

# 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

学籍番号 4910180001

氏名 佐藤友里

主指導教員 根建 拓

副指導教員 児島伸彦

副指導教員 小柴和子

## 【背景】

運動は骨格筋の肥大化や代謝の亢進に寄与するなど様々な効果を及ぼす一方、脂肪組織や肝臓の代謝亢進、免疫システムの制御など骨格筋以外の他組織や器官にもその効果を示すことが知られてきた。近年、これら骨格筋以外の組織への運動効果の一部は、骨格筋から分泌されるタンパク質やペプチド群（マイオカイン）により仲介されることが示唆されてきた。しかし、運動依存的に発現が制御されるマイオカイン（運動制御性マイオカイン）の全体像は不明なままであり、さらに同定され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残っている。

近年、運動による皮膚の機能制御が大きな注目を集めている。例えば、運動を行うことで皮膚の創傷治癒促進や老化制御、さらには癌の増悪などに影響を与えることが報告されている。一方、これらの運動依存的な皮膚機能制御のメカニズムはほとんど分かっておらず、運動制御性マイオカインの関与についても詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、新規の運動制御性マイオカインを同定し、マイオカインを介した運動依存的な皮膚機能制御を明らかにすることを目的とした。

## 【第一章】

第一章では、マウス骨格筋由来 C2C12 細胞に電気パルス刺激 (Electrical pulse stimulation; EPS) を負荷することで収縮させる C2C12-EPS 系と、一度に複数のサイトカインの解析が可能である Cytokine array を組み合わせることで新規運動制御性マイオカインの一括探索を試みた。C2C12 筋管細胞に 1 Hz, 2 ms, 20 V の条件で 24 時間の EPS 刺激を負荷して収縮させ、Cytokine array により培養上清中サイトカイン分泌変化について調べた。その結果、C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) 及び C-C motif chemokine ligand 5 (CCL5) の分泌が EPS 負荷により有意に減少することが分かった。この EPS 依存的な CXCL10 及び CCL5 の減少は ELISA 法でも確認され、さらに *Cxcl10*, *Ccl5* 遺伝子発現も EPS 負荷により有意に減少することが明らかとなった。以上の結果から、CXCL10 及び CCL5 を新規の運動により発現分泌が減少するマイオカイン（運動抑制性マイオカイン）の候補とした。

さらに動物個体における運動依存的な CXCL10 及び CCL5 制御を調査するために、急性的な運動効果の検証を目的とした Treadmill による強制走行モデル、慢性的な運動効果を検証するための Running Wheel による自由走行モデルを用いた解析を行った。CXCL10 については、強制走行群のヒラメ筋 (Soleus muscle; SOL)における遺伝子発現が対照群と比較して有意に減少、さらに自由走行群でも SOL における発現減少傾向が見られた。一方、CCL5 については、自由走行群のみ前脛骨筋 (Tibialis anterior muscle; TA)及び大腿四頭筋 (Quadriceps femoral muscle; Quad)における遺伝子発現が対照群と比較して有意に減少した。以上、CXCL10 及び CCL5 は骨格筋細胞から直接分泌され、収縮によって分泌量が減少すること、動物走行モデルでも運動による遺伝子発現減少が観察されたことから、CXCL10 及び CCL5 を新規の運動抑制性マイオカインとして同定した。

本章において、運動依存的な *Cxcl10* 遺伝子発現減少は遅筋である SOL で観察され、*Ccl5* 遺伝子発現減少は速筋である TA 及び Quad で確認された。さらに、遅筋における *Ccl5* 遺伝子発現は運動依存的に有意に上昇することも示された。このような違いが見られた理由としては速筋と遅筋におけるエネルギー代謝システムやヒストン修飾が異なる可能性が考えられる。エネルギー代謝に関しては、遅筋において Peroxisome proliferators-activated receptor- $\gamma$  co-activator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) の発現が高く、運動によりさらに上昇することが報告されているほか、糖尿病モデルマウスへの運動負荷による心臓での PGC-1 $\alpha$  上昇に伴って血中 CXCL10 濃度が減少することも知られている。さらに、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 発現が上昇することも報告されている。以上のことから、遅筋における CXCL10 及び CCL5 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。また、速筋及び遅筋におけ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、Histone deacetylase (HDAC)4 をはじめとするクラス II の HDAC は速筋において高発現しており、遅筋においては発現が低いことが知られている。CXCL10 や CCL5 遺伝子発現は、それぞれ HDAC6 及び HDAC1 によって制御されているが、今後、速筋及び遅筋におけるこれら HDAC 発現量の差異を解析していくことが重要である。

