

最先端・次世代研究開発支援プログラム  
事後評価書

研究課題名	筋収縮によって骨格筋から分泌される生理活性因子の探索と運動調節性筋内分泌の概念の確立
研究機関・部局・職名	首都大学東京・人間健康科学研究科・教授
氏名	藤井 宣晴

## 【研究目的】

本研究は、「運動がもたらす多様な健康効果は、収縮中の筋細胞から分泌される生理活性因子（総称してマイオカインと呼ばれる。myo = 筋、kine = 作動因子）によって、全身に生じる」という仮説を検証し、従来はホルモン等の分泌器官とは考えられてこなかった骨格筋を中心とする、運動調節性筋内分泌という新概念を確立することを目的としている。この目的を実現するために、(I) 骨格筋が分泌するマイオカイン（主にタンパク質）を、独自に開発した培養骨格筋細胞の電気収縮システムを用いて、網羅的に探索する（プロテオームおよびDNA マイクロアレイ解析）。(II) 同定されたマイオカインの中から重要な生理機能を持つことが予測されるものを絞り込み、以後の解析の優先順位を決める（同定されたマイオカインのホモログを、ショウジョウバエの骨格筋特異的にノックダウンする系統を樹立し、その表現型（寿命、自発活動量、運動能力、日内リズム、等）を観察することで絞り込む）。(III) 絞り込まれたマイオカインについては遺伝子組み換えマウスを作製し、詳細な生理機能を解析する。(IV) マイオカインが、筋収縮をトリガーにして骨格筋から分泌されるかを確認する。

## 【総合評価】

	特に優れた成果が得られている
○	優れた成果が得られている
	一定の成果が得られている
	十分な成果が得られていない

## 【所見】

## ① 総合所見

目的は明確であり、本研究の着想に至った動機も優れている。  
中間評価では未達成の部分もみられたが、研究期間内に当初の検討課題はほぼ達成されたといえる。  
独自に開発した細胞収縮システムを用いて、骨格筋から分泌蛋白 45 分子を同定した。同定したマイオカインの中でショウジョウバエにホモログの存在が確認できたも

のは 31 分子であった。これらの中から、RNAi ノックダウン系統が国際バンクから入手可能だった 21 分子について、筋特異的 RNAi ノックダウン系統を樹立し表現型を確認した。その結果、3 系統で寿命が短縮し (Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)、Peroxisredoxin-6、Slit)、1 系統で寿命が延長する (分子 A) ことが確認された。さらに MIF は骨格筋から分泌されると骨格筋自身に作用して、インスリン刺激や AMP キナーゼ活性化によって生じる骨格筋の糖輸送を、抑制することを明らかにした。つまり、MIF は糖尿病治療の新たな標的分子になり得ることが示された。筋収縮がトリガーとなって調節性に分泌されるマイオカインは少なく (Interleukin-6 と -15)、それら以外は構成性に (つまり恒常的に) 分泌されることが明らかになった。筋収縮による調節性分泌の存在を明らかにしたのは、本研究が初めてである。

骨格筋細胞内のカルニチン (脂質の一種) が、糖代謝を抑制するアセチル CoA と結合して細胞外と一緒に排出されることを示唆し、マイオカインの新たな機能の可能性を提示した。

研究実施体制、マネジメントはおおむね適切であり、助成金の執行状況は問題ない。

## ② 目的の達成状況

・ 所期の目的が

(  全て達成された ・  一部達成された ・  達成されなかった )

研究は当初の目的をほぼ全てに関して達成したと判断する。

(I) 網羅的探索 独自に開発した細胞収縮システムと、プロテオームおよび DNA マイクロアレイ解析を組み合わせ、網羅的探索を行った。検出されたタンパク質分子および遺伝子の配列情報から、バイオ・インフォマティクスの手法で分泌構造を持つ分子を予測させた。その結果、45 分子が骨格筋からの分泌タンパク質 (マイオカイン) として同定できた。(II) 重要な機能を持つと予測される分子の絞り込み (I) で同定したマイオカインの中でショウジョウバエにホモログの存在が確認できたものは 31 分子であった。これらの中から、RNAi ノックダウン系統が国際バンクから入手可能だった 21 分子について、筋特異的 RNAi ノックダウン系統を樹立し表現型を確認した。その結果、3 系統で寿命が短縮し (Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)、Peroxisredoxin-6、Slit)、1 系統で寿命が延長する (分子 A) ことが確認された。(III) 遺伝子組み換えマウスの入手・作製と、その解析 (II) の結果を受けて、北海道情報大学および北海道大学のグループから MIF ノックアウトマウス (MIF-KO マウス) を供与され、表現型の解析を行った。その結果、MIF は骨格筋から分泌されると骨格筋自身に作用して、インスリン刺激や AMP キナーゼ活性化によって生じる骨格筋の糖輸送を、抑制することが明らかになった。つまり、MIF は糖尿病治療の新たな標的分子になり得ることが示された。また、Peroxisredoxin-6 を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス (Prx6 TG マウス) も作製した。現在、解析用に F2 世代の繁殖を行うと同時に体重や血糖値などの基礎データを得おり、Prx6 TG マウスでは野生型マウスよりも、ケージ内行動量が多い傾向が得られている。Slit および分子 A については、前者は骨格筋特異的過剰発現マウス、後者は骨格筋特異的ノックアウトマウスを作製しており、今後の検討が期待される。(IV) 筋収縮で分泌されるか

