



Pulsed ultrasound promotes secretion of anti-inflammatory extracellular vesicles from skeletal myotubes via elevation of intracellular calcium level

山口, 亜斗夢

(Degree)

博士 (保健学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8914号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490139>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(様式3)

論文内容の要旨

専攻領域 リハビリテーション科学領域

専攻分野 運動機能障害学分野

氏 名 山口 亜斗夢

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を()を付して併記すること。)

Pulsed ultrasound promotes secretion of anti-inflammatory extracellular vesicles from skeletal myotubes via elevation of intracellular calcium level

(筋線維への超音波照射は細胞内 Ca^{2+} の増加による細胞外小胞放出増加を介してマクロファージへの抗炎症効果を発揮する)

論文内容の要旨 (1,000字～2,000字でまとめること。)

【はじめに】マクロファージは自然免疫系の中心的役割を担う細胞である一方、マクロファージの過剰な炎症反応は臓器障害や治療の遷延化をもたらすため、炎症反応の適切な制御が求められる。骨格筋が Exosome と呼ばれる膜小胞に抗炎症性を有する因子を包含して他細胞・他臓器に送達することが知られており、骨格筋への超音波照射が Exosome の分泌を促進することが報告されている。そこで本研究では、超音波照射による骨格筋 Exosome 放出促進を介したマクロファージ炎症反応制御効果を検証した。

【方法】培養筋線維に超音波 (ソニックタイザー SZ-100, ミナト医科学) を3種の強度 (1.0 W/cm^2 , 2.0 W/cm^2 , 3.0 W/cm^2) で5分間照射し、細胞内 Ca^{2+} 濃度及び Exosome 放出量を測定した。12時間後に Exosome を含む培養上清を回収しマクロファージに添加し、 100 ng/mL のリポポリサッカライドで1.5時間刺激したのち炎症性因子 ($\text{IL-1}\beta$ ・ IL-6) の mRNA 発現レベルを qPCR で測定した。また、超音波誘発性骨格筋 Exosome 内

miRNA シーケンス解析を行った。

【結果】 3.0 W/cm^2 の超音波照射群にて有意に筋細胞内への Ca^{2+} の流入が促進され, Exosome 放出量が有意に増加した。培地内 Ca^{2+} の枯渇により超音波による Exosome 放出促進効果は消失した。超音波誘発性 Exosome を含む培養上清を添加されたマクロファージでは炎症性因子 ($\text{IL-1}\beta \cdot \text{IL-6}$) の発現が有意に抑制され, 培養上清から Exosome を除去することでこの効果が消失した。筋線維由来 Exosome の miRNA-seq 解析において, 抗炎症性の骨格筋特異的 miRNA (miR-206) の含有率が最も高く, 超音波照射によって当該 miRNA の含有率は変化しなかった。

【考察】細胞内 Ca^{2+} の増加は Exosome の放出を増加させることが知られているため, 超音波は筋線維内への Ca^{2+} の流入を増加させ, Exosome の放出を促進したと考えられる。Exosome を除去した培養上清では抗炎症効果がみられなかったことから, 筋線維由来 Exosome にマクロファージの炎症反応を抑制する効果があり, 超音波による Exosome の放出増加によってその効果が増強されることが示唆された。Exosome 内に豊富に含まれた miR-206 は抗炎症作用を有することが報告されており, 骨格筋 Exosome はこれらの因子を送達することでマクロファージの炎症反応を抑制したと考えられる。

【結論】筋線維への超音波照射が Ca^{2+} を介して筋特異的因子を含む Exosome の放出を促進し, マクロファージの炎症反応を抑制することが明らかとなった。

指導教員氏名：藤野 英己

(別紙 1)

論文審査の結果の要旨

氏 名	山口 亜斗夢		
論文 題 目	Pulsed ultrasound promotes secretion of anti-inflammatory extracellular vesicles from skeletal myotubes via elevation of intracellular calcium level (筋線維への超音波照射は細胞内Ca ²⁺ の増加による細胞外小胞放出増加を介してマクロファージへの抗炎症効果を発揮する) (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)		
審 査 委 員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	藤野 英己
	副 査	教授	秋末 敏宏
	副 査	准教授	前重 伯壮
	副 査		印
要 旨			
<p>本研究では超音波照射による骨格筋細胞外小胞の放出促進を介したマクロファージ炎症反応制御効果を検証した。培養筋線維に超音波装置で5分間照射し、細胞内Ca²⁺濃度及び細胞外小胞の放出量を測定した。また、12時間後に細胞外小胞を含む培養上清を回収しマクロファージに添加し、リポポリサッカライドで1.5時間刺激したのち炎症性因子(IL-1β・IL-6)のmRNA発現レベルをqPCRで測定し、さらに超音波誘発性の骨格筋細胞外小胞内miRNAシーケンス解析が実施された。超音波照射で有意に筋細胞内へのCa²⁺の流入が促進され、筋細胞から細胞外小胞の放出量が有意に増加した。また、培地内Ca²⁺の枯渇により超音波による細胞外小胞の放出促進効果は消失した。超音波誘発性の細胞外小胞を含む培養上清を添加されたマクロファージでは炎症性因子(IL-1β・IL-6)の発現が有意に抑制され、培養上清から細胞外小胞を除去することで本効果が消失した。さらに筋線維由来細胞外小胞のmiRNA-seq解析において、抗炎症性の骨格筋特異的miRNA(miR-206)の含有率が最も高かったが、超音波照射によりmiRNAの含有率は変化しなかった。これらの結果から筋線維への超音波照射がCa²⁺を介して筋特異的因子を含む細胞外小胞の放出を促進し、マクロファージの炎症反応を抑制することを明らかにした。本研究で検証した結果は妥当であり、その解釈も適切と考えられる。本研究で明らかにされた知見はリハビリテーション科学分野や保健学の発展に寄与する価値ある集積であることを認め、学位申請者の山口 亜斗夢は博士(保健学)の学位を得る資格があると認める。</p>			
掲載論文名・著者名・掲載(予定)誌名・巻(号)、頁、発行(予定)年を記入してください。 Pulsed ultrasound promotes secretion of anti-inflammatory extracellular vesicles from skeletal myotubes via elevation of intracellular calcium level. Yamaguchi A, Maeshige N, Noguchi H, Yan J, Ma X, Uemura M, Su D, Kondo H, Sarosiek K, Fujino H. <i>Elife</i> 12: RP89512. 2023			