

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282199

研究課題名(和文) マイオカイン SPARC の発がん予防機構および運動処方への応用に関する包括的研究

研究課題名(英文) Comprehensive study on cancer preventive effect of the myokine SPARC and its application for exercise prescription

研究代表者

青井 渉 (Aoi, Wataru)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：60405272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000 円

研究成果の概要(和文)：骨格筋から分泌される機能性タンパク質(マイオカイン) SPARCは、運動によって血中に増加し、習慣的運動による大腸発がん予防に寄与する。この作用機序に関して、SPARCは大腸の病変部位に直接作用してがん化を防ぐことを明らかにした。さらに、分泌されたSPARCは骨格筋自身にも作用して代謝能を高め、全身の代謝を改善することでも大腸発がんの抑制に寄与することもわかった。健常者、代謝疾患患者いずれにおいても運動を行うことにより血中SPARCの増加が起こることを明らかにし、また食事条件によってSPARC分泌を効率化できる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：SPARC is one of myokines, bioactive proteins secreted from skeletal muscle. The level of circulating SPARC is increased in response to exercise, and contributes to prevention of colon carcinogenesis by habitual exercise. Our results showed that SPARC directly affects the lesion site of the colon, and prevents carcinogenesis. In addition, the SPARC could increase metabolic capacity of skeletal muscle itself, leading to improved whole body metabolism, which also contributes to the suppression of colon carcinogenesis. The increase of circulating SPARC was found in both healthy subjects and metabolic patients. In addition, dietary approach has been suggested to accelerate the secretion of SPARC efficiently.

研究分野：体力科学

キーワード：マイオカイン 大腸がん 運動 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

わが国における死因の第 1 位はがんであるが、中でも大腸がんによる死亡率が年々高まっており、女性 1 位、男性 3 位という現状である(人口動態調査)。各国で行われた 30 以上の疫学的研究から、とりわけ大腸がんについては、リスクを減らすための生活習慣として運動が唯一‘確実’に効果的であると判断されている(世界がん研究基金/米国がん研究協会, 2007)。一方、運動がどのような機序で大腸がんを予防するかについては不明である。

我々はかねてから運動による大腸がん予防効果の機序解明にむけた研究を推進し、腫瘍形成初期段階における‘がんの芽’を抑えることががん予防につながることを報告した(Aoi et al., BBRC, 2010)。さらに、Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) 欠損マウスでは運動による前がん病変(Aberrant crypt foci)形成の抑制効果が認められないこと、大腸上皮がん培養細胞に SPARC を作用させると細胞増殖が抑制されることを見出した(Aoi et al., Gut, 2013)。このことより、運動による大腸がん予防にマイオカイン SPARC が寄与すると考えた。

しかし、SPARC がどのような機序で大腸がんを抑制するのかについては明らかでない。細胞の発がんには、炎症、遺伝子変異、酸化障害、血管新生など様々な要因が考えられるが、SPARC の作用機序について不明である。また、血液中に分泌された SPARC がどのように標的部位(大腸前がん病変)を認識して発がんを抑制するのか、大腸以外の臓器においても SPARC が発がん抑制作用を有するのか、あるいは臓器特異性があるのかについても不明である。さらに、運動によってどのような機序で筋細胞からの分泌が高まるのか、どのような運動条件(運動の様式、強度、習慣の有無など)が分泌を効率化するのかについてもわかっていない。

2. 研究の目的

運動による大腸がん予防の機序解明を目指して、骨格筋から血液中に分泌されるマイオカイン SPARC の大腸がん抑制作用の詳細を明らかにするとともに、筋細胞からの分泌機序および標的細胞の認識機序を解明し、さらに分泌を効率化する運動条件について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

下記(1)から(4)の試験を並行して進めた。

(1) 運動による骨格筋からの SPARC 分泌機序の解明

マウスにトレッドミル走運動を負荷し、骨格筋における SPARC の発現量、局在について生化学的・形態学的手法を用いて経時的に

測定した。

運動は骨格筋のエネルギー代謝レベルを劇的に変動させることから、インスリン刺激、細胞内 AMP 上昇によって SPARC 分泌が促進されるか否か検討した。ヒト筋生検組織および培養細胞を用いて、インスリン、5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) を用いた実験を行うとともに、健康者を対象に、食後 30 分と食後 2 時間のタイミングで運動負荷試験を行い、血中 SPARC 濃度を比較した。

