

運動マウス由来の血漿投与は、筋萎縮モデルマウスの筋量や筋機能を改善するか？

—筋萎縮抑制効果をもつエクサカインの探索と、血液伝播を介した運動による筋萎縮抑制効果の検証—

大 藪 葵* 吉 岡 潔 志** 亀 井 康 富*

DOES ADMINISTRATION OF PLASMA FROM EXERCISE-TRAINED MICE IMPROVE MUSCLE MASS AND FUNCTION IN MUSCLE ATROPHY MODEL MICE?: IDENTIFICATION OF EXERKINE THAT PREVENTS MUSCLE ATROPHY AND VERIFICATION OF SUPPRESSIVE EFFECT OF EXERCISE AGAINST MUSCLE ATROPHY VIA BLOOD TRANSMISSION

Mamoru Oyabu, Kiyoshi Yoshioka, and Yasutomi Kamei

Key words: exercise, exerkine, skeletal muscle, muscle atrophy, plasma.

緒 言

近年、若齢マウスやヒトの血漿投与が老齢マウスの認知機能を改善すること^{1,5,8)}や、運動した老齢マウスの血漿投与によって老齢マウスの認知機能が改善すること^{2,4)}が報告され、血液伝播を介した健康効果の伝達が注目されている。運動はさまざまな臓器を刺激し、多種多様な生理活性物質(マイオカイン, ヘパトカイン, オステオカイン等)の分泌を促すことで全身的な健康増進に寄与する。

加齢に伴う筋量・筋機能の低下(サルコペニア)や疾患に付随した筋萎縮は、日常生活動作や生活の質を低下させるだけでなく寿命にも影響を及ぼす。本研究では、これら運動誘発性の生理活性因子の総称である「エクサカイン(exerkines)」に

着目し、運動マウス由来の血漿中に含まれる筋萎縮抑制因子を特定すること、および最終的に「運動マウス由来の血漿投与が、個体レベル(in vivo)において筋萎縮モデルマウスの筋量や筋機能を改善するか」を実証することを大目的としている。本成果報告では、この最終目的に向けた初期的な検証段階として、運動マウス由来の血漿におけるエクサカイン候補物質の探索結果、および運動マウス由来の血漿が筋細胞に対して直接的な萎縮抑制効果をもつかについて、細胞培養系(in vitro)を用いて解析した結果を中心に報告する。

* 京都府立大学生命環境科学研究科 Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University, Kyoto, Japan.

** プロダクティブ・エイジング機構 Institute for Research on Productive Aging(IRPA), Tokyo, Japan.

方 法

A. アミノ酸欠乏培地を用いた C2C12 筋管細胞でのデキサメタゾン添加実験

(研究計画 2 : 運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証)

C2C12 細胞 (RCB0987, RIKEN) を 10% ウシ胎児血清 (FBS, F9423, Sigma-Aldrich) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含有した DMEM (C11995500BT, Thermo Fisher) を用いて培養した。C2C12 細胞の分化誘導は、2% ウマ胎児血清 (HS, 16050122, Thermo Fisher) と 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含有した DMEM を含む分化培地で C2C12 筋芽細胞を培養することにより実施した。分化誘導 6 日目の C2C12 細胞をアミノ酸欠乏培地 (D9800-13, US Biological) で 1 時間 wash し、アミノ酸欠乏培地に終濃度 0, 1, 5, 10, 20, 25 μ M デキサメタゾン (DEX, D4902, Sigma-Aldrich) を加えた培地に交換し、24 時間後に細胞回収し、qRT-PCR 解析を実施した。アミノ酸欠乏培地 (低グルコース, HS なし) を用いて、アミノ酸の有無によって DEX を添加した際に筋萎縮関連遺伝子の発現増加の程度を qRT-PCR 解析で調べたところ、アミノ酸欠乏培地で DEX を処理することで、DEX による筋萎縮関連遺伝子 *Atrogin1* の発現誘導が顕著になった (図 1)。そこで、本研究ではアミノ酸欠乏培地を用いた条件下で、筋萎縮関連遺伝子 *Atrogin1* をマーカー遺伝子として運動マウス由来の血漿による筋萎縮抑制効果を評価した。

B. C2C12 細胞と骨格筋組織における qRT-PCR 解析

(研究計画 2 : 運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証)

凍結した骨格筋組織および C2C12 筋管細胞から、TRIzol もしくは Sepasol 試薬を用いて RNA を回収した。骨格筋組織は Tissue Lyser II (Qiagen) を用いて 30 Hz で 1 サイクル 3 分間 (3 サイクル以上) ホモジナイズした。cDNA は ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo)

