

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07802

研究課題名(和文)サルコペニアを促進する病態における運動の有効性に関するIL-15の役割の解明

研究課題名(英文)Clarification of the role of Interleukin-15 for the efficacy of exercise on physiological conditions promoting sarcopenia

研究代表者

杉本 研 (Sugimoto, Ken)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：20437403

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)：本研究において、糖尿病に対する運動療法による骨格筋の微小循環障害の予防には、IL-15を介した筋代謝活性の改善が関与していることが示された。また骨格筋由来IL-15は骨格筋自身に対し、筋分化に関与している可能性がある。IL-15の骨格筋内の分泌動態に関しては、IL-15が筋細胞膜へ移行し分泌され、他臓器に作用する際には受容体の一つであるIL-15R との複合体形成が重要であることが示された。糖尿病患者の血液サンプルを用いた検討ではIL-15を含むいくつかのサイトカインがサルコペニア発症と関連する可能性が示されたが、結論づけるには他集団での検証や介入研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりIL-15が糖尿病のようなサルコペニアを促進させる病態において、運動を介してサルコペニアに対して抑制的に作用する可能性が示された。またIL-15はIL-15R と複合体を形成することで細胞外へ分泌され、骨格筋内のみならず、周囲組織へも影響すると考えられた。この結果から、高血糖や酸化ストレス、炎症といったサルコペニアを誘導する状況において、運動により分泌されたIL-15が骨格筋自身および周囲組織の代謝を改善し、病態の改善に関連すると考えられる。しかし、IL-15のマイオカインとして意義や、バイオマーカーとして臨床応用できるかを明らかにするには、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：The present study showed that the improvement in muscle metabolic activity mediated by IL-15 was involved in the prevention of microcirculatory dysfunction in skeletal muscle by exercise therapy for patients with diabetes. As for the dynamics of IL-15 secretion in skeletal muscle, the formation of IL-15 complexed with IL-15R, which is a receptor needed to function in other organs, would be important for the translocation and secretion of IL-15 to the muscle cell membrane. Investigations targeting patients with diabetes showed that some cytokines, including IL-15, may be associated with the development of sarcopenia, but validation in other populations or intervention studies is needed to be established as a biomarker for sarcopenia.

研究分野：老年医学

キーワード：サルコペニア マイオカイン IL-15

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦が直面している超高齢社会において健康寿命の延伸は喫緊の課題であり、健康寿命を短縮させる要因であるサルコペニアは、診断基準の設定により実態が明らかとなり重要性が浸透しつつある。これまでの研究からサルコペニアは加齢以外にも、活動性や栄養状態などの生活・環境因子や、罹患している慢性疾患がその発症に影響することが明らかにされ、骨格筋のみにとどまらない全身性疾患として位置付けられつつある。

近年、骨格筋が内分泌臓器であることが注目され、液性因子を介した筋-筋または筋-多臓器連関が存在することが知られているが、慢性疾患がサルコペニアを誘導するという観点からも骨格筋由来サイトカインであるマイオカインは、臓器連関の解明やバイオマーカーの確立における標的として期待できる。マイオカインは骨格筋から分泌される機能性因子として、他臓器や骨格筋自身に対し様々な生理作用を有することがこれまでに報告されている。マイオカインは持続的に分泌される構成性分泌型と、筋収縮により分泌される調節性分泌型とに大別されるが、本研究でターゲットとするインターロイキン 15 (IL-15) は調整性分泌型である。IL-15 は免疫細胞における役割の他、マイオカインとして筋同化作用や糖代謝への影響が知られる (図 1)。我々は骨格筋特異的 IL-15 トランスジェニックマウス (IL-15mTG) が野生型と比較し、糖代謝と筋質が良いことを報告した (BBRC 2019)。またこの報告において、糖代謝に対する IL-15 の影響は高脂肪食群でより大きかったことから、高脂肪食による全身性炎症下でより

IL-15 の効果が発揮されると推察される (図 2)。また我々は IL-15 と IL-15 α 受容体が筋細胞内で複合体を形成し、細胞膜に移行するとともに IL-15 のタンパク発現が増加するという実験結果を得ている (図 3) が、骨格筋における作用機構や細胞内動態 (分泌機構を含む) について既報は無く、詳細は不明である。我々は、「高血糖や酸化ストレス、炎症などの病態においてこそ運動による IL-15 分泌の意義があるのではないか」という学術的「問い」に対して、分泌機構の解明、IL-15 活性化治療の開発に向けた標的探索のための IL-15 と各受容体 (Ra,R β ,R γ) の細胞内動態とシグナル伝達の解明を目的とした研究を計画した。

