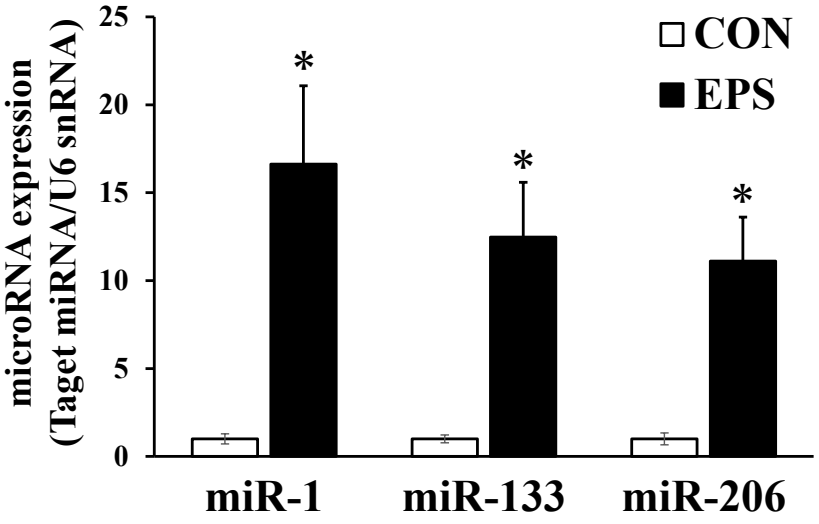
112　運動効果を規定する骨格筋由来エクソソームの探索	川西　範明

【目的】運動は骨格筋の代謝機能を向上させることで、代謝性疾患の予防あるいは改善の効果を有するが、この現象の調節機能の全容は明らかにされていない。細胞から分泌されるエクソソームには多種多様なタンパク質、遺伝子の発現を調節する作用を有するマイクロ RNA（miRNA）などが含まれている。細胞から分泌されたエクソソームは分泌臓器内で作用するのみならず、血液により運搬されて標的組織に作用することが知られている。持久的な運動は血液中のエクソソームに含まれる miRNA の発現プロファイルを変化させることが明らかになっていることから、エクソソームは骨格筋の糖代謝機能の調節など様々な運動適応現象に重要な役割を担うことが想定されるが、骨格筋由来のエクソソームの変動については不明瞭な点が数多く残されている。本研究では筋収縮により変動する骨格筋由来のエクソソームの miRNA の探索と、変動するエクソソームが骨格筋の遺伝子発現を制御するのか否かを検討した。
【方法】マウスの腓腹筋に経皮電気刺激を負荷して筋収縮を行わせた。電気刺激の 90 分後にマウスから血液を採取して、血清中のエクソソームを回収した。血清中エクソソームの数は Acetyl-CoA Acetylcholinesterase（AChE）の活性を酵素反応による比色定量法により測定した。また、血清中エクソソームから RNA を抽出した後に real-time PCR 法により microRNA の発現量を定量した。また、マウス骨格筋細胞株 C2C12 細胞にマウスの血清エクソソームを添加して、mRNA の発現量を real-time PCR 法により定量した。
【結果】マウスの骨格筋への経皮電気刺激は血清エクソソームの数は変化させなかった。興味深いことに、マウスの骨格筋への経皮電気刺激は血清エクソソームの miRNA（miR-1、miR-133、miR-206）の発現を増加させた。電気刺激を負荷したマウスの血清エクソソームの添加は C2C12 細胞の IL-6 の mRNA 発現を増加させた。

電気刺激によるマウスの血清エクソソームの miRNA 発現の変化



112. 運動効果を規定する骨格筋由来エクソソームの探索

川西　範明

千葉工業大学 先進工学部 体育教室

Key words：エクソソーム，miRNA，骨格筋，運動，筋収縮

緒　言

加齢は骨格筋の萎縮や糖代謝機能の低下など身体機能の変化を生じさせることで、サルコペニア（加齢性筋肉減弱症）や糖尿病などの代謝性疾患の発症リスクを増大させる。一方で、運動は骨格筋の容量の増大や糖代謝機能の向上させることで、サルコペニアや生活習慣病の予防あるいは改善の効果を有することが知られている［1］が、この現象の調節機能の全容は明らかにされていない。したがって、運動による骨格筋の糖代謝機能の向上などの適応現象の分子メカニズムを解明することは、健康寿命の延伸を目指した治療法の技術開発に重要となる。

運動に伴い骨格筋からは数多くのホルモンやサイトカインなどの液性因子が分泌されるが、これらの骨格筋由来の液性因子はマイオカインと呼ばれ、骨格筋の糖代謝機能の向上や脂肪組織のエネルギー消費の増大、抗炎症作用など様々な生理機能を有することが明らかにされている［2］。しかしながら、マイオカインなどの液性因子のみでは運動適応現象の分子メカニズムの全容を解明することには至らず、マイオカインなどの液性因子以外にも運動適応現象を制御する因子が存在することが示唆されている。