を用いて合成した。mRNA 発現レベルは、Thunderbird Next SYBR qPCR Mix (Toyobo) を用いて CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) で測定した。データ解析は $\Delta \Delta$ Ct 法で行った。

C. マウスの回転かご運動と骨格筋・血漿サンプルの回収

(研究計画 2 : 運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証)

8 か月齢の C57BL/6J マウス (雌) を 47 日間、回転かごで自発運動させた。その後、ヘパリンを添加したチューブに血液を回収し、遠心分離後、血漿を凍結保存した。骨格筋を回収し、重量測定後、凍結保存した。

D. C2C12 筋管細胞へのデキサメタゾンと運動マウス由来の血漿添加実験

(研究計画 2 : 運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証)

分化誘導 7 日目の C2C12 筋管細胞をアミノ酸欠乏培地で培地交換し、その 1 時間後にアミノ酸欠乏培地に 10% マウス由来の血漿と終濃度 25 μ M DEX を加えた培地に交換した。24 時間後に細胞回収し、qRT-PCR 解析を実施した。

E. ラダークライミングを用いたレジスタンストレーニングと血漿プロテオーム解析

(研究計画 1 : 運動マウス由来の血漿における筋萎縮抑制効果をもつエクサカインの探索)

3 か月齢の C57BL/6J マウス (雄) を使用した。バーベキュー網 (長さ 80 cm, 網目 1.3 cm, 傾斜 80°) で作ったクライミングラダーを用いて、1 か月間週 2 ~ 3 回のレジスタンストレーニングを実施した。初週は順化期間とし、「最大挙上重量」の 50% の負荷にて 1 分間のインターバルで 6 ~ 8 ラウンドのラダークライミングを行った。2 週目からは、マウスに「最大挙上重量」の 70% の重量のナットを尾に付けてレジスタンストレーニングを行い、1 分間のインターバルで 12 ラウンドのラダークライミングを実施した。登りを停止したマウスについては、尻を軽く叩いて登りを促した。登りが困難な場合は、登ることが可能な重量に減量させた。最終的なラダートレーニングの 24

時間後、骨格筋を回収するとともに、血漿を凍結保存し、標準 DIA プロテオーム解析 (Promega) を実施した (n = 9~10のサンプルをプールして使用した)。

F. 不活動モデルマウスを用いた骨格筋と血漿メタボローム解析 (関連データ取得)

2 か月齢の C57BL/6J マウス (雄) を使用した。7 日間の片足の不動化により運動量を部分的に制限した不活動モデルマウスの骨格筋と血漿を用いて、CE-TOFMS によるメタボローム解析 (Human Metabolome Technologies) を実施した⁶⁾。血漿は 800 × g で 5 分間遠心分離することによりを分離し (EDTA 含有採血管: VP-DK051K, Terumo を使用した)、液体窒素で急速凍結後、その後の分析のために -80℃ で保存した。

G. 不動化・再運動時の骨格筋トランスクリプトーム解析 (関連データ取得)

2 か月齢の C57BL/6J マウス (雄) を使用した。11 日間の片足の不動化により運動量を部分的に制限した不活動モデルマウス、および 11 日間の片足の不動化後 3 日あるいは 30 日間の再活動により運

動量を向上させた再運動マウスの骨格筋から RNA を抽出し、骨格筋のトランスクリプトーム変化を RNA-seq (Macrogen) により解析した。

H. 動物実験

動物実験は京都府立大学動物実験委員会 (承認番号: KPU260407, 審査責任者: 塚本康弘) の承認を得て実施した。実験は機関のガイドラインに従って実施した。マウスは、24℃ の一定温度下で人工照明 (12 時間明期/12 時間暗期) のもと、飼料 (CE-2, CLEA) と水を自由摂取できる状態で飼育した。

結 果

A. 回転かごで自発運動させたマウスの骨格筋における筋重量と遺伝子発現変化

(研究計画 2: 運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証)