2. 研究の目的

研究①：高血糖、酸化ストレス、炎症下での筋収縮刺激の有無による IL-15 作用 (糖代謝、筋同化、ミトコンドリア機能) の変化の検討、研究②：IL-15 とその受容体の動態と分泌・作用機構の解明、研究③：IL-15 のバイオマーカーとしての可能性の検討を目的とする。

3. 研究の方法

研究①：高血糖や酸化ストレス、炎症などの病態において運動によって IL-15 が分泌される機序とその意義の解明

雄性 Goto-Kakizaki ラットを用いて、糖尿病群 (DM)、血流制限群 (DM+Bfr)、電気刺激群 (DM+ES) 及び血流制限と電気刺激の併用群 (DM+Bfr+ES)、対照群として雄性 Wistar ラット (Cont) の 5 群比較を行った。血流制限は大腿部にカフを用いた圧迫を 5 分間、4 回/日実施した。電気刺激は下腿後面に電極を貼り、3 回/週、8 週間実施した。実験期間終了後に血清およびヒラメ筋を摘出し、血中グルコース濃度、3 次元構造解析により血管径及び血管容量、血管新生、退行に関連する因子 (HIF-1 α 、TSP-1、IL-15、AMPK、PGC-1 α 、VEGF) のタンパク質発現量を測定した。

研究②：IL-15 活性化治療の開発に向けた標的探索のための IL-15 と各受容体の細胞内動態とシグナル伝達の解明

骨格筋芽細胞 (C2C12) を筋管細胞に分化させ、分化に伴う遺伝子発現変化を検討した。次に、蛍光タンパクで標識した IL-15 (GFP 標識)、IL-15Ra、IL-2R β /R γ (OFP 標識) を遺伝子導入した系を用い、IL-15 または IL-15-IL-15Ra 複合体の細胞内局在変化を IL-2R β /R γ の存在の有無を含めて検討するとともに、シグナル伝達機構を解析した。

研究③：糖尿病患者を対象としたサルコペニアに関する多施設前向きコホート研究の血液サンプルを用い、マルチプレックスサスペンションアレイを用いて IL-15 を含めた数種類のサイトカ

図1.本研究の学術的背景

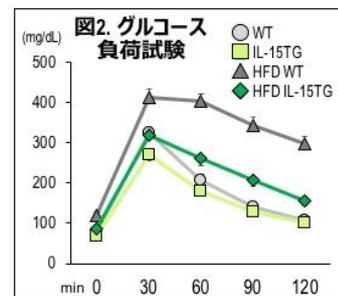
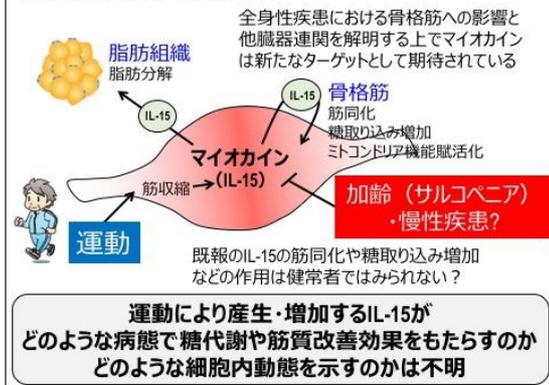
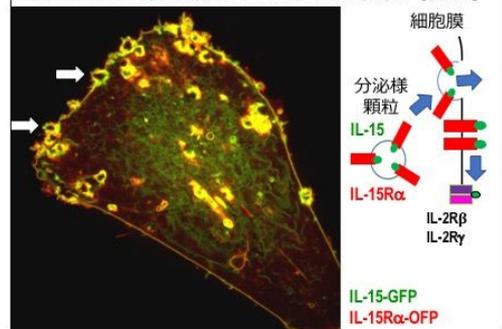


図3. IL-15の骨格筋細胞内動態・分泌機構 (仮説)



インと筋量、筋力といったサルコペニア指標との関連を横断的に検討した。

4. 研究成果

研究①：血流制限と電気刺激の併用療法を行った群ではその他の群に比し、血管新生に関わる分子である VEGF の発現を上昇させ、毛細血管径および血管容量の低下が抑制されていた(図 4、5)。また血流制限群では、IL-15 の制御因子の一つとされ、AMPK の下流シグナルである PGC-1 α の発現が他群よりも上昇していた。さらに IL-15 の発現は電気刺激群で上昇していたことから、IL-15 は AMPK-PGC-1 α 軸の活性化を介して VEGF 発現上昇を誘導すると考えられ(図 6、7)。また VEGF 発現上昇は血管新生を促進することで筋低酸素状態を改善させたと考えられる。一方で、骨格筋内の慢性的な低酸素状態で上昇する血管新生抑制因子(TSP-1 など) が糖尿病群で上昇しており、糖尿病の骨格筋では血管退行による低酸素が生じていると考えられた。

