

博士論文

筋芽細胞に対する亜鉛の効果および
作用機序に関する研究

大橋 和也

目次

略語一覧	2
第1章 序論	4
第2章 リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響	11
背景	11
実験材料と方法	15
結果	25
考察	50
第3章 筋芽細胞増殖・分化に対する亜鉛の影響	57
背景	57
実験材料と方法	59
結果	61
考察	70
第4章 総括	73
引用文献	76
謝辞	85

略語一覧

- BCA, bicinchoninic acid (ビシンコニン酸)
- BSA, bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
- BrdU, 5-bromo-2'-deoxy-uridine (ブロモデオキシウリジン)
- CK, creatine kinase (クレアチンキナーゼ)
- DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium (ダルベッコ改変イーグル培地)
- DMSO, dimethyl sulfoxide (ジメチルスルホキシド)
- DOX, doxycycline (ドキシサイクリン)
- DTPA, diethylenetriamine pentaacetic acid (ジエチレントリアミン五酢酸)
- DTT, dithiothreitol (ジチオスレイトール)
- EdU, 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
- EGF, epidermal growth factor (上皮細胞成長因子)
- eGFP, enhanced green fluorescent protein (高感度緑色蛍光タンパク質)
- EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid (エチレングリコールビス2アミノエチルエーテル四酢酸)
- ERK, extracellular signal-regulated kinase (細胞外シグナル調節キナーゼ)
- FBS, fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
- FGF, fibroblast growth factor (線維芽細胞成長因子)
- GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)
- HGF, hepatocyte growth factor (肝細胞成長因子)
- HS, horse serum (ウマ血清)
- IGF, insulin-like growth factor (インスリン様成長因子)
- IGFR, insulin-like growth factor receptor (インスリン様成長因子受容体)
- IRS, insulin receptor substrate (インスリン受容体基質)
- ITS, insulin, transferrin, sodium selenite (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム)
- LTR, long terminal repeat (末端反復配列)
- MAPK, mitogen-activated protein kinase (分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ)
- MyHC, myosin heavy chain (ミオシン重鎖)

mTOR, mammalian target of rapamycin (哺乳類ラパマイシン標的タンパク質)
PBS, phosphate buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
PDGF, platelet-derived growth factor (血小板由来成長因子)
PI3K, phosphoinositide 3-kinase (ホスホイノシチド3キナーゼ)
PKB, protein kinase B (プロテインキナーゼ B)
PTPase, protein tyrosine phosphatase (チロシンホスファターゼ)
RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ転写反応)
SDS, sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
S1P, sphingosine-1-phosphate (スフィンゴシン-1-リン酸)
S1PR, sphingosine-1-phosphate receptor (スフィンゴシン-1-リン酸受容体)

第1章 序論

筋組織は全身に分布し、その総数は 600 を超える。このうち半数以上は横紋構造を持ち随意収縮を担う骨格筋である。骨格筋は多数の筋線維が束になった構造であり、筋線維一本が筋細胞である。筋線維は発生時に多数の単核筋芽細胞が互いに融合し形成されるため、多核で巨大な細胞という特徴をもつ。さらに成熟した骨格筋の細胞核は細胞膜近傍へと移動し周辺核として存在する。筋線維の主要構成要素は収縮機能を有した筋原線維によって占められており収縮することで身体運動や呼吸に働く。

骨格筋は身体運動を司るため損傷を受けやすい組織であり、高負荷のトレーニングやコンタクトスポーツでは挫傷や断裂が誘発されることがある。また骨折など 2 次的要因によっても筋損傷を受ける。さらに筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患では骨格筋は常に損傷状態にあるといえる。

骨格筋の特徴に、損傷を受けた際には速やかに再生される可塑性に富んだ組織であることが挙げられる。しかし、加齢や疾患合併等の影響によって再生遅延が認められる。再生遅延は疼痛の持続や、それに伴う活動量の低下を引き起こすため臥床期間長期化の一要因であり、寝たきりの原因になる。さらに再生遅延は組織線維化の要因でもあり、骨格筋の機能低下に関与する。そのため、骨格筋再生の促進は予後を良好にするための重要な要素である。

骨格筋の再生機序を解明することは、再生促進に貢献できると考えられる。超高齢社会を迎えた現在、骨格筋損傷が起因となる寝たきりの高齢者が一層増加することが予想されることから、詳細な骨格筋再生機序の解明が待たれる。

筋衛星細胞と筋再生

筋線維の損傷について、筋線維膜の損傷や微細損傷の場合 dysferlin1、caveolin-3

などが担う筋線維自体の修復機構により筋崩壊拡大が妨げられている[1]。一方で、集団壊死等が起因となり筋線維が広範の損傷を受けた場合は、筋線維自体の修復能力では不十分のため骨格筋幹細胞がその再生を担う。重篤損傷時の再生について、その中核を担っているのが筋衛星細胞である。筋衛星細胞は筋線維の表面に局在する細胞で、基底膜と形質膜の間に位置している。平静状態では休眠状態であり増殖を停止した G₀ 期で存在するが、筋線維が損傷した場合や筋線維へ過負荷が加わった場合に増殖を開始する[2]。この休眠状態から周期細胞への移行は筋衛星細胞の活性化と呼ばれている。活性化した筋衛星細胞は、損傷部位修復のため細胞分裂を繰り返し増殖する[3]。増殖中の細胞は筋前駆細胞と呼ばれ、増殖した筋前駆細胞は筋芽細胞へと分化し、互いに融合することで多核の筋管細胞を形成、または既存の筋線維に融合して成熟し再生される。また筋前駆細胞の一部は自己複製し再び休眠状態に戻ることで筋衛星細胞は維持される[4]。(図 1)

亜鉛について

亜鉛は必須ミネラルの一つであり、体内にある重金属の中では鉄について 2 番目に多く含まれる。ヒトでは成人 70kg の場合約 1.4-2.3 g 存在し、主に骨格筋、骨、皮膚、肝臓、脳、腎臓などに分布する。骨格筋と骨の亜鉛含有率は組織の中でも高く、両者を合わせると全亜鉛含有量の 85%以上を占める[5]。亜鉛はそのほとんどがタンパク質などと結合して存在し、3000 種類以上もの亜鉛含有タンパク質が報告されている[6]。亜鉛含有タンパク質を含め血清中の亜鉛濃度は約 15 μM であり、血液に含まれる亜鉛含有量は体内に存在する亜鉛の 0.1%程度である[7]。またタンパク質に結合していない血清に含まれる遊離した亜鉛イオン濃度は極めて低く 10^{-9}M 以下に保たれていることも知られている[8]。生体に

対する亜鉛の影響については数多く研究がされており、亜鉛の主な生理機能には、触媒作用、構造維持、調節機能、解毒機能などがある[8]。

亜鉛は生命活動に必須であり、その欠乏症についても数多くの関連疾患が報告されている。亜鉛欠乏症は、発達遅延や発育異常から始まり、性的発育遅延、無月経、精子減少、創傷治癒遅延、食欲不振、下痢等の消化器症状、味覚障害など多岐にわたる[8]。

近年、食生活の改善によって健常成人の亜鉛欠乏症はほとんど認められなくなったがフィチン酸の過剰摂取[9]や疾患によって亜鉛欠乏がみとめられることがある。その代表的な疾患の一つに糖尿病があり、1型および2型糖尿病では健常者と比較し血清内の亜鉛濃度は低く[10]、組織内亜鉛含有量に至っては膵臓で約50%減少していると報告されている[11]。

骨格筋に対する影響についても多くの報告があり、亜鉛は骨格筋の単収縮張力の向上[12]や筋持久力の向上[13]などの筋生理学的な効果や、亜鉛含有薬Z-103は、Duchenne型筋ジストロフィーの遺伝性筋原疾患の筋機能を向上させることが報告されている[14, 15]。一方で、筋衛星細胞に対する亜鉛の影響はそのほとんどが不明のままである。

リザーブ細胞について

本研究では筋衛星細胞または筋芽細胞に対する亜鉛の作用について検討するため、マウス骨格筋筋芽細胞株のC2C12細胞を用いた。C2C12細胞は十分量の血清を含んだ培養液ではすべての細胞が増殖し、低栄養状態に置換すると分化が誘導される。分化に運命決定されたC2C12細胞は各々が融合することで多核の筋管細胞を形成する。C2C12細胞は、分化誘導によって2つの形態をとる。一方は上記した筋管細胞であり、他方は筋管細胞を形成せず単核の細胞として

存在する。この単核の細胞はリザーブ細胞と呼ばれ増殖中の C2C12 細胞とは異なった性質を示す[16]。リザーブ細胞の特徴は、細胞周期 G₀ 期で増殖を停止していること。MyoD、myogenin 等分化制御因子の発現は認められず、未分化状態であること。十分量の血清を加えると G₀ 期から逸脱し増殖を開始すること。再び増殖した細胞は分化誘導により筋管細胞とリザーブ細胞を形成することなどがある。

以上のリザーブ細胞の特徴は休眠状態の筋衛星細胞の特徴を反映しており、リザーブ細胞はそのモデルとして用いられている[17, 18]。筋衛星細胞の採取は、初代培養法や単一筋線維培養法によって可能であるが、一度に十分量の細胞採取が困難なことや、採取と共に筋衛星細胞の活性化が誘導される可能性があるなど、同一条件による休眠状態の筋衛星細胞の採取が難しいと考えた。そのため本研究ではリザーブ細胞を用いた。(図 2)

なお、リザーブ細胞の増殖誘導刺激後 24 時間以内に行われた DNA 合成をリザーブ細胞の活性化とみなし、第一細胞分裂以降の DNA 合成は細胞増殖とみなした。

インスリン・IGF・EGF について

インスリンは膵臓ランゲルハンス島の β 細胞より産生・分泌されるペプチドホルモンである。主な標的臓器は骨格筋、腎臓、肝臓であり、骨格筋では Glut4 を介したグルコースの取り込みがその中心的作用を担い研究が進められている。β 細胞内に貯蔵されているインスリンはその結晶構造に亜鉛を含有している。分泌顆粒内に貯蔵されていた亜鉛-インスリン六量体はグルコース刺激によって亜鉛とインスリンに解離した状態で放出される[8]。

インスリン様成長因子(Insulin-like growth factor, IGF)はインスリン前駆体であ

るプロインスリンのホモログであり、IGF-1 と IGF-2 が存在する。IGF-1 は主に成長ホルモンの作用により肝臓から分泌される。一方で IGF-2 は骨格筋や腎臓、膵臓より分泌され主に胎児の発達に関与している。IGF-1 は成長ホルモンによって分泌される他、運動によって骨格筋から放出され運動早期に認められる血中 IGF-1 濃度の増加は筋線維膜に結合した IGF-1 の放出であると考えられている [19]。インスリンと IGF-1 および IGF-2 は、各々がリガンドとしてインスリン受容体、IGF-1 受容体および IGF-2 受容体へと結合することで作用し、各成長因子は高濃度環境下においてすべての受容体へ作用する [20]。

上皮細胞成長因子(Epidermal Growth Factor, EGF)は、多くの細胞種でその作用が認められ組織特異性は示さない細胞増殖に重要な成長因子の一つである。筋芽細胞でも EGF の作用は知られており、筋芽細胞の増殖促進やグルコースの取り込みを担う [21, 22]。また、EGF 受容体の erbB は筋衛星細胞の活性化誘導刺激後 6 時間以内に発現し抗アポトーシスの作用を示す [23]。

インスリン受容体および IGF-受容体について

インスリン受容体は 4 量体であり、二つの細胞外 α サブユニットと膜貫通型 β サブユニットで構成されチロシンキナーゼ活性を有する。その量は IGF-1 受容体と比較し極めて少ない。

IGF-1 受容体はインスリン受容体同様 4 量体であり、二つの細胞外 α サブユニットと膜貫通型 β サブユニットがお互いに連結している。リガンドは α サブユニットのロイシンリッチリピートドメインとシステインリッチドメインよりなるポケット構造に結合し、 β サブユニットを介し細胞内リン酸化ドメインへシグナルが伝達する。これは β サブユニットの構造変化やチロシンキナーゼドメインの自己リン酸化を誘導する。IGF-1 受容体の発現は多くの細胞種で認められ、

1つの細胞には20から35000ほどの受容体が発現し、その数は成長因子とチロシンによって厳密に制御されている。IGF-1受容体はインスリン受容体と70%のアミノ酸配列を共有しており、インスリン受容体と複合体を形成する。この受容体複合体はIGF-1およびインスリンに高い親和性で結合能を有している。

IGF-2受容体はインスリン受容体およびIGF-1受容体と構造が異なり単量体で存在する。チロシンキナーゼ活性を持たず、細胞成長への関与は低い。[24]

本研究について

骨格筋筋芽細胞のC2C12細胞は、休眠状態のリザーブ細胞、増殖状態の細胞および分化した筋管細胞の少なくとも3つの形態を持つ。そこで本研究では、C2C12細胞各々の状態に対する亜鉛の影響および作用機序について検討を行った。

リザーブ細胞への影響とその作用機序については第2章の「リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響」、増殖中のC2C12細胞への影響については第3章の「筋芽細胞増殖・分化に対する亜鉛の影響」にまとめた。

