

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750303

研究課題名(和文) 運動によるミトコンドリア生合成および血管新生におけるリゾリン脂質の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of lysophospholipids in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis.

研究代表者

川西 範明 (KAWANISHI, Noriaki)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・特別研究員

研究者番号：00706533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：持久的運動はミトコンドリア生合成や血管新生などの骨格筋の適応現象を惹起するが、これらの現象を制御する分子機序は未だ不明瞭である。リゾリン脂質は様々な生理作用を有することから、持久的運動による骨格筋の適応現象にリゾリン脂質が関与すると仮説を立て、持久的運動により骨格筋で変動するリゾリン脂質分子種の探索を行った。その結果、急性の持久的運動および持久的運動トレーニングにより骨格筋組織中で特定の脂肪酸を含有するリゾリン脂質分子種が増加することが示された。以上の結果から、持久的運動は骨格筋中の特定のリゾリン脂質分子種の濃度を変化させることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Endurance exercise is known to induce skeletal muscle adaptation such as mitochondrial biogenesis and angiogenesis, but the molecular mechanisms regulating these phenomena are still unclear. Lysophospholipid is known to have several physiological functions. Therefore, we hypothesized that lysophospholipid is associated with exercise-induced skeletal muscle adaptation. We examined lysophospholipid molecular species changes by endurance exercise. As a result, acute endurance exercise and endurance exercise training showed that lysophospholipid molecular species containing specific fatty acids increased in skeletal muscle tissue. From the above results, we found that endurance exercise changes the concentration of specific lysophospholipid molecular species in skeletal muscle.

研究分野：運動生理学

キーワード：リゾリン脂質 運動 骨格筋 質量分析 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

持久的運動トレーニングは骨格筋のミトコンドリア生合成や血管新生などの適応現象を惹起することで、糖尿病などのメタリックシンドロームの予防あるいは改善効果が期待されている。これらの疾患に対して適切な運動療法を実施する上でも、運動による骨格筋の適応現象の分子機序を解明することが重要である。しかしながら、持久的運動トレーニングによる骨格筋の適応現象の分子機序については十分には解明されていない。

持久的運動トレーニングは骨格筋組織において p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) および AMP-activated protein kinase (AMPK) のリン酸化を介した peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC) -1 の活性化などの細胞内情報伝達経路を活性化することで、ミトコンドリア生合成や血管新生などの骨格筋の適応現象を引き起こすことが知られている。しかしながら、これらの細胞内情報伝達経路の制御機構については未だ不明瞭な点が数多く残されている。

脂質はエネルギー基質や細胞膜構成成分としての役割以外に、生理作用を有する分子として近年注目されている。脂質分子は構造や保持する脂肪酸の違いにより生体内には多様な分子種が存在し、各種の脂質分子種の生理機能は異なる。

生体内にはグリセロ脂質やリン脂質以外に、リゾリン脂質や脂肪酸代謝物などの脂質分子が微量に存在しているが、これらの脂質分子の一部は「脂質メディエーター」として機能することが知られている。これらの脂質メディエーターは外来刺激に応答して細胞外に放出され、他細胞の細胞膜受容体に結合することで作用する役割も有する。リゾリン脂質に対しては、特異的な G タンパク質共役型受容体が存在し、p38MAPK や AMPK などのキナーゼのリン酸化を介した細胞内情報伝達経路を制御することにより、細胞増殖および免疫応答など多様な生理作用を発揮することが知られている(文献2)。また、各種のリゾリン脂質の特異的受容体の遺伝子改変動物を用いた研究により、これらの脂質メディエーターの多くが、疾患の発症・進展に関連する分子であることが分かってきた。近年、質量分析技術の発展に伴い、これらの微量な脂質分子の高感度な定量が可能となり、新規バイオマーカーとしての役割が期待されている。

一方で、骨格筋のミトコンドリア生合成や血管新生はリゾリン脂質によって制御される細胞内情報伝達経路が関与する(文献2)ことから、骨格筋の適応現象にもリゾリン脂質が関与する可能性が考えられる。しかしながら、持久的運動による骨格筋のリゾリン脂質の変動と生理作用については解明されていない。持久的運動によるリゾリン脂質の変

