

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18848

研究課題名（和文）革新的エクササイズメディスンの創出を目指した運動EVsの分泌特性と機能の解明

研究課題名（英文）Secretory Characteristics and Functions of Exercise EVs for the Creation of Innovative Exercise Medicine

研究代表者

本多 裕之（Honda, Hiroyuki）

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：70209328

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：運動により骨格筋細胞から分泌されるEVの数や質がどのように変化するか明らかになっていない。本研究では、in vitroの運動モデルを用いて、運動が骨格筋細胞から放出されるEVの量に影響を与えるかどうかを検討した。運動条件が異なる1 Hzと30 Hzの電気刺激を24時間負荷した際の影響を調べた。その結果、30 Hzの電気刺激で運動させた場合にEVsの分泌量が増加し、EVsに含まれるmicroRNAの種類も変動することが分かった。さらにこれにはAlixの発現量変化とカルシウムイオン濃度変化が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では培養骨格筋細胞への電気刺激によるin vitro運動モデルを用いて、in vivoでは困難である運動時の骨格筋細胞からのEVs分泌量が増加し、含まれるmicroRNAの種類も変化することを明らかにした。今後、分泌されたEVsの特性をさらに解析することで、運動効果の分子メカニズムが解明され、健康長寿社会の実現に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It is not clear how exercise alters the number and quality of EVs secreted by skeletal muscle cells. In this study, we used an in vitro exercise model to examine whether exercise affects the amount of EVs released from skeletal muscle cells. The effects of 1 Hz and 30 Hz electrical stimulation applied under different exercise conditions for 24 hours were examined. The results showed that the amount of EVs secreted increased and the type of microRNAs contained in EVs also fluctuated when the subjects were exercised with 30 Hz electrical stimulation. Furthermore, it was suggested that changes in Alix expression and calcium ion concentration were involved in this.

研究分野：生物化学工学

キーワード：細胞外小胞 電気刺激 骨格筋細胞 運動モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Exercise is medicine と言われるように運動が健康によいことが経験的に知られているが、長年その分子メカニズムは不明であった。最近、運動によって筋組織が分泌する細胞外小胞(Extracellular Vesicles; EVs)が、その実体の一つであることが明らかになり、注目を集めている。骨格筋は、収縮運動することでエクソソームやマイクロベシクルなどのナノサイズの EVs(以下、運動 EVs)を血中に分泌する。運動 EVs には、マイオカイン(運動により筋で作られるペプチドやタンパクであるサイトカインの総称)や microRNA が封入されている。分泌された運動 EVs は血流によって全身を長期に循環し、他の臓器・組織にマイオカインや microRNA を送達することでがん抑制、うつ改善、免疫暴走の抑制などの生理的变化をもたらす。運動 EVs は、培養骨格筋細胞に電気パルス刺激を負荷して収縮運動させることで分泌生産することができる。もし *in vitro* で生産した運動 EVs を、自ら運動することが困難な高齢者や患者に投与することで運動と同等の効果を得ることができれば、運動 EVs はリハビリや運動療法に替わる革新的なバイオ医薬品になる可能性がある。

2. 研究の目的

これまでに、運動 EVs の分泌や機能に関する基本特性の解明は十分に進んでいない。本研究では、我々が独自に開発したデバイスを使って構築する *in vitro* 運動モデルを用いて、運動 EVs の分泌特性と機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

細胞培養：マウス不死化骨格筋細胞 C2C12 を用いた。C2C12 の増殖培養では、DMEM に 10% FBS、1.0% Penicillin-Streptomycin を添加した培地を用いた。C2C12 の分化培養では、DMEM に 2% Horse Serum、1% Penicillin-Streptomycin を添加した培地を用いた。

In vitro 運動モデル

細胞の剥離を防ぐため、マトリゲル混合フィブリンゲル上で細胞培養を行った。35 mm 細胞培養皿にマトリゲルとフィブリノーゲン、トロニンBを混合した溶液を入れ、ゲル化した。その上から C2C12 を播種し、2 日間増殖させたのちに、分化誘導を行った。分化 6 日目から 24 時間電気刺激を負荷した。電気刺激装置は C-PACE (C-Pace 100, IonOptix Million MA, USA) を使用し、炭素電極により電気刺激 (電圧 10 V, 周波数 1 Hz または 30 Hz, パルス幅 2 ms) を与えた。

