

氏 名（本籍地）	佐藤 友里（埼玉県）
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
報告・学位記番号	甲第 488 号（甲（生）第四十一号）
学位記授与の日付	2021 年 3 月 25 日
学位記授与の要件	本学学位規程第 3 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 目	マイオカインを介した運動依存的な皮膚機能制御の解明
論 文 審 査 委 員	主査 教授 博士（農学） 根建 拓 副査 教授 医学博士 児島 伸彦 副査 教授 博士（理学） 小柴 和子 副査 東京大学大 博士（獣医学） 山内 啓太郎 学院准教授

学位論文審査結果報告書〔甲〕

No 2

【論文審査】

運動は骨格筋だけでなく全身に様々な効果を及ぼすことが知られている。この運動による全身への影響は、体温上昇、血糖値変動、さらには中枢神経系や内分泌系の変化など複数の要因によって生じることが予想されてきた。近年、骨格筋から分泌されるタンパク質・ペプチド(マイオカイン)が複数同定され、これらマイオカインの筋伸縮による分泌変化が全身性の運動効果発現に一定の役割を果たしているのではないかと仮説が提唱された。しかし、運動依存的に発現が制御されるマイオカインに関する研究は発展途上であり、マイオカインの全体像、運動依存的な発現制御の生理的意義など不明な点が多く残っている。これらを鑑み、本学位請求論文は、主にマイオカイン全体像の理解を目指した新規マイオカインの探索、および運動依存的な全身性変化の中で不明な点が多い皮膚機能制御に対するマイオカインの役割解明を目的としたものである。

第一章では、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS) を負荷することで擬似的な筋伸縮を誘導可能な C2C12-EPS 系と、複数のサイトカインの同時解析が可能である Cytokine array を組み合わせ、筋伸縮によって分泌制御を受けるマイオカイン (以下、運動制御性マイオカイン) の探索を試みている。具体的には C2C12 筋管細胞に持久運動を模した EPS を負荷した後、培養上清中のサイトカイン分泌変化を Cytokine array 法にて解析、多数のマイオカインを同定するとともに、EPS によって C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) および C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) の分泌が有意に減少することを発見した。そして ELISA 法による確認実験の後、CXCL10 及び CCL5 を新規の運動により発現分泌が減少するマイオカイン (運動抑制性マイオカイン) の候補とした。既に C2C12-EPS 系を用いたマイオカイン同定の例は複数存在するが、Cytokine array 法を組み合わせた解析は本論文がはじめての例となり新規性が認められる。

さらに動物個体における運動依存的な CXCL10 および CCL5 制御を調査するために、2種類の走行モデルを用いた解析を実施している。CXCL10 については自由・強制走行群のヒラメ筋における遺伝子発現が対照群と比較して減少、さらに CCL5 については自由走行群のみ前脛骨筋及び大腿四頭筋における遺伝子発現が対照群と比較して有意に減少することを示している。細胞モデルのみならず、動物モデルの骨格筋でも運動依存的な遺伝子発現減少が見られたことから、CXCL10 および CCL5 を新規の運動抑制性マイオカインとして同定したと結論している。著者が主張するように、運動によって発現分泌が減少するマイオカインは Myostatin の一例しか知られていなかったため、本章の結果はマイオカインの研究分野における極めて重要な発見と考えられる。

第二章では、前章で同定した新規運動抑制性マイオカインのうち、特に皮膚機能との関連が報告されている CXCL10 に着目し、骨格筋伸縮に応答した発現分泌制御メカニズムの解明を行っている。骨格筋において運動前後に観察される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇、AMP kinase および p38 MAPK 活性化に着目し、各種活性化剤や阻害剤を用いて、筋伸縮による CXCL10 発現減少を制御するメカニズム解明を試みている。

一連の研究の結果、運動依存的な CXCL10 発現分泌は、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇や p38 MAPK 活性化により制御されることを示唆した。今後、細胞の遺伝子操作などによる直接的な証明が必要と考えられるが、骨格筋において運動依存的に活性化される細胞内シグナルのうち、CXCL10 発現制御に関連する候補経路を同定したことは一定の評価がなされるものである。