動とその生理作用についての分子機構を検討することで、持久的運動に伴う骨格筋の生体適応の作用機序を解明することが重要である。本研究により、リゾリン脂質を介した骨格筋組織の生体適応メカニズムの解明が進めば、その知見に基づいた、糖尿病や加齢性筋代謝不全などの疾患に対する効果的な治療法の開発や、新規創薬に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では運動によるリゾリン脂質の変動と生理作用を検証するために、以下の目的を設定した。

(1) 脂質分子種の同定および定量が可能となる高速液体クロマトグラフ質量分析計および質量分析イメージング装置を用いて、急性の持久的運動および持久的運動トレーニングにより骨格筋で変動するリゾリン脂質などの脂質分子種の探索。

(2) 細胞培養実験により、骨格筋のミトコンドリア生合成に関与する脂質分子種の探索

3. 研究の方法

(1) 運動による骨格筋で変動する脂質分子種の探索

急性運動による骨格筋のリゾリン脂質の変動を検証するために、小動物用トレッドミル装置を用いた運動負荷を実施した。マウスは予備飼育後に、2回の走行訓練を行った。走行訓練の7日後以降に、マウスに90分間の中等度持久的走行運動を負荷した。運動直後、6時間後、24時間後に麻酔下で解剖して、採血および骨格筋の採取を行った。

また、運動トレーニングによる骨格筋のリゾリン脂質の変動を検証するために、1日120分間の持久的走行運動を週5回の頻度で、8週間負荷した。運動トレーニング期間最終日の48時間後に麻酔下で解剖して、採血および骨格筋の採取を行った。

採取した血液はおよび骨格筋組織からの脂質成分の抽出は Bligh & Dyer 法により実施した。具体的には、血漿成分にクロロホルム、メタノールを添加して混合した後に、遠心分離を行い、脂質成分を含んだ有機溶媒層を回収した。骨格筋組織はクロロホルム、メタノールを添加して粉砕した後に、遠心分離を行い、脂質成分を含んだ有機溶媒層を回収した。抽出液からクロマトグラフィー手法により脂質を分離した後に、トリプル四重極型質量分析計を用いてリゾリン脂質などの各種の脂質分子種の濃度を測定した。また、骨格筋の組織切片を作製した後にイメージング質量分析装置を用いて、リゾリン脂質の組織局在を評価した。

加えて、脂質代謝に関連する酵素の発現についてウエスタンブロット法および real-time

PCR 法により定量した。

(2) リゾリン脂質が骨格筋のミトコンドリア密度に及ぼす影響

マウスの骨格筋細胞株 C2C12 細胞を用いて、リゾリン脂質が骨格筋細胞のミトコンドリア密度に及ぼす生理作用について検証した。具体的には、リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジン酸を 1 μ M、5 μ M、25 μ M の濃度で骨格筋細胞に添加した。

リゾリン脂質の細胞毒性を評価するために、細胞内の脱水素酵素の活性を測定した。細胞内のミトコンドリアの増殖は、ミトコンドリア内のマトリックスを特異的に染色する MitoTracker Green で染色した後に、フローサイトメトリー法により細胞内のミトコンドリア密度を評価することで検証した。また、ミトコンドリアの増殖の制御因子の一種である peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator (PGC)-1, nuclear respiratory factor (Nrf) の発現をウエスタンブロット法および real-time PCR 法により定量した。

4. 研究成果

(1) 運動による骨格筋で変動する脂質分子種の探索

急性の持久的運動により骨格筋で変動する各種の脂質分子種について質量分析技術を用いて検証した。その結果、急性運動の直後に血液中および骨格筋中の中鎖脂肪酸および長鎖脂肪酸を含有する各種のアシルカルニチンの濃度が増加することが示された(図1)。また、運動トレーニングにより骨格筋において長鎖脂肪酸を含有する各種のアシルカルニチンの濃度が増加することが示された。骨格筋細胞内に局在するアシルカルニチンはミトコンドリアでアセチル CoA に変換された後に、ATP 生成に利用されることから、運動は骨格筋での脂質の利用を増加させる可能性が考えられる。