4. 研究成果

図 1A の 2 条件で電気刺激を負荷した。2 条件間で負荷するパルス回数と同じにした。1 Hz と 30 Hz のそれぞれで電気刺激にตอบสนองして筋細胞が収縮した (図 1B)。電気刺激 24 時間後においても、顕著な細胞死は観察されなかった。さらに運動マーカーである AMPK のリン酸化と IL-6 の遺伝子発現が向上したことを確認した (図 2)。

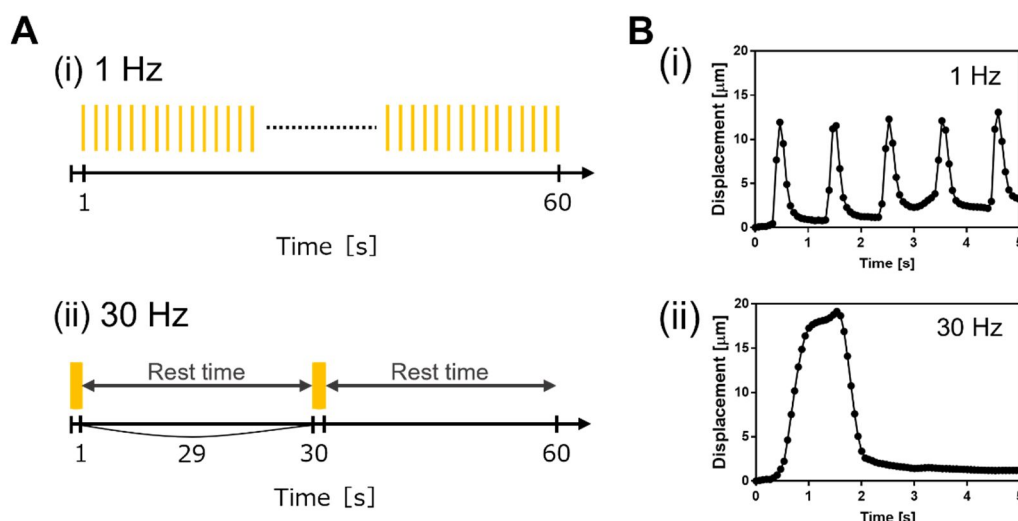


図 1 電気刺激条件と筋細胞の収縮

A: パルスパターン

B: ゲル状での筋細胞の収縮

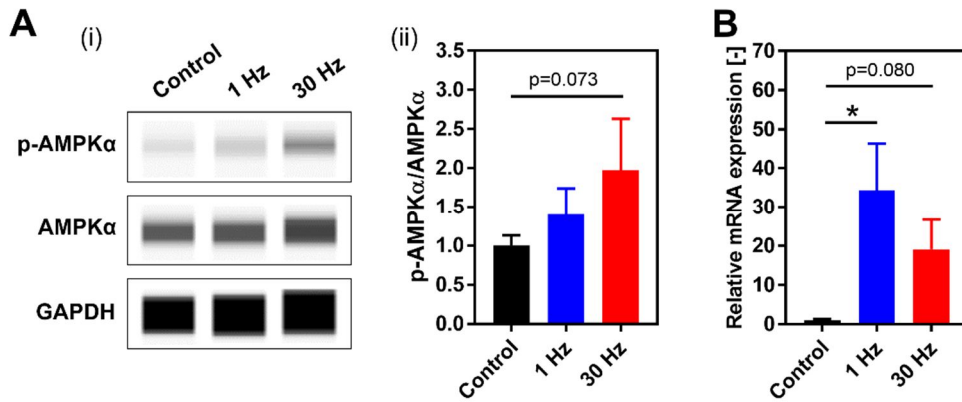


図2 運動マーカーへの影響
 A: AMPK のリン酸化
 B: IL-6 の遺伝子発現量変化

続いて、1 Hz と 30 Hz で電気刺激を 24 時間負荷し、EVs の産生量を比較した。その結果、30 Hz で刺激した条件で、有意に EVs の量が増加することが明らかになった。EVs の粒子径分布から、分泌された EVs はエクソソームかマイクロベシクルである可能性が示唆された。また EVs 中に含まれる microRNA が変化したのかどうかを microRNA-seq で調べた。30 Hz の電気刺激で、電気刺激なしと比較し、10 個の microRNA の量が有意に増加したことが分かった。

