

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19505

研究課題名（和文）運動依存的なマイオカインの分泌に骨格筋Ca<sup>2+</sup>シグナルが与える影響

研究課題名（英文）The effects of intramuscular calcium signaling on the exercise-induced secretion of myokines

研究代表者

伊藤 尚基 (Ito, Naoki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 ジェロサイエンス研究センター・プロジェクトリーダー

研究者番号：50746534

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢に伴って適切な筋量・筋力を維持できなくなるサルコペニアが医学的・経済的課題となっている。高齢者では運動依存的なマイオカインの分泌が生じにくくなっており、サルコペニアとの関連が示唆されている。しかし、加齢に伴い、運動依存的なマイオカインの分泌が低下する原因は明らかになっていない。本研究では乳酸が骨格筋Ca<sup>2+</sup>シグナルの活性化を介して、マイオカインの一つであるIL-6の発現を制御していることを明らかにした。そのため、“運動 乳酸の上昇 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇 マイオカインの分泌の促進”という経路の破綻がサルコペニア病態の一端を担っている可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴うマイオカインの分泌不全の原因は大部分が未解明であり、その改善法も確立されていない。その理由として、“運動や筋収縮という刺激が、どのようなメカニズムを介してマイオカインの分泌を促進するのか？”という基本的な問いに対する答えが得られていないことが挙げられる。本研究によって、乳酸依存的なマイオカインの分泌機構が明らかになった。特に高齢者では代謝系の破綻が生じていることが報告されており、乳酸依存的なマイオカインの分泌機構の破綻がサルコペニア病態の一端を担っている可能性がある。今後、より詳細な分子機構を明らかにすることで、サルコペニアに対する分子標的・創薬技術基盤の構築が期待される。

研究成果の概要（英文）：Sarcopenia is an urgent medical and socio-economic problem in rapidly aging societies. In particular, sarcopenia has been associated with the impaired secretion of myokines in response to exercise or muscle contraction. In this study, I revealed that increases in lactate levels induced up-regulation of IL-6 in an intramuscular calcium-dependent manner. My results suggested the impairment in lactate-induced activation of calcium signaling as a cause of aging-associated impairment in the secretion of myokines.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：骨格筋 サルコペニア マイオカイン Ca<sup>2+</sup>シグナル 乳酸

## 1. 研究開始当初の背景

骨格筋は、個体の体重や運動量の変化に応じ、生涯を通じてその筋量・筋力を変化させる。これは運動などの物理的な刺激に応じて骨格筋由来のサイトカイン（マイオカイン）が分泌され、多臓器相関を介した全身性のエネルギー調節によって適切な筋量・筋力が維持されるためである。しかし近年、加齢に伴って適切な筋量・筋力を維持できなくなるサルコペニアが社会的問題となっている。

運動によって Interleukin-6 (IL-6) や Irisin といった数多くのマイオカインが分泌される。分泌されたマイオカインは脂肪・肝臓といった代謝臓器に作用し、脂質・糖代謝を制御することで、全身性のエネルギー調節を行う。顕著な例として、IL-6 受容体阻害抗体を投与すると、運動依存的な内臓脂肪の低下が生じなくなることがヒト試験において示されている (Wedell-Neergaard AS *et al.*, *Cell Metab*, 2019)。また、インスリン抵抗性といった代謝異常が運動依存的なマイオカインによって改善されることから、運動療法は肥満やⅡ型糖尿病を始めとした代謝疾患に対する治療の大きな柱となっている。

しかし、高齢者では運動依存的なマイオカインの分泌が生じにくくなっており (Della Gatta PA *et al.*, *Brain Behav Immun*, 2014)、サルコペニアとの関連が示唆されている。高齢者ではマイオカインの分泌量の低下、およびマイオカインを介した骨格筋と他臓器との相関不全が起きているため、マイオカインを介した運動効果が低減している。この運動効果の低減は、肥満・糖尿病を誘発するだけでなく、全身性のエネルギー調節の異常を発端としたサルコペニアをも誘引すると考えられる。そして、この代謝異常を伴うサルコペニアが、更なる多臓器相関不全を生むという、負の連鎖が高齢者で生じていることが示唆される。そのため、加齢依存的なマイオカインの分泌低下は、サルコペニアに対する介入法を確立するうえで大きな医学的障壁となっている。