## 【第二章】

第二章においては、抗腫瘍活性を持つことや血管新生の抑制など多岐にわたる作用を持つ CXCL10 に着目し、骨格筋収縮に応答した発現分泌制御メカニズムの解明を行った。本章では特に骨格筋収縮時に大きな動態変化を示すことが知られており、骨格筋収縮に必須である細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇、筋収縮依存的に活性化する Adenosine monophosphate activates protein kinase (AMPK)、ストレス応答性 Mitogen activated protein kinase (MAPK)の 1 つである p38 MAPK に着目し、CXCL10 発現減少を制御するメカニズム解明を試みた。まず、C2C12 筋管細胞を電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害剤である Verapamil の存在下、あるいは非存在下で EPS を負荷し、培養上清中の CXCL10 濃

度変化調べたところ、Verapamil 添加によって EPS 依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少は見られなくなった。また、p38 MAPK の特異的阻害剤である SB203580 存在下で EPS を負荷した際にも同様に EPS 依存的な CXCL10 分泌及び遺伝子発現減少が打ち消された。一方、AMPK の特異的活性化剤である 5-Aminoimidazole-4-carboximide ribonucleotide (AICAR) の添加は EPS 依存的な CXCL10 分泌量に顕著な影響を与えず、遺伝子発現に関しては逆に約 2.1 倍に上昇することが分かった。以上の結果より、運動依存的な CXCL10 発現分泌は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇や p38 MAPK により制御されていることが示唆された。

本章において、収縮依存的な CXCL10 減少に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇及び p38 MAPK 活性化が関与していることが明らかになったが、神経細胞などにおいて、p38 MAPK は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇によって活性化されるという報告もある。そのため、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇に伴って p38 MAPK が活性化し、CXCL10 が減少する可能性も考えられる。

### 【第三章】

第三章では、皮膚機能制御における運動依存的な CXCL10 減少の生理的意義を検討した。まず、動物強制走行モデルにおける運動依存的なコラーゲン産生促進を検討したところ、走行群の皮膚組織における *Colla1* 遺伝子発現が対照群と比較して約 3.6 倍に上昇していることが分かった。次に、この運動依存的な皮膚コラーゲンの産生増加メカニズムを調べるため、2 週齢マウスの皮膚組織より単離した線維芽細胞に対して、EPS を負荷した、あるいは負荷していない C2C12 筋管細胞由来培養上清 (それぞれ EPS-CM, Ctrl-CM) を添加して 24 時間培養し、培養上清中のコラーゲン分泌量を解析した。その結果、Ctrl-CM 添加による線維芽細胞培養上清中のコラーゲン量は  $9.6 \pm 0.7 \mu\text{g/ml}$  ほどであったのに対し、EPS-CM を添加することで  $16.4 \pm 1.6 \mu\text{g/ml}$  に上昇することが明らかとなった。さらに EPS-CM 添加により *Colla1* 遺伝子発現も約 1.4 倍に上昇することが分かった。次に、EPS-CM によるコラーゲン発現分泌上昇が、筋収縮依存的な CXCL10 減少によるものであるかを調べるため、CXCL10 の受容体である CXCR3 のアンタゴニスト NBI74330 及び組換え CXCL10 の効果を解析した。その結果、CXCL10-CXCR3 シグナルを阻害することでコラーゲン分泌量が上昇、すなわち、筋収縮による CXCL10 減少はコラーゲン産生増加を促すことが示唆された。

また、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ため、EPS-CM 依存的に発現変動する遺伝子群の網羅的解析を行ったところ、酸化ストレス関連遺伝子群の発現が変化していることが分かった。特に *Blvrb*, *Pgd*, *Srxn1* の 3 遺伝子の発現は EPS-CM 添加によりそれぞれ有意に上昇していた。これらの遺伝子発現変化に対する筋収縮依存的な CXCL10 減少の関与について検討したところ、少なくとも *Srxn1* の発現変動については CXCL10-CXCR3 シグナルが関与していることが示唆された。

