

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：32644
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010 ～ 2011
 課題番号：22700659
 研究課題名（和文） 運動とサルコペニアによって上昇するインターロイキン 6 の骨格筋に対する生理学的意義
 研究課題名（英文） Physiological roles of exercise- and sarcopenia-induced interleukin-6 in skeletal muscle
 研究代表者 黒坂 光寿（KUROSAKA MITSUTOSHI）
 東海大学・体育学部・特定研究員
 研究者番号：40553970

研究成果の概要（和文）：

我々は、運動やサルコペニアによって分泌されるサイトカインであるインターロイキン 6（IL-6）が骨格筋の幹細胞である筋衛星（サテライト）細胞の増殖能に及ぼす影響について初代培養技術を用いて検討した。その結果、IL-6 は濃度依存的に筋サテライト細胞の増殖能に影響を及ぼすこと、さらに IL-6 は細胞内情報伝達系 JAK/STAT3 系を介して、Cyclin D1 や SOCS3 の発現量を増加させることによって、筋サテライト細胞の増殖や筋分化を調整していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We examined the effect of exercise- and sarcopenia-induced interleukin-6 (IL-6) on the proliferative potential of satellite cells in primary cell culture. We demonstrated that IL-6 has an effect on proliferative potential of satellite cells in a dose-dependent manner, and IL-6 regulates proliferation and differentiation of satellite cell through induction of Cyclin D1 and SOCS3 by activation of JAK/STAT3 pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、スポーツ生理学

キーワード：体力科学

1. 研究開始当初の背景

ヒトが生涯にわたって、健康で自立した生活を営むためには、日常動作の基盤となる骨格筋量を維持することが重要である。しかしながら、骨格筋量は、加齢に伴い減少する。この加齢性筋肉減弱症は、サルコペニアと呼ばれており、国際的に大きな問題となっている。しかしながら、サルコペニア発症の詳細

な機序については明らかではない。

運動は、骨格筋で様々なサイトカインを分泌することが知られており、これらサイトカインは、Myokines と呼ばれている。これら Myokines の中でも特に、インターロイキン 6（IL-6）については、運動中および運動後の動態について多くの研究がなされ、IL-6 が運動中および運動後のグルコースホメオスタ

シスのために重要な因子であることが明らかにされている。また、最近の研究によって、IL-6が骨格筋の肥大や萎縮にも関与していることが報告されている。例えば、IL-6を過剰に発現させたラットでは、IL-6を正常に発現しているラットと比較して、筋線維のタンパク質量が減少し、筋萎縮が引き起こされる可能性が報告されている (Hadda et al., 2005)。また、サルコペニア発症者では、IL-6のレベルが高いことが報告されている (Visser et al., 2002)。一方、IL-6の分泌を抑制したマウスでは、筋肥大を刺激する負荷を課した際に、筋肥大が生じなかったが、IL-6を通常に発現しているマウスでは、筋肥大がもたらされたことが報告されている (Serrano et al., 2008)。さらに、C2C12細胞を用いた培養実験では、IL-6が筋芽細胞の増殖能を向上させることが報告されている (Serrano et al., 2008)。すなわち、これらの研究からIL-6は、筋肥大に対してプラスの面(同化作用)とマイナスの面(異化作用)を兼ね備えており、その作用は、分泌される濃度の違いもしくは、加齢による感受性の違いによって決定される可能性が示唆される。さらにこれらの作用は、筋サテライト細胞の諸機能の変化を介して、引き起こされる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、IL-6が筋サテライト細胞の増殖能に及ぼす影響とその分子機序を初代培養系によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 平成 22 年度

約 11 週齢の F344 系雄性ラット (n=20) の両脚下肢骨格筋より、筋サテライト細胞を単離し、Machida et al. (2004) の方法に従って初代培養を行った。単離・培養した筋サテライト細胞を異なる濃度の IL-6 (0.01、0.1、1、10、100 ng/ml) で 24 時間刺激し、細胞数および BrdU を用いて増殖能を検討した。さらに、IL-6 の刺激によって引き起こされる増殖能の変化に影響を及ぼす分子機序を明らかにするために、IL-6 と関連する細胞内情報伝達系の阻害剤 (JAK/STAT3 系 阻害剤: AG490、STAT3 peptide、MAPK 系: PD98059、SB202190) を使用し、BrdU 法を用いて増殖能を検討した。また、細胞周期を促進する因子である Cyclin D1 タンパク質の発現量を定量するために、蛍光二重染色を行い MyoD 陽性細胞数当たりの Cyclin D1 陽性細胞の割合を評価した。