まず運動マウス由来の血漿を回収するために、C57BL/6J マウスを回転かごで 1 か月半飼育した。コントロールマウスには回転かごに入れていない

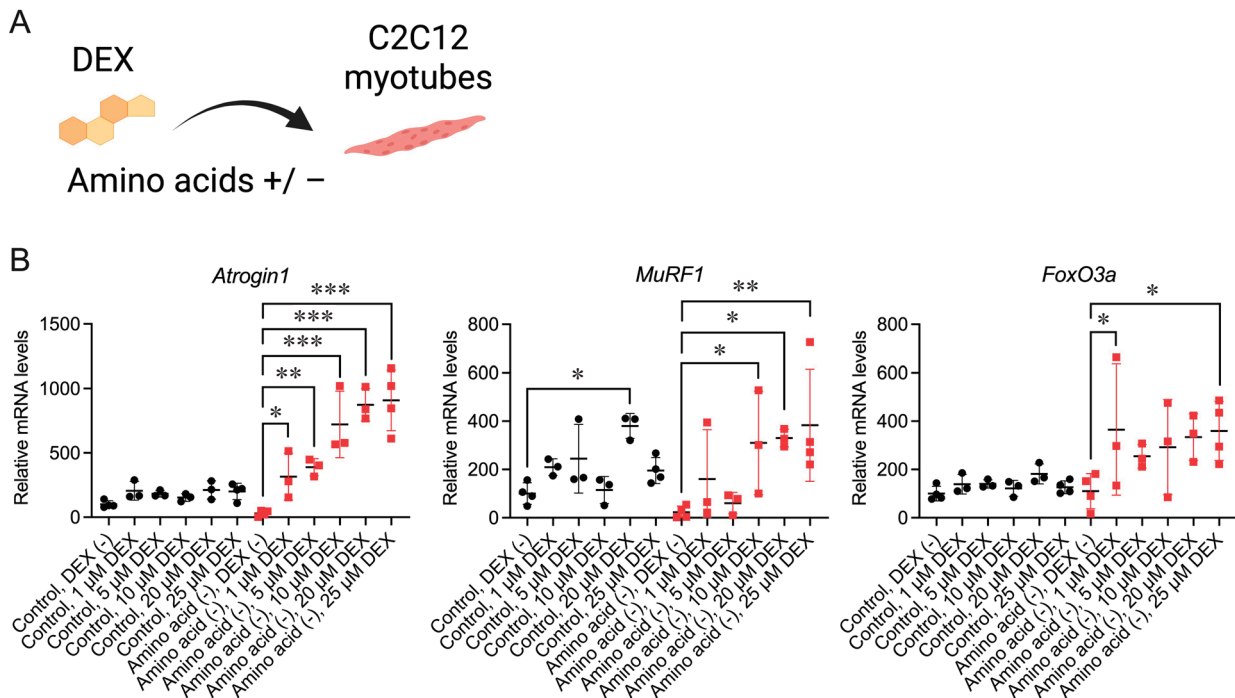


図 1. C2C12 筋管細胞でのデキサメタゾン誘導性の筋萎縮関連遺伝子発現変化に及ぼすアミノ酸の影響

Fig.1. Effects of amino acids on dexamethasone-induced expression of muscle atrophy-related genes in C2C12 myotubes.

A. Experimental design (created with BioRender.com). B. Relative mRNA expression of *Atrogin1*, *MuRF1*, and *FoxO3a* genes in C2C12 myotubes treated with dexamethasone (DEX) for 24h (n = 3-4/group). All data indicate mean ± standard deviation (SD). One-way ANOVA. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001.

同週齢のマウスを使用した。運動効果が出ているかを確認するために、骨格筋における遺伝子発現解析を実施した。先行研究より、週5回、1時間のトレッドミル運動により1か月間トレーニングを行ったマウスでは、定常状態での大腿四頭筋における運動応答遺伝子 *PGC1 α* の発現が低下することが明らかにされている³⁾。この結果と一致して、1か月半回転かごで自発運動させたマウスでは、骨格筋（大腿四頭筋）における運動応答遺伝子 *PGC1 α* の発現が有意に低下していた（図2）。

B. デキサメタゾンおよび運動マウス由来の血漿の C2C12筋管細胞への添加実験

（研究計画2：運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスに与える影響の解析の補助的検証）

上記の1か月半の自発運動を経験したマウス由来の血漿をアミノ酸欠乏条件下で C2C12筋管細胞に添加することで、DEX 誘発性筋萎縮に対する運動マウス由来の血漿の効果について評価した。qRT-PCR 解析の結果、自発運動をさせていないコントロールマウス由来の血漿を添加した C2C12筋管細胞と比べて、運動マウス由来の血漿を添加した C2C12筋管細胞で DEX 添加による筋萎縮関連遺伝子 *Atrogin1* の発現増加に影響はみられなかった（図3）。一方で、他の筋萎縮関連遺伝子である *MuRF1* の発現は運動マウス由来の血漿を添加した C2C12筋管細胞において DEX 添加による発現増加がむしろ増強されていた（図3）。

