5　運動筋ニッチが司る運動免疫ネットワーク制御の解明	神﨑　展

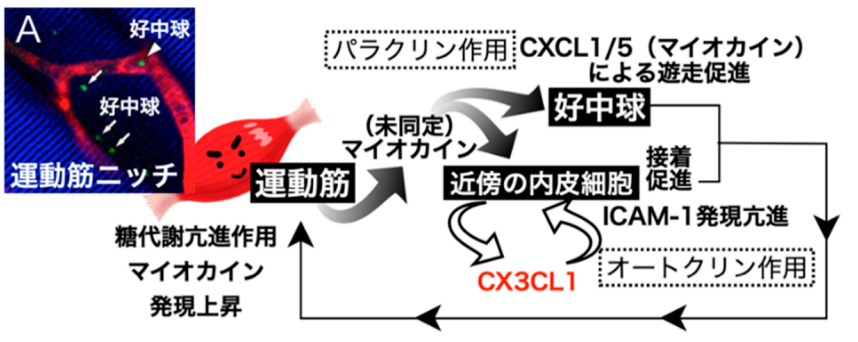
【目的】本研究課題では、我々が最近に見出した運動筋ニッチ（exercise-governed favorable immune-metabolic niche）（Tsuchiya, M. et al. Cell Rep.2018）と、その現場における動員好中球などの免疫系細胞種、血管内皮細胞、そして運動筋線維からなる異種細胞間の機能連携に着目し、「運動筋ニッチがつかさどる運動免疫ネットワーク制御」の重要性を明らかにすることを目的とした。

【方法】軽微な筋運動を負荷できるマウス咬筋咀嚼運動（Gnawing）モデルを用い、一定期間の運動負荷の後に咬筋を採取して各種解析および 2 光子顕微鏡解析へと供した。筋糖代謝亢進の指標としてのインスリン反応性糖輸送担体（GLUT4）を観察するため GLUT4-EGFP-tg マウスを用い、量子ドット（QD）標識 Gr-1 抗体を予め投与して *in vivo* で好中球を免疫染色することで、運動筋ニッチにおける GLUT4 膜移行（糖代謝亢進）と好中球動員（免疫系賦活化）の連関状況を可視化解析した。また、マウス筋組織内における異細胞種間の機能連携を培養系において再構成し、マウス筋細胞株（C2C12）を用いた *in vitro* exercise モデルおよび血管内皮細胞培養系を活用した一連の実験を遂行した。

【結果】運動筋内における CX3CL1 の生理的役割を明らかにするために、CX3CL1 受容体（CX3CR1）のアンタゴニストである AZD8797 投与による影響（咬筋活動量・好中球動員量・筋糖代謝能）を Gnawing モデルにより調べた。その結果、(1) AZD8797 投与は、運動依存性の好中球動員を阻害し、咬筋活動量も減弱することを見出した。また、(2) 咬筋運動により、IL-6 や CXCL1、CX3CL1 および ICAM-1 の mRNA 発現が筋組織内で増加するが、AZD8797 投与は、運動依存性の IL-6、CXCL1 および ICAM-1 の mRNA 発現亢進を抑制することを見出した。一方、CX3CL1 発現亢進は AZD により抑制されず、他のマイオカイン類の調節機構と異なっていた。(3) AZD8797 投与により運動依存性の筋糖取込および GLUT4 膜移行が有意に抑制された。(4) 免疫組織染色解析を行ったところ CX3CL1 と ICAM-1 は主に血管内皮細胞にて強い免疫染色性が認められ、筋線維自体では確認されなかった。(5) *in vitro* exercise モデルを用いた実験を行ったところ、筋細胞自体の CX3CL1 発現亢進は認められなかった。(6) 培養血管内皮細胞における CX3CL1 の mRNA 発現量は、上述の *in vitro* exercise モデルで得られた収縮筋細胞の条件培地により上昇した。