(2) 平成 23 年度

平成 22 年度と同様に約 11 週齢の F344 系雄性ラット (n=30) の両脚下肢骨格筋より、筋サテライト細胞を単離し、初代培養を行った。単離・培養した筋サテライト細胞の増殖能を向上させる IL-6 の濃度 (1 ng/ml 群) もしくは増殖能の向上を抑制させる IL-6 の濃度 (10 ng/ml 群) で刺激した。JAK/STAT3 系は、リン酸化した STAT3 が核内に移行することでその標的遺伝子である Cyclin D1 や SOCS3 遺伝子を発現させる。そこで、蛍光二重染色を行いリン酸化 STAT3 が核内に移行している細胞を MyoD 陽性細胞当たりの割合で評価した。また、JAK/STAT3 系の標的遺伝子である Cyclin D1 および SOCS3 の遺伝子発現量を RT-PCR 法によって評価した。さらに、蛍光二重染色によって Cyclin D1 タンパク質を発現している細胞を MyoD 陽性細胞当たりの割合で評価し、SOCS3 タンパク質を筋分化マーカーである myogenin と蛍光二重染色することでその局在を確認した。

4. 研究成果

(1) 平成 22 年度

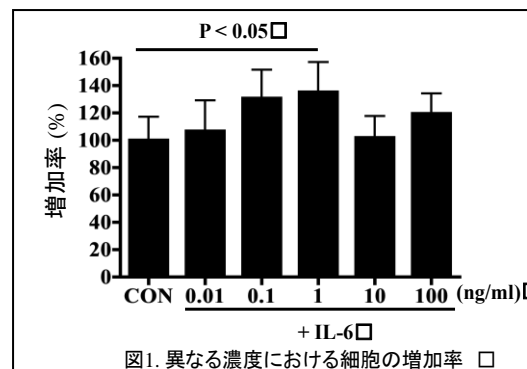


図1. 異なる濃度における細胞の増加率

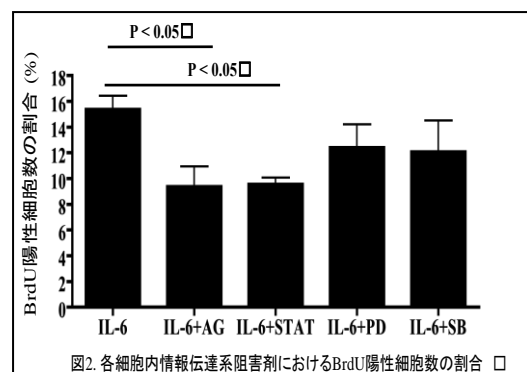


図2. 各細胞内情報伝達系阻害剤におけるBrdU陽性細胞数の割合

IL-6 濃度が 0.01~1 ng/ml までは、濃度依存的に増殖能が向上し、1 ng/ml 時に IL-6 刺激なし (以下、CON) と比較して有意に増加した ($P < 0.05$) (図 1)。

増殖能は、IL-6 (1 ng/ml) 刺激後、6 時間で CON 群と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。また、IL-6 刺激後 6 時間で観察さ

れた増殖能の増加が JAK/STAT3 系細胞内情報伝達系阻害剤によって有意に抑制された ($P<0.05$) (図 2)。

したがって、濃度依存的に筋サテライト細胞の増殖能に影響を及ぼすこと、さらに細胞内情報伝達系 JAK/STAT 経路を介して筋サテライト細胞の増殖能を調整していることが示唆された。

(2) 平成 23 年度

MyoD 陽性細胞当たりのリン酸化 STAT3 陽性細胞の割合は、1 ng/ml 群が CON 群と比較して有意に増加した ($P<0.05$) が、10 ng/ml 群ではそのような増加は観察されなかった (図 3)。また、Cyclin D1 の遺伝子発現量は、1 ng/ml 群が CON 群と比較して有意に増加した ($P<0.05$) (図 3) が、10 ng/ml 群ではそのような増加は観察されなかった。

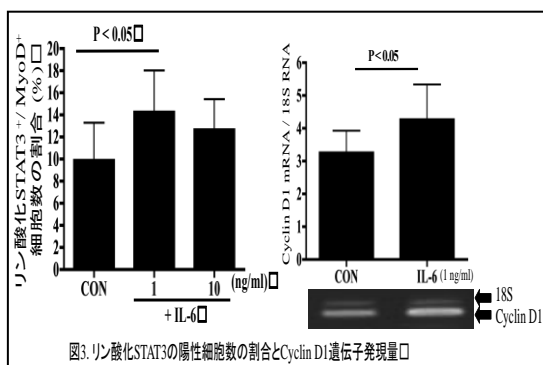


図3. リン酸化STAT3の陽性細胞数の割合とCyclin D1遺伝子発現量

さらに、MyoD 陽性細胞当たりの Cyclin D1 陽性細胞の割合は、1 ng/ml 群が 10 ng/ml 群および CON 群と比較して、有意に増加した ($P<0.05$)。

