

2020 年度  
東洋大学審査学位論文

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

生命科学研究科生命科学専攻博士後期課程

4910180001 佐藤 友里

# 目次

序章.....	1
第一章 運動依存的な新規マイオカインの同定.....	13
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
図表	
第二章 運動依存的な CXCL10 制御メカニズム.....	37
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
図表	
第三章 皮膚における運動依存的な CXCL10 減少の生理的意義の解明.....	55
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
図表	
第四章 栄養条件の変化による CXCL10 の発現分泌制御.....	78
緒言	
材料と方法	
結果	
考察	
図表	
総合討論.....	95
参考文献.....	99
研究成果.....	117
謝辞.....	119

# 序章

## 骨格筋

「筋肉」とは、骨格筋、心筋、平滑筋の総称である。これらの筋肉のうち、骨格筋は自分の意思で動かすことのできる随意筋であり、体重の約 40%を占める生体内最大の器官である。骨格筋を形作る筋線維は多核の細胞であり、複数の筋線維とその間隙に存在する結合組織によって骨格筋が形成されている。筋線維は数千もの筋原線維が集まってできたものであり、この筋原線維は多数のサルコメアが連なってできたものである。サルコメアとは隣接した 2 つの Z 帯によって区切られた部分を指し、骨格筋の機能的な最小単位となっている。各サルコメアはアクチンフィラメントとミオシンフィラメントを中心として構成され、さらにアクチンフィラメントにはトロポニン及びトロポミオシンが存在しており、この構造が骨格筋の収縮において非常に重要な役割を果たしている (Fig. introduction-1) (1, 2)。

## 骨格筋の機能

骨格筋は運動や姿勢保持、代謝制御など数多くの機能を担っている (2)。骨格筋は収縮や代謝の特性から大きく速筋 (白筋)と遅筋 (赤筋)の 2 つに分類される (3)。速筋及び遅筋は、エネルギー代謝のシステム (解糖系もしくは酸化的リン酸化)や収縮の速度、疲労耐性など様々な点で異なっている。これらの相違は主に線維タイプの違いによるものである。筋線維は Myosin heavy chain (MHC)アイソフォームの発現に基づいて type I, type IIa, IIx, IIb の 4 種類に分類され、げっ歯類の骨格筋においてはこれら全てが存在するものの、ヒトの骨格筋においては type IIb は存在しない (4)。Type I 線維を多く含む遅筋においては、酸化的リン酸化による代謝が優勢である。さらに、収縮速度は遅いもののミトコンドリア含量が高く、効率の良い ATP の供給が可能であるため持久力が高く、疲労耐性が高い (5)。一方で、Type II 線維を多く含む速筋においては、解糖系による代謝が優勢である。解糖系により迅速に ATP が供給されるため、瞬間的に大きな力を生み出すことができるものの、疲労耐性が低い (5)。例えば、ヒトにおいては以下の骨格筋が存在する。速筋に分類される長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle; EDL)は Type I : Type II 線維比が 47% : 53% となっているほか、前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle; TA)は Type I : Type II 線維の割合が 72% : 28%であるものの、エネルギー代謝について、解糖系が優位であるなどの特徴を持つことから、速筋に分類される (6-8)。また、遅筋に分類されるヒラメ筋 (Soleus muscle; SOL)の Type I 線維 : Type II 線維比は 80% : 20%となっている (9)。さらに、遅筋及び速筋の両方の性質を併せ持つ大腿四頭筋 (Quadriceps femoral muscle; Quad)は大腿直筋、内側広筋、中間広筋、外側広筋からなり、Type I : Type II 線維比はおおよそ 49% : 51%である (10)。しかし、長距離選手においては、70%ほどが遅筋

である一方、短距離選手では約 80%が速筋であるなど、運動の種類によって筋線維の割合が異なるほか、加齢とともに速筋の割合が減少し、遅筋の割合が増加するなど、骨格筋線維の割合は様々な条件下で変化する (11-13)。

## 骨格筋における運動効果

運動は骨格筋収縮を介して様々な生理変化を引き起こす。代表的な例として運動による筋肥大が挙げられる。Trappe らは高齢 (65-69 歳)の男性及び女性に 12 週間の膝の伸展運動を負荷したところ、大腿四頭筋の筋量が 9%ほど増加したことを明らかにした (14)。さらに 69-73 歳の女性に 12 週間の有酸素運動トレーニングを負荷したところ、大腿四頭筋の筋量が約 12%増加したこと (15)、19-21 歳の男性及び 71-77 歳の男性においても同様に 12 週間の有酸素トレーニングを負荷した際に大腿四頭筋量及び骨格筋の筋断面積 (Cross-sectional area; CSA)が増加したことなどが報告されており (16)、運動が骨格筋肥大に大きく寄与していることが分かる。また、ラットに週 3 回の筋力トレーニングを 8 週間負荷した際に、長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle; EDL) において、筋の幹細胞であり、筋の修復や再生、肥大に関与する筋サテライト細胞の数が増加し、同時に EDL の CSA も増加したことから、運動依存的な筋肥大には運動依存的な筋サテライト細胞数の増加が関与することが示唆されている (17)。さらに、ラット後肢に重りをつけた伸展運動による筋力トレーニングを 48 時間おきに 4 回実施したところ、腓腹筋におけるタンパク質合成が上昇した (18)。この際、ラット腓腹筋においてインスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor-1; IGF-1)の mRNA 発現上昇が観察されており、これによって筋肥大が生じたと考えられる (18, 19)。以上のように、筋肥大の際、骨格筋において筋量や CSA が増加するとともに、細胞レベルでは筋サテライト細胞数の増加や細胞内タンパク質合成上昇が観察されている。筋肥大は、骨格筋におけるタンパク質合成の割合が分解の割合を上回った際に生じ、このタンパク質合成を主にコントロールするシグナル伝達経路としては Insulin-like growth factor 1- phosphoinositide-3-kinase-Akt/protein kinase B- mammalian target of rapamycin (IGF1-PI3K-Akt/PKB-mTOR)経路や p70S6K のリン酸化などが、タンパク質分解に関与する因子としては Forkhead box O 1 (FOXO1)などが挙げられる (20-22)。

また、運動は筋線維のタイプスイッチを引き起こすことも知られている。マウスに 4 週間の Treadmill による持久運動を負荷すると、マウスの骨格筋において遅筋線維の割合が多くなり、速筋線維から遅筋線維へ、筋線維のタイプスイッチが誘導されることが報告されている (23)。また、この持久運動依存的な筋線維タイプスイッチには  $\text{Ca}^{2+}$ 透過性のイオンチャネルである Transient receptor potential melastatin 2 を介した  $\text{Ca}^{2+}$ 依存性のシグナル伝達経路が関与していることも知られている (23)。一方、女性に 12 週間の短距離走によるトレーニングを負荷したところ、遅筋線維が減少し、速筋線維が上昇したことから、短距離走や筋力トレーニングなどの高負荷な運動は遅筋線維から速筋線維への筋線維のタイプスイッチを誘導することが示唆される (11)。また、遅筋



線維から速筋線維へのタイプスイッチにも上述の FOXO1 が関与していることも報告されている (24)。

さらに、運動は骨格筋代謝を亢進する。筋収縮の過程で ATP が消費されると Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK)が活性化し (25, 26)、糖輸送単体 4 (Glucose transporter-4: GLUT4)の膜への輸送を介して糖取り込みを上昇させる (27-30)。さらに運動は全身のインスリン感受性を高め、インスリン依存的な糖取り込みを上昇させることも報告されている (31)。また、1 型糖尿病モデルラットにおいて、12 週間の有酸素運動を負荷することで脂質輸送体である CD36 発現が上昇することから、運動は脂質代謝にも寄与していることが示されている (32)。以上のように、運動は骨格筋において、筋肥大や代謝制御など様々な効果を及ぼす。

## 骨格筋以外への運動効果

近年の研究により、運動は骨格筋以外にも様々な組織や器官にその効果を及ぼすことが明らかにされている。

### (1) 運動による脂肪組織の制御

運動は脂肪組織の代謝を制御することから、肥満や 2 型糖尿病に有効であることが知られている (33)。脂肪組織は、脂肪を形成することでエネルギーを貯蔵する白色脂肪組織 (White adipose tissue: WAT)、熱産生に寄与する褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue: BAT)、BAT と類似した機能を有するベージュ細胞により構成されるベージュ脂肪組織の 3 つが存在している (34-36)。BAT やベージュ細胞数の増加は体重増加の抑制や耐糖能異常の改善、インスリン感受性の回復などに寄与する (37-40)。運動は WAT 内でのベージュ細胞数増加を誘導することが報告されているほか (41)、Running Wheel を用いた自発走行による低強度の持久運動は脂肪組織における Uncoupling protein 1 や Prdm16 などの BAT 及びベージュ細胞マーカー遺伝子の発現を上昇させることから、BAT 及びベージュ細胞数が運動に伴って増加することが示されている (42)。以上より、運動によるベージュ細胞の増加は脂肪組織における代謝亢進に貢献していると考えられている (37-42)。

### (2) 運動による肝機能制御

運動は肝臓での代謝に対しても効果を示す。例えば、運動は非アルコール性脂肪肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease : NAFLD)の改善に有用であるとされている (43)。NAFLD を発症する原因としてインスリン抵抗性や高インスリン血症、過剰な脂肪による肝臓での脂質合成上昇が挙げられるが (44, 45)、様々な条件の有酸素運動及び筋力トレーニングによって肝臓の脂肪量が減少し、インスリン抵抗性が改善することが報告されている (43)。

また、近年の研究によって、高脂肪食を摂取させたマウスに運動を負荷したところ、肝臓におけ

る脂肪蓄積や糖新生が減少し、インスリン感受性が上昇することが明らかにされた。脂質合成上昇による NAFLD 発症に伴って肝臓において炎症が誘導されるが、同研究においては、運動により脂肪生成が減少して脂質酸化が亢進、肝臓の炎症も改善されたことが報告されている (46)。また、同様の運動効果はヒトにおいても観察されている (47)。以上のように、運動は肝臓の代謝制御にも関与している。

### (3) 運動による免疫調節

運動は免疫機能を調節することも知られている。まず、低強度の運動は全白血球数や循環性白血球の割合を上昇させる。全白血球数は運動後短時間 (0.5-3 h)のうちに 2-3 倍に上昇し、長時間の持久運動を行うことで約 5 倍に上昇する (48)。さらに、急性の穏やかな運動は好中球の遊走を増強させる (49)。好中球のファゴサイトーシスは単回の運動後すぐに増強されるなどの報告もある (50)。T 細胞に関しても 45 分間の Treadmill による運動の 1 時間後より減少することが報告されている (51)。

一方、高強度運動は免疫能を低下させることも知られている。単回長時間の運動は日和見感染症のリスクを上昇させる (52)。この現象は open window theory と呼ばれており、特に運動後数時間から数日間に渡って上気道感染症のリスクが増加する (51, 53)。以上、運動の種類や強度によってその効果は異なるものの、低強度の運動は免疫能を高め、炎症を減少させる。

### (4) 運動と骨代謝

運動は、近年高齢化が進む中で問題となっている骨粗しょう症の進行を防ぐために有効であることが知られている。骨粗しょう症は骨の形成と再吸収のバランスが崩れることによって引き起こされる (54)。骨形成は間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSCs)に由来する骨芽細胞、再吸収は造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell: HSCs)のマクロファージ系譜由来である破骨細胞により行われる (55, 56)。運動後に石灰化された小結節の数や骨形成マーカーである Alkaline phosphatase, Osteocalcin 発現量が上昇することから、運動は骨形成を促進することが示唆される (57, 58)。また、運動は骨芽細胞における骨形成マーカーOsteocalcin, Runx2, Osterix, BAP, BMP2, I型コラーゲンを発現上昇させ、骨粗しょう症マーカーTartrate-resistant acid phosphatase レベルを減少させる (59, 60)。さらに運動は、破骨細胞において、破骨細胞の分化を抑制する Osteoprotegerin (OPG)発現を増加させるとともに、破骨細胞分化を促進する Receptor activator of nuclear factor κB ligand (RANKL) 発現を減少させることで、骨吸収が抑制されることも示されている (59)。

### (5) 運動と血管新生

運動は血管新生の促進にも関与している。血管新生とは、既存の血管から新しい血管が分岐する

ことであり、Vascular endothelial growth factor (VEGF)が重要な役割を果たしている (61)。近年の研究により、ラットやヒトに穏やかな持久運動を負荷した際、骨格筋における VEGF 発現が上昇することが明らかにされた (62-64)。さらに、運動は VEGF の受容体である VEGFR1 及び VEGFR2 の mRNA 発現を増加させることや VEGF シグナルの活性化に重要な Nitric oxygen (NO)産生に関連する eNOS 発現を上昇させることも示されている (65-67)。このように運動は血管新生の制御にも深く関連している。

以上のように運動は骨格筋以外の多くの組織や器官に対して影響を及ぼすが、骨格筋収縮によって発生する運動シグナルがどのように他組織や器官に伝達されるのかについては長らく不明であった。

## マイオカイン

これら運動依存的に生じる骨格筋以外の他組織・器官の変化を説明する有力な説として、骨格筋収縮シグナルを伝達する骨格筋由来分泌タンパク質・ペプチドであるマイオカインが注目されている。運動はこれまでに心不全や慢性閉塞性肺疾患、2 型糖尿病などの改善に有用であることが示されてきたが (68-70)、当初このような効果は運動依存的なインスリン感受性の上昇や血圧低下に起因すると考えられていた (71, 72)。しかし、筋収縮により血中 Interleukin-1 (IL-1)及び Interleukin 6 (IL-6)濃度が上昇することで好中球数の上昇などを含めた免疫制御が起こること (73)、運動により骨格筋における *IL-6* 遺伝子発現が上昇することが示され (74)、マイオカインにより骨格筋以外の他組織や器官へ運動シグナルが伝達されるという仮説 (マイオカイン仮説)が提唱された。以下、これまでに同定されたマイオカインの例を述べる。

### (1) Interleukin-6

IL-6 は炎症を誘発する炎症性サイトカインとして知られる一方、炎症を抑制することも知られているサイトカインであり、一過性の運動により IL-6 の血中濃度が上昇することはよく知られている (75, 76)。また、ラットの片脚のみに電気刺激を負荷して収縮させた際、電気刺激を負荷した脚のみで *IL-6* 遺伝子発現が上昇すること (74)、マウス由来の骨格筋細胞である C2C12 筋管細胞に電気刺激を負荷して収縮させた際に IL-6 分泌が上昇することなどを併せ (77)、IL-6 は運動依存的に骨格筋より分泌されるマイオカインであることが証明された。この運動依存的な骨格筋からの IL-6 分泌に関する生理的意義についても研究が進められており、抗炎症効果があることが明らかにされている (78)。また、運動依存的な抗炎症効果は、Interleukin-1 $\beta$  シグナルの抑制を介していることも示唆されている (78)。以上のように、IL-6 は免疫の制御に関与する運動制御性マイオカインである。

## (2) Irisin

Irisin は膜タンパク質であり、皮下脂肪組織の代謝制御を担う Fibronectin type III domain-containing protein 5 (FNDC5)の細胞外ドメインが切断されて放出されるマイオカインである (79)。骨格筋特異的に Peroxisome proliferators activates receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )を過剰発現させたマウスでは、骨格筋での FNDC5 発現が上昇するが、運動は FNDC5 を切断することで血中 Irisin 量を増加させる (79)。血中 Irisin 量の増加は皮下脂肪における脂肪細胞の褐色化を誘導することが報告されているほか (79)、FNDC5 を過剰発現させたマウスにおいては血中 FNDC5 濃度も上昇し、cAMP-PKA-Perilipin/HSL 経路を介して脂肪分解を促進することで血中の脂質レベルを減少させることも報告されている (80)。以上のことから、Irisin は運動依存的に分泌が上昇することで主に脂肪組織の代謝に影響を与えていることが示されているものの、心筋における Irisin 分泌は骨格筋よりも多い可能性も唆されており (81)、運動依存的な血中 Irisin 量増加への骨格筋の寄与については、さらなる調査が必要である。

## (3) Interleukin-15

Interleukin-15 (IL-15)はヒト骨格筋において発現しており、タンパク質同化作用や脂肪量減少作用を示すことが知られている (82)。近年の研究により、筋力トレーニングによって骨格筋における *IL-15* 遺伝子発現量及び血中 IL-15 濃度が上昇することが明らかにされた (83, 84)。放出された IL-15 は骨格筋のみならず脂肪組織でも重要な役割を果たす (85)。IL-15 は脂肪組織重量を減少させることが示されており、実際、ラットに 7 日間 IL-15 を処理することで、白色脂肪組織が約 33% 減少したことが報告されている (86)。また、そのメカニズムの 1 つとして、IL-15 による Very low density lipoproteins の産生抑制が知られている (86)。以上、運動依存的に血中 IL-15 濃度が上昇すると、骨格筋におけるタンパク質同化作用及び脂肪組織における脂肪量減少が引き起こされる。その他、最近、運動依存的に骨格筋由来 IL-15 発現分泌が上昇することで皮膚機能を制御するという報告もなされた (87)。これは、第三章緒言において詳しく述べる。

## (4) Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8)は好中球の活性化因子であることが知られているサイトカインである (88)。IL-8 について 3 時間のランニングや 1 時間のサイクリング運動など伸張性収縮を伴う高強度の運動において血中 IL-8 濃度及び骨格筋における *IL-8* 遺伝子発現が上昇することが明らかにされているほか、短縮性収縮を伴う比較的穏やかな運動に応答して IL-8 タンパク質発現が上昇することも報告されている (89-91)。また、運動依存的な骨格筋由来 IL-8 の発現分泌上昇は血管新生に関与していることが知られている (92, 93)。IL-8 は CXCR1 及び CXCR2 の 2 つの受容体と相互作用することが知られており、CXCR2 と相互作用した際に血管新生が誘導されることが報告されている

(92, 93)。このように IL-8 は運動依存的な免疫制御及び血管新生促進に関与している可能性があるマイオカインである。

#### (5) Myostatin

Myostatin は現在までに同定されている運動制御性マイオカインの中で、唯一、運動により発現分泌が減少するマイオカインである (94)。Myostatin はオートクライン、パラクライン様に作用し、主にサテライト細胞の増殖や分化を抑制することが知られており、ヒトやマウスにおいて Myostatin を欠損させることで、筋肥大が誘導されることが示されている (94-97)。また、Myostatin の受容体は Activin 受容体である Acvr2b であり、Myostatin が Acvr2b と結合することで筋肥大が抑制されることが知られている (97)。そのため、運動により Myostatin の発現分泌が減少すると Acvr2b を介したシグナル伝達が抑制され、筋肥大が促進される (97, 98)。

ここまで、運動により発現や分泌が制御されるマイオカイン (運動制御性マイオカイン) の例を述べてきたが、その他の運動制御性マイオカイン (候補因子を含む) を含めて Table. introduction-1 にまとめた。さらに、骨格筋以外への運動効果と関与している可能性があるマイオカインを Table. introduction-2 にまとめ、マイオカインの概念図を Fig. introduction-2 に示した。

### 皮膚における運動効果

Table. introduction-2 にまとめたように、免疫系、脂肪や肝臓、血管系で観察される運動効果の少なくとも一部にマイオカインが関与していることが示唆された。一方、近年、運動は皮膚機能にも大きな影響を与えていることが示されている。

例えば、皮膚創傷モデルラットに Treadmill 運動を負荷すると、非運動群と比較して、有意に創傷閉鎖速度が上昇することや、マウスへの持久運動負荷によっても創傷治癒促進が観察されることが報告された (99, 100)。さらに、健康なヒト高齢者に創傷し、15 分間の有酸素運動を週 3 回実施した結果、創傷治癒が促進されることが示されている (101)。また、肥満によって創傷治癒の遅滞や潰瘍形成 (99, 102-104)、真皮の薄皮化やコラーゲン量減少が見られるが、運動はこれらの状態を改善することも明らかにされている (105)。

さらに運動は、皮膚癌モデルマウスの表皮において p53 経路を活性化し、Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3) や p21, Phosphatase and tensin homolog (PTEN) の発現を増加させる。この中で、IGFBP-3 及び PTEN は IGF-1 の生理活性を抑制することが知られており、これによって癌細胞の増殖を抑制しているのではないかと考えられている (106)。

以上のように、運動による皮膚機能制御については多くの報告があるものの、マイオカインの関与については不明な点が多く残っている。

## 本研究の目的

ここまで見てきたように、骨格筋以外の組織や器官で観察される運動効果の少なくとも一部に、骨格筋から分泌されるタンパク質やペプチドであるマイオカインが関与することが指摘されてきた。一方、マイオカインの同定は完了しておらず、未知の運動制御性マイオカインも多数存在することが予想される。また、運動制御性マイオカインの生理作用についても不明な点が多く、特に運動依存的な皮膚機能制御におけるマイオカインの関与についてはほとんど分かっていない。そこで、本研究においては、(1) 新規の運動制御性マイオカインを探索・同定すること、(2) 運動による皮膚機能制御にマイオカインが関わっているかを明らかにすることを大きな目的とした。

## 本論文の構成

本論文は、以下の形で構成される。

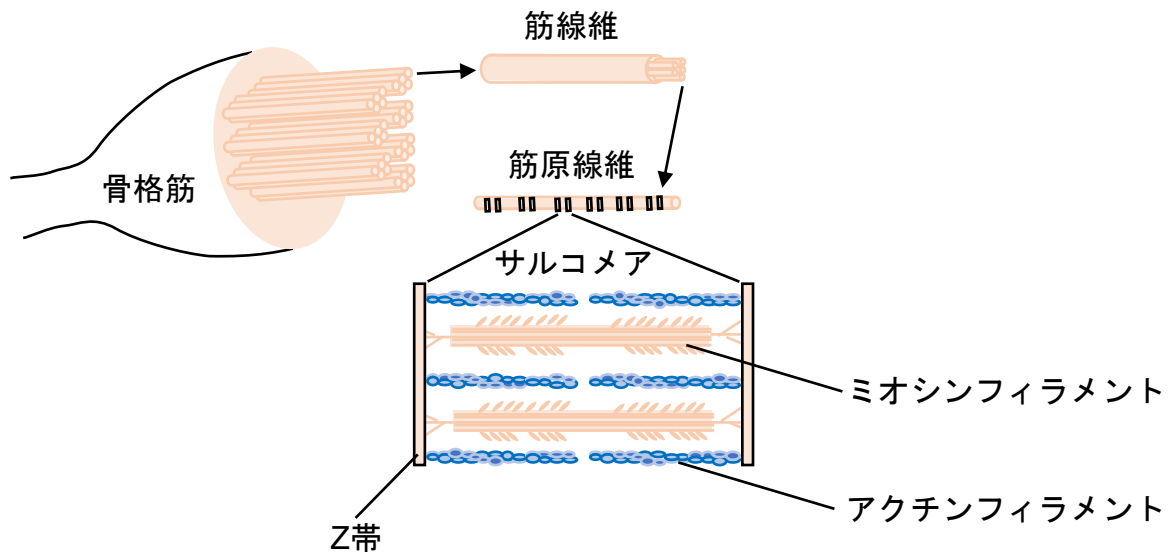
第一章では、マウス由来骨格筋細胞 C2C12 細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation: EPS)を負荷することで人為的な収縮を誘導する C2C12-EPS 系及び複数の走行動物モデルを用いて新規マイオカインの探索を試み、C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10)及び C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5)の2つを新規の運動により発現や分泌が減少するマイオカイン (運動抑制性マイオカイン)として同定した。

第二章では、同定した CXCL10 及び CCL5 の2つのマイオカインのうち、特に血管新生の制御など興味深い生理作用が報告されている CXCL10 に着目し、その発現制御メカニズムを明らかにすることを試みた。その結果、筋収縮依存的な CXCL10 減少には  $\text{Ca}^{2+}$  振動や p38 MAPK 活性化が重要であることを示した。

第三章では、運動制御性マイオカインによる皮膚機能制御について、特に CXCL10 に着目した研究を行った。その結果、筋収縮によって骨格筋由来 CXCL10 分泌が減少すると、真皮線維芽細胞におけるコラーゲン量が上昇すること、酸化ストレス関連遺伝子 *Srxn1* の遺伝子発現上昇を介して真皮線維芽細胞の酸化還元状態を制御していることを示唆した。

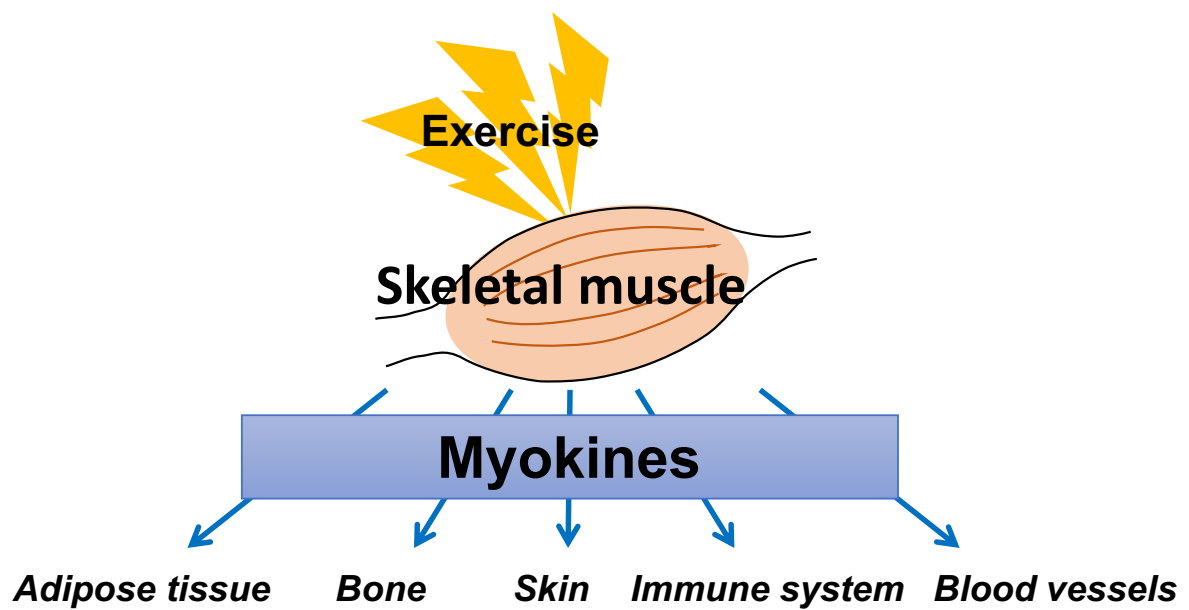
第四章では、運動以外の刺激である栄養条件の変化による CXCL10 制御の解明を試み、高栄養による肥満は骨格筋由来 CXCL10 の発現分泌を上昇させることを見出し、これが血中グルコースや飽和脂肪酸濃度の上昇に起因する可能性を示した。

最後に総合討論にて、本研究において得られた結果より運動依存的な CXCL10 制御及び皮膚機能への効果を総合的に考察した。



**Fig. introduction-1 骨格筋の模式図**

骨格筋は複数の筋線維とその間隙に存在する結合組織によって形成されている。筋線維は数千もの筋原線維より形成されており、筋原線維は多数のサルコメアが連なってできたものである。サルコメアは隣接した2つのZ帯によって区切られた部分であり、各サルコメアはアクチンフィラメントとミオシンフィラメントを中心として構成される。



**Fig. introduction-2** マイオカインの概念図

運動は骨格筋以外にも脂肪組織や骨をはじめとした多くの組織や器官にその効果を及ぼすことが報告されている。この運動効果を他臓器や組織に伝達する因子として、骨格筋より分泌されるタンパク質やペプチドであるマイオカインの存在が提唱されている。



**Table. introduction-1** 現在提唱されている運動制御性マイオカイン

マイオカイン	正式名称	参考文献
IL-6	Interleukin-6	Pedersen BK et al., 2003
IL-15	Interleukin-15	Nielsen AR et al., 2007
CXCL1/KC	C-X-C motif chemokine ligand 1	Nedachi T et al., 2008
CXCL5/LIX	C-X-C motif chemokine ligand 5	Nedachi T et al., 2008
GM-CSF	Granulocyte Macrophage colony-stimulating factor	Peterson JM & Pizza FX., 2009
IL-8	Interleukin-8	Peterson JM & Pizza FX., 2009
Myostatin	-	Saremi A et al., 2010
VEGF	Vascular endothelial growth factor	Høier B et al., 2010
Irisin	-	Boström P et a., 2012
Myonectin	-	Seldin MM et al., 2012
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cystein	Aoi W et al., 2013
BAIBA	3-Aminoisobutyric acid	Roberts LD et al., 2014
CCL2/MCP-1	C-C motif chemokine ligand 2	Catoire M et al., 2014
CNTF	Ciliary neurotrophic factor	Johnson RW et al., 2014
CX3CL1/fractalkine	C-X3-C motif chemokine ligand 1	Cptoire M et al., 2014
Decorin	-	Kanzleiter T et al., 2014
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	Miyatake S et al., 2014
Musclin	-	Subbotina E et al., 2015
FGF-21	Fibroblast growth factor 21	Kruse R et al., 2017
IL-10	Interleukin-10	Leal LG et al., 2018

**Table. introduction-2 骨格筋以外への組織における運動効果と**

関与している可能性が考えられるマイオカイン

組織・器官	運動効果	マイオカイン
免疫システム	免疫能の制御	IL-6 CXCL1/KC CXCL5/LIX GM-CSF CCL2/MCP-1 IL-10
脂肪組織	脂肪組織の代謝亢進	IL-15 Irisin Myonectin BAIBA Musclin FGF-21
肝臓	肝臓における代謝亢進	FGF-21
血管	血管新生の促進	IL-8 VEGF

## 第一章

### 運動依存的な新規マイオカインの同定

## 1. 緒言

序論で述べたとおり、骨格筋はマイオカインと総称される数多くのタンパク質やペプチドを分泌していることが明らかになった。また、ヒト、マウス、培養骨格筋細胞などを対象にした研究により、運動により発現や分泌が制御されるマイオカイン (運動制御性マイオカイン)も多数発見されてきている (68, 107, 108)。一方、骨格筋から分泌されるマイオカインであることは示されているものの、運動制御性マイオカインであるかについては不明なマイオカインも多く存在する。例えば、Interleukin-7 (IL-7)は、骨格筋から分泌されるマイオカインであることが報告されているが、ラットに運動を負荷しても骨格筋における IL-7 タンパク質発現量に変化は見られない (109, 110)。

また、運動によって血中濃度が変化する増殖因子やサイトカインについても、その変動が骨格筋に由来するのか明らかにすることは容易ではない。例えば、膝の進展による運動を 60 分間実施すると、Interleukin-6 (IL-6)の血中濃度が上昇することが報告されているが、その際、同時に骨格筋における *IL-6* 遺伝子発現量が増加することが知られている (111)。一連の結果から、「運動後に見られる IL-6 血中濃度の上昇は骨格筋における IL-6 産生増加に由来する」との仮説を立てることはできるものの、一方、運動によって骨格筋に浸潤したマクロファージも盛んに IL-6 を分泌するため (112, 113)、運動後の IL-6 血中濃度上昇がマクロファージなど他の細胞・組織に由来している可能性を排除できない。したがって、骨格筋分泌因子の研究を行う上で、骨格筋から実際にタンパク質やペプチドが分泌されているのか、その分泌量は収縮によって変化するのかを明らかにすることは極めて重要である。

近年、マウス由来骨格筋細胞 C2C12 細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS)を負荷することで収縮誘導を行う実験系 (C2C12-EPS 系)が確立された (77)。この C2C12-EPS 系を用いることで、C2C12 筋管細胞から IL-6 が直接分泌されていること、さらに EPS による収縮誘導により分泌量が増加することが示された (77)。すなわち、本系の確立は IL-6 が運動制御性マイオカインであることの最終的な証明に貢献したと言える。さらに、本系は骨格筋細胞のみから構成される利点を持っているため、マイオカインの同定に対して強力なツールとなる。実際、本系あるいは本系を改変した実験系を用いて、C-X-C motif chemokine ligand 1 (CXCL1)及び C-X-C motif chemokine ligand 5 (CXCL5)などをはじめとする数多くの運動制御性マイオカインが同定されている (77, 114)。

このように、現在までに多くのマイオカインが同定されてきたが、未だ運動による制御を受けるか不明なマイオカインも多く存在する。そこで、本章では、上記の C2C12-EPS 系に加えて、多数の分泌タンパク質を同時に解析可能である Cytokine array を組み合わせ、新規運動制御性マイオカインの探索を行うこととした。

## 2. 材料と方法

### 細胞培養

#### **C2C12 細胞の培養**

マウス骨格筋由来 C2C12 細胞は高橋伸一郎教授 (東京大学大学院農学生命科学研究科)、長森英二准教授 (大阪工業大学工学部生命工学科)、藤田英明氏 (国立研究開発法人理化学研究所生命機能科学研究センター)より譲渡していただいたものを使用した。C2C12 細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下において、75 cm<sup>2</sup> flask (Corning, NY, USA)内で培養した。C2C12 細胞の培養には 15 ml の Growth medium (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) Low glucose (LG; 1.0 g/l) (Nacalai tesque, Kyoto, Japan) + 10% Fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Nuaille, France) + 1% Penicillin-Streptomycin mixed solution (P/S) (Nacalai tesque))を用いた。培地交換は 48 時間ごとに実施し、フラスコの 50%程度まで C2C12 細胞が増殖したところで継代を行った。継代は以下に示した手順で実施した。まず、アスピレーターを用いて培地を除去した後に、10 ml の Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) (Nacalai tesque) により細胞を洗浄した。その後、1 ml の Trypsin-EDTA (TE) (Nacalai tesque)を用いて細胞を剥離し、9 ml の Growth medium を加えて全量を 10 ml として 163 × g の条件で 5 分間遠心した。遠心終了後に上清を除去し、細胞のペレットを 10 ml の Growth medium にて再懸濁した後、血球計算盤 (ERMA INC., Tokyo Japan)を用いて細胞数を計測し、75 cm<sup>2</sup> flask に  $2.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> となるよう播種した。

#### **C2C12 細胞の分化誘導**

C2C12 の分化誘導は以下の手順で実施した。まず、継代の際に 8 well plate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)または 6 well plate (Corning)に  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるよう C2C12 細胞を播種した。C2C12 細胞をプレートの 95%程度まで増殖させ、Differentiation medium (Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) High glucose (HG; 4.5 g/l) (Nacalai tesque) + 0.5% Calf serum (CS) (Biowest) + 1% P/S)培地に切り替えることで C2C12 細胞の分化を誘導した。分化誘導の実施中は 24 時間ごとに培地を交換し、筋管が形成されるまで 5~7 日間ほど分化誘導を行った (Supplementary figure. 1-1A)。

#### **電気パルス (Electrical pulse stimulation; EPS)処理**

十分に筋管を形成した C2C12 細胞は以下の手順にしたがって電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation: EPS)を負荷することによって収縮させた。Differentiation medium を用いて培地交換を行った後に C-Pace EP Culture Pacer (IonOptix, Westwood, MA, USA)及び C-dish (8 well, 6 well)

(IonOptix)を用いて 1 Hz, 2 ms, 20 V, 24 時間の条件で C2C12 細筋管胞を刺激することにより収縮させた (Supplementary figure. 1-1B, C)。なお、本研究で用いた EPS 条件は、これまでに骨格筋収縮に伴って増加することが観察されている糖取り込みについて、EPS による変化の検討が行われており、1 Hz, 2 ms, 20 V で 24 時間刺激した際に糖取り込みが増加することが確認されている (77)。通常、ヒトの運動においては 30 分程度の穏やかな運動により糖取り込みが上昇することが知られており (115)、このような運動条件を模倣できていると考えられたため、上述の条件を用いた。

## タンパク質解析

### **Cytokine array**

EPS 処理終了後、C2C12 筋管細胞の培養上清を回収した。回収した培養上清は卓上冷却遠心機 (Eppendorf, Hamburg, Germany)によって 4°C, 92 × g で 1 分間遠心し、上清をサンプルとした。その後、Proteome Profiler™ Arrays Mouse Cytokine Panel A (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)によって C2C12 筋管細胞から分泌された複数のタンパク質を網羅的に解析した。Cytokine array の手順については、キット付属のプロトコルにしたがって実施し、化学発光の検出には ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いた。検出されたスポットのシグナル強度は Image J Software (<http://imageJ.nih.gov/ij/>)により定量化し、相対的な数値として算出した。

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

ELISA は DuoSet® Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 (R&D systems)、DuoSet® Mouse CCL5/RANTES (R&D systems)、DuoSet® Ancillary Reagent Kit2 (R&D systems)を使用して実施した。実験の手順についてはキット付属のプロトコルにしたがって実施し、各濃度の Standard (CXCL10; 62.5-4000 pg/ml, CCL5; 31.25-2000 pg/ml)及びサンプルは 4°Cにて 12 時間インキュベートし、吸光度の測定には xMark™ Microplate Spectrophotometer (Bio-Rad)を用いた。得られた Standard の吸光度を用いて Standard curve を作成した。なお、各濃度の Standard は Reagent Diluent を用いて希釈したため、Reagent Diluent の吸光度も測定し、これを Background として各濃度の Standard の吸光度から差し引いた値を用いて Standard curve を作成した。各サンプル中の CXCL10 濃度については、得られた吸光度の値を Standard curve に適用することで算出した。

## 遺伝子発現解析

### **細胞の回収及び RNA 抽出**

細胞からの RNA 精製は、NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)または、TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて、添付プロトコルに従って行った。精製した RNA は

Nanodrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific)を用いて濃度測定を行い、-80℃にて保存した。

## 逆転写反応 (Reverse-Transcription)

逆転写反応には、PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いた。各サンプル 500 ng の RNA を鋳型として用い、cDNA を合成した。合成した cDNA は-30℃にて保存した。

