

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500864

研究課題名(和文) 骨格筋から分泌される因子と運動が及ぼす影響についての基礎的研究

研究課題名(英文) An investigation of endocrine factors from cultured skeletal muscle cells and the effect of cell pressurization

研究代表者

飯塚 健治 (Iizuka, Kenji)

北海道医療大学・薬学部・教授

研究者番号：10344467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)： 擬似的な運動や高血糖を再現した環境下において、ヒト骨格筋細胞からどのような因子が放出され、さらにはその因子が脂肪細胞などに対してどのような影響を及ぼしているのかについて、培養細胞を用いて検討を行った。その結果擬似的な運動環境下の骨格筋細胞では、12種類の遺伝子が2倍以上増加し、逆にこれと異なる12種類の遺伝子が半分以上に減少した。また高血糖を再現した環境では、一部の因子の遺伝子発現がさらに増加し、さらに運動環境下の骨格筋細胞の培地をヒト脂肪細胞に添加したところ、複数のサイトカインが2倍以上増加した。骨格筋細胞は内分泌器官の一つであり、他の臓器にも影響を及ぼす多様な機能を持っていると予想された。

研究成果の概要(英文)： Human skeletal muscle cells (Huskms) were cultured and pressurized to spuriously reproduce an intra-muscular pressure elevation during exercise. Investigations of mRNA expression in pressurized Huskmcs resulted in an increase in several secreted endocrine factors known as myokines, and protein levels in culture medium were also increased compared with non-pressurized cells. An administration of culture medium, collected by pressurized Huskmcs, to human adipocytes resulted in an increase in more than two times of up-regulation in cytokine release into culture medium. Huskmcs may play as a secretory organ during exercise and those released factors may have effect on adipocytes as a myokine.

研究分野：総合領域

キーワード：骨格筋細胞 ミオカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 現状

ライフスタイルの欧米化に伴って肥満、糖尿病、高血圧症、高脂血症、動脈硬化性疾患等の生活習慣病の罹患率は増加の一途を辿り、これらの克服は国民医療の観点からも極めて重要な課題となっている。特に、動脈硬化症を初めとする様々な全身疾患の前駆状態と位置づけられているメタボリックシンドロームの発症メカニズムの解明と新しい治療法の確立は、予防医学の観点からも極めて重要な課題であり、これまでに例のない高齢化社会を迎えつつある我が国において国民の健康、医療、福祉の向上の観点からその対策は急務である。

(2) メタボリックシンドロームと糖代謝に係わる中心臓器としての骨格筋

糖質は食事などで摂取した総量の 80%以上が骨格筋で処理されるとされており、糖尿病(2型)は骨格筋の糖、脂質代謝機能異常が発症に深く関わっていると考えられている。骨格筋は生体最大の臓器であり、運動、エネルギー消費、糖脂質代謝に重要な役割を果たす。骨格筋量とその構成成分は、骨格筋の機能発現に重要であるが、これは身体の活動量や環境、種々の病態により変化することが知られており、骨格筋の代謝機能を高める運動療法は、糖尿病の予防および治療に効果的であることが良く知られている。

(3) 内分泌器官としての骨格筋の可能性

これまで骨格筋は、上述の様な糖代謝の首座としての機能を果たす一方、外界からの様々な因子に反応してその代謝の制御を受けるいわば受け身の器官としての印象が強かった。しかしながら、近年骨格筋はサイトカインやホルモン物質(いわゆる myokine)を放出する一種の内分泌器官である可能性があるとの報告がなされるようになった(J.Exp.Biol. 2011; 214: 337-346. Muscles and their myokines)。すなわち、骨格筋細胞は自身の環境に応じて endocrine あるいは paracrine として作用する多様な因子を放出することで積極的に生理的環境を制御している可能性があると考えられ、さらに病的環境においては、この機能に何らかの変化が生じている可能性があると考えられている。

(4) 本研究の着想に至った経緯

現在我々が行っている研究(基盤研究 C)の執行過程に於いて、ヒト培養骨格筋細胞の培養液に、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)で測定することが可能な濃度の複数の増殖因子が新たに産生されていること、さらに骨格筋細胞を擬似的な骨格筋運動を再現した環境下に置いた場合、それらの増殖因子の濃度が大きな変動を示すことを見いだした(概略を(5)に記載)。