これらの結果より、1 ng/ml 群では、Cyclin D1 の遺伝子やタンパク質の発現量の増加を介して、細胞周期を促進させることで増殖能を向上させる可能性が示唆された。一方、SOCS3 の遺伝子発現量は、10 ng/ml 群が CON 群および 1 ng/ml 群と比較して、増加する傾向が観察された。そこで、10 ng/ml 群において、myogenin および SOCS3 タンパク質の局在を確認したところ、myogenin 陽性細胞に SOCS3 タンパク質が局在していることを確認した。

したがって、IL-6 は、JAK/STAT3 系を介して Cyclin D1 や SOCS3 の発現量を増加させることによって増殖や筋分化を調整していることを明らかにした。

以上の結果より、IL-6 は濃度依存的に筋サテライト細胞の増殖能に影響を及ぼすこと、さらに細胞内情報伝達系 JAK/STAT3 系を介して、Cyclin D1 や SOCS3 の発現量を増加させることによって、筋サテライト細胞の増殖や筋分化を調整していることが明らかになった。

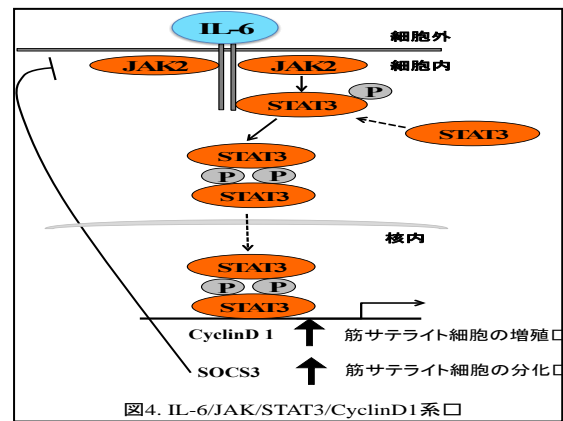


図4. IL-6/JAK/STAT3/CyclinD1系

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Kuroski M, Naito H, Ogura Y, Machida S, Katamoto S. Satellite cell pool enhancement in rat plantaris muscle by endurance training depends on intensity rather than duration. *Acta Physiologica*, 205, 査読有, 2012, 159-166.
- ② 町田 修一, 黒坂 光寿, 高齢社会における骨格筋研究の今後の展望、*体育の科学*, 61 巻、査読無、2011、234-239
- ③ 町田 修一, 畑山 元政, 黒坂 光寿, 筋再生の分子メカニズム、*体育の科学*、査読無、61 巻、2011、203-210
- ④ 黒坂 光寿, 町田 修一, 運動・トレーニングによる筋肥大の分子メカニズム、*体育の科学*、査読無、60 巻、2010、649-655

[学会発表] (計 4 件)

- ① 黒坂 光寿, 町田 修一インターロイキン-6 は JAK/STAT3/Cyclin D1 系を介して筋サテライト細胞の増殖能を調整する、第 66 回日本体力医学会大会、2011 年 9 月 17 日、下関市生涯スポーツプラザ (山口県)
- ② 黒坂 光寿, 町田 修一、インターロイキン-6 が筋サテライト細胞の増殖能に及ぼす影響とその分子メカニズムの解明、第 65 回日本体力医学会大会、2010 年 9 月 17 日、千葉商科大学 (千葉県)
- ③ Kurosaka M, and Machida S. Effects of interleukin-6 on proliferative potential of satellite cells in vitro, American college of sports medicine conference on Integrative Physiology of Exercise, 2010 年 9 月 22 日, マイアミ, アメリカ
- ④ Kurosaka M, and Machida S. Interleukin-6/JAK/STAT3-induced satellite cell proliferation is regulated through induction of Cyclin D1, *Experimental*

Biology, 2011年4月24日, サンディエゴ,
アメリカ

[図書] (計1件)

- ① 町田 修一、黒坂 光寿、真興交易(株)医
書出版部、サルコペニアの基礎と臨床 第2
節サルコペニアの発生のメカニズム、2011、
pp22-31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒坂 光寿 (KUROSAKA MITSUTOSHI)
東海大学・体育学部・特定研究員
研究者番号：40553970

(2) 研究者協力者

町田 修一 (MACHIDA SHUICHI)
東海大学・体育学部・准教授
研究者番号：40421226