

## 運動方法に特異的なマイオカイン分泌過程の 可視化を通じた分子メカニズムの解明

麓 佳月\* 及川 司\* 高田 真吾\*\*

### ELUCIDATION OF MOLECULAR MECHANISMS THROUGH VISUALIZATION OF MYOKINE SECRETION PROCESS SPECIFIC TO VARIOUS EXERCISE METHODS

Yoshizuki Fumoto, Tsukasa Oikawa, and Shingo Takada

Key words: myokine secretion, BDNF, live imaging, Hibit, myogenic differentiation.

#### 緒 言

病態生理の文脈内で、多くの臓器は治療標的として登場する。心臓は心不全の治療標的であり、膵臓は糖尿病の治療標的である。臓器自身が治療に従事することはめったにない。骨格筋も他の臓器と同様に治療を受ける対象として位置付けられてきた。ところが骨格筋で産生・分泌される生理活性物質、マイオカインの発見は、骨格筋の臓器内の立ち位置を一変させた。運動に应答して骨格筋から分泌されるマイオカインは、骨格筋自身だけでなく、血管から全身循環に乗ることで遠隔臓器や特定の病態生理への治療効果も期待されている<sup>10)</sup>。マイオカインを分泌させる骨格筋に対する介入は、運動やストレッチ、介助者とともに行うリハビリテーションなど、他の臓器と比べて物理的な容易さが際立つ。バリエーションに富むこれらの介入方法は重篤な副作用を伴いにくい点で薬剤を中心とした治療とも差別化を図ることができる。

もしマイオカインによる治療効果を期待した運

動処方を目指すのであれば、狙って特定のマイオカインを多く分泌させることのできるプログラムの作成は必須である。そのような運動プログラムを作成するにはマイオカインごとの分泌メカニズムの解明が必要となる。一方、これまでのマイオカイン研究は、どの分子がマイオカインか、そのマイオカインはどのような生理活性をもつのかを明らかにすることに注力しており、マイオカインがどのように運動に呼応して分泌されているのか、その分子メカニズムは未解明である。また運動方法ごとに分泌されるマイオカインが異なるという知見も存在し<sup>9)</sup>、マイオカインの分泌経路には骨格筋の刺激タイプに応じた多様なメカニズムが想定される。

これまで我々は、カフェインの添加、電気刺激による運動模倣刺激によって培養 C2C12 筋管細胞が分泌するマイオカイン（培養液中）をプロテオーム解析により定量を行ってきた。特にカフェイン（運動模倣）刺激後培養液のプロテオーム解析から、骨格筋由来の BDNF（脳由来神経栄養因子）をマイオカインとして同定した。我々はこの

\* 北海道大学医学院分子生物学教室

Department of Molecular Biology, Hokkaido University Graduate School of Medicine, Hokkaido, Japan.

\*\* 北翔大学生涯スポーツ学部スポーツ教育学科

Department of Lifelong Sport, School of Sports Education, Hokusho University, Hokkaido, Japan.

骨格筋由来 BDNF の心不全に対する改善効果についてこれまで研究を進めており<sup>1,2,6,7)</sup>、これらの研究結果を実臨床に応用するにはマイオカインとしての BDNF 分泌を駆動するメカニズムを同定する必要があった。また血中の BDNF と運動強度の関係を示した先行研究も存在することから<sup>5)</sup>、運動種特異的なマイオカイン分泌経路の全体像へ切り込むきっかけにもなると考えた。本研究では、マイオカイン分泌を発光として簡便に定量評価可能な実験系や、細胞に対する介入の筋分化への影響を可視化する実験系を作成し、マイオカインの分泌に関与するメカニズムを厳密に評価する基盤技術の開発を行った。

## 方 法

### A. 筋芽細胞株 C2C12 を用いた運動模倣刺激実験系の確立

我々は、骨格筋からの分泌を解析するために、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株である C2C12 (ATCC) を使用した。1 週間の分化誘導により骨格筋に分化させた C2C12 に対しカフェインによる運動模倣刺激を行った。カフェインによる運動模倣は電気刺激に比べコストが低く、細かいタイムスケールの実験や、さまざまな条件を検討しても安く済むメリットがある。また先行研究から、分泌の最終段階で輸送小胞が細胞膜と融合する際に、細胞膜付近のカルシウムイオン濃度が重要であると報告されており<sup>10)</sup>、細胞内のカルシウムイオン濃度を容量依存的に変化させるカフェイン刺激が本研究に適していると考えた。