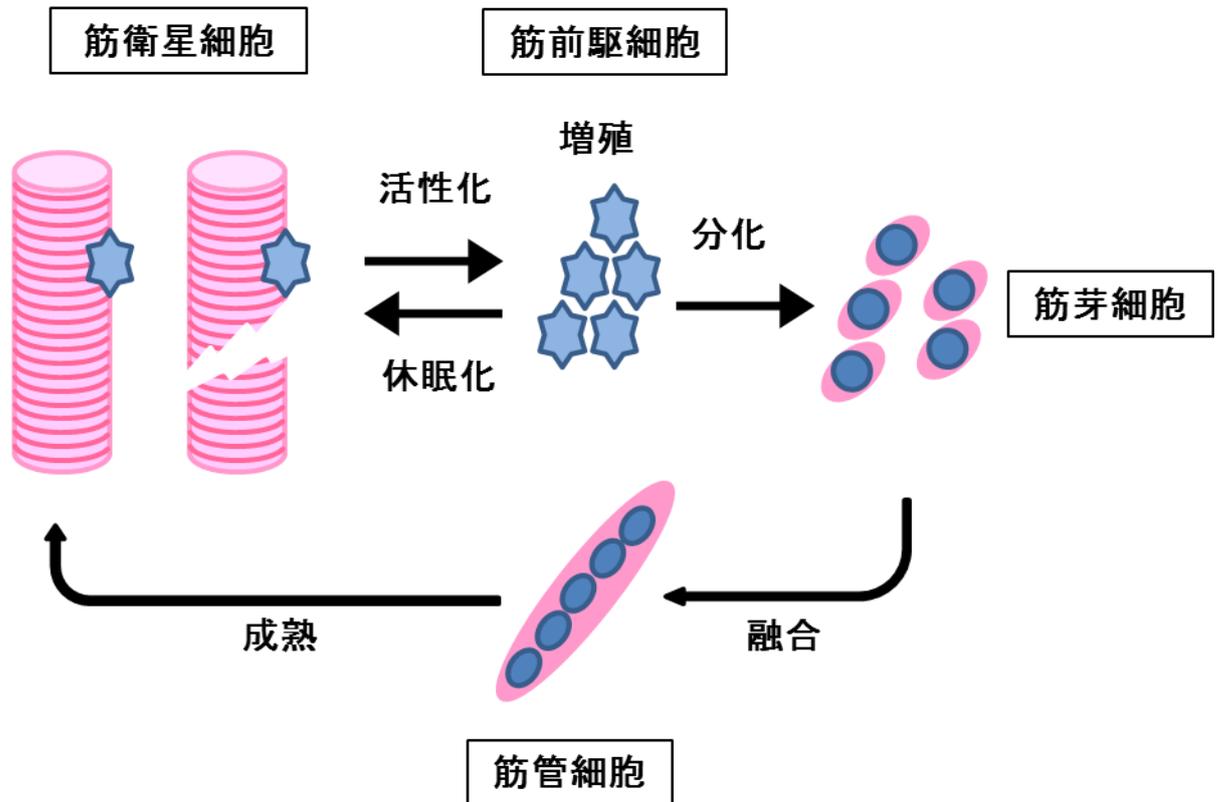


図1. 骨格筋再生過程

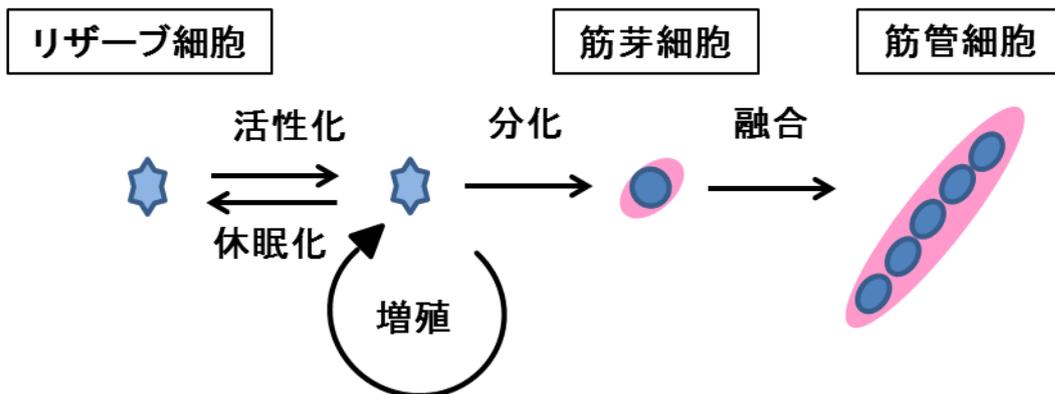


図2. C2C12細胞について

第2章 リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響

筋衛星細胞は骨格筋再生に必要不可欠な骨格筋幹細胞である[25]。平静時は細胞増殖能を持たない休眠状態として存在し、骨格筋の損傷とともに活性化され増殖能力を発揮する。筋衛星細胞の活性化は骨格筋再生時に起きる最初のイベントである。

筋衛星細胞活性化は損傷筋抽出液を加えることによって誘導される。一方で損傷筋抽出液は線維芽細胞の増殖には影響を与えないことが明らかにされている[26]。これによって筋衛星細胞活性化はそれ特異的な機構が存在することが考えられており、その特異作用をもつ成分は肝細胞成長因子(hepatocyte growth factor, HGF)であることも明らかとされた[27]。しかし、無血清の条件下では HGF によって休眠状態の筋衛星細胞を刺激しても十分な活性化誘導はできない。そのため、筋衛星細胞活性化は HGF をはじめとする血清中や抽出液に含まれる成分が協調的に働いていると考えられる。

筋衛星細胞の活性化機構に対する研究は、C2C12 細胞のリザーブ細胞を用いて行うことができる。リザーブ細胞の活性化には EGF、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor, FGF)、血小板由来成長因子(platelet-derived growth factor, PDGF-BB)の成長因子をインスリンと組み合わせ培養することで血清と同程度誘導されることが報告されている[18]。

インスリンはインスリン受容体および IGF 受容体に結合するリガンドとして機能する。インスリンが受容体へ結合すると受容体 β サブユニットのチロシンキナーゼが活性化され、その結果リン酸化調節領域が活性化される。これによりインスリン受容体基質(insulin receptor substrate-1, IRS-1)の活性化が引き起こされ、その下流に位置する複数のカスケードを活性化させる[28]。インスリン受

容体や IGF-1 受容体下流の情報伝達系の一つにホスホイノシチド 3 キナーゼ (Phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /Akt カスケードがある。骨格筋において IGF-1 誘導性 PI3K/Akt カスケードの活性化は C2C12 筋管細胞の細胞サイズの増大に関わり、筋肥大への研究が進んでいる[29]。さらに、PI3K/Akt カスケードの活性化は筋衛星細胞の細胞周期 G₁/S 期の移行に関与することが示されている[30]。また、このカスケードの下流にある哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mammalian target of rapamycin, mTOR)は Akt によって活性化を受ける[31, 32]。mTOR は細胞増殖と細胞周期制御のマスター因子であり、筋芽細胞では分化と肥大に関与する[33, 34, 35]。

インスリン受容体は他のカスケードにも影響し、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)カスケードの 1 つ細胞外シグナル調節キナーゼ(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)の活性化に関与する[28]。ERK は種々の細胞で細胞増殖と分化、生存を制御することが知られているが[36]、C2C12 のリザーブ細胞においては休眠状態からの活性化を誘導する一要因として報告され、インスリンと EGF、FGF の組み合わせ(インスリン/EGF、インスリン/FGF)によって誘導されるリザーブ細胞活性化は ERK のリン酸化が必要であることが明らかにされている[17, 18] (図 3)。

このように筋衛星細胞およびリザーブ細胞の活性化機構に対する研究対象は、そのほとんどが成長因子やペプチドホルモンであり、その作用機序も明らかにされつつある。一方で、成長因子以外でもリザーブ細胞活性化を引き起こすことが明らかにされ、細胞膜構成脂質のスフィンゴ脂質分解産物で、細胞に対し生理活性を持つスフィンゴシン-1-リン酸(sphingosine-1-phosphate, S1P)がリザーブ細胞活性化に寄与していることが報告された[18]。

そこで細胞に対し生理活性を持つミネラルがリザーブ細胞活性化への必要条件を満たすことが可能であればリザーブ細胞活性化へ寄与しうると考えた。本研究では必須ミネラルの一つである亜鉛に着目した。

亜鉛は細胞に対し生理活性を示し、情報伝達系へ影響することが多くの研究から明らかとなっている。特にインスリン受容体および IGF 受容体情報伝達系に対する影響については研究が進んでおり、*In vitro* では C2C12 細胞でインスリン無添加の状態に亜鉛を加えることによってインスリン受容体と IRS-1 のリン酸化が誘導される[37]。さらに、*in vivo* においてもその効果が示されており、高亜鉛食餌は骨格筋でリン酸化 Akt を増大させる[38]。また亜鉛は EGF 受容体下流の情報伝達系の活性化にも寄与し、EGF 受容体のリン酸化を介して、ERK のリン酸化を誘導する[39]。このように亜鉛は成長因子によって誘導されるリザーブ細胞活性化の条件をいくつか満たす(図 4)。

以上のことから、亜鉛は C2C12 リザーブ細胞活性化を誘導できることが考えた。本章ではリザーブ細胞活性化への影響について検討を行った。

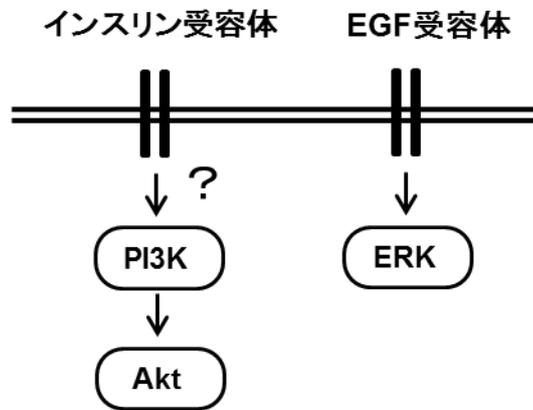


図3. リザーブ細胞活性化条件

インスリンとEGFの単独ではリザーブ細胞活性化の誘導効率が低いが、組み合わせた条件では血清と同程度活性化誘導効率が高まる。

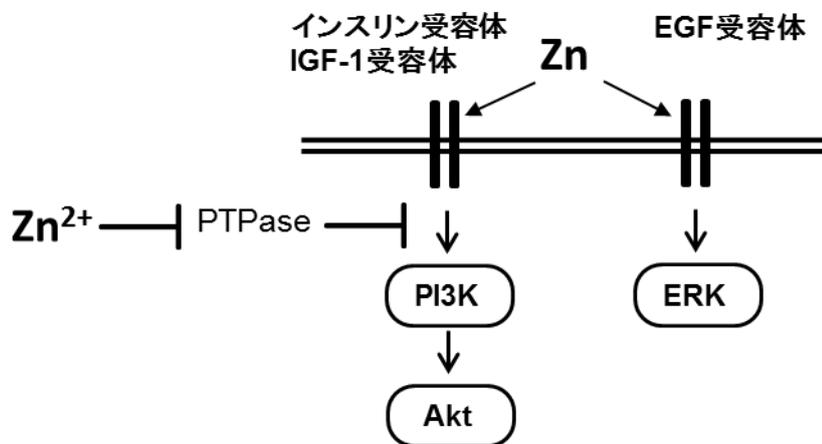


図4. 細胞に対する亜鉛の影響

亜鉛はインスリン受容体、IGF受容体およびEGF受容体の活性化に関与し、下流の情報伝達系を活性化させる。情報伝達系活性化機構のひとつにProtein Tyrosine Phosphatase (PTPase)阻害効果が考えられている。

実験材料と方法

細胞培養

マウス由来骨格筋筋芽細胞株である C2C12 細胞は 37 °C、5% 二酸化炭素存在下で培養した。細胞の増殖には 20% ウシ胎児血清(fetal bovine serum, FBS; Gibco, NY)を含むダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM; Gibco) (20 % FBS/DMEM)を使用した。

C2C12 細胞の分化誘導は、2% ウマ血清(horse serum, HS; Gibco)を含む DMEM(2% HS/DMEM)または、5 µg/ml インスリン、5 µg/ml トランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸ナトリウムの混合液(ITS; Sigma-Aldrich, MO)、1 mg/ml ウシ血清アルブミン(bovine serum albumin, BSA; Sigma-Aldrich)を含む DMEM (ITSB/DMEM)の無血清培養液に交換することで行った。

リザーブ細胞作製は、35 mm の細胞培養皿(IWAKI, 千葉)に 1×10^5 個の細胞を播種し 5 日間分化誘導することで行った。分化誘導後 5 日目に単核を維持し、増殖能を待たない細胞をリザーブ細胞とした。

なお、すべての培養液は 50 U/ml ペニシリンと 50 µg/ml ストレプトマイシン(Gibco)を含む。

リザーブ細胞と筋管細胞の分離

C2C12 細胞を分化誘導するとリザーブ細胞と筋管細胞が混在する。そこで、リザーブ細胞を評価するために、筋管細胞をトリプシン処理によって除去した。

方法は先行研究に準拠した[18]。分化誘導 4-5 日目の細胞を PBS(+) (0.1 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.13 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 和光純薬, 大阪, を含む PBS)で洗浄し、PBS(+)で希釈した 0.05% トリプシン溶液(Gibco)で 1-5 分間室温または 37 °C 環境

下で反応させることで筋管細胞を除去した。

リザーブ細胞活性化の評価

リザーブ細胞作製後 2% HS/DMEM または 1 mg/ml BSA を含む DMEM (0.1% BSA/DMEM)の無血清培養液へ交換した。亜鉛は塩化亜鉛および硫酸亜鉛(和光純薬)を使用した。活性化の誘導は塩化亜鉛・硫酸亜鉛 (25-100 μ M)、インスリン (10 μ g/ml) (Sigma-Aldrich)、EGF (25 ng/ml) (R&D Systems, MN)および IGF-1 (100 ng/ml) (R&D Systems)をリザーブ細胞へ添加することで行った。阻害剤を使用した場合は、活性化因子を加える 30 分前に薬剤を添加し前処理を行った。阻害剤は LY294002 (CaymanChemical, AnnArbor, MI)、Triciribine (Merck, Whitehouse Station, NJ)、Rapamycin (Cayman Chemical)、U0126 (Merck)、AG1024 (Merck)を各々ジメチルスルホキシド(dimethyl sulfoxide, DMSO; 和光純薬)に溶解した。また阻害剤無添加のコントロールとして最終濃度 0.1%の DMSO を 0.1% BSA/DMEM へ加えた。リザーブ細胞活性化の評価は 10 μ M のブロモデオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxy-uridine, BrdU; Sigma-Aldrich) または 10 μ M の 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU; Invitrogen, Life Technologies, Paisley, UK)の細胞核への取り込み、Ki67 の発現によって評価した。BrdU、EdU はチミジンのアナログであり DNA 合成期にチミジンにかわり DNA に取り込まれる。そのため、増殖中の細胞を標識することができる。Ki67 は G₀ 期以外の細胞核に特異的に発現することから増殖細胞の標識として用いた。