以上の結果から、糖尿病モデルにおいて血流制限下での電気刺激は血管新生を促進させ、骨格筋内低酸素状態の改善に寄与しており、この変化が血管新生抑制因子の上昇を抑制し、毛細血管の退行を減弱させたと考えられる。高血糖状態では終末糖化産物(AGEs) を介した酸化ストレスや炎症の影響により筋微小循環障害が生じるとともに、筋細胞の AMPK-PGC1 α 軸が抑制されてミトコンドリア機能障害や筋タンパク合成障害が生じるが、適度な血流制限や電気刺激により、筋微小循環と AGEs による筋細胞障害が抑制されると考えられ、そのメカニズムに筋収縮刺激により増加する IL-15 が関与していることが示唆された(詳細は J Appl Physiol 131: 1219-1229, 2021 を参照)。

図 4. 血管容量

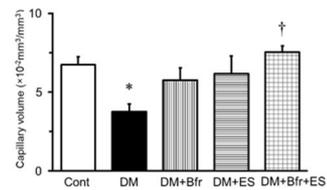


図 5. 血管径

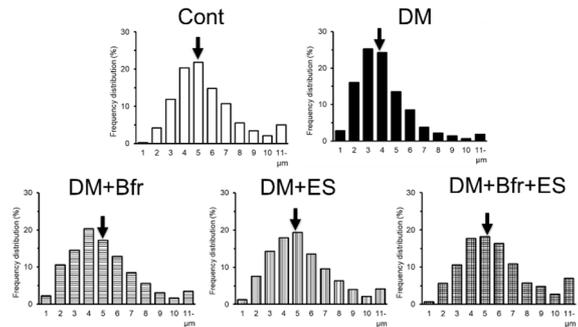


図 6.

終末糖化産物および血管新生関連因子

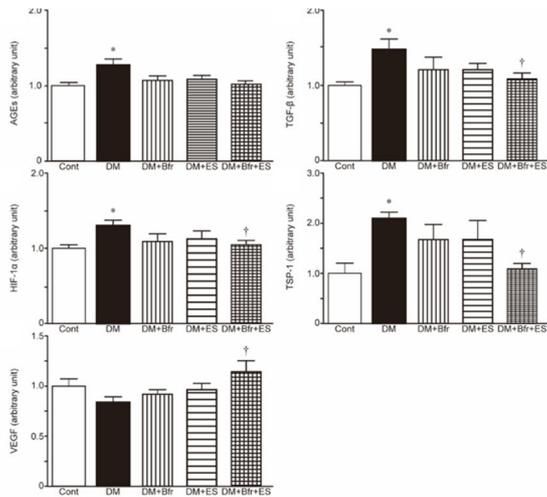
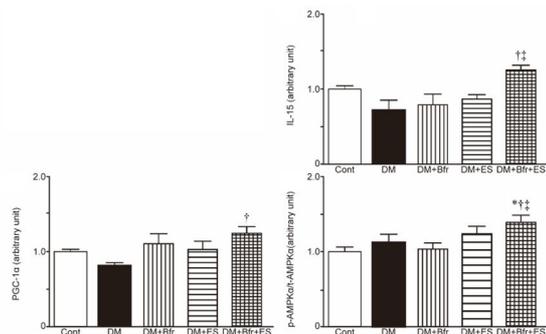


図 7.

IL-15 およびミトコンドリア関連因子



研究②：骨格筋芽細胞を用いた検討において、IL-15 は筋分化とともにシグナル伝達に関連する IL-2R β /R γ を増加させること、また IL-15 は IL-15R α と複合体(IL-15/L-15R α) を形成し、それが細胞膜に移行することで IL-15 自体の発現量が増加することが明らかとなった(図 8、9)。

これまでに免疫細胞では IL-2R β /R γ が IL-15 の下流シグナル伝達に関わっていること、IL-15/L-15R α 複合体が可溶性複合体として血漿内に放出されることが報告されており、それを考慮すると、骨格筋においても同様のメカニズムが関与して、筋分化や代謝を調節している可能性がある(詳細は Exp Physiol 107: 222-232, 2022 を参照)。

図 8.

