっていたため、複数の方法を用いてその可能性を検証した。しかし、期待されたようなタンパク質ではないことが明らかとなった。一方、本候補分子の検出や機能の解明のために用いた実験手法は、現在別のマイオカインの検証に役立っている。現在行っているマイオカイン候補は、大変興味深い結果を得ているため、今回の研究を進めるにあたって使用した手法が他のマイオカインの研究に役立っているという点で、大きな学術的意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：This study was investigated whether a new myokine candidate #30020 is actually synthesized in the skeletal muscle, secreted and played physiological roles. #30020 gene was expressed in human skeletal muscle cells, but not mouse skeletal muscle cells. When HA-tagged #30020 gene was overexpressed in mouse skeletal muscle by in vivo electroporation, #30020 protein expression was detected by an HA-antibody. To detect endogenous #30020, a direct antibody against #30020 was produced. Although overexpressed #30020 was detected by the HA-antibody, endogenous #30020 could not be detected by the direct antibody. We also tried to detect secretion of #30020 in the supernatant of human skeletal muscle cells, but could not detect any signal of #30020. These results suggest that #30020 is unlikely to be a new myokine.

研究分野：マイオカイン研究

キーワード：骨格筋 マイオカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は運動器としての機能以外にも分泌器官としての役割を有しており、種々の生理活性物質を分泌することによって、脂肪燃焼の促進、血糖値の調節、癌の抑制など、健康に有益な効果を生み出している。骨格筋から分泌される生理活性物質は総称してマイオカインと呼ばれており、これまでに複数報告されている。これらマイオカインのほとんどは、骨格筋以外の臓器では分泌タンパク質として知られていたが、じつは骨格筋からも分泌されることが明らかになったものである。これまで、全く新規なマイオカインの発見がなされたケースはない。申請者は次世代シーケンサーを用いて、ヒト骨格筋のトランスクリプトーム解析を実施し、これまで読み落とされていた「新規の分子」である可能性の高いペプチド・タンパク質を発見した。

2. 研究の目的

本研究は、このマイオカイン候補分子(仮称 #30020)について、実際に分泌され、生理的役割を担っているのかを明らかにすることを目的とした。#30020 が、健康に有益な効果を全身に届けているマイオカインの新メンバーであれば、それを指標にした運動療法の開発や創薬など、臨床的研究へ発展していくことが期待できる。

3. 研究の方法

(1) ヒト骨格筋から#30020 のクローニング

次世代シーケンス解析から得られた#30020 の遺伝子配列を元に PCR 法を用いたクローニングを行った。さらに、今後の実験ツールとして使用するために N 末、C 末に HA-tag を付加した発現ベクター(それぞれ、#30020-pCAGGS, N-HA-#30020-pCAGGS, C-HA-#30020-pCAGGS)も作製した。

(2) マウス下肢への強制発現

片側のマウス前脛骨筋に Tag つきのベクターを、もう片脚には empty ベクターをエレクトポレーション法で導入し、強制発現させた。2 週間後に骨格筋を摘出し、#30020 がタンパク質として発現しているかを、HA 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。

(3) 特異的抗体の作製とタンパク質発現の検証

#30020 分子のペプチド断片に対する抗体を作製した(MBL (株)医学生物化学研究所に依頼)。発現の確認には、(1)で作成したベクターを(2)で強制発現させた筋組織、ヒト培養骨格筋細胞である Hu5/KD3 細胞を用いた。

(4) 質量分析法を用いた検証

#30020 を強制発現させたサンプルとヒト骨格筋サンプルを電気泳動により分離し、銀染色を行った。これまで HA 抗体で得られているバンドと同じ位置にあるバンドを切り出し、質量分析に供した。

(5) 局在の確認(免疫染色法)

#30020 の骨格筋での局在を明らかにするため、強制発現させた骨格筋から凍結横断切片を作製し、HA 抗体ならびに(3)で作成した#30020 の抗体で局在の確認を行った。

(6) 分泌の確認

#30020 が分泌されることを明らかにするために、ヒト骨格筋細胞である Hu5KD3 細胞を分化させ、培養上清を回収し、遠心濃縮法により上清を濃縮し、ウェスタンブロッティングによって細胞上清に分泌されるかの検証を行った。