C. レジスタンストレーニングマウス由来の血漿におけるプロテオーム変化

（研究計画1：運動マウス由来の血漿における筋萎縮抑制効果をもつエクサカインの探索）

次に、別の運動マウスを用いて、筋萎縮抑制効果をもつエクサカインの探索における予備的なデータを得るために、若齢マウスをラダークライミングにより1か月間のレジスタンストレーニングを行った。このレジスタンストレーニングマウスでは、体重補正した際の骨格筋重量の増加が観察された（図4）。そこで、レジスタンストレーニングマウスにおける血漿のプロテオーム解析を実施した（図4）。

D. 不活動モデルマウスを用いた骨格筋と血漿メタボローム変化（関連データ取得）

運動不足（不活動）によって骨格筋は萎縮する。そこで、運動不足による筋萎縮時の血液と骨格筋の代謝変化を包括的にメタボローム解析によって調べた。7日間の片足の不動化により運動量を部分的に制限した不活動モデルマウスの骨格筋と血漿を用いて、CE-TOFMS によるメタボローム解析を実施したところ、運動不足によって血漿で有意に減少するいくつかの代謝物を見いだすことができた（図5）⁶⁾。

E. 不動化時の骨格筋トランスクリプトーム変化（関連データ取得）

若齢マウスと老齢マウスを用いて、運動不足による筋萎縮時の骨格筋トランスクリプトーム変化

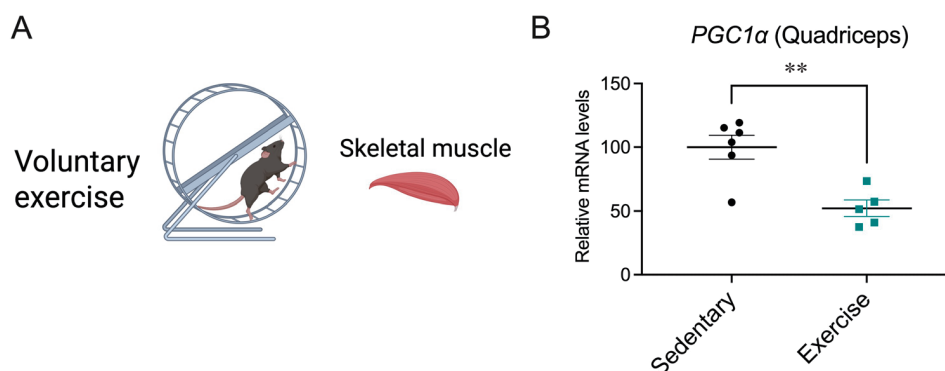


図2. 回転かごで自発運動させたマウスの骨格筋における遺伝子発現変化
Fig.2. Gene expression changes in skeletal muscle of mice with spontaneous exercise in a rotating cage.
A. Experimental design (created with BioRender.com). B. Relative mRNA expression of *PGC1 α* genes in skeletal muscle of exercise-trained mice (n = 5-6/group). All data indicate mean $\pm$ standard error (SE). Student's two-tailed unpaired t-test. ** $P < 0.01$.