## Reverse transcriptional-qPCR (qPCR)

逆転写反応により合成した cDNA は EASY Dilution (for Real Time PCR) (Takara Bio Inc.)を用いて 10 倍に希釈し、qPCR のサンプルとして用いた。qPCR には KAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd., Tokyo, Japan)または THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO CO., LTD., Osaka, Japan)を用いた。内在性コントロールとして、Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*Gapdh*)を用いた。なお、使用したプライマー配列は以下に示した。

mouse *Cxcl10*

Forward: 5' - CAT ATG GCT CGG ACA CCA - 3'

Reverse: 5' - ACA CAC TTG GCG GTT CCT - 3'

mouse *Gapdh*

Forward: 5' - TGT GTC CGT CGT GGA TCT GA - 3'

Reverse: 5' - CGT GCT TCA CCA CCT TCT TGA - 3'

## 動物実験

### 動物飼育

本研究における全ての動物実験は、東洋大学動物実験委員会の承認を受けた後に実施した。8 週齢の雄 C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan Inc., Kanagawa, Japan)を購入し、個別のケージにおいて 1 週間の馴化飼育を実施した。なお、マウスは温度 23±1℃、湿度 40-60%、12 時間の明暗サイクル (6:00-18:00 明期、18:00-6:00 暗期)の条件において飼育し、飼料 (Labo MR Stock, Nosan Corp., Kanagawa, Japan)および水は自由摂取とした。

### Treadmill による走行実験

1 週間の馴化飼育を終えた後、マウスを 4 匹ずつ Treadmill による強制走行を負荷する Running 群と負荷しない Rest 群の 2 群に分けた。Running 群のマウスには 8% slope、15 cm/s の条件で 30 分間の強制走行を負荷した。なお、本実験では、走行路末端に電極 (100-150 V の電圧負荷)を設置し

て走行を強制させるシステムを用いたが、マウスが電極に触れる直前にスパーテルを用いて走行を促し、マウスのストレス軽減を図った。30 分間の走行が終了した後、イソフルラン (Pfizer Inc., New York, NY, USA)による麻酔下で頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、各骨格筋 (前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle; TA)、長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle; EDL)、大腿四頭筋 (Quadriceps femoral muscle; Quad)、ヒラメ筋 (Soleus muscle; SOL))を採取した。

## **Running Wheel による走行実験**

1 週間の馴化飼育後、マウスを 5 匹ずつ Running Wheel による強制走行を負荷する Running 群と負荷しない Rest 群の 2 群に分け、Running 群のケージ内には Running Wheel を設置し、1 週間の自由走行を負荷した。なお、本実験においては、Wheel Manager Software (Med Associates Inc., Fairfax, VT, USA)により各 Running Wheel の回転数をモニタリングした。1 週間後、上記と同様にイソフルラン (Pfizer Inc.)による麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、上記と同様の手順で各骨格筋 (TA, EDL, Quad, SOL)サンプルを採取した。

## **マウス骨格筋からの RNA 抽出**

マウスの各骨格筋サンプルは TRIzol reagent を用いて RNA を抽出した。15 ml チューブに 25 mg 以上の各骨格筋組織と TRIzol を混合し、超音波ホモジナイザ (Misui Electric Co., Ltd, Chiba, Japan)によって超音波破碎した。超音波破碎終了後、破碎した組織と TRIzol reagent を全てマイクロチューブに移し、4℃, 12000 × g の条件で 10 分間遠心することで不溶性画分を除去した。遠心後、上清を新しい 1.5 ml チューブに移し、上記と同様の手順で RNA を抽出した。

## **統計解析**

統計解析には GraphPad Prism8 (GraphPad Software, CA, USA)を用いた。本章では、全て 2 群間の解析であったため、unpaired Student's t-test を使用した。危険率が 5%未満の際に統計的に有意な差があったとした。



### 3. 結果

#### CXCL10 及び CCL5 は新規マイオカイン候補因子である

まず、マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞よりどのようなタンパク質が分泌されているかを明らかにするため、Cytokine array を用いた解析を行った。各タンパク質のスポットのシグナル強度を測定したところ、CCL1/I-309,  $\text{INF}\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, CXCL10/IP-10, CXCL1/KC, M-CSF, CCL2/JE, CXCL2/MIP-2, CCL5/RANTES, CXCL12/SDF-1, TIMP-1, TNF- $\alpha$  の 14 のタンパク質については、最もシグナルが強かった CXCL1/KC のシグナル強度を 1 とした時に相対値が 0.2 以上となった。以上の結果から、これら 14 のタンパク質を骨格筋細胞から放出されるマイオカイン候補分子とした (Fig. 1-1A)。

次に、これらのマイオカイン候補分子の分泌が、骨格筋収縮による制御を受けるか調べた。分化 C2C12 筋管に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷して収縮させ、培養上清を回収、Cytokine array を用いた解析を行った。その結果、C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) 及び C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) 分泌量はそれぞれ約 0.7 倍、約 0.5 倍に減少し、M-CSF 及び CXCL2 は EPS 負荷により 1.2 倍ほど分泌が上昇した (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 1-1B)。運動によって骨格筋からの分泌が抑制されるマイオカイン (運動抑制性マイオカイン) としては、これまで、Myostatin のみしか同定されていなかったことから (94)、本研究で同定された CXCL10 及び CCL5 に着目し、さらに解析を行うこととした。

#### CXCL10 及び CCL5 は EPS 依存的に分泌及び遺伝子発現が減少する

CXCL10 は Interferon-gamma ( $\text{INF}\gamma$ ) や Tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) をはじめとした炎症性サイトカインの刺激によって単球や内皮細胞などにおいて産生されることが知られている (116)。一方で、骨格筋から放出される CXCL10 の生理的意義や放出メカニズムについては全く分かっていない。

そこで、EPS 負荷によりどの程度の CXCL10 の分泌が減少しているかを明らかにするため、ELISA による解析を行った。分化した C2C12 筋管細胞に上記と同様に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷し、ELISA によって培養上清中の CXCL10 濃度の変化について解析した。その結果、EPS を負荷していない筋管より分泌された CXCL10 は  $125 \pm 5.6$  pg/ml であったのに対して、EPS を負荷した筋管より分泌された CXCL10 は  $100 \pm 4.4$  pg/ml であり、EPS を負荷することで CXCL10 分泌は約 25 pg/ml 減少することが明らかとなった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 1-2A)。さらに、EPS 依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現制御を調べるために、上記と同様の条件で EPS を負荷した後に細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR による解析を実施した。その結果、*Cxcl10* 遺伝子発現量は EPS の負荷により約 0.4 倍に減少した (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 1-2B)。

もう 1 つの新規運動抑制性マイオカイン候補物質である CCL5 は T 細胞やマクロファージにおいて産生されるサイトカインである (117)。しかし、CCL5 についても骨格筋から分泌されるマイオカインとして報告された例はない。そこで、CCL5 についても CXCL10 と同様の解析を行った。

上記と同様の条件で C2C12 筋管細胞に EPS 刺激を負荷して培養上清を回収し、ELISA によって CCL5 分泌変化を調べた結果、EPS を負荷していない培養上清中の CCL5 濃度は  $220 \pm 48.9$  pg/ml であった一方、EPS を負荷することで、 $100 \pm 19.8$  pg/ml まで減少することが明らかとなった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 6-7$ ) (Fig. 1-3A)。さらに、遺伝子発現変化についても調べるために、上記と同様に C2C12 筋管細胞に EPS を負荷した後に細胞を回収し、RNA を抽出して qPCR により解析したところ、EPS を負荷することで *Ccl5* 遺伝子発現量が約 0.7 倍に減少していた (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 1-3B)。

### マウスへの運動負荷により、一部の骨格筋において *Cxcl10* 及び *Ccl5* の遺伝子発現が減少する

C2C12 筋管細胞における EPS 依存的な CXCL10 及び CCL5 の分泌及び遺伝子発現減少が確認されたため、動物走行モデルにおいても運動による発現分泌の減少が見られるか検証した。本研究においては、動物走行モデルとして、急性の運動効果を検証するための Treadmill を用いた強制走行負荷モデル (Fig. 1-4) と、慢性的な運動効果を検証するための Running Wheel を用いた自由走行負荷モデル (Fig. 1-5) の 2 つを併用した。また、序論で述べたように、各骨格筋における筋線維の割合が異なっていることや、運動の種類や加齢により筋線維の割合が変化することから、運動制御性マイオカインの発現分泌も骨格筋部位により異なる可能性があることが考えられたため、序章に述べた TA, EDL, Quad, SOL の 4 部位について *Cxcl10* 及び *Ccl5* 遺伝子発現変化を調査した。Treadmill による強制走行負荷モデルには、8 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いた。マウスを 1 週間馴化飼育した後、4 匹ずつ Rest 及び Running の 2 群に分け、Running 群には 15 cm/s, 8% slope の条件で 30 分間の強制走行を負荷した。強制走行終了後に、マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、各骨格筋組織 (TA, EDL, Quad, SOL) を採取した。Running Wheel による自由走行負荷モデルも同様に 8 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用い、1 週間馴化飼育した。その後、Running 群のケージに Running Wheel を設置し、1 週間の自由走行を負荷した。Running 群の各マウスにおける Running Wheel 回転数を計測したところ、個体差はあるものの、少なくとも 4 日間以上、暗期にのみマウスが走行している様子が観察された (Fig. 1-5B)。1 週間後、強制走行モデルと同様に頸椎脱臼によりマウスを安楽死させて各骨格筋サンプルを採取した。

各骨格筋組織 (TA, EDL, Quad, SOL) における *Cxcl10* 遺伝子発現変化を調べたところ、Treadmill により強制走行を負荷したマウスについて、TA, EDL, Quad においては Rest 及び Running の両群における顕著な *Cxcl10* 遺伝子発現変化は見られなかったが、SOL については Running 群において約 0.4 倍に減少していることが明らかとなった (\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 1-6A-D)。さらに、Running

Wheel による自由走行を負荷した際にも、Treadmill と同様に TA, EDL, Quad における *Cxcl10* 遺伝子発現量には変化が見られなかったものの、SOL における *Cxcl10* 遺伝子発現が若干減少する傾向にあった (n=4-5) (Fig. 1-7A-D)。

次に、*Ccl5* についても *CXCL10* と同様に動物走行モデルにおける動態変化を調べた。まず、Treadmill による強制走行負荷後、各骨格筋の *Ccl5* 遺伝子発現を解析したが、TA, EDL, Quad, SOL のいずれの組織においても運動負荷による顕著な変化は観察されなかった (Fig. 1-8A-D)。さらに、Running Wheel による自由走行負荷モデルについても各骨格筋における *Ccl5* 遺伝子発現変化を調べた。その結果、TA 及び Quad において、自由走行を負荷することで *Ccl5* 遺伝子発現はそれぞれ約 0.6 倍、0.4 倍に減少した。一方、EDL における *Ccl5* 遺伝子発現については運動依存的な変化は見られなかったものの、SOL における *Ccl5* 遺伝子発現は運動によって約 5 倍に上昇した (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , n=5) (Fig. 1-9A-D)。

## 4. 考察

### Cytokine array を用いた新規運動抑制性マイオカイン候補因子 CXCL10 及び CCL5 の同定

これまでのマイオカイン研究においては、マウスに運動を負荷した際に分泌因子群の血中濃度が上昇することが契機となって運動制御性マイオカインが同定される例が多かった。しかし、緒言でも述べた通り、これらの因子の運動依存的な血中濃度が骨格筋に起因するかを明らかにすることは容易ではない。本研究では、骨格筋細胞に EPS を負荷することで収縮させる C2C12-EPS 系を用いることで、骨格筋細胞から直接放出される分泌因子の変化を解析することが可能となった。一方、C2C12-EPS 系は、培養骨格筋細胞に電気パルスを加えるという人工的な系であるため、動物個体の運動によって生じるマイオカイン分泌変化と同一の現象が得られているかは慎重な検討が必要である。Table. introduction-1 に示した既知のマイオカインのうち、動物走行モデルを用いた検討によって同定された IL-6, IL-8, Irisin, SPARC, C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2), Interleukin-10 (IL-10), Myostatin については培養骨格筋細胞への EPS 依存的な筋収縮によっても上下動することが報告されている (118-122)。また、EPS 依存的な筋収縮によって発現分泌が上昇することで同定されたマイオカインである CXCL1, VEGF についても動物走行モデルにおいて運動依存的な発現上昇が確認されている (77, 123)。本研究においても、C2C12-EPS 系で見られた筋収縮依存的な CXCL10 及び CCL5 発現減少は、動物走行モデルにおいても一部再現されていることが明らかとなった。すなわち、マイオカイン研究については、動物走行モデルを併用した検討は依然必要であるものの、C2C12-EPS 系は生理的な運動制御性マイオカインの探索手段として有用であると考えられる。

これまで同定されてきたマイオカインは、血中濃度や細胞における遺伝子発現を ELISA や qPCR により 1 つずつ解析する手法が用いられてきた (78, 84, 89-91, 124)。しかしこの場合、一度に解析できるタンパク質の数が少なく、マイオカインの候補因子になり得るタンパク質は限られたもののみになってしまう。一方、本研究においては、R&D 社の Proteome Profiler™ Arrays Mouse Cytokine Panel A (以下、Cytokine array とする)を用いた。本キットは、メンブレンに 40 種類の抗体がスポットされており、一度に 40 種類のタンパク質 (サイトカイン)をターゲットとして調べることが可能である。本章では、これら C2C12-EPS 系の利点と Cytokine array 法の利点を組み合わせることで骨格筋収縮依存的に分泌変化するマイオカイン候補因子について、多数のものをターゲットとして検討を行った。

一方、Cytokine array は各スポットにおけるシグナル強度から分泌変化を算出しているため半定量的な解析方法であり、運動依存的なマイオカインの分泌変化を定量的に評価するためには別方法による検証が必要である。実際、本研究においても Cytokine array を用いた解析により CXCL10

及び CCL5 を運動抑制性マイオカイン候補とした後、ELISA 及び qPCR を用いた定量的な検証を行った。本方法を用いた他研究においても、Cytokine array によってターゲットする因子を決定した後に、ELISA や Western Blotting, qPCR を用いた定量が行われている。例えば、Sun らはマウスの間質血管細胞群 (Stromal vascular fraction: SVF)における Discoidin domain receptor 1 (DDR1)の役割を調べるために、野生型もしくは DDR1 ノックアウトマウス SVF 由来の培養上清を Cytokine array に供し、DDR1 ノックアウトマウス SVF において減少する因子として IL-6 を候補とした後、ELISA 及び qPCR による定量的な解析を実施している (125)。さらに Gartung らもマクロファージを Cyclooxygenase-2 及び soluble epoxide hydrolase の阻害剤である 4-(5-phenyl-3-{3-[3-(4-trifluoromethyl-phenyl)-ureido]-propyl}-pyrazole-1-yl) benzenesulfonamide で処理した際に分泌が変化するサイトカインとして、Cytokine array を用いて TNF $\alpha$ , CXCL2, CCL4, MCP-1, IL-1 $\alpha$ , sICAM, GM-CSF, G-CSF の 8 つを同定したが、いずれについても ELISA による定量的な解析を実施している (126)。以上の例からもこれらの検証は不可欠であると考えられる。

さて、序章に述べた通り、これまでに同定されているマイオカインのうち運動によって発現や分泌が抑制される運動抑制性マイオカインとして報告されているものは Myostatin のみであった (127, 128)。そのため、CXCL10 及び CCL5 は運動により分泌が抑制される世界で 2 例目、3 例目の運動抑制性マイオカイン候補因子である。一方、運動によって分泌上昇するマイオカインはこれまで数多く報告されてきたが (79, 84, 91, 124)、運動によって生じる筋損傷依存的に骨格筋から漏出するタンパク質を運動制御性マイオカインに含めるか議論が続いている (129)。したがって、運動によって分泌変動するマイオカインは、以下の 3 種類に分類可能ではないかと考える。(1) 筋収縮によって筋損傷とは独立して分泌上昇するマイオカイン、(2) 筋損傷に伴って漏出するマイオカイン、(3) 運動によって分泌減少するマイオカインである。今後、すでに報告されている運動によって分泌促進されるマイオカインを(1)と(2)に区分していくことが求められる。さらに、筋小胞体からの Ca<sup>2+</sup>放出を起点として生じる筋収縮は、骨格筋細胞内の様々なシグナル伝達経路の活性化を引き起こすことが知られている (130-133)。そのため、CXCL10 や CCL5 などの運動制御性マイオカインの発現制御メカニズムを解明することも重要であるが、この点については第二章において詳しく調べていくこととする。

新規マイオカインのターゲットを広げるための解析手段としては、質量分析による方法が挙げられる。質量分析を用いて同定されたマイオカインの例として上述した Irisin が挙げられる。骨格筋における運動依存的な Irisin 遺伝子の発現上昇は確認されていたものの (37)、運動依存的な血中 Irisin 濃度の上昇は Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)を用いて証明された (134)。すなわち、今後の新規マイオカイン探索には、本章で用いた Cytokine array だけでなく、質量分析も有用な方法であることが示唆される。

## 各動物走行モデルにおける CXCL10 及び CCL5 の発現変化

本研究では Treadmill を用いた急性走行、Running Wheel を用いた慢性走行の両モデルを動物走行モデルとして併用し、CXCL10 及び CCL5 を運動依存的に発現変動する新規マイオカインとして同定した。CXCL10 については、急性走行、慢性走行ともに遅筋である SOL において *Cxcl10* 遺伝子発現の減少が確認された。一方、CCL5 に関しては、急性走行による骨格筋 *Ccl5* 遺伝子発現の変動は観察されなかったが、慢性走行依存的に TA 及び Quad において運動依存的な *Ccl5* 遺伝子発現の減少が見られた。すなわち、CXCL10 や CCL5 は、骨格筋から常時分泌されているマイオカインであるが、運動を行うことで、一過的に分泌が抑制されることが示唆される。CXCL10 欠損マウスでは、T 細胞の機能が不全となり免疫反応不全となること、コラーゲンの主成分であるヒドロキシプロリンが過剰に産生され、肺の線維化が進行することが報告されている (116, 135)。さらに、CCL5 欠損マウスでは、T 細胞の増殖抑制や機能不全が生じ、免疫不全となることが示されている (136)。骨格筋が常時分泌する CXCL10 や CCL5 の生理的役割については、更なる研究が必要ではあるが、骨格筋から常時分泌される CXCL10 や CCL5 も正常な免疫システムの維持に何らかの役割を果たしている可能性は否定できない。一方、上述の通り、CXCL10 は血管新生の抑制や炎症促進に関与しているほか、CCL5 も炎症促進に関与していることから、運動依存的に CXCL10 や CCL5 の発現分泌が一過的に減少することで、これらを制御している可能性が考えられる (116, 117, 137, 138)。

また、本実験において、運動依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現減少は主に遅筋において観察され、運動依存的な *Ccl5* 遺伝子発現減少は遅筋ではなく速筋において観察された。序章に述べた通り、速筋では主に解糖系、遅筋では酸化的リン酸化によってエネルギー代謝が制御されていること、さらに速筋と遅筋でヒストン修飾が異なっていることなどが知られている。

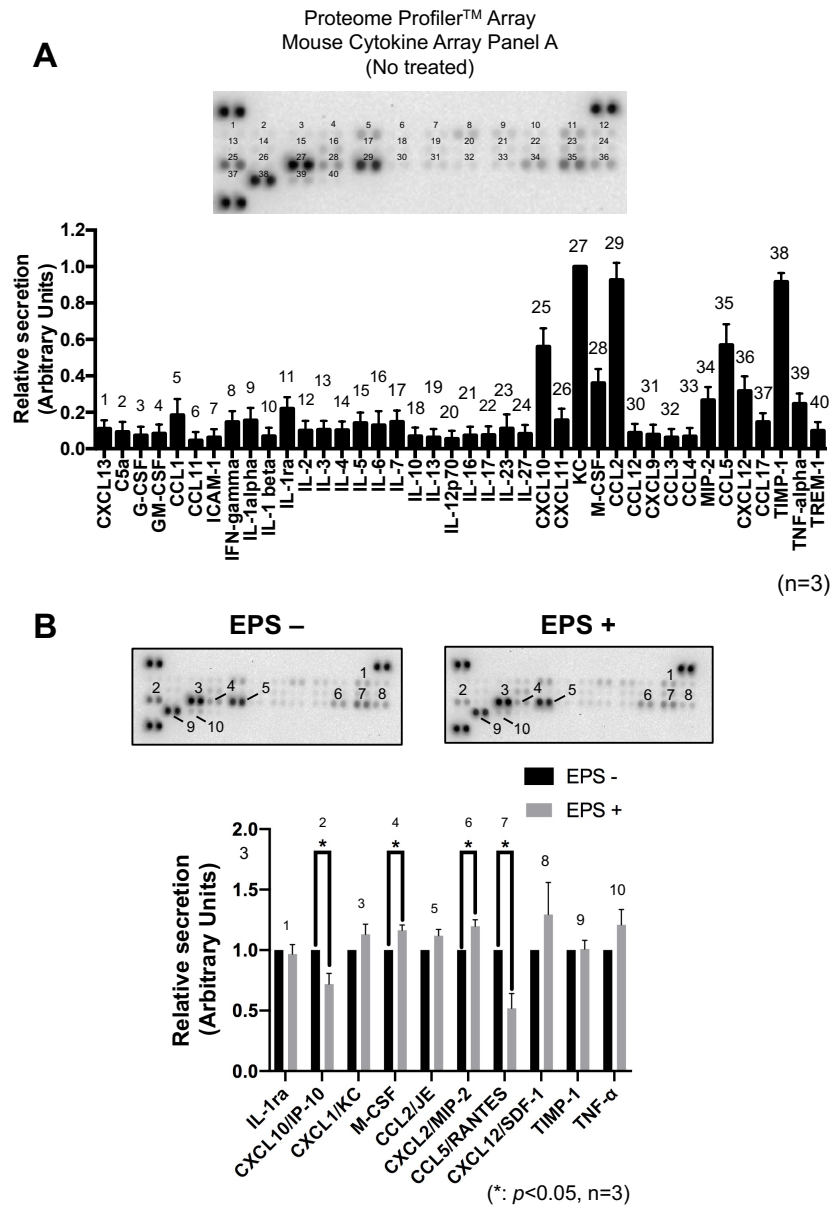
エネルギー代謝に関しては、遅筋において PGC-1 $\alpha$  の発現が高く (139)、運動は PGC-1 $\alpha$  量をさらに増加させることが知られている (139)。さらに、糖尿病モデルマウスを運動させることで、心臓における一過的な PGC-1 $\alpha$  発現上昇が生じ、これに伴って血中 CXCL10 濃度が減少することが報告されている (140)。また、ヒト培養骨格筋細胞において PGC-1 $\alpha$  を過剰発現させることで CCL5 発現が上昇するなど、PGC-1 $\alpha$  は CCL5 発現を上昇させることも示されている (141)。すなわち、遅筋における CXCL10 及び CCL5 の発現制御には、PGC-1 $\alpha$  が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、速筋のみで観察される運動依存的な CCL5 発現減少についても、速筋と遅筋の代謝特性の差異から研究を継続していくことが重要である。

ヒストン修飾の相違も骨格筋部位特異的な遺伝子発現変化に寄与している可能性が考えられる。例えば、Myocyte enhancer factor 2 (MEF2) の発現は主に遅筋において高いことが知られている (142)。MEF2 の遺伝子発現には Histone Deacetylase (HDAC) のうち、HDAC4 をはじめとするクラス II の HDAC が関与しているが、クラス II HDAC 発現は速筋において高く、遅筋において低いことが知

られている。すなわち、遅筋におけるヒストン H2 アセチル化は、速筋と比較して高い傾向があり、これが主に遅筋において MEF2 遺伝子発現が上昇する理由のひとつではないかと考えられている (142)。CXCL10 や CCL5 遺伝子発現を制御する HDAC としては、それぞれ HDAC6、HDAC1 が同定されているが (143, 144)、両者の速筋、遅筋における発現動態や運動依存的な発現制御については明らかにされていない。今後、HDAC6 や HDAC1 の速筋及び遅筋における発現量や運動による発現変化を解析することで、運動による骨格筋部位特的な CXCL10 及び CCL5 発現減少にヒストン修飾が関与しているかを明らかにすることができると考えられる。

本章の動物走行モデルを用いた研究の結果、CXCL10 は主に遅筋、CCL5 は速筋において運動依存的な遺伝子発現減少が見られたが、C2C12-EPS 系においてはどちらも EPS 依存的な発現分泌減少が認められた。本研究で用いた C2C12 筋管細胞はもともと Type II MHC 発現が高いが、EPS を負荷することで Type I MHC 発現が増加することが報告されている (77)。すなわち、24 時間の EPS 処理の中で、骨格筋のタイプスイッチが生じながら継続した収縮が生じたため、CCL5 および CXCL10 発現分泌減少が生じたとの仮説を考えることができる。しかしながら、C2C12 は細胞株であって生体筋と同一ではない生理変化を生じる可能性もあるため、今後も生体筋を併用した研究を継続していくことが重要であると考えられる。なお、本章のまとめを Fig. summary1-1 として示した。

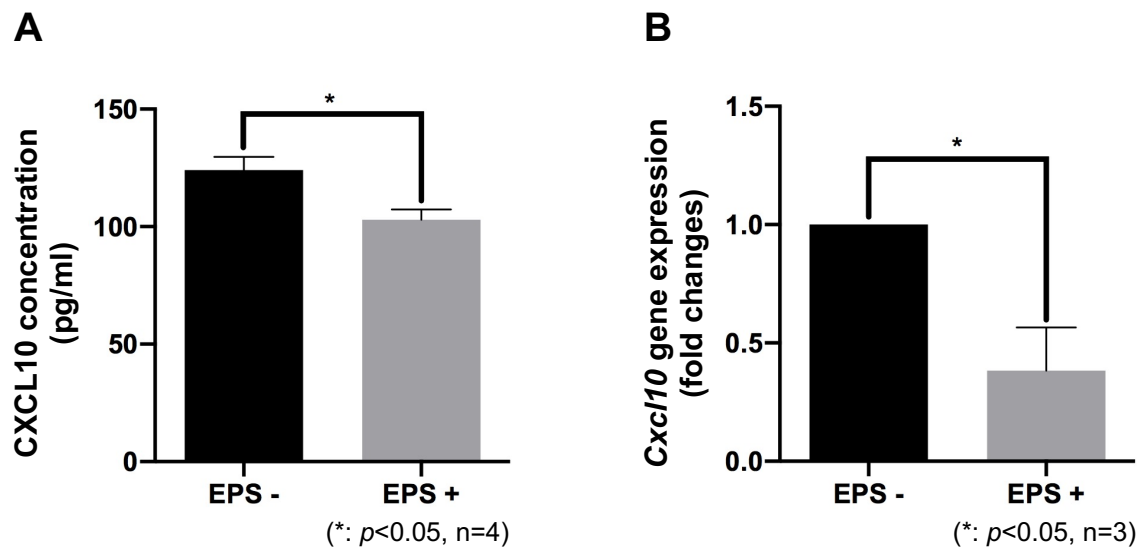
## 5. 図表



**Fig. 1-1 C2C12 筋管細胞への EPS 処理によるタンパク質分泌の変化**

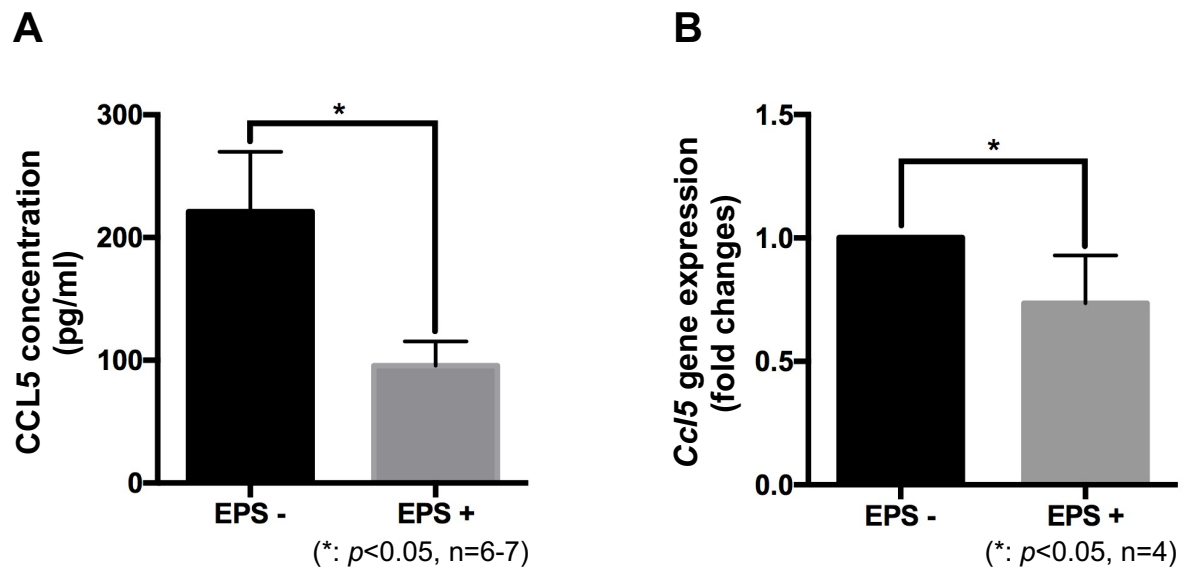
(A) C2C12 筋芽細胞を分化誘導して筋管を形成し、培養上清を回収して Cytokine array によって筋管より分泌されるタンパク質を解析した。(B) 分化した C2C12 筋管細胞に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS を負荷し、培養上清を回収して Cytokine array によりタンパク質分泌の変化を解析した。写真の各スポットは Image J を用いて数値化し、グラフを作成した。独立した実験を 3 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (A:  $n = 3$ ) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )。





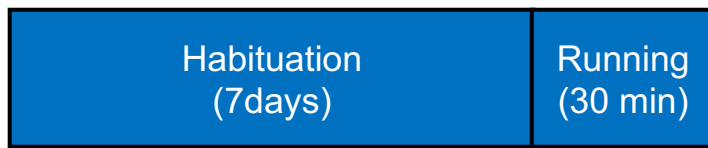
**Fig. 1-2 C2C12 筋管細胞への EPS 負荷による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

C2C12 筋管細胞に 24 時間 EPS を負荷した。(A) 24 時間の EPS 負荷終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて EPS 負荷による CXCL10 分泌変化を調べた。(B) EPS 負荷終了後に細胞を回収して RNA を抽出し、Reverse transcriptional-qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現量を解析した。なお、*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (A: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n=4$ ) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n=3$ )。

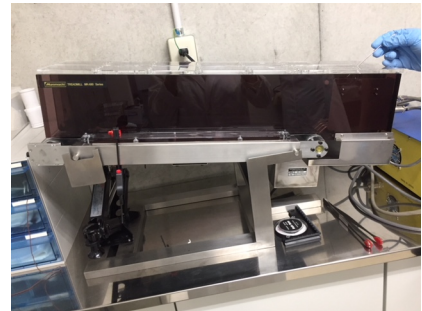


**Fig. 1-3 C2C12 筋管細胞への EPS 負荷による CCL5 分泌及び遺伝子発現の変化**

分化した C2C12 筋管細胞に 24 時間 EPS を負荷した。(A) EPS 負荷終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて CCL5 分泌変化を調べた。(B) 細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR により *Ccl5* 遺伝子発現を解析した。なお、*Ccl5* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (A: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 6-7$ ) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ )。

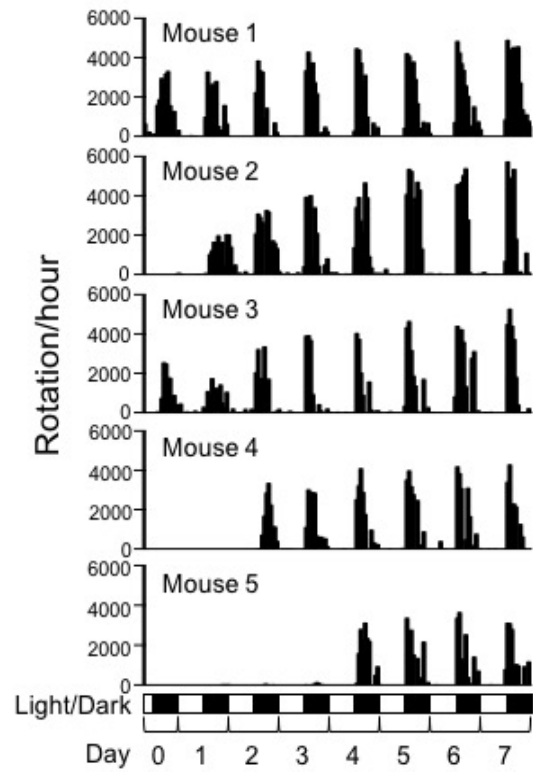
**A**

➡ Sampling (skeletal muscle)

**B**

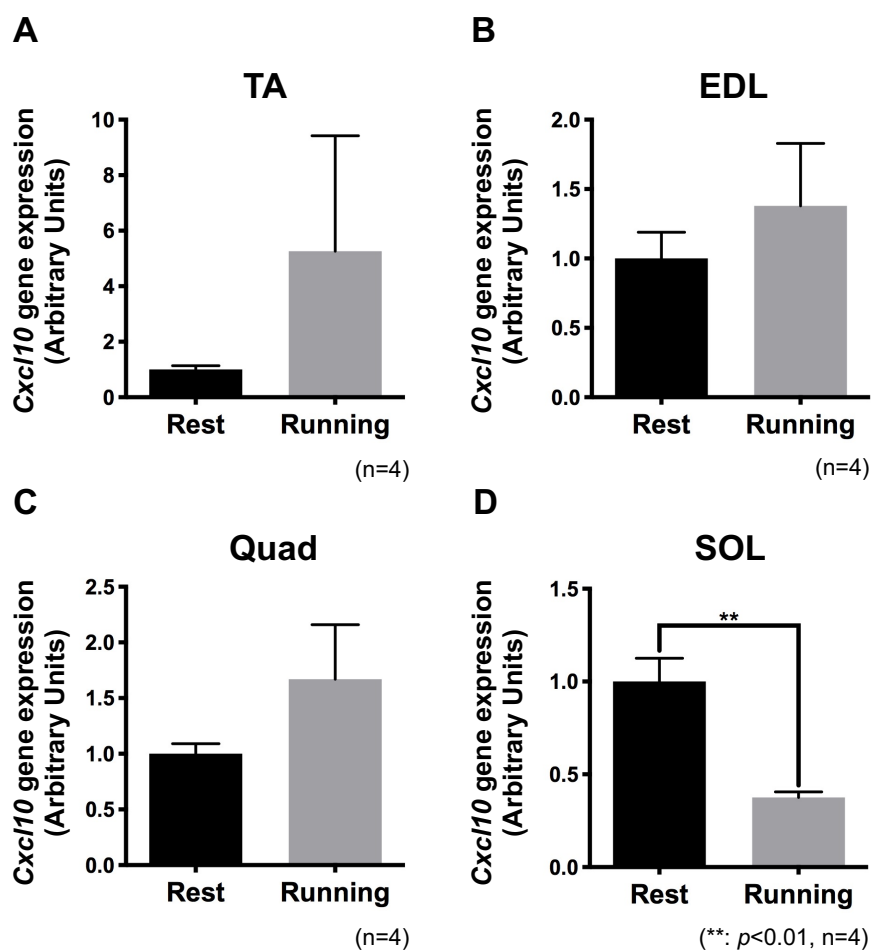
**Fig. 1-4 Treadmill による強制走行モデルの実験デザイン**

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 5 匹ずつ Rest 群及び Running 群の 2 群に分けた。(A) Treadmill を用いた強制走行モデルにおいては、Rest 及び Running の両群のマウスを 1 週間馴化飼育した。その後、Running 群には Treadmill による強制走行を負荷し、走行終了後に血液及び TA, EDL, Quad, SOL の 4 部位の骨格筋を採取した。(B) Running 群においては、写真に示した Treadmill を用いて、強制走行 (15 cm/s, 30 min, 8% slope) を負荷した。

**A****B**

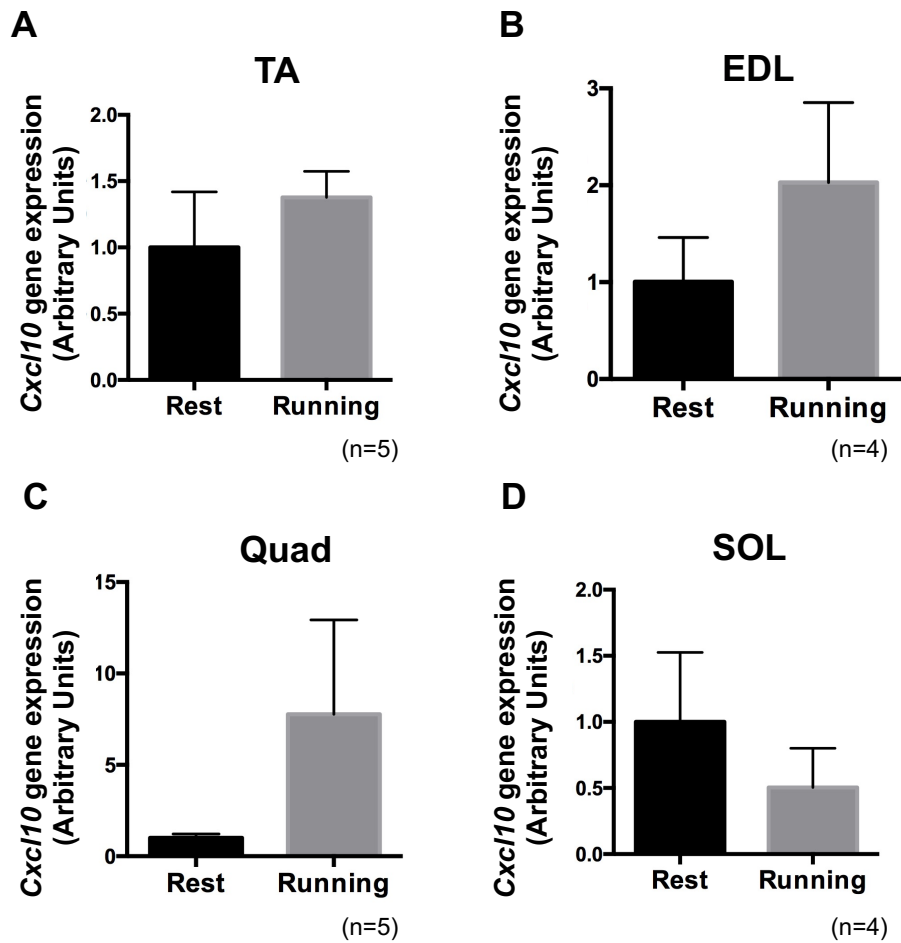
**Fig. 1-5 各マウスにおける Running Wheel 回転数**

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 5 匹ずつ Rest 群及び Running 群の 2 群に分けた。(A) Running 群においては、ケージ内に Wheel を設置し、1 週間自由走行させた。(B) Wheel の回転数をモニタリングし、各日の 2 時間毎の合計回転数をグラフ化した (n=5)。



