

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08993

研究課題名（和文）伸展刺激で得られる骨格筋細胞外小胞は新たな糖代謝改善薬になり得るか

研究課題名（英文）A study the possibilities that extracellular vesicles from muscle cells obtained by stretching stimulation can be a new target for improving glucose metabolism.

研究代表者

齋藤 従道 (saito, tsugumichi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80572619

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）：我々は骨格筋細胞に伸展刺激を加えて分泌される細胞外小胞(EVs)は脂肪細胞での糖取り込みを促進することを見出した。その作用として骨格筋より分泌されたEVsは直接脂肪細胞内に取り込まれ、糖取り込みに関するタンパクを直接脂肪細胞に導入する作用、またmiRNAを介してタンパク量を制御する両方の作用が存在することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋が収縮する運動が糖代謝改善作用があることは周知の通りであり、骨格筋量や機能が低下している高齢者、糖尿病・肥満症患者における糖尿病治療を困難にしている。骨格筋の伸展刺激により分泌される細胞外小胞(EVs)が生体内での糖代謝改善作用を有することが明らかとなれば、新たな糖尿病治療に繋がり、超高齢化社会を迎える日本での糖尿病予防・治療に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that the extracellular vesicles (EVs) secreted by stretch stimulation from skeletal muscle cells improve glucose uptake in adipocytes. The mechanism is that EVs are directly taken up into adipocytes and carry the protein and miRNA, which are related to glucose uptake.

研究分野：糖代謝

キーワード：細胞外小胞 骨格筋 糖取り込み 伸展刺激

1. 研究開始当初の背景

世界の糖尿病患者数は成人 11 人中 1 人と爆発的に増加し、健康寿命の短縮や医療経済の圧迫をもたらしており、新規糖尿病治療、発症予防法の開発は急務である。骨格筋は食後血糖の 80% を消費する最大臓器であるが、2 型糖尿病患者は健常者と比較し、骨格筋の糖取り込み能が 50-60% も障害されているため耐糖能異常を呈する。さらに、諸臓器 (脳、肝臓、脂肪、筋肉など) が独立して糖代謝を担っているのではなく、神経系、内分泌系機構を利用して他臓器と糖代謝ネットワークを構築し、恒常性を維持していることが解明されつつある (*Romacho et al. Acta Physiol 2014*)。従って、骨格筋の糖取り込み能改善は他臓器の糖代謝に影響を及ぼすことが予想される。事実、骨格筋はマイオカインと総称されるサイトカインを分泌し、糖代謝を制御することが報告されている。しかし、新たな糖代謝機構の解明、糖尿病薬治療薬へ応用されるまでには至っていない。その一役として、細胞間で移送され、遺伝子発現の制御や細胞内シグナル伝達を行っていることが想定されている細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) が関与する可能性が考えられているが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

骨格筋細胞 (C2C12 myotubes) の上清中に基底状態と伸展刺激中に分泌された EVs を単離し、別に培養した C2C12 細胞、脂肪細胞 (3T3L1 adipocytes) に添加したところ、伸展刺激により分泌された EVs のみ骨格筋、脂肪細胞の両方において糖取り込みを増加した。つまり、骨格筋細胞から分泌された EVs は脂肪細胞をも標的としていることから、骨格筋から分泌される EVs を介した臓器間の糖代謝制御ネットワーク機構が存在する可能性が示唆された。さらに刺激により分泌された EVs には脂肪細胞のインスリン刺激による糖取り込みも促進することを見いだした。

そのため、我々は伸展刺激した骨格筋から分泌される EVs は糖代謝改善作用を有する分子を含有すると想定し、糖代謝改善作用を有する EVs の解析を行い、新しい糖尿病治療を展開出来る基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1. EVs が直接細胞に作用するか確認

基底状態と伸展刺激中に分泌される EVs を精製し、蛍光染色を施した後、別に培養した脂肪細胞 (3T3L1 adipocytes) に添加した。添加 6 時間後、蛍光顕微鏡にて EVs の挙動を確認した。

2. EVs 内分子の解析

基底状態と伸展刺激中に分泌される EVs 含有蛋白を質量分析 (ショットガン法) にて比較解析した。

上記にて発現に変化のあった蛋白をウェスタンブロットにて確認した。

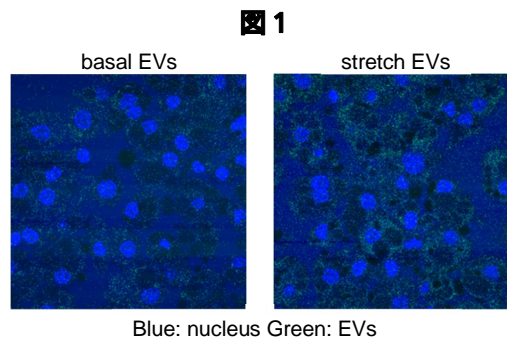
基底状態と伸展刺激中に分泌される EVs をマイクロアレイにて細胞外小胞内 small RNA の変化、含有量を解析した。

3. EVs の *In vivo* による機能解析

EVs のインスリン感受性増強作用を確認するため、糖尿病モデルマウス (ob/ob) に投与実験を行った。基底状態と伸展刺激中に分泌される EVs を精製し、8 週令の ob/ob マウスに腹腔内投与し、血糖測定し、脂肪組織での EVs 取り込みを確認した。