以上の結果から、運動骨格筋内の運動筋ニッチにおける異種細胞種間の機能連携の重要性を明らかにした。特に筋運動ニッチ内の収縮筋線維近傍に存在する血管内皮細胞が分泌するCX3CL1は、運動依存性の好中球動員、さらには筋GLUT4膜移行と糖取込亢進と、マイオカイン類（IL-6やCXCL1）の発現亢進に不可欠であり、この運動筋ニッチ内での機能連携性の不全は、筋運動能力自体の低下を惹起することを明らかにした。本研究課題では比較的急性の効果について研究を行ったが、中長期的な筋適応性や、さらには加齢に伴う「運動筋ニッチ」の変容は筋可塑性の作動原理ともなり、そのシステム不全は筋機能、ひいては身体運動機能の弱体化にも関与する可能性が非常に高い。本研究成果に基づく上記の新視点からの包括的な筋運動研究は、超高齢化社会にある現代社会の吃緊の課題であると考えられる。

運動筋ニッチにおける異種細胞（運動筋線維・内皮細胞・好中球）連携の重要性



Chaweewannakorn, et al. Journal of Physiology. 598(1): 101-122, 2020.

5. 運動筋ニッチが司る運動免疫ネットワーク制御の解明

神﨑　展

東北大学 大学院医工学研究科 病態ナノシステム医工学

Key words：運動，骨格筋，免疫，代謝，GLUT4

緒　言

日常的な身体活動（適度な運動）は免疫力を高め、全身性にもさまざまな良い効果をもたらすが、激しいトレーニングは逆に一過性に免疫力を弱めることはよく知られている。また、骨格筋が運動依存性に分泌する液性因子（マイオカイン）としてインターロイキン 6（IL-6）を含めた多数のサイトカイン／ケモカイン類が続々と同定され［1，2］、運動と免疫の関係性がますます注目されている。他方、肥満や過栄養が誘因となる「慢性炎症」が 2 型糖尿病をはじめとした生活習慣病の共通病理であるが、これらの病態に対しても適度な運動は極めて有効な治療効果を発揮することができる。しかしながら、免疫代謝調節系と運動効果の有機的連関機序の詳細は不明である。

本研究課題では、最近、我々が見出した運動筋ニッチ（exercise-governed favorable immune-metabolic niche）［3］と、その現場における動員好中球などの免疫系細胞種、血管内皮細胞、そして運動筋線維からなる異種細胞間の機能連携に着目することにより、この「運動筋ニッチがつかさどる運動免疫ネットワーク制御」の重要性、すなわち免疫代謝調節系と運動効果の新規の連携メカニズムを明らかにすることを目的とした。

これまでの我々の研究から、軽微な運動刺激によって運動筋組織内へと好中球が速やかに動員されること、この好中球の動員は運動筋組織への GLUT4 膜移行を介した糖取込亢進とマイオカイン発現亢進に不可欠であること、さらにこの運動筋ニッチにて局所的に産生される IL-1 が上記の筋機能応答の発現に不可欠であることを明らかにしてきた［3，4］。筋損傷を伴うような強い筋運動負荷刺激時などにおける免疫系細胞の動員については、筋損傷後の筋修復過程に不可欠の役割を果たすことが知られているが［5］、筋損傷のない軽微な筋活動時にも惹起される好中球動員の機序とその生理的役割については不明であった。そこで本研究課題では、特に運動筋ニッチへの好中球動員機序の解明を試み、この運動筋内微小環境の形成過程とその生理的重要性をさらに深く理解することを目的とした。

方　法

1.　マウス咬筋咀嚼運動（Gnawing）モデル

5～7 週齢の Balb/c オスマウス（日本クレア）および筋特異的 GLUT4-EGFP 発現トランスジェニック（tg）マウス［6］を用いて、既報に則り Gnawing 実験を遂行した（図 1）［4］。この際、各種の実験的処理を行い、一定期間の運動負荷の後に咬筋を採取して各種生化学的・分子生物学的解析へと供した。Gr-1 抗体の投与により好中球枯渇化処理を行った。AZD8797 投与により CX3CR1 阻害処理を行った。動物実験は東北大学倫理委員会の承認済みであり、全て規範に沿って実験を行った。

