

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 11 日現在

機関番号：22604
研究種目：基盤研究(A) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26242068
研究課題名(和文) マイオカインの探索とその生理作用の解明

研究課題名(英文) Myokines and their physiological roles

研究代表者

藤井 宣晴 (Fujii, Nobuharu L)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、骨格筋が分泌するマイオカインを探索しその生理作用を明らかにすることである。我々が開発した、培養骨格筋細胞の収縮モデルを用いて、筋収縮後に培養上清に分泌されるタンパク質を質量分析によって同定した。さらに収縮後にmRNA発現変化が見られる遺伝子をDNAマイクロアレイで同定した。その結果、約40個の分子が同定された。次に同定された分子を、ショウジョウバエの骨格筋特異的にsiRNAでノックダウンしたところ、寿命が短縮(分子A)あるいは延長(分子B)するものが複数あった。分子Aの骨格筋特異的過剰発現マウスを作製したところ、エネルギー基質が糖質寄りになり、糖負荷試験の結果が向上した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to find myokines secreted by skeletal muscle cells and elucidates their physiological roles. Conditional cell culture media of C2C12 myotubes were provided to mass analysis after contraction to identify new myokines. mRNA was isolated from the C2C12 myotubes after contraction and also provided to DNA micro array analysis. As a result, we had around 40 candidates of novel myokines. Then, each candidate molecule was knocked down in skeletal muscle-specific manner in drosophila. We observed shorten life span in myokine A knocked down drosophila. On the other hand, we observed prolonged life span in myokine B knocked down drosophila. Next, we generated skeletal muscle specific myokine A over expression mice. The transgenic mice had higher glucose metabolism rate and better result of glucose tolerance test compared to wild type mice.

研究分野：代謝内分泌科学 運動分子生物学

キーワード：マイオカイン 骨格筋 筋収縮 遺伝子組み換えマウス 遺伝子組み換えショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

運動は多様な健康効果を全身にもたらす。このような「多様」で「全身性」に恩恵効果をもたらされるメカニズムは明らかになっていない。我々は、運動によって生じる健康の恩恵効果は、骨格筋から分泌される複数の多様な生理活性因子（総称してマイオカイン；myo = 筋、kine = 作動因子）によって全身性に届けられるとの仮説を有している。

2. 研究の目的

骨格筋から分泌されるマイオカインを探索し、それらの生理作用を明らかにする。

3. 研究の方法

(1), マイオカインの探索

我々が構築した培養骨格筋細胞の収縮モデルを用いて、培養上清中のタンパク質を質量分析によって網羅的に探索した。また、収縮後に筋細胞で mRNA 発現レベルが変化した遺伝子を、DNA マイクロアレイ解析で網羅的に探索した。見つかった分子の中から、バイオインフォマティクス解析で「分泌様タンパク質」と推定されたものを、マイオカイン候補として後の分析に供した。

(2), ショウジョウバエを用いた解析

マイオカイン候補と考えられたタンパク質を骨格筋特異的にノックダウンさせたショウジョウバエ（以下、ハエ）を作製した。ノックダウンは UAS-Gal4 システム下で働く RNAi を用いた。作製したハエの中で寿命が短縮あるいは延長する系統については、ノックダウンした分子が生体内でよりインパクトの高い作用を有するものと判断し、以降の解析に供した。

(3), マウスを用いた解析

ハエにおいて、ノックダウンにより寿命が短縮した分子 A については、骨格筋特異的に過剰発現させたマウスを作製した。プロモーターには、骨格筋に特異性の高い human α -actin promoter を使用した。また、ハエにおいて、ノックダウンにより寿命が延長した分子 B については、骨格筋特異的なノックアウトマウスを作製した。このマウスの作製は、ドキシサイクリンで誘導可能な human α -actin promoter 下で発現する Cre マウスと、分子 B のエクソンを Flox で挟んだマウスを掛け合わせることで得た。

4. 研究成果

(1), 約 40 個のタンパク質・ペプチドがマイオカイン候補分子として同定された。質量分析では比較的大きな分子が、また DNA マイクロアレイでは比較的小さな分子が同定される傾向にあった。