近年、エクソソームと呼ばれる顆粒物質が様々な生理機能を有することが明らかにされてきた。エクソソームは様々な細胞から分泌される細胞外小胞の一つで、エクソソームの中には多種多様なタンパク質、遺伝子の発現を調節する作用を有するマイクロ RNA（miRNA）などが含まれている。組織に常在する細胞から分泌されたエクソソームはオートクリン（自己分泌）やパラクリン（傍分泌）として分泌臓器内で作用するのみならず、エンドクリン（内分泌）として血液により運搬されて標的組織に作用することで、エネルギー代謝亢進や抗炎症作用など様々な生理応答を生じさせることが知られている［3］。重要なことに、エクソソームは表面に発現する受容体や含有する miRNA などの違いにより数多くのサブタイプが存在しており、これらの各種のエクソソームサブタイプは生理応答に異なる影響を及ぼすことが明らかにされてきた。したがって、エクソソームは生体内での量的な変化のみならず、質的な変化が生体機能の調節に重要となる。

近年、骨格筋からもエクソソームが分泌されることが報告されてきた。興味深いことに、高強度間欠的運動により、血液中のエクソソームに含まれる miRNA の発現プロファイルが変化することが示されている［4］。エクソソームは骨格筋の容量や糖代謝機能の調節など様々な運動適応現象に重要な役割を担うことが想定されるが、骨格筋由来のエクソソームの変動とその生理学的意義についての全容は解明されていない。そこで、本研究では筋収縮により変動する骨格筋由来のエクソソームの miRNA の探索と、変動するエクソソームが骨格筋の遺伝子発現を制御するのか否かを検討した。

方　法

本実験は千葉工業大学動物実験委員会の承認を得て実施した。実験には 10 週齢の C57/BL6J 雄マウスを使用した。マウスの下腿腓腹筋の近位と遠位に球電極を留置して、経皮電気刺激を負荷した。電気刺激の電流の強度は足関節の伸展運動時の最大トルクを発揮する条件とした。20 mA の電流で 3 秒間の電気刺激と 7 秒間のインターバルの条件で 10 回 1 セット、セット間のインターバルを 3 分間に設定して合計 6 セットの電気刺激による筋収縮を麻酔下で負荷した。電気刺激の 90 分後にマウスから血液を採取した。尚、対照として電気刺激無しのマウスから血液と下肢骨格筋

を採取した。血液は 30 分間静置した後に遠心操作を行い、血清を分離した。血清中のエクソソームはポリマー沈殿法により回収した。血清中エクソソームの数の測定には、エクソソームに含有される Acetyl-CoA Acetylcholinesterase（AChE）の活性を酵素反応による比色定量法を使用した。また、血清中エクソソームから RNA を抽出した後に cDNA を作製して、real-time PCR 法により microRNA の発現量を定量した。内部標準として U6 small RNA を用いた。

細胞実験には、マウス骨格筋細胞株 C2C12 細胞を使用した。C2C12 細胞はコンフルエンスした段階で分化用培地に交換して 6 日間培養した後に実験に使用した。筋管細胞に分化した C2C12 細胞にエクソソームを 1×10^7 個添加した。尚、経皮電気刺激による筋収縮を負荷 90 分後のマウスおよび電気刺激無しのマウスから回収したエクソソームを使用した。エクソソーム添加 6 時間後に細胞を回収して、細胞から RNA を抽出した。cDNA を作製して、real-time PCR 法により mRNA の発現量を定量した。内部標準として β-Actin を用いた。

結　果

1. 電気刺激による筋収縮が血清エクソソームの数および miRNA 発現量に及ぼす影響

動物実験では骨格筋への経皮電気刺激が血清のエクソソーム数の変化とエクソソームに含有する miRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

マウス腓腹筋への経皮電気刺激による血清エクソソームの数の変化を図 1 に示した。電気刺激を行わなかったコントロール群では血清 $1\mu L$ あたり 3.1×10^7 個、電気刺激群では 2.7×10^7 個であった（図 1）。群間に有意な違いは見られなかった。

マウス腓腹筋への経皮電気刺激による血清エクソソームの miRNA 発現の変化を図 2 に示した。miRNA-1 発現量は、経皮電気刺激を行わなかったコントロール群と比べて、電気刺激群では約 16.6 倍に有意に高値であった（図 2）。miRNA-133 発現量はコントロール群と比べて電気刺激群では約 12..5 倍に有意に高値であった（図 2）。miRNA-206 発現量はコントロール群と比べて電気刺激群では約 11.1 倍に有意に高値であった（図 2）。

