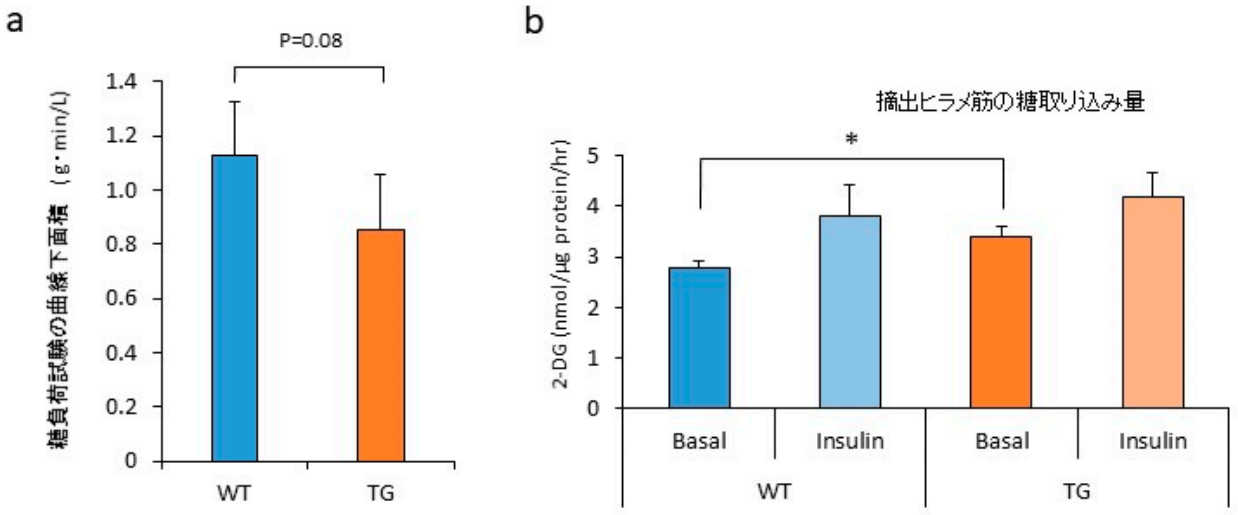
18　身体運動による健康効果にマイオカインが果たす役割	藤井　宣晴

【目的】骨格筋は種々の生理活性物質（総称してマイオカイン）を分泌していることが明らかになってきた。我々は、「運動がもたらす様々な健康効果は、骨格筋から分泌されたマイオカインが全身に届けられることによって生じる」という仮説を有している。本研究は、我々がこれまでに発見した新規マイオカインの発現量を骨格筋のみで変化させた遺伝子組み換えマウスを解析することで、運動によってもたらされる様々な健康効果には、マイオカインを介した骨格筋―諸臓器間のコミュニケーションが必要かどうかを検証することを最終目的としている。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだペルオキシレドキシン-6 の骨格筋特異的過剰発現マウスについて報告する。

【方法】過剰発現用の DNA コンストラクトは、ヒト骨格筋α-actin プロモーターと、その制御を受けるヒト・ペルオキシレドキシン-6 遺伝子で作製した。完成した DNA コンストラクトを C57BL/6N マウス受精卵の前核に注入し、仮親の子宮に移植してキメラマウスを得た。一部のキメラマウスは、生殖系列細胞に TG コンストラクトが挿入されたゲノム DNA が認められたため、野生型マウスと交配させることで、全細胞に組換えゲノムを持つ仔マウスを得た。一晩絶食させたマウスの尾部先端を約 2 mm 切り、血糖値測定器を用いて空腹時血糖値を測定した。100 mg/mL グルコース溶液を腹腔内投与（10 μL/g Body Weight）し、15、30、60、90、および 120 分後の血糖値を測定した。これらの値を、経過時間および血糖値を軸とするグラフ上にプロットし、空腹時血糖値のベースラインと血糖値推移に囲まれた面積（上昇曲線下面積 : iAUC）を算出した。また摘出したヒラメ筋を用いて、糖取り込み量を測定した。

【結果】骨格筋特異的にペルオキシレドキシン-6 を過剰発現させたマウス（TG マウス）の骨格筋では、野生型マウス（WT マウス）と比較して約 10～40 倍のペルオキシレドキシン-6 が発現していた。また、ウェスタンブロッティングで定量した血中のペルオキシレドキシン-6 含有量は、TG マウスでは WT マウスと比較して約 2 倍に増加しており、実際に生体内で骨格筋からペルオキシレドキシン-6 が分泌されていることが示された。TG マウスに対して耐糖能試験を行ったところ、WT マウスと比較して亢進傾向が認められた（$p < 0.08$）。そこで遅筋を代表するヒラメ筋を摘出して糖取り込み量を測定したところ、TG マウスではインスリン非刺激時の糖取り込み量が増加していた（$p < 0.05$）。ヒラメ筋でグルコース・トランスポーター1 のタンパク質発現量の増加も認められた。