### B. C2C12 の分化度を考慮した BDNF 可視化 C2C12 の作成

C2C12 細胞株を用いて BDNF の動態を解析するには、蛍光タンパクを融合した BDNF を強制発現し、可視化を可能にする必要がある。しかし先行研究から、BDNF は筋分化阻害的に働くことが示唆されており<sup>8)</sup>、単純な蛍光タンパク付き BDNF の強制発現は厳密なマイオカイン解析へのオフターゲット効果が想定された。そこで我々は蛍光タンパク付き BDNF 発現量が適切な範囲でありかつ、筋分化を行うことのできる C2C12 株クローンを樹立した。

### C. 時間分解能と定量性を担保する、断片化発光タンパクを用いた BDNF 分泌度解析システムの開発

一般的なマイオカインの解析サンプルは、運動模倣刺激後の細胞培養液の濃縮を行うことで回収されてきた。この回収方法は煩雑な操作と長時間の遠心分離を必要とし、細かいタイムコースの解析を行うには 1 度の回収に要する時間が長すぎる。また分子メカニズムに対する介入実験を組み合わせることを考えると、より簡便でハイスループット性の高いマイオカイン解析法を開発する必要があった。我々は BDNF に断片化発光タンパクである Hibit (Promega) を融合し、Hibit と複合体を形成する Lgbit と基質であるフリマジンを追加することで細胞外に分泌された BDNF を発光により検出するシステムを実現した。

### D. 介入実験による筋分化への悪影響を定量的に解析する、分化度可視化システムの開発

マイオカインの分泌メカニズムを解析するには、分泌に関連する可能性のある分子をノックイン、ノックダウンすることで、分泌と注目分子の因果関係を解析する必要がある。しかしこのノックインやノックダウンは筋芽細胞の筋分化に影響を及ぼすこともあり、分泌に対する影響がその分子によるものなのか、それとも分化不全に起因するものなのかを区別する必要がある。そこで我々は筋分化に関連する *Myogenin* プロモーター領域を活用し、分化度を定量的に可視化するシステムを開発し、各種介入の筋分化に対する影響を解析する基盤を構築した。

## 結 果

### A. 筋芽細胞株 C2C12 を用いた運動模倣刺激実験系の確立

10 cm ディッシュ内で C2C12 細胞を 10% ウシ胎児血清入りの Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地のもと培養し、細胞がコンフルエントになった段階で 2% ウマ血清入りの DMEM 培地に培地交換し分化誘導を行った。1 日 1 度の培地交換を行い 1 週間分化誘導した後、カフェインによる運動模倣刺激実験を行った。運動模倣刺激実験は血清未添加の DMEM 培地を用いてプレ