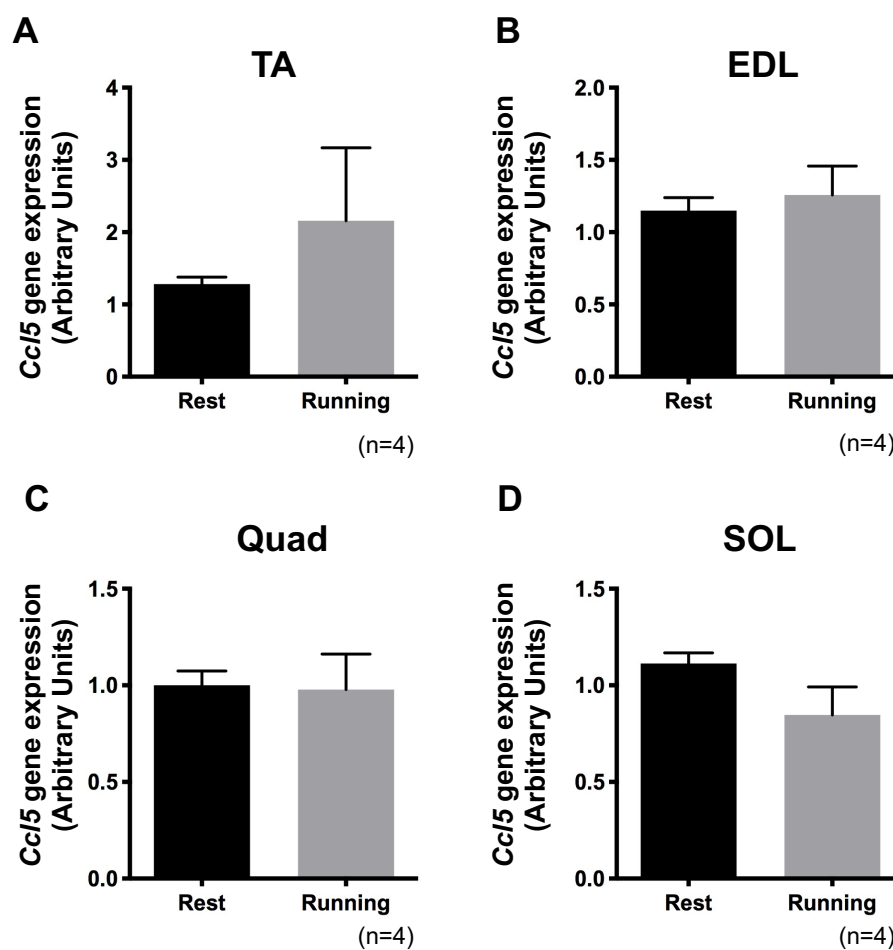
**Fig. 1-6** マウスへの Treadmill 負荷による各骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化

9週齢の C57BL/6J 雄マウスを4匹ずつ Rest 及び Running の2群に分けた。Running 群には Treadmill による強制走行 (15 cm/s, 30 min, 8% slope)を負荷した。(A-D) 採取した各骨格筋より Total RNA を抽出し、qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現を解析した。*Cxcl10* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。両群ともに4匹のマウスのサンプルを解析し、Student's t-test によって統計解析を行った (A-C: n=4) (D: unpaired Student's t-test, \*\*:  $p < 0.01$ , n=4)。



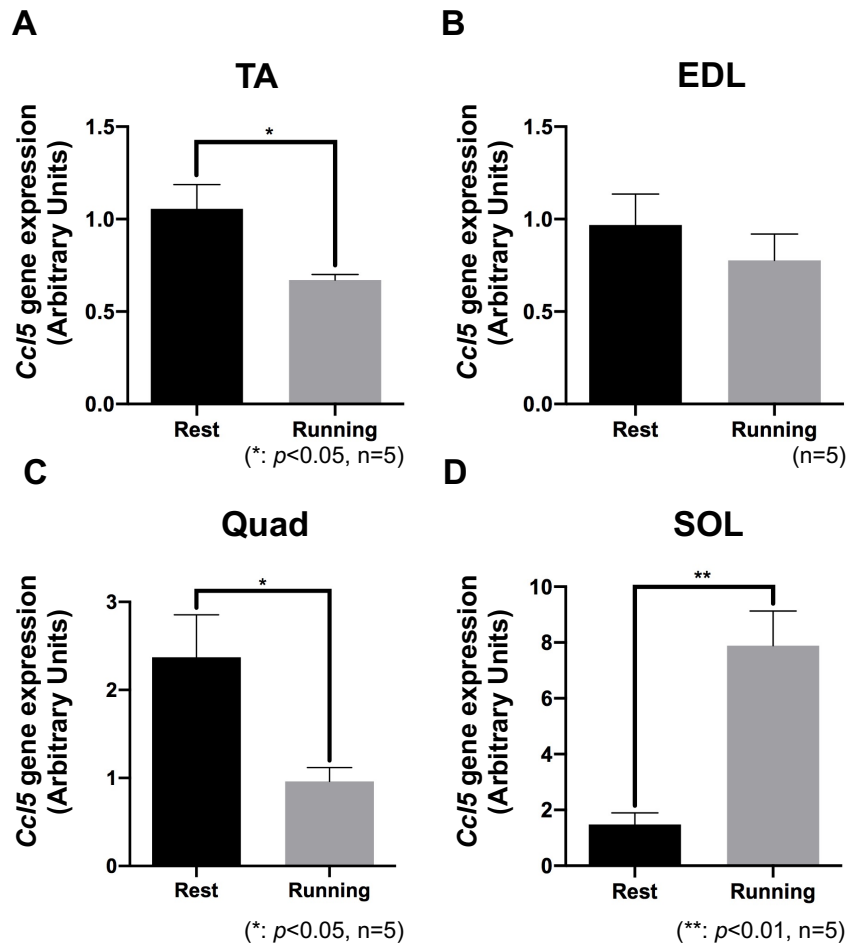
**Fig. 1-7 Running Wheel 負荷による各骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化**

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 5 匹ずつ Rest 群及び Running 群の 2 群に分け、Running 群のケージには Running Wheel を設置し、1 週間の自由走行を負荷した。(A-D) 採取した各骨格筋より Total RNA を抽出し、qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現を解析した。*Cxcl10* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。両群ともに 4 匹もしくは 5 匹のマウスのサンプルを解析し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: n=5) (B: n=4) (C: n=5) (D: n=4)。



**Fig. 1-8** マウスへの Treadmill 負荷による各骨格筋における *Ccl5* 遺伝子発現量の変化

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 4 匹ずつ Rest 群及び Running 群の 2 群に分け、Running 群には Treadmill による強制走行 (15 cm/s, 30 min, 8% slope) を負荷した。(A-D) 採取した各骨格筋より Total RNA を抽出し、qPCR により *Ccl5* 遺伝子発現を解析した。*Ccl5* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。両群ともに 4 匹のマウスのサンプルを解析し、Student's t-test によって統計解析を行った (A-D: n=4)。

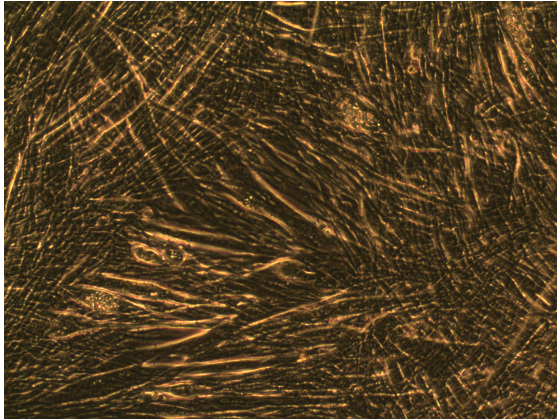
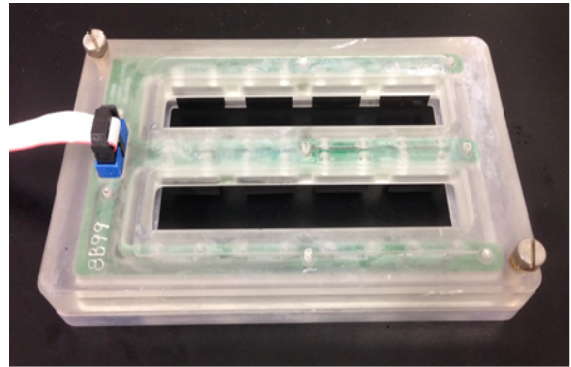


**Fig. 1-9** マウスへの Running Wheel 負荷による各骨格筋における *Ccl5* 遺伝子発現量の変化

9 週齢の C57BL/6J 雄マウスを 4 匹ずつ Rest 群及び Running 群の 2 群に分け、Running 群にはケージ内に Running Wheel を設置し、1 週間の自由走行を負荷した。(A-D)各骨格筋より Total RNA を抽出し、qPCR により *Ccl5* 遺伝子発現を解析した。*Ccl5* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。

(A: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (B:  $n = 5$ ) (C: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (D: unpaired Student's t-test, \*\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 5$ )。

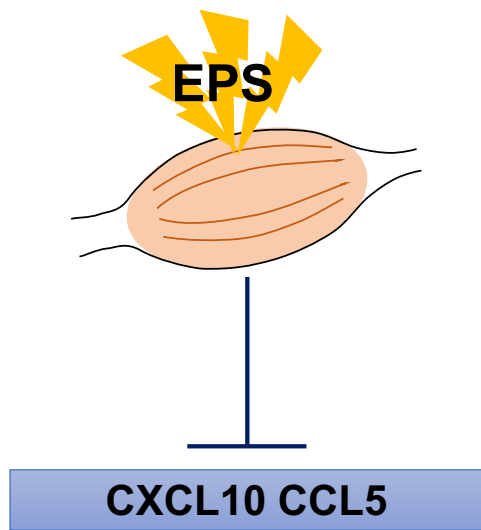


**A****B****C**

**Supplementary Fig. 1-1 分化した C2C12 筋管細胞及び EPS**

(A) マウス由来骨格筋細胞株 C2C12 より形成した筋管細胞。 (B, C) C2C12 筋管細胞の収縮誘導に用いた電気パルス発生装置 (B)及び黒鉛電極 (C)。

C2C12



Mice

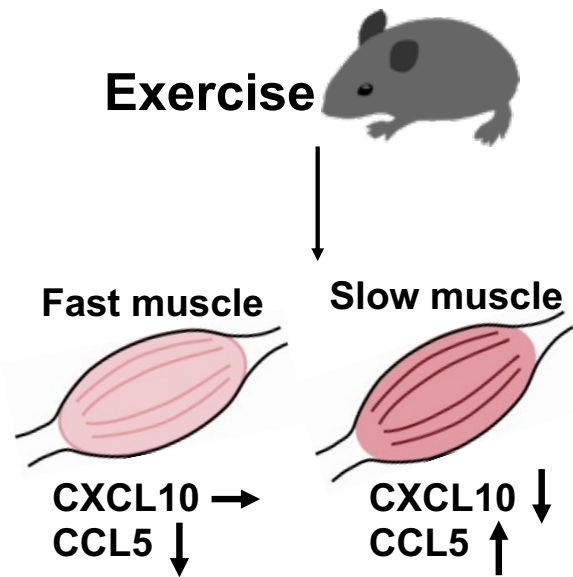


Fig. summary1-1 第一章のまとめ

C2C12-EPS 系及び動物走行モデルを用いた研究によって、CXCL10 及び CCL5 を新規運動抑制性マイオカインとして同定した。マウス走行モデルでは、CXCL10 は主に遅筋において運動依存的な遺伝子発現減少が見られ、CCL5 は主に速筋において運動依存的に遺伝子発現が減少した。

## 第二章

### 運動依存的な CXCL10 制御メカニズム

# 1. 緒言

第一章では、骨格筋において収縮依存的に発現及び分泌が減少する新規マイオカインとして CXCL10 及び CCL5 を同定した。第一章で述べた通り、CXCL10 は単球や内皮細胞など、CCL5 は T 細胞やマクロファージなどにおいて炎症性サイトカインなどの刺激によって産生されるケモカインである (116, 117)。さらに CXCL10 については、肺の細胞腫を接種したマウスに CXCL10 をインジェクションすることで寿命が延びることや (145)、CXCL10 過剰発現によりメラノーマや肉腫、肺の細胞腫において腫瘍の発達を抑制することなどが示されており (146, 147)、抗腫瘍活性を持つことが明らかにされてきた。さらに、血管内皮細胞に対しては、アポトーシスの誘導や細胞遊走の抑制により血管新生を強力に抑制すること (147)、新しく形成された血管を解離させることも報告されるなど (138)、その生理作用は多岐にわたっており、運動依存的に CXCL10 の発現や分泌が減少することで様々な効果がもたらされることが考えられる。そこで、本研究においては、新規の運動抑制性マイオカインとして同定した CXCL10 及び CCL5 のうち、特に CXCL10 に焦点を当てて、筋収縮依存的な発現制御メカニズムを解明することとした。

骨格筋の収縮時あるいは収縮後において、様々な細胞内シグナル分子の変化が生じることが分かっている。その 1 つは骨格筋内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の変動を起点として活性化されるシグナル伝達経路である。筋収縮は骨格筋細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇によって引き起こされるが (148)、この細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇は、同時に Calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) や Calcineurin など  $\text{Ca}^{2+}$  依存性のシグナル伝達経路を活性化させる (130, 131)。本研究で用いた C2C12-EPS 系では EPS 刺激による電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネルの強制開口によって  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入が引き起こされ、C2C12 筋管細胞が収縮することが明らかになっている (149)。

また、筋収縮は大量の ATP を消費するが、これにより細胞内の ATP:AMP 比が変化し、Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) が活性化する (132)。この、運動依存的な AMPK 活性化はマイオカインの発現や分泌の制御にも関与していることが報告されている。Interleukin-15 (IL-15) は運動によって分泌上昇するマイオカインとして同定されたが、AMPK ノックアウトマウスでは、この運動依存的な IL-15 産生上昇が観察されなかった。すなわち、運動依存的な骨格筋 IL-15 発現に AMPK が関与していることが強く示唆される (150)。

さらに、筋収縮はストレス応答性の Mitogen activated protein kinase (MAPK) 活性化を引き起こすことが知られている。例えば、ヒトに 30 分間のサイクリング負荷運動を行うと、骨格筋において MAPK の 1 つである p38 MAPK が活性化することが明らかとなっている (133)。さらに、運動により骨格筋における分泌が上昇することが明らかにされたマイオカインである IL-8 は、p38 MAPK 活性化によって発現分泌が制御されていることも明らかになっている (151, 152)。

まとめると、骨格筋が収縮すると、少なくとも (1)  $\text{Ca}^{2+}$  依存性シグナル、(2) AMPK シグナル、

(3) MAPK シグナルの 3 つが活性化することが示唆されている。一方、第一章で同定した新規マイオカイン CXCL10 が、運動依存的にどのシグナルによって発現低下するのかは不明である。そこで、本章においては、上記シグナル伝達経路を解析することで、運動依存的な CXCL10 発現分泌制御メカニズムの解明を試みた。

## 2. 材料と方法

### 細胞培養

#### C2C12 細胞の培養及び分化誘導

第一章と同様の方法を用いた。

#### 電気パルス (Electrical pulse stimulation; EPS)処理

C2C12 筋管細胞への電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS)は第一章と同様に分化誘導により筋管を十分に形成した後に実施した。EPS の条件は 1 Hz, 2 ms, 20 V, 24 時間とし、EPS 直前に培地交換を実施した。また、EPS 依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少メカニズムについて検討を行うため、以下に示した種々のシグナル活性化剤及び阻害剤を用いた。まず、電位依存性の  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害剤である Verapamil Hydrochloride (Verapamil, Nacalai tesque)は終濃度 100  $\mu\text{M}$  の条件で使用した。また、Adenosine mono-phosphate kinase (AMPK)の特異的活性化剤である 5-Aminoimidazole-4-carboximide ribonucleotide (AICAR, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan)は終濃度 0.5 mM の条件で添加した。さらに、ストレス応答性の Mitogen-activated protein kinase (MAPK)の一つである p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 (Sigma-Aldrich)については終濃度 5  $\mu\text{M}$  の条件で使用した。

### タンパク質解析

#### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA は DuoSet® Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2, DuoSet® Ancillary Reagent Kit2 (R&D systems)を使用し、キット付属のプロトコルに従って第一章と同様にして実施した。

#### Western Blotting

AMPK 及び p38 MAPK のリン酸化は Western Blotting により解析を行った。まず、細胞を細胞抽出液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% TritonX-100 (Sigma-Aldrich), 0.1% Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque), 0.1% Phosphatase Inhibitor Cocktail (Nacalai tesque))を用いて回収、等量の 2 × Samples Buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 20% Glycerol, 0.01% Bromophenol Blue)を加え、さらに全量の 1%となるように 2-Mercaptoethanol (Nacalai tesque)を添加し、熱変性を行ったものを SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE は 10% SDS ポリアクリルミドゲルを用い、分離したタンパク質は Trans Blot Cell (Bio-Rad)及び Transfer Buffer (25 mM Tris, 190 mM Glycine, 10% Methanol)により 4°C, 45V, 300 分間の条件で PVDF 膜 (Polyvinylidene difluoride;

pore size 0.45 µm, MERCK Millipore, MA, USA)に転写した。転写終了後、Blocking Buffer (3% BSA, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20 (Sigma-Aldrich))に浸して 30 分間振とうした。その後、Blocking Buffer で希釈した各種一次抗体を 4℃で 12 時間反応させ、TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20)によって 10 分間、3 回洗浄した。次に TBS-T で希釈した二次抗体とともに室温で 1 時間反応させ、反応終了後に再度、TBS-T を用いて 10 分間、3 回洗浄した。その後、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, CA, USA)もしくは Chemi-Lumi One Super (Nacalai tesque)及び ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad)を用いて化学発光を検出した。得られた化学発光シグナルは Image J Software により定量した。なお、使用した一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率は以下に記載した。

#### 一次抗体

- Anti- AMPK alpha, 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)
- Anti-Phospho-AMPK alpha (T172), 1:1000 (Cell Signaling)
- Anti-p38 MAPK, 1:1000 (Cell Signaling)
- Anti-Phospho-p38 MAPK (T180/Y182), 1:1000 (Cell Signaling)

#### 二次抗体

- Anti-rabbit IgG HRP-1 linked, 1:5000 (Cell Signaling)

## 遺伝子発現解析

### 細胞の回収及び RNA 抽出

細胞の回収及び RNA 抽出は、NucleoSpin® RNA (MACHEREY-NAGEL)または TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いて第一章と同様にして実施した。

### 逆転写反応 (Reverse-Transcription)

逆転写反応についても、第一章と同様に PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio Inc.)を用いて実施した。

### Reverse transcriptional-qPCR (qPCR)

KAPA SYBR Fast qPCR Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd.)または THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO CO., LTD.)を用いて第一章と同様にして行った。

## 統計解析

統計解析には第一章と同様に GraphPad Prism8 (GraphPad Software)を使用した。2 群間の比較には unpaired student's t-test を、3 群間以上の比較には one-way ANOVA を使用した。どちらの解析においても、危険率が 5%未満の際に統計的に有意差があるとした。



### 3. 結果

#### EPS 依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少には $\text{Ca}^{2+}$ 流入が必要である

まず、マウス骨格筋由来 C2C12 筋管細胞に対して、電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル阻害剤である Verapamil (100  $\mu\text{M}$ ) の存在下、あるいは非存在下、1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で EPS を 24 時間負荷し、培養上清に含まれる CXCL10 分泌量を ELISA にて解析した。その結果、対照群における CXCL10 分泌量は  $225 \pm 3.1$  pg/ml であったが、EPS の負荷群では  $213 \pm 1.1$  pg/ml まで減少した。一方で、Verapamil を添加した場合、EPS 依存的な筋管収縮が観察されなくなり、CXCL10 分泌量は EPS を負荷していない群で  $216 \pm 2.0$  pg/ml であったのに対して、EPS を負荷した群では  $214 \pm 1.9$  pg/ml となり、この 2 群間については有意な変化は見られなかった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (Fig. 2-1A)。

さらに、遺伝子発現変化についても調べるために、上記と同様の条件で細胞を処理した後、細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR によって *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化を解析した。その結果、Verapamil を添加せずに EPS を負荷した群については EPS 負荷により *Cxcl10* 遺伝子発現は約 0.4 倍に減少していたものの、Verapamil を添加することにより、EPS を負荷しても筋管収縮は観察されず、*Cxcl10* 遺伝子発現に変化は見られなかった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4-6$ ) (Fig. 2-1B)。

これらの結果より、EPS 依存的な CXCL10 の分泌及び遺伝子発現の減少には  $\text{Ca}^{2+}$  の流入による筋管収縮が必須であることが明らかとなった。

#### EPS 依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少に AMPK 活性化は関与しない

次に、EPS 依存的な AMPK の活性化が CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少に関与しているかを検証した。まずは、本研究に用いた実験系においても EPS 負荷により AMPK が活性化することを確認するために、上記と同様に C2C12 筋管細胞の分化を誘導し、1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷し、AMPK リン酸化量の変化を調べた。その結果、AMPK リン酸化量は EPS を負荷することにより約 1.4 倍に上昇することが確認された (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ ) (Fig. 2-2)。

次に AMPK 活性化が CXCL10 分泌に及ぼす影響を解明するために、分化した C2C12 筋管細胞に終濃度 0.5 mM の AMPK 特異的活性化剤 AICAR を添加し、24 時間培養した。24 時間後、培養上清を回収し、ELISA によって CXCL10 分泌量の変化を調べたところ、対照群の CXCL10 分泌量は  $111 \pm 16.9$  pg/ml, AICAR 添加群では  $133 \pm 21.7$  pg/ml となり、統計上の有意な差は見られなかった ( $n = 4$ ) (Fig. 2-3A)。

さらに、AMPK 活性化が *Cxcl10* 遺伝子発現変化に及ぼす影響についても調査した。上述の通りに C2C12 筋管細胞を処理した後、細胞を回収し、RNA を抽出して qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現変化について調べた。その結果、AICAR を添加することで *Cxcl10* 遺伝子発現量は約 2.1 倍に上昇し、AMPK の活性化は *Cxcl10* 遺伝子発現を上昇させることが明らかになった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ )

(Fig. 2-3B)。

これらの結果より、EPS 依存的な AMPK の活性化は CXCL10 の分泌変化には関与せず、遺伝子発現に関しては、むしろ上昇させることが明らかになった。

### **EPS 依存的な p38 MAPK の活性化により CXCL10 分泌及び遺伝子発現は減少する**

次に運動依存的な p38 MAPK の活性化が CXCL10 発現分泌減少に関与しているかを調べた。まず、C2C12 筋管細胞に EPS を 0, 0.5, 1, 3, 6 時間負荷し、Western Blotting により p38 MAPK リン酸化を解析した。その結果、特に EPS を 6 時間負荷した際に、有意な p38 MAPK リン酸化量の上昇が認められた。すなわち、C2C12-EPS 系においても収縮依存的な p38 MAPK 活性化が生じることが確認された (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 2-4)。

次に EPS 依存的な CXCL10 分泌減少に p38 MAPK 活性化が関与しているかを調べた。C2C12 筋管細胞に終濃度 5  $\mu\text{M}$  の p38 MAPK の特異的な阻害剤である SB203580 を添加し、1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間 EPS を負荷した。処理終了後に培養上清を回収し、ELISA によって CXCL10 分泌量の変化を調べた。その結果、対照群における CXCL10 分泌量は  $204 \pm 2.1 \text{ pg/ml}$  であったのに対して、EPS 負荷により  $193 \pm 3.2 \text{ pg/ml}$  まで減少することが確認された。一方、SB203580 を添加した群については EPS を負荷していない群における CXCL10 分泌量は  $194 \pm 3.0 \text{ pg/ml}$ , EPS を負荷した群においては  $189 \pm 3.5 \text{ pg/ml}$  であり、EPS 負荷による CXCL10 分泌減少効果が消失することが明らかとなった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-6$ ) (Fig. 2-5A)。

さらに、p38 MAPK の活性化が EPS 依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現減少に及ぼす効果を調べた。その結果、EPS 負荷により *Cxcl10* 遺伝子発現量が約 0.5 倍に減少するが、SB203580 存在下では EPS 依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現減少が観察されなくなった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-6$ ) (Fig. 2-5B)。

また、C2C12-EPS 系において JNK 及び ERK1/2 が活性化することが報告されていたため (77, 117)、JNK 阻害剤や ERK1/2 の上流に位置する MAPK である MEK2 阻害剤の効果も検討した。その結果、EPS を負荷せずに JNK 及び MEK2 阻害剤のみを添加しただけで *Cxcl10* 遺伝子発現は有意に減少してしまったため、EPS 依存的な JNK 及び ERK1/2 活性化が *Cxcl10* 遺伝子発現に影響するとの証拠は得られなかった (Supplementary Fig. 2-1, 2-2)。

以上の結果より、少なくとも EPS 負荷による p38 MAPK 活性化は、CXCL10 の分泌及び遺伝子発現減少に重要であることが明らかになった。

## 4. 考察

### 筋収縮依存的な CXCL10 発現制御メカニズム

本研究において、運動依存的な CXCL10 減少に骨格筋細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入及び p38 MAPK の活性化が関与していることが示された。これまで他細胞において CXCL10 発現を制御する細胞内シグナルとして以下が報告されている。

#### (1) NF- $\kappa$ B による制御

唾液腺導管細胞及び唾液腺房細胞に、CXCL10 産生を促進することが知られている IFN $\gamma$  (15) を添加すると、NF- $\kappa$ B を介して両細胞における CXCL10 産生が増強されることが示されている (153)。加えて、ヒト表皮細胞を Prolactin で処理すると、CXCL10 産生が観察されるが、この際、Prolactin 依存的に活性化される NF- $\kappa$ B が関与していることが報告されている (154)。さらに、Crescioli らによって、ヒト胎児の骨格筋細胞における IFN $\gamma$  及び TNF $\alpha$  依存的な CXCL10 分泌上昇にも NF- $\kappa$ B が関与していることが報告されている (155)。

#### (2) JAK/STAT 経路を介した制御

ヒト微小血管内皮細胞において、サイトカインの 1 つである p43 の刺激により CXCL10 の発現が上昇することが知られているが、これは Janus kinase/Signal transducers and activation of transcription (JAK/STAT) 経路を介していることが明らかになっている (156, 157)。

#### (3) MAPK による制御

ヒト気道平滑筋 (Airway smooth muscle; ASM) において、c-Jun N-terminal kinase (JNK) の特異的な阻害剤である SP600125 を処理することで *Cxcl10* 遺伝子発現が減少することが報告されており (158)、JNK の活性化が CXCL10 発現を制御していることが示唆されている。また、ヒト表皮細胞株 HaCaT において、T 細胞の増殖や樹状細胞の機能を抑制することが知られている漢方薬成分である Dang-Gui-Liu-Huang Tang (DGLHT) (159) は、JNK 活性を抑制することで CXCL10 産生を抑制する (160)。さらに、MAPK の一つである Extracellular signal-related kinase (ERK1/2) も CXCL10 制御に関与することが知られている。ヒト単球細胞株 THP-1 細胞において、TNF $\alpha$  刺激依存的な CXCL10 分泌上昇が ERK1/2 の特異的な阻害剤 PD98059 処理によって抑制されることが示されている (161)。

これまで、複数の細胞において、上述の細胞内シグナルによって CXCL10 発現が上昇することが報告されていたものの、CXCL10 減少メカニズムの詳細は明らかになっていなかった。本章の研究によって、骨格筋細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入や収縮依存的な p38 MAPK 活性化により CXCL10 発現が減少することが初めて示された。また、JNK 阻害剤や ERK1/2 の上流に位置する MAPK である MEK2 阻害剤の効果も検討したが、EPS 負荷による JNK 及び ERK1/2 シグナルは、筋収縮依存的な CXCL10 減少に寄与する明確な証拠は得られなかった。さらに、喫煙者の肺組織における NF-

κB 活性化が運動により抑制されることが知られており (162)、骨格筋においても運動により NF-κB 活性化が抑制される可能性も考えられる。今後、C2C12 筋管細胞における EPS 依存的な NF-κB 活性化を検討し、CXCL10 減少メカニズムのさらなる詳細を明らかにすることが重要である。

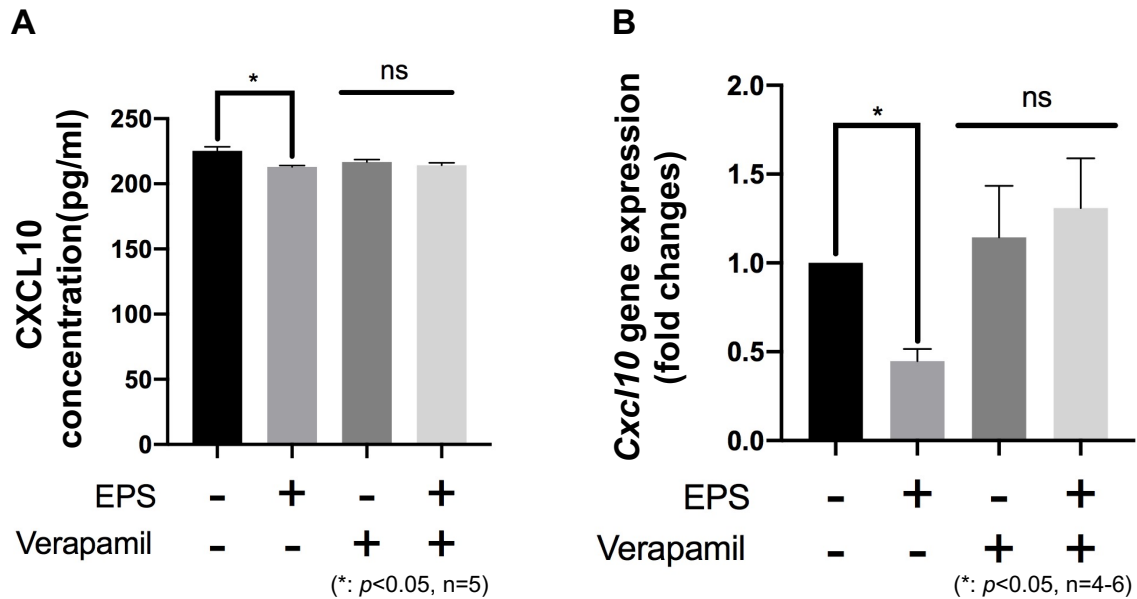
### Ca<sup>2+</sup>依存性シグナル及び MAPK 活性化による CXCL10 発現分泌制御

本章で、運動依存的な CXCL10 減少に Ca<sup>2+</sup>の流入が重要であることが明らかになったが (Fig. 2-1)、細胞内 Ca<sup>2+</sup>流入によって活性化される下流経路が CXCL10 の発現や分泌を制御しているかは未だ不明である。これまで、Ca<sup>2+</sup>依存的に様々なシグナル分子が活性化することが示されてきた。例えば、Ca<sup>2+</sup>依存性ホスファターゼ m-calpain、筋収縮依存的に活性化する Calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII)、Calmodulin 依存的ホスファターゼの一種である Calcineurin などが、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に伴って活性化されることが報告されている (130, 131, 163)。現在までのところ、これらシグナル分子による CXCL10 制御は明らかになっていない。

さらに、本章では、筋収縮により活性化する p38 MAPK が CXCL10 の分泌及び遺伝子発現減少に重要であることを示した。マイオカインの1つである IL-8 の運動依存的な制御にこの p38 MAPK が関与することは知られてきたものの (117, 151, 152)、筋収縮依存的な CXCL10 減少に p38 MAPK が関与していることは本章において初めて明らかにされた。また、ラット神経細胞やヒトの骨肉腫細胞において、p38 MAPK の活性化は細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇により誘導されることが報告されている (164, 165)。本章では、EPS 依存的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇と p38 MAPK 活性化の相互関係については明らかにできなかったものの、細胞内の Ca<sup>2+</sup>濃度上昇に伴って p38 MAPK が活性化することで CXCL10 が減少する可能性も考えられる。

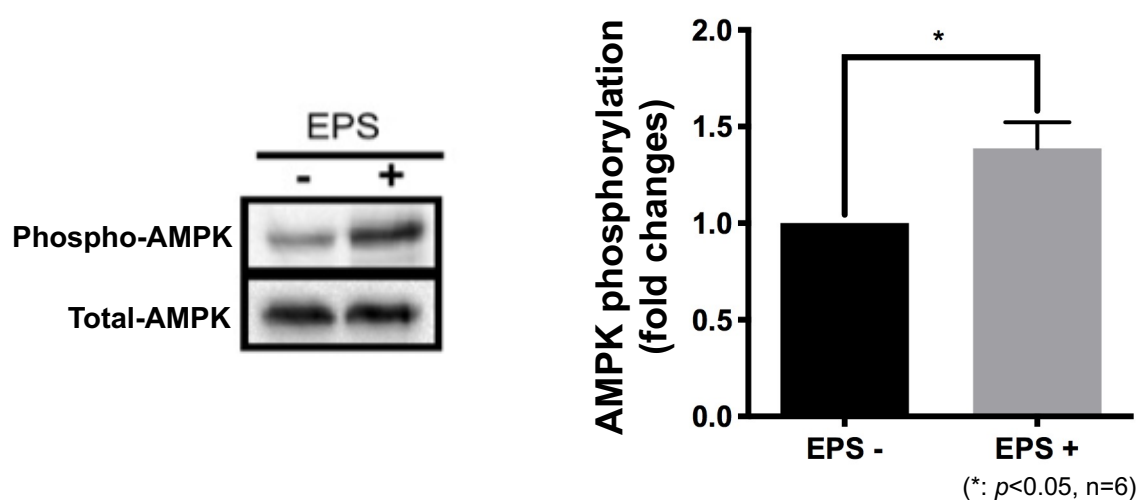
序論で述べたように、全身への運動効果波及のメディエーターとして運動制御性マイオカインが注目されている。今後、CXCL10 を含めた運動制御性マイオカインの産生制御メカニズムがさらに明らかとなれば、運動非依存的にマイオカインの発現分泌を制御することも可能となり、最終的には運動が不可能な人々に対しても、マイオカインを介した運動効果を付与することが可能となる技術基盤となることが期待される。

## 5. 図表



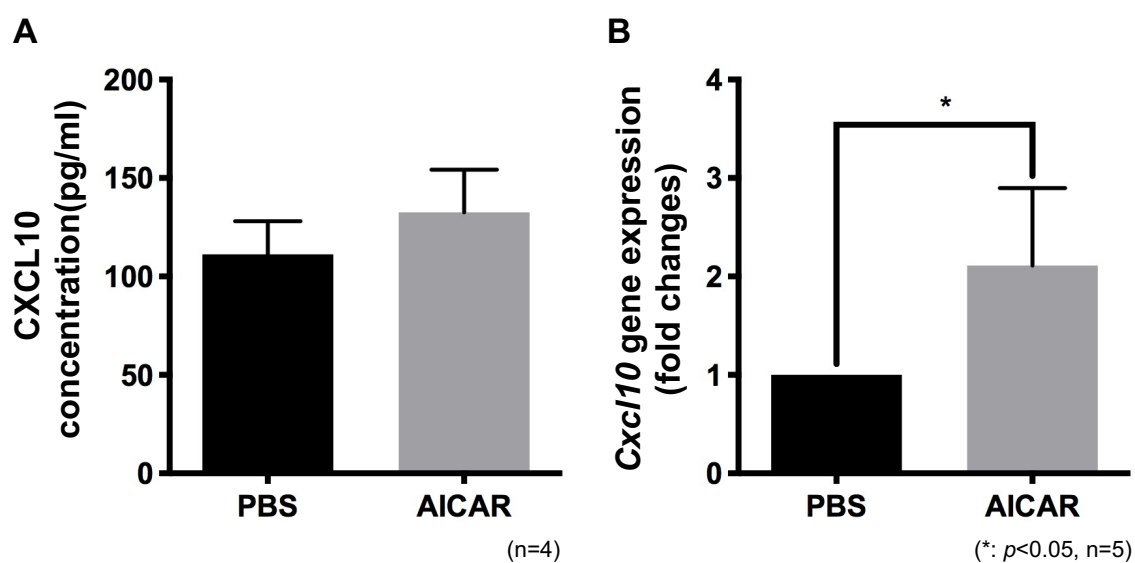
**Fig. 2-1 C2C12 筋管細胞における Verapamil による  $\text{Ca}^{2+}$ 流入阻害が CXCL10 分泌及び遺伝子発現変化に及ぼす影響**