4. 研究成果

次世代シーケンサー解析から得られた#30020 の遺伝子配列を元にヒト骨格筋から PCR 法を用いたクローニングを行ったところ、予想通り 5.7 k の遺伝子がクローニングできた。これを今後の実験ツールとして使うため、タグが付加されていないベクター、N 末端または C 末端に HA タグをつけたベクターを作製した。作製したベクターが機能するかを調べるため、in vivo エレクトポレーション法によってマウス下肢に強制発現させた。一週間後に、骨格筋を回収してタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティング法を用いて目的の分子が発現するかを HA 抗体で確認したところ、図 1 に示すように、目的の位置にバンドが確認され、タンパク質として発現していることが明らかになった。

次に、#30020 に対する直接抗体を作製した。#30020 抗体を作製するためのペプチド断片は、高次構造予測で分子表面に露出している可能性が高い部位(MGISITTSQGC)を選択し、この部位に対する精製抗体を作製した。作製した特異的抗体をもちいて、ヒト培養骨格筋細胞 Hu5/KD3、N 末端または C 末端に HA タグをつけたベクターを強制発現したマウス骨格筋をサンプルとし、ウェスタンブロッティング法にて、過剰発現させた#30020 と内因性#30020 のタンパク質の発現検証を行った。HA タグをつけたベクターを過剰発現させたマウス骨格筋サンプルでは、HA 抗体によりバンドが検出されたが、作製した#30020 抗体では HA 抗体で確認される位置にバンドを確認することができなかった(図 2)。作製した抗体では HA 抗体にくらべて力価が低い可

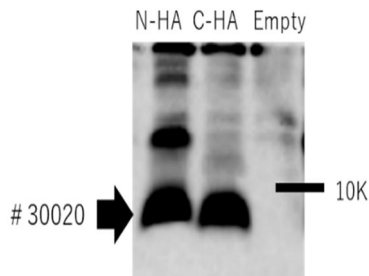


図1 #30020 のタンパク質発現確認

#30020 ベクターをマウス下肢に強制発現させた筋を回収し、HA 抗体を用いて発現を確認した。N-HA:N 末端に HA タグをつけた DNA の強制発現筋組織、C-HA:C 末端に HA タグをつけた DNA の強制発現筋組織 Empty:empty vector を発現させた筋組織

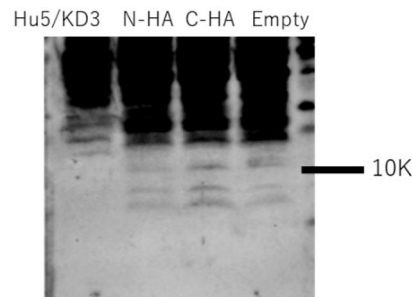


図2 作製した#30020 抗体によるタンパク質発現確認

Hu5/KD-ヒト骨格筋培養細胞、N-HA:N 末端に HA タグをつけた DNA の強制発現筋組織、C-HA:C 末端に HA タグをつけた DNA の強制発現筋組織、Empty:empty vector を発現させた筋組織

能性が考えられるため、より効率的に #30020 を発現させたサンプル (薬剤選択耐性のベクターへ#30020 をサブクローニングし、C2C12 細胞に強制発現させ薬剤選択して残った #30020 を高発現した細胞のみのサンプル) を用いて再度検証したが、検出することができなかった (data not shown)。

抗体の問題で検出できないのか、あるいは発現量が低くて検出できないレベルなのかを明らかにするために、質量分析法にて検証を行った。HA タグをつけたベクターを過剰発現させたマウス骨格筋サンプルは HA 抗体を用いた免疫沈降法により濃縮し、SDS-PAGE で分離した。ゲルを銀染色にて染色したところ、図1で発現が確認された位置にバンドが得られたため、その部分を切り出して質量分析法での検出を試みた。しかし、質量分析法においても標的とするペプチド断片のピークを得ることができなかった。

さらに骨格筋細胞内での発現位置を確認するために、HA 抗体または、#30020 抗体を用いて免疫染色法にて局在の確認を行った。しかし、いずれの方法によっても明確なシグナルを得ることができなかった(図3)。