**の確認** 本研究ではこれまでに知られていない2つの重要な現象を発見した。1) 培養骨格筋細胞は、培養液を交換しただけで非特異的に過剰な分泌を起こす。その量が多いため、非特異的分泌の影響を排除しないと、筋収縮による分泌はマスクされ検出できない(偽陰性)。2) 収縮で筋細胞が壊れてしまうと、大量の細胞内タンパク質が培養液に漏出し、それがあたかも分泌されたかのように観察されてしまう(偽陽性)。実際に、1)・2)の問題を取り除いた条件でないと「筋収縮による分泌」は検出できないことを見出した。筋収縮がトリガーとなって調節性に分泌されるマイオカインは少なく(Interleukin-6 と-15)、それら以外は構成性(つまり恒常的に)分泌されることが明らかになった。筋収縮による調節性分泌の存在を明らかにしたのは、本研究が初めてである。

### ③ 研究の成果

- これまでの研究成果により判明した事実や開発した技術等に先進性・優位性が (■ある ・ □ない)
- ブレークスルーと呼べるような特筆すべき研究成果が (■創出された ・ □創出されなかった)
- 当初の目的の他に得られた成果が (■ある ・ □ない)

#### I) 網羅的探索

① 独自に開発した培養骨格筋細胞の収縮システムは改良を重ね、現バージョンでは独立した複数の培養皿に同レベルの電流を与え筋収縮を惹起させる。この収縮システムは、共同開発した内田電子株式会社(八王子市)によって製品化されている。

② 開発した細胞収縮システムと、プロテオームおよびDNAマイクロアレイ解析を組み合わせて網羅的探索を行った。検出されたタンパク質分子および遺伝子の配列情報から、バイオ・インフォマティクス手法で分泌構造を持つ分子を予測させた。その結果、45分子が骨格筋からのマイオカインとして同定できた。

③ マイオカインの種類はタンパク質やペプチドに限定されるものではなく、アミノ酸(代謝物)や脂質(代謝物)も含まれることが最近になって明らかになってきた。当初の目的にはなかったものの本研究においても、骨格筋細胞内のカルニチン(脂質輸送体の一種)が、糖代謝を抑制するアセチルCoAと結合して細胞外と一緒に排出されることを示唆し、マイオカインの新たな機能の可能性を提示した。

#### (II) 重要な機能を持つと予測される分子の絞り込み

(I) で同定したマイオカイン45分子の中でショウジョウバエにホモログの存在が確認できたものは31分子であった。これらの中から、RNAiノックダウンシステムが国際バンクから入手可能だった21分子について、筋特異的RNAiノックダウンシステムを樹立し表現型を確認した。骨格筋特異的に発現する転写促進因子Gal4システムと、その結合配列UAS支配下に各マイオカインのRNAiを組み込んだシステムを、それぞれ樹立する

ことができた。いずれも7世代に渡るバッククロスを完了しており遺伝的背景を統一できた。骨格筋特異的な発現ドライブはUAS-GFPシステムを作製することで確認した。その結果、3つのマイオカイン分子のノックダウンシステムで寿命が短縮した (Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)、Slit、Peroxisredoxin 6)。また1システムで寿命が延長する (分子A) ことが確認された。

### **(III) 遺伝子組み換えマウスの入手・作製と、その解析**

① (II)の結果を受けて、北海道情報大学および北海道大学のグループからMIFノックアウトマウス (MIF- KO マウス) を供与され、表現型の解析を行った。野生型マウスから抽出した骨格筋組織にMIFを直接添加しても糖輸送に影響を与えなかった。しかしインスリン刺激やAMPキナーゼ (AMPK) 活性化によって骨格筋の糖輸送が促進している状態でMIFを添加すると、糖輸送は抑制された。逆にMIF-KOマウスの骨格筋では、インスリンやAMPKの糖輸送促進作用が増強されていた。すなわち、MIFは骨格筋から分泌されると骨格筋自身に作用して糖輸送を抑制することが明らかになった。MIFは糖尿病治療の新たな標的分子になり得ることが示された。