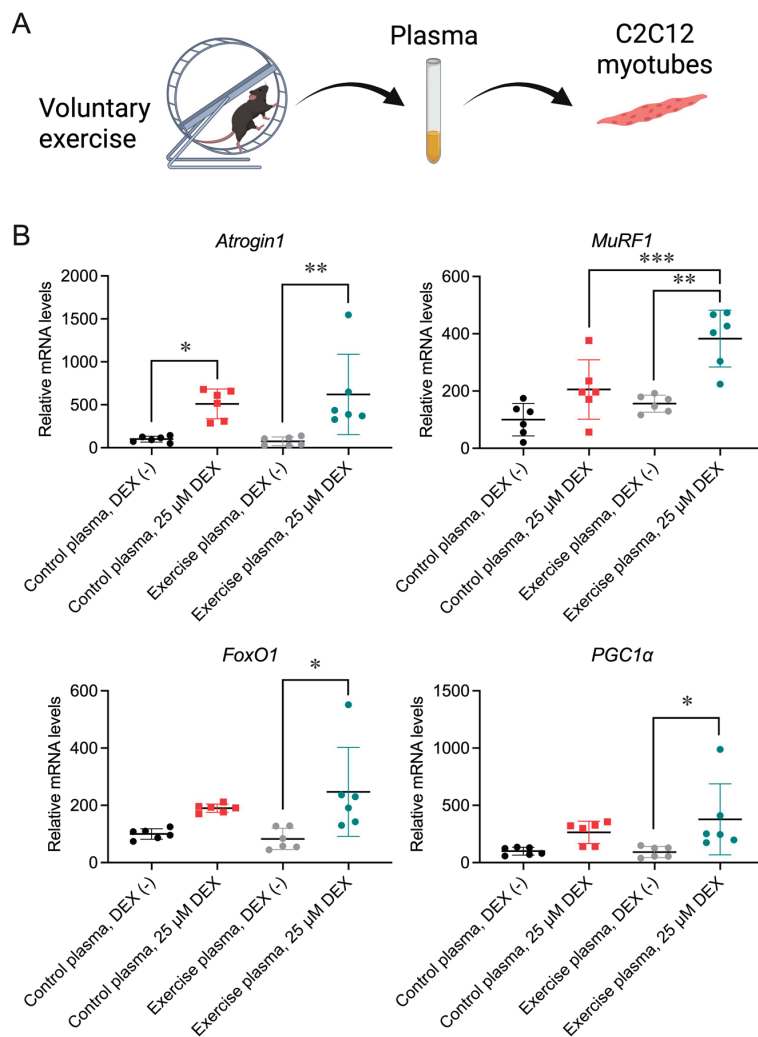


図3. 運動マウス由来の血漿による C2C12筋管細胞でのデキサメタゾン誘導性の筋萎縮関連遺伝子発現変化への影響

Fig.3. Effects of exercise-trained mouse-derived plasma on dexamethasone-induced changes in gene expression of muscle atrophy-related genes in C2C12 myotubes. A. Experimental design (created with BioRender.com). B. Relative mRNA expression of *Atrogin1*, *MuRF1*, *FoxO1*, and *PGC1α* genes in C2C12 myotubes treated with exercise-trained mouse-derived plasma and dexamethasone (DEX) for 24 h (n = 6/group). All data indicate mean $\pm$ standard deviation (SD). One-way ANOVA. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

を RNA-seq 解析により明らかにした。この解析によって、運動不足による骨格筋の遺伝子発現変化が、加齢によってどのように変化するかを明らかにできた。特に興味深いことに、不活動による筋萎縮関連遺伝子 *Atrogin1* や *MuRF1* の発現増加は老齢マウスの骨格筋ではむしろ抑制されることを見いだした (図6)。

考 察

本研究では、運動マウス由来の血漿を C2C12 筋管細胞に添加することで、DEX 誘発性筋萎縮

を抑制しうるかを評価した。その結果、筋萎縮関連遺伝子である *Atrogin1* を指標とした解析では、運動マウス由来の血漿による筋萎縮抑制効果はみられなかった。一方で、他の筋萎縮関連遺伝子である *MuRF1* の発現は運動マウス由来の血漿を添加した C2C12 筋管細胞において DEX 添加による発現増加がむしろ増強されていたことから、運動マウス由来の血漿は C2C12 筋管細胞における DEX の感受性を増加させる可能性が示唆された。運動マウスの骨格筋では、*MuRF1* などの筋萎縮関連遺伝子の発現が増加することが報告されてお