2.　2 光子顕微鏡を用いた筋組織内への好中球動員と GLUT4 膜移行の解析

マウス咬筋組織の 2 光子顕微鏡観察を行うために運動負荷後の GLUT4-EGFP-tg マウスは速やかに環流固定を行った。この際、量子ドット（QD）標識 Gr-1 抗体を予めマウス尾静脈より投与し *in vivo* で好中球を免疫染色することで、その可視化を行った。撮影した顕微鏡画像は MatLab および Image J により処理し、骨格筋 GLUT4-EGFP 膜移行量と動員好中球量を定量解析した。

3.　2-deoxyglucose uptake assay、BioPlex assay、Western blotting、RT-PCR 解析

定法に従いこれらの生化学的・分子生物学的解析を行った。

4. Electric Pulse Stimulation（EPS）を用いた *in vitro* Exercise モデル

骨格筋内で起きる異種細胞間の機能連携性を培養系で疑似再現した詳細な解析を行う目的で、マウス筋細胞株（C2C12）を用いた *in vitro* exercise モデル［1］を活用した。また、ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVEC）を用いて収縮筋細胞が分泌するマイオカイン作用を検討した。

結　果

1. CX3CR1（CX3CL1 受容体）アンタゴニストは筋運動依存性の好中球動員と Gnawing 量を減弱させた

運動筋内における CX3CL1 の生理的役割を明らかにするために、CX3CL1 受容体（CX3CR1）のアンタゴニストである AZD8797 投与による影響（咬筋活動量と好中球動員量）をマウス Gnawing モデルにより調べた。その結果、AZD8797 投与は、運動依存性の好中球動員を阻害し、咬筋活動量も減弱することを見出した（図 1A，B）。

2. CX3CR1（CX3CL1 受容体）アンタゴニストは筋運動依存性のマイオカイン発現亢進と ICAM1 発現を抑制した

運動筋内における CX3CL1 のマイオカイン発現調節への関与を明らかにするために、AZD8797 投与による影響（運動筋組織内 IL-6、CXCL1、CX3CL1 および ICAM-1 の mRNA 発現）をマウス Gnawing モデルにより調べた。その結果、咬筋運動により、既知の IL-6 や CXCL1 発現亢進に加えて［7，8］、CX3CL1 および ICAM-1 の mRNA 発現亢進が誘導されることを見出した。さらに、AZD8797 投与は、運動依存性の IL-6、CXCL1 および ICAM-1 の mRNA 発現亢進を有意に抑制することを見出した（図 1C）。一方、CX3CL1 mRNA 発現亢進は AZD により抑制されず、他のマイオカイン類とは異なる調節機構が関与することが考えられた。