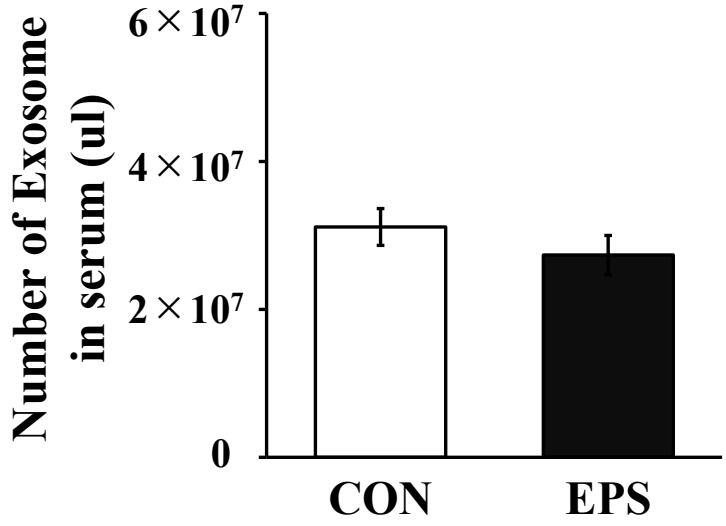


図 1. 電気刺激によるマウスの血清エクソソームの数の変化

マウスの腓腹筋に経皮電気刺激による筋収縮負荷 90 分後の血清エクソソームの数の変化。

CON：電気刺激負荷無し条件群、EPS：電気刺激負荷条件群。

群間の差の比較には Student の t 検定を用いた。

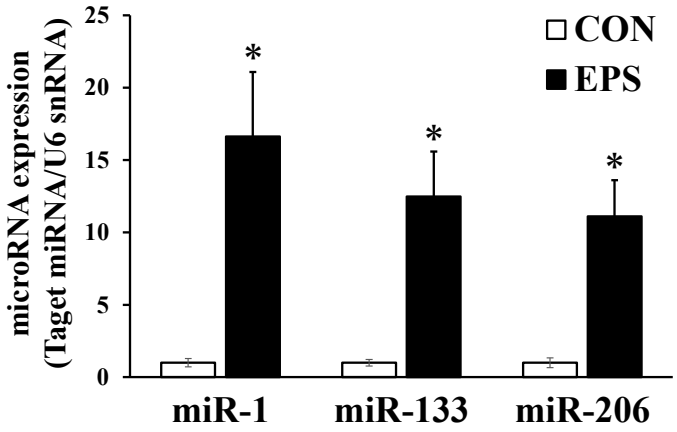


図 2. 電気刺激によるマウスの血清エクソソームの miRNA 発現の変化

マウスの腓腹筋に経皮電気刺激による筋収縮負荷 90 分後の血清エクソソームの miR-1、miR-133、miR-206 の発現の変化。CON：電気刺激負荷無し条件群、EPS：電気刺激負荷条件群。群間の差の比較には Student の t 検定を用いた（＊$p < 0.05$）。

2. 筋収縮により分泌されるエクソソームが骨格筋細胞の遺伝子発現に及ぼす影響

細胞培養実験では、筋収縮により分泌される血清エクソソームが骨格筋の糖代謝を制御する因子の mRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

マウスの血清エクソソームの骨格筋細胞株 C2C12 細胞への添加による mRNA 発現量の変化を図 3 に示した。IL-1β および Fndc5 の mRNA 発現は電気刺激を負荷したマウスの血清中エクソソームの添加は、無添加および電気刺激を負荷していないマウスの血清中エクソソームの添加と比較して有意な違いは見られなかった（図 3A、D）。IL-6 の mRNA 発現は電気刺激を負荷したマウスの血清中エクソソームの添加は、無添加および電気刺激を負荷していないマウスの血清中エクソソームの添加と比較して有意に高値を示した（図 3B）。IL-15 の mRNA 発現は電気刺激を負荷したマウスの血清中エクソソームの添加は、無添加と比較して有意に低値を示したが、電気刺激を負荷していないマウスの血清中エクソソームの添加と比較して有意な違いは見られなかった（図 3C）。