筋分化ともなう IL-15 とその受容体発現の変化

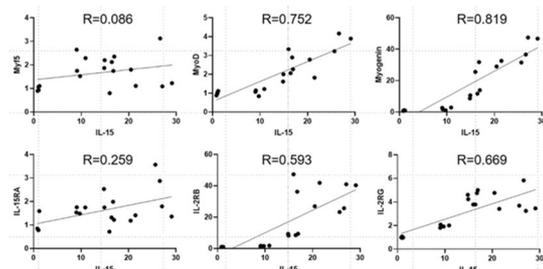
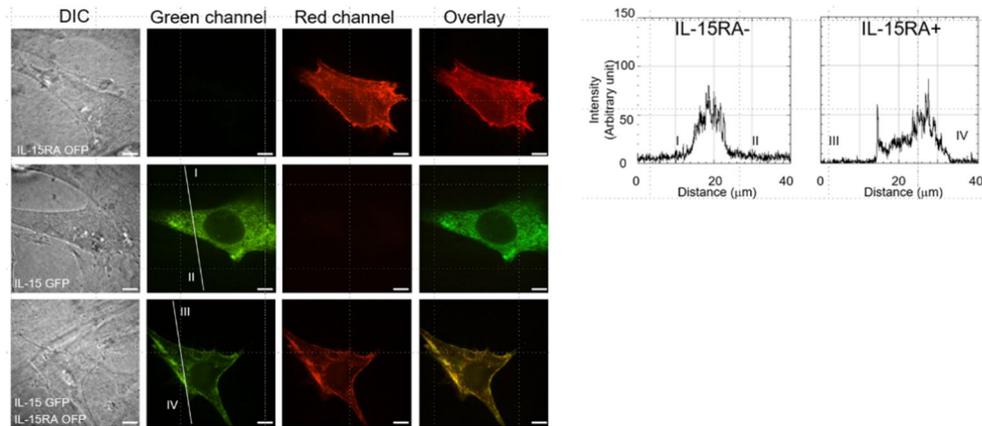


図 9. IL-15/IL-15Ra 複合体は細胞膜に移行する



研究③：糖尿病患者の血液サンプルを用いた検討では、いくつかの液性因子、たとえば筋分化に関わることが知られているインスリン様調節因子(IGF-1)や血管作動性物質であるアドレノメデュリンなどがサルコペニアと関連する因子として抽出されたが、IL-15 とサルコペニアとの関連はみられなかった。IL-15 との関連がみられなかった要因として、IL-15 が筋収縮刺激により一時的血液中に放出されるために、基礎値としての変化がみられなかったことが考えられる。このことを結論づけるには、他の集団や介入研究による検証や、測定系の工夫や確立が必要であると考えられた。

本研究により、IL-15 が糖尿病といったサルコペニアを促進する病態において、運動を介してサルコペニア抑制的に作用する可能性を示す基礎的な知見は得られたが、現段階ではデータが不十分であり、IL-15 のノックアウトマウスを用いた検討や、筋細胞刺激系を用いたシグナル分析などにより明らかにする必要がある。また IL-15 のマイオカインとしての意義を確立させるためには、更なる検討が必要である。しかし、サルコペニア予防または改善を目的とした運動処方を確立する上で IL-15 が重要な分子の一つである可能性を示すことができたことは、本研究の最大の成果と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshida Shino, Fujimoto Taku, Takahashi Toshimasa, Sugimoto Ken, Akasaka Hiroshi, Tanaka Minoru, Huang Yibin, Yasunobe Yukiko, Xie Keyu, Ohnishi Yuri, Minami Tomohiro, Takami Yoichi, Yamamoto Koichi, Rakugi Hiromi	4. 巻 107
2. 論文標題 Interleukin 15 receptor subunit alpha regulates interleukin 15 localization and protein expression in skeletal muscle cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Physiology	6. 最初と最後の頁 222 ~ 232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/EP090205	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 Tanaka Minoru, Morifuji Takeshi, Sugimoto Ken, Akasaka Hiroshi, Fujimoto Taku, Yoshikawa Madoka, Nakanishi Ryosuke, Kondo Hiroyo, Fujino Hidemi	4. 巻 131
2. 論文標題 Effects of combined treatment with blood flow restriction and low-current electrical stimulation on capillary regression in the soleus muscle of diabetic rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physiology	6. 最初と最後の頁 1219 ~ 1229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/jappphysiol.00366.2021	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋利匡、吉田紫乃、藤本拓、横山世理奈、本行一博、中神太志、赤坂憲、鷹見洋一、杉本研、山本浩一、楽木宏実
2. 発表標題 骨格筋におけるIL-15RaによるIL-15調整機構の解明
3. 学会等名 第57回高血圧関連疾患モデル学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 研究・診療グループ紹介 代謝・糖尿病研究室
<https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/www/jgrp.html>
 大阪大学大学院医学系研究科 老年・総合内科学 研究・診療グループ紹介
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/geriat/www/jgrp.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
研究分担者	藤本 拓 (FUJIMOTO TAKU) (10854284)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤) (14401)	
研究分担者	樂木 宏実 (RAKUGI HIROMI) (20252679)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	高橋 利匡 (TAKAHASHI TOSHIMASA) (60807270)	大阪大学・医学部附属病院・助教 (14401)	

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