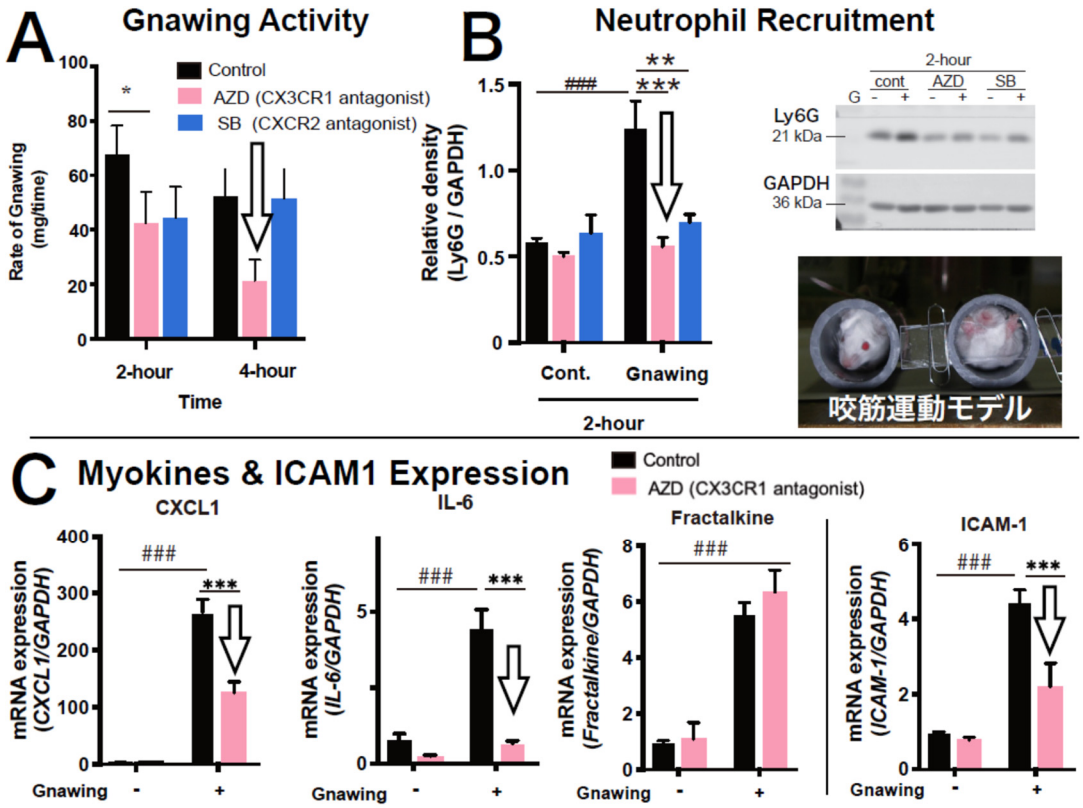


図 1. CX3CR1 アンタゴニスト（AZD）は好中球動員と運動筋機能を抑制した

AZD 投与は（A）咬筋活動量、（B）運動依存性の好中球動員（Ly6G）量、および（C）運動依存性のマイオカイン類（CXCL1, IL-6）の発現を抑制した。（C）咬筋活動（Gnawing）は、咬筋組織内の CXCL1、IL-6、CX3CL1 および ICAM1 の mRNA 発現亢進を誘導するが、AZD により CX3CL1 以外の発現亢進は抑制した。（Multifactor ANOVA with Tukey's test、###、*** : $p < 0.01$、* : $p < 0.05$）（[9] より改変）。

3. CX3CR1（CX3CL1 受容体）アンタゴニストは筋運動依存性の GLUT4 膜移行と糖取込亢進を阻害した

運動筋内における CX3CL1 の筋糖代謝調節への関与を明らかにするために、AZD8797 投与による影響（運動筋 GLUT4 膜移行量と糖取込亢進量）をマウス Gnawing モデルにより調べた。その結果、AZD8797 投与は、運動依存性の骨格筋内への糖取込亢進を阻害した。さらに、GLUT4 膜移行をサルコレンマ膜および T 管ともに阻害することを 2 光子顕微鏡観察により確認した（図 2）。

4. 筋運動依存性の CX3CL1 発現上昇は、収縮筋細胞由来ではなく、血管内皮細胞由来であった

運動筋組織内にて発現亢進している上記のマイオカイン類や ICAM-1 は、筋線維自体の発現上昇に由来しているのか、あるいは、筋組織内に存在する異種細胞種（動員好中球、血管内皮細胞など）に由来するのかを明らかにするために、Gnawing 後の咬筋凍結切片の免疫組織染色解析を行った。その結果、CX3CL1 と ICAM-1 は主に血管内皮細胞にて強い免疫染色性が認められ、筋線維自体では確認されなかった。マウス咬筋組織内で観察されたこれらの免疫組織染色結果をもとに、収縮筋細胞における CX3CL1 の発現を直接的に調べるために、筋細胞のみからなる *in vitro* exercise モデルを用いた実験を行ったところ、(IL-6 および CXCL1 発現上昇は誘導されるが) 筋細胞自体の CX3CL1 発現亢進は認められないことが確認された（図 3A）。