野生型マウス（WT）と骨格筋特異的ペルオキシレドキシン-6 過剰発現マウス間で
糖耐能試験（a）と摘出骨格筋の糖取り込み量（b）を比較



18. 身体運動による健康効果にマイオカインが果たす役割

藤井　宣晴

首都大学東京 大学院人間健康科学研究科 ヘルスプロモーションサイエンス学域

Key words：骨格筋，分泌，遺伝子組み換えマウス

緒　言

骨格筋は種々の生理活性物質（総称してマイオカイン）を分泌していることが明らかになってきた。我々は、「運動がもたらす様々な健康効果は、骨格筋から分泌されたマイオカインが全身に届けられることによって生じる」という仮説を有している。本研究は、我々がこれまでに発見した新規マイオカインの発現量を骨格筋のみで変化させた遺伝子組み換えマウスを解析することで、運動によってもたらされる様々な健康効果には、マイオカインを介した骨格筋―諸臓器間のコミュニケーションが必要かどうかを検証することを最終目的としている。本報告書では、検証を試みた複数のマイオカインのうち、最も解析の進んだペルオキシレドキシン-6 の骨格筋特異的過剰発現マウスについて報告する。

方　法

1.　骨格筋特異的ペルオキシレドキシン-6 過剰発現マウスの作製

過剰発現用の DNA コンストラクトは、ヒト骨格筋α-actin プロモーターと、その制御を受けるヒト・ペルオキシレドキシン-6 遺伝子で作製した。完成した DNA コンストラクトを C57BL/6N マウス受精卵の前核に注入し、仮親の子宮に移植してキメラマウスを得た。一部のキメラマウスは、生殖系列細胞に TG コンストラクトが挿入されたゲノム DNA が認められたため、野生型マウスと交配させることで、全細胞に組換えゲノムを持つ仔マウスを得た。得られた系統は、過剰発現マウス（TG マウス；ヘテロ）と野生型マウス（WT マウス）を繁殖させることで維持した。

2. ウェスタンブロッティングによるタンパク質の定量

破砕用 Buffer 中でポリトロンホモジェナイザーを用いて組織を破砕した。この懸濁液を遠心分離（13,000 g、15 分間、4℃）し、上清を組織溶解液として回収した。組織溶解液のタンパク質濃度を Bradford 法により測定した。組織溶液中のタンパク質を検出するため、16% Tricine gel を用いた電気泳動を行い、展開されたタンパク質を Polyvinylidene Difluoride（PVDF）メンブレンに転写した。ブロッキング処理は、5%スキムミルク/TBS-T（Tris-buffered serine, 0.1% Tween-20）溶液を用いて、室温で 1 時間行った。一次抗体反応は、ウサギ由来 Anti-ペルオキシレドキシン-6（Sigma）または Anti-GAPDH（Cell Signaling Technology）を 1：3000 の割合で TBS-T に希釈し、4℃で一晩反応させた。二次抗体反応は、Anti-Rabbit IgG（GE Healthcare）を 1：2000 の割合で TBS-T に希釈し、室温で 1 時間反応させた。ECL 試薬（Perkin Elmer）をメンブレンに加え、ImageQuant LAS4000（GE Healthcare）を用いて化学発光シグナルを検出・撮影した。

3. 呼気ガス分析による代謝パラメータの測定

マウスを小動物用陰圧チャンバー（アルコシステム）に入れ、馴化のために 24 時間飼育した後、48 時間の測定を行った。チャンバー内の呼気ガスは、エアチューブを介して生体ガス用質量分析装置（アルコシステム）に送られ、マウス一個体あたりの酸素摂取量（VO2）および二酸化炭素排出量（VCO2）を得た。これらの値から、単位時間あたりの消費エネルギー量、糖質消費量、および脂質消費量を算出した。また、チャンバー上部に設置した赤外線センサーにより、代謝測定中の活動量を計測した。

4. トレッドミルによる走持久能力の評価

マウスをトレッドミル（アルコシステム）上で強制運動させ、疲労による走行不能（All-out）に陥るまでの走行時間を測定した。測定日はマウスを 4 時間絶食させた後、強制運動を開始した。強制運動は、走行方向に対して 10°の登り傾斜を付け、10 m/min の速度から 5 分ごとに 2.5 m/min ずつ速度を速め、30 m/min を速度の上限とした。マウスが疲労して刺激電極上で不動になった段階で、さらに疲労させるために棒で走行面へ押し出す操作を行った。この操作を行っても脚を動かせなくなった時点で All-out と判断し、それまでの走行時間を測定した。