近年、多くのマイオカインが同定され、その機能解析が進んでいる。しかし、“なぜ加齢に伴って、運動依存的なマイオカインの分泌が低下するのか？”という問いに加え、“そもそも”運動や筋収縮という刺激が、どのようなメカニズムを介してマイオカインの分泌を促進するのか？”、という基本的な問いに対する答えは得られていない。加齢に伴うマイオカイン分泌低下の原因を明らかにし、運動療法の効果を最大化させるためには、運動依存的にマイオカインが分泌されるメカニズムを明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、運動負荷により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルが急速に活性化することを発見し、この負荷依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの活性化によって筋肥大が促進されることを示してきた (Ito N *et al.*, *Nat Med*, 2013. Ito N *et al.*, *Channels*, 2013. Ito N *et al.*, *Int J Mol Sci*, 2018.)。興味深いことに、薬理的に  $\text{Ca}^{2+}$  シグナルを活性化させるだけで、筋肥大が促進し、筋萎縮が軽減される。これらの結果は、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの活性化こそが、運動と筋肥大を繋ぐ本質であること、また、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの活性化により、運動依存的な現象を模擬できることを示している。さらに、 $\text{Ca}^{2+}$  シグナルの活性化、および  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル依存的な Erk1/2 の活性化により、マイオカインの一つである IL-6 の発現および分泌が促

進されることを *in vitro* において明らかにしている (Ito N *et al.*, *Int J Mol Sci.* 2018.)。

そこで本研究では、“運動依存的なマイオカインの分泌に骨格筋  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが与える影響”を明らかにすることを目的とした。これにより、“負荷依存的な  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの活性化が、マイオカインの分泌を促すトリガーとなる”ことを示す。さらに、“負荷依存的な  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの機能破綻が、加齢に伴うマイオカインの分泌不全を生じさせる”という仮説を検証し、サルコペニアに対する分子標的・創薬技術基盤を構築する。

### 3. 研究の方法

*in vitro* の解析では C2C12 マウス筋芽細胞株、あるいは単一筋線維単離法によって樹立した初代筋芽細胞を用いた。これらの細胞を筋管へと分化させ、解析を行った。また 3~4 ヶ月齢の若齢マウスから単一筋線維を単離し、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングなどの解析を行った。 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングには Fluo-4 を用いた (Ito N *et al.*, *Int J Mol Sci.* 2018.)。Fluo-4 処理後に各  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルや受容体に対する阻害剤処理を行い、 $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを行った。細胞内シグナルの解析においては、乳酸処理を行った 30 分後に細胞を液体窒素で瞬間凍結し、解析を行った。また *in vivo* の解析には 3~4 ヶ月齢の若齢マウスを用いた。

### 4. 研究成果

本研究では運動依存的なマイオカインの分泌に骨格筋  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルが与える影響を明らかにすることを目的とし、まず運動と骨格筋  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルの活性化を繋ぐ上流因子の同定を試みた。そこで研究代表者は、運動依存的に活性化される糖代謝系に注目した。運動依存的にグルコースの取り込み、そして解糖系が活性化される。しかし、解糖系の活性化、および解糖系に属する代謝物とマイオカインの分泌との関係は明らかになっていない。そこで“解糖系代謝産物が骨格筋  $\text{Ca}^{2+}$ シグナルを活性化することで、マイオカインの分泌を制御する”という仮説を立てた。