本研究の着想は上記の結果に多大な影響を受けた物である。

(5) 平成 21 年～23 年の基盤研究 C (バイオマーカーとしての MCT4 定量系構築への試みとその制御因子の解明) の執行課程で得られた結果

【目的】運動の際に骨格筋内部で発生する筋内圧上昇を疑似的に再現した圧力負荷環境下で骨格筋細胞を培養し、細胞数、細胞容量と細胞増殖因子がどの様な変動を示すかについて検討した。【方法】ヒト骨格筋細胞を筆者が作製した圧力負荷チャンバー内に静置し、180 mmHg まで 5% CO₂+ air を送入することで圧力負荷を行った。コールターカウンターを用いて細胞容量と細胞数の変化を、また Insulin-like growth factor-I (IGF-1)と Basic fibroblast growth factor (bFGF)の濃度を ELISA で測定した。【結果・考察】圧力負荷は細胞数の増加を抑制する一方、細胞容量を増加させた。また圧力負荷によって培養液中の IGF-1 と bFGF の濃度が増加を示した。

骨格筋細胞は、圧力負荷に伴って細胞数と容量の両面で応答を示すことが明らかになったが、その機序として機械的ストレスによる直接作用に加えて、増殖因子も関与している可能性が考えられた。圧力負荷が骨格筋の細胞増殖因子の変動を引き起こす機序や、エネルギー代謝にどの様な影響を及ぼしているかを含めて今後さらなる検討を行う価値があると考えられた。(次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2011 にて発表)

2. 研究の目的

上記の経緯から、我々は、i)骨格筋細胞がどの様な因子を放出する機能を持っているのか、また ii)運動はこの因子を放出させる機能にどの様な影響を及ぼすのか、さらには iii)この因子は他の体内組織に対してどの様な影響を及ぼすのか、そして、iv)全身性の代謝疾患のうち、高血糖状態において、この因子の放出機能にはどの様な影響が現れるのか、などについて基礎的な検討を行うことに価値があると考えた。

3. 研究の方法

そこで本研究では、研究対象としてヒトならびにラット由来の培養骨格筋細胞を用いるとともに、想定される放出因子の作用ターゲットの 1 つとして、脂肪細胞に注目して作用の有無を検討する。一方、メタボリックシンドロームの代表的な病的環境である高血糖を再現した条件下で骨格筋細胞の培養を行い、放出因子への影響を検討する。また、運動によって発生する骨格筋への機械的刺激

よって因子の放出にどのような変化が現れるかについての検討を行う際には、骨格筋運動がもたらす機械的ストレス要素の1つである筋内圧の上昇を用いることを計画した。この条件を *in vitro* で擬似的に再現するために申請者が過去に特許を取得した波動圧ストレス負荷装置を用いる（以下に概略）。

<平成 24 年度>

(1) 骨格筋細胞から分泌される因子の概要と、擬似的運動負荷の影響の有無についての検討

上述のごとく骨格筋細胞からは、少なくとも複数種の増殖因子が分泌されていることが強く示唆されていることから、放出されている因子の網羅的スクリーニングを行う事を目的として、まず Growth Factor PCR Array を用いて遺伝子レベルでの発現検索を行う事を計画している。この手法を用いる際には、擬似的な運動負荷条件を負荷した細胞と、負荷を行わないコントロール細胞との比較検討を同時に行う事によって、放出される因子の概要の把握と、運動による効果の有無を一元的に検討することができる。

さらに、上記の遺伝子レベルでの検索により、顕著な増加、または減少を来した因子について、引き続き、Human Growth Factor Array を用いて蛋白質レベルでの変動を運動条件の有無を含めて検討する。

前述の、遺伝子並びに蛋白質レベルでのスクリーニングより、顕著な変動を示したいくつかの因子を抽出し、後述の脂肪細胞へ影響性が有るか否かについての学術的観点からの評価をも加えた上で、各因子単体での変動を realtime-PCR、ウエスタンブロットまたは ELISA で検討し、実際の分泌量の変動の定量を試みる。なお、上述した初年度の変動因子の抽出課程は、最も時間と費用を要することが強く予想される。また、サンプルに含まれる因子の変動が、各検出系で detection 可能な領域に達する程十分であるか否か、また遺伝子変化と蛋白質変化が一致するか否かなどの点が実験計画の進捗状況を左右すると考えられる。このため上述の遺伝子、蛋白質用のアレイを用いた実験が当初の計画通りに機能しなかった場合には、検出することが出来る因子の数が減少するものの、操作性や確実性の観点からより優れた、ELISA を用いたマルチプレックススィムノアッセイを用いた実験系に切り替えてスクリーニングを行い、実験の継続性を維持する事を考慮していたが、一定項目数の変動因子の抽出に成功したことから、当該計画どおりに次年度の検討項目へ移行した。

<平成 25 年度～26 年度>

(2) 病的環境における骨格筋細胞からの分泌因子の変化の有無についての検討

平成 24 年度の検討で変動が確認された因子について、メタボリックシンドロームの代

表的な病的環境である高血糖を再現した条件下で細胞培養を行い、放出量への影響を検討する。この際、培養液中のグルコース濃度を段階的に変動させた環境を用意し、グルコース濃度の変化と因子の変動の関係についても併せて検討を行う。また、この高グルコース環境において、運動を再現した圧力負荷がどのような影響を及ぼすかについても併せて検討を行う。