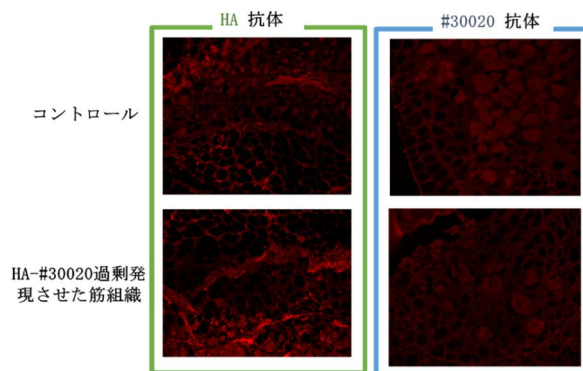


図3 タンパク質局在確認
#30020 をマウス下肢に強制発現させた筋組織を回収し、免疫染色法にて発現を確認した。HA 抗体と作製した作製した #30020 抗体を用いた。

#30020 がマイオカインとして分泌される分子であるかについても検証した。#30020 をマウス C2C12 細胞に過剰発現させた細胞、またはヒト由来培養骨格筋細胞 Hu5/KD3 の培養上清を回収し、遠心濃縮法により上清を濃縮して、ウェスタンブロッティング法において分泌を検証した。しかし、予測される目的の位置にバンドは観察されなかった (data not shown)。