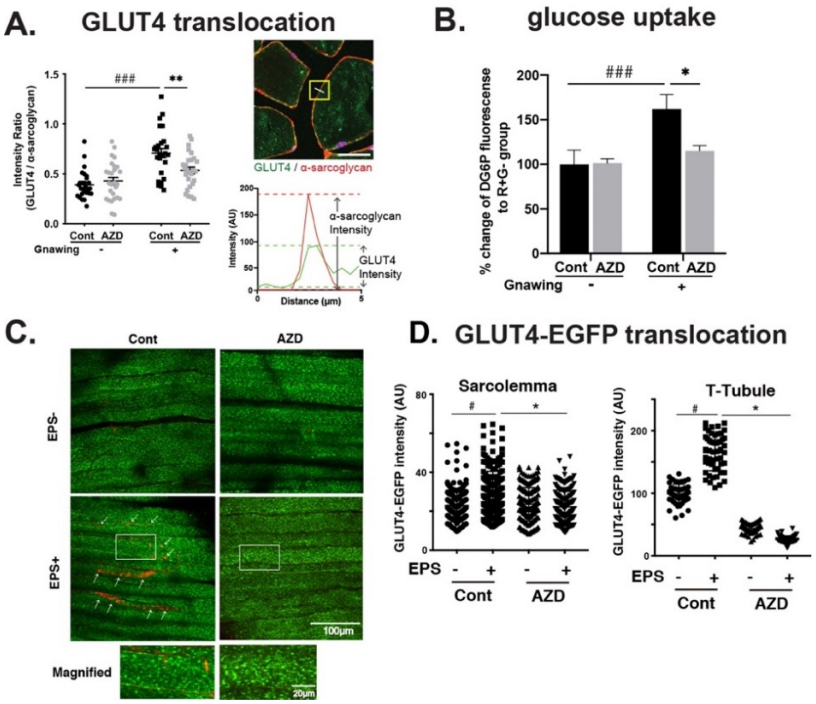


図 2. CX3CR1 アンタゴニスト（AZD）は運動依存性の GLUT4 膜移行と糖取込を抑制した

AZD 投与は（A）咬筋活動は内在性 GLUT4 膜移行と（B）筋内への糖取込増大を誘導するが、AZD はこれらを抑制した。（C）GLUT4-EGFP-tg マウスを用いた GLUT4-EGFP 膜移行量（緑）と QD655-標識好中球（赤）の 2 光子顕微鏡画像。AZD により好中球動員（矢印）が抑制されている。下の図は白枠部分を拡大したもの。(D)左図のサルコレンマ膜および T 管に移行した GLUT4-EGFP 量を定量化したグラフ（Multifactor ANOVA with Bonferroni post hoc test、###：$p<0.01$、*、#：$p<0.05$）（[9] より改変）。

5. 未同定のマイオカインが血管内皮細胞の CX3CL1 発現亢進に不可欠であった

マウス咬筋組織の免疫組織染色の結果をもとに、血管内皮細胞における CX3CL1 および ICAM-1 の発現調節について HUVEC を用いた *in vitro* での検討を行った。HUVEC におけるこれら両者の mRNA 発現量は、上述の *in vitro* exercise モデルで得られた収縮筋細胞の条件培地により著しく上昇することを観察した。BioPlex assay により HUVEC から培地中への CX3CL1 分泌が増加していることも確認した。また、HUVEC の ICAM-1 mRNA 発現量は、外来性 CX3CL1 添加により有意に上昇することも確認した（図 3B）。