BrdU、EdU は 24 時間細胞に取り込ませた(図 5)。リザーブ細胞を評価するため、固定前にトリプシン処理によって筋管細胞を除去した。細胞の固定は 10%ホルマリン溶液によって 30 分間行った。その後、0.5% Triton X-100 を含む PBS で細胞膜透過処理を行い、1N の塩酸で 30 分間処理した後 5 mg/ml BSA/PBS に

よってブロッキングし抗体反応させた。一次抗体はラット抗 BrdU モノクローナル抗体(clone BU1/75, Abcam, Cambridge, UK)、二次抗体は Alexa Fluor 標識抗ラット IgG 抗体を用いて検出し、細胞核については 100 ng/ml の Hoechst33258 (Sigma-Aldrich)で標識した。BrdU 取り込みの評価は蛍光顕微鏡下で 5 視野をランダムに選択し、全細胞核および BrdU 陽性細胞核の計測により、BrdU 陽性細胞の割合を算出した。

EdUの検出は、Click-it EdU imaging kit (Invitrogen, Life Technologies)を使用し、30分間反応させることで可視化した。

免疫染色

C2C12細胞を10%ホルマリン溶液で30分間固定し、5分間0.5% Triton X-100 (ICN Biomedicals)によって細胞膜透過処理を行った。一次抗体反応後、Alexa Fluor標識抗体により検出し、細胞核は100 ng/mlのHoechst33258で標識した。

一次抗体はラット抗マウスKi-67抗原(clone TEC-3, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark)、ラット抗BrdUモノクローナル抗体(clone BU1/75, Abcam)、ウサギ抗GFPポリクローナル抗体(Life Technology)を用いた。

ウェスタンブロット

リザーブ細胞のタンパク質を抽出するため、分化誘導後4日目にトリプシン処理で筋管細胞を除去した。トリプシン処理後0.1% BSA/DMEMの無血清培養液に交換してさらに24時間培養した。C2C12細胞の固定は10%トリクロロ酢酸溶液 (trichloroacetic acid; 和光純薬)で4℃環境下にて30分行った。固定後0.1% Tween 20を含むトリス緩衝生理食塩水によって洗浄し回収した。タンパク質抽出は2%のドデシル硫酸ナトリウム(sodium dodecyl sulfate, SDS; 和光純薬)を含むComplete

Lysis-M Reagent (Roche Diagnosis, IN)を用い、超音波処理によって細胞破碎して、その遠心上清を回収することで行った。BCA法によってタンパク質濃度を測定し、サンプルバッファー(2% SDS, 10%グリセロール; 和光純薬, 50 nMジチオスレイトール, dithiothreitol, DTT; 和光純薬, 0.0025%ブロモフェノールブルー)を加えタンパク質濃度を1 mg/mlに調整した。抽出したタンパク質は5分間の煮沸処理を行いポリアクリルアミドゲルの各レーンに注入し電気泳動した。その後セミドライ法によってポリフッ化ビニリデン(polyvinylidene fluoride, PVDF; Millipore, MA)メンブレンに転写し、Odysseyブロッキング溶液(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)でブロッキング後、一次抗体を反応させた。二次抗体はAlexa Fluor 680およびIRDye 800標識抗体を用い反応させ、Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln)によりタンパク質を可視化した。

なお、一次抗体はマウス抗phospho-Aktモノクローナル抗体(Ser473, clone 587F11; Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、ウサギ抗Aktモノクローナル抗体(pan,11E7; Cell Signaling Technology)、ウサギphospho-p42/44モノクローナル抗体(T202/Y204, clone20G11; Cell Signaling Technology)、ウサギ抗ERK1/2ポリクローナル抗体(Promega, Madison, WI)、ウサギ抗beta tubulinポリクローナル抗体(Abcam)、ウサギ抗DDDDK-tagポリクローナル抗体(医学生物学研究所, 愛知)を使用した。

逆転写ポリメラーゼ転写反応(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

C2C12細胞はPBSで洗浄後、500 μ lのRNAisoPlus (タカラバイオ, 滋賀)を加えピペティングによってホモジナイズし回収した。100 μ lのクロロホルムを加え激しく攪拌し室温で15分間静置した後、15,000 rpm、4 $^{\circ}$ C、15分間遠心した。分離

した水層を回収し、等量のイソプロパノール(和光純薬)を加え攪拌した。室温で5分間静置した後、15,000 rpm、4 °C、5分間遠心しRNAを沈殿させた。その後、75%エタノールにより2回洗浄し風乾させ、RNA沈殿を滅菌水に溶解した。逆転写反応はPrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit(タカラバイオ)を使用した。RNAにOligo dT primer, d NTP mixtureを加え65 °Cで5分間加熱した後、氷上に移し静置した。その後反応液へPrimeScript II Buffer, RNase inhibitor, PrimeScript II RTaseを加え、50度で50分間の逆転写反応を行った後、85 °Cで5分間加熱処理し酵素を失活させcDNAを得た。PCR反応はEmeraldAmp PCR Master Mix(タカラバイオ)によって行った。得られたcDNAにEmerald Amp PCR Master Mixおよびプライマーを加え、サーマルサイクラーによってPCR反応を行った。PCR条件は98°Cで10秒、55 °Cで30秒、72°Cで1分に設定し、IGF-1、IGF-2、グリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)転写産物ともに25サイクルで増幅させた。PCR産物はSYTO60 (Molecular Probes, OR)を含むアガロースゲルにて電気泳動後、Odyssey Infrared Imaging SystemによりDNAを検出した。

プライマーは以下の配列のものを用いた。

GAPDH (つくばオリゴサービス, 茨城)

5'-CCCATCACCATCTTCCAGGAGC-3' (フォワードプライマー)

5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAGC-3' (リバースプライマー)

IGF-1 (ユーロフィリンジェノミクス, 東京)

5'-CGCTCTGCTTGCTCACCTTCAC-3' (フォワードプライマー)

5'-CACTCATCCACAATGCCTGTCTG-3' (リバースプライマー)

IGF-2 (ユーロフィリンジェノミクス)

5'-TGTTGACACGCTTCAGTTTGT-3' (フォワードプライマー)

5'-AAGCAGCACTCTTCCACGAT-3' (リバースプライマー)

チロシンホスファターゼ(protein tyrosine phosphatase, PTPase)活性測定

氷上にて細胞をPBSで二回洗浄後、ホモジナイズバッファー(0.25 M スクロース; 和光純薬, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA; Sigma-Aldrich)を1ml加え細胞を回収し、ダウンスホモジナイザーを使用して細胞を破碎した。2,200 rpm、4 °C、10分間遠心し細胞核を沈殿させ、その上清をさらに12,000 rpm、4 °C、1時間遠心し沈殿を得た。沈殿にPTP Lysis buffer (50 mM Bis (2-hydroxyethyl) aminotris (hydroxymethyl) methane (Bis-tris); 東京化成工業, 東京, 2 mM EDTA, 20 %グリセロール, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT, pH 6.3 with HCl)を50 µl加え室温で15分間混和した後、14000 rpm、4 °C、5分間で遠心し上清を回収した。Bradford法によってタンパク質濃度を測定し、10 µgのタンパク質を96穴プレートに注入して10分間室温で静置した。各ウェルにSubstrate solution (10 mg/ml パラニトロフェニルリン酸(p-nitrophenyl phosphate)を含むassay buffer (50 mM Bis-tris、2 mM EDTA、5 mM DTT、pH 6.3 with HCl))を100 µl注入し30分室温で静置した後、波長405 nmで吸光度測定をした。

S1P受容体過剰発現

S1P受容体過剰発現はレトロウイルスベクターにより行った。S1P受容体過剰発現レトロウイルスベクターはPeter Zammit研究室(King's College London, UK)で作製された[40]。レトロウイルスベクターはpMSCV-puro (Clontech)のピューロマイシン耐性遺伝子をIRESeGFP遺伝子に置換し、改変したpMSCV-IRESeGFP

を用いた。マウスS1P受容体は各々クローニングしウイルスベクターへ組み込んだ。(S1PR1 NM_007901.5; S1PR2 NM_010333.4; S1PR3 NM_010101.4)

pMSCV-S1PR1-IRES-eGFP、 pMSCV-S1PR2-IRES-eGFP、
pMSCV-S1PR3-IRES-eGFPとパッケージング構造プラスミドを293T細胞へ形質転換させることで自己増幅能を持たないレトロウイルスを産生させ、その上清を回収した。(図6)

C2C12細胞へウイルスベクターを感染させるため、 5×10^4 の細胞数で6穴細胞培養プレートへ播種した後、レトロウイルス感染効率を上げるため4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のポリブレンを加え1時間インキュベートした。その後レトロウイルスを含む293T細胞の培養上清を加え6時間以上インキュベートし感染させた。およそ90%の細胞がeGFP陽性になった。

インスリン様成長因子受容体過剰発現および変異体過剰発現

C2C12細胞に対するIGF-1受容体の過剰発現はプラスミドベクターを導入し、安定発現株を選抜することで行った。また細胞分化に対する過剰発現の影響を少なくするため、ドキシサイクリン(doxycycline, DOX)依存的に遺伝子発現を調節可能なTet-onシステムを用いた[41]。まずテトラサイクリン制御性トランス活性化因子をコードしたプラスミドベクターをC2C12細胞へ導入した。目的遺伝子を挿入するプラスミドベクターは、プロモーター領域にtetO反復配列をもつトランス活性化応答因子をコードしたpTRE3Gベクターを用いた。Tet-onの場合ドキシサイクリン依存的にトランス活性化因子がpTRE3Gベクターのトランス活性化応答因子に結合し遺伝子発現を誘導する。本研究では目的遺伝子とは独立にSV40プロモーター制御化でピューロマイシン耐性遺伝子を発現するように改変した。

pTRE3G ベクターのマルチクローニングサイトに IGF-1 受容体遺伝子または IGF-1 受容体のキナーゼドメインを含む C 末端領域を欠損させた変異遺伝子を挿入した。なお IGF-1 受容体遺伝子は 5'末端に細胞膜へのシグナル配列を持つため FLAG タグは 3'末端に設計した：pTRE3G-IGF-1 受容体-FLAG-Puro、pTRE3G-IGF-1 受容体変異体-FLAG-Puro。(図 7)

C2C12 細胞へのプラスミド導入はリポフェクション法によって行った[42]。リポフェクション法は、負電荷を持つ導入 DNA を正電荷リポソームによって正電荷の複合体を形成させ、負電荷の細胞膜表面に結合させることで細胞のエンドサイトーシスを利用し遺伝子導入を行う方法である。C2C12 細胞を 5×10^4 の細胞数で 35 mm 細胞培養皿に播種し、そこへ 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のプラスミドベクターとリポフェクタミン 2000 を加え 24 時間インキュベートした。遺伝子の導入された細胞は 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンによって選別し、単一コロニーから安定発現株を取得し実験に用いた。

統計解析

測定は同様の実験を 3 から 6 回繰り返す、800 前後の細胞数を計測することによって行った。2 群間による比較には Student's t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) Turkey の多重比較検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし、数値は平均値 \pm 標準誤差で示した。

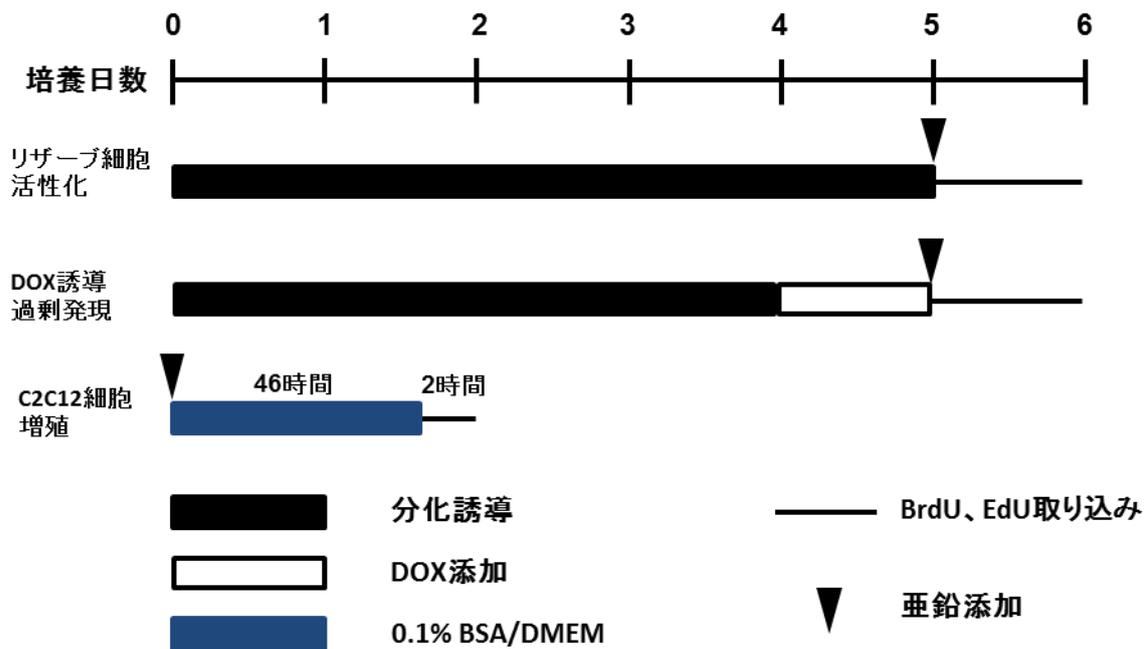


図5. リザーブ細胞活性化・C2C12細胞増殖におけるBrdU・EdU取り込みプロトコル



図6. S1P受容体(S1PR)挿入レトロウィルスベクターのコンストラクト

レトロウィルスベクターはpMSCVを用い、挿入遺伝子細胞確認のためeGFPを設計した。両遺伝子間にIRES配列を挿入することによって前後の遺伝子を共発現させた。

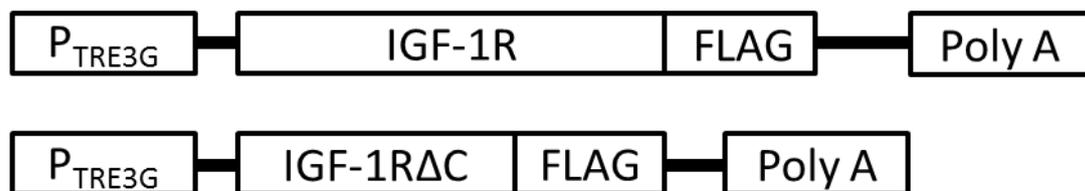


図7. IGF-1受容体(IGF-1R)と受容体変異体(IGF-1RΔC)挿入プラスミドのコンストラクト

プラスミドベクターはドキシサイクリン制御性トランス活性化因子の結合配列tetOをプロモーター領域に持つpTRE3Gを使用した。挿入遺伝子の3'末端にFLAGタグを設計することによって遺伝子発現を確認した。