分化した C2C12 筋管細胞を終濃度 100  $\mu\text{M}$  の Verapamil で処理し、24 時間の EPS 刺激 (1 Hz, 2 ms, 20 V) を負荷した。(A) 24 時間の EPS 刺激負荷の後、培養上清を回収し、ELISA によって CXCL10 分泌量を測定した。(B) 細胞より RNA を抽出し、qPCR を用いて *Cxcl10* 遺伝子発現量を解析した。*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化して解析を実施した。独立した実験を 5 回、または 4-6 回実施し、one-way ANOVA による統計解析を実施した (A: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (B: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4-6$ )。



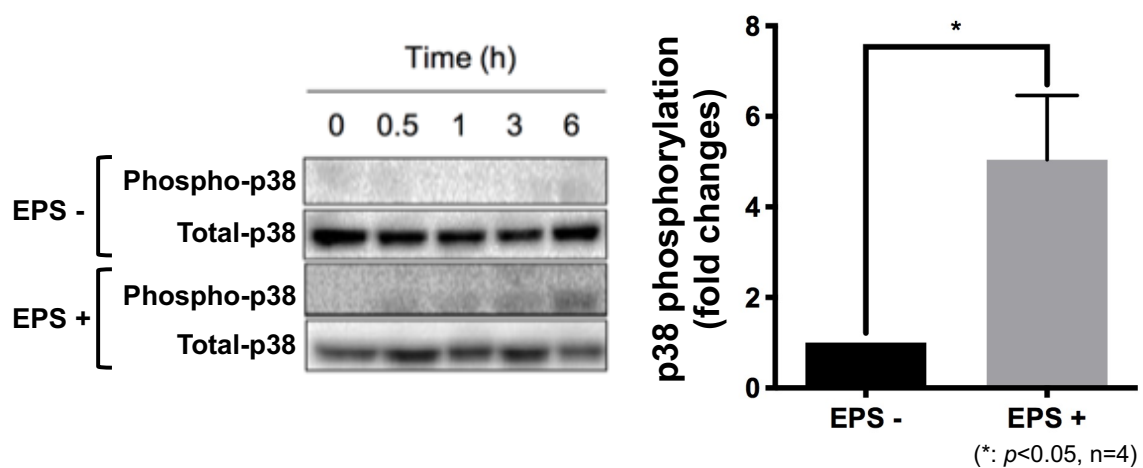
**Fig. 2-2 C2C12 筋管細胞への EPS 刺激による AMPK リン酸化量の変化**

分化した C2C12 筋管細胞に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷した。EPS 終了後に細胞を回収し、タンパク質を抽出して Western Blotting によって AMPK リン酸化量の変化を調べた。検出されたバンドは写真に示し、Image J により数値化してグラフを作成した。独立した実験を 6 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )。



**Fig. 2-3 C2C12 筋管細胞における AMPK 活性化による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

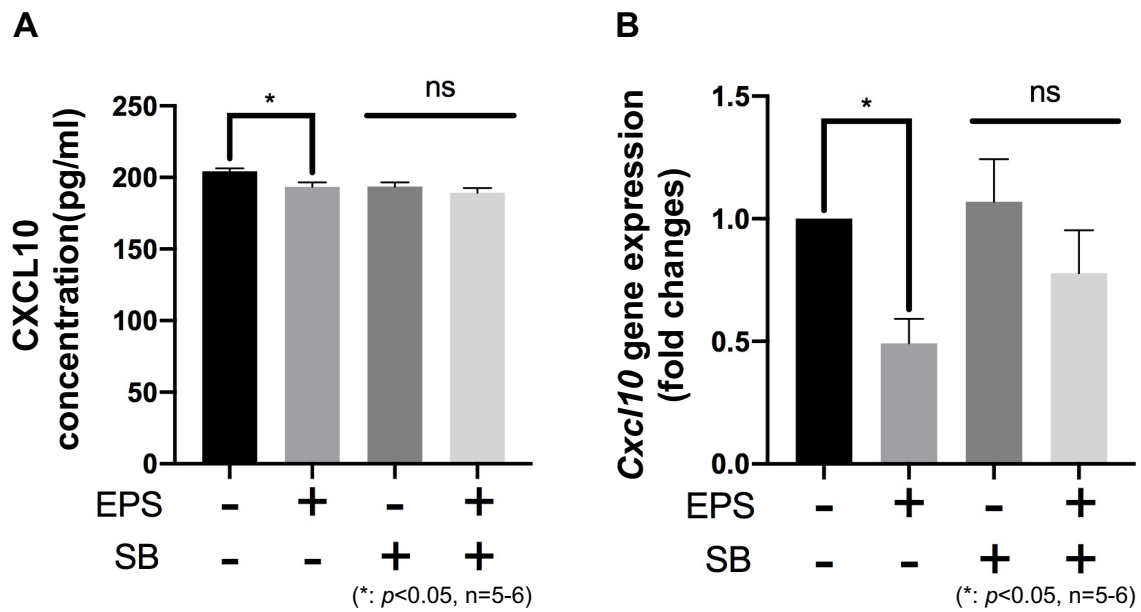
分化した C2C12 筋管細胞に AMPK の特異的な活性化剤である AICAR を終濃度 0.5 mM の条件で添加し、24 時間処理を行なった。(A) 処理終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて CXCL10 分泌変化を調べた。(B) 細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現を解析した。なお、*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 4 回もしくは 5 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (A: n=4) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=5)。



**Fig. 2-4 C2C12 筋管細胞への EPS 刺激による p38 リン酸化量の変化**

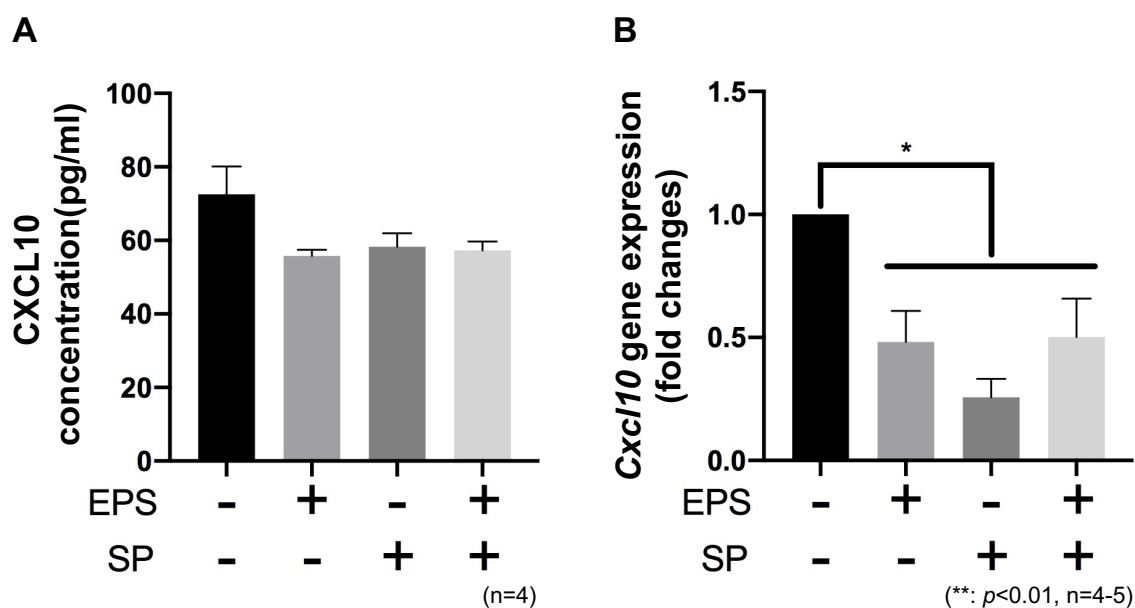
分化 C2C12 筋管細胞に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷した。EPS 終了後に細胞を回収し、タンパク質を抽出して Western Blotting により p38 リン酸化量の変化を解析した。検出されたバンドは写真に示し、Image J を用いて数値化してグラフを作成した。独立した実験を 4 回実施し、Student's t-test を用いて統計解析を行った (unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ )。





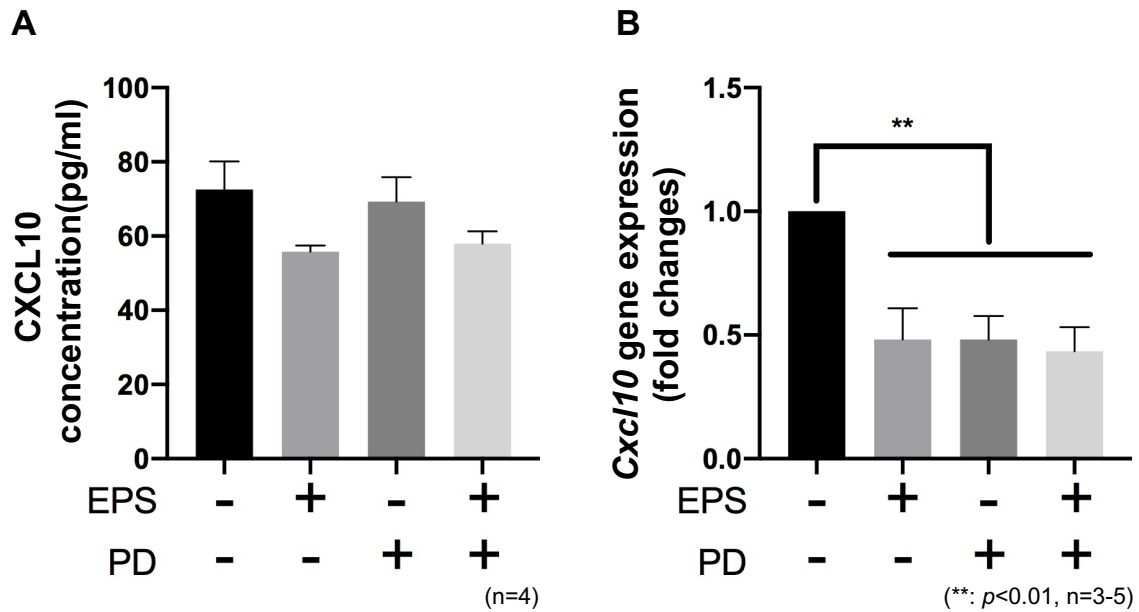
**Fig. 2-5 C2C12 筋管細胞における p38 阻害による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

分化 C2C12 筋管細胞に、終濃度 5  $\mu$ M の条件で p38 の特異的阻害剤である SB203580 を添加し、EPS 刺激 (1 Hz, 2 ms, 20 V) を 24 時間負荷した。(A) 処理終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて CXCL10 分泌量の変化を調べた。(B) 細胞から RNA を抽出し、qPCR によって *Cxcl10* 遺伝子発現変化を解析した。なお、*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 5-6 回実施し、one-way ANOVA を用いて統計解析を行った (A: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-6$ ) (B: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-6$ )。



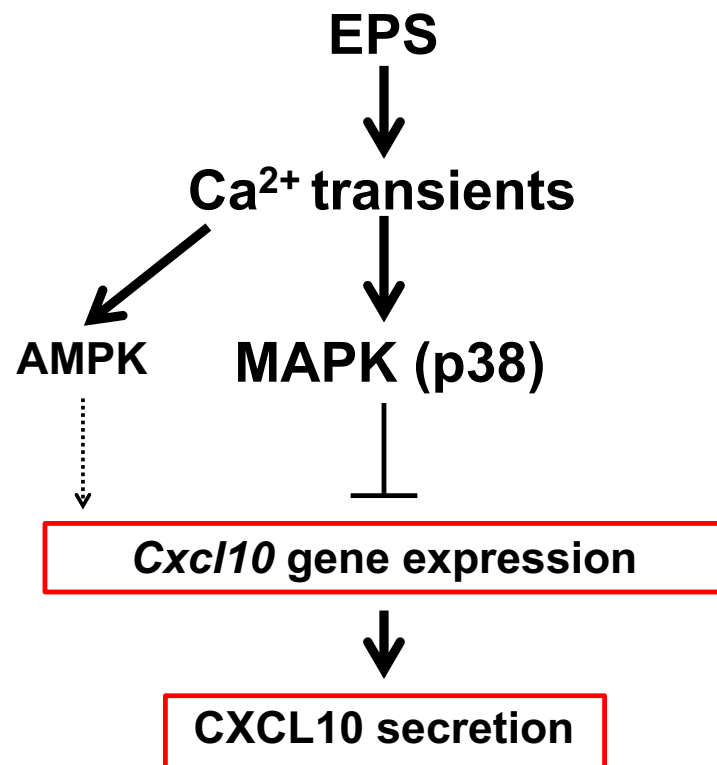
**Supplementary Fig. 2-1 C2C12 筋管細胞における MEK2 阻害による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

分化 C2C12 筋管細胞に、終濃度 20  $\mu$ M の条件で JNK の特異的阻害剤である SP600125 を添加し、EPS 刺激 (1 Hz, 2 ms, 20 V) を 24 時間負荷した。(A) 処理終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて CXCL10 分泌量の変化を調べた。(B) 細胞から RNA を抽出し、qPCR によって *Cxcl10* 遺伝子発現変化を解析した。なお、*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 4 回もしくは 4-5 回実施し、one-way ANOVA を用いて統計解析を行った (A: n=4) (B: one-way ANOVA, \*\*:  $p < 0.01$ , n=4-5)。



**Supplementary Fig. 2-2 C2C12 筋管細胞における MEK2 阻害による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

分化 C2C12 筋管細胞に、終濃度 50  $\mu$ M の条件で MEK2 の特異的阻害剤である PD98059 を添加し、EPS 刺激 (1 Hz, 2 ms, 20 V) を 24 時間負荷した。(A) 処理終了後に培養上清を回収し、ELISA を用いて CXCL10 分泌量の変化を調べた。(B) 細胞から RNA を抽出し、qPCR によって *Cxcl10* 遺伝子発現変化を解析した。なお、*Cxcl10* 遺伝子発現量は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 4 回もしくは 3-5 回実施し、one-way ANOVA を用いて統計解析を行った (A: n=4) (B: one-way ANOVA, \*\*:  $p < 0.01$ , n=3-5)。



**Fig. summary2-1** 第二章のまとめ

C2C12 筋管細胞において EPS 依存的な  $\text{Ca}^{2+}$  振動により p38 MAPK 及び AMPK が活性化し、同時に CXCL10 発現分泌が減少する。これらの関係を調べたところ、まず、EPS 依存的な p38 MAPK 活性化は CXCL10 発現分泌を減少させる重要な仕組みであることが分かった。一方、薬剤による AMPK 活性化は *Cxcl10* 遺伝子発現を上昇させるものの、EPS による AMPK 活性化は CXCL10 発現分泌に主要な影響を与えていないことが推測される。以上、EPS 依存的な CXCL10 発現分泌減少は、 $\text{Ca}^{2+}$  振動及び p38 MAPK の活性化により制御されていることが示された。

### 第三章

## 皮膚における運動依存的な CXCL10 減少の生理的意義の解明

# 1. 緒言

序論において述べた通り、運動は骨格筋のみならず脂肪組織や肝臓など多くの組織や器官に効果を及ぼす (37-40, 46-51)。その中で、運動依存的な皮膚機能の制御、すなわち運動依存的な創傷治癒促進、老化抑制などが注目を集めている (99, 106, 150)。最近、運動依存性マイオカインである Interleukin-15 (IL-15) が、皮膚の代謝や老化を制御していることが報告された (150)。この論文では、ヒト加齢に伴う真皮コラーゲン量の減少が運動依存的な IL-15 産生上昇により抑制されることを明らかにしている (150)。

コラーゲンは生体組織の構造維持を行う細胞外マトリクスの主要成分であり、I 型、II 型など約 30 種類に分類されるタンパク質ファミリーを形成している (166)。その中で I 型コラーゲンは、骨や腱、皮膚、靱帯、角膜など生体内の多くの組織における主要なコラーゲンであり、特に皮膚において発現しているコラーゲンのうち約 80% を占めている (166, 167)。I 型コラーゲンの合成から分解までの過程は以下のプロセスを介して起こる。まず、コラーゲンの mRNA がプレプロコラーゲンに翻訳され、粗面小胞体内腔に突出する (166)。その後、3-hydroxylase, 4-hydroxylase, lysyl hydroxylase によるプロリン、リジン残基のヒドロキシル化や鎖内のジスルフィド結合による C-プロペプチドの安定化により C 末端ドメインが整列し、3 重らせんが形成される。C 末端側の 3 重らせん形成により N 末端においても 3 重らせん形成が惹起され、プロコラーゲン鎖が形成される (166)。形成されたプロコラーゲン鎖は Peptidyl-prolyl *cis-trans*-isomerase や HSP47 によりフォールディングされ、プロコラーゲンとなることでゴルジ体の分泌小胞区画より細胞外へ分泌される (168, 169)。分泌されたプロコラーゲンは疎水性相互作用や静電相互作用、C-プロペプチドの切断により自己凝集することで線維構造を形成するなどのプロセッシングを受ける (170, 171)。さらに、Bone morphogenetic protein 1 (BMP-1) 及び Tolloid-like 1 (TLL-1) もプロセッシングに関与することが報告されている (172, 173)。このようなプロセスで成熟したコラーゲンは、創傷治癒や組織発達において Matrix metalloproteinases (MMPs) により分解される (174)。

本研究で新規に同定された運動抑制性マイオカイン CXCL10 の生理的意義については不明な点が多い。我々は以前、運動依存的なマイオカイン CXCL10 の分泌減少が、骨格筋近傍の血管新生を促進する可能性を示したが (175)、他の組織や器官における生理的意義については不明な点が多く残っている。他方、マウスやヒトにおいて創傷治癒のプロセスにおいて皮膚組織の CXCL10 発現が誘導され、CXCR3 を介して真皮線維芽細胞や内皮細胞の遊走を制御することや、創傷した皮膚への cyclic GMP-AMP 添加による創傷治癒の促進に CXCL10 が関与していることなど、CXCL10 が皮膚機能を制御する可能性が示されている (147, 176, 177)。

そこで本章では、運動依存的な CXCL10 減少が皮膚組織にどのような影響を与えるのか解明することとした。

## 2. 材料と方法

### 動物実験

#### 動物飼育

本研究における全ての実験は、第一章に示した通り東洋大学動物実験委員会の承認を受けた後に実施した。動物飼育に関しては、8 週齢の雄 C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan Inc.) を購入し、第一章と同様にして飼育した。

#### Treadmill による走行実験

Treadmill を用いた走行実験についても、第一章と同様にして実施した。走行終了後はイソフルランによる麻酔下で頸椎脱臼により安楽死させ、トリマー (Daito Electric Machine Industry Co., Ltd., Osaka, Japan) 及び除毛クリーム (Kracie Home Products Ltd., Tokyo, Japan) を用いて除毛した。その後、背側の皮膚組織を採取して皮下脂肪を除去し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### マウス由来皮膚線維芽細胞の単離

本研究における全ての実験は、上記と同様に東洋大学動物実験委員会の承認を受けた後に実施した。マウス由来皮膚線維芽細胞は 2 週齢マウスより単離した。マウスを頸椎脱臼によって安楽死させた後、上述と同様にして除毛し、皮膚組織を採取、皮下脂肪を除去した。次に、クリーンベンチ内で皮膚組織片を 3 mm 角にカットし、6 well plate に貼り付けた。15 分ほど乾燥させた後、Fibroblast growth medium (Minimum essential medium eagle (MEM) (Sigma Aldrich) + 10% Fetal bovine serum (Biowest) + 1% Non-essential amino acid (NEAA) (Nacalai tesque) + 1% Pyruvate (Nacalai tesque)) を加え、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の条件下で培養した。2~3 日毎に培地を交換し、10~12 日後、十分な真皮線維芽細胞の増殖を確認し、継代を実施した。継代は以下の手順に従って行った。まず、D-PBS (-) で 2 回洗浄し、TrypLE™ Express Enzyme (1×), phenol red (Thermo Fisher Scientific) を  $37^{\circ}\text{C}$  で 5 分間反応させ、細胞を剥離した。その後、Fibroblast growth medium を加えて十分にピペッティングを行い、15 ml tube に移して  $163 \times \text{g}$  の条件で 3 分間遠心した。遠心終了後に上清を除去し、細胞のペレットを 10 ml の Fibroblast growth medium で再懸濁した。その後、血球計算盤を用いて細胞数を計測し、 $75 \text{ cm}^2$  flask もしくは 35 mm dish (Corning) に  $2.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$  となるよう播種した。サンプルについては、細胞播種の 24 時間後に EPS を負荷した、または負荷していない C2C12 筋管細胞由来 Conditioned medium (それぞれ EPS-CM, Ctrl-CM), EPS-CM 及び recombinant CXCL10 (PeproTech, Cranbury, NJ, US) (終濃度 25 pg/ml) 共処理、もしくは CXCL10 の特異的アンタゴニスト NBI74330 (R&D Systems) (終濃度 10, 15, 30 ng/ml) で処理し、24 時間培養した。

## 遺伝子発現解析

### RNA 抽出、逆転写反応、Reverse transcriptional-qPCR (qPCR)

第一章及び第二章と同様の方法を用いた。なお、qPCR で用いたプライマーは Table. 3-1 に示した。

### アガロースゲル電気泳動

マウス皮膚線維芽細胞における各マイオカイン受容体の発現確認にはアガロースゲル電気泳動を用いた。泳動用バッファーとして Tris-Acetate EDTA Buffer (TAE) (Bio Rad)を用い、2% Agarose (Nacalaitesque) の条件で電気泳動を行った。なお、分子サイズマーカーは 20 bp ladder 及び 100 bp ladder (NIPPON Genetics Co., Ltd.) を用いた。泳動終了後のゲルは Gel Red で染色し、ゲル撮影装置 AE-6933FXCF (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)にて撮影した。

Table. 3-1 本章において使用した各種プライマーの配列

Gene	Sequence	
	Forward	Reverse
<i>Colla1</i>	5' - GCC AAG AAG ACA TCC CTG AAG - 3'	5' - TGT GGC AGA TAC AGA TCA AGC - 3'
<i>Ki67</i>	5' - CCT TTG CTG TCC CCG AAG A - 3'	5' - GCT TCT CAT CTG TTG CTT CCT - 3'
<i>Pena</i>	5' - CAC GTA TAT GCC GAG ACC TTA GC - 3'	5' - CTC CAC TTG CAG AAA ACT TCA CC - 3'
<i>Bak</i>	5' - ATA TTA ACC GGC GCT ACG AC - 3'	5' - AGG CGA TCT TGG TGA AGA GT - 3'
<i>Bad</i>	5' - GAG GAG GAG CTT AGC CCT TT - 3'	5' - AGG AAC CCT CAA ACT CAT CG - 3'
<i>Bcl-2</i>	5' - TTC GCA GCG ATG TCC AGT CAG CT - 3'	5' - TGA AGA GTT CTT CCA CCA CCG T - 3'
<i>Abcc1</i>	5' - CAG GGA AGG AGT CAA AGC CG - 3'	5' - GGG AAG ACG AGT TGC TGA GAT - 3'
<i>Bhvb</i>	5' - CCG ATG TGG ACA AGA CTG TG - 3'	5' - TCG GAC ATT ACT GTA GTG GGA CT - 3'
<i>Cyb5a</i>	5' - ACG ATC TGA CCA AGT TTC TCG - 3'	5' - TCC TCA AAA TTC TCG GTA GCA - 3'
<i>Nqo1</i>	5' - AGC GTT CGG TAT TAC GAT CC - 3'	5' - AGT ACA ATC AGG GCT CTT CTC G - 3'
<i>Pgd</i>	5' - AAA GAT CCG GGA CAG TGC T - 3'	5' - GAGCAAAGACAGCTTCTCCAA - 3'
<i>Srxn1</i>	5' - ACT ATT CCT TTG GGG GCT GC - 3'	5' - GCT TGG CAG GAA TGG TCT CT - 3'
<i>Ccr1</i>	5' - TCA AAG CCG TGC GTC TGA TA - 3'	5' - GGC AAT CAC CTC AGT CAC CT - 3'
<i>Ccr2</i>	5' - ACC TGT AAA TGC CAT GCA AGT - 3'	5' - TGT CTT CCA TTT CCT TTG ATT TG - 3'
<i>Ccr3</i>	5' - TAC CGG CCC TCA CAT ACC A - 3'	5' - CAC TTC AAT CCA GAG AGC ACC T - 3'
<i>Ccr5</i>	5' - AGA CAT CCG TTC CCC CTA CA - 3'	5' - GCA GGG TGC TGA CAT ACC AT - 3'
<i>Cxcr2</i>	5' - CAC CGA TGT CTA CCT GCT GA - 3'	5' - CAC AGG GTT GAG CCA AAA GT - 3'
<i>Cxcr3</i>	5' - GCA ACT GTG GTC GAG AAA GC - 3'	5' - GGC ATA GAG CAG CGG ATT GA - 3'

## コラーゲン分泌解析

培養上清中の分泌コラーゲンの測定は、Sirius Red (Chondrex, Inc., Redmond, WA, USA)を用いてキット付属のプロトコルに従って実施した。培養上清 1 ml あたり 250  $\mu$ l の Concentrating Solution を添加し、混合した後、4°Cで 12 時間反応させた。その後、10,000  $\times$  g で 3 分間遠心し、上清を除去して 100  $\mu$ l の 0.05 M 酢酸で再懸濁することで 10 倍に濃縮し、これをサンプルとして用いた。



## 統計解析

第一章及び第二章と同様に GraphPad Prism8 を用いて実施した。2 群間の比較には unpaired student's t-test を、3 群以上の比較には one-way ANOVA をそれぞれ使用した。また、危険率が 5% 未満の場合に統計的な有意差を認めた。

### 3. 結果

#### Treadmill による強制走行負荷により、皮膚における *Colla1* 遺伝子発現が上昇する

まず、既に報告されている運動依存的な皮膚組織におけるコラーゲン量の増加 (99)、皮膚細胞の増殖促進や細胞死抑制 (178, 179)を確認することとした。第一章と同様の条件でマウスに Treadmill による強制走行を負荷した後、安楽死させたマウスより背側の皮膚組織を採取した。その後、皮膚組織から RNA を抽出し、コラーゲン遺伝子 (*Colla1*)、増殖マーカー遺伝子 (*Ki67*, *Pcna*)、細胞死マーカー遺伝子 (*Bak*, *Bad*, *Bcl-2*)の発現を qPCR により解析した。その結果、増殖マーカー遺伝子、細胞死マーカー遺伝子の発現に顕著な変化は見られなかったものの、*Colla1* 遺伝子発現は Running 群において約 3.6 倍に上昇することが明らかとなった (\*:  $p<0.05$ ,  $n=3-6$ ) (Fig. 3-1)。

#### 真皮線維芽細胞への EPS-CM の添加により、コラーゲン分泌及び遺伝子発現が促進される

上記マウス走行モデルにおける皮膚 *Colla1* 遺伝子発現が有意に上昇していたことから、皮膚における主要なコラーゲン産生細胞である真皮線維芽細胞に注目して、筋収縮依存的なマイオカイン分泌変化がコラーゲン分泌及び遺伝子発現に与える影響を検討した。線維芽細胞は全身の結合組織に存在するものの、どの組織に由来するかによってその性質は大きく異なる。例えば、骨髄由来の線維芽細胞では骨髄性の細胞として増殖し続けることができるものの、皮膚線維芽細胞では創傷治癒時には *Actin* 遺伝子発現が上昇し、Myofibroblast に変化していくなど、性質が変化していく (180)。さらに、皮膚線維芽細胞は、肺線維芽細胞と比較して細胞増殖が遅いことや寿命が短いことなども知られている (181, 182)。そのため、本研究においてはマウス皮膚由来の初代培養真皮線維芽細胞を用いた。まず、2 週齢マウス真皮組織由来の初代培養線維芽細胞、及び対照群 (マウス海馬由来神経細胞 HT22、マウス骨格筋細胞 C2C12)よりそれぞれ RNA を抽出し、qPCR を用いて *Colla1* 遺伝子発現を解析した。その結果、真皮線維芽細胞における *Colla1* 遺伝子発現は、HT22 細胞、C2C12 細胞の発現と比較して、それぞれ約 17 倍、28 倍と高値を示したことから、単離した細胞が真皮線維芽細胞であることが確認された (\*:  $p<0.05$ ,  $n=3$ ) (Fig. 3-2)。

次に、EPS 依存的な C2C12 筋管細胞由来マイオカインの分泌変化が、真皮線維芽細胞のコラーゲン発現に影響を及ぼしうるか検討を行った。EPS を負荷したあるいは負荷していない C2C12 筋管細胞より回収した Conditioned medium (それぞれ EPS-CM と Ctrl-CM)を単離した真皮線維芽細胞に添加して、24 時間培養を行った。その後、真皮線維芽細胞の培養上清に含まれるコラーゲン濃度を測定したところ、Ctrl-CM 添加時の培養上清中のコラーゲン濃度  $9.6 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$  に対して EPS-CM 添加群では  $16.4 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$  まで上昇した (\*\*:  $p<0.01$ ,  $n=10$ ) (Fig. 3-3)。この結果より、EPS

負荷による C2C12 筋管細胞由来マイオカインの分泌変化は、真皮線維芽細胞のコラーゲン分泌を上昇させることが示された。

### 真皮線維芽細胞への EPS-CM 添加によるコラーゲン分泌の促進は CXCL10-CXCR3 系を介している

次に、EPS-CM 依存的なコラーゲン発現分泌上昇における CXCL10 の関与について調べることにした。まず、真皮線維芽細胞における既知マイオカイン受容体遺伝子の発現を PCR により確認したところ、CXCL10 受容体 CXCR3、CCL5 受容体 CCR1、CXCL1 及び CXCL5 受容体 CXCR2 の遺伝子発現が確認された (Fig. 3-4)。そこで、CXCL10 受容体 CXCR3 が EPS-CM 依存的なコラーゲン分泌に関与しているか検討を行った。真皮線維芽細胞を C2C12 筋管細胞由来 Ctrl-CM で刺激する際に CXCR3 のアンタゴニスト NBI74330 を添加した際のコラーゲン分泌量を解析した結果、Ctrl-CM のみを添加した際の培養上清中コラーゲン濃度は  $10.1 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$  であったのに対して、NBI74330 濃度依存的にコラーゲン分泌は上昇し、30 ng/ml の NBI74330 を添加した際には  $17.6 \pm 2.8 \mu\text{g/ml}$  まで上昇していることが示された (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 3-5A)。すなわち、真皮線維芽細胞のコラーゲン分泌について、CXCR3 シグナル活性化は負に作用することが示唆された。

さらに、真皮線維芽細胞に Ctrl-CM 及び EPS-CM を添加する際、EPS により減少した CXCL10 (25 pg/ml)を補償的に添加し、分泌されるコラーゲン濃度を測定した。その結果、Ctrl-CM 添加群と比較して、EPS-CM 添加群では培養液中のコラーゲン濃度が約  $9.6 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$  から  $16.4 \pm 1.5 \mu\text{g/ml}$  に上昇したが、EPS-CM に rCXCL10 を添加し、CXCL10 濃度のみを Ctrl-CM と同濃度にした群では、培養液中のコラーゲン濃度は約  $13.1 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$  となった。すなわち、rCXCL10 単独添加による有意なコラーゲン分泌変化は見られないものの、rCXCL10 を添加することで EPS-CM によるコラーゲン分泌上昇効果が観察されなくなった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ ) (Fig. 3-5B)。さらに、I 型コラーゲンのプロセッシングに関与する BMP-1 及び TLL-1、分解に関与する MMP-13 及び MMP-14 (183, 184)についても EPS-CM 添加による発現変化を調べたところ、EPS-CM を添加することで *Tll-1* 遺伝子発現は上昇し、*Mmp-14* 遺伝子発現は減少していた (Supplementary Fig. 3-1)。

以上の結果をまとめると、EPS-CM 中の CXCL10 が減少し、真皮線維芽細胞の CXCL10-CXCR3 シグナルが減弱することが EPS-CM 依存的コラーゲン分泌上昇の原因の 1 つであることが明らかとなった。さらに、CXCL10-CXCR3 の関与は不明であるものの、EPS-CM に含まれる成分がコラーゲンのプロセッシング促進及び分解抑制を制御する可能性が示された。

### 真皮線維芽細胞への EPS-CM 添加は酸化ストレス関連遺伝子の発現を変化させる

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解析することを目的に、Ctrl-CM と比較して EPS-CM 依存的に発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。真皮

線維芽細胞に Ctrl-CM 及び EPS-CM を添加して 24 時間培養した後に total RNA を精製し、次世代型発現解析マイクロアレイ Clariom™ S Assay, Mouse による解析を行った。さらに、マイクロアレイ解析で得られたデータを Gene ontology 解析に供し、どのような機能を持った遺伝子群の発現が変化しているかを解析した。その結果、特に酸化ストレスに関連する遺伝子群 (oxidation-reduction process, response to oxidative stress) の発現が EPS-CM 刺激に応答して上昇していることが明らかになった (Fig. 3-6)。また、アポトーシスや細胞遊走に関する遺伝子群 (negative regulation of apoptotic process, positive regulation of cell migration) の発現は EPS-CM 添加により上昇し、炎症に関する遺伝子群 (inflammatory response) の発現は減少している傾向も見られた (Fig. 3-6)。特に EPS-CM によって多くの酸化ストレス関連遺伝子群の発現調節が生じることが明らかとなったため、これらについて詳細な検討を実施した (Fig. 3-6)。その結果、*Abcc1*, *Blvrb*, *Cyb5a*, *Nqo1*, *Pgd*, *Srxn1* の 6 つの遺伝子発現が EPS-CM の添加によってそれぞれ  $1.7 \pm 0.5$  倍、 $1.9 \pm 1.1$  倍、 $1.5 \pm 0.3$  倍、 $1.7 \pm 0.4$  倍、 $1.5 \pm 0.3$  倍、 $2.2 \pm 0.8$  倍に上昇していることが明らかになった。これら 6 つの遺伝子について qPCR による確認を行った結果、*Abcc1*, *Cyb5a*, *Nqo1* については有意な変化は見られなかったものの ( $n=5-6$ ) (Fig. 3-7A, C, D)、*Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* については EPS-CM の添加によってそれぞれ約 1.4, 1.7, 1.5 倍に遺伝子発現が上昇した (\*:  $p<0.05$ ,  $n=3-6$ ) (Fig. 3-7B, E, F)。

以上の結果より、真皮線維芽細胞への EPS-CM の添加はコラーゲン分泌を上昇させるだけでなく、酸化ストレス関連遺伝子の発現を上昇させることが明らかになった。

### 真皮線維芽細胞における EPS-CM 依存的な酸化ストレス関連遺伝子発現の変化の一部は CXCR3 及び CXCL10 を介している

上記の実験において、真皮線維芽細胞への EPS-CM 添加により発現が上昇することが明らかになった 3 つの遺伝子について、CXCR3 の関与を解析した。上述と同様に、真皮線維芽細胞を C2C12 筋管細胞由来 Ctrl-CM で刺激する際に CXCR3 のアンタゴニスト NBI74330 を添加し、24 時間培養した。その後、qPCR によって各遺伝子の発現を解析した。その結果、30 ng/ml の NBI74330 を添加することで *Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* の発現はそれぞれ 1.5 倍、1.2 倍、1.8 倍となった (\*:  $p<0.05$ ,  $n=3$ ) (Fig. 3-8A-C)。このことから、EPS-CM 添加による *Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* 遺伝子発現上昇にも CXCR3 が関与している可能性が示唆された。

さらに、*Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* の 3 遺伝子について、EPS 依存的な CXCL10 減少が関与しているかを検討した。真皮線維芽細胞を Ctrl-CM 及び EPS-CM、さらに EPS により減少した CXCL10 (25 pg/ml) を recombinant CXCL10 (rCXCL10) により補償的に添加した EPS-CM で処理し、24 時間後の各遺伝子発現の変化を解析した。その結果、*Blvrb*, *Pgd* については EPS-CM に rCXCL10 を補償的に添加しても、EPS-CM のみを添加した群と比較して、各遺伝子発現に顕著な変化は見られなかった (\*\*:  $p<0.01$ ,  $n=7$ ) (Fig. 3-9A, B)。一方、*Srxn1* については、EPS-CM を添加することで遺伝子発現が約

1.8 倍に増加するものの、EPS-CM への補償的な rCXCL10 を添加によって Ctrl-CM との間に有意な差は観察されなくなることが分かった (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ ) (Fig. 3-9C)。さらに、抗酸化酵素の遺伝子発現についても EPS-CM 添加による発現変化を調べたところ、Glutathione S-reductase (GSR) の遺伝子発現が EPS-CM 添加によって有意に発現上昇していた (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 3-10C)。以上の結果より、EPS-CM 添加による *Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* 遺伝子発現上昇のうち、特に *Srxn1* については CXCR3 に加えて、EPS 依存的な CXCL10 減少も関与していることが示された。さらに、EPS-CM は一部の抗酸化酵素遺伝子発現も亢進することが明らかとなった。

## 4. 考察

### CXCL10-CXCR3 シグナルを介した EPS-CM 依存的なコラーゲン発現分泌制御

本章の研究によって、真皮線維芽細胞における EPS-CM 依存的なコラーゲン分泌上昇は CXCL10-CXCR3 経路を介している可能性が示唆された。すなわち、EPS-CM 中の CXCL10 量が減少したため、EPS-CM 処理群では Ctrl-CM 処理群と比較して CXCL10-CXCR3 系のシグナルが減弱、その結果、コラーゲン分泌が上昇したと考えられる。コラーゲン産生を制御しているシグナル分子として Extracellular signaling regulated kinase (ERK1/2) が知られている。例えば、ヒトの真皮線維芽細胞において、Lipo-prostaglandin E1 (Lipo-PGE1) の刺激によりコラーゲン産生が減少することが示されているが、これは Lipo-PGE1 が ERK1/2 活性化を誘導し、それによって下流の転写因子である Ets-1 を活性化することによるものである (185)。さらに、ヒト真皮線維芽細胞における IL-18 依存的なコラーゲン産生抑制作用にも ERK 及び Ets-1 が関与していることが示されている (186)。これまでに CXCL10-CXCR3 シグナルにより ERK 経路が活性化されるという報告は多数なされている。例えば、神経芽細胞腫の細胞株である NUB 6 や SK-NMC において CXCL10 が CXCR3 と相互作用することで ERK のリン酸化を上昇させることや (187)、CXCR3 のスプライシングバリエントである CXCR3-A を発現させた Human embryonic kidney 293 (HEK293) 細胞において、CXCL10 が ERK リン酸化を誘導することも報告されている (188)。以上を併せると、EPS-CM 処理群においては CXCL10-CXCR3 系シグナルが減弱、ERK の活性化が抑制され、コラーゲン分泌が上昇した可能性が考えられる。真皮においては、コラーゲン産生が加齢とともに減少することで皮膚の弾力が低下することが報告されている (189)。さらに、真皮において紫外線照射によりコラーゲン発現が減少する一方でアスコルビン酸の添加により増加することなど、複数の要因によってコラーゲン産生が制御されていることが知られている (190,191)。そのため、真皮におけるコラーゲン産生制御の理解には本研究で明らかになった CXCL10-CXCR3 シグナルを介したコラーゲン分泌上昇メカニズムの詳細を含め、細胞内シグナルを解明していくことが重要である。