本章において収縮依存的に CXCL10 が減少することで CXCL10-CXCR3 が減弱し、コラーゲンの産生増加が生じることが明らかになったが、この経路はコラーゲン産生抑制に関与することが知られている Extracellular signaling regulated kinase (ERK) 経路を活性化させることが知られている。そのため、収縮依存的に CXCL10-CXCR3 が減弱したことで ERK 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。さらに、CXCL10-CXCR3 の減弱は *Srxn1* 遺伝子発現を変動させることが明らかになったが、*Srxn1* は抗酸化能をもつことが知られており、収縮依存的な CXCL10 減少は CXCL10-CXCR3 の減弱を介して、コラーゲン産生上昇、酸化ストレス抑制の両面から皮膚機能を制御している可能性が考えられる。

#### 【第四章】

第四章では、運動以外の刺激による CXCL10 制御について解明した。骨格筋は運動以外にも細胞外栄養条件に応じた生理変化を示すことが知られてきたことから、グルコースや脂肪酸による CXCL10 制御を調べた。まず、C2C12 筋管細胞を異なるグルコース濃度の培地 (HG; 4.5 g/l, LG; 1.0 g/l, GF; 0.0 g/l) で培養し、CXCL10 分泌及び遺伝子発現変化について調べた。その結果、細胞外グルコース濃度上昇に伴い、C2C12 筋管細胞における CXCL10 分泌及び遺伝子発現が増加することが示唆された。また、CXCL10 発現分泌に対する飽和脂肪酸及び不飽和脂肪酸の効果を解析したところ、飽和脂肪酸 Palmitic acid 依存的に CXCL10 発現分泌は上昇し、この上昇は不飽和脂肪酸 Palmitoleic acid によって消失することが分かった。すなわち、CXCL10 発現分泌の制御には、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の存在比が重要であることが示唆された。

さらに、血中グルコース及び脂肪酸が高値となるマウス肥満モデルを作製し、骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現を調べた。その結果、4 週齢のマウスに高脂肪飼料を 10 週間摂取させることで、TA 及び長趾伸筋 (Extensor digitorum longus muscle; EDL) における *Cxcl10* 遺伝子発現が有意に増加することが分かった。以上の結果より、骨格筋における *Cxcl10* 遺伝子発現は、運動のみならず過栄養によっても変動することが明らかとなった。

本章において、高脂肪食による *Cxcl10* 遺伝子発現上昇は速筋においてのみ観察された。この理由として、速筋と遅筋における高脂肪食摂取に伴う Reactive oxygen species (ROS) の産生効率が異なっていることが考えられる。高脂肪食摂取に伴う ROS 産生は速筋において高いことが知られているとともに、ROS は Nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) を活性化することも知られている。NF- $\kappa$ B は CXCL10 発現制御に関与していることが知られており、高脂肪食摂取により主に速筋において NF- $\kappa$ B が活性化することで *Cxcl10* 遺伝子発現が上昇した可能性が考えられる。

#### 【結論】

本研究では、CXCL10 及び CCL5 を新規の運動抑制性マイオカインとして同定し、運動依存的な

制御メカニズムの一端を明らかにした。また、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。さらに、CXCL10 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。以上より、本研究において新規同定したマイオカインである CXCL10 は、運動や栄養の刺激により産生が調節され、皮膚機能を制御するマイオカインであることが示唆された。これまで運動による皮膚の創傷治癒促進や老化抑制などは明らかになっていたものの、その効果を媒介するマイオカインについてはほとんど知られていなかった。本研究において、筋収縮依存的な CXCL10 分泌減少は、真皮線維芽細胞のコラーゲン産生促進、酸化ストレス軽減の両面から皮膚機能を制御している可能性が考えられた。

以上より、長らく不明であった運動依存的な皮膚機能制御メカニズムについて、その一部は収縮依存的な CXCL10 分泌減少により制御されている可能性を示唆した。本研究では、筋収縮依存的な CXCL10 減少メカニズムの一部や栄養状態の変化による CXCL10 制御も明らかとなったことから、運動非依存的な CXCL10 分泌制御も可能であり、今後、骨格筋における CXCL10 発現分泌制御の詳細がさらに解明されることで、皮膚機能制御のターゲットとして CXCL10 を利用することができるかもしれない。