結果

塩化亜鉛はリザーブ細胞活性化を誘導する

亜鉛が細胞内情報伝達系の活性化作用を有することはよく知られており、特にインスリン受容体と、EGF受容体下流に影響を与える[37, 43]。そのため、亜鉛はリザーブ細胞活性化条件であるインスリンとEGFの組み合わせ(インスリン/EGF)を模倣可能であると考えた。

そこでリザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響について検討した。活性化の評価はKi67の発現によって評価した。まず、リザーブ細胞に対し塩化亜鉛を25、50、100 μM と濃度を調整し2% HS/DMEMに加えたところ、濃度依存的にKi67陽性細胞の割合が増加した(図8 A)。

次に培養条件をより単純化するため0.1% BSA/DMEMの無血清培養液に亜鉛を加えその影響を検討したところ、塩化亜鉛濃度依存的にKi67陽性細胞の割合が増加した(図9 A)。しかし、塩化亜鉛濃度100 μM を加えた際には、細胞が培養皿からはがれてしまい評価ができなかった。

細胞外亜鉛は高濃度になると細胞毒性を示すことが知られているため[44]、塩化亜鉛濃度の上限を75 μM に変更し、さらに細胞増殖の評価をBrdUの取り込みに変更した。その結果、血清含有培養液(図8 B)および無血清培養液(図9 B)ともにBrdU陽性細胞の割合が増加した。

以上の結果から、塩化亜鉛はリザーブ細胞活性化に影響を与えることが分かった。また、血清含有培養液は無血清培養液に比べて、BrdU陽性細胞の割合が各々の濃度で2倍程度に増加していることが分かった(図8 B, 9 B)。

硫酸亜鉛はリザーブ細胞活性化を誘導する

塩化亜鉛によってC2C12リザーブ細胞は活性化し休眠状態から逸脱することが分かったがリザーブ細胞活性化には亜鉛イオンではなく塩化イオンあるいは塩化亜鉛が機能していることも考えられた。そこで硫酸亜鉛を使用しリザーブ細胞活性化への影響を検討した。硫酸亜鉛濃度は25、50、75 μM と調整しBrdUの取り込みを評価したところ、BrdU陽性細胞の割合は塩化亜鉛と同様に濃度依存的に増加した(図9 C)。

以上より、亜鉛はリザーブ細胞活性化を誘導可能であることを示した。

リザーブ細胞活性化と情報伝達系

インスリン/EGFはリザーブ細胞活性化を誘導し、その活性化にはERKのリン酸化が関与していることが報告されている[17, 18]。そこでインスリンとEGFを加えた時の情報伝達系タンパク質のリン酸化変化について検討した。評価した情報伝達系タンパク質はインスリン受容体およびEGF受容体下流に位置するAktとERKを選択した。

まずインスリン、EGF、インスリン/EGFによるリン酸化Aktの変化をウェスタンブロットによって検出したところインスリン、EGF各々の単独刺激によってリン酸化Aktが検出できた。インスリンとEGFによって誘導されるリン酸化Aktのシグナル強度を比較すると、刺激後10分では両者に違いは認められないが、刺激後30分でインスリンによって誘導されたリン酸化シグナル強度が強くなり、その後60分までリン酸化Aktのシグナル強度は維持された。またEGF刺激については、刺激後10分以降は時間経過とともに減弱した。一方、インスリン/EGFによって誘導されたリン酸化Aktは、各々単独で刺激した場合と比較すると、すべての時間でリン酸化Aktのシグナル強度が高く、さらにリン酸化状態は60分後まで

減弱は認められなかった(図10 A, B)。

ERKもインスリンとEGF各々単独の添加によってリン酸化が検出された。リン酸化ERKのシグナル強度をインスリンとEGFで比較すると、EGF刺激の方が強く、30、60分とリン酸化ERKのシグナル強度は減弱するものの、高いリン酸化を維持した。インスリン/EGFはEGFの単独刺激と似た変化を示した(図10 C, D)。

これより、成長因子によって誘導されるリザーブ細胞の活性化はAktとERKがリン酸化されること、さらにAktのリン酸化状態が強く維持されることが重要であると示唆された。

亜鉛はリザーブ細胞に対してAktおよびERKのリン酸化を誘導する

次にリザーブ細胞の細胞内情報伝達系変化に対する塩化亜鉛の影響を検討した。成長因子誘導性リザーブ細胞活性化はAktおよびERKのリン酸化が誘導されることが分かったため、亜鉛を加えた時のAktおよびERKのリン酸化変化を検討した。

その結果、塩化亜鉛によりAktおよびERKのリン酸化が検出された。100 μM ではAktのリン酸化は亜鉛添加後0.5時間で検出され、その後3時間までリン酸化強度は増加した。6時間後では減弱したもののリン酸化Aktは維持された。また亜鉛濃度50 μM では、そのリン酸化強度は非常に弱いものの検出可能であった(図11 A, B)。

ERKも亜鉛濃度100、50 μM ともに0.5時間からリン酸化が検出された。100 μM については添加3時間後までそのリン酸化強度が増加し、6時間後ではリン酸化は減弱したが比較的顕著に検出された(図11 C, D)。一方50 μM では、0.5時間を頂点に時間経過と共に減弱した。

亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化はIGF-1受容体を介する

リザーブ細胞に対し亜鉛を加えるとAktおよびERKのリン酸化が誘導されることが分かった。両者の活性化はインスリン受容体やIGF受容体の活性化により誘導される。

そこでリザーブ細胞活性化に対するインスリンおよびIGF-1受容体の影響を検討した。インスリン受容体/IGF-1受容体のチロシンキナーゼ活性を、AG1024を用いて阻害し塩化亜鉛濃度75 μM でリザーブ細胞活性化を誘導した。その結果、AG1024を5 μM 加えることで有意にリザーブ細胞活性化を抑制した(図12)。

AG1024はインスリン受容体とIGF-1受容体の両者に対し阻害効果を持つ。しかし、亜鉛によって誘導されるAktの活性化はインスリン受容体ではなくIGF受容体を介するという報告があることから[43]リザーブ細胞に対する亜鉛の作用にはIGF-1受容体が関与すると考え、詳細な検討を行った。

そのため、C2C12細胞にIGF-1受容体全長あるいはキナーゼドメインを含むC末端側領域を欠損させたIGF-1受容体変異体(図7)を過剰発現させ、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するIGF-1受容体の影響を検討することにした。過剰発現したIGF-1受容体あるいは変異体が機能することは細胞分化への影響によって確認した。分化誘導24時間前にDOXを加えIGF-1受容体を過剰発現させた後、2% HS/DMEMで分化誘導し、そこへDOXを添加し3日間培養した。その結果、IGF-1受容体過剰発現細胞では太い筋管細胞が観察された(図13 A)。一方でIGF-1受容体変異体を過剰発現した細胞では筋管細胞形成の抑制が認められた(図14 A)。リザーブ細胞活性化への影響については分化誘導4日目にDOXを加え遺伝子発現を誘導し24時間後に塩化亜鉛を加えた。遺伝子発現はIGF-1受容体のC末端に挿入したFLAGタグの発現をウェスタンブロットによって判定した(図13 B, 14 B)。その結果、IGF-1受容体過剰発現C2C12細胞はDOXを加えた細胞で25 μM の塩化

亜鉛によりBrdUの取り込みが増加した(図13 C, D)。

IGF-1受容体変異体の過剰発現については、DOXを加えたて培養した細胞では50 μ Mの塩化亜鉛によりBrdUの取り込みは有意に抑制された(図14 C, D)。

以上の結果は、亜鉛によって誘導されるリザーブ細胞活性化にIGF-1受容体が関与していることを示している。

リザーブ細胞活性化に対するIGF-1中和抗体の影響

亜鉛誘導性リザーブ細胞の活性化はIGF-1受容体を介して引き起こされることが示唆された。そこで塩化亜鉛によってC2C12細胞からIGF-1が放出または分泌されることでリザーブ細胞活性化へ寄与している可能性を考え、IGF-1の中和抗体を用いて培養液中のIGF-1の作用について検討を行った。

IGF-1中和抗体は2.5 μ g/mlで使用し、75 μ Mの塩化亜鉛と共に無血清培養液へ加えた。その結果、IGF-1中和抗体の有無によって有意差は検出できなかったが亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化を抑制する傾向にあった(図15)。この時に分泌されるIGF-1はリザーブ細胞または分化した筋管細胞のどちらに由来するかについては今のところ不明である。

以上の結果とIGF-1受容体の結果から、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は培養液中に含まれるIGF-1が作用している可能性が考えられた。

亜鉛によるC2C12細胞のIGF-1およびIGF-2 mRNAの変化

IGF-1受容体はリザーブ細胞活性化に関与したこと、中和抗体によってリザーブ細胞の活性化が抑制傾向にあったことから、培養液中へIGF-1受容体のリガンドが放出されたことが考えられた。そこで亜鉛がC2C12細胞に作用し成長因子産生を促した可能性を考え、亜鉛添加によるIGF-1のmRNA転写レベルの変化を

RT-PCRによって検討した。RNA抽出は亜鉛刺激を3時間行ったリザーブ細胞および筋管細胞と、亜鉛無添加の細胞を用いて行った。ところが亜鉛添加によってIGF-1 mRNAの転写は減少傾向が認められた(図16 A, B)。さらに骨格筋から産生されるIGF-2についてもmRNAの転写レベルを検討したところ、亜鉛添加によってその転写レベルは減少した(図16 A, C)。

これより、亜鉛によってIGF-1およびIGF-2産生は増加しないことが示された。

S1P受容体とリザーブ細胞活性化

IGF-1中和抗体によって亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は抑制傾向にあったものの、有意差は検出できなかった。そこで、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化機構にはIGF-1以外の因子が機能している可能性を考え、S1P受容体に着目した。

リザーブ細胞活性化の分子機構の一つとして、細胞膜脂質のスフィンゴミエリンの分解産物であるS1Pが関与することが報告されており、EGFによってリン酸化されたERKがS1Pの産生に寄与し、産生されたS1Pがリザーブ細胞活性化の一端を担うことが報告されている[18]。S1Pは2つの機能を持ち、細胞内のセカンドメッセンジャーとして働く側面と、細胞外でS1P受容体に結合するリガンドとして機能する側面を持つ。S1Pの受容体は5つのサブタイプがありS1P1、S1P2、S1P3、S1P4、S1P5が存在する。C2C12細胞ではS1P1、S1P2、S1P3が発現し、EGF誘導性リザーブ細胞活性化におけるS1Pの役割についてはS1P2の関与が報告されている[18]。そこでS1Pが細胞外でリガンドとして機能している可能性を考えS1P受容体を過剰発現させた細胞でリザーブ細胞活性化へ影響を与えるか検討した。リザーブ細胞の活性化は50 μ Mの塩化亜鉛により誘導しEdUの取り込みによって評価した。また受容体はS1P1、S1P2、S1P3についてレトロウイルスベクターを用いてC2C12細胞に過剰発現させ安定発現株を作製した。

その結果、塩化亜鉛50 μM によりEdUの取り込みは増加したがS1P受容体過剰発現による有意な差は認められなかった。(図17)

これより成長因子誘導性リザーブ細胞活性化に関わるS1PおよびS1P受容体は、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化には影響を与えないことが分かった。

亜鉛と成長因子との協調効果

前述したように、リザーブ細胞の活性化はインスリンとEGFを組み合わせた場合、それ単独と比較し増強する[18]。また亜鉛はインスリン様およびEGF様作用を有していることが報告されていることから[37, 39]、亜鉛はインスリン/EGF誘導性リザーブ細胞活性化においてインスリンあるいはEGFの機能を補完可能であると考えた。そこで亜鉛とインスリンおよび亜鉛とEGFを各々組み合わせ、その効果を検討した。

亜鉛濃度は50 μM で行った。その結果、塩化亜鉛、インスリン、EGFを各々単独で刺激した場合、BrdUの取り込みは検出できたものの、その割合は無添加のコントロールと有意な差は認められなかった。一方、塩化亜鉛とインスリンまたはEGFを組み合わせた場合は、BrdUの取り込みは相乗的に増加し、無添加のコントロールと比較してBrdUの取り込みは有意に増加した(図18 A)。

次にIGF-1との協調効果を検討した。高濃度のインスリンはIGF受容体に結合する[20]。亜鉛/インスリンで用いたインスリン濃度は、生理的濃度と比較すると高濃度であり、IGF-1はインスリンと同様な役割を担うことが考えられた。その結果、塩化亜鉛とIGF-1の組み合わせもインスリン同様に、BrdU取り込みが相乗的に増加した(図18 B)。

