

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16148

研究課題名（和文）重炭酸イオンシグナルによるエキソサイトーシスの制御機構の解明

研究課題名（英文）Bicarbonate-induced exocytosis

研究代表者

城 愛理（渡辺愛理）（Jo-Watanabe, Airi）

順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授

研究者番号：40726197

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）：近年、筋細胞が様々な生理活性因子（マイオカイン）を分泌することが知られてきた。筋細胞が分泌するマイオカインは、筋細胞自身のみでなく遠隔臓器に作用することがわかってきている。一方、老化によって細胞外分泌パターンが変わることも知られている。本研究では、重炭酸イオンが細胞内シグナル伝達や細胞外分泌に与える影響を解析し、さらに細胞老化が細胞外分泌に与える影響を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心臓や肝臓などの体内の各臓器は、それ自身だけでなく他の臓器にも影響を与えながら生体恒常性の維持に寄与している。本研究結果により、筋肉が遠隔臓器に与える影響やその加齢による変化についての *in vitro* の基礎的治験が得られた。これらの成果を生体に応用することで、多臓器連関や老化による影響の解明に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent studies have revealed that myocytes secrete various bioactive molecules, which are called as myokines. These secreted molecules act not only on neighboring cells but also distant organs. Studies also revealed that aging affects the secretome. In this study, we studied how bicarbonate affects intracellular signaling and secretion and how cellular senescence affects secretome.

研究分野：生化学

キーワード：エキソサイトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、筋細胞が様々な生理活性因子(マイオカイン)を分泌することが知られてきた。筋細胞が分泌するマイオカインは、筋細胞自身のみでなく遠隔臓器に作用することがわかってきている。一方、老化によって細胞外分泌パターンが変わることも知られている。

2. 研究の目的

本研究では、まず、重炭酸イオンが細胞内シグナル伝達や細胞外分泌に与える影響を明らかにする。また、細胞老化が分泌に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 重炭酸イオンシグナルがシグナル伝達に与える影響の解析

マウス筋芽細胞 C2C12 に重炭酸ナトリウムを添加し、1, 3, 5, 10, 15 分と経時的に培養上清および細胞を回収した。培養上清は限外濾過による濃縮ののち、BDNF のウェスタンブロッティングを行い、重炭酸イオン刺激による BDNF の分泌を解析した。培養細胞 lysate は、ERK のリン酸化および CaMKII のリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析した。

(2) 細胞老化がエクソサイトーシスに与える影響の解析

酸化ストレスによる老化を模倣するため、 H_2O_2 により老化誘導を行った。まず、C2C12 細胞における細胞老化誘導条件を決めるため、 H_2O_2 の濃度と時間を振り、誘導される細胞老化を評価した。老化の評価は、定量 PCR による老化マーカー p53, p21 の発現量解析と Senescence-Associated β -galactosidase (SA- β -gal) 染色で行った。

(3) 脳微小血管細胞のエクソサイトーシスの解析

マウスの脳実質から、dissection および酵素処理後、パーコール処理により、微小血管片を得た。微小血管片をコラーゲンコート dish に播種し、翌日に細胞の接着を確認した。内皮用増殖培地 EGM2 で 1 週間培養し、培養上清を回収し、超遠心によって細胞外小胞 (EVs) を単離した。この細胞外小胞の大きさや個数を、細胞外小胞解析装置 VideoDrop を用いて計測し、必要な培養スケールおよび培養条件を検討した。エレクトロポレーションには、Neon Transfection system を用いた。

4. 研究成果

(1) 重炭酸イオンシグナルがシグナル伝達に与える影響の解析

本研究ではまず、重炭酸イオン刺激によるシグナル伝達経路の活性化について解析を行った。C2C12 細胞に重炭酸ナトリウムを添加し、ERK のリン酸化、CaMKII のリン酸化をウェスタンブロッティングにより評価した。また、培養上清中の分泌タンパク質の量的・質的变化を解析するため、培養上清の銀染色や BDNF のウェスタンブロッティングを行った。