5. 骨格筋組織の免疫組織化学

摘出した前脛骨筋をカミソリで長軸方向に 4 等分し、中心部の 2 部位を用いた。膝側を上にした筋を約 1.5 mm 四方のコルク板上に置き、O.C.T.コンパウンド（サクラファインテック）で包埋した。包埋筋を、液体窒素で適温に冷却した 2-メチルブタン（和光純薬）に浸し、速やかに凍結させた。凍結した筋を CM1950 クライオスタット（Leica）で 8μm に薄切し、切片を MAS コート付スライドガラス（松波硝子工業）に貼付した。

6. 糖耐能試験および摘出骨格筋の糖取り込み量測定

一晩絶食させたマウスを静寂な実験室に移し、体重を測定して 1 時間おいた。尾の先端を約 2 mm 切り、血糖値測定器 One Touch Ultra（Life Scan, Inc.）を用いて空腹時血糖値を測定した。100 mg/mL グルコース溶液を腹腔内投与（10 µL/g Body Weight）し、15、30、60、90、および 120 分後の血糖値を測定した。これらの値を、経過時間および血糖値を軸とするグラフ上にプロットし、空腹時血糖値のベースラインと血糖値推移に囲まれた面積（iAUC）を算出した。マウスのヒラメ筋の腱に手術用縫合糸を結び、速やかに摘出した。片脚から摘出した筋をインスリン非添加条件、対脚の筋をインスリン添加条件に用いた。摘出筋を、2 mM ピルビン酸を含む Krebs-Ringer Bicarbonate (KRB) Buffer（117 mM NaCl、4.7 mM KCl、2.5 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、1.2 mM KH_2PO_4、1.2 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、24.6 mM $NaHCO_3$）で満たした培養皿に固定した。

結果および考察

我々はショウジョウバエを用いた先行研究において、RNAi法を用いて骨格筋特異的にペルオキシレドキシン-6の発現を抑制すると、寿命が短縮することを見出している（未発表）。また近年では、ペルオキシレドキシン-6が培養骨格筋細胞から分泌されていることも明らかになり、運動や筋量増加による健康効果が期待されるマイオカインの候補分子と考えられている［1］。そこで本研究では、解析対象となるモデルを遺伝子組み換えマウスへ移し、骨格筋に発現するペルオキシレドキシン-6生理機能の解明を目指した。

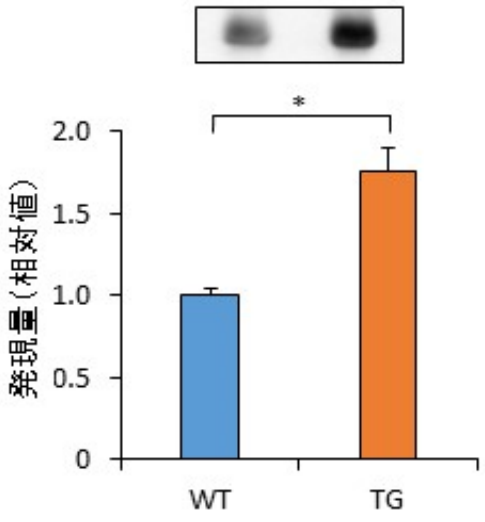


図1. 血中ペルオキシレドキシン-6含有量の比較
野生型マウス（WT）と過剰発現マウス（TG）から血清を得てウェスタンブロッティングで定量比較した。Student's t-test（* : $P < 0.05$）。n = 4。

本研究では、骨格筋特異的にペルオキシレドキシン-6を過剰発現するマウス（TGマウス）の表現型を解析し、マイオカインとしてのペルオキシレドキシン-6の生理機能を探索した。TGマウスの骨格筋では、野生型マウス（WTマウス）と比較して約10～40倍のペルオキシレドキシン-6が発現していた。また、ウェスタンブロッティングで定量した血中のペルオキシレドキシン-6含有量は、TGマウスではWTマウスと比較して約2倍に増加しており、実際に生体内で骨格筋からペルオキシレドキシン-6が分泌されていることが示された（図1）。したがって、骨格筋由来のペルオキシレドキシン-6が血流を介して運ばれ、全身の臓器に作用を及ぼす可能性が考えられた。