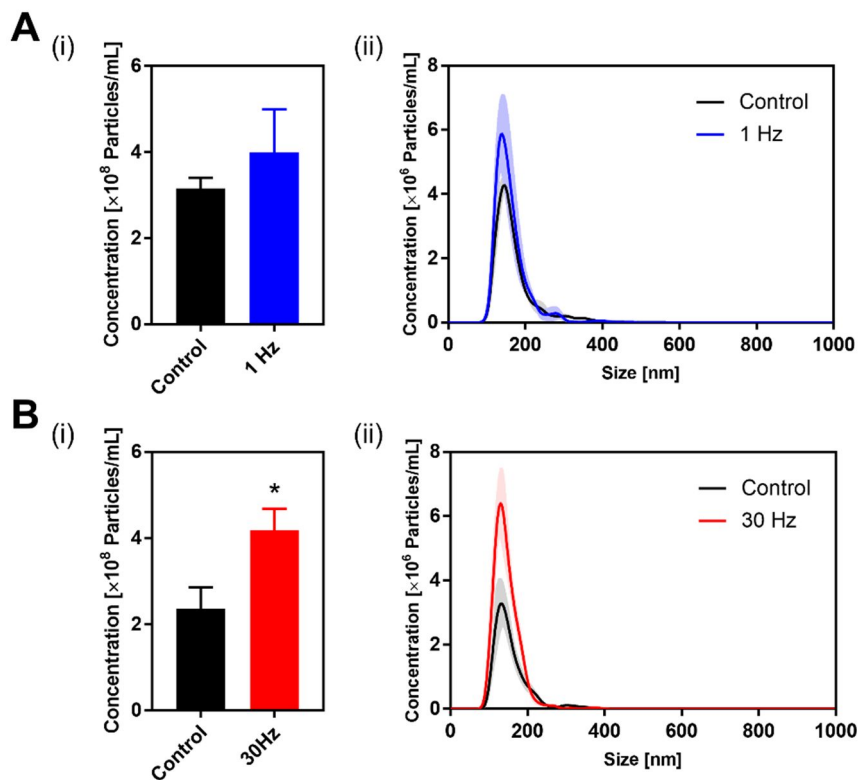
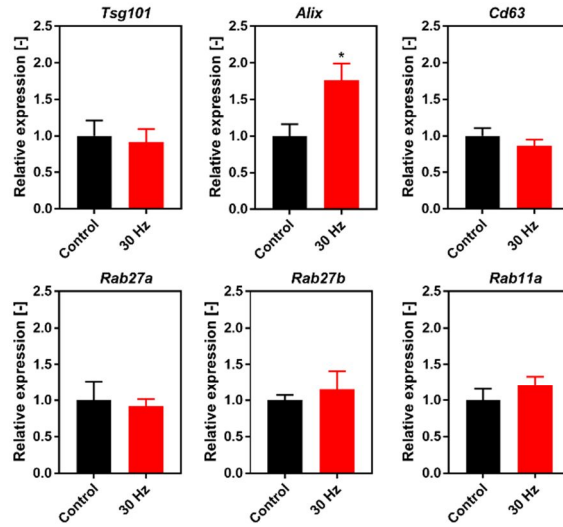