(2), 分子 A を骨格筋特異的にノックダウンしたハエでは、寿命の短縮が観察されたため、分子 A は本来、何らかの好い働きをしている可能性が示唆された。また、分子 B を骨格筋特異的にノックダウンしたハエでは、寿命の

延長が観察されたため、本来は何らかの悪い働きをする可能性が示唆された。

(3), 分子 A の骨格筋特異的過剰発現マウスを作製したところ、エネルギー基質が糖質寄りになり、糖負荷試験の結果が向上した。分子 B の骨格筋特異的ノックアウトマウスは現時点で F2 世代が生出してきている。

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 13 件)

① Kitamura K, Takamura Y, Iwamoto T, Nomura M, Iwasaki H, Ohdera M, Murakoshi M, Sugiyama K, Matsuyama K, Manabe Y, Fujii NL, Fushiki T: Dammarane-type triterpene extracts of *Panax notoginseng* root ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity by enhancing glucose uptake in skeletal muscle, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017 in press. (査読有)

② Inagaki A, Maruo K, Furuichi Y, Miyatake S, Tamura K, Fujii NL, Manabe Y: An improved glucose transport assay system for isolated mouse skeletal muscle tissues, *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017 in press. (査読有)

③ Inada A, Inada O, Fujii NL, Nagafuchi S, Katsuta H, Yasunami Y, Matsubara T, Arai H, Fukatsu A, Nabeshima Y: Adjusting the 17 β -Estradiol-to-Androgen Ratio Ameliorates Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 27(10):3035-3050, 2016 (査読有)

④ Inada A, Fujii NL, Inada O, Higaki Y, Furuichi Y, Nabeshima YI. Effects of 17 β -Estradiol and Androgen on Glucose Metabolism in Skeletal Muscle.

Endocrinology. 157: 4691-4705. 2016.

⑤Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. Anal Biochem, 497: 36-38, 2016. (査読有)

⑥Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: Evaluation of an in vitro muscle contraction model in mouse primary cultured myotubes. Anal Biochem, 497: 36-38, 2015. (査読有)

⑦Yu H, Fujii NL, Toyoda T, An D, Farese RV, Leitges M, Hirshman MF, Mul JD, Goodyear LJ: Contraction stimulates muscle glucose uptake independent of atypical PKC. Physiol Rep, 3: e12565, 2015. (査読有)

⑧Goto-Inoue N, Tamura K, Motai F, Ito M, Miyata K, Manabe Y, Fujii NL: A fragmented form of annexin A1 is secreted from C2C12 myotubes by electric pulse-induced contraction. Mol Cell Biochem, 411: 173-180, 2015. (査読有)

⑨Shoji E, Sakurai H, Nishino T, Nakahata T, Heike T, Awaya T, Fujii NL, Manabe Y, Matsuo M, Sehara-Fujisawa A: Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells. Sci Rep, 5: 12831, 2015. (査読有)

⑩Miyatake S, Manabe Y, Inagaki A, Furuichi Y, Takagi M, Taoka M, Isobe T, Hirota K, Fujii NL: Macrophage migration

inhibitory factor diminishes muscle glucose transport induced by insulin and AICAR in a muscle type-dependent manner. Biochem Biophys Res Commun 444: 496-501, 2014.

(査読有)

⑪Furuichi Y, Goto-Inoue N, Manabe Y, Setou M, Masuda K, Fujii NL: Imaging mass spectrometry reveals fiber-specific distribution of acetylcarnitine and contraction-induced carnitine dynamics in rat skeletal muscles. Biochim Biophys Acta 1837: 1699-1706, 2014. (査読有)

⑫Manabe Y, Takagi M, Nakamura-Yamada M, Goto-Inoue N, Taoka M, Isobe T, Fujii NL: Redox proteins are constitutively secreted by skeletal muscle. J Physiol Sci 64: 401-409, 2014.

(査読有)

⑬Inada A, Inada O, Fujii NL, Fujishima K, Inai T, Fujii H, Sueishi K, Kurachi K: β -cell induction in vivo in severely diabetic male mice by changing the circulating levels and pattern of the ratios of estradiol to androgens. Endocrinology 155: 3829-3842, 2014. (査読有)

[学会発表] (計 28 件)

①眞鍋康子: マイオカインは運動模倣薬となるか?. 日本薬学会第 137 年会 (シンポジウム招待講演), 2017 年 3 月 27 日, 仙台.