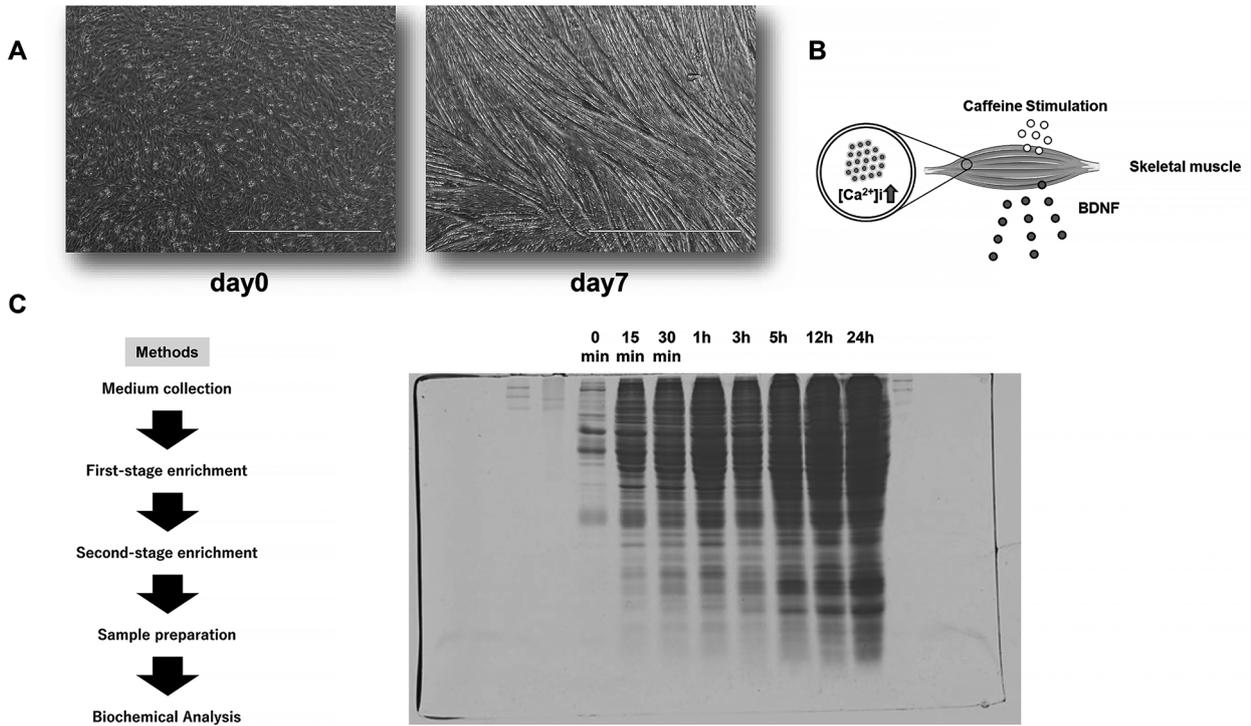


図 1. 筋芽細胞株 C2C12を用いた運動模倣刺激実験系の確立

Fig.1. Establishment of an experimental system for exercise-mimetic stimulation using the myoblast cell line C2C12.

- (A) Phase contrast image of C2C12 before differentiation and 7 days after induction of differentiation. The scale bar indicates 1 mm.
- (B) The schematic image of the experimental system for exercise mimetic stimulation.
- (C) The caffeine-stimulated exercise-mimicking experimental protocol and CBB-stained images of electrophoresed gels of collected media concentrates.