### EPS-CM 添加による酸化ストレス関連遺伝子の発現制御

本章の研究によって、真皮線維芽細胞に EPS-CM を添加した際に、主に酸化ストレスに関連する遺伝子群の発現が上昇していることが示された。酸化ストレスは酸化物質 (活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) を含む) の生成と抗酸化物質のバランスが崩れることで発生し (192)、ヒト皮膚老化や真皮へ負の影響を与える。例えば、酸化ストレスの増大により DNA ダメージや炎症反応、抗酸化物質や MMPs の産生減少、コラーゲンやエラスチンの分解などが上昇することが報告されている (193-195)。

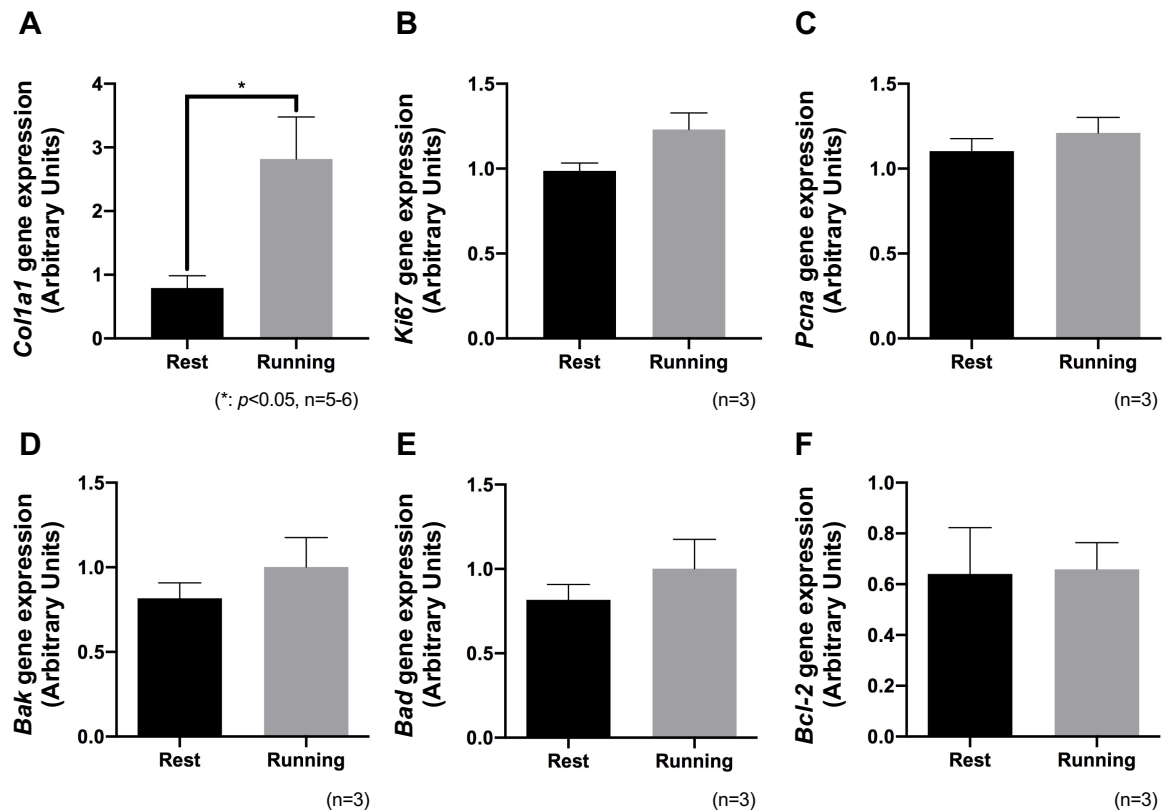
本章においては、EPS-CM 添加によって、酸化ストレス関連遺伝子群のうち、*Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* の

3 つの遺伝子について有意な変化が観察された。*Blvrb* 遺伝子は Biliverdin reductase B (BLVRB) をコードする遺伝子であり、BLVRB は NADPH 依存的に複数の基質の酸化還元に関与し、細胞の酸化還元を制御している (196, 197)。*Pgd* 遺伝子は Pentose phosphate pathway (PPP)-phosphogluconate dehydrogenase (PGD) をコードする遺伝子であり、ROS の除去に重要な役割を果たしている (198)。*Srxn1* 遺伝子は Sulfiredoxin-1 (Srxn1) をコードしており、抗酸化酵素である Peroxiredoxin の反応を触媒し、抗酸化機能に重要な役割を果たしている (199)。また、アストロサイトではあるが、Srxn1 が Nrf2/ARE 経路を制御することで抗酸化能を上昇させることも知られている (198-200)。また、EPS-CM 依存的な *Srxn1* 遺伝子発現上昇は CXCL10-CXCR3 系シグナルにより制御されていた。一方、*Blvrb* 及び *Pgd* については CXCR3 アンタゴニストを添加した群においてのみ遺伝子発現が上昇していた。CXCR3 はリガンドとして CXCL10 の他に C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9) や C-X-C motif chemokine ligand 11 (CXCL11) を持つことが知られている (201, 202)。本論文第一章で実施した Cytokine array 解析において、CXCL9 及び CXCL11 のシグナルは極めて低かったため詳細な検討は実施しなかったが、同解析がスポットされている抗体力価に依存する半定量的方法であることを踏まえ、今後、これら CXCL9 及び CXCL11 が関与している可能性を検討していく必要があると考えられる。また、C-X-C motif chemokine ligand 4 (CXCL4) も CXCR3 のリガンドであることが報告されているが (201, 202)、本研究で用いた Cytokine array には含まれていないため、EPS による分泌変化は明らかになっていない。今後、これらの CXCR3 リガンドとなりうるケモカイン群が筋収縮によってどのような制御を受けるかを明らかにし、EPS-CM 依存的な *Blvrb*, *Pgd* 遺伝子発現上昇に関与しているかを検討していくことが求められる。

さらに、EPS-CM 添加によって一部の抗酸化酵素の遺伝子発現が有意に発現上昇していたことから、今後、EPS-CM 添加が皮膚線維芽細胞内の ROS 産生に影響を与えるか調べる必要はあるものの、運動による CXCL10 分泌減少は皮膚において *Srxn1* をはじめとする酸化還元酵素や一部の抗酸化酵素発現を上昇させることで酸化ストレスを抑制し、老化を抑制している可能性が考えられる。

また、ヒト皮膚における酸化ストレスの増大は、皮膚におけるコラーゲン産生を抑制することも報告されている (203)。すなわち、本研究において見られた EPS-CM 依存的なコラーゲン産生上昇についても、EPS-CM 添加による酸化ストレス抑制が原因となっている可能性が考えられる。今後、EPS-CM や rCXCL10 が、皮膚線維芽細胞内 ROS 産生にどのような影響を与えるか解明していく必要がある。最後に、本章のまとめを Fig. summary3-1 に示した。

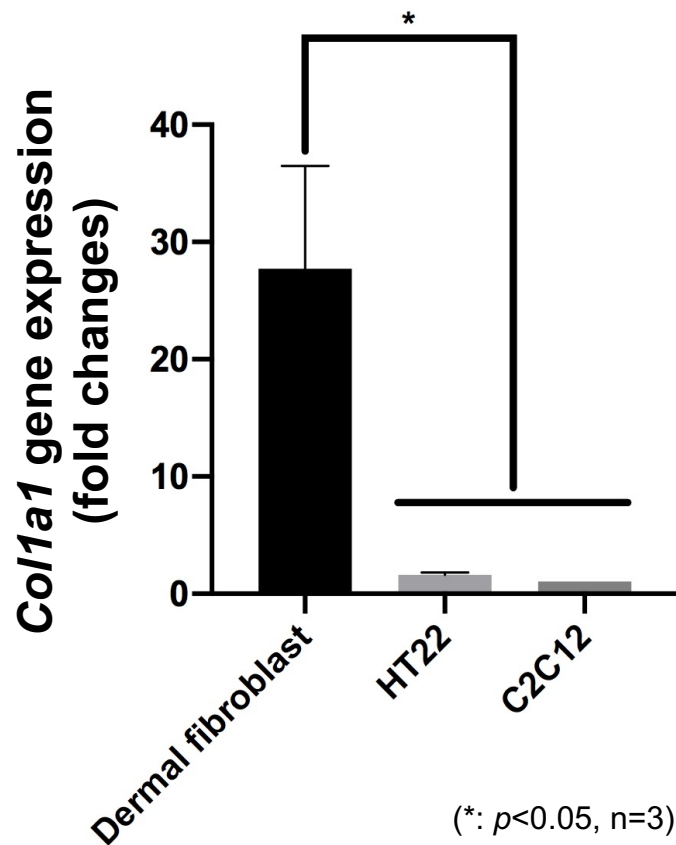
## 5. 図表



**Fig. 3-1 Treadmill 負荷による Whole skin における各遺伝子発現の変化**

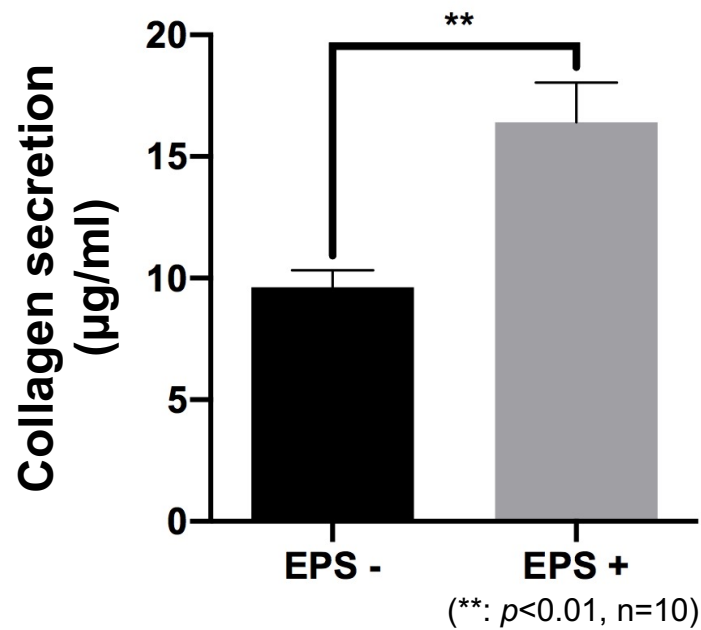
9 週齢の C57BL/6J 雄マウス 6-11 匹を Rest 及び Running の 2 群に分けた。Running 群には Treadmill による強制走行 (15 cm/s, 30 min, 8% slope) を負荷した。走行終了後 Whole skin を採取し、RNA を抽出して (A) *Col1a1*、増殖関連遺伝子である (B) *Ki67*、(C) *PCNA*、細胞死関連遺伝子である (D) *Bak*、(E) *Bad*、(F) *Bcl-2* の発現を qPCR により解析した。各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。両群ともに 5-6 匹もしくは 3 匹のマウスのサンプルを解析し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-6$ ) (B-F:  $n = 3$ )。





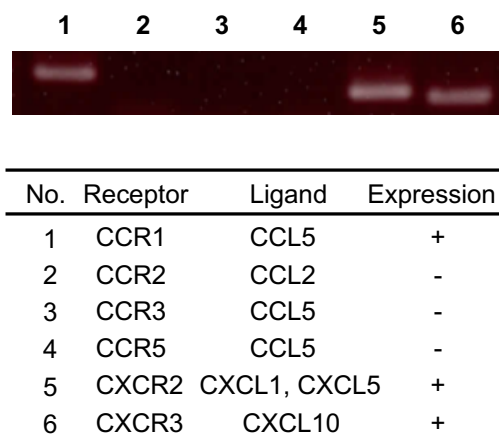
**Fig. 3-2** 各細胞における *Col1a1* 遺伝子発現の比較

2 週齢の C57BL/6J マウスの背側皮膚より採取した組織片を約 3 mm 角にカットし、6 well plate に貼り付けた。15 分ほど乾燥させたのち、培地を加えて 2 週間ほど培養し、線維芽細胞が細胞を増殖させて単離した。また、マウス由来神経細胞である HT22 細胞とマウス由来骨格筋細胞である C2C12 細胞も回収し、各細胞より RNA を抽出した。*Col1a1* 遺伝子発現量は qPCR により解析した。*Col1a1* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3 回繰り返し、one-way ANOVA によって統計解析を行った (one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )。



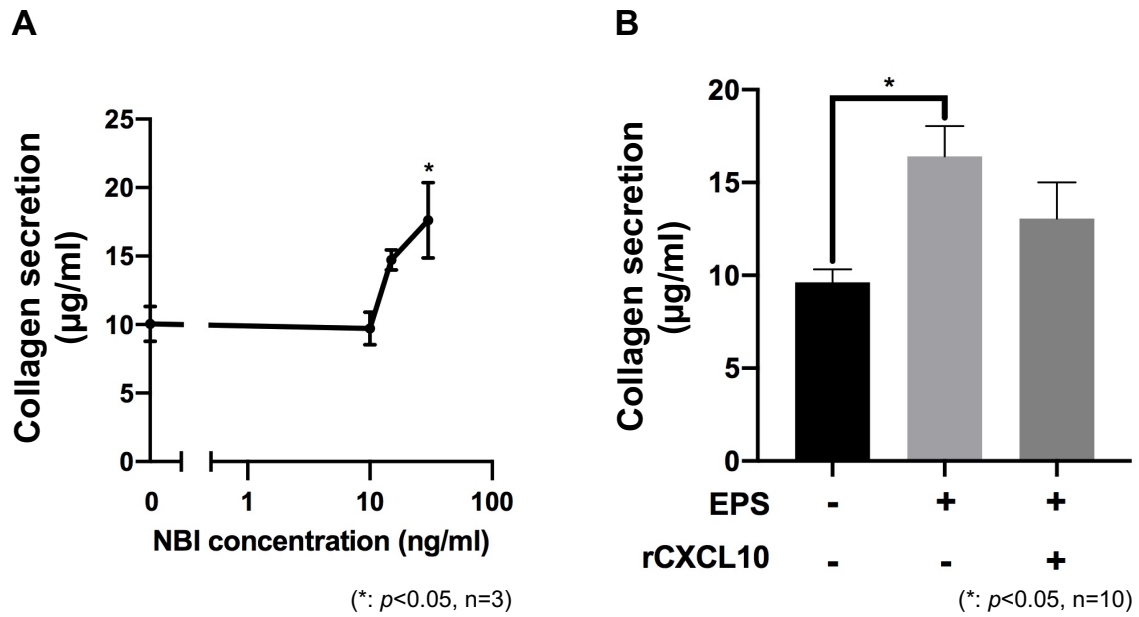
**Fig. 3-3** 皮膚線維芽細胞における C2C12-CM 添加によるコラーゲン分泌及び *Colla1* 遺伝子発現の変化

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清 (C2C12-CM) を添加し、24 時間培養した。処理が終了した皮膚線維芽細胞の培養上清を回収し、Sirius Red Collagen Detection Kit を用いてコラーゲン分泌量を解析した。独立した実験を 10 回繰り返し、Student's t-test によって統計解析を行った (unpaired Student's t-test, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 10$ )。



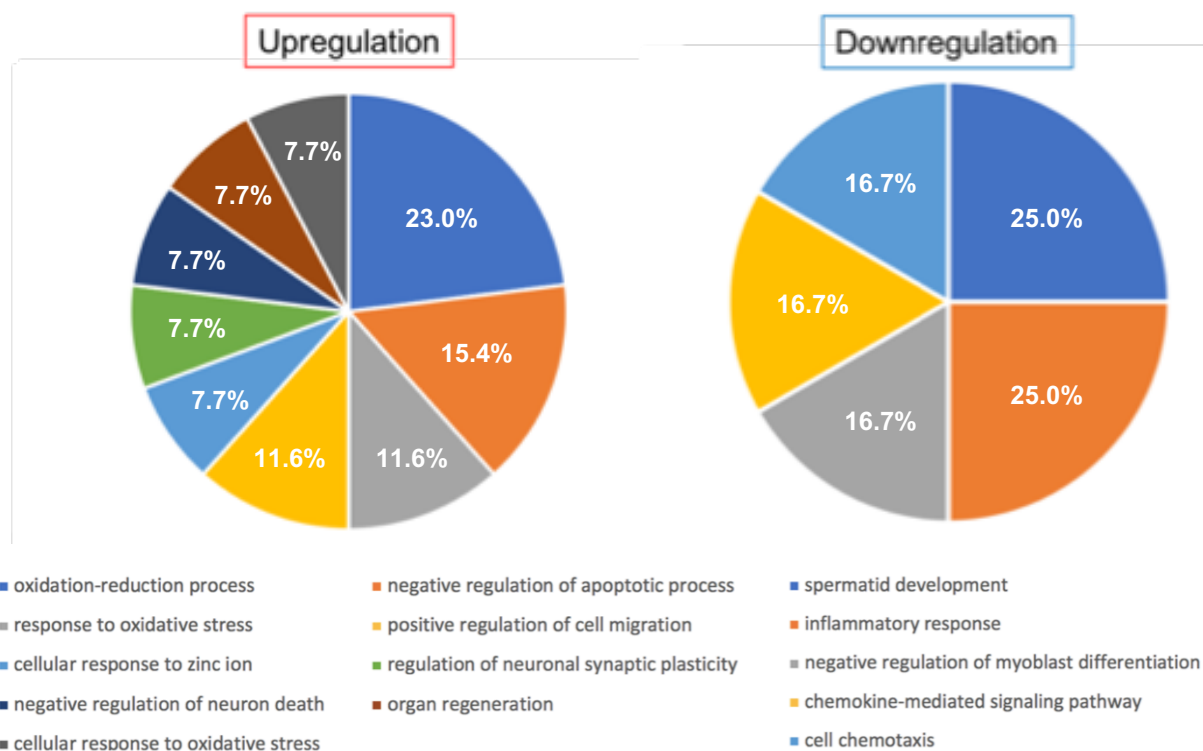
**Fig. 3-4 皮膚線維芽細胞における各種運動依存性マイオカインの受容体発現**

マウスより単離した皮膚線維芽細胞を回収し、RNA を抽出した後、PCR により各受容体の遺伝子を増幅した。その後、PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動によって泳動し、各種受容体の発現を確認した。



**Fig. 3-5 皮膚線維芽細胞における CXCR3 阻害及び rCXCL10 添加によるコラーゲン分泌量の変化**

(A) マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷していない C2C12 筋管細胞由来培養上清及び各濃度の CXCR3 アンタゴニストを添加し、24 時間培養した。(B) マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清と終濃度 25 pg/ml の recombinant CXCL10 を添加し、24 時間培養した。(A, B) 培養終了後の皮膚線維芽細胞より培養上清を回収し、Sirius Red Collagen Detection Kit を用いてコラーゲン分泌量を解析した。独立した実験を 3 回もしくは 10 回繰り返し、one-way ANOVA によって統計解析を行った (A: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ) (B: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 10$ )。



**Fig. 3-6 皮膚線維芽細胞における C2C12 筋管由来培養上清添加による各遺伝子群の発現変化**

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいは負荷していない C2C12 筋管細胞由来の培養上清を添加し、24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収して RNA を抽出し、Clariom™ S Assay, Mouse によって各遺伝子発現の変化を解析した。その後、EPS-CM の添加により発現が 1.5 倍以上、もしくは 0.5 倍以下となった遺伝子について Gene Ontology analysis を実施し、グラフを作成した。独立した実験は 3 回実施した。

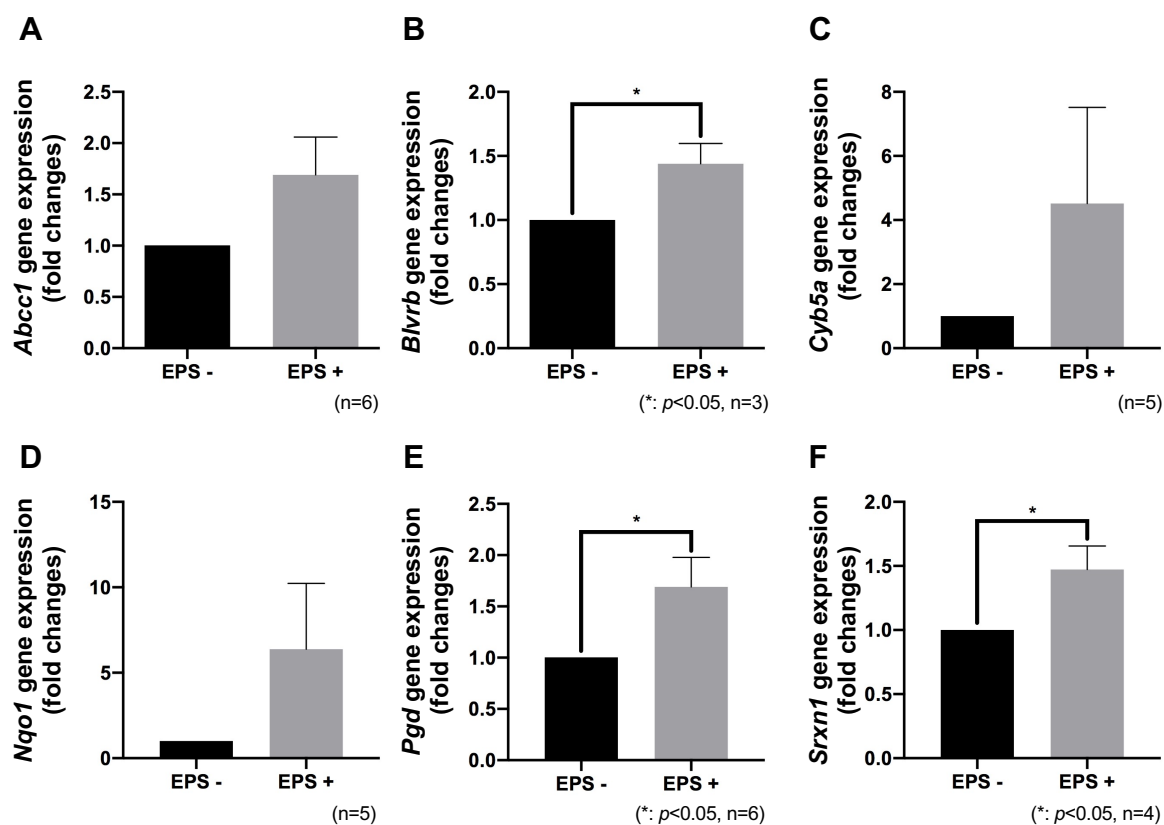
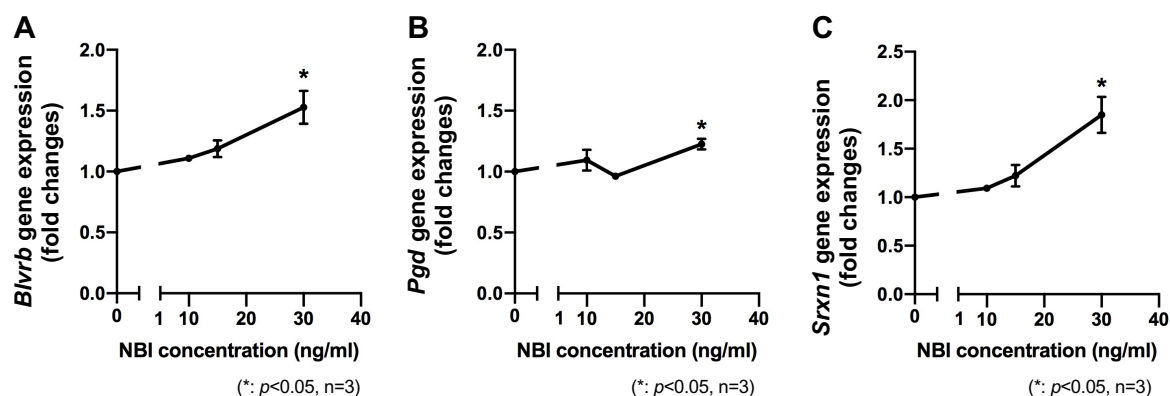


Fig. 3-7 皮膚線維芽細胞における C2C12 筋管由来培養上清添加による

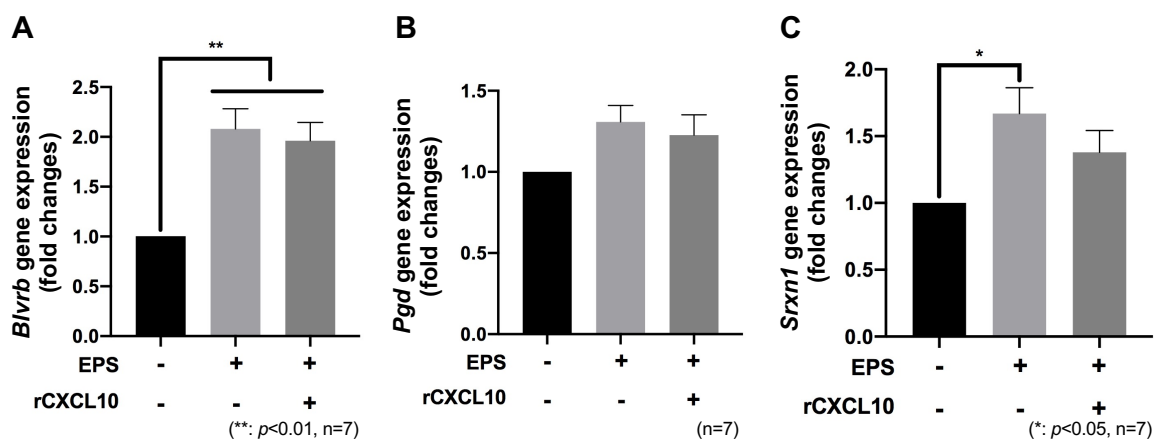
#### 酸化関連遺伝子の発現変化

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清を添加し、24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR により (A) *Abcc1*、(B) *Blrb*、(C) *Cyb5a*、(D) *Nqo1*、(E) *Pgd*、(F) *Srxn1* の遺伝子発現変化を解析した。各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3-6 回繰り返し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: n=6) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=3) (C: n=5) (D: n=5) (E: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=6) (F: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=4)。



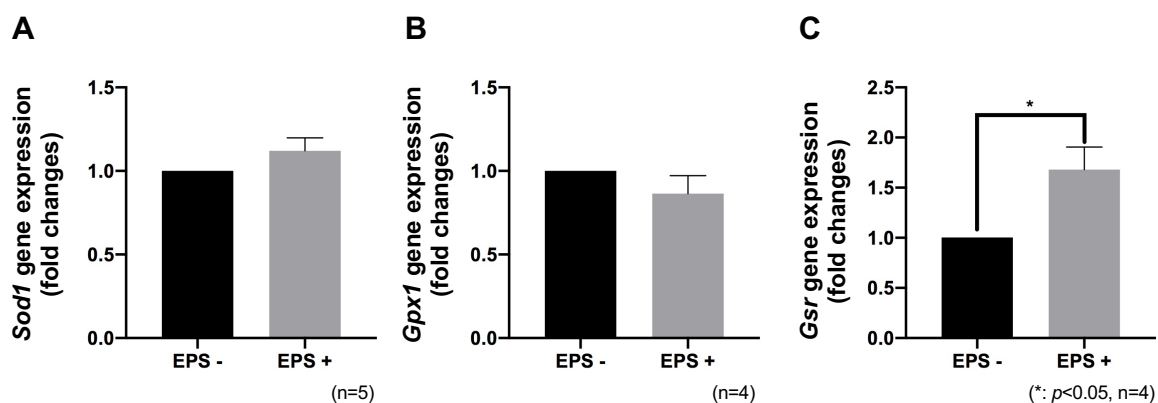
**Fig. 3-8 皮膚線維芽細胞における CXCR3 阻害による酸化関連遺伝子の発現変化**

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷していない C2C12 筋管細胞由来培養上清及び各濃度の CXCR3 アンタゴニストを添加し、24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR により (A) *Blvrb*, (B) *Pgd*, (C) *Srxn1* の遺伝子発現変化を解析した。各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3 回繰り返し、Student's t-test によって統計解析を行った (A-C: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )。



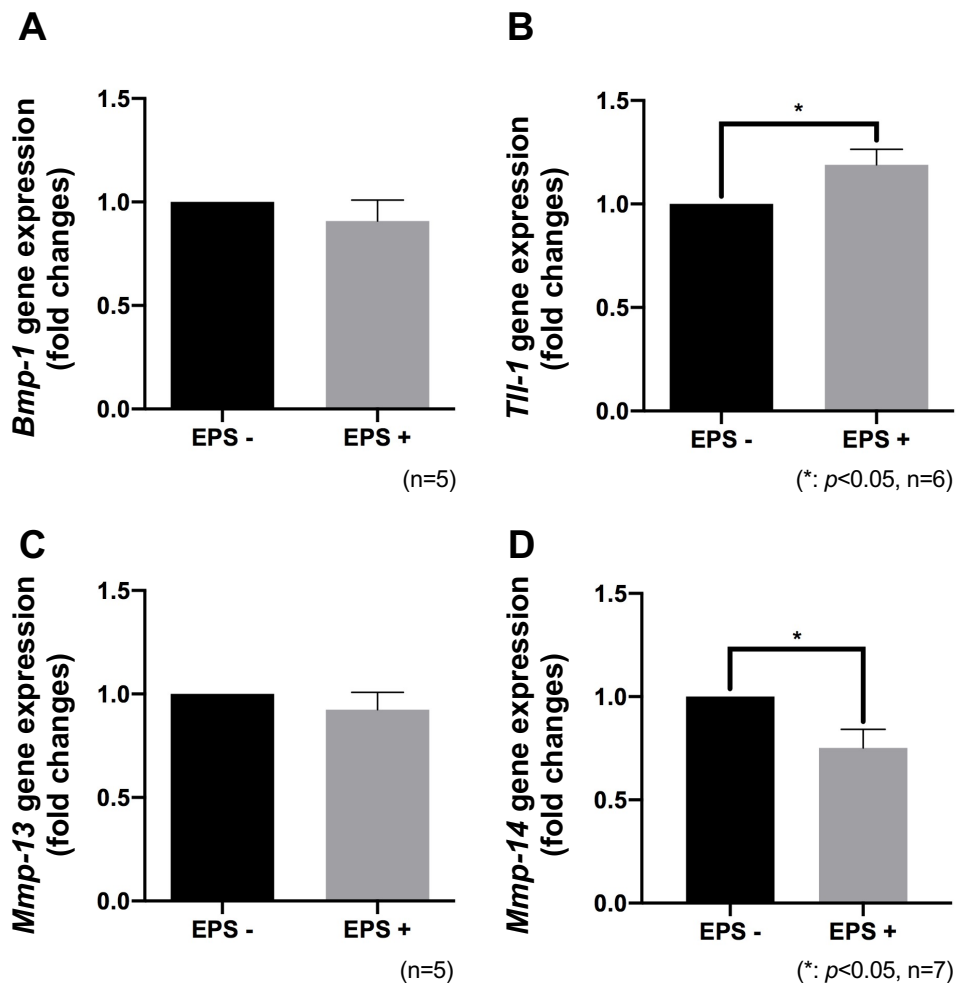
**Fig. 3-9 皮膚線維芽細胞における recombinant CXCL10 添加による酸化関連遺伝子発現の変化**  
 マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清と終濃度 25 pg/ml の recombinant CXCL10 を添加し、24 時間培養した。培養終了後、細胞より RNA を抽出し、qPCR を用いて (A) *Blvr*, (B) *Pgd*, (C) *Srxn1* 遺伝子の発現変化を調べた。なお、各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 7 回繰り返し、one-way ANOVA によって統計解析を行った (A: one-way ANOVA, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 7$ ) (B:  $n = 7$ ) (C: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 7$ )。





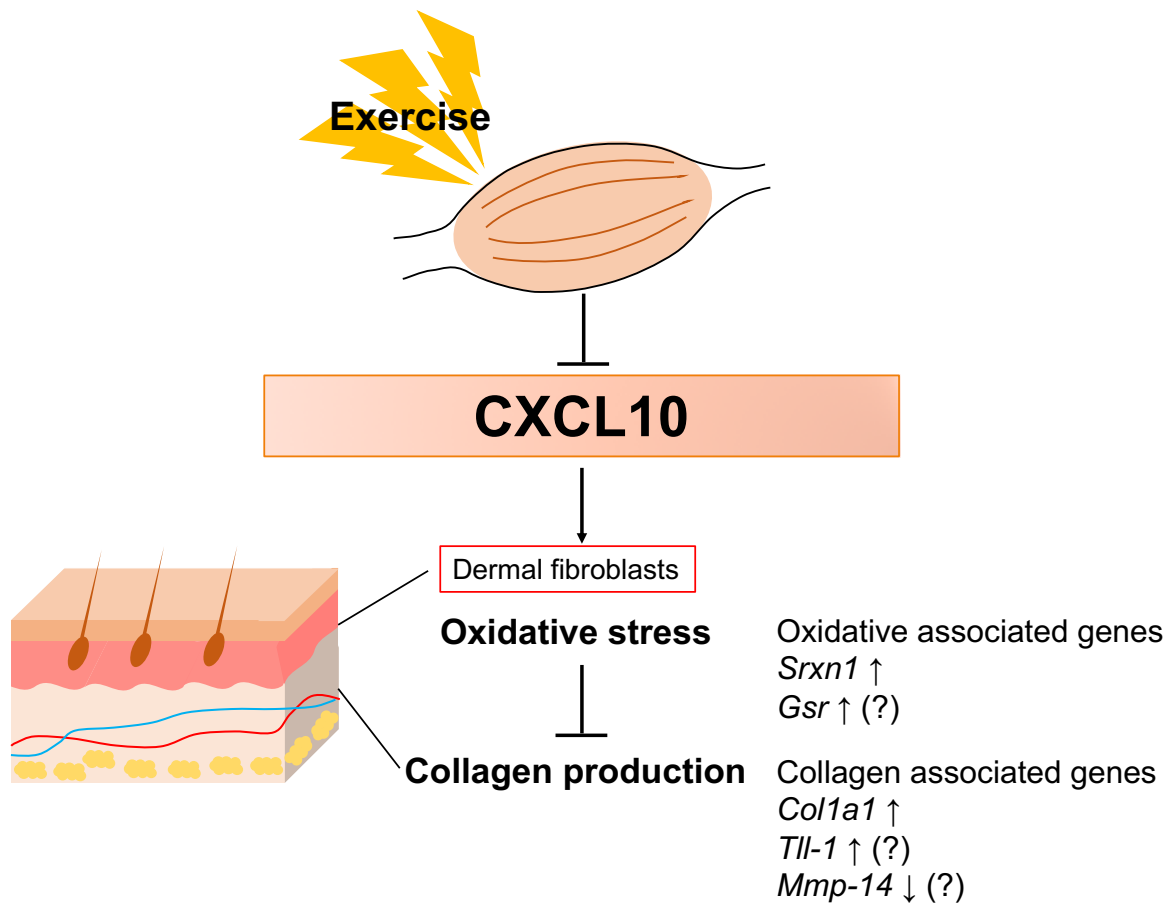
**Fig. 3-10 皮膚線維芽細胞における C2C12 筋管由来培養上清添加による抗酸化酵素遺伝子の発現変化**

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいはしていない C2C12 筋管細胞由来の培養上清を添加し、24 時間培養した。培養終了後、細胞を回収して RNA を抽出し、qPCR により (A) *Sod1*, (B) *Gpx1* (C) *Gsr* の遺伝子発現変化を解析した。各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 4-5 回繰り返し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: n=5) (B: n=4) (C: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=4)。



**Supplementary Fig. 3-1 皮膚線維芽細胞における C2C12-CM 添加によるコラーゲン代謝関連遺伝子発現の変化**

マウスより単離した皮膚線維芽細胞に、EPS を負荷した、あるいは負荷していない C2C12 筋管細胞由来の培養上清 (C2C12-CM) を添加し、24 時間培養した。細胞より RNA を抽出し、qPCR によって (A, B) コラーゲンのプロセッシング関連遺伝子、(C, D) コラーゲン分解関連遺伝子の発現を解析した。各遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 5-7 回繰り返し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: n=5) (B: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=6) (C: n=5) (D: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ , n=7)。



**Fig. summary3-1** 第三章のまとめ

運動依存的な骨格筋 CXCL10 減少は、真皮線維芽細胞においてコラーゲン産生を促進する可能性が示された。さらに、EPS-CM の添加によってコラーゲン代謝関連遺伝子の発現も変化していたことから、C2C12 筋管細胞への EPS 負荷によって CXCL10 を含めたマイオカインの発現分泌が変化し、皮膚におけるコラーゲン産生を総合的に調節している可能性が考えられる。さらに、運動依存的な骨格筋 CXCL10 減少は、真皮線維芽細胞において酸化ストレスを抑制する可能性も示された。