②藤井宣晴: 骨格筋から健康が生まれる仕組み. 第 8 回 区東部・区東北部ブロック学術集会 (特別講演). 2016 年 3 月 6 日, 東京.

③藤井宣晴: 骨格筋の新機能 - 糖輸送調節とマイオカイン分泌 -. 第 30 回循環・代謝セミナー. 北海道大学病院内科, 2016 年 3 月 4

日, 東京.

④藤井宣晴: 運動を科学するとは. 九州大学リサーチコアチーム 身体活動・座位行動の科学日本 (基調講演), 2016年2月11日, 東京.

⑤藤井宣晴: 筋萎縮および筋肥大研究のための骨格筋培養細胞モデルの創出. 日本分子生物学会 (ワークショップ・招聘講演), 2015年12月2日, 神戸.

⑥藤井宣晴: 骨格筋・リターンズ. 平成27年度国公立大学病院医療技術関係職員研修 (招聘講演), 2015年10月21日, 東京

⑦古市泰郎, 眞鍋康子, 高木麻由美, 青木美穂, 藤井宣晴: IL-6は筋収縮のカルシウム放出をトリガーとして分泌促進される. 第70回日本体力医学会大会, 2015年9月18日, 和歌山.

⑧Manabe Y, Ogino S, Ito M, Furuichi Y, Takagi M, Yamada M, Goto-Inoue N, Ono Y, Fujii NL: An in vitro contraction model in mouse primary cultured myotubes using satellite cells originated from EDL and soleus. 2nd Congress, International Academy of Sportology, 2015年9月12日, 東京.

⑨眞鍋康子: 骨格筋から分泌されるホルモン (マイオカイン) の探索. 日本体育学会第66回大会 (シンポジウム), 2015年8月25日, 東京.

⑩古市泰郎: 急性収縮によってマイオカインが分泌調節されることの証明. 日本体育学会第66回大会 (シンポジウム), 2015年8月25日, 東京.

⑪古市泰郎, 眞鍋康子, 増田和実, 藤井宣晴: 筋収縮はカルニチンの取り込みとアセチル

化を促進させる. 第23回日本運動生理学会大会, 2015年7月25日, 東京.

⑫藤井宣晴: Secretion of Myokines Regulated by Contraction in C2C12 Myotubes. 第48回日本動脈硬化学会 (シンポジウム招待講演), 2015年7月14日, 東京.

⑬眞鍋康子, 荻野慎也, 高木麻由美, 井上(後藤)菜穂子, 山田美緒, 小野悠介, 古市泰郎, 藤井宣晴: 骨格筋初代培養細胞とC2C12細胞株の細胞特性の検証. 第67回日本細胞生物学会, 2015年6月30日, 東京.

⑭藤井宣晴: 筋収縮に応じたマイオカイン分泌の証明. - バイオマーカーとしての可能性 -. 第5回TOBIRA研究交流フォーラム (主催者講演), 2015年5月23日, 東京.

⑮藤井宣晴: 糖代謝調節に関わる筋収縮調節性マイオカインの探索ストラテジー. 日本糖尿病学会 (シンポジウム), 2015年5月22日, 下関.

⑯Manabe Y, Inagaki A, Maruo K, Tamura K, Furuichi Y, Fujii NL: Development of a new in vitro skeletal muscle contraction system. 12th Asian Congress of Nutrition, 2015年5月15日, 横浜.

⑰藤井宣晴 交流講演: 筋収縮がインスリン非依存的に骨格筋への糖輸送を促進する機序. 東京都医学総合研究所・首都大学東京交流発表会, 2014年12月26日 東京.

⑱眞鍋康子: 骨格筋から分泌されるマイオカインの探索と機能解明. 東京都医学総合研究所交流セミナー, 2014年12月26日, 東京.

⑲藤井宣晴 招待講演: 筋萎縮および筋肥大研究のための骨格筋培養細胞モデルの創出. 脳心血管抗加齢研究会, 2014年12月7日 大阪.