(2) 細胞老化がエクソサイトーシスに与える影響の解析

まず、老化誘導条件を決めるため、6 well plate に C2C12 細胞を 2×10^5 個/well で播種し、80% コンフルエントの状態での老化誘導を開始した。0, 10, 50, 100, 250, 500 μ M の H_2O_2 を含む DMEM で 2 時間処理を行ったのちに増殖培地で 3-7 日培養し、老化マーカーの上昇を確認した。老化マーカーとして、定量 PCR による p53, p21 発現量の解析と、Senescence-associated β -Galactosidase 染色を行った。その結果、50 μ M H_2O_2 で 2 時間処理を老化誘導条件とした。

次に、老化誘導による C2C12 細胞の分泌機能への影響を解析した。老化誘導後の C2C12 細胞を無血清培地で 6 時間培養し、培養上清中のタンパク質量を銀染色で評価した。

(3) 脳微小血管細胞のエクソサイトーシスの解析

最後に本研究では、脳微小血管細胞からの細胞外分泌の解析を行った。まず、マウスの脳より微小血管を単離し、ディッシュに播種して翌日に微小血管片周囲での細胞の接着を確認した。その後 7 日間、微小血管構成細胞の混合培養を行なった後、培養上清を回収し、超遠心によって細胞外小胞 (EVs) を単離した。この細胞外小胞の大きさや個数を、細胞外小胞解析装置 VideoDrop を用いて計測し、必要な培養スケールおよび培養条件を検討した。

さらに、各種遺伝子を導入した微小血管細胞で細胞外小胞の解析を行うため、エレクトロポレーションによる初代培養細胞への遺伝子導入条件を検討し、至適なパルス条件を得た。

以上より、本研究によって、マウス筋芽細胞における細胞外分泌やその老化による影響を明らかにし、さらに初代培養（マウス脳の微小血管細胞）における細胞外小胞の解析手法を最適化することができた。

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 2件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Shioda Ryotaro, Jo Watanabe Airi, Okuno Toshiaki, Saeki Kazuko, Nakayama Maiko, Suzuki Yusuke, Yokomizo Takehiko | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 The leukotriene B4/BLT1 dependent neutrophil accumulation exacerbates immune complex mediated glomerulonephritis | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 e22789~e22806 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202201936R | 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 Shioda Ryotaro, Jo-Watanabe Airi, Lee-Okada Hyeon-Cheol, Yasukawa Ken, Okuno Toshiaki, Suzuki Yusuke, Yokomizo Takehiko | 4. 巻 582 |
| 2. 論文標題 Dietary intake of n-3 polyunsaturated fatty acids alters the lipid mediator profile of the kidney but does not attenuate renal insufficiency | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 49 ~ 56 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.028 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Oh-hora M, Shioda R, Jo-Watanabe A, Okuno T, Saeki K, Nakayama M, Suzuki Y, Yokomizo T. |
| 2. 発表標題 The leukotriene B4-BLT1 axis in neutrophils exacerbates crescentic glomerulonephritis. |
| 3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ryotaro Shioda, Jo-Watanabe Airi, Maiko Nakayama, Yusuke Suzuki. |
| 2. 発表標題 Leukotriene B4-BLT1 axis controls neutrophil accumulation via Fc receptor-dependent leukotriene B4 production in experimental glomerulonephritis. |
| 3. 学会等名 The American Society of Nephrology, Kidney Week 2021（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 塩田遼太郎, 城愛理, 奥野利明, 中山麻衣子, 鈴木祐介, 横溝岳彦 |
| 2. 発表標題 LTB4-BLT1軸による糸球体腎炎の病態制御機構の解明と治療への応用 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 塩田遼太郎, 城愛理, 奥野利明, 鈴木祐介, 横溝岳彦 |
| 2. 発表標題 ロイコトリエンB4-BLT1軸はFc 受容体依存的に腎炎急性期の好中球浸潤を制御する |
| 3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 塩田遼太郎, 城愛理, 奥野利明, 横溝岳彦, 鈴木祐介 |
| 2. 発表標題 ロイコトリエンB4-BLT1軸はFc 受容体依存的に腎炎急性期の好中球浸潤を制御する |
| 3. 学会等名 第64回日本腎臓学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 yotaro Shioda, Jo-Watanabe Airi, Toshiaki Okuno, Maiko Nakayama, Takehiko Yokomizo, Yusuke Suzuki. |
| 2. 発表標題 Leukotriene B4-BLT1 axis controls neutrophil accumulation via Fc receptor-dependent leukotriene B4 production in experimental glomerulonephritis. |
| 3. 学会等名 第5回文京腎研究会 |
| 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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|