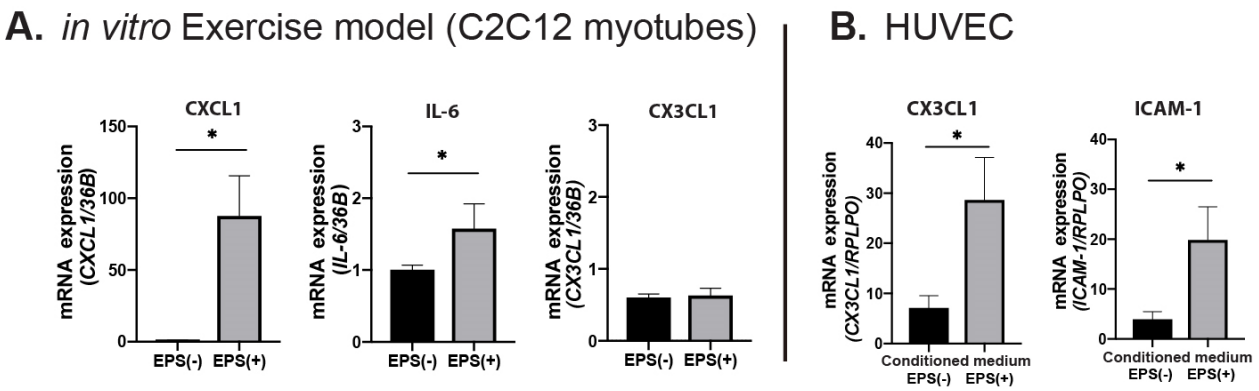


図 3. 筋運動による CX3CL1 発現上昇は血管内皮細胞由来であり、筋細胞由来ではない

(A) *in vitro* Exercise モデルにより収縮筋細胞（C2C12 myotubes）の CX3CL1 発現上昇が惹起されないことが明らかとなった。

(B) 一方、上述の収縮筋細胞系から得た条件培地（EPS＋培地）を培養 HUVEC に投与すると、その CX3CL1 の発現上昇が誘導された。同様に ICAM-1 の発現上昇も観察された。（the unpaired t test、* : $p<0.05$）（[9] より改変）。

考　察

本研究課題では、運動骨格筋内における運動筋線維、隣接する血管内皮細胞、そして動員される好中球を含む異種細胞種間の機能連携の重要性、特に CX3CL1 を介した機能連携メカニズムを明らかにした。この運動筋組織内における CX3CL1 を介した相互作用は、運動依存性の（1）好中球動員、(2) 筋 GLUT4 膜移行と等の取込亢進、(3) マイオカイン類（IL-6 や CXCL1）の発現亢進に不可欠であること、そしてこの運動筋ニッチ内における機能連携の不全は、結果的に（4）上述した各種筋運動応答性の減弱により筋運動（Gnawing 能力）自体の低下を惹起することを明らかにした［9］。

強力な収縮活動という特殊刺激を自ら発動する骨格筋であるが、この運動自体は、意思的にその運動強度や質／モダリティ、さらにはその習慣性などにより、全くの任意で鍛錬する、あるいは怠る、ことができる。また、鍛錬度合いや、健康状態、さらには加齢による影響も大きい。従って、骨格筋は運動活動の起点としてトリガーとして重要であるが、その活動度に呼応する生物応答性を導き出すためには、筋線維を取り巻く環境要因との相互作用が極めて重要であり、異種細胞間での相互的機能連携の場となる「運動筋ニッチ」は、まさにこの時局に応じた最適な生物応答を導き出すための統合システム制御機構として中核的な役割を担っていると考えられる。本研究課題では数時間の運動による比較的急性の効果について研究を行ったが、中長期的な筋の適応性や、さらには加齢［10］といった時間軸に沿った運動筋ニッチの変容は筋可塑性の作動原理ともなり、（努力により）好適性に変容可能であるだけでなく、そのシステム不全は筋機能（ひいては身体運動機能）の弱体化に関わっている可能性が非常に高く、この観点からの包括的な筋運動研究は超高齢化社会にある現代社会の吃緊の課題であると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究は、東北大学大学院歯学研究科の佐々木啓一教授、東北福祉大学の土谷昌広教授らとの共同研究である。また、本研究は神﨑研究室のラボメンバー全員の協力によりなされたものである。

文 献

1) Nedachi T, Fujita H, Kanzaki M. Contractile C2C12 myotube model for studying exercise-inducible responses in skeletal muscle. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2008;295(5):E1191-204. doi: 10.1152/ajpendo.90280.2008. PubMed PMID: 18780777.