(2) SPARC の標的細胞認識機序の解明

SPARC の標的細胞認識の特異性には、タンパク質間の相互作用が関係すると考えられることから、SPARC 結合性タンパク質のスクリーニング・同定を試みた。9000 個以上のタンパク質を搭載した Protein Array を用いて、SPARC との相互作用レベルについて網羅的解析を行った。さらに、スクリーニングされた SPARC 結合性タンパク質候補に関して、生化学的手法を用いて機能調節機序を検討した。

(3) SPARC の大腸がん抑制機序の解明

SPARC の大腸がん抑制作用について、抗炎症作用に焦点をあてて検証した。SPARC 欠損マウスおよび野生型マウスに Dextran sodium sulfate (DSS) および Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) を投与して腸炎を誘発し、腸管長、腸管重量および炎症性サイトカインを測定し、マウス間で比較した。

また、試験(2)においてスクリーニングされた標的候補タンパク質に着目し、SPARC との相互作用が大腸がんの細胞増殖におよぼす影響について培養細胞系を用いて検討した。

(4) SPARC 分泌におよぼす運動条件・身体特性および効率的に分泌を促す運動方法の検討

これまで若齢男性において、運動負荷によって血中 SPARC が増大することがわかっているが、女性、高齢者においても SPARC 分泌応答がみられるか検討した。自転車エルゴメータ運動(40-50%最大心拍数の負荷で 30 分間)の前後に採血を行い、血液中の SPARC 濃度を測定した。また、2 型糖尿病患者においても同様に運動によって血中 SPARC が増加するか否かについても検討した。

運動様式が SPARC 応答におよぼす影響を検討するため、若齢男性を対象に自転車エルゴメータ運動あるいはレジスタンス運動(ベンチプレス、レッグプレス、上体起こし)を負荷し、血液中の SPARC 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 骨格筋における SPARC 含量は運動開

始直後に一時的に低下することが観察され、筋組織から血中へ急速に放出されることが示唆された。また、この効果は運動強度に依存して大きい傾向にあった。運動時間が長くなるにつれて筋 SPARC 含量は回復し、さらには安静時よりも増加することが観察された。

ヒト筋生検組織、培養細胞を用いた実験では、AMPK 活性化剤 AICAR により、mRNA レベルが変わらないにもかかわらずメディウム中へ分泌される SPARC 量が増大することを観察した。これらより、運動による AMPK の活性化が SPARC 分泌に影響をおよぼすことが示唆された。一方、インスリンの刺激によっては mRNA、メディウム含量ともに変動は見られなかった。また、ヒトを対象とした試験においても、食後いずれのタイミングの運動でも血液中 SPARC は同様に上昇したことから、インスリンは SPARC 分泌に大きく影響をおよぼす因子ではないことが示唆された。

(2) 9000個以上のタンパク質を搭載した Protein Arrayを用いて、タンパク質相互作用の網羅的解析を行った。その結果、SPARCと相互作用活性の高い165個のタンパク質スポットを抽出した。このうち、カルシウムチャンネルに着目した実験を進めたところ、チャンネルをノックダウンした筋細胞ではSPARC刺激によるグリコーゲン合成能が低下する傾向を観察した。さらに、培養筋細胞へのSPARC刺激によって、急速に細胞内のカルシウム濃度が上昇することを観察したことから、SPARCによる糖代謝活性の改善にカルシウム濃度の上昇を介したシグナル伝達機構が関与することを示唆する結果を見出した。また、ピオチン標識SPARCをマウスに投与し、SPARCが骨格筋細胞膜へ集積することも観察した。

(3) DSS腸炎モデルおよびTNBS腸炎モデルいずれにおいても、SPARC欠損マウスは野生型マウスと比較して腸管長の短縮、低Disease Activity Indexスコアがみられ、腸炎の軽減が観察された。そのため、SPARCによる発がん抑制作用は抗炎症作用を介したものではないと考えた。一方、正常腸細胞と比較して大腸がん細胞ではSPARC刺激によるアポトーシス活性の亢進がみられた。