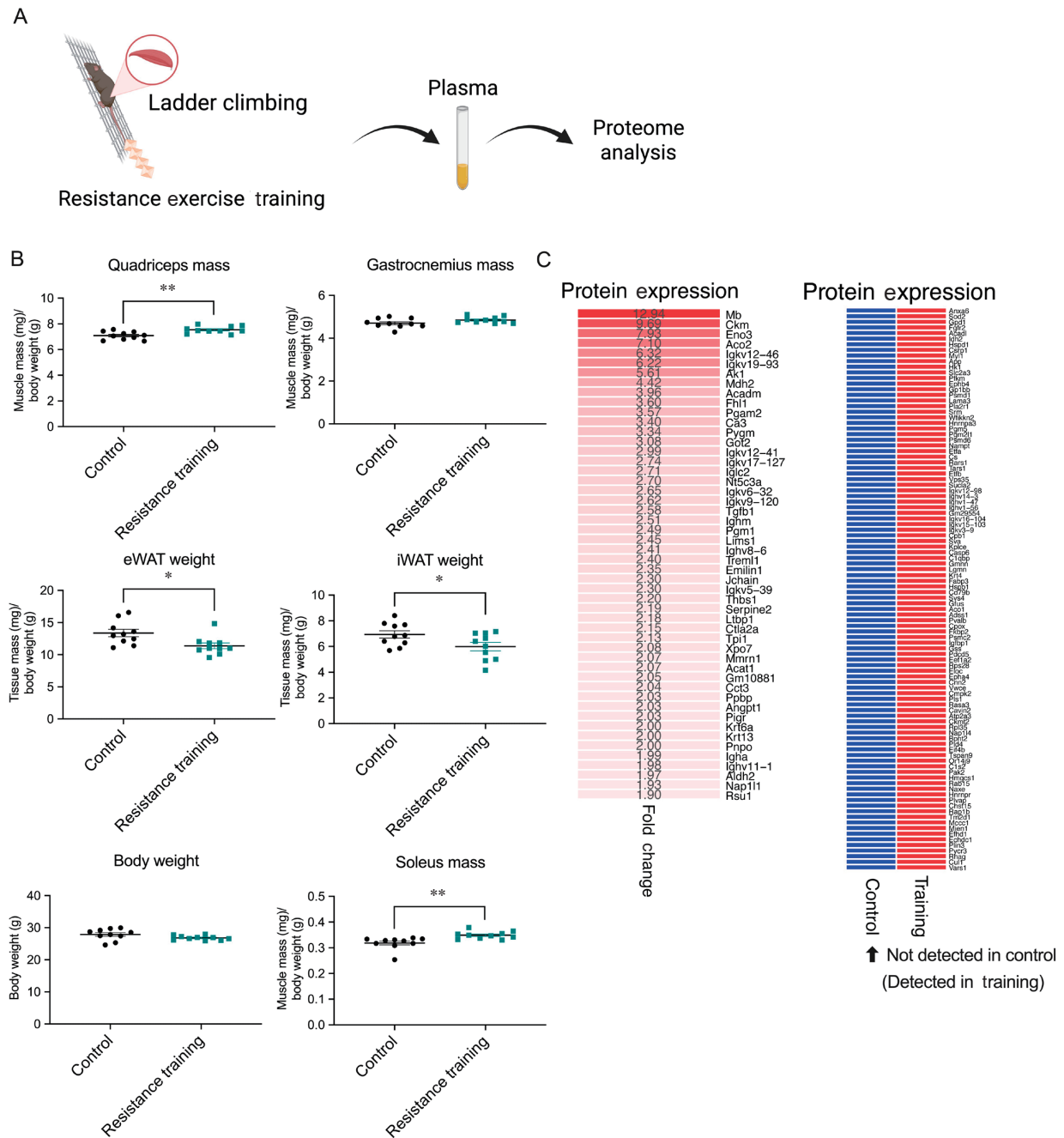


図4. レジスタンストレーニングモデルマウスにおける血漿プロテオーム解析

Fig.4. Plasma proteome analysis in resistance training model mice.

A. Experimental design(created with BioRender.com). B. Body weight and tissue mass normalized to body weight(n = 10/group). All data indicate mean $\pm$ standard error(SE). Student's two-tailed unpaired t-test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. C. Plasma proteome data. Left figure shows top 50 increased proteins in plasma of trained mice. Right figure shows detected proteins in plasma of trained mice(not detected in control mice).

り、運動による *MuRF1* などの発現増加は、骨格筋リモデリングに寄与していることも考えられる。この視点から本研究結果を解釈すると、運動マウス由来の血漿は筋細胞における骨格筋リモデリングを促進している可能性も考えられる。グルココルチコイドは慢性投与では骨格筋に対して筋萎縮というネガティブな影響をもたらす一方で、断続

的な投与では筋機能をむしろ増強することが報告されている⁷⁾。したがって、運動マウス由来の血漿が *MuRF1* の発現増加を増強したという結果は、骨格筋のグルココルチコイド応答性を増強したという運動によるポジティブな効果をとらえている可能性も考えられる。