2) Chen W, Nyasha MR, Koide M, Tsuchiya M, Suzuki N, Hagiwara Y, et al. In vitro exercise model using contractile human and mouse hybrid myotubes. Sci Rep. 2019;9(1):11914. Epub 2019/08/17. doi: 10.1038/s41598-019-48316-9. PubMed PMID: 31417107; PubMed Central PMCID: PMCPMC6695424.

3) Tsuchiya M, Sekiai S, Hatakeyama H, Koide M, Chaweewannakorn C, Yaoita F, et al. Neutrophils Provide a Favorable IL-1-Mediated Immunometabolic Niche that Primes GLUT4 Translocation and Performance in Skeletal Muscles. Cell Rep. 2018;23(8):2354-64. Epub 2018/05/24. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.067. PubMed PMID: 29791847.

4) Chiba K, Tsuchiya M, Koide M, Hagiwara Y, Sasaki K, Hattori Y, et al. Involvement of IL-1 in the Maintenance of Masseter Muscle Activity and Glucose Homeostasis. PloS one. 2015;10(11):e0143635. doi: 10.1371/journal.pone.0143635. PubMed PMID: 26599867; PubMed Central PMCID: PMC4658060.

5) Chaweewannakorn C, Tsuchiya M, Koide M, Hatakeyama H, Tanaka Y, Yoshida S, et al. Roles of IL-1alpha/beta in regeneration of cardiotoxin-injured muscle and satellite cell function. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology. 2018;315(1):R90-r103. Epub 2018/03/08. doi: 10.1152/ajpregu.00310.2017. PubMed PMID: 29513560.

6) Hatakeyama H, Kanzaki M. Heterotypic endosomal fusion as an initial trigger for insulin-induced glucose transporter 4 (GLUT4) translocation in skeletal muscle. The Journal of physiology. 2017;595(16):5603-21. PubMed PMID: 28556933.

7) Nedachi T, Hatakeyama H, Kono T, Sato M, Kanzaki M. Characterization of contraction-inducible CXC chemokines and their roles in C2C12 myocytes. American journal of physiology Endocrinology and metabolism. 2009;297(4):E866-78. doi: 10.1152/ajpendo.00104.2009. PubMed PMID: 19622786.

8) Farmawati A, Kitajima Y, Nedachi T, Sato M, Kanzaki M, Nagatomi R. Characterization of contraction-induced IL-6 up-regulation using contractile C2C12 myotubes. Endocr J. 2013;60(2):137-47. Epub 2012/10/06. PubMed PMID: 23037942.

9) Chaweewannakorn C, Nyasha MR, Chen W, Sekiai S, Tsuchiya M, Hagiwara Y, et al. Exercise-evoked intramuscular neutrophil-endothelial interactions support muscle performance and GLUT4 translocation: a mouse gnawing model study. The Journal of physiology. 2020;598(1):101-22. Epub 2019/11/14. doi: 10.1113/jp278564. PubMed PMID: 31721209.

10) Oki K, Arias EB, Kanzaki M, Cartee GD. Effects of Acute Exercise Combined With Calorie Restriction Initiated Late-in-Life on Insulin Signaling, Lipids, and Glucose Uptake in Skeletal Muscle From Old Rats. The Journals of Gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences. 2020;75(2):207-17. Epub 2018/10/03. doi: 10.1093/gerona/gly222. PubMed PMID: 30272137.