以上の結果から、#30020 は強制発現によってタンパク質として発現が確認された一方で、内因性のタンパク質発現は確認されなかった。また、強制発現した細胞の培養上清を用いても分泌が確認されなかった。質量分析法を用いても検出されなかったことを考慮すると、#30020 は極めて発現量が低く、検出が困難である可能性が高いと考えられた。よって新規マイオカイン候補として考えられた #30020 は、マイオカインとしての発現や分泌の可能性は極めて低いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuichi Y, Manabe Y, Takagi M, Aoki M, Fujii NL.	4. 巻 13
2. 論文標題 Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 e0206146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206146	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 眞鍋康子	4. 巻 138
2. 論文標題 マイオカインは運動模倣薬となるか?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 薬学雑誌	6. 最初と最後の頁 1285-1290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1248/yakushi.18-00091-5	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 坂本 憲一, 竹本 稔, 古市 泰郎, 高橋 恵, 秋元 義弘, 山本 雅, 石川 崇広, 前澤 善朗, 清水 孝彦, 眞鍋 康子, 藤井 宣晴, 横手 幸太郎	4. 巻 94
2. 論文標題 新規遺伝子R3hdm1は筋衛星細胞の増殖能を制御し、骨格筋の分化再生を促進する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 眞鍋康子	4. 巻 22
2. 論文標題 骨格筋から分泌されるマイオカインの役割	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FOOD Style21	6. 最初と最後の頁 53-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 眞鍋康子	4. 巻 471
2. 論文標題 運動療法の科学的機序	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 糖尿病専門新聞『DITN』	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 眞鍋康子	4. 巻 51
2. 論文標題 マイオカインによる代謝への影響	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 理学療法ジャーナル	6. 最初と最後の頁 535-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11477/mf.1551200902	査読の有無 無
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 眞鍋康子, 藤井宣晴	4. 巻 53
2. 論文標題 運動は本当に健康によいのか?	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 医薬ジャーナル	6. 最初と最後の頁 111-115,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 眞鍋康子, 藤井宣晴	4. 巻 35
2. 論文標題 運動の代謝作用と不活動	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 実験医学増刊	6. 最初と最後の頁 99-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 眞鍋康子	4. 巻 24
2. 論文標題 骨格筋から分泌されるホルモン（マイオカイン）の探索	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本運動生理学雑誌	6. 最初と最後の頁 7-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Tamura K, Furuichi Y, Manabe Y, Fujii NL	4. 巻 6
2. 論文標題 Role of satellite cells in skeletal muscle plasticity, beyond muscle regeneration.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Phys Fitness Sports Med	6. 最初と最後の頁 89-93
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7600/jpfsm.6.89	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 Kitamura K, Takamura Y, Iwamoto T, Nomura M, Iwasaki H, Ohdera M, Murakoshi M, Sugiyama K, Matsuyama K, Manabe Y, Fujii NL, Fushiki T	4. 巻 81
2. 論文標題 Dammarane-type triterpene extracts of Panax notoginseng root ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity by enhancing glucose uptake in skeletal muscle	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 335-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2016.1246173.	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17件（うち招待講演 6件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂本憲一, 竹本 稔, 古市泰郎, 高橋 恵, 秋元義弘, 山本 雅, 石川崇広, 前澤善朗, 清水孝彦, 眞鍋康子, 藤井宣晴, 横手幸太郎
2. 発表標題 新規筋衛星細胞発現遺伝子R3hdm1は筋衛星細胞の増殖能を制御し、骨格筋の分化再生に関わる
3. 学会等名 第91回日内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoko Sato, Yusuke Takamura, Ikko Yamana, Mitsuru Nomura, Akira Uchiyama, Yasuro Furuichi, Yasuko Manabe, Nobuharu L. Fujii
2. 発表標題 Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) augments muscle contraction-induced protein synthesis via mTORC1 signaling in cultured L6 myotubes.
3. 学会等名 Experimental Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本憲一, 竹本稔, 古市泰郎, 高橋恵, 秋元義弘, 山本雅, 石川崇広, 前澤善朗, 清水 孝彦, 眞鍋 康子, 藤井 宣晴, 横手 幸太郎
2. 発表標題 新規筋衛星細胞発現遺伝子R3hdm1は筋衛星細胞の増殖能を制御し、骨格筋の分化再生を促進する
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱口裕貴, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴, 眞鍋康子
2. 発表標題 骨格筋培養細胞の収縮力を評価する解析アルゴリズムの開発
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小宮祐希, 見城茜, 田岡万悟, 磯辺俊明, 坂井貴臣, 古市泰郎, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 Peroxi redoxin - 6が骨格筋の糖取り込みに与える作用
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞鍋康子, 濱口裕貴, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴
2. 発表標題 骨格筋細胞の収縮力を評価する系の確立
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 青木美穂, 三田佳貴, 内田沙綺, 眞鍋康子, 藤井宣晴:
2. 発表標題 グルコース制限はサテライト細胞の純粋かつ大量培養を可能にする
3. 学会等名 第6回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱口裕貴, 松井翼, 出口真次, 古市泰郎, 藤井宣晴, 眞鍋康子
2. 発表標題 :骨格筋培養細胞の収縮力を評価する解析アルゴリズムの開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古市泰郎, 川端有紀, 青木美穂, 三田佳貴, 内田沙綺, 眞鍋康子, 藤井宣晴
2. 発表標題 ルコース濃度がサテライト細胞の増殖能力に及ぼす影響
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞鍋康子
2. 発表標題 骨格筋細胞の張力を測定する新技術: (シンポジウム) 健康科学を牽引する基礎細胞
3. 学会等名 第73回日本体力医学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 眞鍋康子
2. 発表標題 筋に秘められた多彩な機能
3. 学会等名 大阪コスメ倶楽部定例勉強会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井宣晴, 田村晃太郎, 井上 (後藤) 菜穂子, 眞鍋康子, 古市泰郎
2. 発表標題 骨格筋から分泌され脂肪細胞に作用するマイオカインの探索 (シンポジウム)
3. 学会等名 第35回日本肥満治療学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井宣晴, 古市泰郎, 眞鍋康子
2. 発表標題 骨格筋量の維持のための要因 “基礎研究の視点から” (シンポジウム)
3. 学会等名 第72回日本体力医学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井宣晴, 眞鍋康子, 古市泰郎
2. 発表標題 骨格筋における細胞内情報伝達とサルコペニア (シンポジウム)
3. 学会等名 第4回日本サルコペニア・フレイル学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞鍋康子
2. 発表標題 内分泌器官としての骨格筋
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞鍋康子, 武藤敬正, 山田健一朗, 片倉健悟, 青木友那, 古市泰郎, 坂井貴臣, 藤井宣晴
2. 発表標題 Peroxi redoxin6のマイオカインとしての生理的意義の検証
3. 学会等名 第71回日本栄養食糧学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshitaka Mita, Miyuki Ito, Mio Yamada, Yasuro Furuichi, Yasuko Manabe, Nobuharu L. Fujii
2. 発表標題 Effect of chronic muscle contraction on endurance-training-associated protein expression in mouse primary cultured myotubes
3. 学会等名 The 3rd Congress, International Academy of Sportology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 眞鍋康子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 2
3. 書名 酒類のおいしさ『醸造の事典』	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 骨格筋初代細胞の培養液	発明者 古市泰郎、眞鍋康子、藤井宣晴	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、P2018-194A	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/index.html

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
研究協力者	井上 菜穂子 (Inoue Naoko)		