本研究の主眼は、運動マウス由来の血漿因子の

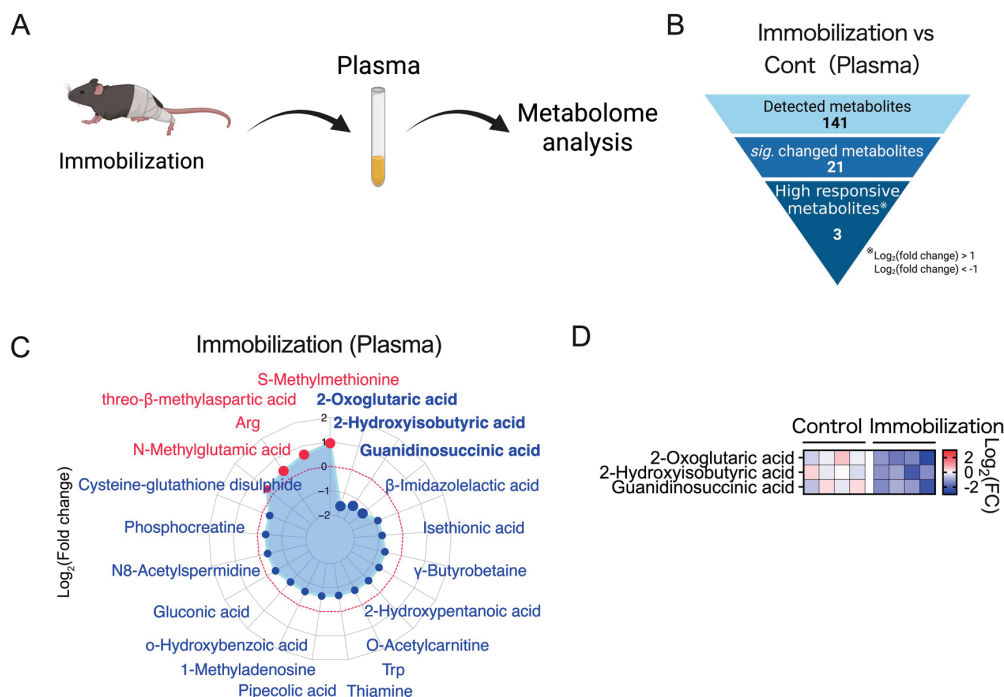


図5. 不活動モデルマウスにおける血漿メタボローム解析

Fig.5. Plasma metabolome analysis in immobilization model mice.

A. Experimental design (created with BioRender.com). B. Scheme of the procedure of data filtering. C. Twenty-one significantly altered metabolites in the plasma of limb-immobilized mice. D. Heatmap showing three highly responsive metabolites that decreased in plasma of limb-immobilized mice (n = 4 mice/group). Figure 5B-D are reproduced from Oyabu, M. et al.⁶⁾

筋萎縮抑制効果を個体レベル (in vivo) で実証することにある。当初は1年度目に本検証を実施する計画であったが、in vitro 解析の結果を受け、運動マウス由来の血漿による筋萎縮抑制効果を最適に評価しうる運動マウスの再選定に時間を要した。また、2年度目は研究実施体制の変更（他機関への研究拠点の移行）に伴い、実験環境の再整備を優先せざるを得ず、期間内に個体レベルでの投与検証を完遂するに至らなかった。今後は、新体制下において本年度確立した評価系を用い、速やかに in vivo 検証へと移行することが最優先課題である。その一環として、レジスタンストレーニングマウス由来の血漿におけるプロテオーム変化により得られた一部の運動関連エクサカイン候補のなかから、筋萎縮抑制効果を発揮する因子を同定していく必要がある。

本研究では、上述の in vivo 検証および将来の研究展開をより強固なものにするための補足的成果として、以下のオミクス解析を実施し、重要な基盤情報を取得した。まず、運動不足モデルマウスを用いたメタボローム解析により、不活動時に血漿中で有意に低下する候補代謝物を特定した⁶⁾。

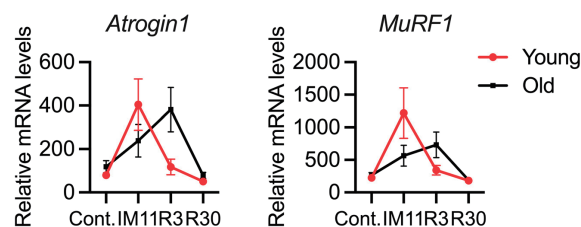


図6. 不活動・再活動モデルマウスの骨格筋における筋萎縮関連遺伝子の発現変化

Fig.6. Changes in expression of muscle atrophy-related genes in skeletal muscle of immobilization and remobilization model mice.

Relative mRNA expression of *Atrogin1* and *MuRF1* genes in skeletal muscle of young and old limb-immobilized mice and limb-remobilized mice (n = 4/group). All data indicate mean ± standard error (SE).