そこで、基本的な表現型解析を行った。11～27 週齢の体重は、WTマウスとTGマウスに差は認められなかった。また、29 週齢における骨格筋重量も、いずれの筋においても差は認められなかった。29 週齢における白色脂肪重量も、両者に差は認められなかった。呼気ガスの分析により通常飼育時のエネルギー代謝を検討したが、酸素摂取量および二酸化炭素排出量は、WTマウスとTGマウスで同等であった。また、これらの値から算出した消費エネルギー量、糖質消費量、および脂質消費量にも差は認められなかった飼育時の活動量にも差は認められなかった。前脛骨筋組織の横断切片をLaminin-2免疫染色して計測した、平均断面積および断面積別の筋線維数にも差は認められなかった。

次に、ペルオキシレドキシン-6が筋収縮と運動能力に与える作用に着目した。筋収縮を繰り返す運動では、骨格筋において大量のATPが産生されるのと同時に、活性酸素も産生される。実際に、一定の強度を超える運動では、過酸化脂質や、酸化によるDNA損傷の指標である8-OHdGが増加するなど、酸化ストレスの増大が認められる。ペルオキシレドキシン-6は本来、酸化ストレスの除去因子として知られており、このように酸化ストレスが増大した条件では、TGマウス表現型が顕在化すると予想した。そこで、WTマウスおよびTGマウスに高強度の強制運動を課し走持久能力（耐運動能）を評価したが、両者に差は認められなかった（図2）。

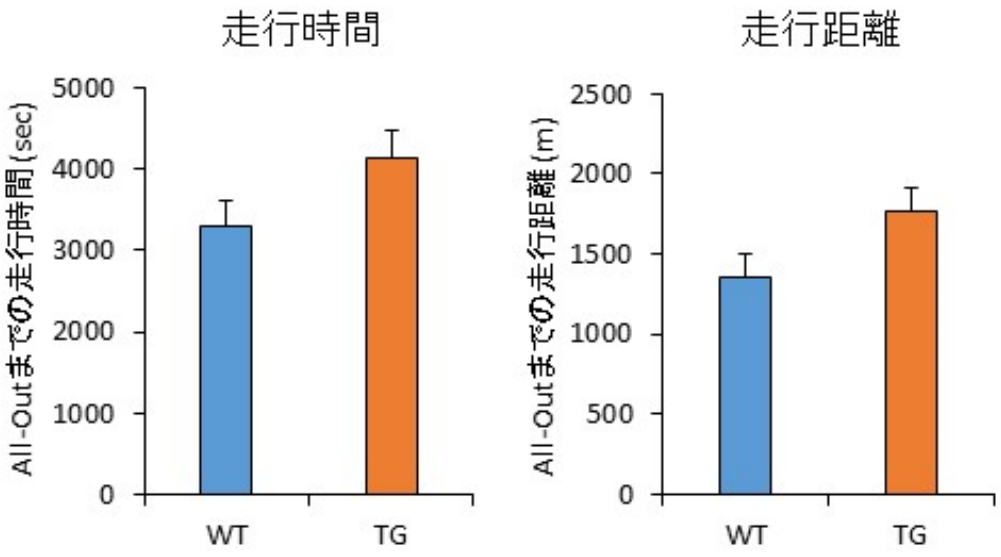


図2. 走持久力（耐運動能）の比較

野生型マウス（WT）と過剰発現マウス（TG）を、4時間絶食させた後にトレッドミル走を課し、疲労による走行不能（All-out）に陥るまでの時間と走行距離を測定した。いずれにおいても統計的な有意差は認められなかった。n = 5～7。

本研究では、強制運動後の骨格筋における酸化ストレスを評価しておらず、酸化ストレスの増大を誘導できていたかは疑問が残る。したがって、運動能力と酸化ストレスマーカーの定量を組み合わせた再検討が必要と考えられる。最後に、ペルオキシレドキシン-6が骨格筋の糖取り込みに与える作用を検討した。血糖濃度を正常な範囲に調節する能力（耐糖能）を評価したところ、TGマウスでは亢進傾向が認められた（図3a）。そこで遅筋を代表するヒラメ筋を摘出して糖取り込み量を測定したところ、TGマウスではインスリン非刺激時の糖取り込み量が増加していた（図3b）。これらの表現型は、ペルオキシレドキシン-6のノックアウトマウスで認められる、耐糖能の悪化［2］と対照的である。Pacificiら

は、ペルオキシレドキシン-6の欠失による酸化ストレスの増大が、Glut4の膜移行を抑制し、インスリン依存的な糖取り込みを減少させたと結論している［2］。本研究ではヒラメ筋でグルコース・トランスポーター1のタンパク質発現量の増加が認められた（データ未掲載）、インスリン非依存的な糖取り込みが増加したと推察される。今後、ペルオキシレドキシン-6がグルコース・トランスポーター1の発現量を増加させる機序や、その作用が遅筋に限定される原因について、さらに検討の余地がある。