解糖系に属する各種代謝物を用いた  $\text{Ca}^{2+}$ イメージングを行った。その結果、解糖系最終産物である乳酸によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇することを発見した。この乳酸依存的な  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は C2C12 由来の筋管、単一筋線維単離法に樹立した初代筋芽細胞由来の筋管、および生体若齢マウスより単離した単一筋線維全てにおいて確認された (図 1 A)。またピルビン酸などの他の解糖系代謝物によっては細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は上昇しなかった (図 1 B)。

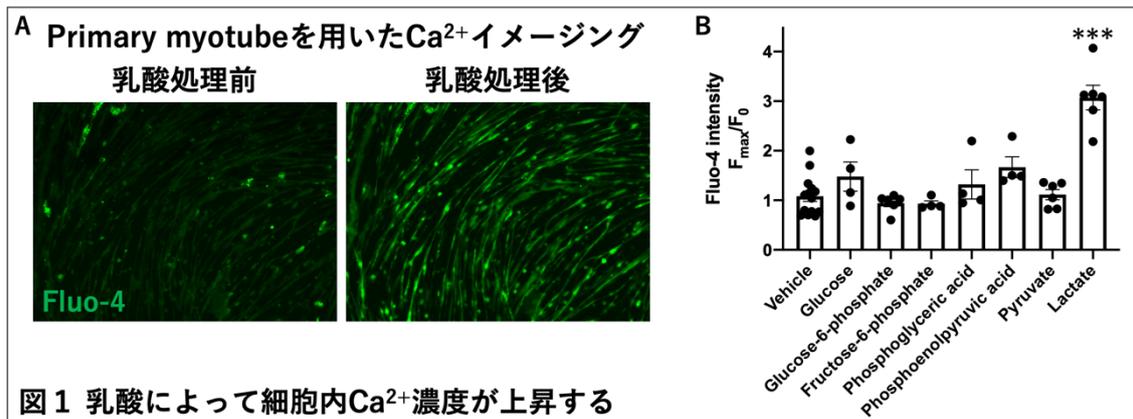


図 1 乳酸によって細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇する

さらに乳酸による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇によって活性化しうる細胞内シグナルを解析した。その結果、乳酸処理によって mTOR 下流分子の p70S6K および S6 のリン酸化

が上昇したが、Akt のリン酸化は上昇しなかった (図 2 A)。研究代表者は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇依存的に生じる mTOR の活性化は、Akt 非依存的に起こることを示している (Ito N *et al.*, *Nat Med*, 2013. Ito N *et al.*, *Channels*, 2013. Ito N *et al.*, *Int J Mol Sci*. 2018)。乳酸によって、Akt のリン酸化を伴わずに mTOR 下流分子のリン酸化が上昇することは、過去の研究とも一致する結果だった。

また乳酸による mTOR の活性化が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇依存的に生じるか検証した。その結果、乳酸による mTOR の活性化は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  キレート剤である BAPTA-AM との共投与によって抑制された。以上の結果から、乳酸は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を促進し、mTOR といった下流シグナル系を活性化する作用があることがわかった。

そこで運動依存的なマイオカインの分泌に乳酸、および乳酸依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が与える影響を明らかにするため、代表的なマイオカインである IL-6 の発現解析を行った。その結果、乳酸によって IL-6 の発現が上昇し、この発現の上昇は BAPTA-AM によって抑制された。これらの結果から、乳酸依存的な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇によって IL-6 の発現が惹起されることが明らかになった (図 2 B)。