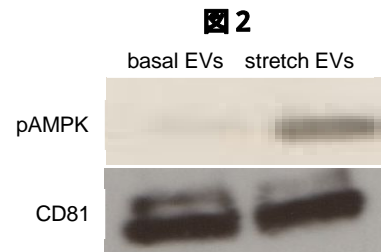
4. 研究成果

1. 基底状態にも C2C12 細胞から EVs が分泌されることが明らかとなった。基底状態に分泌される EVs (basal EVs) と伸展刺激により分泌された EVs (stretch EVs) のタンパク測定をしたところ、タンパク量に大きな変化は認めなかった。つまり、骨格筋培養細胞は常にほぼ同量の EVs を分泌し続けていることが明らかとなった。EVs が脂肪細胞外から作用することも想定し、

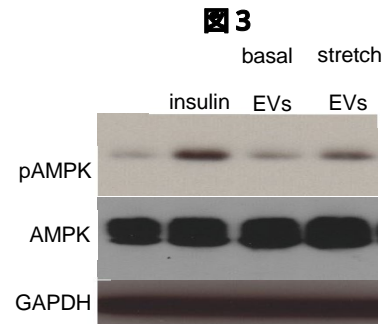


EVs の脂肪細胞との挙動を確認したところ、図 1 に示す通り basal EVs、stretch EVs 共に脂肪細胞内に取り込まれることを確認した。このことから、EVs 内に含有する分子が直接脂肪細胞内に取り込まれ、糖取り込みを制御する可能性が示唆された。

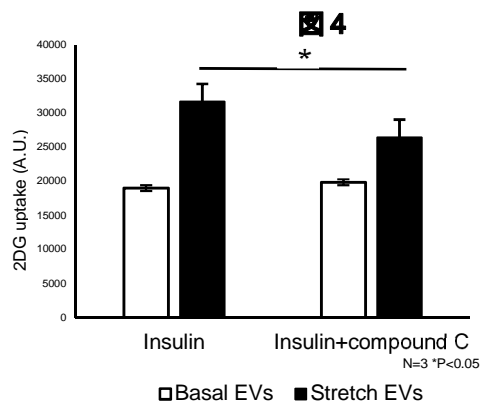
2. basal EVs と stretch EVs 内に含まれるタンパク質を質量分析にて解析したところ、stretch EVs にてリン酸化 AMPK (AMP 活性化プロテインキナーゼ) が増加している可能性が示唆された。そこで EVs 内のリン酸化 AMPK (pAMPK) の発現量をウェスタンブロットにて確認したところ、stretch EVs 内には basal EVs と比較し有意に pAMPK を含有していることが明らかとなった (図 2)。



3. また、Evs を添加した脂肪細胞内のリン酸化 AMPK をウェスタンブロットにて確認したところ、stretch EVs を添加した脂肪細胞のリン酸化 AMPK が増加していることが判明した (図 3)。つまり、骨格筋細胞から stretch EVs を介して脂肪細胞内のリン酸化 AMPK が増加した可能性が示唆された。



4. EVs 添加前に AMPK の阻害剤である Compound C を前処置して、糖取り込みを観察すると、図 4 に示す通り stretch EVs による糖取り込み作用が減少した。以上から、stretch EVs により持ち込まれたリン酸化 AMPK が脂肪細胞での糖取り込みを促進していると考えられた。



5. 事前に stretch EVs を投与した脂肪細胞内において、糖取り込みに関与する分子として糖輸送担体 (Glut4) タンパク量が増加していることが分かっていた。EVs に含まれる Glut4 タンパク量には basal EVs と stretch EVs 間には変化を認めなかった。マイクロアレイにて small RNA を解析したところ、Glut4 の発現に関与することが報告されている miRNA (Esteves JV et al. Front Endocrinol. 9:536.2018) の中で複数の miRNA 量が basal EVs と stretch EVs 間で変化を認めた。

以上のことから stretch Evs による脂肪細胞における糖取り込み促進作用は、EVs が直接細胞内に取り込まれ、糖取り込みに関するタンパクを直接導入する作用、また miRNA を介してタンパク量を制御する両方の作用が存在する可能性が示唆された。

6 . マウスへの投与予備実験では明らかな血糖変動は認めなかった。In vivo でも EVs が直接脂肪細胞に取り込まれるのかを確認中である。また、投与する EVs の濃度、投与方法などの条件設定を行なっている最中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Tsugumichi Saito	4. 巻 6
2. 論文標題 Research on skeletal muscle secretory glucose metabolism improver	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 37-39
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimizu Tomohiko, Saito Tsugumichi, Aoki Saito Haruka, Okada Shuichi, Ikeda Hiroyuki, Nakakura Takashi, Fukuda Hayato, Arai Syota, Fujiwara Kouichi, Nakajima Yasuyo, Horiguchi Kazuhiro, Yamada Sayaka, Ishida Emi, Hisada Takeshi, Shuto Satoshi, Yamada Masanobu	4. 巻 36
2. 論文標題 Resolvin E3 ameliorates high fat diet induced insulin resistance via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt signaling pathway in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	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） 10.1096/fj.202100053R	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 齋藤従道
2. 発表標題 骨格筋由来細胞外小胞はAMPK依存性シグナルにより脂肪細胞での糖取り込み機構を制御する。
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsugumichi Saito, Haruka Saito-Aoki, Tomohiko Shimizu, Aya Osaki, Eijiro Yamada, Shuichi Okada, Masanobu Yamada
2. 発表標題 The extracellular vesicles from myotubes improved insulin-stimulated glucose uptake in adipocytes by regulating AMPK pathway and glut4 expression.
3. 学会等名 European association for study diabetes (EASD) 57th Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	齋藤 悠 (Saito Haruka)	群馬大学・呼吸器・アレルギー内科・助教 (12301)	

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