図3 EVs 量とサイズへの影響
 A: 1 Hz
 B: 30 Hz

さらに、EVs 増加のメカニズムを明らかにするため、EVs の産生や輸送に關する遺伝子発現を調べた。その結果、Alix の遺伝子発現が有意に向上することを見出した。Alix の発現量向上には細胞内カルシウムイオン濃度上昇が關与している報告があった。また筋細胞の収縮は細胞内カルシウム濃度上昇によって誘導される。これらから、EVs の分泌量の増加にはカルシウムイオン濃度変化が關与していると考え、電気刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度を調べた。その結果、30 Hz では、1 Hz よりもカルシウムイオン濃度のピーク値が高くなっていた。

A



B

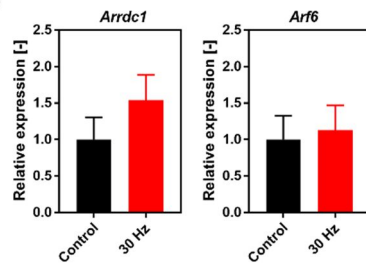


図 4 EVs の産生や輸送に関する遺伝子の発現量変化

A: エクソソーム関連

B: マイクロベシクル関連

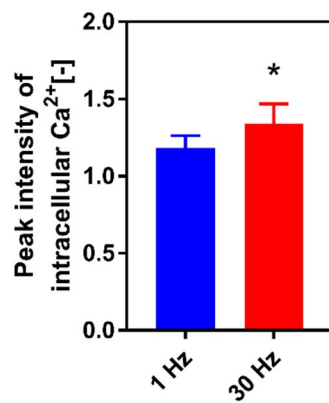


図 5 細胞内カルシウムイオン濃度変化

5. まとめ

In vitro 運動モデルを用いて、30 Hz の電気刺激負荷で EVs 分泌量が増加することを見出した。

さらに分泌には Alix の発現上昇が関与する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 Developing compartmentalized three-dimensional co-culture microdevice for neuromuscular disease model |
| 3. 学会等名 生物工学若手研究者の集い 夏のオンラインセミナー2021 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山本一貴、樋口昌也、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋オルガノイドの構築 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 マイクロデバイス上での区画化ヒト神経筋組織モデルの構築 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本一貴、大隅早紀、長島拓則、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 96ウェル型培養筋組織収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの探索 |
| 3. 学会等名 第73回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 清水一憲、山本一貴、大隅早紀、長島拓則、秋山裕和、本多裕之 |
| 2. 発表標題 96穴型培養筋モデル収縮力評価系を用いた抗筋萎縮ペプチドの開発 |
| 3. 学会等名 第7回日本筋学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本一貴、樋口昌也、松島歩夢、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 収縮力測定可能なマイクロデバイス上での神経筋共分化誘導法の開発 |
| 3. 学会等名 Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (細胞アッセイ技術の現状と将来) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 亀井雄平、山本一貴、秋山裕和、本多裕之、清水一憲 |
| 2. 発表標題 神経筋疾患解析や創薬応用に向けた区画化三次元ヒト神経筋組織モデルの構築 |
| 3. 学会等名 Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (細胞アッセイ技術の現状と将来) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 有本加奈絵、秋山裕和、清水一憲、本多裕之 |
| 2. 発表標題 酸素濃度の違いが培養骨格筋細胞に与える影響 |
| 3. 学会等名 化学工学会第87年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shimizu, K., Yamamoto, K., Kamei, Y., Akiyama, H., Honda, H. |
| 2. 発表標題 Human Neuromuscular Tissue Models Fabricated on a 24-Well-Plate-Format Compartmentalized Microfluidic Device |
| 3. 学会等名 Young Asian Biological Engineers' Community (YABEC 2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shimizu, K., Yamamoto, K., Kamei, Y., Akiyama, H., Honda, H. |
| 2. 発表標題 Innervated skeletal muscle-on-a-chip for modeling neuromuscular disorders |
| 3. 学会等名 International Symposium on Chemistry for Multimolecular Crowding Biosystems (CMCB2022) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>名古屋大学工学研究科本多研究室ホームページ https://www.chembio.nagoya-u.ac.jp/labhp/life2/index.html</p> |
|---|

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 | 清水 一憲 (Shimizu Kazunori) (70402500) | 名古屋大学・工学研究科・准教授 (13901) | |

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