## 第四章

栄養条件の変化による

**CXCL10** の発現分泌制御

## 1. 緒言

第三章では、筋収縮依存的に分泌減少するマイオカイン CXCL10 が皮膚機能を制御する可能性を示した。一方、骨格筋は運動以外にも様々な刺激を感知する仕組みをもつ。例えば、骨格筋は細胞外の栄養状態をモニターする仕組みを保持しており、与えられた栄養条件に応じた生理応答を示す (204-208)。肥満状態においては、骨格筋への脂肪の過剰蓄積によって筋再生能が低下する (204)。また、2 型糖尿病患者では筋量の低下や遅筋線維量の減少などが見られる (205, 206)。一方、適度なタンパク質量を摂取することで運動後に筋サテライト細胞の増殖が促進されることや、ロイシン摂取が筋線維を肥大化させることなども示されている (207, 208)。

細胞外栄養条件の変化によるマイオカイン制御について知見は少ないが、高脂肪食摂取により肥満を誘導したマウスにおいて、血清中 IL-6 濃度及び腓腹筋 *IL-6* 遺伝子発現の上昇傾向が報告されている (209)。さらに、運動依存的に血中濃度及び遺伝子発現が上昇するマイオカイン Irisin も、肥満や糖尿病発症に伴い遺伝子発現や分泌が制御されることが示されている (210)。このように一部のマイオカインは、運動のみならず栄養条件の変化によっても発現分泌が制御されることが示されてきている。

また、運動と過栄養は骨格筋以外の組織においても対照的な効果を示す。例えば、序章で述べた通り、運動は脂肪組織や肝臓における代謝亢進や血管新生の促進に寄与するが (37-42, 46, 47, 62-67)、糖尿病や肥満といった過栄養状態においては、脂肪組織における脂質代謝の減少や肝臓への脂肪蓄積などを引き起こすとともに微小血管形成を抑制する (211-213)。これまで、高脂肪食摂取により CXCL10 の血中濃度が上昇するという報告もあるものの、この CXCL10 量増加はどの器官/臓器に由来するのかは明らかになっておらず、また、過栄養状態における骨格筋 CXCL10 の発現分泌についても明らかになっていない (214)。そこで、本章では骨格筋における CXCL10 発現分泌が細胞外の栄養条件の変化によって制御されるのか明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 細胞培養

#### **C2C12 細胞の培養及び分化誘導**

第一章及び第二章と同様の方法で実施した。

#### **C2C12 筋管細胞への栄養条件変化による刺激負荷**

十分に分化した C2C12 筋管細胞をグルコース及び脂肪酸で処理することで栄養条件変化の刺激を負荷した。グルコース条件は、4.5 g/l の High glucose (HG)条件、1.0 g/l の Low glucose (LG)条件、グルコースを含まない Glucose free (GF)条件の 3 条件とした。どのグルコース条件の培地においても、グルコース以外の組成は同様とし、それぞれ DMEM High glucose (4.5 g/l) (Nacalai tesque), DMEM Low glucose (1.0 g/l) (Nacalai tesque), DMEM No glucose (0.0 g/l) (Nacalai tesque)にそれぞれ 0.5% CS, 1% P/S を添加したものを使用した。

脂肪酸含有培地は以下の手順で調製した。まず、無血清の Differentiation medium (DMEM + 1% P/S)に 2%になるよう Albumin, Bovine Serum, Fatty Acid Free, pH7.0 (BSA) (Nacalai tesque)を添加した。さらに、0.5-1.0 mM となるように Palmitic acid (C16:0)及び Palmitoleic acid (C16:1)を添加した。さらに、Palmitic acid 及び Palmitoleic acid をそれぞれ 1 mM 添加した Mix (C16:0, C16:1)培地も作成した。なお、脂肪酸を含有している培地については、フィルター (pore size 0.45 µm; MERCK Millipore)で濾過滅菌を行った後に使用した。

### タンパク質解析

#### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

第一章及び第二章と同様に DuoSet® Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 (R&D systems), DuoSet® Ancillary Reagent Kit2 (R&D systems)を用いた。

#### **Western Blotting**

AMPK のリン酸化は Western Blotting により解析を行った。第二章と同様に SDS-PAGE によりタンパク質を分離、PVDF 膜に転写した後、Blocking を行った。その後、Blocking Buffer で希釈した各種一次抗体を 4℃で 12 時間反応させた。TBS-T を用いてメンブレンを洗浄し、TBS-T で希釈した二次抗体とともに室温で 1 時間反応させ、再度 TBS-T によりメンブレンを洗浄した。その後、ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, CA, USA)もしくは Chemi Lumi One Super (Nacalai tesque), ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad)を用いて化学発光を検出した。得られた化学発

光シグナルは Image J Software を用いて定量した。なお、使用した一次抗体及び二次抗体とその希釈倍率は以下に示した。

#### 一次抗体

- Anti- AMPK alpha, 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)
- Anti-Phospho-AMPK alpha (T172), 1:1000 (Cell Signaling)

#### 二次抗体

- Anti-rabbit IgG HRP-1 linked, 1:5000 (Cell Signaling)

## 遺伝子発現解析

第一章及び第二章と同様に行った。*Gapdh* 及び *Cxcl10* のプライマーは第一章及び第二章と同じものを利用した。*Cox-2* 遺伝子発現解析に用いたプライマー配列を以下に示す。

mouse *Cox-2*

Forward: 5' - AGA TCA TAA GCG AGG ACC TG - 3'

Reverse: 5' - TAC ACC TCT CCA CCA ATG AC - 3'

## 動物実験

### 動物飼育

本研究における全ての実験動物は東洋大学動物実験委員会の承認を受けた後に実施した。購入した4週齢の雄 C57BL/6J マウス (Charles River Laboratories Japan Inc.)を個別のケージにて1週間の馴化飼育を行った。マウスの飼育条件は温度 23℃、12 時間の明暗サイクル (6:00-18:00 明期、18:00-6:00 暗期)とした。また、飼料 (Labo MR Stock) (Nosan Corp.)及び水は自由摂取とした。

### 高脂肪食摂取実験

1 週間の馴化飼育終了後、マウスを4匹ずつ普通飼料摂取群 (Normal diet; ND)と高脂肪食摂取群 (High fat diet; HFD)の2群に分けた。ND 群には上述の飼料 (Lab MR Stock)、HFD 群には高脂肪飼料 (HFD-60) (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)を与えて自由摂取させた。マウスに各飼料を10週間与えた後、イソフルランによる麻酔下でマウスの心臓より採血し、血清サンプルを調製した。さらに、各骨格筋 (TA, EDL, Quad, SOL)についても第一章と同様の手順で採取した。なお、各飼料の栄養組成は次ページの表に示した (Table. 4-1)。

**Table. 4-1 各種飼料の栄養組成**

栄養成分	Lab MR Stock	HFD-60
粗蛋白質 (%)	18.8	22.0
粗脂肪 (%)	3.9	33.2
可溶無窒素物 (%)	54.7	26.4
粗繊維 (%)	6.6	6.3
その他 (%)	16.0	12.1
カロリー (kcal/kg)	3,291	4,926

### 血糖値の測定

上述の通りに調製した各マウスの血清におけるグルコース量は NIPRO FreeStyle Freedom Lite (NIPRO, Osaka, Japan)を用いて付属のプロトコルに従って実施した。

### 血清中遊離脂肪酸の測定

各マウスにおける血清中の遊離脂肪酸 (Non-esterified Fatty Acid; NEFA)の測定は LabAssay™ NEFA (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., Osaka, Japan)を用いてキット付属のプロトコルに従って実施した。

### マウス骨格筋からの RNA 抽出

マウスの各骨格筋サンプルの RNA 抽出は TRIzol reagent を用いて第一章と同様にして実施した。

## 統計解析

統計解析には第一章～第三章と同様に GraphPad Prism8 (GraphPad Software)を使用した。2 群間の比較の際には unpaired student's t-test を、3 群間以上の比較には one-way ANOVA を使用した。また、どちらの方法を用いて統計解析を行った場合にも、危険率が 5%未満の際に統計的な有意差を認めた。



### 3. 結果

#### 細胞外グルコース濃度の減少に伴って AMPK は活性化する

緒言に述べた通り、骨格筋は栄養状態によって様々な生理応答を示すことが知られてきたが、グルコースは骨格筋収縮の主要なエネルギー源であると同時に、全身の糖取り込みの 75%は骨格筋で生じることも知られている (33,215)。そこで、まず C2C12 筋管細胞外のグルコース濃度を変化させた場合、CXCL10 発現分泌にどのような影響を与えるか検討することとした。

まず、細胞外グルコース濃度変化に細胞が応答しているか AMPK リン酸化を指標とした確認を行った。C2C12 筋管細胞を各種グルコース条件 (HG; 4.5 g/l, LG; 1.0 g/l, GF; 0.0 g/l)の培地で培養して細胞を回収した後、Western Blotting によって AMPK リン酸化量の変化を解析した。その結果、細胞外グルコース濃度が減少するにつれて AMPK リン酸化量は上昇し、特に HG と GF を比較すると、GF において AMPK リン酸化量は約 2 倍に上昇することが明らかとなった (\*:  $p<0.05$ ,  $n=5$ ) (Fig. 4-1)。

#### 細胞外グルコース濃度の上昇に伴って CXCL10 分泌及び遺伝子発現は上昇する

次に、細胞外グルコース濃度変化に応答した CXCL10 分泌及び遺伝子発現変化を調べた。先述した通り C2C12 筋管細胞を各グルコース濃度の培地で 24 時間培養した後、培養上清に含まれる CXCL10 量の変化を ELISA 法により調べた。その結果、GF 条件における培養液中の CXCL10 濃度は約  $117 \pm 16.0$  pg/ml であったのに対して LG 条件では  $184 \pm 34.4$  pg/ml、HG 条件では、 $260 \pm 44.4$  pg/ml まで上昇していることが明らかになった (\*:  $p<0.05$ ,  $n=5-9$ ) (Fig. 4-2A)。

さらに、*Cxcl10* 遺伝子発現についても同様の解析を行った。その結果、*Cxcl10* 遺伝子発現に関してもグルコース濃度と相関した増加を示し、HG においては GF と比較して 4.2 倍に上昇していることが明らかになった (\*\*:  $p<0.01$ ,  $n=6$ ) (Fig. 4-2B)。以上の結果から、細胞外グルコース濃度の上昇は C2C12 筋管細胞の CXCL10 分泌及び遺伝子発現を増加させることが示された。

#### 飽和脂肪酸濃度の上昇にしたがって *Cox-2* 遺伝子発現は上昇する

緒言で述べた通り、骨格筋は細胞外脂肪酸濃度に応答した生理変化も示す。特に研究が進んでいるのが飽和脂肪酸の 1 つである Palmitic acid (Pal, C16:0)の効果であり、ヒト骨格筋細胞におけるインスリン抵抗性を惹起することなどが報告されている (216)。一方、 $\Delta 9$  不飽和酵素によりパルミチンから変換される不飽和脂肪酸である Palmitoleic acid (Palt, C16:1)は、マウス由来骨格筋細胞において Pal 誘導性のインスリン抵抗性を改善する効果があることが示されている (217)。そこで、C2C12 細胞における CXCL10 発現分泌制御にこれらの脂肪酸がどのような役割を果たしているか調べることにした。

まずは Pal 及び Palt の刺激が細胞に負荷されているかを確認した。十分に分化した C2C12 筋管細胞に 0, 0.5, 0.75, 1.0 mM の Pal (C16:0) 及び Palt (C16:1)、あるいは Pal, Palt をそれぞれ 1.0 mM ずつ混合したもの (Mix) を添加して 24 時間培養した後に C2C12 細胞において Pal 添加により上昇することが報告されている遺伝子である *Cox-2* の発現変化を解析し、C2C12 筋管細胞が既報通り飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸に応答するか検証した (218)。その結果、Pal 濃度依存的に *Cox-2* 遺伝子発現量は増加し、1.0 mM Pal 添加群では対照群と比較して約 7.7 倍に上昇することが分かった (\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 4-3)。一方、Palt による *Cox-2* 遺伝子発現上昇は観察されず、Mix 添加においては、Pal のみの添加と比較して *Cox-2* 遺伝子発現上昇は抑制された ( $n = 3$ ) (Fig. 4-3)。これらの結果より、既報と同様、C2C12 筋管細胞は飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸に応答することが確認された。

### 飽和脂肪酸の添加により CXCL10 分泌及び遺伝子発現は上昇する

次に、Pal 及び Palt 刺激が CXCL10 分泌及び遺伝子発現にどのような影響を与えるか検討した。分化した C2C12 筋管細胞に上記と同様に 0, 0.5, 0.75, 1.0 mM の Pal (C16:0) 及び Palt (C16:1)、あるいは Pal, Palt をそれぞれ 1.0 mM ずつ混合したもの (Mix) を添加して 24 時間培養し、CXCL10 分泌量を ELISA 法により、また *Cxcl10* 遺伝子発現量を qPCR 法により解析した。その結果、対照群における CXCL10 分泌量は  $103 \pm 2.4$  pg/ml であったのに対し、1.0 mM Pal 添加群では  $167 \pm 26.8$  pg/ml まで増加した (\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 4-4A)。一方、Palt 単独添加群及び Mix 群における有意な変化は見られなかった。*Cxcl10* 遺伝子発現についても、1.0 mM Pal 添加群では対照群と比較して約 35 倍に上昇したものの、Palt 単独添加群及び Mix 群における有意な変化は見られなかった (\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 4-4B)。以上の結果をまとめると、C2C12 筋管細胞において飽和脂肪酸の添加によって CXCL10 の分泌及び遺伝子発現は上昇、一方、不飽和脂肪酸を同時に添加することで飽和脂肪酸依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現上昇が抑えられたことから、脂肪酸依存的な CXCL10 制御には、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の存在比率が重要であることが示唆された。

### 高脂肪食摂取によりマウスにおける血清中グルコース量が上昇する

ヒトやマウスなどの骨格筋においてグルコースや脂肪酸の濃度が高くなっている状態としては、肥満や糖尿病の状態が挙げられる (204, 219)。そこで、マウス高脂肪食摂取モデルを用いて骨格筋における CXCL10 遺伝子発現を解析した。4 週齢マウスを個別ケージにおいて 1 週間馴化飼育した後、ND 及び HFD の 2 群に分け、ND 群には通常の飼料を、HFD 群には高脂肪の飼料を与え、10 週間飼育した。10 週間の飼育期間中、3 日毎に HFD 群と ND 群の体重を比較解析したところ、24 日後より HFD 群の体重が有意な増加を示した (Fig. 4-5A)。10 週間後に各群の血清に含まれるグルコース量を測定した結果、ND 群では約  $278 \pm 10.3$  mg/dl に対して HFD 群では  $348 \pm 14.9$  mg/dl

と有意な増加を示した(\*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 4-5B)。また、各群の血清に含まれる NEFA 量は、ND 群では  $0.3 \pm 0.07$  mEq/L に対して HFD 群では  $0.4 \pm 0.11$  mEq/L と増加する傾向が見られた ( $n = 8-9$ ) (Fig. 4-5C)。

### 高脂肪食摂取により、TA 及び EDL における *Cxcl10* 遺伝子発現量は上昇する

次に、HFD 群及び ND 群の血中 CXCL10 量及び骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現量を解析した。その結果、ND 群では  $110 \pm 1.3$  pg/ml, HFD 群では  $118 \pm 3.9$  pg/ml であり、両群における血清中 CXCL10 濃度に変化は見られなかった (Fig. 4-6A)。一方、各骨格筋組織 (TA, EDL, Quad, SOL) の *Cxcl10* 遺伝子発現を解析した結果、HFD 群では ND 群と比較して TA における *Cxcl10* 遺伝子発現量が約 2.7 倍に、EDL における遺伝子発現も約 1.7 倍に増加することが明らかとなった (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 6-8$ ) (Fig. 4-6B, C)。Quad 及び SOL での *Cxcl10* 遺伝子発現については有意な差は認められなかった ( $n = 4$ ) (Fig. 4-6D, E)。

## 4. 考察

### 細胞外グルコース濃度及び飽和脂肪酸濃度上昇に伴った CXCL10 分泌及び遺伝子発現上昇

これまでマイオカインについては、特に運動依存的な分泌変化が注目されてきたが、骨格筋は運動以外の刺激も感知している。そこで本章では、栄養状態の変化に伴う骨格筋での CXCL10 発現分泌制御に関する検討を行った。その結果、グルコースや飽和脂肪酸の濃度上昇に伴って CXCL10 分泌及び遺伝子発現が上昇することが分かった (Fig. 4-7)。

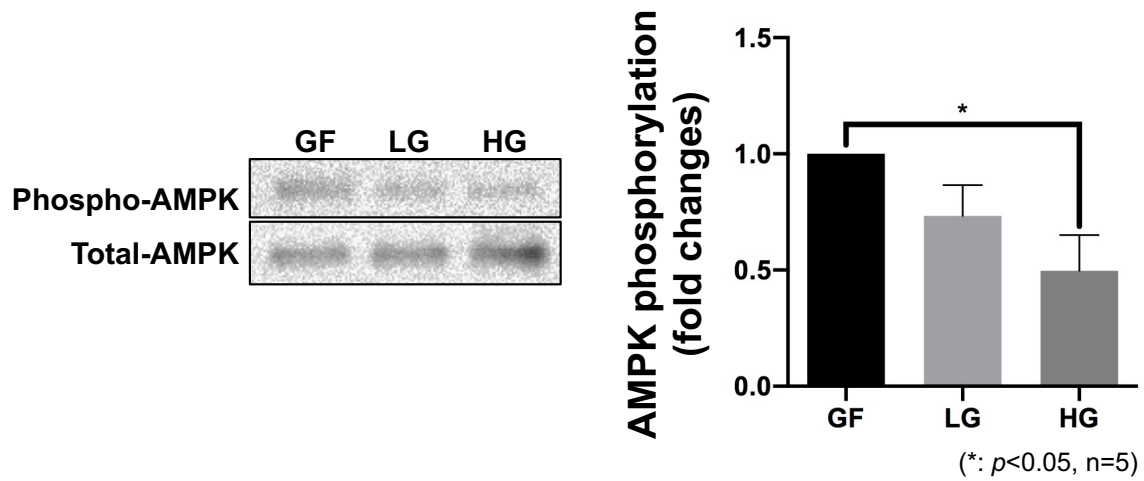
まず、細胞レベルにおいて、C2C12 筋管細胞の細胞外グルコースあるいは Palmitic acid 濃度が上昇することで CXCL10 分泌及び遺伝子発現が上昇することが分かった。これらはどのようなシグナル伝達経路を介しているのであろうか。主要な候補経路として NF- $\kappa$ B 経路が挙げられる。マウス歯根膜線維芽細胞やヒト骨格筋において高グルコース状態や Palmitic acid 添加は NF- $\kappa$ B を活性化することが知られている (220, 221)。さらに、先述した通り、運動は骨格筋において NF- $\kappa$ B の活性化を抑制する可能性があることや、CXCL10 発現制御に NF- $\kappa$ B 活性化が関与していることを併せると (153, 154)、筋管収縮によっては CXCL10 発現分泌が減少した一方で細胞外グルコース濃度の上昇及び Palmitic acid の添加によって NF- $\kappa$ B が活性化し、それにより CXCL10 の分泌及び遺伝子発現が上昇した可能性が考えられる。また、第二章において、AICAR 添加による AMPK 活性化により *Cxcl10* 遺伝子発現が上昇した一方で、第四章においてはグルコース枯渇条件において AMPK の有意な活性化が見られたにも関わらず、CXCL10 発現分泌は高グルコース状態と比較して減少していた。すなわち、薬剤が誘導する強制的な AMPK 活性化は CXCL10 発現に正の効果を持つが、運動や栄養依存的に生じる生理的な AMPK 活性制御は CXCL10 発現に大きな影響を与えていないことが示唆される。

### 高脂肪食摂取マウスの各骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現

高脂肪食摂取マウスでは、TA 及び EDL など速筋において *Cxcl10* 遺伝子発現量が上昇したが、Quad 及び SOL など遅筋を含む骨格筋ではこのような差は見られなかった。遅筋と速筋は、HFD 摂取に伴う Reactive oxygen species (ROS) の産生効率が異なっており、速筋における ROS 産生効率が高値となる (222)。CXCL10 発現制御には NF- $\kappa$ B 活性化が関与していることが知られているが (153-155)、この NF- $\kappa$ B 活性化に ROS は大きな影響を与えている。NF- $\kappa$ B は通常、Inhibitor  $\kappa$ B  $\alpha$  (IkB $\alpha$ ) と結合することで不活性化されているが、ROS は IkB $\alpha$  のチロシン残基をリン酸化することで、IkB $\alpha$  の分化を誘導し、最終的に NF- $\kappa$ B が活性化する (223, 224)。すなわち、高脂肪食摂取マウスの特に速筋において ROS が過剰産生され、NF- $\kappa$ B が活性化することで *Cxcl10* 遺伝子発現が増加するという仮説が考えられる。

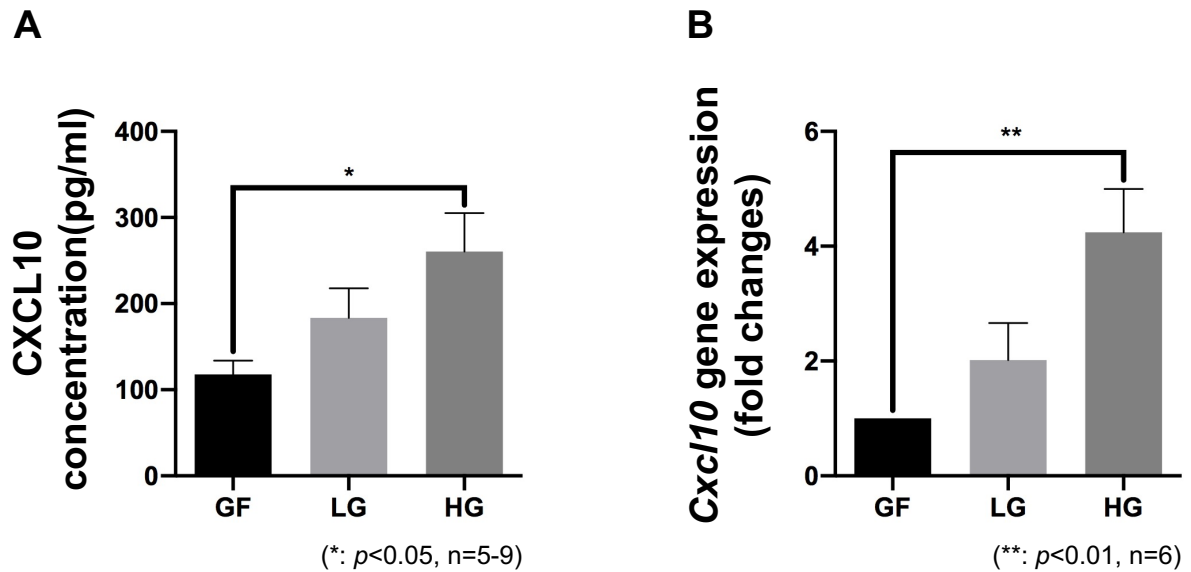
本章において、HFD 依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現上昇は速筋で観察されたが、*Cxcl10* 発現上昇に伴って主に速筋周辺において血管新生が抑制されることで骨格筋萎縮の原因のひとつとなっている可能性が考えられる。実際にヒトやマウスにおいて、糖尿病や肥満は主に速筋において筋萎縮を進行させることや、筋萎縮の過程において骨格筋周辺の血管密度が減少することが報告されている (225, 226)。また、運動負荷の場合、遅筋において *Cxcl10* 遺伝子発現減少が観察された一方、HFD 摂取によっては速筋において *Cxcl10* 発現上昇が見られた。この理由としては、各刺激依存的な CXCL10 発現制御メカニズムが異なる可能性が考えられる。第一章では、マウス走行モデルにおける遅筋特異的な *Cxcl10* 遺伝子発現減少について PGC-1 $\alpha$  の関与を考察した (139)。一方、HFD 摂取群については、上述の通り、速筋における ROS 産生が高値となるため (222)、主に速筋において NF- $\kappa$ B が活性化、*Cxcl10* 遺伝子発現が上昇した可能性が考えられる。今後、これらの仮説を証明するためにも、速筋、遅筋における CXCL10 発現制御の差異については継続した研究が必要である。

## 5. 図表

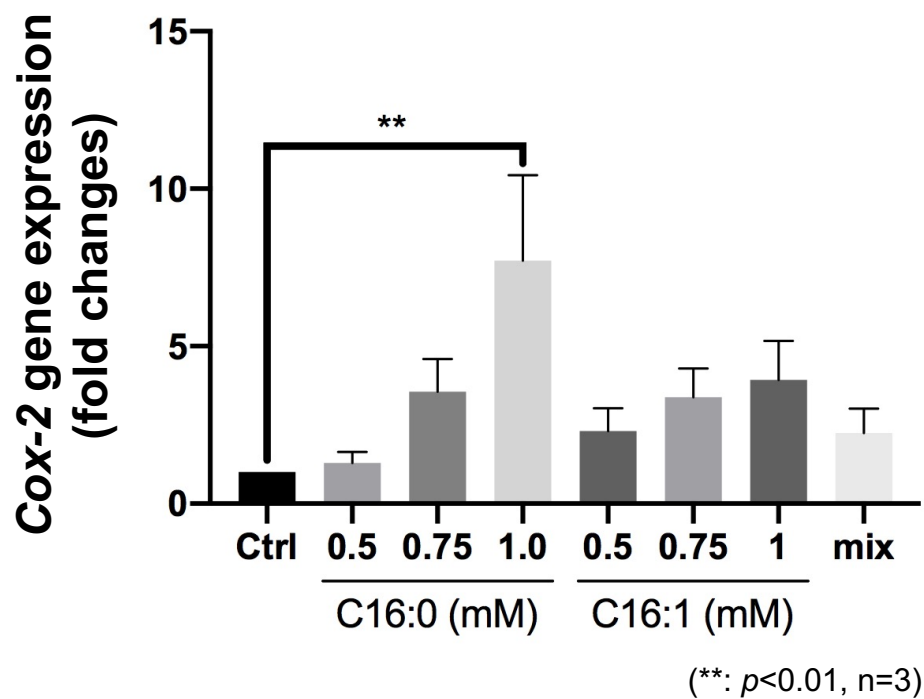


**Fig. 4-1 C2C12 筋管細胞における Glucose 濃度変化による AMPK リン酸化量の変化**

分化した C2C12 筋管細胞を 0, 1, 4.5 g/L の Glucose を含有した培地で処理し、24 時間培養した。培養終了後に細胞を回収し、タンパク質を抽出して Western Blotting によって AMPK リン酸化量の変化を調べた。検出されたバンドは写真に示し、Image J により数値化してグラフを作成した。独立した実験を 5 回実施し、one-way ANOVA によって統計解析を行った。(one-way ANOVA, \*:  $p<0.05$ ,  $n=5$ )。



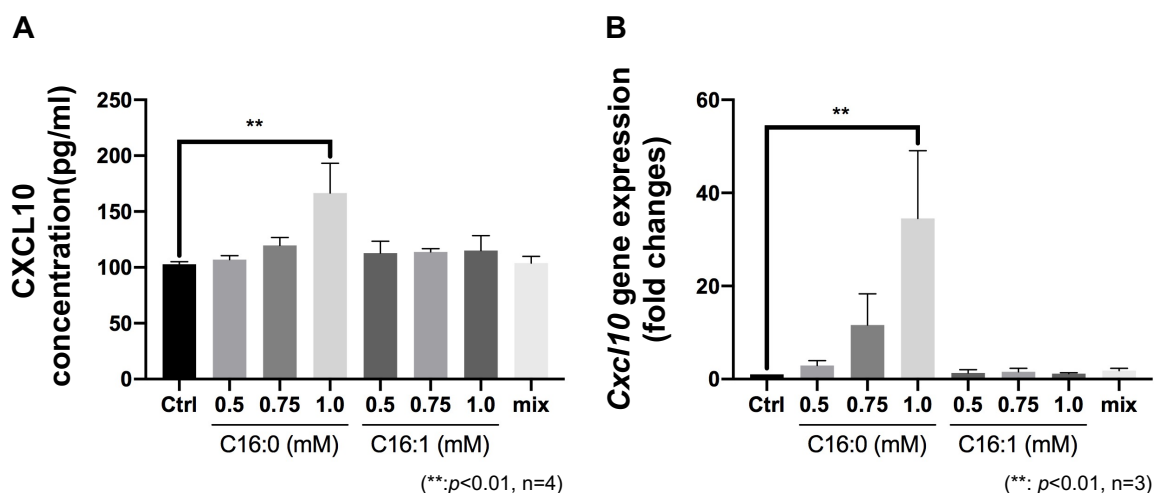
**Fig. 4-2 C2C12 筋管細胞における Glucose 濃度変化による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**  
 分化した C2C12 筋管細胞を 0, 1, 4.5 g/L の Glucose を含有した培地で処理し、24 時間培養した。  
 (A) 24 時間後に細胞より培養上清を回収し、ELISA によって CXCL10 分泌量の変化を解析した。  
 (B) 培養終了後に細胞を回収し、Total-RNA を抽出して qPCR により *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化を調べた。*Cxcl10* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 5-9 回もしくは 6 回実施し、one-way ANOVA によって統計解析を行った。(A: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5-9$ ) (B: one-way ANOVA, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 6$ )。



**Fig. 4-3 C2C12 筋管細胞における Fatty acid 添加による *Cox-2* 遺伝子発現の変化**

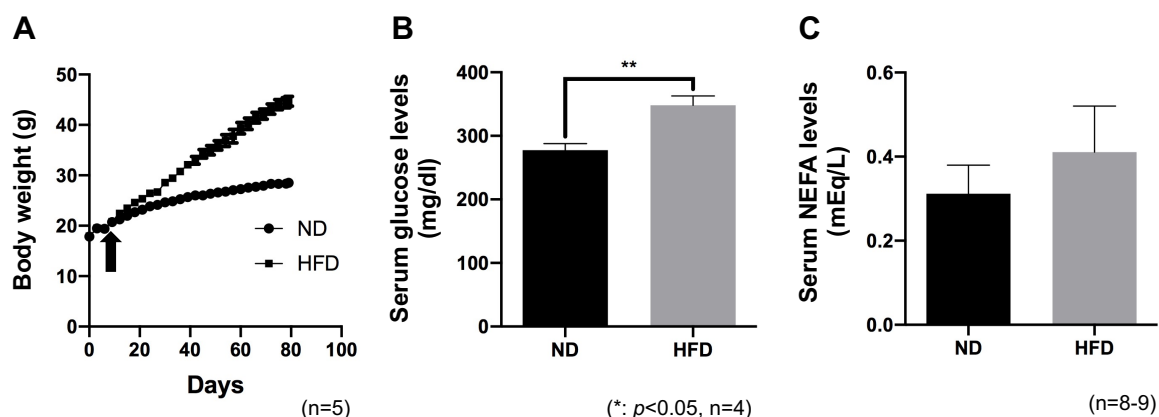
分化した C2C12 筋管細胞を 0.5, 0.75, 1 mM の Palmitic acid (C16:0) または Palmitoleic acid (C16:1) 培地で処理し、24 時間培養した。24 時間後に細胞を回収し、Total-RNA を抽出して qPCR により *Cox-2* 遺伝子発現量の変化を調べた。*Cox-2* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 3 回実施し、one-way ANOVA によって統計解析を行った。(one-way ANOVA, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 3$ )。





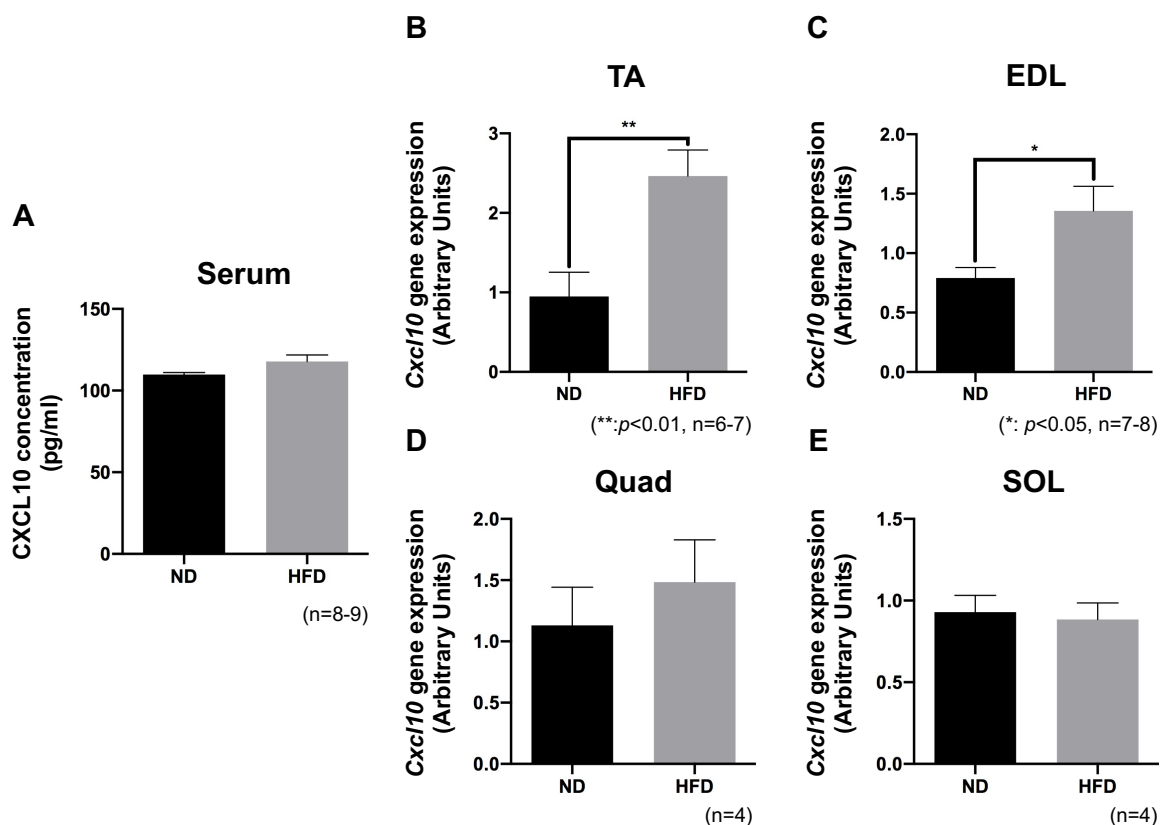
**Fig. 4-4 C2C12 筋管細胞における Fatty acid 添加による CXCL10 分泌及び遺伝子発現の変化**

分化した C2C12 筋管細胞を 0.5, 0.75, 1 mM の Palmitic acid (C16:0) または Palmitoleic acid (C16:1) 培地で処理し、24 時間培養した。(A) 24 時間後に細胞より培養上清を回収し、ELISA を用いて CXCL10 分泌量を調べた。(B) 処理後の細胞より Total-RNA を抽出し、qPCR によって *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化を解析した。 *Cxcl10* 遺伝子発現は *Gapdh* により標準化した。独立した実験を 4 回または 3 回実施し、one-way ANOVA によって統計解析を行った。(A: one-way ANOVA, \*\*:  $p<0.01$ ,  $n=4$ ) (B: one-way ANOVA, \*\*:  $p<0.01$ ,  $n=3$ )。



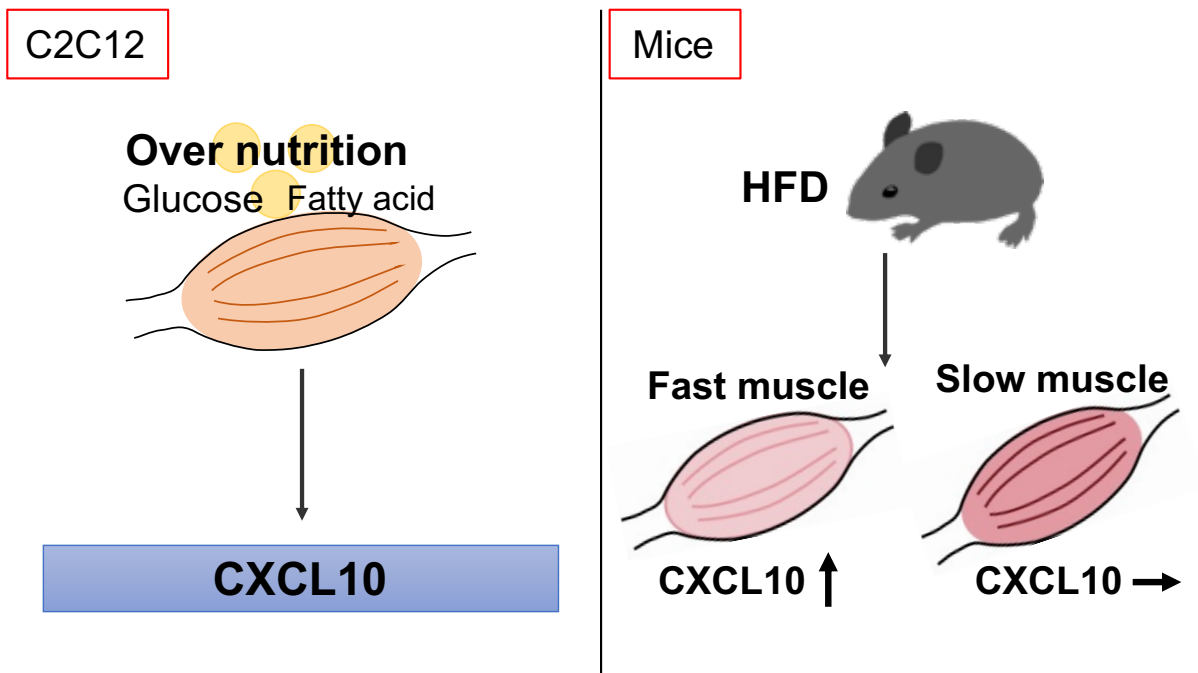
**Fig. 4-5 高脂肪食摂取による血中グルコース量及びNEFA 量の変化**

