

平成 25 年度 博士後期課程学位論文要旨

学位論文題名（注：学位論文題名が欧文の場合は和訳をつけること）

Macrophage migration inhibitory factor decreases insulin- and AMPK-mediated glucose transport in skeletal muscle.

（マクロファージ遊走阻止因子は骨格筋におけるインスリンと AMPK による糖取り込みを抑制する）

学位の種類： 博士（健康科学）

人間健康科学研究科 博士後期課程 人間健康科学専攻ヘルスプロモーションサイエンス学域

学修番号 11999603

氏名： 宮武正太

（指導教員名：藤井宣晴）

注：1 ページあたり 1,000 字程度（欧文の場合 300 ワード程度）で、本様式 1 枚～2 枚（A4 版）程度とする。

運動は多様な医学的な恩恵効果をもたらすが、その分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。近年発見されてきた骨格筋からの生理活性物質（myokine; 骨格筋から放出され、種々の細胞間相互作用を媒介するタンパク質性因子の総称）は筋収縮によって分泌制御され、骨格筋自身やその他の細胞に作用することにより運動の恩恵効果をもたらす可能性がある。本研究は、①筋収縮時に分泌される myokine を網羅的に探索し、②それにより発見された macrophage migration inhibitory factor (MIF) の生理機能を解明することを目的とした。

まず、C2C12 由来筋管の電気刺激による収縮時に分泌される myokine を、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法を用いたプロテオミクスによって網羅的に探索した。これにより検出されたタンパク質を *in silico* 分析し、分泌蛋白様の特徴を持つものを選別した。その結果、コントロール群（非収縮群）からは 165 種類、収縮群からは 204 種類のタンパク質が検出され、2 つの群に重複して検出されたタンパク質は 159 種類であった。予測された分泌タンパク質のうち骨格筋以外の細胞から実際に分泌されることが報告されているものは 12 種類であった。このうち、両群に重複して検出された MIF に着目し、機能解明を行うこととした。

まず、培養骨格筋細胞を収縮させた時の MIF 分泌量の変化を検討した。C2C12 由来筋管に 1 時間の筋収縮を行わせたところ、MIF 分泌量は約 70% 減少した。この時、乳酸脱水素酵素に変化はなかったことから、細胞膜障害は生じていなかった。

次に、筋収縮による生体骨格筋からの MIF 分泌量の変化を検討した。MIF は骨格筋以外の様々な組織からも分泌される。そこで、HA 標識を付けた MIF (HA-MIF) を骨格筋に導入することにより骨格筋由来の MIF を区別した。導入から 2 週間後、*in situ* contraction によって 15 分間の筋収縮を行わせた。その後回収した血清中には HA 標識抗体による immunoblotting により HA 活性が検出された。ゆえに、MIF は生体においても骨格筋から分泌されることが明らかになった。一方、MIF 抗体によっては内因性の MIF の他に HA-MIF が検出されなかったことから、骨格筋から血液中に分泌される MIF は他の組織由来のものに比べて非常に少ないと考えられた。ゆえに、骨格筋から分泌される MIF は endocrine として遠方の組織に働くのではなく、近傍の骨格筋自体に働く可能性が高い。また、マウスの筋収縮によって、血液中の HA 活性に変化はなく、筋収縮による骨格筋からの HA-MIF 分泌量に変化は見られなかった。この原因の 1 つとして、HA 標識を付けたこ

とにより本来の筋収縮による分泌制御がマスクされた可能性が考えられた。

骨格筋は血糖の主要な取り込み器官であることから、MIFの骨格筋自体への作用として糖取り込みに着目した。骨格筋への糖取り込みは主にインスリンと5'AMP-activated protein kinase (AMPK)によってもたらされる。また、筋収縮によるAMPKの活性化は骨格筋における急性の糖取り込みを促進する。

まず、MIFがインスリンとAMPKによる糖取り込みに与える影響を検討した。マウスから摘出した下肢骨格筋を培養装置に装着し、MIFを含むKRB中で2時間培養後、インスリンを30分間またはAMPK活性化薬5-aminoimidazole-4-carboxyamide ribonucleoside (AICAR)を20分間反応させ、RI標識した糖の取り込み量を放射線活性により測定した。その結果、MIFは糖取り込みに単独では影響を与えなかった。これに対して、インスリンとAICAR刺激によって生じる糖取り込みは、MIFによってその増加率が減弱した。ゆえに、MIFはインスリンとAMPKによる骨格筋の糖取り込みを抑制した。

次に、MIFが筋収縮による糖取り込みに与える影響を検討した。この検討にはMIFが分泌されない、全身性のMIF欠損マウスを用いた。野生型及びMIF欠損マウスからの下肢骨格筋を10分間収縮させ、同様に糖取り込みを測定したところ、筋収縮による糖取り込み量は、野生型に比べてMIF欠損マウスで有意に高かった。MIFの欠損が筋収縮時の糖取り込みを促進したことから、MIFは筋収縮による糖取り込みを抑制した。

本研究はmyokineが培養骨格筋細胞及び生体骨格筋の両者から分泌されることを初めて証明した。また、MIFはインスリン、AMPK及び筋収縮による骨格筋の糖取り込みを抑制した。筋収縮時にMIF分泌が減少することは、MIFの糖取り込み抑制作用が減少することにつながり、結果として筋収縮による糖取り込みの促進に貢献している可能性がある。また、筋収縮はインスリンによる糖取り込みを促進するのでMIFはこのメカニズムにも関与している可能性がある。