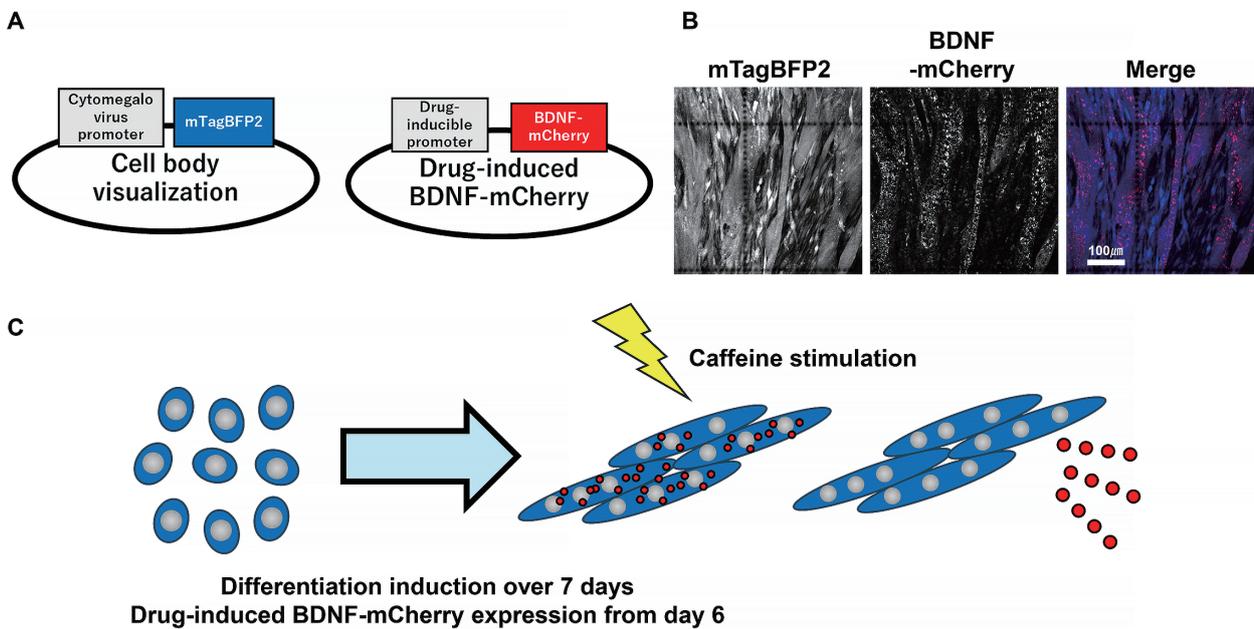


図 2. C2C12の分化度への影響をおさえた BDNF 可視化システムの作成

Fig.2. Development of a BDNF visualization system with minimal impact on C2C12 differentiation.

- (A) The schematic image of the vector utilized to visualize BDNF.
- (B) Representative images of BDNF-mCherry-expressing C2C12 after 7 days of differentiation induction.

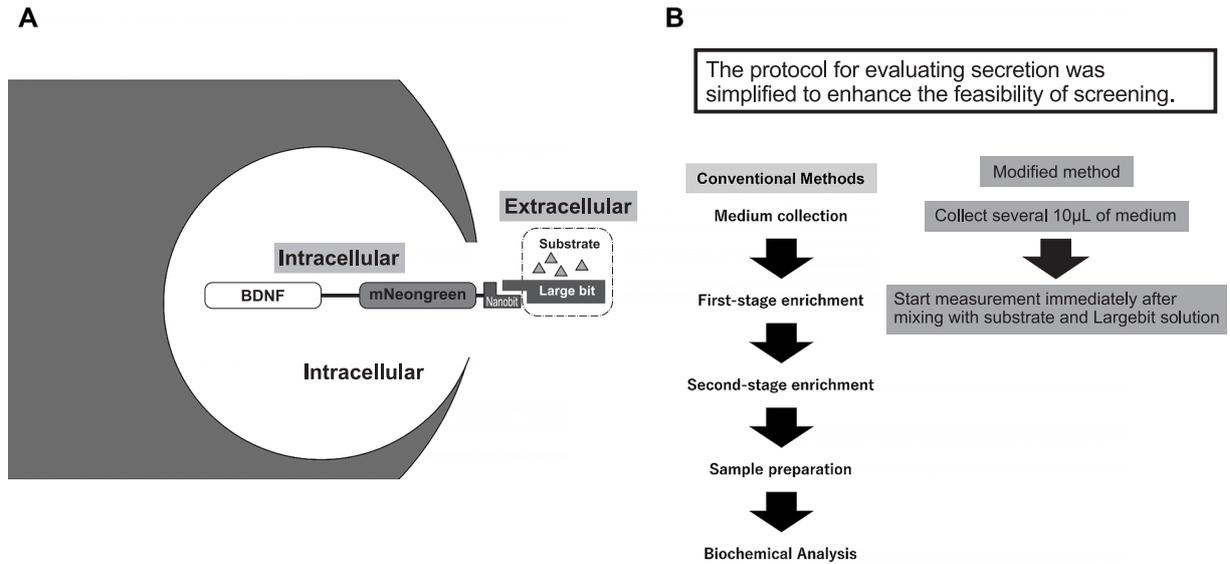


図3. 断片化発光タンパクを用いた BDNF 分泌度解析システムの開発

Fig.3. The Development of a BDNF secretion analysis system utilizing fragmented luminescent protein.

- (A) The schematic image of the fragmented luminescent protein-based BDNF secretion analysis system.  
 (B) The schematic image of comparison with previous myokine secretion analysis.