SPARCの標的因子探索解析結果の情報をもとに、Cortactinに着目し、SPARCとの関係について検討した。大腸がん細胞では正常腸細胞と比べてCortactin発現量およびリン酸化レベルが高く、SPARCはCortactinを認識し、作用することで細胞死・アポトーシスシグナルを高めることが示唆された。したがって、SPARCの大腸がん抑制機構にCortactinとの相互作用を介したがん細胞増殖シグナル阻害作

用が関与することが考えられる。

また、SPARC欠損マウスは野生型マウスと比較して血糖および血漿インスリン濃度が高く、インスリンを介した細胞増殖の制御機構にもSPARCが寄与する可能性を見出した。

(4) 健康若齢男性に30分間の有酸素運動(自転車こぎ運動)あるいはレジスタンス運動を負荷し、運動前後の血中SPARC濃度の変化を評価した。その結果、いずれの運動によっても血中SPARCの上昇がみられ、上昇の程度は有酸素運動の方が大きかった。一方、歩行運動においては、個人差はあるものの、有意なSPARC上昇はみられず、運動強度に依存する可能性が考えられる。

健康女性、2型糖尿病患者においても自転車こぎ運動による血中SPARC濃度の有意な上昇が認められ、性の違い、代謝疾患の有無を問わず運動効果を得られることが示唆された。また、シス테인供給剤を食事から摂取することにより、血中SPARC上昇の程度が大きく、食事内容によって影響を受けることが示唆された。

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 10件)

青井 渉, 新規マイオカイン SPARC の可能性 - 運動による大腸がん予防作用の解明にむけて -, 体力科学, 64, 263-271, (2013)

Aoi W, Ingenious function of skeletal muscle as a secretory organ: its crucial role for cancer prevention, *J Phys Fitness Sports Med*, 3, 211-215 (2014)

Liu PH, Aoi W, Takami M, Terajima H, Tanimura Y, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T, The astaxanthin-induced improvement in lipid metabolism during exercise is mediated by a PGC-1 α increase in skeletal muscle, *J Clin Biochem Nutr*, 54, 86-89 (2014)

Aoi W, Sakuma K, Does regulation of skeletal muscle function involve circulating microRNAs?, *Front Physiol*, 5, 39 (2014)

Marunaka Y, Yoshimoto K, Aoi W, Hosogi S, Ikegaya H, Low pH of interstitial fluid around hippocampus of the brain in diabetic OLETF rats, *Molecular and Cellular Therapies*, 2, 6 (2014)

Aoi W, Marunaka Y, Importance of pH homeostasis in metabolic health and diseases: crucial role of membrane proton transport, *Biomed Res Int*, 2014:598986 (2014)

内藤 裕二, 青井 渉, 高木 智久, 日常的運動による大腸癌予防: 新規マイオカイン

SPARC の発見とその意義, 消化器内科, 58, 594-598 (2014)

Aoi W, Frontier impact of microRNAs in skeletal muscle research: a future perspective, *Front Physiol*, 5, 495 (2015)

Iwasa M, Aoi W, Nakayama A, Wada S, Miyazaki H, Nakamura T, Ohki K, Higashi A, Milk casein hydrolysate alleviates muscle soreness and fatigue after downhill walking in middle-aged to elderly men. *Ann Sport Med Res*, 2, 1045 (2015)

青井 涉, 疾患別からみた生活習慣とがん: 大腸がん, 成人病と生活習慣病 - 特集 生活習慣とがん, 45, 1248-1252 (2015)

〔学会発表〕(計 15 件)

Hirano N, Aoi W, Takami M, Nakayama A, Ogaya Y, Wada S, Higashi A, The effect of SPARC on insulin-sensitive glucose metabolism in skeletal muscle, 20th International Congress of Nutrition, September 18, 2013 (Granada, Spain)

Aoi W, Yamauchi H, Wada S, Higashi A, Light exercise after high-fat meal suppresses postprandial serum triglyceride in humans, 20th International Congress of Nutrition, September 16, 2013 (Granada, Spain)

青井 涉, マイオカイン SPARC は運動による大腸がん予防に寄与する, テーマ: 大腸がんの予防と運動, 第 12 回 Hindgut Club Japan サテライトミーティング 2013 年 5 月 (名古屋)