(3) 培養脂肪細胞に対する作用の有無についての検討

3T3-L1 細胞を継代培養し、differentiation medium を用いて脂肪細胞に分化させた細胞を実験に用いる予定である。まず骨格筋細胞の培養液を直接再添加して adipocytokine の分泌状況をマルチプレックススィムノアッセイを用いて検討する。

(骨格筋細胞と脂肪細胞の相互関係を検討する時間的、費用的余裕が有る場合には、共培養システムを用いて 2 種の細胞を培養し、培養液中の増殖因子と adipocytokine の検討を行う。また、平成 24 年度の検討で変動が確認された因子を単体で添加した場合の反応性実験も併せて検討する。)

4. 研究成果

(1) 骨格筋細胞から分泌される因子の概要と、擬似的運動負荷の影響の有無についての検討

Growth Factor PCR アレイを用いて 84 種類の増殖因子の遺伝子発現について検討を行った結果、擬似的運動負荷を加えた骨格筋細胞において、以前の検討で増加が示唆されていた FGF を含めて 12 種類の因子の遺伝子発現が 2 倍以上の増加を示し、さらにこれらと異なる 12 種類の因子の発現が逆に半分以下に減少した。そこで特に 6 倍以上の増加を示した inhibin について、実際に培養液中の因子の濃度変化を測定した結果、蛋白質レベルでも圧負荷をかけた細胞からの分泌が増加を示す事が明らかになった (図 1)。

図 1 圧力負荷によって骨格筋細胞で発現が増加した因子と減少した因子。

略名	名称	増減(倍)
INHHA	Inhibin	6.6877
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	2.7844
CSF3	Colony stimulating factor 3	0.1168
IL1B	Interleukin 1, beta	0.052

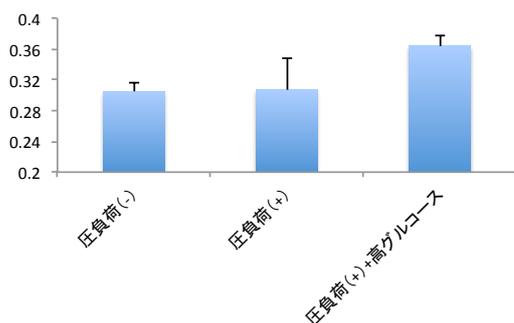
ヒト骨格筋細胞における遺伝子の発現変化を、圧負荷をかけなかったものを 1 とした相対的な変化量で示した (上段 2 つは増加を示した因子、下段 2 つは減少を示した因子からそれぞれ代表的なものを示す)。

(2) 病的環境における骨格筋細胞からの分泌因子の変化の有無についての検討

重症な糖尿病での血中濃度に近い

400mg/dl のグルコース濃度環境下で骨格筋細胞を培養し、さらに圧力負荷の存在下で検討を行った結果、通常の糖濃度に比べて一部のみオカインで遺伝子発現が増加を示し、高グルコース環境は骨格筋細胞の内分泌機能に影響を及ぼす可能性が高いと考えられた(図2)。

図2 糖尿病環境を再現した高グルコース環境で培養した細胞における遺伝子の発現。



(3) 培養脂肪細胞に対する作用の有無についての検討

上記(1)の環境で変化が現れた骨格筋細胞の培地を保存し、これを脂肪細胞の培養液に加えて、骨格筋細胞から放出された因子が、ヒト脂肪細胞から放出されるサイトカインに影響を与えるか否かを検討した。抗体アレイを用いて、ヒト脂肪細胞の培地に放出されたサイトカインの変化を同時に検討した結果、複数のサイトカインの濃度が2倍を超えて増加を示し、圧力負荷によって増加したミオカインが脂肪細胞に作用を及ぼし、サイトカインの放出を変化させたと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Iizuka K, Machida T, Hirafuji M.
Skeletal muscle is an endocrine organ.
J Pharmacol Sci. 2014;125(2):125-31.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計1件)

森田憲輝、沖田孝一、飯塚健治、平藤雅彦、南山堂、「進化する運動科学の研究最前線」運動中における骨格筋のエネルギー代謝メカニズム、2014、83

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等; なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 健治 (IIZUKA KENJI)
北海道医療大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10344467

(2) 研究分担者

平藤 雅彦 (HIRAFUJI MASAHIKO)
北海道医療大学・薬学部・教授
研究者番号: 20142987

町田 拓自 (MACHIDA TAKUJI)
北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号: 90433424

(3) 連携研究者

なし