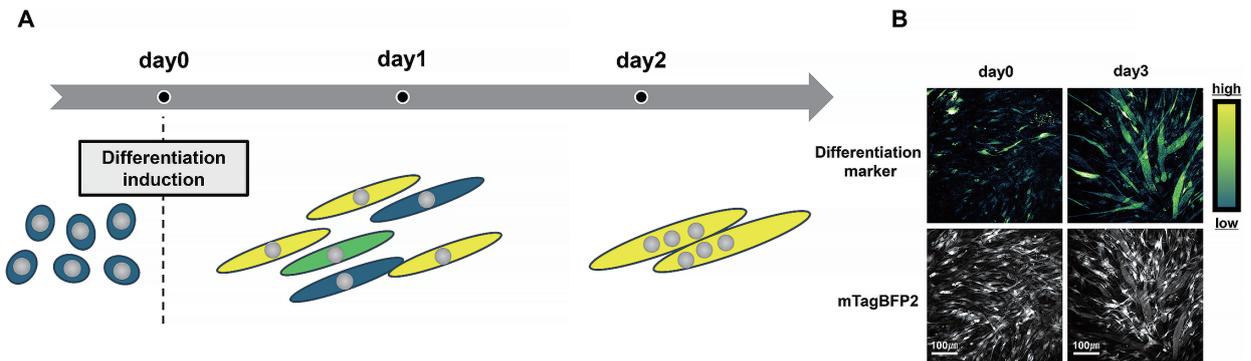


図4. 筋分化度可視化システムのイメージ図

Fig.4. The schematic image of the myogenic differentiation visualization system.

- (A) The schematic image of the dynamics of the differentiation visualization system after induction of differentiation.  
 (B) Representative image of C2C12 with myogenic differentiation visualization system.

ウォッシュを行い<sup>4)</sup>、その後 5 mM 濃度のカフェイン入り DMEM 培地と培地を交換することで実行した。刺激後の培地を回収し、遠心による濃縮を行い、濃縮した培地をウェスタンブロットにより解析した。カフェイン刺激後の培地中の BDNF は刺激なしの培地に比べより多くの BDNF が検出された (図 1)。

#### B. C2C12の分化度を考慮した BDNF 可視化 C2C12の作成

BDNF に蛍光タンパク mCherry を融合した分子を C2C12へ過剰発現させる際に、薬剤誘導性ベクターに分子を載せつつ、mTagBFP2を過剰発現するベクターを混ぜた状態で C2C12にトランス

フェクションし、ゲノムへの挿入を競合させることで、分化に影響を及ぼしづらい適切な BDNF の発現量を実現した。カフェイン刺激後の BDNF-mCherry を共焦点顕微鏡によるライブイメージングで観察した。BDNF-mCherry の蛍光が分泌現象を示唆する挙動を示す画像の取得はできたが、安定した再現性は現在担保できていない (図 2)。

#### C. 時間分解能と定量性を担保する、断片化発光タンパクを用いた BDNF 分泌度解析システムの開発

BDNF に Hibit を融合した分子を C2C12に発現させ、分化誘導後にカフェイン刺激実験を行った。

実験系は培地を濃縮する実験系が数時間要するのに対し、この実験系は数分で完了することができた。カフェイン刺激後の発光度の変化は、ウェスタンブロットで確認した BDNF の挙動と一致していた (図 3)。

#### D. 介入実験による筋分化への悪影響を定量的に解析する、分化度可視化システムの開発

*Myogenin* プロモーター最小領域は C2C12 のゲノムから PCR により伸長した。*Myogenin* プロモーター最小領域下流に蛍光タンパク *tdTomato* をコードする配列を挿入し、同一ベクターに *mTagBFP2* を強制発現するユニットを導入することで分化度とそのベクター導入量を定量することを可能にした。このシステムの開発により、C2C12 に対する介入の筋分化度に対する影響を定量的に評価することが可能になった<sup>3)</sup> (図 4)。