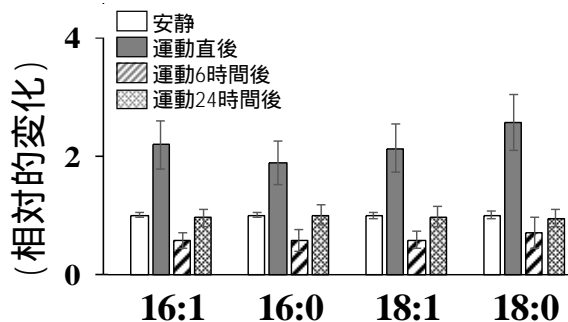


図1 急性運動による骨格筋中の長鎖脂肪酸含有アシルカルニチン濃度の変動

スフィンゴミエリンやセラミドなどの脂質の各種分子種の骨格筋中の濃度は急性運動後には変動は観察されなかった。一方で、血液中の長鎖脂肪酸を含有するセラミドの分子種の濃度は急性運動の6時間後に増加することが示された。

リン脂質の一種であるホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンの分子種濃度は骨格筋において急性運動後に変動は観察されなかった。一方で、運動トレーニングは、長鎖脂肪酸を含有するホスファチジルエタノールアミンの分子種濃度の増加が観察された。

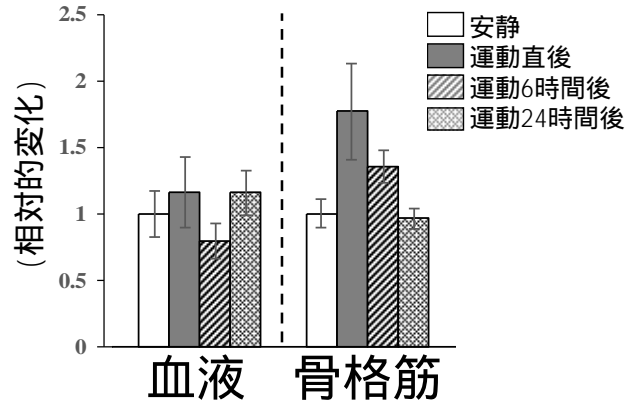


図2 急性運動による血液中および骨格筋中の長鎖脂肪酸含有リゾホスファチジン濃度の変動

リゾリン脂質の一種であるリゾホスファチジン酸およびリゾホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルグリセロールは長鎖脂肪酸を含有する特定の分子種が急性運動直後に骨格筋で増加することが示された(図2)。一方で、運動トレーニングは、骨格筋において特定の脂肪酸を含有するリゾホスファチジルコリンおよびリゾホスファチジルエタノールアミンの濃度を増加させることが示された。

以上の結果から、急性の持久的運動および持久的運動トレーニングはともに、骨格筋で特定の脂質分子種の濃度を変動させることを見出した。

また、質量分析イメージング装置を用いて、リゾリン脂質などの各種の脂質分子種の骨格筋組織での局在について検証を試み、筋線維タイプ特異的に変動する脂質分子種の同定を進めている。

リゾリン脂質は細胞膜や脂肪滴を構成するリン脂質がホスホリパーゼ A2 の作用によって分解されることで生成されるが、運動はホスホリパーゼ A2 を活性化させるカルシウムイオンの細胞内濃度を増加させる。したがって、運動による刺激が骨格筋のホスホリパーゼ A2 を活性化させることで、リゾリン脂質の生成を誘導する可能性が考えられる。今後は、リゾリン脂質の生成に関連する脂質代謝酵素の発現を検証することで、リゾリン脂質生成の分子機序の解明を試みる。