⑳古市泰郎, 眞鍋康子, 高木麻由美, 青木美穂, 藤井宣晴: 骨格筋培養細胞を用いた急性収縮によるマイオカイン分泌調節の証明. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日, 横浜.

㉑古市泰郎: 培養細胞を用いた筋収縮応答性マイオカイン分泌の証明. 第2回若手による骨格筋細胞研究会, 2014年11月10日, 京都.

㉒眞鍋康子: 新規マイオカインの探索と機能解明のストラテジー. 第2回若手による骨格筋細胞研究会, 2014年11月10日, 京都.

㉓Takamura Y, Kitamura K, Iwamoto T, Nomura M, Ichiba Y, Murakoshi M, Uchiyama A, Manabe Y, Fujita S, Fujii NL: Ingestion of Panaxatoriol ameliorates Insulin resistance in KK-A^Y mice by promoting insulin dependent glucose uptake in skeletal muscle. 第36回欧州臨床栄養代謝学会議, 2014年9月23日, Geneva.

㉔藤井宣晴 シンポジウム: エネルギー代謝機構を「分子」の視座で捉える. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月20日 長崎.

㉕眞鍋康子, 宮武正太 シンポジウム: マイオカインによる糖代謝の調節. 第69回日本体力医学会大会, 2014年9月20日 長崎.

㉖古市泰郎, 井上菜穂子, 眞鍋康子, 瀬藤光利, 増田和実, 藤井宣晴: 質量分析イメージングを用いた骨格筋アセチルカルニチンの可視化. 第69回日本体力医学会大会, 2014年26年9月20日, 長崎.

㉗眞鍋康子, 高木麻由美, 山田美緒, 井上(後藤) 菜穂子, 田岡万悟, 磯辺俊明, 藤井宣晴: チオレドキシンは骨格筋から構成性に分泌されるマイオカインである. 第66回日本細胞生物学会, 2014年6月11日, 奈良.

㉘藤井宣晴 シンポジウム: Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) suppresses glucose transport in skeletal muscle. 第57回日本糖尿病学会, 2014年5月24日 大阪.

[図書] (計7件)

①藤井宣晴: 6章-1 運動生理学から身体不活動の生理・分子生物学へ. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, in Press.

②眞鍋康子, 古市泰郎: 7章-1 身体運動に伴う生体機能適応を支える分子機構. エビデンスに基づく身体活動の科学 (熊谷秋三, 田中茂穂, 藤井宣晴 編集), 杏林書院, in Press.

③Fujii NL: Overview. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 127-137, 2016.

④Manabe Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Intracellular signaling in skeletal muscle contraction. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 139-153, 2016.

⑤Furuichi Y: Mechanism of skeletal muscle contraction: Role of mechanical muscle contraction in glucose homeostasis. In Musculoskeletal Disease Associated With Diabetes Mellitus (Masaaki Inaba Eds), Springer, 155-169, 2016.

⑥眞鍋康子: 第11章 摂取エネルギー 肥満および食行動. In 最新栄養学 第10版(翻訳) (木村修一, 古野純典 監修), 建帛社, 2015.

⑦眞鍋康子, 藤井宣晴: 運動による血糖降下のメカニズム. In 糖尿病治療のニューパラダイム 第1巻(加来浩平, 加来浩平, 松田昌文, 池上博司, 宇都宮一典 編集), 医薬ジャーナル社, 2015.

[その他]
ホームページ等
<http://www.comp.tmu.ac.jp/muscle/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 宣晴 (NOBUHARU L FUJII)

首都大学東京・人間健康科学研究科・教授

研究者番号：40509296

(2) 研究分担者

井上 菜穂子 (NAOKO GOTO-INOUE)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：00509515

古市 泰郎 (YASURO FURUICHI)

首都大学東京・人間健康科学研究科・助教

研究者番号：40733035

眞鍋 康子 (YASUKO MANABE)

首都大学東京・人間健康科学研究科・准教授

研究者番号：60467412

中川 嘉 (YOSHIMI NAKAGAWA)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構

・准教授

研究者番号：80361351