### 考 察

本研究により、培養細胞系 C2C12 とカフェインを用いた BDNF の分泌解析とその可視化を中心に、分泌解析のハイスループット化による実験の時間解像度の改善、分泌に対する介入実験が筋分化に影響しているか否かを解析する実験系の開発を行うことで、マイオカインを研究するための基盤となる実験系の開発ができた。今後このハイスループット性を生かしたマイオカイン分泌に対する大規模スクリーニングを行うことで、特定のマイオカイン分泌を促進する刺激方法の樹立を行う礎となる実験を行い、運動方法に特異的なマイオカイン分泌をより詳細に解析することが可能となった。このような実験が実現できれば、運動処方箋に対象者ごとの具体的な運動方法を記載するためのエビデンスを与える、特定の投薬に頼らない本来の身体活動に根差した個別化医療を実現させようとする。本研究では電気刺激よりもむしろカフェイン刺激に依存して分泌が観察された BDNF を中心に解析を行ったが、電気刺激特異的に分泌されるタンパクは、今後引き続き探索と解析を行う予定である。またマイオカイン特異的な細胞内輸送および分泌機構の解析は、BDNF-*mCherry* と同時にさまざまな輸送や分泌関連タンパクをとともに発現させることで共局在スクリーニ

ングを現在行っている。現在選定された候補分子のノックダウン系の条件検討を行っている。ノックダウンには shRNA といった基本的なシステムだけでなく、短い時間スケールで機能阻害を実現しうるドミナントネガティブを用いた古典的な機能阻害法も検討している。

### 総 括

マイオカインのなかには加齢や病態に改善効果をもたらすマイオカインもある。運動刺激から分泌に至るメカニズムが明らかになれば、副作用が懸念される外部からの投薬に依存せず、分泌のメカニズムに依拠して運動方法を選択し、身体活動に根差して狙ったマイオカインを分泌させる方法論が確立できる。また、健康増進の目的で運動を処方する場合においても、対象者ごとの健康状態に基づき運動を選択するための具体的な基準は必要である。マイオカインを中心とした新たな基準があれば、現在多様に進化を遂げている運動方法やトレーニング方法を対象者個別に効果的に運用することが可能となり、対象者に恩恵があるだけでなく、マイオカイン分泌に特化した新たな運動方法研究の需要を生み出すことで、運動生理学研究の更なる活性化も期待できると考える。どのようなメカニズムが分泌に関与するのかを解明するには、筋分化など分泌経路以外への影響を排除し、分泌経路に対する影響のみを厳密に評価できる基盤実験系が必要である。本研究で作成した実験システムはこの目的に合致するものだと考えられる。

### 謝 辞

本研究の実施にあたり助成を賜りました公益財団法人明治安田厚生事業団に深く感謝を申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) Fukushima A, et al. (2013): Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int J Cardiol*, **168**, e142-144.
- 2) Fukushima A, et al. (2015): Serum brain-derived neurotrophic factor level predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *J Card Fail*, **21**, 300-306.
- 3) Fumoto Y, et al. (2024): Development of a *Myogenin* minimal promoter-based system for visualizing the degree of myogenic differentiation. *Biochem Biophys Res*

- Commun, **741**, 151091.
- 4) Furuichi Y, et al. (2018): Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes. *PLoS One*, **13**, e0206146.
  - 5) Hotting K, et al. (2016): The effects of acute physical exercise on memory, peripheral BDNF, and cortisol in young adults. *Neural Plast*, **2016**, 6860573.
  - 6) Matsumoto J, et al. (2021): Brain-derived neurotrophic factor improves impaired fatty acid oxidation via the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase- $\alpha$  - proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  signaling in skeletal muscle of mice with heart failure. *Circ Heart Fail*, **14**, e005890.
  - 7) Matsumoto J, et al. (2018): Brain-derived neurotrophic factor improves limited exercise capacity in mice with heart failure. *Circulation*, **138**, 2064-2066.
  - 8) Mousavi K, et al. (2006): BDNF is expressed in skeletal muscle satellite cells and inhibits myogenic differentiation. *J Neurosci*, **26**, 5739-5749.
  - 9) Piccirillo R (2019): Exercise-induced myokines with therapeutic potential for muscle wasting. *Front Physiol*, **10**, 287.
  - 10) Takada S, et al. (2022): Ergogenic effects of caffeine are mediated by myokines. *Front Sports Act Living*, **4**, 969623.