亜鉛/インスリンがAktおよびERKのリン酸化に及ぼす影響

先の結果で、リザーブ細胞に対しインスリン、EGFを加えるとAktとERKのリン酸化が生じ、リン酸化AktはインスリンとEGFを組み合わせることで各々単独よりもリン酸化強度が高いことが分かった。そこで、塩化亜鉛とインスリンを組み合わせた際のAktとERKリン酸化の変化について検討した。

その結果、Aktは先の結果同様、塩化亜鉛とインスリンによりリン酸化された。さらに塩化亜鉛/インスリンを組み合わせることで添加した場合そのリン酸化強度は高く、3時間後でも各々単独よりリン酸化強度が高く維持されていることが示された(図19 A, B)。一方、ERKについては、塩化亜鉛、インスリン、塩化亜鉛/インスリンのすべてにおいてリン酸化は顕著に検出された。しかし、塩化亜鉛/インスリンによって引き起こされたリン酸化ERKは、塩化亜鉛誘導性のリン酸化ERKと同程度であり組み合わせることによる相乗効果は検出できなかった(図19 C, D)。

PI3K、Akt、mTOR、ERKは亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に関与する

リザーブ細胞へ塩化亜鉛を加えることによってAktとERKのリン酸化が誘導されることが分かった。さらに、塩化亜鉛/インスリンを組み合わせることによって、Aktのリン酸化シグナル強度が増強・持続することが分かった。そこで、AktとERK、さらにAktの上流と下流に位置するPI3KおよびmTORはリザーブ細胞活性化に影響するか阻害剤を用いて検討した。

阻害剤はPI3K : LY294002、Akt : Triciribine、mTOR : Rapamycin、ERK : U0126を使用し、実験に用いた各阻害剤の濃度は副作用を示さない濃度範囲とした。ウェスタンブロットによって各々の阻害効果を確認したところAktのリン酸化はLY294002とTriciribineによって減弱し、Akt下流タンパク質であるmTORの阻害

剤ではリン酸化Aktに影響を及ぼさなかった(図20 A)。またU0126はERKのリン酸化を抑制した(図20 B)。なお、AktとERKのリン酸化は塩化亜鉛/インスリンによって誘導した。

上記の阻害剤を使用して塩化亜鉛/インスリン誘導性リザーブ細胞活性化を検討したところ、すべての阻害剤によってBrdUの取り込みが抑制された(図20 C)。

これにより亜鉛/インスリン誘導性リザーブ細胞活性化は、PI3K/AktカスケードとERKの2つの経路が関与していることが分かった。

PTPaseに対する亜鉛の影響

前項において亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化にはPI3K/AktおよびERKの情報伝達系が関与した。亜鉛が細胞内情報伝達系活性化に作用する機序の一つに、細胞内へ流入した亜鉛イオンがチロシンキナーゼ型受容体のPTPaseの阻害因子として機能し、それにより受容体のリン酸化状態が維持されることによって下流の情報伝達系カスケードの活性化が誘導されることが考えられている[45]。そのため、私は添加した亜鉛が細胞内に取り込まれ機能している場合には、亜鉛添加によってリザーブ細胞のPTPase活性が低下すると考えた。また、インスリンを加えた時のPTPase活性は亜鉛を加えることによって低下すると考えた。

塩化亜鉛濃度は、成長因子との協調作用が認められた50 μM で細胞に加え、塩化亜鉛、インスリン、塩化亜鉛/インスリンで比較し添加後1時間、3時間、6時間後のPTPase活性を測定した。その結果、3群間で違いは認められなかった(図21)。

PTPase活性が塩化亜鉛を加えることによって低下しなかったことから、リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の挙動として細胞内に取り込まれ作用するよりも細胞外で作用する可能性が高いことが示唆された。

カルシウムキレートにおける亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化

細胞の増殖はカルシウム依存的に生じ、金属元素キレート剤のジエチレントリアミン五酢酸(Diethylenetriamine pentaacetic acid, DTPA)によって亜鉛を欠乏させるとIGF-1等の成長因子によるカルシウム流入が抑制されると報告されている[46, 47]。そこで、塩化亜鉛/IGF-1と共にエチレングリコールビス2アミノエチルエーテル四酢酸(Ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)を加えることによって培養液中のカルシウムイオンをキレートしリザーブ細胞活性化に対するカルシウムイオンの関与を検討した。

培養液中には1.8 mMのカルシウムイオンが含まれているため、EGTAは等量の1.8 mM加えた。また培養液中のフリーカルシウムイオン濃度はMaxchelatorによって算出した。

その結果、EGTAを培養液に加えることによって塩化亜鉛/IGF-1によるBrdUの取り込みは抑制された。また、塩化カルシウムの添加によって濃度依存的にBrdUの取り込みが増加した(図22)。以上の結果より亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化はカルシウム依存的であることが分かった。

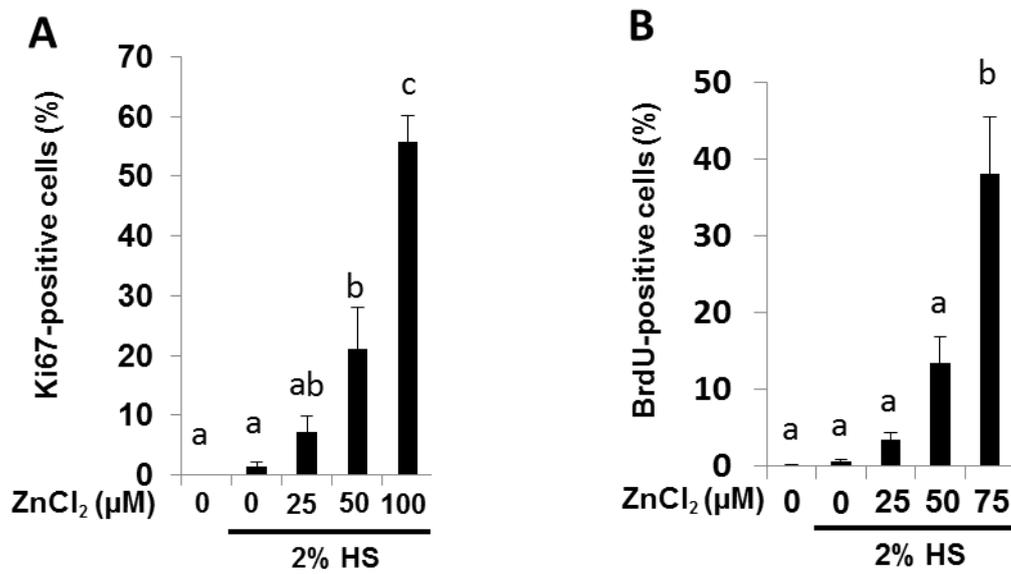


図8. リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響

リザーブ細胞に塩化亜鉛とBrdUを加え24時間培養した。免疫染色によりKi67(A)、BrdU(B)を標識し陽性細胞の割合を算出した。異なるアルファベットは有意差($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

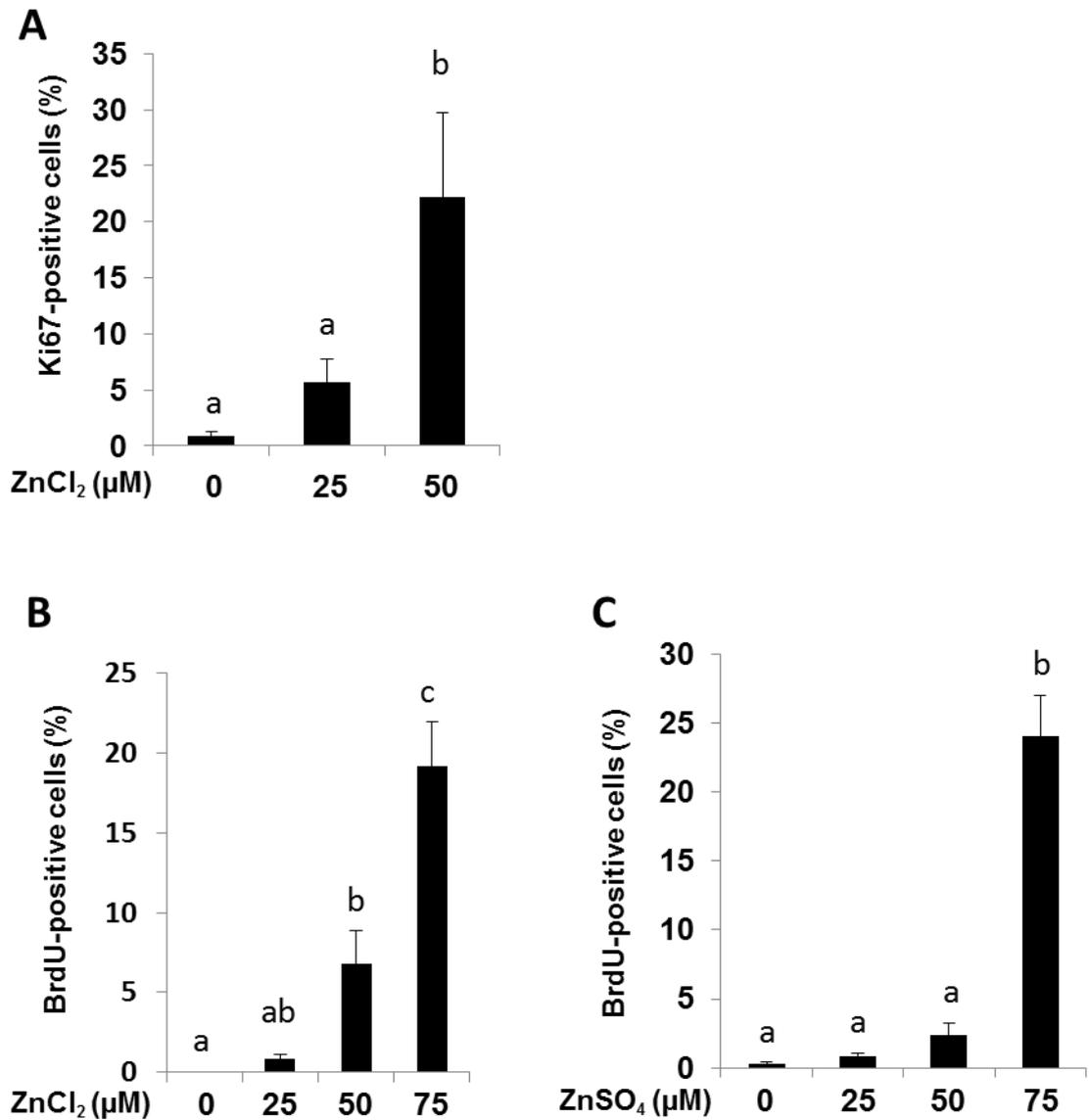


図9. リザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響

リザーブ細胞に塩化亜鉛(A、B)または硫酸亜鉛(C)、BrdUを加え24時培養した。免疫染色によりKi67(A)、BrdU(B、C)を標識し陽性細胞の割合を算出した。異なるアルファベットは有意差($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

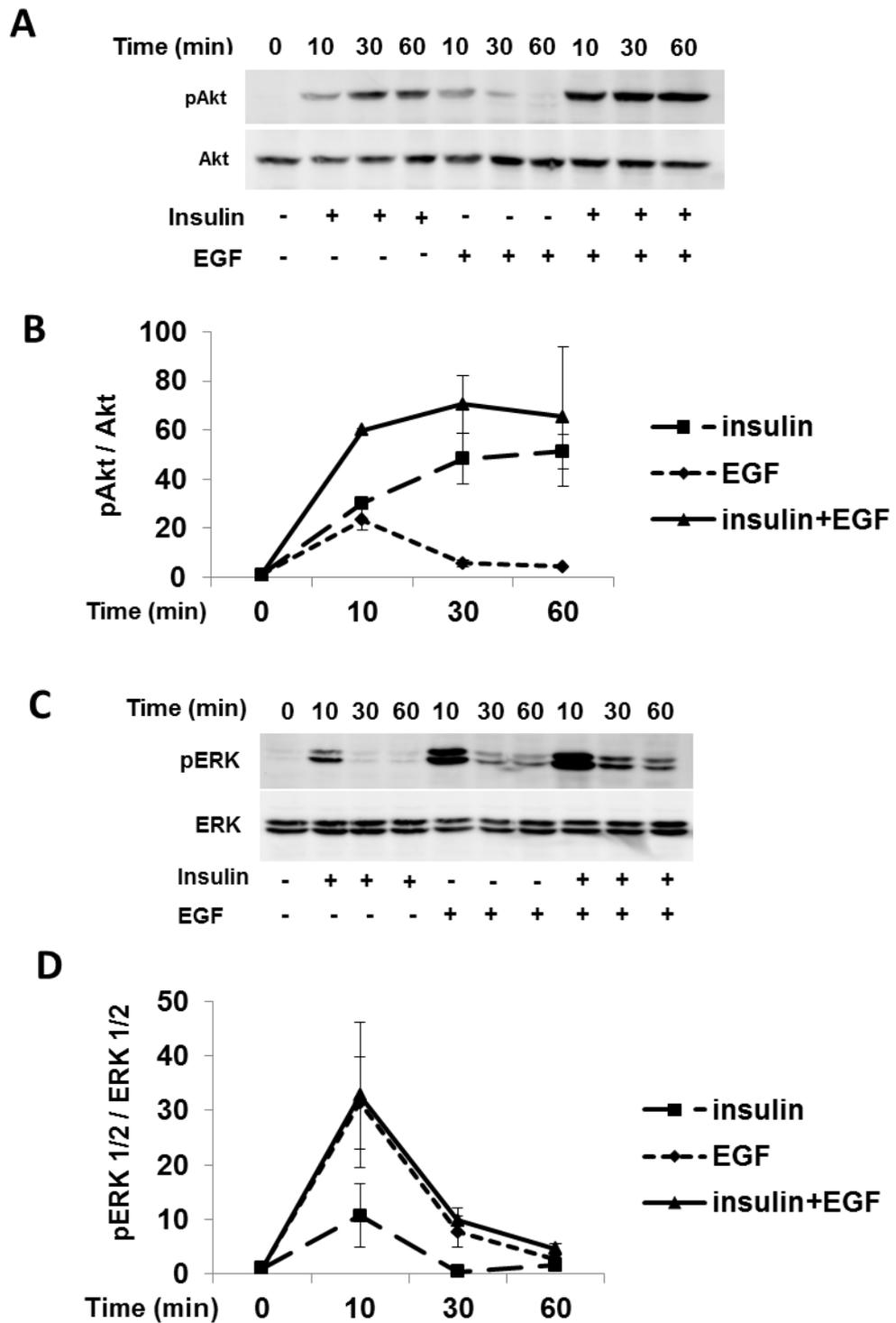


図10. インスリン/EGFによるAkt、ERKリン酸化への影響
筋管細胞を除去したリザーブ細胞に、インスリンおよびEGFを加え各時間で細胞を回収した。ウェスタンブロットにより、リン酸化Akt、全Akt(A)およびリン酸化ERK1/2、全ERK1/2(C)を検出した。定量はリン酸化のシグナル強度を全Akt、ERKシグナル強度で補正を行った(B, D)。