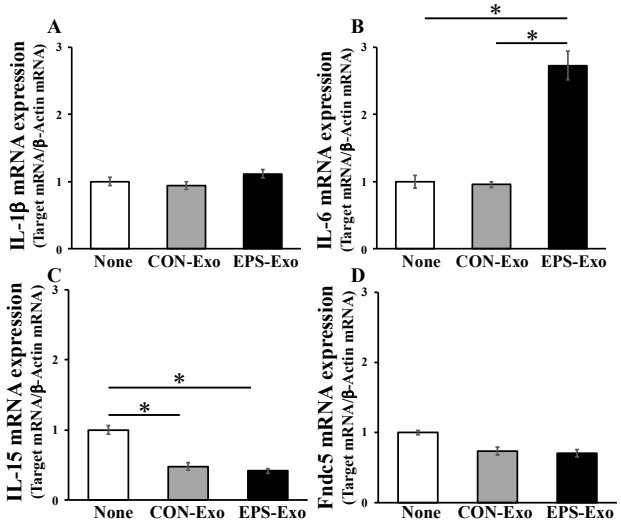


図 3. マウスの血清エクソソーム添加による骨格筋細胞の mRNA 発現の変化

骨格筋細胞株 C2C12 細胞へのマウス血清エクソソーム添加による IL-1b（A）、IL-6（B）、IL-15（C）、Fndc5（D）の mRNA 発現の変化。None：無添加、CON-Exo：電気刺激を負荷していないマウスの血清エクソソームの添加、EPS-Exo：電気刺激を負荷したマウスの血清エクソソームの添加。統計処理は一元配置分散分析を行い、多重比較には Tukey's test を用いた（*$p < 0.05$）。

考　察

持久的運動によりエクソソーム中の miRNA の発現プロファイルが変動することが報告されている。しかしながら、筋収縮で変動するエクソソームについてはほとんど明らかにされていない。本研究により、電気刺激負荷による筋収縮はマウスの血清エクソソームに miRNA 発現量を変化させることが示された。興味深いことに、電気刺激負荷により血清エクソソームで発現量が増加した miR-1 および miR-133、miR-206 は骨格筋で発現が強いことが報告されている［5］。したがって、筋収縮により骨格筋からエクソソームが分泌されたことにより、血清中の miRNA 発現の変動が生じた可能性が示唆される。本研究では、骨格筋に特異的に発現する miRNA のみに着眼して筋収縮による変動を検討したが、エクソソームにはこれら以外の多種多様な分子が含まれることから、筋収縮により分泌されるエクソソームの性質については、シークエンス法や質量分析法などの網羅的な分子解析法を用いて解析することが必要である。また、筋収縮により骨格筋からエクソソームが分泌される分子機序については、本研究は明らかにすることが出来ていないことから、今後はどのような分子機序により筋収縮によりエクソソームが分泌されるのかについての詳細な解明が必要である。

また、電気刺激を負荷したマウス血清エクソソームの筋細胞への添加により、糖代謝に関連する mRNA 発現量の影響を検討した。結果として、糖の取り込みを亢進させる IL-6 の mRNA 発現が筋収縮を負荷したマウス血清エクソソームの添加により減少することが示された。したがって、筋収縮により分泌されるエクソソームが糖代謝機能を制御することで、運動時の骨格筋の糖代謝の亢進に関与する可能性が示唆される。今後は、糖代謝に関連する細胞内シグナル伝達経路や糖の取り込み動態を検証することで、筋収縮由来のエクソソームの詳細な生理作用の解明が必要である。

謝　辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

文　献

1） Villareal DT, Aguirre L, Gurney AB, Waters DL, Sinacore DR, Colombo E, Armamento-Villareal R, Qualls C. Aerobic or Resistance Exercise, or Both, in Dieting Obese Older Adults. N Engl J Med. 2017 May 18;376(20):1943-1955. PMID: 28514618 doi: 10.1056/NEJMoa1616338.

2） Pillon NJ, Bilan PJ, Fink LN, Klip A. Cross-talk between skeletal muscle and immune cells: muscle-derived mediators and metabolic implications. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2013 Mar 1;304(5):E453-65. PMID: 23277185 doi: 10.1152/ajpendo.00553.2012. Epub 2012 Dec 31.

3） Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. Cell Metab. 2019 Oct 1;30(4):656-673. PMID: 31447320 doi: 10.1016/j.cmet.2019.07.011. Epub 2019 Aug 22.

4） D'Souza RF, Woodhead JST, Zeng N, Blenkiron C, Merry TL, Cameron-Smith D, Mitchell CJ. Circulatory exosomal miRNA following intense exercise is unrelated to muscle and plasma miRNA abundances. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2018 Oct 1;315(4):E723-E733. PMID: 29969318 doi: 10.1152/ajpendo.00138.2018.

5） De Gasperi R, Hamidi S, Harlow LM, Ksiezak-Reding H, Bauman WA, Cardozo CP. Denervation-related alterations and biological activity of miRNAs contained in exosomes released by skeletal muscle fibers. Sci Rep. 2017 Oct 16;7(1):12888. PMID: 29038428 doi: 10.1038/s41598-017-13105-9.