5 週齢の C57BL/6J マウスに普通食もしくは高脂肪食 (HFD-60) を 10 週間与えた。(A) 普通食もしくは高脂肪食を与えている間、3 日ごとに体重を測定して平均値をグラフ化した。(B, C) 普通食または高脂肪食の摂取期間終了後、マウス以下においてマウスの心臓より採血し、血中グルコース濃度 (B) 及び血中 NEFA 量 (C) を測定した。両群共に 4-5 匹もしくは 8-9 匹のマウスよりサンプルを採取し、Student's t-test によって統計解析を行った (A: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n = 5$ ) (B: unpaired Student's t-test, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (C:  $n = 8-9$ )。



**Fig. 4-6 高脂肪食摂取によるマウス血清中 CXCL10 量及び各骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現量の変化**

5 週齢の C57BL/6J マウスに普通食もしくは高脂肪食 (HFD-60) を 10 週間与えた。(A) 10 週間後にイソフルラン麻酔下で心臓より採血し、ELISA により血清中 CXCL10 濃度を測定した。(B-E) 採取した各骨格筋より Total RNA を抽出して qPCR を用いて *Cxcl10* 遺伝子発現を解析した。*Cxcl10* 遺伝子発現は *Gapdh* によって標準化した。両群ともに 4-9 匹のマウスのサンプルを解析し、Student's t-test によって統計解析を行った (A:  $n=8-9$ ) (B: unpaired Student's t-test, \*\*:  $p < 0.01$ ,  $n=6-7$ ) (C: unpaired Student's t-test, \*:  $p < 0.05$ ,  $n=7-8$ ) (D, E:  $n=4$ )。



**Fig. summary4-1** 第四章のまとめ

C2C12 筋管細胞において、高グルコース及びパルミチン酸依存的に CXCL10 発現分泌が上昇することが明らかになった。さらに、マウス高脂肪食摂取モデルにおいては、特に速筋において高脂肪食摂取により *Cxcl10* 遺伝子発現が上昇することが示された。

# 総合討論

## 新規マイオカイン CXCL10 及び CCL5 の同定

第一章に述べたように、これまでは、主に運動負荷後の血中サイトカイン濃度やホルモン濃度の変動を起点として、運動制御性マイオカインが発見される例が多かった。序章で述べた IL-6 についても、運動負荷による血中濃度上昇が観察されたことが契機となって研究が進展した (75, 76)。一方、運動による血中サイトカイン濃度の変動は様々な要因によって生じる可能性がある。例えば、運動後に骨格筋にマクロファージが浸潤して IL-6 を盛んに分泌する (112, 113)。したがって、運動負荷による血中分泌因子の濃度変化が骨格筋由来であるかは慎重な検討が必要である。

近年、*in vitro* 擬似的運動刺激系である C2C12-EPS 系が確立され、マイオカイン同定のブレークスルーとなった (77)。培養骨格筋細胞に電気パルス刺激を負荷して人為的収縮を誘導する C2C12-EPS 系は、骨格筋細胞のみからなる系であるため、筋収縮依存的に発現分泌するマイオカインを直接的に可視化できる特長をもつ。さらに電気パルスの強度やパターンを変化させることで、様々なタイプの筋収縮を人為的に引き起こすこともできる。実際、マイオカイン候補因子であった IL-6 についても、本系により筋管細胞から直接分泌されていることが初めて明らかとなり、マイオカインである最終的な証明がなされた (77)。さらに、CXCL1 や CXCL5 をはじめとする多数の運動制御性マイオカインが、本系あるいはその改良型を用いて同定されてきた (77, 114)。

本研究は、この C2C12-EPS 系に Cytokine array を併用し、多数の運動制御性マイオカインを一括同定しようとした初めての試みである。その結果、CXCL10 及び CCL5 をはじめとする複数の新規運動制御性マイオカイン候補分子の同定に成功した (第一章)。これまでのマイオカイン研究は、主に一種類の分子に着目した研究が主流であったが (74, 84)、骨格筋から多種類のマイオカインが分泌されることを考えると、ある生理状態における「マイオカインプロファイル」として一括して評価することも重要になってくる可能性が高い。実際、Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) 及び Interleukin-10 (IL-10) はどちらも運動により発現上昇することが知られているマイオカインであるが (227, 228)、GM-CSF は好中球の遊走を促進する一方 (229)、IL-10 は抑制する (230)。

一方、本研究で用いた Cytokine array には 40 種類のサイトカイン抗体がスポットしてあるため網羅的解析とは言い難い。今後、さらなる新規マイオカイン探索のため、別種 Cytokine array を用いるなどの方法で探索範囲を広げていくことが重要である。さらに、C2C12-EPS 系の培養上清を質量分析で解析する方法も有効である可能性が高い。実際、運動制御性マイオカイン Irisin の同定には LC-MS/MS 分析が用いられており、質量分析がマイオカイン同定に有効であることは証明され

ている (134)。本方法を用いれば Cytokine array で解析可能なタンパク質のみならず、その他のタンパク質や切断されたペプチドなどもターゲットとすることができると考えられる。

## 運動依存的な CXCL10 減少による皮膚機能制御

運動による皮膚の創傷治癒促進や肥満による創傷治癒の遅滞や真皮コラーゲン量減少の改善、癌の抑制などが報告されてきたものの (99, 102-106)、これらの運動効果を仲介するマイオカインについての知見はほとんどなかった。本論文では CXCL10 を新規運動抑制性マイオカインとして同定したが、この CXCL10 については皮膚機能に関連するという複数の報告が存在する。例えば、皮膚損傷時に cyclic GMP-AMP (cGAMP) を塗布すると創傷治癒が促進されるが、これは、cGAMP による CXCL10 発現上昇に由来することが示されている (176)。また、CXCL10 受容体である CXCR3 は、表皮細胞と真皮線維芽細胞の両者に発現しており、異なる機能を持つことも報告されている (231)。表皮細胞では、CXCR3 シグナル伝達経路が活性化すると細胞遊走が促進されるが、真皮線維芽細胞においては、同経路の活性化によって細胞遊走が逆に抑制されることが知られている (231)。これらの知見から、本論文では「運動依存的な CXCL10 減少は皮膚機能に影響を与える」との仮説を立て、その検証を行った。その結果、運動に応答したマイオカイン CXCL10 の減少は、真皮線維芽細胞に発現する CXCR3 を介してコラーゲン産生を促進することが初めて明らかになった。コラーゲンは真皮の約 70% を占める主要な Extracellular matrix (ECM) である (232)。ECM は皮膚において創傷治癒における再上皮化や弾性維持に寄与しており、加齢などによりコラーゲンを含む ECM が減少することで創傷治癒の遅滞や皮膚の弾性低下などが生じることが報告されている (232, 233)。一方、運動により真皮コラーゲン量が増加することは知られていたが (80)、CXCL10 の関与は明らかになっていなかった。しかし、本論文によって筋収縮による CXCL10 減少は真皮線維芽細胞のコラーゲン産生を上昇させることが初めて明らかとなった。

さらに、本論文では、筋収縮後のマイオカイン変動によって真皮線維芽細胞の酸化ストレス関連遺伝子の発現が上昇することを示した。特に抗酸化能を有する *Srxn1* (200) については、筋収縮依存的な CXCL10 分泌減少により発現が有意に上昇することが明らかとなった。皮膚組織における酸化ストレスは、抗酸化物質の産生減少やコラーゲンやエラスチン分解促進などを引き起こし、皮膚老化を亢進する (194, 195)。したがって、運動依存的な CXCL10 分泌減少は、真皮線維芽細胞の酸化還元酵素の発現調節を介して酸化ストレスを抑制し、最終的に皮膚老化を抑制している可能性が考えられる。今後、創傷モデルマウスや老化マウスなどの動物モデルを用いた検証を実施する必要はあるものの、筋収縮依存的に CXCL10 が減少することで、(1) 真皮線維芽細胞のコラーゲン産生促進、(2) 真皮線維芽細胞における酸化ストレスの軽減などが生じ、皮膚に良好な影響を与えている可能性が考えられる。

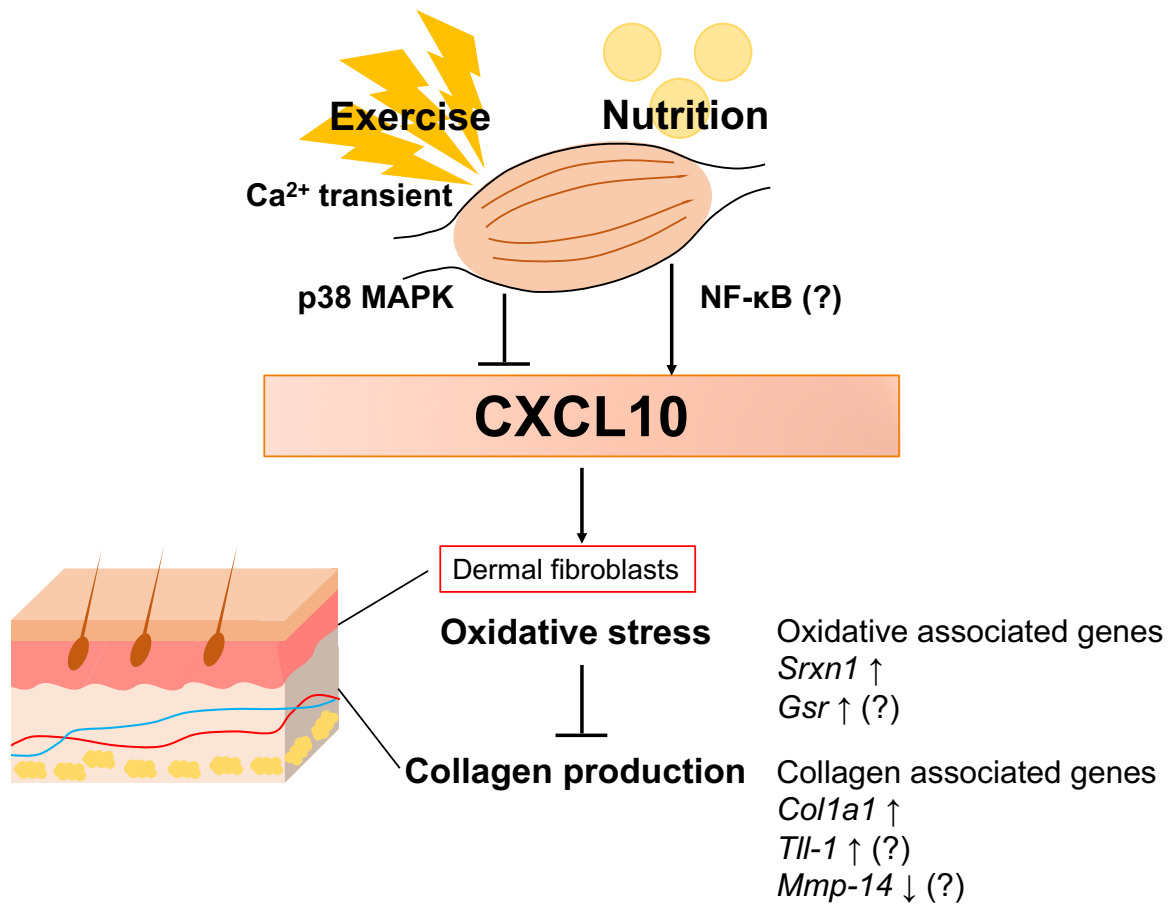
さらに本研究では、骨格筋における CXCL10 発現は栄養状態によっても変動すること、運動依存的な CXCL10 分泌減少には p38 MAPK の活性化が重要であることも明らかにした。これにより、細胞外栄養状態や細胞内の p38 MAPK 活性化を制御することで、運動非依存的にも CXCL10 分泌制御が可能であることが示された。今後、骨格筋における CXCL10 発現分泌制御の詳細がさらに明らかとなれば、運動が困難である高齢者などにおいても CXCL10 を介した運動依存的な皮膚機能制御効果を適用することが可能となるかもしれない。

以上、本研究によってマイオカインが皮膚機能を制御していることが明らかになった。これまで骨格筋は姿勢の保持や運動などに寄与するほか、内分泌器官としての機能を持つことが示唆されてきたが、本研究においても骨格筋の内分泌器官としての機能の一部を明らかにした。また、本研究においては、動物モデルとしてマウスを用いたが、マウス及びヒトの両方で運動依存的に発現分泌が上昇することが示されている IL-6 について、どちらも運動依存的な IL-6 発現分泌上昇により抗炎症効果がもたらされることが報告されているほか、Irisin についてもマウス及びヒトのどちらにおいても運動依存的に発現が上昇し、脂肪組織の代謝亢進に寄与することも示されている (74, 78-80, 234, 235)。さらに、第一章においてマウスと培養細胞のどちらにおいても運動依存的に発現分泌が変化することが示された 9 つのマイオカインのうち、IL-6, Irisin の他に少なくとも IL-8, SPARC, CCL2, Myostatin, VEGF についても、マウスにおける運動依存的な発現変化がヒトにおいても観察されている (236-241)。以上のように、これまでの研究においてマウスを用いて得られた知見の多くはヒトにおいても観察されていることがわかる。本論文ではマウス個体及びマウス由来の細胞を使用した、得られた研究結果がヒトにおいても同様であるか確認していくことが重要である。

## 本研究のまとめ

本論文では、新規の運動制御性マイオカイン探索すること、運動依存的な皮膚機能制御についてマイオカインの関与を明らかにすることを目的として研究を行った。まず、CXCL10 をはじめとする複数の新規運動制御性マイオカインの同定に成功 (第一章)、その運動依存的な制御メカニズムを示唆した (第二章)。さらに、この運動依存的な CXCL10 分泌減少が皮膚機能を制御する可能性を初めて示した (第三章)。さらに、この新規マイオカイン CXCL10 の発現分泌は、運動だけでなく栄養によっても制御されることも明らかにした (第四章)。

まとめると、本論文で新規同定したマイオカイン CXCL10 は、運動、栄養など複数の刺激によって産生調節され、皮膚機能をコントロールする重要なマイオカインであることが明らかとなった (Fig. summary-1)。骨格筋が内分泌器官であるとの概念が提唱されて 20 年弱となるが、今後も骨格筋を中心とする臓器間ネットワークを明らかにすることで、運動効果の実態がさらに明らかになっていくことが期待される。



**Fig. summary-1** 本研究のまとめ

C2C12 筋管細胞への EPS 負荷による CXCL10 発現分泌減少は Ca<sup>2+</sup>振動や p38 MAPK 活性化を介していることが明らかになった。さらに、EPS 依存的な CXCL10 減少をはじめとするマイオカイン発現分泌の変化は真皮線維芽細胞においてコラーゲン産生の促進や酸化ストレスの抑制に寄与する可能性が示された。さらに、骨格筋における高グルコースやパルミチン酸などの栄養条件の変化は CXCL10 発現分泌を上昇させることも明らかとなった。



## 参考文献

- (1) **Frontera WR, Ochala J.** (2015) Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int.* 96(3): 183-195.
- (2) **Szczesna D, Guzman G, Miller T, Zhao J, Farokhi K, Ellemberger H, Potter JD.** (1996) The role of the four  $\text{Ca}^{2+}$  binding sites of troponin C in the regulation of skeletal muscle contraction. *J Biol Chem.* 271(14): 8381-8386.
- (3) **Schiaffino S, Reggiani C.** (2011) Fiber type in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev.* 91(4): 1447-1531.
- (4) **Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S.** (1994) Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 267: C1723-1728.
- (5) **Bottinelli R.** (2001) Functional heterogeneity of mammalian single muscle fibers: do myosin isoforms tell the whole story? *Pflugers Arch.* 443(1): 6-17.
- (6) **Johnson MA, Polgar J, Weightman D, Appleton D.** (1973) Data on the distribution of fibre types in thirty human muscles. An autopsy study. *J Neurol Sci.* 18(1): 111-129.
- (7) **Henriksson-Larsén KB, Lexell J, Sjöström M.** (1983) Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. I. Method for the preparation and analysis of cross-sections of whole tibialis anterior. *Histochem J.* 15(2): 167-178.
- (8) **Jaworowski A, Porter MM, Holmbäck AM, Downham D, Lexell J.** (2002) Enzyme activities in the tibialis anterior muscle of young moderately active men and women: relationship with body composition, muscle cross-sectional area and fibre type composition. *Acta Physiol Scand.* 176(3): 215-225.
- (9) **Gollnick PD, Sjödin B, Karlsson J, Jansson E, Saltin B.** (1974) Human soleus muscle: a comparison of fiber composition and enzyme activities with other leg muscles. *Pflugers Arch.* 348(3): 247-255.
- (10) **Nilwik R, Snijders T, Leenders M, Groen BBL, van Kranenburg J, Verdijk LB, van Loon LJC.** (2013) The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp Gerontol.* 48(5): 492-498.
- (11) **Wilson JM, Loenneke JP, Jo E, Wilson GJ, Zourdos MC, Kim JS.** (2012) The effects of endurance, strength, and power training on muscle fiber type shifting. *J Strength Cond Res.* 26(6): 1724-1729.
- (12) **Lexell J.** (1995) Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 50: 11-16.
- (13) **Murgia M, Toniolo L, Nagaraj N, Ciciliot S, Vindigni V, Schiaffino S, Reggiani C, Mann M.** (2017) Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell Rep.* 19(11): 2396-2409.
- (14) **Trappe TA, Carroll CC, Dickinson JM, LeMoine JK, Haus JM, Sullivan BE, Lee JD, Jemiolo B, Weinheimer EM, Hollon CJ.** (2011) Influence of acetaminophen and ibuprofen on skeletal muscle adaptations to resistance exercise in older adults. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300(3): R655-

- (15) **Harber MP, Konopka AR, Douglass MD, Minchev K, Kaminsky LA, Trappe TA, Trappe S.** (2009) Aerobic exercise training improves whole muscle and single myofiber size and function in older women. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 297(5): R1452-1459.
- (16) **Gollnick PD, Armstrong RB, Saubert CW 4th, Piehl K, Saltin B.** (1972) Enzyme activity and fiber composition in skeletal muscle of untrained and trained man. *J Appl Physiol.* 33(3): 312-319.
- (17) **Lim CH, Gil JH, Quan H, Viet DH, Kim CK.** (2018) Effect of 8-week leucine supplementation and resistance exercise training on muscle hypertrophy and satellite cell activation in rats. *Physiol Rep.* 6(12): e13725.
- (18) **Farrell PA, Fedele MJ, Vary TC, Kimball SR, Lang CH, Jefferson LS.** (1999) Regulation of protein synthesis after acute resistance exercise in diabetic rats. *Am J Physiol.* 276(4): E721-727.
- (19) **DeVol DL, Rotwein P, Sadow JL, Novakofski J, Bechtel PJ.** (1990) Activation of insulin-like growth factor gene expression during work-induced skeletal muscle growth. *Am J Physiol.* 259(1 Pt 1): E89-95.
- (20) **Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M.** (2013) Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J.* 280(17): 4294-4314.
- (21) **Mitchell CJ, Churchward-Venne TA, Bellamy L, Parise G, Baker SK, Phillips SM.** (2013) Muscular and systemic correlates of resistance training-induced muscle hypertrophy. *PLoS One.* 8(10): e78636.
- (22) **Margolis LM, Berryman CE, Murphy NE, Carrigan CT, Young AJ, Carbone JW, Pasiakos SM.** (2018) PI3K-AKT-FOXO1 pathway targeted by skeletal muscle microRNA to suppress proteolytic gene expression in response to carbohydrate intake during aerobic exercise. *Physiol Rep.* 6(23): e13931.
- (23) **Lee SH, Kim BJ, Park DR, Kim UH.** (1985) Exercise induces muscle fiber type switching via transient receptor potential melastatin 2- dependent  $Ca^{2+}$  signaling. *J Appl Physiol.* 124(2): 364-373.
- (24) **Yuan Y, Shi XE, Liu YG, Yang GS.** (2011) FoxO1 regulates muscle fiber-type specification and inhibits calcineurin signaling during C2C12 myoblast differentiation. *Mol Cell Biochem.* 348(1-2): 77-87.
- (25) **Vavvas D, Apazidis A, Saha AK, Gamble J, Patel A, Kemp BE, Witters LA, Ruderman NB.** (1997) Contraction-induced changes in acetyl-CoA carboxylase and 5'-AMP-activated kinase in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 272(20): 13255-13261.
- (26) **Hardie DG.** (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev.* 25(18): 1895-1908.
- (27) **Mikines KJ, Sonne B, Farrell PA, Tronier B, Galbo H.** (1988) Effect of physical exercise on sensitivity and responsiveness to insulin in humans. *Am J Physiol.* 254(3 Pt 1): E248-259.
- (28) **Koopman R, Manders RJF, Zorenc AHG, Hul GBJ, Kuipers H, Keizer HA, van Loon LJC.** (2005) A single session of resistance exercise enhances insulin sensitivity for at least 24 h in healthy men. *Eur J Appl Physiol.* 94(1-2): 180-187.
- (29) **Lee AD, Hansen PA, Holloszy JO.** (1995) Wortmannin inhibits insulin-stimulated but not contraction-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 36(1): 51-54.
- (30) **Richter EA, Hargreaves M.** (2013) Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake. *Physiol Rev.*

- 93(3): 993-1017.
- (31) **Goodyear RJ, Kahn BB.** (1998) Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. *Annu Rev Med.* 49: 235-261.
  - (32) **Dotzert MS, McDonald MW, Murray MR, Nickels JZ, Noble EG, Melling CWJ.** (2018) Effect of Combined Exercise Versus Aerobic-Only Training on Skeletal Muscle Lipid Metabolism in a Rodent Model of Type 1 Diabetes. *Can J Diabetes.* 42(4): 404-411.
  - (33) **Crandall JP, Knowler WC, Kahn SE, Marrero D, Florez JC, Bray GA, Haffner SM, Hoskin M, Nathan DM.** (2008) The prevention of type 2 diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 4(7): 382-393.
  - (34) **Tran TT, Kahn CR.** (2010) Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 6(4): 195-21.
  - (35) **Cousin B, Morroni SCM, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, Casteilla L.** (1992) Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 103(Pt 4): 931-942.
  - (36) **Petrovic N, Walden TB, Shabalina IG, Timmons JA, Cannon B, Nedergaard J.** (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. *J Biol Chem.* 285(10): 7153-7164.
  - (37) **Böström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Böström AB, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP, Spiegelman BM.** (2012) A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature.* 481(7382): 463-468.
  - (38) **Cederberg A, Grønning LM, Åhrén B, Taskén K, Carlsson P, Enerbäck S.** (2001) FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell.* 106(5): 563-573.
  - (39) **Seale P, Conroe HM, Estall J, Kijimura S, Frontini A, Ishibashi J, Cohen P, Cinti S, Spiegelman BM.** (2011) Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest.* 121(1): 96-105.
  - (40) **Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Fulgheri D, Zhang C, Takahashi N, Sarzani R, Collins S.** (2012) Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. *J Clin Invest.* 122(3): 1022-1036.
  - (41) **Trevellin E, Scorzeto M, Olivieri M, Granzotto M, Valerio A, Tedesco L, Fabris R, Serra R, Quarta M, Reggiani C, Nisoli E, Vettor R.** (2014) Exercise training induces mitochondrial biogenesis and glucose uptake in subcutaneous adipose tissue through eNOS-dependent mechanisms. *Diabetes.* 63(8): 2800-2811.
  - (42) **Stanford KI, Middelbeek RJW, Goodyear LJ.** (2015) Exercise Effects on White Adipose Tissue: Beiging and Metabolic Adaptations. *Diabetes.* 64(7): 2361-2368.

- (43) **J van der Windt D, Sud V, Zhang H, Tsung A, Huang H.** (2018) The Effects of Physical Exercise on Fatty Liver Disease. *Gene Expr.* 18(2): 89-101.
- (44) **Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N.** (2001) Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 50(8): 1844-1850.
- (45) **Roden M.** (2006) Mechanisms of Disease: hepatic steatosis in type 2 diabetes-pathogenesis and clinical relevance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2(6): 335-348.
- (46) **Pereira RM, Rodrigues KCC, Anaruma CP, Sant'Ana MR, Pereira de Campos TD, Gaspar RS, Canciglieri RDS, Gomes de Melo D, Mekary RA, Ramos de Silva AS, Cintra DE, Ropelle ER, Pauli JR, Pereira de Moura L.** (2019) Short-term strength training reduces gluconeogenesis and NAFLD in obese mice. *J Endocrinol.* 241(1): 59-70.
- (47) **Keating SE, Hackett DA, Parker HM, O'Connor HT, Gerofi JA, Sainsbury A, Baker MK, Chuter VH, Caterson ID, George J, Johnson NA.** (2015) Effect of aerobic exercise training dose on liver fat and visceral adiposity. *J Hepatol.* 63(1): 174-182.
- (48) **Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R.** (2015) Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 135: 355-380.
- (49) **Pedersen BK, Ullum H.** (1994) NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc.* 26(2): 140-146.
- (50) **Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P.** (2011) Position statiment. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 17: 6-63.
- (51) **Nieman DC, Miller AR, Henson DA, Warren BJ, Gusewitch G, Johnson RL, Davis JM, Butterworth DE, Herring JL, Nehlsen-Cannarella SL.** (1994) Effect of high- versus moderate-intensity exercise on lymphocyte subpopulations and proliferative response. *Int J Sports Med.* 15(4): 199-206.
- (52) **Ortega E, Collazos ME, Maynar M, Barriga C, De la Fuente M.** (1993) Stimulation of the phagocytic function of neutrophils in sedentary men after acute moderate exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 66(1): 60-64.
- (53) **Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Fagoaga OR, Henson DA, Utter A, Davis JM, Williams F, Butterworth DE.** (1998) Effects of mode and carbohydrate on the granulocyte and monocyte response to intensive, prolonged exercise. *J Appl Physiol (1985).* 84(4): 1252-1259.
- (54) **Chen C, Cheng P, Xie H, Zhou HD, Wu XP, Liao EY, Luo XH.** (2014) MiR-503 regulates osteoclastogenesis via targeting RANK. *J Bone Miner Res.* 29(2): 338-347.
- (55) **Cheng P, Chen C, He HB, Hu R, Zhou HD, Xie H, Zhu W, Dai RC, Wu XP, Liao EY, Luo XH.** (2013) miR-148a regulates osteoclastogenesis by targeting V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B. *J Bone Miner Res.* 28(5): 1180-1190.
- (56) **Yang L, Cheng P, Chen C, He HB, Xie GQ, Zhou HD, Xie H, Wu XP, Luo XH.** (2012) miR-93/Sp7

- function loop mediates osteoblast mineralization. *J Bone Miner Res.* 27(7): 1598-1606.
- (57) **Hell RCR, Ocarino NM, Boeloni JN, Silva JF, Goes AM, Santos RL, Serakides R.** (2012) Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potentia of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Acta Physiol (Oxf).* 205(2): 292-301.
- (58) **Marędziak M, Śmieszek A, Chrzastek K, Basinska K, Marycz K.** (2015) Physical Activity Increases the Total Number of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Enhances Their Osteogenic Potential, and Inhibits Their Adipogenic Properties. (2015) *Stem Cells Int.* 2015: 379093.
- (59) **Yuan Y, Chen X, Zhang L, Wu J, Guo J, Zou D, Chen B, Sun Z, Shen C, Zou J.** (2016) The roles of exercise in bone remodeling and in prevention and in prevention and treatment of osteoporosis. *Prog Biophys Mol Biol.* 122(2): 122-130.
- (60) **Lester ME, Urso ML, Evans RK, Pierce JR, Spiering BA, Maresh CM, Hatfield DL, Kraemer WJ, Nindl BC.** (2009) Influence of exercise mode and osteogenic index on bone biomarker responses during short-term physical training. *Bone.* 45(4): 748-776.
- (61) **Bloor CM.** (2005) Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis.* 8(3): 263-271.
- (62) **Breen EC, Jihson EC, Wagner H, Tseng HM, Sung LA, Wagner PD.** (1996) Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol (1985).* 81(1): 355-361.
- (63) **Gustafsson T, Puntchart A, Kaijser L, Jansson E, Sundberg CJ.** (1999) Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. *Am J Physiol.* 276(2): H679-685.
- (64) **Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD.** (1999) Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol.* 277(6): H2247-2252.
- (65) **Lloyd PG, Prior BM, Yang HT, Terjung RL.** (2003) Angiogenic growth factor expression in rat skeletal muscle in response to exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284(5): H1668-1678.
- (66) **Vassilakopoulos T, Deckman G, Kebbewar M, Rallis G, Harfouche R, Hussain SNA.** (2003) Regulation of nitric oxide production in limb and ventilatory muscles during chronic exercise training. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 284(3): L452-457.
- (67) **Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M.** (1996) Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol.* 270(1 Pt 2): H411-415.
- (68) **Lloyd-Williams F, Mair FS, Leitner M.** (2002) Exercise training and heart failure: a systematic review of current evidence. *Br J Gen Pract.* 52(474): 47-55.
- (69) **Lacasse Y, Wong E, Guyatt GH, King D, Cook DJ, Goldstein RS.** (1996) Meta-analysis of respiratory rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 348(9035): 1115-1119.
- (70) **Boulé NG, Haddad E, Kenny GP, Wells GA, Sigal RJ.** (2001) Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials. *JAMA.* 286(10): 1218-1227.
- (71) **Dela F, Handberg A, Mikines KJ, Vinten J, Galbo H.** (1993) GLUT4 nd insulin receptor binding and

- kinase activity in trained human muscle. *J Physiol*. 469: 615-624.
- (72) **Whelton SP, Chin A, Xin X, He J.** (2002) Effects of aerobic exercise on blood pressure: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*. 136(7): 493-503.
- (73) **Pedersen BK, Hoffman-Goetz L.** (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev*. 80(3): 1055-1081.
- (74) **Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK.** (2000) Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol*. 528(Pt 1): 157-163.
- (75) **Pedersen BK, Fischer CP.** (2007) Beneficial health effects of exercise - the role of IL-6 as a myokine. *Trends Pharmacol Sci*. 28(4): 152-156.
- (76) **Pedersen BK and Febbraio MA.** (2008) Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol Rev*. 88(4): 1379-1406.
- (77) **Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M.** (2008) Contractile C2C12 myotubes model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 295(5): E1191-1204.
- (78) **Knudsen SH, Pedersen BK.** (2015) Targeting Inflammation Through a Physical Active Lifestyle and Pharmaceuticals for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep*. 15(10): 82.
- (79) **Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kijimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Höglund K, Gygi SP, Spiegelman BM.** (2012) A PGC1- $\alpha$ - dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature*. 481(7382): 463-468.
- (80) **Xiong XQ, Chen D, Sun HJ, Ding L, Wang JJ, Chen Q, Li YH, Zhou YB, Han Y, Zhang F, Gao XY, Kang YM, Zhu GQ.** (2015) FNDC5 overexpression and irisin ameliorate glucose/lipid metabolic derangements and enhance lipolysis in obesity. *Biochim Biophys Acta*. 1852(9): 1867-1875.
- (81) **Aydin S, Kuloglu T, Aydin S, Eren MN, Celik A, Yilmaz M, Kalayci M, Sahin I, Gungor O, Gurel A, Ogeturk M, Dabak O.** (2014) Cardiac, skeletal muscle and serum irisin responses to with or without water exercise in young and old male rats: cardiac muscle produces more irisin than skeletal muscle. *Peptides*. 52: 68-73.
- (82) **Pedersen BK, Akerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP.** (2007) Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* (1985). 103(3): 1093-1098.
- (83) **Riechman SE, Balasekaran G, Roth SM, Ferrell RE.** (2004) Association of interleukin-15 protein and interleukin-15 receptor genetic variation with resistance exercise training responses. *J Appl Physiol* (1985). 97(6): 2214-2219.
- (84) **Nielsen AR, Mounier R, Plomgaard P, Mortensen OH, Penkowa M, Speersneider T, Pilegaard H, Pedersen BK.** (2007) Expression of interleukin-15 in human skeletal muscle effect of exercise and muscle fiber type composition. *J Physiol*. 584(Pt 1): 305-312.
- (85) **Argilés JM, López-Soriano J, Almendro V, Busquets S, López-Soriano FJ.** (2005) Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity? *Med Res Rev*. 25(1): 49-65.

- (86) **Carbó N, López-Soriano J, Costelli P, Alvarez B, Busquets S, Baccino FM, Quinn LS, López-Soriano FJ, Argilés JM.** (2001) Interleukin-15 mediates reciprocal regulation of adipose and muscle mass: a potential role in body weight control. *Biochim Biophys Acta*. 1526(1): 17-24.
- (87) **Crane JD, MacNeil LG, Lally JS, Ford RJ, Bujal AL, Brar IK, Kemp BE, Raha S, Steinberg GR, Tarnopolsky MA.** (2015) Exercise-stimulates interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging. *Aging Cell*. 14(4): 625-634.
- (88) **Baggiolini M.** (2001) Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*. 250(2): 91-104.
- (89) **Nieman DC, Davis JM, Henson DA, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Carson JA, Brown A, Lee WJ, McAnulty SR, McAnulty LS.** (2003) Carbohydrate ingestion influences skeletal muscle cytokine mRNA and plasma cytokine levels after a 3 h run. *J Appl Physiol* (1985). 94(5): 1917-1925.
- (90) **Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK.** (2001) Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol*. 84(3): 244-245.
- (91) **Chan MHS, Carey AL, Watt MJ, Febbraio MA.** (2004) Cytokine gene expression in human skeletal muscle during concentric contraction: evidence that IL-8, like IL-6, is influenced by glycogen availability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 287(2): R322-327.
- (92) **Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM.** (1992) Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*. 258(5089): 1798-1801.
- (93) **Norrby K.** (1996) Interleukin-8 and de novo mammalian angiogenesis. *Cell Prolif*. 29(6): 315-323.
- (94) **McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ.** (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*. 387(6628): 83-90.
- (95) **Lee SJ, McPherron AC.** (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(16): 9306-9311.
- (96) **Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF, Lee SJ.** (2004) Myostatin mutation associates with gross muscle hypertrophy in a child. *N Engl J Med*. 350(26): 2682-2688.
- (97) **Rodgers BD, Garikipati DK.** (2008) Clinical, agricultural, and evolutionary biology of myostatin: a comparative review. *Endocr Rev*. 29(5): 513-534.
- (98) **Allen DL, Hittel DS, McPherron C.** (2011) Expression and function of myostatin in obesity, diabetes, and exercise adaptation. *Med Sci Sports Exerc*. 43(10): 1828-1835.
- (99) **Zhou W, Liu GH, Yang SH, Mi BB, Ye SN.** (2016) Low-intensity treadmill exercise promotes rat dorsal wound healing. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*. 36(1): 121-126.
- (100) **Keylock KT, Vieira VJ, Wallig MA, DiPietro LA, Schrementi M, Woods J.** (2008) Exercise accelerates cutaneous wound healing and decreases wound inflammation in aged mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294(1): R179-184.
- (101) **Emery CF, Kiecolt-Glaser JK, Glaser R, Malarkey WB, Frid DJ.** (2005) Exercise accelerates wound healing among healthy older adults: a preliminary investigation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*.

- 60(11): 1432-1436.
- (102) **Mirmirani P, Carpenter DM.** (2014) Skin disorders associated with obesity in children and adolescents: a population-based study. *Pediatr Dermatol.* 31(2): 183-190.
  - (103) **Shipman AR, Millington GWM.** (2011) Obesity and the skin. *Br J Dermatol.* 165(4): 743-750
  - (104) **Yosipovitch G, DeVore A, Dawn A.** (2007) Obesity and the skin: skin physiology and skin manifestations of obesity. *J Am Acad Dermatol.* 56(6): 901-916.
  - (105) **Lorincz K, Haluszka D, Kiss N, Gyöngyösi N, Bánvölgyi A, Szipocs R, Wikonkál NM.** (2017) Voluntary exercise impairs murine dermal connective tissue status in high-fat diet-induced obesity. *Arch Dermatol Res.* 309(3): 209-215.
  - (106) **Yu M, King B, Ewert E, Su X, Mardiyati N, Zhao Z, Wang W.** (2016) Exercise activates p53 and negatively regulates IGF-1 pathway in epidermis within a skin Cancer Model. *PLoS One.* 11(8): e0160939.
  - (107) **Aoi W, Naito Y, Takagi T, Tanimura Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Hang LP, Mizushima K, Hirai Y, Korama R, Wada S, Higashi A, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T.** (2013) A novel myokine, secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC), suppresses colon tumorigenesis via regular exercise. *Gut.* 62(6): 882-889.
  - (108) **Seldin MM, Peterson JM, Byerly MS, Wei Z, Wong GM.** (2012) Myonectin (CTRP15), a novel myokine that links skeletal muscle to systemic lipid homeostasis. *J Biol Chem.* 287(15): 11968-11980.
  - (109) **Haugen F, Norheim F, Lian H, Wensaas AJ, Dueland S, Berg O, Funderud A, Skålhegg BS, Raastad T, Drevon CA.** (2010) IL-7 is expressed and secreted by human skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 298(4): C807-816.
  - (110) **Ahn N, Kim K.** (2020) Effects of Aerobic and Resistance Exercise on Myokines in High Fat Diet-Induced Middle-Aged Obese Rats. *Int J Environ Res Public Health.* 17(8): 2685.
  - (111) **Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Osada T, Febbraio MA, Pedersen BK.** (2002) IL-6 and TNF- $\alpha$  expression in, and release from contracting human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283(6): E1272-1278.
  - (112) **McLoughlin TJ, Mylona E, Hornberger TA, Esser KA, Pizza FX.** (2003) Inflammatory cells in rat skeletal muscle are elevated after electrically stimulated contractions. *J Appl Physiol (1985).* 94(3): 876-882.
  - (113) **Marklund P, Mattsson CM, Wåhlin-Larsson B, Ponsot E, Lindvall B, Lindvall L, Ekblom B, Kadi F.** (2013) Extensive inflammatory cell infiltration in human skeletal muscle in response to an ultraendurance exercise bout in experienced athletes. *J Appl Physiol.* 114(1): 66-72.
  - (114) **Nedachi T, Hatakeyama H, Kono T, Sato M, Kanzaki M.** (2009) Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297(4): E866-878.
  - (115) **Kempainen J, Fujimoto T, Kalliokoski KK, Viljanen T, Nuutila P, Knuuti J.** (2002) Myocardial and skeletal muscle glucose uptake during exercise in humans. *J Physiol.* 524 (Pt 2): 403-412.