第三章では、運動依存的な骨格筋 CXCL10 の分泌減少が皮膚の生理機能にどのような影響を与えるか検討を行っている。まず、マウス強制走行モデルを用いて、既に報告がある運動依存的な皮膚コラーゲン産生促進を確認している。その後、若齢マウス皮膚組織から単離した真皮線維芽細胞に対して、EPS を負荷した、あるいは負荷していない C2C12 筋管細胞由来培養上清（それぞれ EPS-CM, Ctrl-CM）を添加し、線維芽細胞培養上清中のコラーゲン分泌量を測定している。その結果、EPS-CM 添加群においてコラーゲン分泌量が有意に増加することを明らかにし、さらに EPS-CM 依存的な線維芽細胞のコラーゲン分泌量増加に CXCL10-CXCR3 シグナルが関与していることを示唆した。これまで、運動依存的な皮膚コラーゲン産生上昇については、運動によって分泌上昇するマイオカイン IL-15 の関与が報告されているが、本章の研究によって、新たにマイオカイン CXCL10 も関与している可能性が示された。今後、conditional knockout mice などを用いた検証は必要であるものの、運動による皮膚機能制御に新しい視点を導入する発見である。

さらに、運動によるマイオカイン変動が真皮線維芽細胞に与える影響を包括的に理解することを目的とした網羅的遺伝子発現解析を実施し、EPS-CM 依存的に酸化ストレス関連遺伝子群の発現が変化していることを示した。特に、酸化ストレスから細胞を保護する因子として知られる sulfiredoxin の遺伝子発現増加については、運動によって減弱することが予想される真皮線維芽細胞の CXCL10-CXCR3 シグナル系が関与していることを示唆した。既報をあわせて考えると、著者が主張するように「運動によってマイオカイン CXCL10 分泌が減少、これによって皮膚線維芽細胞の酸化ストレスが減少し、コラーゲン産生が増加する」という一連の仮説を立てることは十分に可能であり、運動と皮膚老化の関係解明に貢献する研究成果である。

第四章では、骨格筋生理を調節する運動以外の重要な刺激として「栄養」を取り上げ、栄養条件に応答したマイオカイン CXCL10 の発現制御に関する研究を行っている。まず、in vitro 系を中心とした研究を行い、細胞外グルコースおよび飽和脂肪酸であるパルミチン酸の濃度上昇によって、マイオカイン CXCL10 の発現分泌が上昇することを明らかとした。さらに、血中グルコースおよび脂肪酸が高値となるマウス肥満モデルでは、前脛骨筋、長趾伸筋など速筋系を中心に CXCL10 遺伝子発現が増加していることを示した。これまでのマイオカイン研究は運動依存的な分泌制御が主題であったところ、栄養依存的にも制御されている一例を示したことは高く評価できる。特に CXCL10 が強力な血管新生抑制効果を持つこと、骨格筋近傍の毛細血管密度減少は筋萎縮と相関することなどを考え併せると、本章で明らかとなった栄養依存的なマイオカイン CXCL10 制御は、肥満による骨格筋量減少を説明するメカニズムのひとつである可能性も考えられる。

以上、本学位請求論文では、著者が新規同定したマイオカイン CXCL10 を中心に総合的な検討を行い、マイオカイン CXCL10 が運動、栄養など複数の刺激によって産生調節され、皮膚機能を制御する可能性を

示した。近年、骨格筋を中心とする臓器間コミュニケーションによる生体調節は大きな注目を集めているが、本論文で示された知見は、関連分野の発展に大きく貢献しうるものであると判断される。

【審査結果】

博士論文審査委員会において総合的な審査を行った結果、本学位請求論文は当該分野に大きく貢献する研究成果を内包するものであると認められた。本研究成果は、佐藤氏が筆頭著者となる3報の査読付き学術論文 (Ishiuchi et al., Biosci Biotechnol Biochem 82(1):97-105 (2018), Ishiuchi et al., Cytokine 108: 17-23 (2018), Ishiuchi-Sato et al., Biosci Biotechnol Biochem 84(12): 2448-2457 (2020))として発表され、当該分野で高く評価されていることを付記する。これらの業績に加えて、佐藤氏は共著論文2報、著書1件、国際学会3件、国内学会9件の研究成果発表を行っている。これらは、東洋大学大学院生命科学研究科(生命科学専攻)の博士学位審査基準に照らしても妥当な研究成果であると認められる。以上、所定の試験結果と論文評価に基づき、本審査委員会は全員一致をもって、佐藤友里氏の博士学位請求論文は本学博士学位を授与するに相応しいものであると判断する。