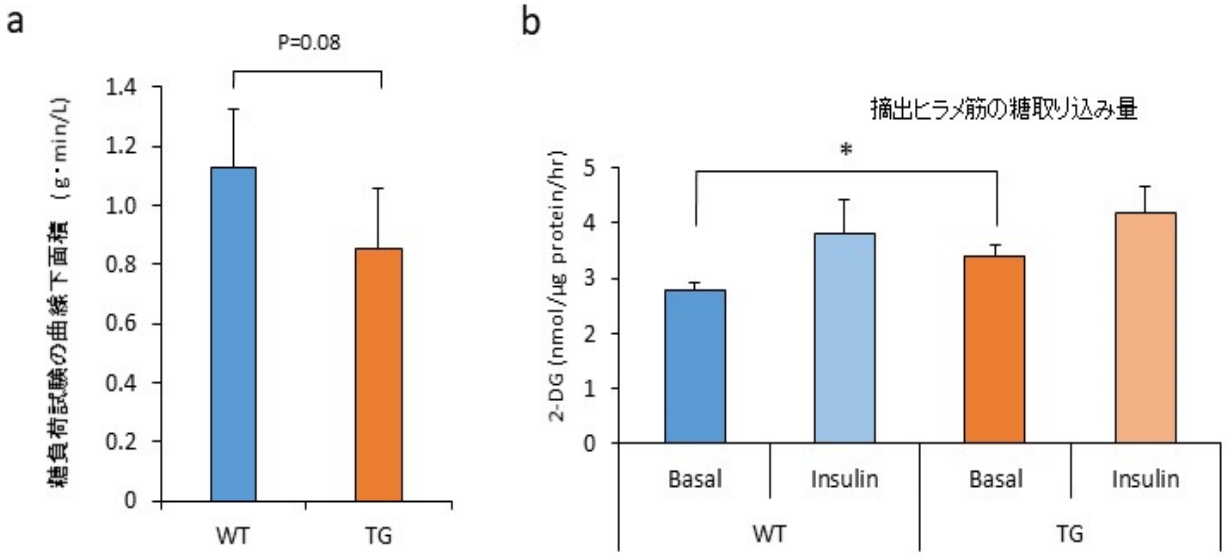


図3. 糖耐能試験（a）と摘出骨格筋の糖取り込み量（b）の比較

a）絶食させたマウスの空腹時血糖値を測定した後、体重に応じた量のグルコースを腹腔内投与し、経時的に血糖値を測定した。その後、血糖値推移の線グラフと空腹時血糖値ベースラインに囲まれる面積（上昇曲線下面積：iAUC）を算出した。Student's t-test。n = 8。

b）ヒラメ筋を摘出し、2-デオキシ・グルコースを含むKRB Bufferで培養した。インスリン添加条件では、インスリン（最終濃度50 mU/mL）を添加した。Student's t-test。n = 5～8。* $p < 0.05$

本研究では、骨格筋からのペルオキシレドキシン-6の分泌は、培養骨格筋細胞だけでなく、生体内においても起こることが明らかとなった。したがって、ペルオキシレドキシン-6がマイオカインとして骨格筋自体や他の組織に作用する可能性が考えられたが、本研究からは遠隔臓器への作用は確認できなかった。一方、ペルオキシレドキシン-6は遅筋のグルコース・トランスポーター1発現量を増加させ、インスリン非刺激時糖取り込みを増加させることを明らかにした。これらの現象は、耐糖能の亢進を導くことで、糖尿病の予防と改善に寄与する可能性がある。

文　献

1） Manabe Y, Takagi M, Nakamura-Yamada M, Goto-Inoue N, Taoka M, Isobe T, Fujii NL. Redox proteins are constitutively secreted by skeletal muscle. J Physiol Sci. 2014 Nov;64(6):401-9. doi: 10.1007/s12576-014-0334-7. Epub 2014 Sep 10.

2） Pacifici F, Arriga R, Sorice GP, Capuani B, Scioli MG, Pastore D, Donadel G, Bellia A, Caratelli S, Coppola A, Ferrelli F, Federici M, Sconocchia G, Tesauro M, Sbraccia P, Della-Morte D, Giaccari A, Orlandi A, Lauro D. Peroxiredoxin 6, a novel player in the pathogenesis of diabetes. Diabetes. 2014 Oct;63(10):3210-20. doi: 10.2337/db14-0144. Epub 2014 Jun 19.