② MIFはThioredoxinファミリーに属するが、同ファミリーのメンバーであるGlutaredoxin-1, -2, -3およびPeroxyredoxin-1, -2, -4, -6も骨格筋から分泌されるマイオカインであることを明らかにした。これらのマイオカインにMIFの様な糖輸送調節作用は無いが、細胞外のレドックス調節関わる可能性が示唆された。

③ Peroxisredoxin-6を骨格筋特異的に過剰発現させたマウス (Prx6 TG マウス) を製し、解析用にF2世代の繁殖を行うと同時に体重や血糖値等の基礎データを取得中である。Prx6 TG マウスでは野生型マウスよりもケージ内行動量が多い傾向が得られている。

### **(IV) 筋収縮で分泌されるかの確認**

① 本研究は、培養骨格筋細胞の分泌に関する2つの新たな特徴を見出した。I) 培養骨格筋細胞は培養液を交換すると1時間以内に多量のタンパク質を非特異的に分泌するが、一度その現象が生じると数時間たっても非特異的分泌は生じない。II) 筋収縮による分泌は、細胞培養液 (DMEM) 中では抑制されてしまう。I) は多量の非特異的な分泌によって筋収縮による分泌が覆い隠されてしまうことを、またII) は分泌の観察には異なる種類の培地が必要なことを示す。今回の検討では、非特異的分泌の除去およびKRBの使用という、2つの要素を組み合わせることで、細胞障害マーカーLDHの上昇無しに、収縮による分泌を観察できることを発見した。同様にIL-15も収縮によって分泌が促進することを見出した。また、同条件においてもSPARC等の分泌は上昇しなかったことから、分泌タンパク質には筋収縮によって調節性に分泌される分子と、そうでない分子があることが示唆された。これらの結果は、筋収縮によるマイオカインの調節性分泌を始めて示すものであり、この発見は、分泌のメカニズムを探るための大きな推進力になる。

#### (V) 当初目標以外の研究成果

① プロテオーム解析や DNA マイクロアレイ解析は、データベースを基盤とした網羅的探索法なため、ゲノム上ですでにマッピングされている既知の分子中から標的を探索することになる。そこで、これまでに全く報告されていない新たなマイオカインの発見に挑むため、次世代高速シーケンサーを用いて骨格筋の転写産物の配列を大量に読み取る新たな試みを加えた。この方法は発現している mRNA の配列を直接に読み取る同定のため、ゲノム中で読み落とされているエキソン領域の新規同定、および遺伝子の新規スプライス・バリエーションの発見が可能で、全く未知の新たなマイオカインを発見できるポテンシャルを有している。健常な成人男性 3 名から筋生検によって外側広筋を得て、そこから mRNA を抽出した。次世代高速シーケンス解析（1 次解析）はタカラバイオ・ドラゴンジェノミクスセンターに依頼した。現在はジナリス社にて 2 次解析中である。2 次解析では、未知の転写産物の中からタンパク質をコードする物を選出することを最大の焦点として、以下のことを行っている。塩基配列の読み枠を 1 個ずらした計 3 つの読み枠でアミノ酸に変換し、明らかな Coding Sequence を有する物、すなわち明確な Kozak 配列があり、かつ 24 アミノ酸以上のタンパク質に変換される物（データベース最小のタンパク質が 24 アミノ酸）を選出する。

#### ④ 研究成果の効果

・研究成果は、関連する研究分野への波及効果が

（見込まれる ・ 見込まれない）

・社会的・経済的な課題の解決への波及効果が

（見込まれる ・ 見込まれない）

この研究課題が完成し運動の効果が科学的根拠を持って明確に示されれば、運動の価値を啓発し人々を運動に向かわせるモチベーションを高めることができると考えられる。これもライフ・イノベーションへの貢献にあたりと考えられる。また、国が運動を政策として推進する場合にも、その有効性が科学的に証明されているのであれば、国家予算を投入する明確な根拠となる。運動による健康産業や予防医学産業の開拓にもつながる。運動処方として生体に適用可能となると、運動で全身に効果的な貢献が可能となり、重要な研究になると思われる。長寿高齢化社会を迎えた日本にとって、適切な運動処方が健康に果たす役割が明確になれば、社会的、経済的に本研究が果たす役割は、特に厚生労働面で大きいと考えられる。特に今後本研究を生かすためには、臨床医学的分野との結びつきも積極的に行っていく必要があると思われる。

#### ⑤ 研究実施マネジメントの状況

・適切なマネジメントが（行われた ・ 行われなかった）

概ね適切である。指摘事項に対しても適切に対処している。

論文掲載は 17 件、学会・学会発表は 18 件である。知的財産の出願はない。新聞掲載 1 件、市民への講演も行っている。