- (116) **Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD.** (2002) IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 168(7): 3195-3204.
- (117) **Schall TJ.** (1991) Biology of the RANTES/SIS cytokine family. *Cytokine.* 3(3): 165-183.
- (118) **Tarum J, Folkesson M, Atherton PJ, Kadi F.** (2017) Electrical pulse stimulation: an in vitro exercise model for the induction of human skeletal muscle cell hypertrophy. A proof-of-concept study. *Exp Physiol.* 102(11): 1405-1413.
- (119) **Chen W, Nyasha MR, Koide M, Tsuchiya M, Suzuki N, Hagiwara Y, Aoki M, Kanzaki M.** (2019) In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes. *Sci Rep.* 9(1): 11914.
- (120) **He W, Wang P, Chen Q, Li C.** (2020) Exercise enhances mitochondrial fission and mitophagy to improve myopathy following critical limb ischemia in elderly mice via the PGC1 $\alpha$ /FNDC5/irisin pathway. *Skelet Muscle.* 10(1): 25.
- (121) **Melouane A, Yoshioka M, Kanzaki M, St-Amand J.** (2019) Sparc, an EPS-induced gene, modulates the extracellular matrix and mitochondrial function via ILK/AMPK pathways in C2C12 cells. *Life Sci.* 229: 277-287.
- (122) **Son BK, Eto M, Oura M, Ishida Y, Taniguchi S, Ito K, Umeda-Kameyama Y, Kojima T, Akishita M.** (2019) Low-intensity exercise suppresses CCAAT/enhancer-binding protein  $\delta$ /myostatin pathway through androgen receptor in muscle cells. *Gerontology.* 65(4): 397-406.
- (123) **Hotta K, Behnke BJ, Arjmandi B, Ghosh P, Chen B, Brooks R, Maraj JJ, Elam ML, Maher P, Kurien D, Churchill A, Sepulveda JL, Kabolowsky MB, Christou DD, Muller-Delp JM.** (2018) Daily muscle stretching enhances blood flow, endothelial function, capillarity, vascular volume and connectivity in aged skeletal muscle. *J Physiol.* 596(10): 1903-1917.
- (124) **Steenberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Pedersen BK.** (2000) Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol.* 529(Pt 1): 237-242.
- (125) **Sun X, Gupta K, Wu B, Zhang D, Yuan B, Zhang X, Chiang HC, Zhang C, Curiel T, Bendeck MP, Hursting S, Hu Y, Li R.** (2018) Tumor-extrinsic discoidin domain receptor 1 promotes mammary tumor growth by regulating adipose stromal interleukin 6 production in mice. *J Biol Chem.* 293(8): 2841-2849.
- (126) **Gartung A, Yang J, Sukhatme VP, Bielenberg DR, Fernandes D, Chang J, Schmidt BA, Hwang SH, Zurakowski D, Huang S, Kieran MW, Hammock BD, Panigrahy D.** (2019) Suppression of chemotherapy-induced cytokine/lipid mediator surge and ovarian cancer by a dual COX-2/sEH inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 116(5): 1698-1703.
- (127) **Louis E, Raue U, Yang Y, Jemiolo B, Trappe S.** (1985) (2007) Time course of proteolytic, cytokine, and myostatin gene expression after acute exercise in human skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 103(5): 1744-1751.
- (128) **Hittel DS, Axelson M, Sarna N, Shearer J, Huffman KM, Kraus WE.** (2010) Myostatin decreases

- with aerobic exercise and associates with insulin resistance. *Med Sci Sports Exerc.* 42(11): 2023-2029.
- (129) **Clarke MS, Feedback DL.** (1996) Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in differentiated human skeletal muscle cultures. *FASEB J.* 10(4): 502-509.
- (130) **Payne ME, Fong YL, Ono T, Colbran RJ, Kemp BE, Soderling TR, Means AR.** (1988) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. Characterization of distinct calmodulin binding and inhibitory domains. *J Biol Chem.* 263(15): 7190-7195.
- (131) **Liu JO.** (2009) Calmodulin-dependent phosphatase, kinases, and transcription corepressors involved in T-cell activation. *Immunol Rev.* 228(1): 184-198.
- (132) **Wojtaszewski JF, Nielsen P, Hansen BF, Richter EA, Kiens B.** (2000) Isoform-specific and exercise intensity-dependent activation of 5'-AMP-activated protein kinase in human skeletal muscle. *J Physiol.* 528 (Pt 1): 221-226.
- (133) **Combes A, Denkerle J, Webborn N, Watt P, Bougault V, Daussin FN.** (2015) Exercise-induced metabolic fluctuations influence AMPK, p38-MAPK and CaMK II phosphorylation in human skeletal muscle. *Physiol Rep.* 3(9): e12462.
- (134) **Jedrychowski MP, Wrann CD, Paulo JA, Gerber KK, Szpyt J, Robinson MM, Nair KS, Gygi SP, Spiegelman BM.** (2015) Detection and Quantitation of Circulating Human Irisin by Tandem Mass Spectrometry. *Cell Metab.* 22(4): 734-740.
- (135) **Pociask DA, Chen K, Choi SM, Oury TD, Steele C, Kolls JK.** (2011)  $\gamma\delta$  T cells attenuate bleomycin-induced fibrosis through the production of CXCL10. *Am J Pathol.* 178(3): 1167-1176.
- (136) **Makino Y, Cook DN, Smithies O, Hwang OY, Neilson EG, Turka LA, Sato H, Wells AD, Danoff TM.** (2002) Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol.* 102(3): 302-309.
- (137) **Bodnar RJ, Yates CC, Wells A.** (2006) IP-10 blocks vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell motility and tube formation via inhibition of calpain. *Circ Res.* 98(5): 617-625.
- (138) **Bodnar RJ, Yates CC, Rodgers ME, Du X, Wells A.** (2009) IP-10 induces dissociation of newly formed blood vessels. *J Cell Sci.* 122(Pt 12): 2064-2077.
- (139) **Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM.** (2002) Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature.* 418(6899): 797-801.
- (140) **Botta A, Laher I, Beam J, Decoffe D, Brown K, Halder S, Devlin A, Gibson DL, Ghosh S.** (2013) Short term exercise induces PGC-1 $\alpha$ , ameliorates inflammation and increases mitochondrial membrane proteins but fails to increase respiratory enzymes in aging diabetic hearts. *PLoS One.* 8(8): e70248.
- (141) **Mormeneo E, Jimenez-Mallebrera C, Palomer X, De Nigris V, Vázquez-Carrera M, Orozco A, Nascimento A, Colomer J, Lerín C, Gómez-Foix AM.** (2012) PGC-1 $\alpha$  induces mitochondrial and myokine transcriptional programs and lipid droplet and glycogen accumulation in culture human skeletal muscle cells. *PLoS One.* 7(1): e29985.
- (142) **Potthoff MJ, Wu H, Arnold MA, Shelton JM, Backs J, McAnally J, Richardson JA, Bassel-Duby**

- R, Olson EN.** (2007) Histone deacetylase degradation and MEF2 activation promote the formation of slow-twitch myofibers. *J Clin Invest.* 117(9): 2459-2467.
- (143) **Youn GS, Ju SM, Choi SY, Park J.** (2015) HDAC6 mediates HIV-1 tat-induced proinflammatory responses by regulating MAPK-NF-kappaB/AP-1 pathways in astrocytes. *Glia.* 63(11): 1953-1965.
- (144) **Gonneaud A, Gagné JM, Turgeon N, Asselin C.** (2014) The histone deacetylase Hdac1 regulates inflammatory signaling in intestinal epithelial cells. *J Inflamm (Lond).* 11(1): 43.
- (145) **Arenberg DA, White ES, Burdick MD, Strom SR, Strieter RM.** (2001) Improved survival in tumor-bearing SCID mice treated with interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10). *Cancer Immunol Immunother.* 50(10): 533-538.
- (146) **Feldman AL, Friedl J, Lans TE, Libutti SK, Lorang D, Miller MS, Turner EM, Hewitt SM, Alexander HR.** (2002) Retroviral gene transfer of interferon-inducible protein 10 inhibits growth of human melanoma xenografts. *Int J Cancer.* 99(1): 149-153.
- (147) **Sun Y, Finger C, Alvarez-Vallina L, Cichutek K, Buchholz CJ.** (2005) Chronic gene delivery of interferon-inducible protein 10 through replication-competent retrovirus vectors suppresses tumor growth. *Cancer Gene Ther.* 12(11): 900-912.
- (148) **Ringer S.** (1883) A further Contribution regarding the influence of the different Constituents of the Blood on the Contraction of the Heart. *J Physiol.* 4(1): 29-42.
- (149) **Fujita H, Nedachi T, Kanzaki M.** (2007) Accelerated de novo sarcomere assembly by electric pulse stimulation in C2C12 myotubes. *Exp Cell Res.* 313(9): 1853-1865.
- (150) **Crane JD, MacNeil LG, Lally JS, Ford RJ, Bujak AL, Brar IK, Kemp BE, Raha S, Steinberg GR, Tarnopolsky MA.** (2015) Exercise-stimulated interleukin-15 is controlled by AMPK and regulates skin metabolism and aging. *Aging Cell.* 14(4): 625-634.
- (151) **Peterson JM, Pizza FX.** (2009) Cytokines derived from cultures skeletal muscle cells after mechanical strain promote neutrophil chemotaxis in vitro. *J Appl Physiol (1985).* 106(1): 130-137.
- (152) **Yu Y, Zeng H, Lyons S, Carlson A, Merlin D, Neish AS, Gewirtz AT.** (2003) TLR5-mediated activation of p38 MAPK regulates epithelial IL-8 expression via posttranscriptional mechanism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 285(2): G282-290.
- (153) **Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M.** (2018) Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland and Acinar Cells. *Inflammation.* 41(4): 1172-1181.
- (154) **Kanda N, Watanabe S.** (2007) Prolactin enhances interferon-gamma-induced production of CXC ligand 9 (CXCL9), CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes. *Endocrinology.* 148(5): 2317-2325.
- (155) **Crescioli C, Sottili M, Bonini P, Cosmi L, Chiarugi P, Romagnani P, Vannelli GB, Colletti M, Isidori AM, Serio M, Lenzi A, Luigi LD.** (2012) Inflammatory response in human skeletal muscle cells: CXCL10 as a potential therapeutic target. *Eur J Cell Biol.* 91(2): 139-149.
- (156) **Park SG, Kang YS, Ahn YH, Lee SH, Kim KR, Kim KW, Koh GY, Ko YG, Kim S.** (2002) Dose-dependent biphasic activity of tRNA synthetase-associating factor, p43, in angiogenesis. *J Biol Chem.*

277(47): 45243-45248.

- (157) **Wang W, Tan J, Xing Y, Kan N, Ling J, Dong G, Liu G, Chen H.** (2016) p43 induces IP-10 expression through the JAK-STAT signaling pathway in HMEC-1 cells. *Int J Mol Med.* 38(4): 1217-1224.
- (158) **Alrashdan YA, Alkhouri H, Chen E, Lalor DJ, Poniris M, Henness S, Brightling CE, Burgess JK, Armour CL, Ammit AJ, Hughes JM.** (2012) Asthmatic airway smooth muscle CXCL10 production: mitogen-activated protein kinase JNK involvement. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 302(10): L1118-1127.
- (159) **Liu T, Cao H, Ji Y, Pei Y, Yu Z, Quan Y, Xiang M.** (2015) Interaction of dendritic cells and T lymphocytes for the therapeutic effect of Dangguiuliu Huang decoction to autoimmune diabetes. *Sci Rep.* 5: 13982.
- (160) **Nguyen LTH, Ahn SH, Nguyen UT, Yang IJ.** (2018) Dang-Gui-Liu-Huang Tang a traditional herbal formula, ameliorates imiquimod-induced psoriasis like skin inflammation in mice by inhibiting IL-22 production. *Phytomedicine.* 47: 48-57.
- (161) **Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Jin D, Huang XZ, Li JH, Deung YK, Lee KJ.** (2009) Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol.* 220(3): 690-697.
- (162) **Madani A, Alack K, Richter MJ, Krüger K.** (2018) Immune-regulating effects of exercise on cigarette smoke-induced inflammation. *J Inflamm Res.* 11: 155-167.
- (163) **Raynaud F, Carnac G, Marcilhac A, Benyamin Y.** (2004) m-Calpain implication in cell cycle during muscle precursor cell activation. *Exp Cell Res.* 298(1): 48-57.
- (164) **Zhu G, Liu Y, Zhi Y, Jin Y, Li J, Shi W, Liu Y, Han Y, Yu S, Jiang J, Zhao X.** (2019) PKA- and Ca<sup>2+</sup>-dependent p38 MAPK/CREB activation protects against manganese-mediated neuronal apoptosis. *Toxicol Lett.* 309: 10-19.
- (165) **Hsu SS, Huang CJ, Cheng HH, Chou CT, Lee HY, Wang JL, Chen IS, Liu SI, Lu YC, Chang HT, Huang JK, Chen JS, Jan CR.** (2007) Anandamide-induced Ca<sup>2+</sup> elevation leading to p38 MAPK phosphorylation and subsequent cell death apoptosis in human osteosarcoma cells. *Toxicology.* 231(1): 21-29.
- (166) **Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P.** (2011) Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 17: 6-63.
- (167) **Epstein EH Jr, Munderloh NH.** (1975) Isolation and characterization of CNBr peptides of human (alpha 1 (III))3 collagen and tissue distribution of (alpha a(I))2 alpha 2 and (alpha 1 (III))3 collagens. *J Biol Chem.* 250(24): 9304-9312.
- (168) **Lang K, Schmid FX, Fisher G.** (1987) Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature.* 329(6136): 268-270.
- (169) **Clarke EP, Cates GA, Ball EH, Sanwal BD.** (1991) A collagen-binding protein in the endoplasmic

- reticulum of myoblasts exhibits relationship with serine protease inhibitors. *J Biol Chem.* 266(26): 17230-17235.
- (170) **Veis A, Payne K.** (1988) Collagen fibrillogenesis, in: M.E. Nimni (Ed.), *Collagen Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton: 113.
- (171) **Silver D, Miller J, Harrison R, Prockop DJ.** (1992) Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(20): 9860-9864.
- (172) **Zhang H, Jani P, Liang T, Lu Y, Qin C.** (2017) Inactivation of bone morphogenetic protein 1 (Bmp1) and tolloid-like 1 (Tll1) in cells expressing type I collagen leads to dental and periodontal defects in mice. *J Mol Histol.* 48(2): 83-98.
- (173) **Okada H.** (2011) Tolloid-like proteinases orchestrate extracellular matrix formation. *J Am Soc Nephrol.* 22(4): 588-589.
- (174) **Doren SRV.** (2015) Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin. *Matrix Biol.* 44-46: 224-231.
- (175) **Ishiuchi Y, Sato H, Tsujimura K, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T.** (2018) Skeletal muscle cell contraction reduces a novel myokine, chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10): potential roles in exercise-regulates angiogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 82(1): 97-105.
- (176) **Mizutani Y, Kanbe A, Ito H, Seishima M.** (2020) Activation of STING accelerates skin wound healing. *J Dermatol Sci.* 97(1): 21-29.
- (177) **Shiraha H, Glading A, Gupta K, Wells A.** (1999) IP-10 inhibits epidermal growth factor-induced motility by decreasing epidermal growth factor receptor-mediated calpain activity. *J Cell Biol.* 146(1): 243-254.
- (178) **Vukusic K, Asp J, Henriksson HB, Brisby H, Lindahl A, Sandstedt J.** (2015) Physical exercise affects slow cycling cells in the rat heart and reveals a new potential niche area in the atrioventricular junction. *J Mol Histol.* 46(4-5): 387-398.
- (179) **Lu YP, Lou YR, Nolan B, Peng QY, Xie JG, Wagner GC, Conney AH.** (2006) Stimulatory effect of voluntary exercise or fat removal (partial lipectomy) on apoptosis in the skin of UVB light-irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103(44): 16301-16306.
- (180) **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** (2006) *Molecular Biology of the Cell.* 4 th edition. Fibroblasts and their transformations: The connective-tissue cell family. *Garland Science.*
- (181) **Schneider EL, Mitsui Y, Au KS, Shorr SS.** (1977) Tissue-specific differences in cultures human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res.* 108(1): 1-6.
- (182) **Aizawa S, Mitsui Y, Kurimoto F, Matsuoka K.** (1980) Cell-surface changes accompanying aging in human diploid fibroblasts: effects of tissue, donor age and genotype. *Mech Ageing Dev.* 13(3): 297-307.
- (183) **Du M, Wang Y, Liu Z, Wang L, Cao Z, Zhang C, Hao Y, He H.** (2019) Effects of IL-1 $\beta$  on MMP-9

- Expression in Cementoblast-Derived Line and MMP-Mediated Degradation of Type I Collagen. *Inflammation*. 42(2): 413-425.
- (184) **Zigrino P, Brinckmann J, Niehoff A, Lu Y, Giebeler N, Eckes B, Kadler K, Mauch C.** (2016) Fibroblast-Derived MMP-14 Regulates Collagen Homeostasis in Adult Skin. *J Invest Dermatol*. 136(8): 1575-1583.
- (185) **Yang Y, Kim HJ, Woo KJ, Cho D, Bang SI.** (2017) Lipo-PGE1 suppresses collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK/Ets-1 signaling pathway. *PLoS One*. 12(6): e0179614.
- (186) **Kim HJ, Song SB, Choi JM, Kim KM, Cho BK, Cho DH, Park HJ.** (2010) IL-18 downregulates collagen production in human dermal fibroblasts via the ERK pathway. *J Invest Dermatol*. 130(3): 706-715.
- (187) **Goldberg-Bittman L, Sagi-Assif O, Meshel T, Nevo I, Levy-Nissenbaum O, Yron I, Witz IP, Ben-Baruch A.** (2005) Cellular characteristics of neuroblastoma cells: regulation by the ELR-CXCL chemokine CXCL10 and expression of a CXCR3-like receptor. *Cytokine*. 29(3): 105-117.
- (188) **Petrai I, Rombouts K, Lasagni L, Annunziato F, Cosmi L, Romanelli RG, Sagrinati C, Mazzinghi B, Pinzani M, Romagnani S, Romagnani P, Marra F.** (2008) Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effects of the chemokine receptor CXCR3-B. *Int J Biochem Cell Bio*. 40(9): 1764-1774.
- (189) **Kim DU, Chung HC, Choi J, Sakai Y, Lee BY.** (2018) Oral intake of low-molecular-weight collagen peptide improves hydration, elasticity, and wrinkling in human skin: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrients*. 10(7): 826.
- (190) **Rittié L, Fisher GJ.** (2015) Natural and sun-induced aging of human skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5(1): a015370.
- (191) **Pinnell SR.** (1982) Regulation of collagen synthesis. *J Invest Dermatol*. 79 Suppl 1: 73s-76s.
- (192) **Duracková Z.** (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 59(4): 459-469.
- (193) **Kammeyer A, Luiten RM.** (2015) Oxidation events and skin aging. *Ageing Res Rev*. 21: 16-29.
- (194) **Rittié L, Fisher GJ.** (2002) UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev*. 1(4): 705-720.
- (195) **Zouboulis CC, Makrantonaki E.** (2011) Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol*. 29(1): 3-14.
- (196) **Cunningham O, Gore MG, Mantle TJ.** (2000) Initial-rate kinetics of the flavin reductase reaction catalysed by human biliverdin-IXbeta reductase (BVR-B). *Biochem J*. 345 Pt 2(Pt 2): 393-399.
- (197) **Shalloe F, Elliott G, Ennis O, Mantle TJ.** (1996) Evidence that biliverdin-IX beta reductase and flavin reductase are identical. *Biochem J*. 316 (Pt 2): 385-387.
- (198) **Xu K, He Z, Chen M, Wang N, Zhang D, Yang L, Xu Z, Xu H.** (2020) HIF-1 $\alpha$  regulates cellular metabolism, and Imatinib resistance by targeting phosphogluconate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors. *Cell Death Dis*. 11(7): 586.
- (199) **Biteau B, Labarre J, Toledano MB.** (2003) ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin (sulfiredoxin). *Nature*. 425(6961): 980-984.

- (200) **Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG.** (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *J Biol Chem.* 279(49): 50994-51001.
- (201) **Zhou Y, Duan S, Zhou Y, Yu S, Wu J, Wu X, Zhao J, Zhao Y.** (2015) Sulfiredoxin-1 attenuates oxidative stress via Nrf2/ARE pathway and 2-Cys Prdxs after oxygen-glucose deprivation in astrocytes. *J Mol Neurosci.* 55(4): 941-950.
- (201) **Raemdonck KV, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S.** (2015) CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26(3): 311-327.
- (202) **Altara R, Manca M, Brandão RD, Zeidan A, Booz GW, Zouein FA.** (2016) Emerging importance of chemokine receptor CXCR3 and its ligands in cardiovascular disease. *Clin Sci (Lond).* 130(7): 463-478.
- (203) **Tu Y, Quan T.** (2016) Oxidative Stress and Human Skin Connective Tissue Aging. *Cosmetics.* 3(3): 28.
- (204) **Akhmedov D, Berdeaux R.** (2013) The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front Physiol.* 4: 37.
- (205) **Bianchi L, Volpato S.** (2016) Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient's mobility and independence. *Acta Diabetol.* 53(6): 879-889.
- (206) **Gaster M, Staehr P, Beck-Nielsen H, Schröder HD, Handberg A.** (2001) GLUT4 is reduced in slow muscle fibers of type 2 diabetic patients: is insulin resistance in type 2 diabetes a slow, type 1 fiber disease? *Diabetes.* 50(6): 1324-1329.
- (207) **Farup J, Rahbek SK, Knudsen IK, de Paoli F, Mackey AL, Vissing K.** (2014) Whey protein supplementation accelerates satellite cell proliferation during recovery from eccentric exercise. *Amino Acids.* 46(11): 2503-2516.
- (208) **Pereira MG, Baptista IL, Carlassara EOC, Moriscot AS, Aoki MS, Miyabara EH.** (2014) Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PLoS One.* 9(1): e85283.
- (209) **Choi WH, Son HJ, Jang YJ, Ahn J, Jung CH, Ha TY.** (2017) Apigenin Ameliorates the Obesity-Induced Skeletal Muscle Atrophy by Attenuating Mitochondrial Dysfunction in the Muscle of Obese Mice. *Mol Nutr Food Res.* 61(12): 1700218.
- (210) **Kurdiova T, Balaz M, Vician M, Maderova D, Vlcek M, Valkovic L, Srbecky M, Imrich R, Kyselovicova O, Belan V, Jelok I, Wolfrum C, Klimes I, Krssak M, Zemkova E, Gasperikova D, Ukropec J, Ukropkova B.** (2014) Effects of obesity, diabetes and exercise on Fndc5 gene expression and irisin release in human skeletal muscle and adipose tissue: in vivo and in vitro studies. *J Physiol.* 592(5): 1091-1107.
- (211) **Bozzetto L, Prinster A, Mancini M, Giacco R, Natale CD, Salvatore M, Riccardi G, Rivellese AA, Annuzzi G.** (2011) Liver fat in obesity: role of type 2 diabetes mellitus and adipose tissue distribution. *Eur J Clin Invest.* 41(1): 39-44.

- (212) **Guglielmi V, Sbraccia P.** (2018) Obesity phenotypes: depot-differences in adipose tissue and their clinical implications. *Eat Weight Disord.* 23(1): 3-14.
- (213) **Bitar MS.** (2019) Diabetes impairs angiogenesis and induces endothelial cell senescence by up-regulating thrombospondin-CD47-dependent signaling. *Int J Mol Sci.* 20(3): 673.
- (214) **Hu MB, Xu H, Zhu WH, Bai PD, Hu JM, Yang T, Jiang HW, Ding Q.** (2018) High-fat diet-induced adipokine and cytokine alterations promote the progression of prostate cancer *in vivo* and *in vitro*. *Oncol Lett.* 15(2): 1607-1615.
- (215) **Goodpaster BH, Park SW, Harris TB, Kritchevsky SB, Nevitt M, Schwartz AV, Simonsick EM, Tyllavsky FA, Visser M, Newman AB.** (2006) The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 61(10): 1059-1064.
- (216) **Jeon JY, Choi SE, Ha ES, Lee HB, Kim TH, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Kang Y, Lee KW.** (2019) GLP-1 improves palmitate-induced insulin resistance in human skeletal muscle via SIRT1 activity. *Int J Mol Med.* 44(3): 1161-1171.
- (217) **Talbot NA, Wheeler-Jones CP, Cleasby ME.** (2014) Palmitoleic acid prevents palmitic acid-induced macrophage activation and consequent p38 MAPK-mediated skeletal muscle insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol.* 393(1-2): 129-142.
- (218) **Kadotani A, Tsuchiya Y, Hatakeyama H, Katagiri H, Kanzaki M.** (2009) Different impacts of saturated and unsaturated free fatty acids on COX-2 expression in C2C12. *Am J physiol Endocrinol Metab.* 297(6): E1291-E1303.
- (219) **Dela F, Ingersen A, Andersen NB, Nielsen MB, Petersen HHH, Hansen CN, Larsen S, Wojtaszewski J, Helge JW.** (2019) Effects of one-legged high-intensity interval training on insulin-mediated skeletal muscle glucose homeostasis in patients with type 2 diabetes. *Acta Physiol (Oxf).* 226(2): e13245.
- (220) **Zheng J, Chen S, Albiero ML, Vieira GHA, Wang J, Feng JQ, Graves DT.** (2018) Diabetes Activates Periodontal Ligament Fibroblasts via NF- $\kappa$ B *In Vivo*. *J Dent Res.* 97(5): 580-588.
- (221) **Weigert C, Brodbeck K, Staiger H, Kausch C, Machicao F, Häring HU, Schleicher ED.** (2004) Palmitate, but not unsaturated fatty acids, induces the expression of interleukin-6 in human myotubes through proteasome-dependent activation of nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem.* 279(23): 23942-23952.
- (222) **Pinho RA, Sepa-Kishi DM, Bikopoulos G, Wu MV, Uthayakumar A, Mohasses A, Hughes MC, Perry CGR, Ceddia RB.** (2017) High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med.* 110: 381-389.
- (223) **Schoonbroodt S, Ferreira V, Best-Belpomme M, Boelaert JR, Legrand-Poels S, Korner M, Piette J.** (2000) Crucial role of the amino-terminal tyrosine residue 42 and the carboxyl-terminal PEST domain of I kappa B alpha in NF-kappa B activation by an oxidative stress. *J Immunol.* 164(8): 4292-4300.



- (224) **Takeda Y, Mukhopadhyay A, Kundu GC, Mahabeleshwar GH, Singh S, Aggarwal BB.** (2003) Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 278(26): 24233-24241.
- (225) **Wang Y, Pessin JE.** (2013) Mechanisms for fiber-type specificity of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16(3): 243-250.
- (226) **Ambrose C.** (2015) Muscle weakness during aging: a deficiency state in involving declining angiogenesis. *Ageing Res Rev.* 23 (Pt B): 139-153.
- (227) **Peterson JM, Pizza FX.** (2009) Cytokines derived from cultured skeletal muscle cell after mechanical strain promote neutrophil chemotaxis in vitro. *J Appl Physiol (1985).* 106(1): 130-137.
- (228) **Leal LG, Lopes MA, Batista ML Jr.** (2018) Physical Exercise-Induced Myokines and Muscle-Adipose Tissue Crosstalk: A Review of Current Knowledge and the Implications for Health and Metabolic Disease. *Front Physiol.* 9: 1307.
- (229) **Gomez-Cambronero J.** (2003) Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS Lett.* 550(1-3): 94-100.
- (230) **Kulkarni U, Karsten CM, Kohler T, Hammerschmidt S, Bommert K, Tiburzy B, Meng L, Thieme L, Recke A, Ludwig RJ, Pollok K, Kalies K, Bogen B, Boettcher M, Kamradt T, Hauser AE, Langer C, Huber-Lang M, Finkelman FD, Köhl J, Wong DM, Manz RA.** (2016) IL-10 mediates plasmacytosis-associated immunodeficiency by inhibiting complement-mediated neutrophil migration. *J Allergy Clin Immunol.* 137(5): 1487-1497.
- (231) **Huen AC, Wells A.** (2012) The Beginning of the End: CXCR3 Signaling in Late-Stage Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 1(6): 244-248.
- (232) **Kim DU, Chyng HC, Choi J, Sakai Y, Lee BY.** (2018) Oral Intake of Low-Molecular-Weight Collagen Peptide Improves Hydration, Elasticity, and Wrinkling in Human Skin: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Nutrients.* 10(7): 826.
- (233) **Ono M, Masaki A, Maeda A, Klits TM, Hara ES, Komori T, Pham H, Koboki T, Young MF.** (2018) CCN4/WISP1 controls cutaneous wound healing by modulating proliferation, migration and ECM expression in dermal fibroblasts via  $\alpha 5 \beta 1$  and TNF $\alpha$ . *Matrix Biol.* 68-69: 533-546.
- (234) **Hojman P, Brolin C, Nørgaard-Christensen N, Dethlefsen C, Lauenborg B, Olsen CK, Åbom MM, Krag T, Gehl J, Pedersen BK.** (2019) IL-6 release from muscles during exercise is stimulated by lactate-dependent protease activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 316(5): E940-947.
- (235) **Maalouf GE, Khoury DE.** (2019) Exercise-induced irisin, the fat browning myokine, as a potential anticancer agent. *J Obes.* 2019: 6561726.
- (236) **Frydelund-Larsen L, Penkowa M, Akerstrom T, Zankari A, Nielsen S, Pedersen BK.** (2007) Exercise induces interleukin-8 receptor (CXCR2) expression in human skeletal muscle. *Exp Physiol.* 92(1): 233-240.
- (237) **Akerstrom T, Steensberg A, Keller P, Keller C, Penkowa M, Pedersen BK.** (2005) Exercise induces

- interleukin-8 expression in human skeletal muscle. *J Physiol.* 563 (Pt 2): 507-516.
- (238) **Garneau L, Parsons SA, Smith SR, Mulvihill EE, Sparks LM, Aguer C.** (2020) Plasma myokine concentrations after acute exercise in non-obese and obese sedentary women. *Front Physiol.* 11: 18.
- (239) **Gatta PAD, Cameron-Smith D, Peake JM.** (2014) Acute resistance exercise increases the expression of chemotactic factors within skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol.* 114(10): 2157-2167.
- (240) **Roth SM, Martel GF, Ferrell RE, Metter EJ, Hurley BF, Rogers MA.** (2003) Myostatin gene expression is reduced in humans with heavy-resistance strength training: a brief communication. *Exp Biol Med (Maywood).* 228(6): 706-709.
- (241) **Richardson RS, Wagner H, Mudaliar SR, Henry R, Noyszewski EA, Wagner PD.** (1999) Human VEGF gene expression in skeletal muscle: effect of acute normoxic and hypoxic exercise. *Am J Physiol.* 277(6): H2247-2252.

# 研究成果

## 学術論文（査読有）

- (1) **Ishiuchi-Sato Y**, Hiraiwa E, Shinozaki A, Nedachi T. (2020) The effects of glucose and fatty acids on CXCL10 expression in skeletal muscle cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 84(12): 2448-2457.
- (2) **Ishiuchi Y**, Sato H, Komatsu N, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T. (2018) Identification of CCL5/RANTES as a novel contraction-reducible myokine in mouse skeletal muscle. *Cytokine*. 108: 17-23.
- (3) **Ishiuchi Y**, Sato H, Tsujimura K, Kawaguchi H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M, Nedachi T. (2018) Skeletal muscle cell contraction reduces a novel myokine, chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (CXCL10): potential roles in exercise-regulated angiogenesis. *Biosci Biotechnol Biochem*. 82(1): 97-105.
- (4) Ariga M, Yoneyama Y, Fukushima T, **Ishiuchi Y**, Ishii T, Sato H, Hakuno F, Nedachi T, Takahashi SI. (2017) Glucose deprivation attenuates sortilin levels in skeletal muscle cells. *Endocr J* 63(3): 255-268.
- (5) Kawashima KI, **Ishiuchi Y**, Konnai M, Komatsu S, Sato H, Kawaguchi H, Miyanishi N, Lamartine J, Nishihara M, Nedachi T. (2016) Glucose deprivation regulates the progranulin-sortilin axis in PC12 cells. *FEBS Open Bio*. 7(2): 149-159.

## 著書

- (1) 根建 拓、**石内 友里** (2019) 運動依存性マイオカインと代謝機能 「骨格筋研究を核とした筋スマート社会」 株式会社シーエムシー・リサーチ

## 国際学会における発表

- (1) **Ishiuchi Y**, Sato K, Fujinuma N, Mieghebielle M, Nedachi T. Temperature-dependent secretome profiling in C2C12 myotubes: potential roles of CXCL10 reduction by heat dependent stress. The American Society for Cell Biology ASCB|EMBO 2018 meeting. San Diego, CA, USA, December 2018.
- (2) Miyashita C, Tanabe T, **Ishiuchi Y**, Ukai T, Nedachi T. Contraction-dependent modification of extracellular vesicles derived from C2C12 myotubes. The American Society for Cell Biology ASCB|EMBO 2018 meeting. San Diego, CA, USA, December 2018.
- (3) **Ishiuchi Y**, Sato H, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Kawaguchi H, Nishihara M, Nedachi T. Identification of CXCL10 as a contraction-reduced myokine in mouse skeletal muscle. The European Molecular Biology Organization (EMBO) Meeting 2016, Menheim, Germany. September 2016.

## 国内学会における発表

- (1) **Ishiuchi-Sato Y**, Nedachi T. CXCL10, an exercise-regulated myokine, controls the expression of redox enzyme gene expression in mouse dermal fibroblasts. Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Online. December 2020. (発表予定)

- (2) 石内-佐藤 友里、根建 拓: 運動依存的なマイオカイン発現変化による皮膚機能制御の解明、日本分子生物学会 第 42 回年会、福岡、2019 年 12 月
- (3) 宮下 千穂、郡司 美里、石内 友里、根建 拓: 骨格筋における暑熱依存的なエクソソーム放出の生理的意義、日本分子生物学会 第 42 回年会、福岡、2019 年 12 月
- (4) 石内 友里、佐藤 圭、藤沼 奈津季、Miegebielle Marie、根建 拓: C2C12 筋管細胞における運動及び暑熱ストレスに応答した CXCL10 発現の変化、日本分子生物学会 第 41 回年会、神奈川、2018 年 11 月
- (5) 宮下 千穂、田辺 岳海、石内 友里、根建 拓: 骨格筋由来エクソソームの運動依存的な動態及び生理作用の変化、日本分子生物学会 第 41 回年会、神奈川、2018 年 11 月
- (6) 石内 友里、根建 拓: 運動依存的な新規マイオカインの分泌変化及び発現制御メカニズム、第 4 回日本筋学会学術集会、岡山、2018 年 8 月
- (7) 宮下 千穂、田辺 岳海、石内 友里、根建 拓: 骨格筋由来エクソソーム の運動依存的な動態変化、第 4 回日本筋学会学術集会、岡山、2018 年 8 月
- (8) 石内 友里、園田 彩乃、辻村 和希、小松 愛海、能勢 千晶、根建 拓: 運動・暑熱・栄養条件の変化に応答した新規マイオカイン CXCL10 の発現制御、日本農芸化学会 2018 年度大会、愛知、2018 年 3 月
- (9) 石内 友里、佐藤 整、川口 英夫、根建 拓: 運動および栄養条件の変化による CXCL10 の発現変動、日本農芸化学会 2017 年度大会、京都、2017 年 3 月

# 謝辞

本研究の遂行及び論文の執筆にあたり、終始、親身な御指導御鞭撻を賜りました根建 拓教授 (東洋大学大学院 生命科学研究科)に深く御礼申し上げます。親身な御指導を賜りました児島 伸彦教授 (東洋大学大学院 生命科学研究科)、小柴 和子教授 (東洋大学大学院 生命科学研究科)、川口 英夫教授 (東洋大学大学院 生命科学研究科)に深く感謝いたします。

C2C12 細胞をご分与いただいた高橋 伸一郎教授 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)、長森 英二准教授 (大阪工業大学 工学部 生命工学科)、藤田 英明氏 (国立研究開発法人理化学研究所 生命機能科学研究センター)に感謝申し上げます。動物実験をはじめ、研究の遂行にあたり丁寧な御指導、ご助言を賜りました西原 眞杉教授 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)、山内 啓太郎准教授 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)、松脇 貴志准教授 (東京大学大学院 農学生命科学研究科)に心より感謝申し上げます。本研究は日本学術振興会、東洋大学生体医工学研究センター、東洋大学井上円了記念研究助成、東洋大学国際教育センター海外留学促進奨学金によって遂行できたことを感謝いたします。

研究の遂行にあたり、ご協力いただき、有意義な議論を交わした佐藤 和典氏 (東洋大学大学院 生命科学研究科)、佐藤 整氏 (東洋大学大学院 生命科学研究科)、宮下 千穂氏 (東洋大学大学院 生命科学研究科)、辻村 和希氏 (東洋大学 生命科学部)、小松 愛海氏 (東洋大学 生命科学部)、篠崎 綾香氏 (東洋大学 生命科学部)、平岩 絵梨花氏 (東洋大学 生命科学部)、動物細胞工学研究室、東京大学大学院 農学生命科学研究科・農学部 獣医生理学研究室の皆様感謝申し上げます。

最後に、これまでの研究生生活を精神的、経済的に支えてくださった家族に深く感謝いたします。