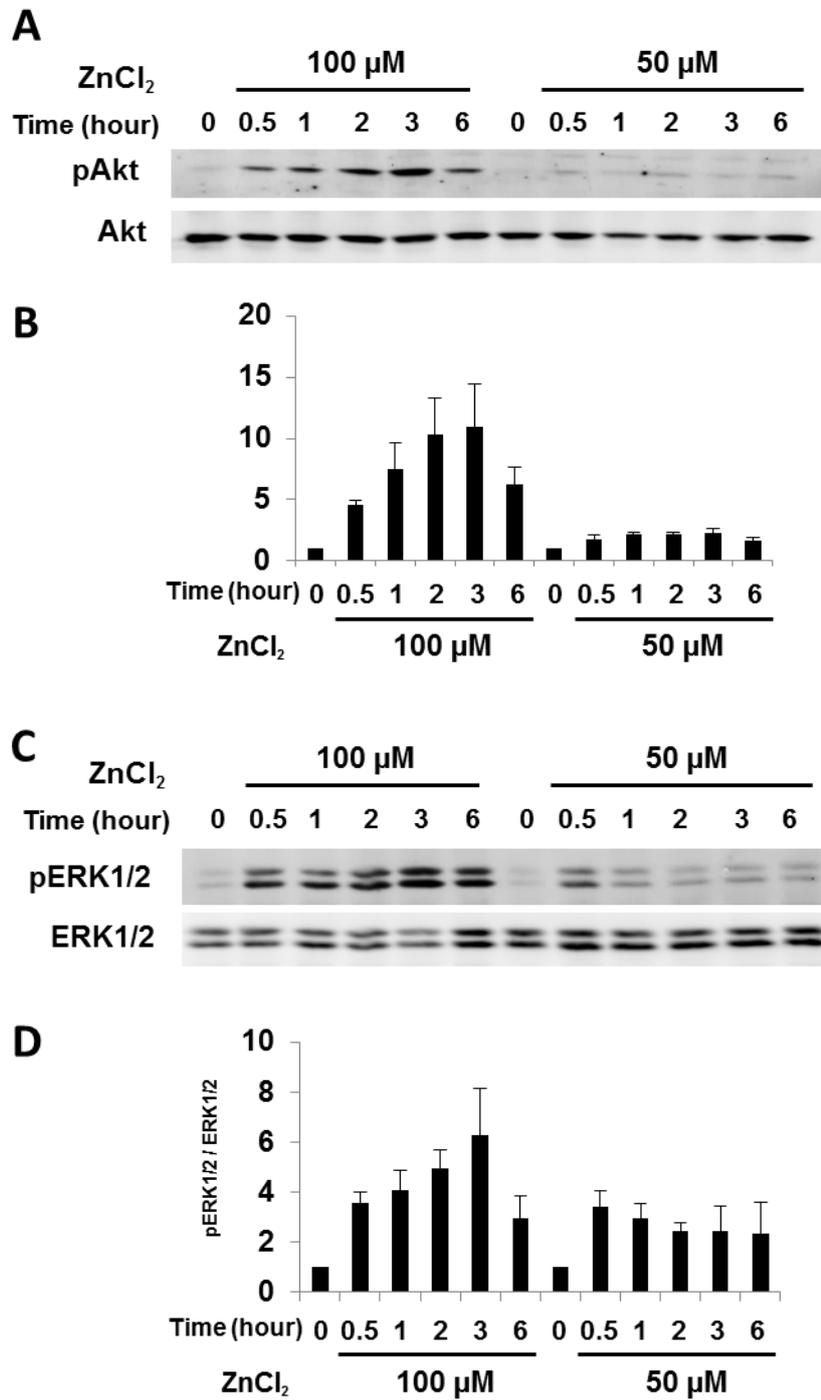


図11. 塩化亜鉛によるAkt、ERKリン酸化への影響

筋管細胞を除去したリザーブ細胞に、インスリンおよびEGFを加え各時間で細胞を回収した。ウェスタンブロットにより、リン酸化Akt、全Akt(A)およびリン酸化ERK1/2、全ERK1/2(C)を検出した。定量はリン酸化シグナル強度を全Akt、ERKシグナル強度で補正して行った(B, D)。

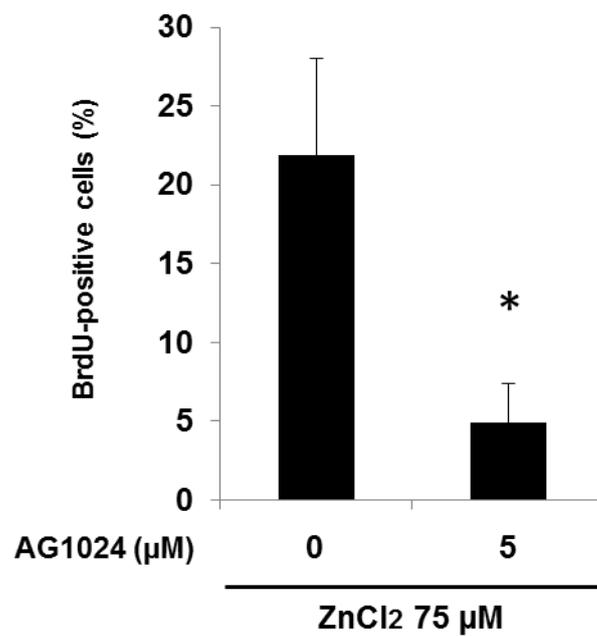


図12. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するIGF-1受容体の影響

リザーブ細胞にAG1024を加え30分インキュベートした後、塩化亜鉛75μMとBrdUを加え24培養した。免疫染色によりBrdUを検出し陽性細胞の割合を算出した。*は有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

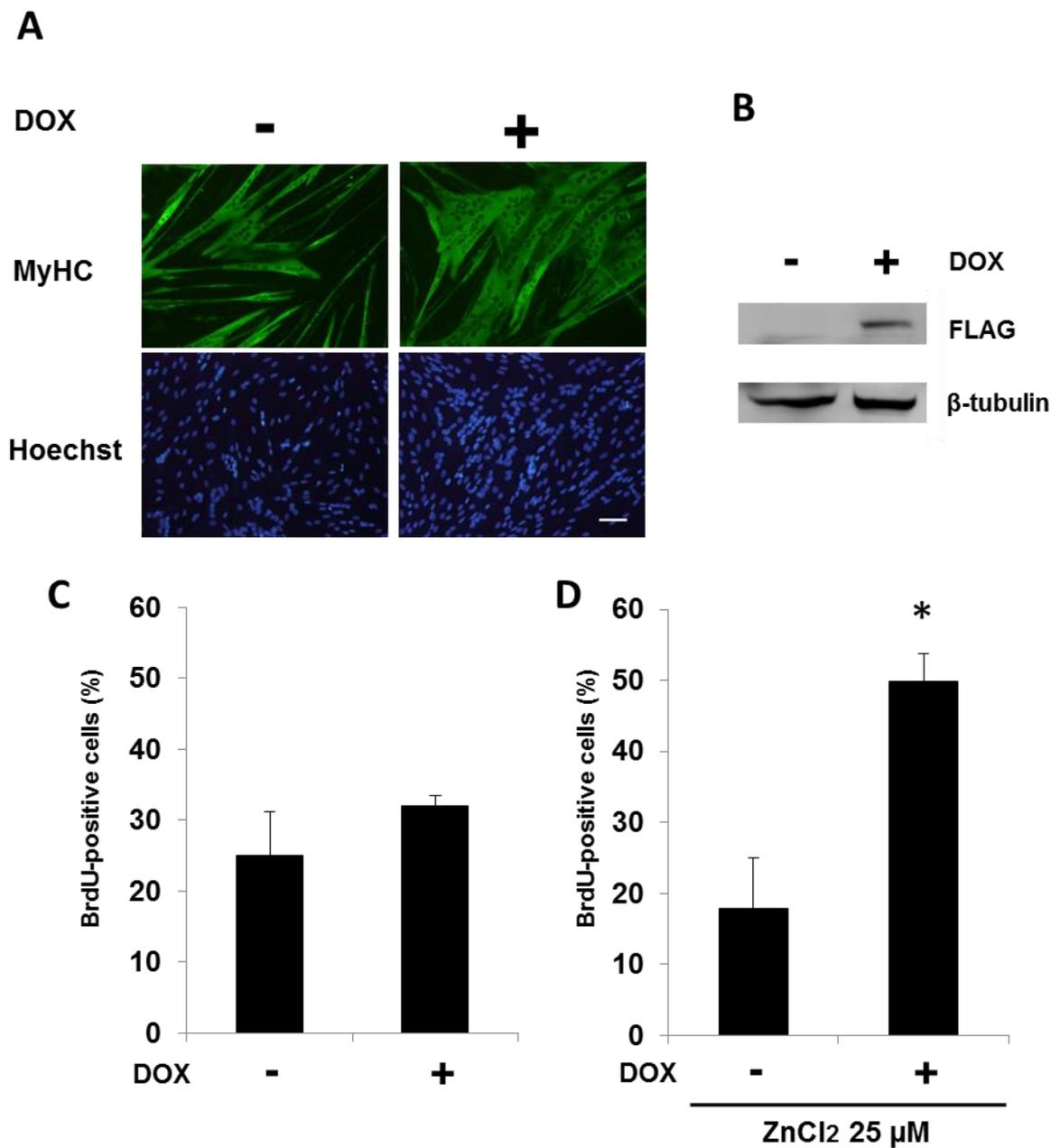


図13. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するIGF-1受容体過剰発現の影響

Tet-onシステムを用いドキシサイクリン(DOX)依存的にIGF-1受容体を過剰発現させた。IGF-1受容体過剰発現の影響をC2C12細胞分化によって検討した(A)。DOXを加えたりザーブ細胞に塩化亜鉛を加え、24時間後培養した。免疫染色にてBrdUを検出しその陽性細胞の割合を算出した(C、D)。なおリザーブ細胞に対する遺伝子発現はウェスタンブロットによって確認した(B)。*は有意差($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で示した。Scale Bar: 100 μ m

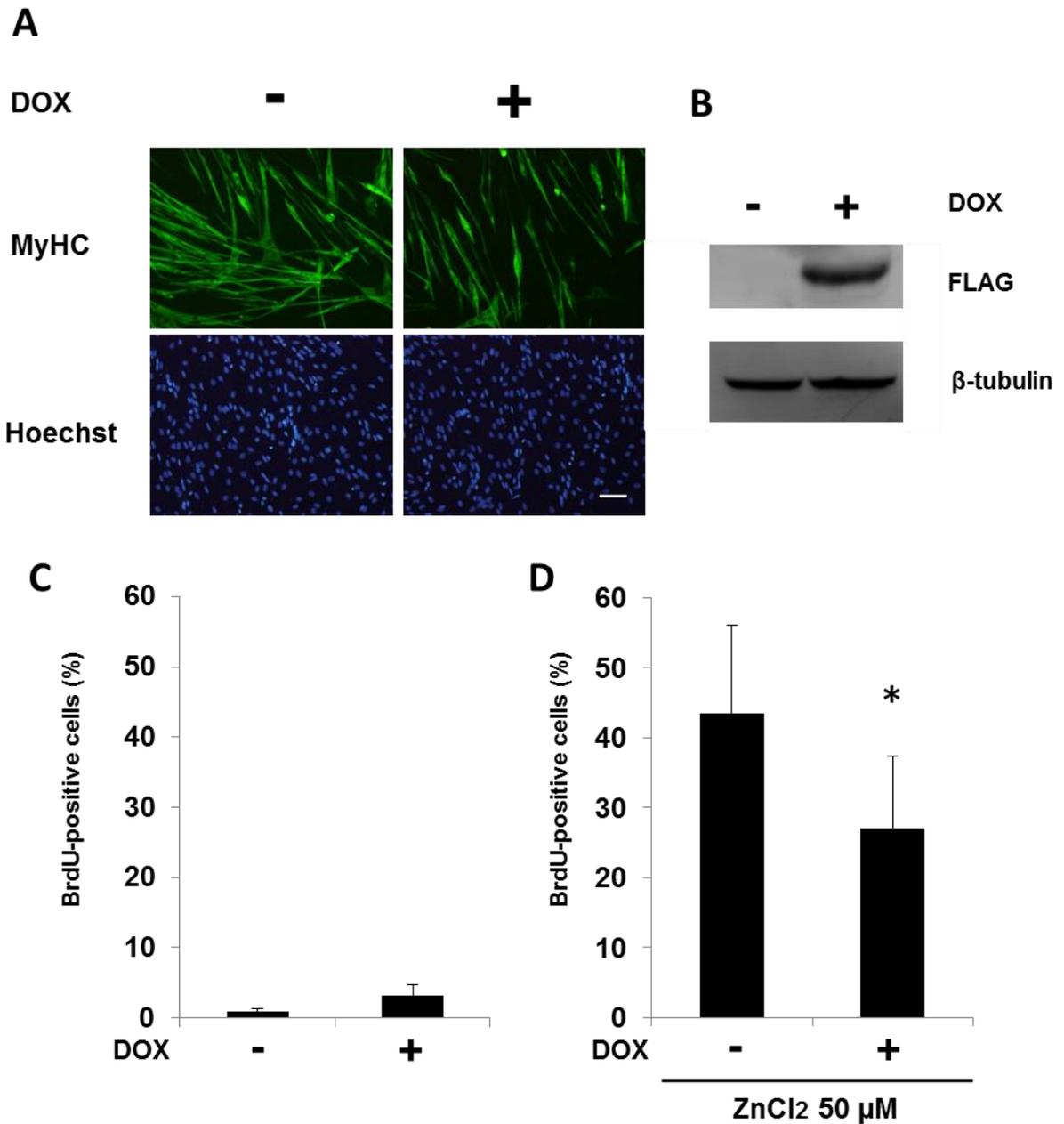


図14. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するIGF-1受容体変異体過剰発現の影響

Tet-onシステムを用いドキシサイクリン(DOX)依存的にIGF-1受容体変異体を過剰発現させた。IGF-1受容体変異体過剰発現の影響をC2C12細胞分化によって検討した(A)。DOXを加えたリザーブ細胞に塩化亜鉛を加え、24時間後培養した。免疫染色にてBrdUを検出しその陽性細胞の割合を算出した(C、D)。なおリザーブ細胞に対する遺伝子発現はウェスタンブロットによって確認した(B)。*は有意差($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で示した。Scale Bar: 100 μ m