スを用いたメタボローム解析により、不活動時に血漿中で有意に低下する候補代謝物を特定した⁶⁾。これらの代謝物のなかには、運動による健康効果を仲介するエクサカインが含まれている可能性もあり、今後これらのデータセットを指標にエクサカイン研究が進むことが期待される。一方で、骨格筋と血漿のメタボローム解析からは、運動不足

によって変動する代謝物は骨格筋と血漿では大きく異なっていることが示唆された⁶⁾。骨格筋が運動による血中因子の変化にどの程度寄与しているのかは今後詳細に調べていく必要がある課題であるだろう。更に、加齢が筋萎縮応答に及ぼす影響を解明するために実施した骨格筋トランスクリプトーム解析では、若齢と老齢のマウスを比較した結果、不活動による筋萎縮関連遺伝子 (*Atrogin1*, *MuRF1*) の発現増加が老齢マウスではむしろ抑制されるという、加齢特有の応答変容を明らかにした。この知見は、将来の *in vivo* 血漿投与実験において、若齢と老齢で異なる評価基準を設ける必要性を示唆する補足的成果である。本研究で得られたこれら一連のデータセットは、当初計画していた個体レベルでの検証において、形態の評価を補完する新たなバイオマーカー (評価指標) を提供するものであり、将来の研究展開を支える基盤的知見となる。

総 括

本研究の主目的は、運動マウス由来の血漿投与が筋萎縮モデルマウスの筋量および筋機能を改善するかを個体レベル (*in vivo*) で実証することであった。計画全体に対する達成状況について、研究計画の中核であった *in vivo* 検証については、期間内に完遂できず未達成であると自己評価している。その主因は、1 年度目に運動マウス由来の血漿による筋萎縮抑制効果を最適に評価しうる運動マウスの再選定に不測の時間を要したこと、および 2 年度目に研究実施体制の変更 (他機関への研究拠点の移行) に伴う実験環境の再整備を優先せざるを得なかったことにあり、個体レベルでの検証は詳細な解析を実施できなかった。一方で、主目的をサポートするための補助的検証として実施した *in vitro* モデルの解析においては、運動マウス由来の血漿が筋管細胞の DEX 応答性に変容を及ぼすことが示唆された。更に、レジスタンストレーニングマウス由来の血漿プロテオーム解析を実施することで、エクサカイン候補探索における予備的なデータを得ることができた。将来の研究展開に向けた補足的成果として、筋萎縮モデル

マウスでのメタボローム解析、トランスクリプトーム解析を行い、次段階の検証において使用可能な評価指標となる多角的なデータセットを構築することができた。本助成研究における最優先の課題は、運動マウス由来の血漿が個体レベルでの筋量および筋機能の改善効果を実証することであり、今後は新体制下において、*in vivo* 検証へと移行し、血液を介した運動の健康効果伝達メカニズムの全容解明を目指す必要がある。

謝 辞

ラダートレーニングによる運動トレーニング実験に関しては、熊本大学発生医学研究所の堀居直希先生、小野悠介先生にご指導を賜りました。また、血漿におけるプロテオーム解析にあたっては、京都府立医科大学の吉澤達也先生にご協力を賜りました。そして、自発運動マウス由来の血漿による筋萎縮抑制効果の検証については、京都府立大学大学院生の山本遥希君が精力的に実施してくれました。また、本研究の実施にあたり、ご助言・サポートをいただきました先生方に感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Castellano JM, et al. (2017): Human umbilical cord plasma proteins revitalize hippocampal function in aged mice. *Nature*, **544**, 488-492.
- 2) De Miguel Z, et al. (2021): Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin. *Nature*, **600**, 494-499.
- 3) Furrer R, et al. (2023): Molecular control of endurance training adaptation in male mouse skeletal muscle. *Nat Metab*, **5**, 2020-2035.
- 4) Horowitz AM, et al. (2020): Blood factors transfer beneficial effects of exercise on neurogenesis and cognition to the aged brain. *Science*, **369**, 167-173.
- 5) Katsimpardi L, et al. (2014): Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors. *Science*, **344**, 630-634.
- 6) Oyabu M, et al. (2025): Multi-dimensional metabolomic remodeling under diverse muscle atrophic stimuli *in vivo*. *Cell Rep*, **44**, 116097.
- 7) Salamone IM, et al. (2022): Intermittent glucocorticoid treatment enhances skeletal muscle performance through sexually dimorphic mechanisms. *J Clin Invest*, **132**, e149828.
- 8) Villeda SA, et al. (2014): Young blood reverses age-related impairments in cognitive function and synaptic plasticity in mice. *Nat Med*, **20**, 659-663.