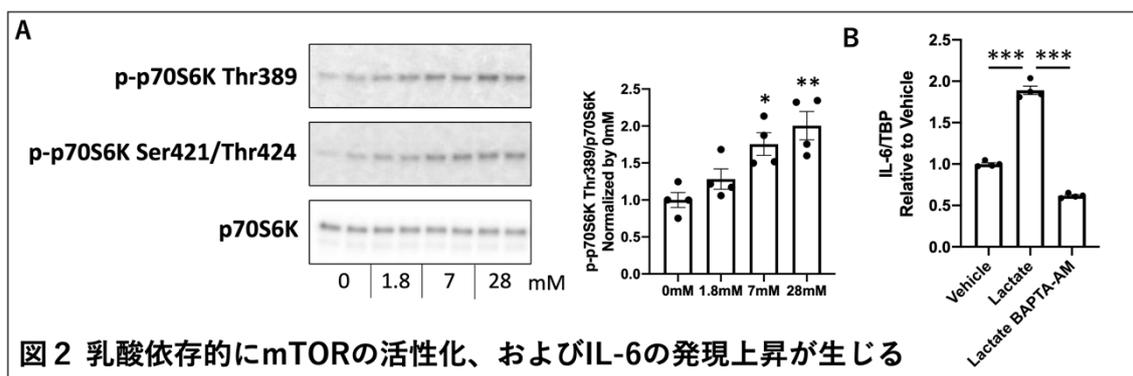


図 2 乳酸依存的に mTOR の活性化、および IL-6 の発現上昇が生じる

以上の結果は、”運動→乳酸の上昇→細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇→マイオカインの分泌の促進”という経路が存在することを示している。そこで乳酸のターゲットとなり、マイオカインの分泌を促進する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの同定を試みた。最初に乳酸依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が、細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  の流入なのか、筋小胞体からの  $\text{Ca}^{2+}$  の放出によるものか検討した。その結果、細胞外の  $\text{Ca}^{2+}$  の除去を行っても、乳酸による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は抑制されなかった。しかし thapsigargin 処理による筋小胞体内の  $\text{Ca}^{2+}$  の枯渇によって、乳酸による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は抑制された。このことから、筋小胞体に局在する  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが乳酸のターゲットであることが示唆された。筋小胞体にはリアノジン受容体や  $\text{IP}_3$  受容体といった  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルが局在しているため、これらの  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルに対する阻害剤を用いた検証を行った。しかし、リアノジン受容体の阻害剤である Dantrolene、 $\text{IP}_3$  受容体の阻害剤である Xestospongin C を用いても、乳酸による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は抑制されなかった。さらにジヒドロピリジン受容体の阻害剤である Nifedipine、 $\text{P}_2\text{X}$  受容体の阻害剤である PPADS などの阻害剤を用いても、乳酸による  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇は抑制されず、唯一抑制効果が確認されたのは、広範囲な TRP チャネルの阻害剤である 2-APB であった。これらの結果は、何らかの TRP チャネルが乳酸の標的である可能性を示唆している。

乳酸は解糖系の最終産物であり、運動依存的に骨格筋および血中乳酸が上昇することがよく知られている。本研究により、運動依存的な乳酸の上昇、およびその後起こる

細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇によって IL-6 といったマイオカインが制御されていることが示唆された。特に高齢者では解糖系を初めとした代謝系に異常が生じていることがわかっており、加齢に伴うマイオカインの分泌不全に、乳酸依存的な経路の破綻が関わっている可能性がある。今後、乳酸による IL-6 などのマイオカインの分泌が老齢個体でどのような変化が生じているか検証する必要があるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 So-ichiro Fukada, Naoki Ito.	4. 巻 409
2. 論文標題 Regulation of muscle hypertrophy: Involvement of the Akt-independent pathway and satellite cells in muscle hypertrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112907
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112907	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 Naoki Ito, Yuko Miyagoe-Suzuki, Shin'ichi Takeda, Akira Kudo.	4. 巻 22
2. 論文標題 Periostin Is Required for the Maintenance of Muscle Fibers during Muscle Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3627
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073627	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 Risa Okada, 他15名, Naoki Ito, Dai Shiba, Masaki Shirakawa, Masafumi Muratani, Takashi Kudo, Satoru Takahashi.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transcriptome analysis of gravitational effects on mouse skeletal muscles under microgravity and artificial 1 g onboard environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 9168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-88392-4	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 伊藤尚基	4. 発行年 2022年
2. 出版社 体育の科学	5. 総ページ数 5
3. 書名 運動による筋肥大で起こるシグナルイベント	

〔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
---------	---------