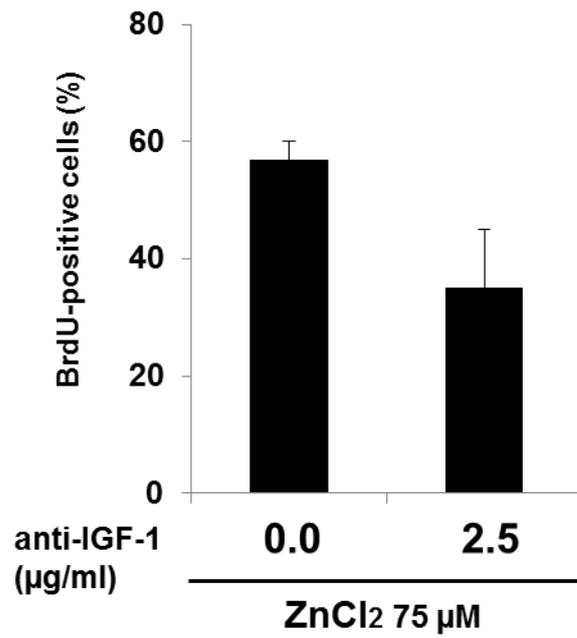


図15. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するIGF-1中和抗体の影響

リザーブ細胞にanti-IGF-1抗体と塩化亜鉛75µMおよびBrdUを加え24時間培養した。

免疫染色によりBrdUを検出し陽性細胞の割合を算出した。データは平均値±標準誤差で表示した。

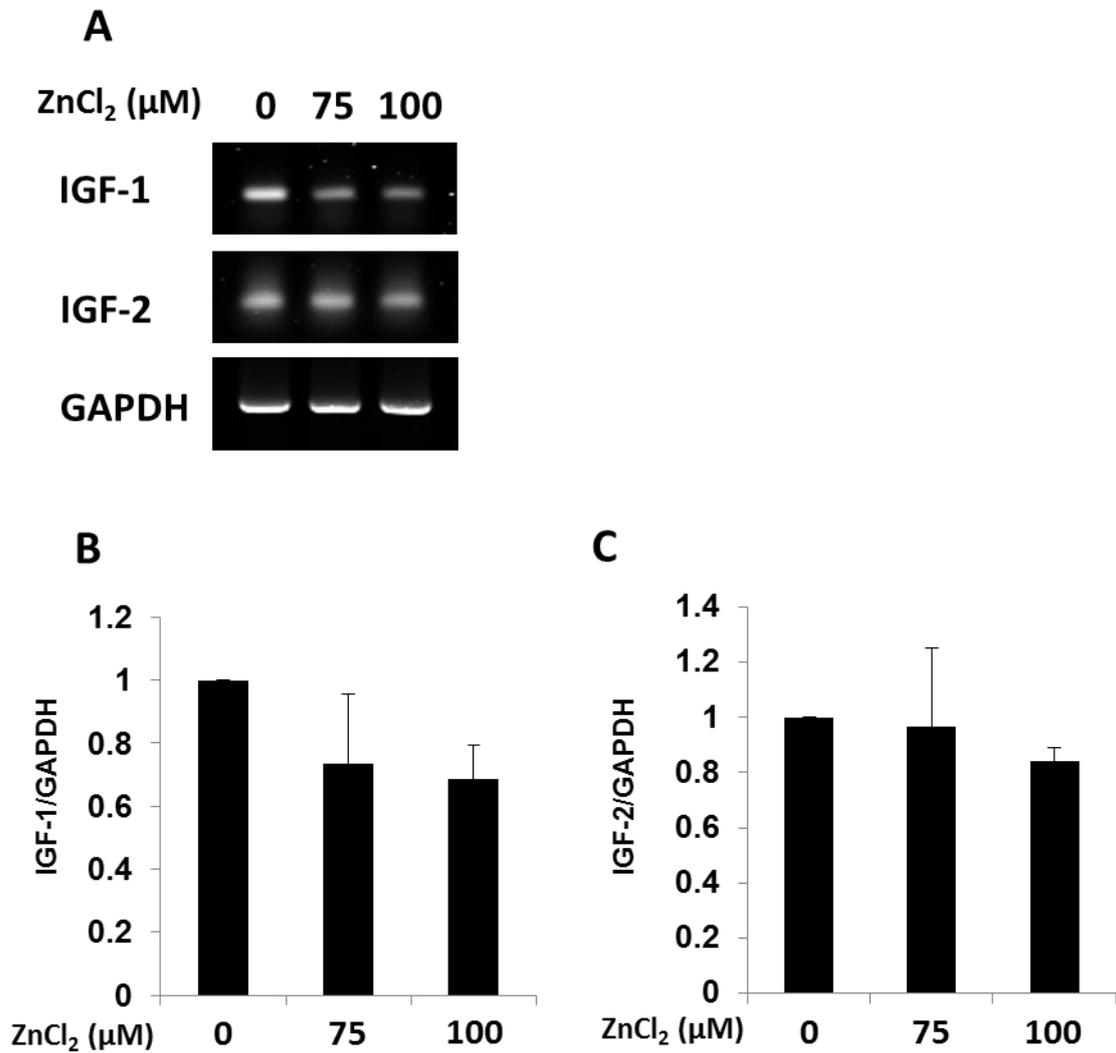


図16. 亜鉛によるIGF-1、IGF-2 mRNA発現に対する影響

リザーブ細胞に塩化亜鉛を加え3時間後RNA抽出を行った。その後PCR反応を行いIGF-1、IGF-2およびGAPDH(A)のmRNAを可視化した。グラフはIGF-1(B)およびIGF-2(C)mRNAバンド強度をGAPDHのmRNAバンド強度で補正し定量した。データは平均値±標準誤差で表示した。

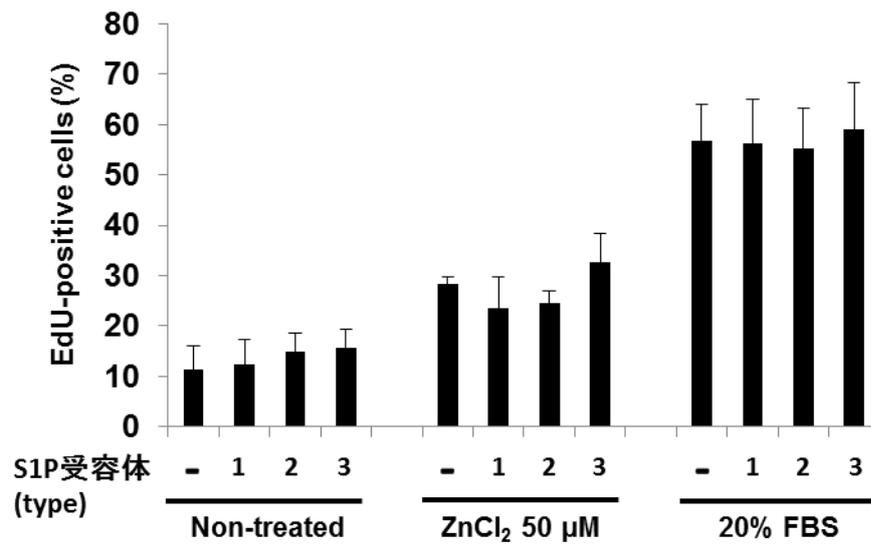


図17. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するS1P受容体の影響

レトロウィルスベクターによりS1P受容体を過剰発現させたC2C12細胞を使用した。S1P受容体の過剰発現したリザーブ細胞に塩化亜鉛50μMと20%FBSを加え24時間のEdU取り込みを評価した。

免疫染色によりEdUおよびGFPを検出し、EdU陽性・GFP陽性細胞の割合を算出した。検定はコントロールベクターと比較した。データは平均値±標準誤差で表示した。

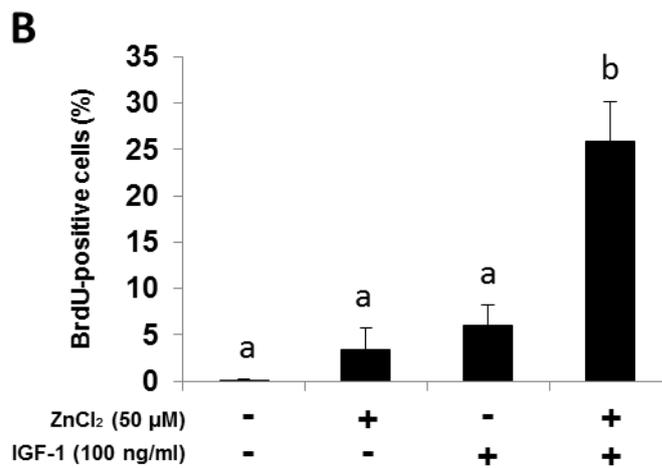
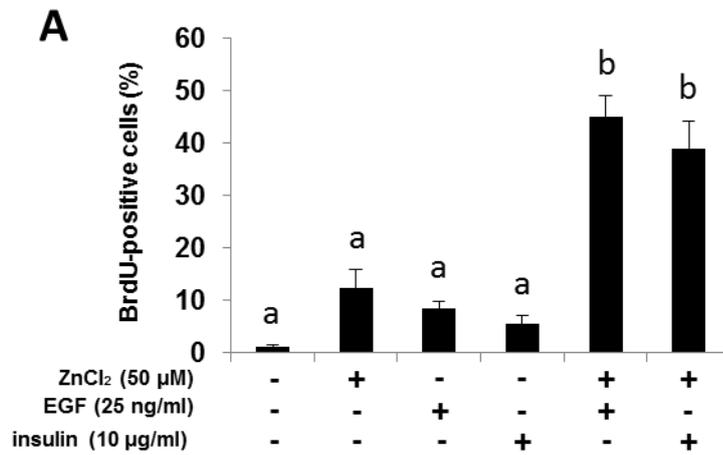


図18. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化の相乗効果

リザーブ細胞にインスリン、EGF(A)、IGF-1(B)と塩化亜鉛50μMを各々組み合わせ添加し24時間BrdUを取り込ませた。免疫染色によりBrdUを検出し、陽性細胞の割合を算出した。