青井 涉, 身体活動・運動による発がん予防機構の解明にむけて, シンポジウム: がんの予防・予後に必要な身体活動・運動, 第 64 回日本体育学会大会, 2013 年 8 月 (滋賀)

Aoi W, Ogaya Y, Takami M, Konishi T, Sauchi Y, Park EY, Wada S, Sato K, Glutathione intake improves muscle fatigue induced by exercise associated with increasing PGC-1 α , 61th Annual Meeting of the American College of Sports Medicine, May 30, 2014 (Florida, USA)

Sato K, Aoi W, Potential benefit of glutathione supplementation in sports field: Prevention of exercise-induced muscle fatigue, Symposium: High Performance Foods and Beverages, 248th the American Chemical Society National Meeting & Exposition, August 11, 2014 (San Francisco, USA)

Aoi W, A muscle-secreted protein SPARC suppresses colon tumorigenesis via apoptotic effect, 6th Annual SRP Diabetes-EndoMet Retreat, May 15, 2014 (Stockholm, Sweden)

谷村祐子, 青井 涉, 内藤裕二, 高木智久, 水島かつら, 東村泰希, 吉川 敏一, ワークショップ 腸と骨格筋のダイナミズム,

運動による腸への刺激, 第 69 回日本体力医学会大会, 2014 年 9 月 (長崎)

Aoi W, Ichikawa H, Wada S, Higashi A, Profiles of muscle-enriched microRNAs in response to acute and chronic exercise in young men, 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015 (Yokohama, Japan)

Shirako S, Wada S, Aoi W, Park EY, Nakamura Y, Sato K, Identification of increased glutathione-binding protein in human plasma after supplementation of glutathione, 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015 (Yokohama, Japan)

Tanimura Y, Aoi W, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Higashimura Y, Yoshikawa T, The effect of voluntary exercise on the composition of gut microbiota in mice, 20th Annual Congress of the European College of Sport Science, June 25, 2015 (Malmo, Sweden)

青井 涉, マイオカイン研究の新展開: 代謝-発がん制御システムとしての可能性, シンポジウム: マイオカイン・アディポカイン - 非免疫臓器が分泌するサイトカインの体力科学的意義, 第 70 回日本体力医学会大会, 2015 年 9 月 (和歌山)

Aoi W, Lassiter DG, Björnholm M, Chibalin AV, Zierath JR, Krook A, The myokine SPARC improves glucose metabolism via AMPK in skeletal muscle, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Diabetes: New insights into molecular mechanisms and therapeutic strategies, October 26, 2015 (Kyoto)

Nylen C, Aoi W, Lassiter DG, Naslund E, Zierath JR, Krook A, The AMP-analogue AICAR acutely reduces cytokine transcription in human skeletal muscle, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology - Diabetes: New insights into molecular mechanisms and therapeutic strategies, October 27, 2015 (Kyoto)

Aoi W, The potential role of dietary antioxidants for metabolic improvement and performance boost, Symposium: Obesity & Diabetes, 6th International Conference on Food Factors, November 11, 2015 (Seoul, Korea)

〔図書〕(計 3 件)

Aoi W, Marunaka Y, The importance of regulation of body fluid pH in the development and progression of metabolic diseases, Berhardt, L.V. (Ed.), *Advances in Medicine and Biology*, 77, pp177-189 Nova Science Publishers, New York (2014)

青井 涉, 運動とレドックスシグナル, 別冊医学のあゆみ: レドックス UPDATE - ストレス制御の臨床医学・健康科学, 平家俊男・淀井淳司監修, pp334-337, 医歯

薬出版株式会社，東京（2015）

Aoi W, Naito Y, Nutrition, functional foods, and exercise: A Review. In Bagchi, D. ed., Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention, pp609-618, CRC Press Taylor & Francis Group, Florida, USA (2015)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

青井渉 (AOI WATARU)
京都府立大学・生命環境科学研究科・助教
研究者番号：60405272

(2)研究分担者

内藤裕二 (NAITO YUJI)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00305575

高木智久 (TAKAGI TOMOHISA)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：70405257

佐久間邦弘 (SAKUMA KUNIHIRO)
豊橋技術科学大学・工学部・准教授
研究者番号：60291176

(3)連携研究者

谷村祐子 (TANIMURA YUKO)
愛知東邦大学・人間学部・助教
研究者番号：90551458