(2) リゾリン脂質が骨格筋のミトコンドリア密度に及ぼす影響

リゾリン脂質の細胞毒性を評価した結果、リゾホスファチジン酸の全ての添加濃度で骨格筋細胞内の脱水素酵素の活性の低下が

観察されなかったことから、本研究で用いたゾホスファチジン酸の添加濃度では細胞毒性は生じないことが示された。

また、リゾリン脂質のミトコンドリア生合成への作用を検証した細胞実験の結果により、骨格筋細胞への 5 μ M の濃度でのゾホスファチジン酸の添加は、ミトコンドリア増殖の制御因子である PGC-1 および Nrf の発現が増加した。これらの結果は、リゾリン脂質が骨格筋細胞でのミトコンドリア生合成を制御する可能性を示唆している。しかしながら、MitoTracker Green 染色によるミトコンドリア密度の評価では、本研究で用いたゾホスファチジン酸の濃度では影響が見られなかった。今後は、運動による骨格筋で分泌されるリゾリン脂質がミトコンドリアの生合成に関与するか否かについての詳細な検証が求められる。

<引用文献>

Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. *Annu Rev Biochem.* 2004. 73:321-354. *Annu Rev Biochem.* 2004. 73:321-354.

Lira VA, Benton CR, Yan Z, Bonen A. PGC-1 α regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010. 299: E145-161.

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3件)

Kawanishi Noriaki, Risa Nozaki, Hisashi Naito, Shuichi Machida. TLR4-defective (C3H/HeJ) mice are not protected from cast immobilization-induced muscle atrophy. *Physiological Reports.* 5: e13255. 2017.

Amano Akiko, Kondo Yoshitaka, Noda Yoshihiro, Ohta Mitsuhiro, Kawanishi Noriaki, Machida Shuichi, Mitsuhashi Kazuteru, Senmaru Takafumi, Fukui Michiaki, Takaoka Osamu, Mori Taisuke, Kitawaki Jo, Ono Masafumi, Saibara Toshiji, Obayashi Hiroshi, Ishigami Akihito. Abnormal lipid/lipoprotein metabolism and high plasma testosterone levels in male but not female aromatase-knockout mice. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 622: 47-58. 2017

Kawanishi Noriaki, Mizokami Tsubasa, Niihara Hiroyuki, Yada Koichi, Suzuki Katsuhiko. Neutrophil Depletion Attenuates Muscle Injury following Exhaustive Exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 48: 1917-1924. 2016. Kawanishi Noriaki, Mizokami Tsubasa, Niihara Hiroyuki, Yada Koichi, Suzuki Katsuhiko.

Macrophage depletion by clodronate liposome attenuates muscle injury and inflammation following exhaustive exercise. *Biochemistry and Biophysics Reports.* 5: 146-151. 2016.

Ma Yi-Shing, Yoshida Shigeru, Kobayashi Yu, Kawanishi Noriaki, Furukawa Takayuki, Fuda Hiroto, Hui Shu-Ping, Chiba Hitoshi. Improvement of Mitochondrial Function and Lipid Utilization by 3,5-dihydroxy-4-methoxybenzyl Alcohol, an Oyster-derived polyphenol, in Oleate-loaded C2C12 Myotubes. *Journal of Food and Nutrition Research.* 4: 498-507. 2016.

[学会発表](計2件)

川西範明, 高木香奈, 李賢哲, 奥野利明, 横溝岳彦, 町田修一. 長期間の高強度持久的運動トレーニングによる骨格筋内のアシルカルニチン分子種濃度の変動. 第168回日本体力医学会関東地方会(東京). 2016年12月3日

川西範明, 高木香奈, 李賢哲, 奥野利明, 横溝岳彦, 町田修一. 持久的運動トレーニングおよび高脂肪食餌負荷が骨格筋のリン脂質分子種濃度に及ぼす影響. 第58回日本脂質生化学会(秋田). 2016年6月9-10日

[図書](計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

川西範明 (KAWANISHI, Noriaki)

順天堂大学・スポーツ健康科学研究科・特別研究員

研究者番号: 00706533