異なるアルファベットは有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

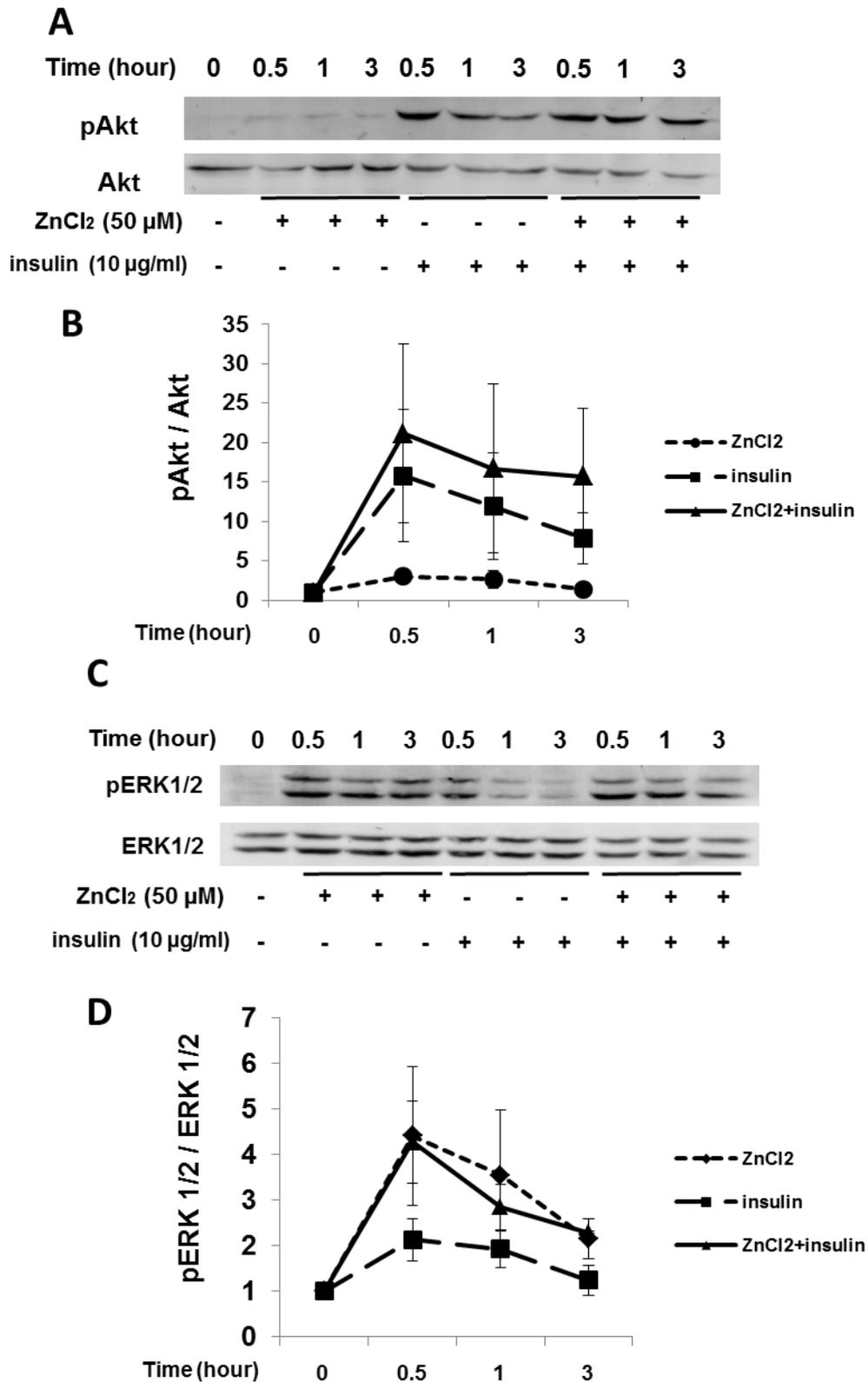


図19. 亜鉛/インスリンによるAkt、ERKリン酸化への影響

筋管細胞を除去したリザーブ細胞に塩化亜鉛を加え各時間でTCA固定し細胞を回収した。ウェスタンブロットにより、リン酸化Akt・全Akt(A)およびリン酸化ERK1/2・全ERK1/2(C)を検出した。定量はリン酸化シグナル強度を全Akt、ERKシグナル強度で補正した(B, D)。データは平均値±標準誤差で表示した。

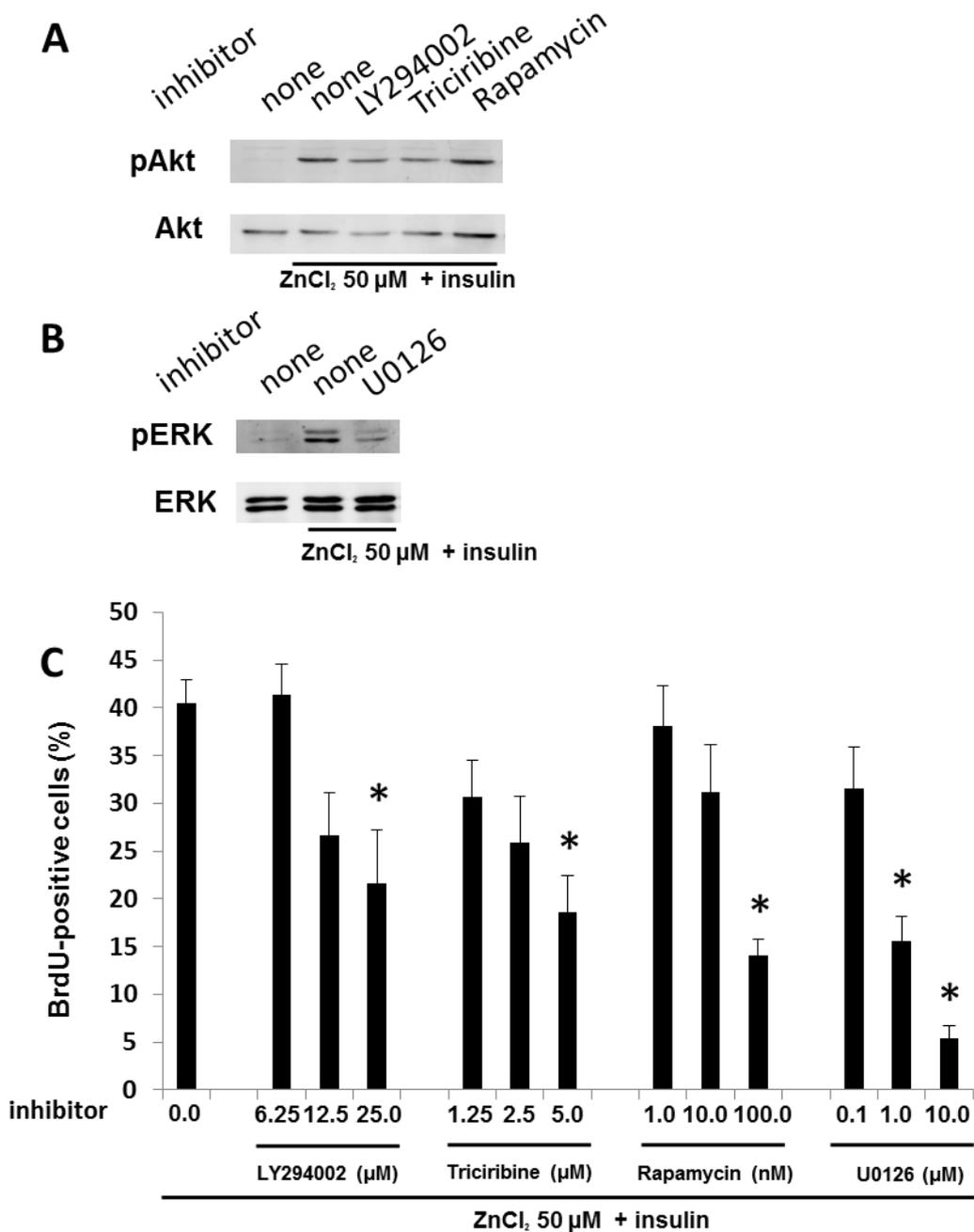


図20. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するPI3K、Akt、mTORおよびERKの影響
 リザーブ細胞に各阻害剤を加え30分培養し、その後、塩化亜鉛、インスリンとBrdUを加えさらに24時間培養した。阻害剤の効果はウェスタンブロットによりリン酸化Akt(A)およびリン酸化ERK(B)を検出することで行った。免疫染色によりBrdUを検出し陽性細胞の割合を算出した(C)。*は阻害剤無添加と比較し有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

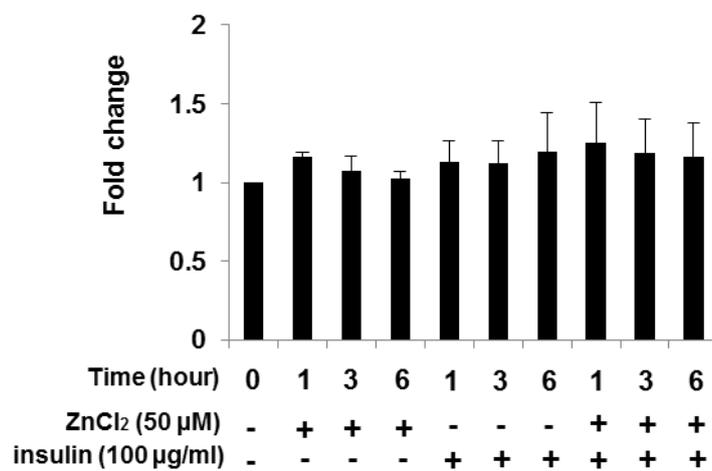


図21. 亜鉛のPTPase活性への影響

リザーブ細胞に塩化亜鉛、インスリンを加え各時間でPTPase測定を行った。データは平均値±標準誤差で表示した。

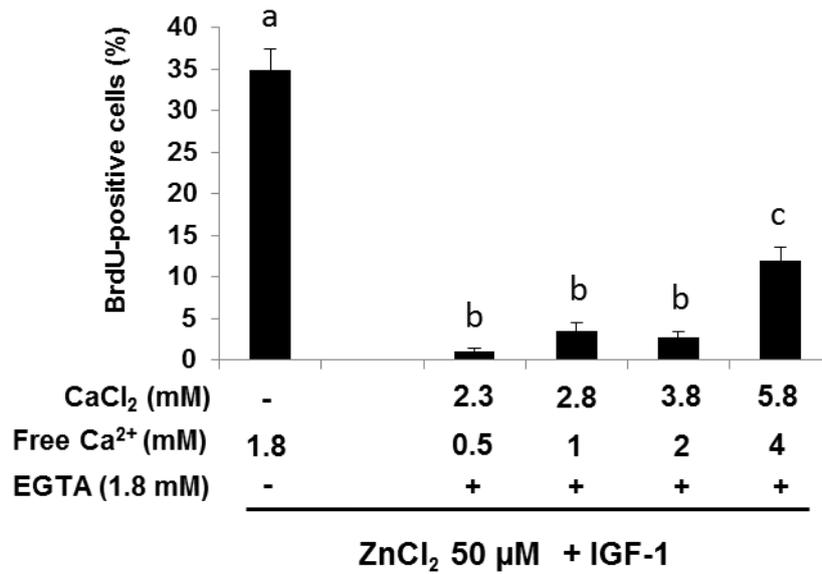


図22. 亜鉛/IGF-1誘導性リザーブ細胞活性化に対するカルシウムキレートの影響
 リザーブ細胞に1.8mMのEGTAと塩化カルシウムを加えた。その後、塩化亜鉛とIGF-1によってリザーブ細胞活性化を誘導し24時間BrdUを取り込ませた。免疫染色にてBrdUを検出し陽性細胞の割合を算出した。異なるアルファベットは有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

考察

本研究では、筋芽細胞株 C2C12 細胞に対する亜鉛の影響を調べた。休眠状態の筋衛星細胞モデルである C2C12 細胞のリザーブ細胞に塩化亜鉛を加えたところ、休眠状態から逸脱することが分かった。また亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は PI3K/Akt 経路と ERK が関与していることを示した。

筋衛星細胞の活性化は骨格筋再生の最初のプロセスであり、筋損傷や高負荷の運動によって惹起される。しかしこれらの制御機構は大部分が不明である。

ミネラルは身体を構成する成分のうち水素、炭素、窒素、酸素以外の元素と定義され、健康維持に重要な役割を持つ。ミネラルは体内で産生できないため食事によって摂取する。摂取不足はもちろんのこと過剰摂取も健康面へ影響する。最近では mdx マウスのリン過剰摂取は、骨格筋内に異所的石灰化を引き起こす要因であることが示されており[48]、ミネラルと健康について注目されている。ミネラルの中でも亜鉛はそのほとんどが骨格筋に存在し、高負荷運動時には筋線維に生じた微細損傷によって亜鉛が漏出し、血漿亜鉛濃度が増加すると考えられている[49]。そこで、私は細胞生理活性をもったミネラルである亜鉛に着目し筋衛星細胞活性化への影響を検討した。

亜鉛はインスリン様作用および EGF 様作用を持つこと[37, 39, 43]、C2C12 リザーブ細胞はインスリン/EGF により活性化されることから[18]、亜鉛は C2C12 リザーブ細胞の活性化を誘導できると考えられた。本研究では塩化亜鉛および硫酸亜鉛によってリザーブ細胞活性化が促進したことを示した(図 8, 9)。塩の種類およびイオン強度の異なる亜鉛を用いたことで亜鉛イオンがリザーブ細胞活性化へ寄与していることが考えられた。さらには塩化亜鉛、硫酸亜鉛は同程度の濃度でリザーブ細胞に対し効果がみられたことから、試薬や培養液中に混在する他の金属イオンの影響ではないと考えている。しかし、亜鉛イオンがタン

パク質等と複合体を形成し機能した可能性については不明のままである。そのため、本文では亜鉛イオンではなく亜鉛と表記している。

線維芽細胞、脂肪細胞において亜鉛は PI3K/Akt カスケードを介した糖の細胞内取り込みの増加に寄与し、インスリン様機能を有することが報告されている [50]。本研究で、リザーブ細胞に対する塩化亜鉛刺激はインスリン受容体下流タンパク質である Akt および ERK のリン酸化を誘導したことから、亜鉛は休眠状態の細胞であっても細胞内情報伝達系を活性化することが分かった。また、これら情報伝達系のリン酸化強度は塩化亜鉛濃度依存的に増強したため、インスリン情報伝達系の活性化は亜鉛によって誘導されたことが示唆された。情報伝達系に対する亜鉛の作用機序は不明であるが、亜鉛濃度によって異なる挙動を示すことから(図 11)、細胞への作用機序が異なると考えている。また、インスリンおよび EGF を加えた際には、そのリン酸化変化は刺激直後から検出できたのに対し、亜鉛を加えた際には 2-3 時間の時間を要した(図 10, 図 11)。成長因子を加えた時のリン酸化変化は成長因子が受容体に結合したことにより生じたと考えられるが、亜鉛が誘導する情報伝達系変化は亜鉛が直接情報伝達系変化に作用したのではなく、成長因子分泌など間接的な機構が関与していると考えている。本研究では、情報伝達系活性に対する亜鉛の作用について後述した PTPase に対する作用、IGF 産生・分泌促進作用について検討を行った。

次に情報伝達系変化を誘導した上流について検討したところ、インスリン受容体と IGF-1 受容体のチロシンキナーゼ阻害効果をもつ AG1024 によって亜鉛誘導性のリザーブ細胞活性化は抑制されることが分かった。亜鉛誘導性 Akt 活性化の上流を検討した先行研究では、インスリン受容体欠損 Chinese hamster ovary cell を用いた場合、亜鉛によって Akt のリン酸化は検出されるが、IGF-1 受容体欠損細胞を用いた場合では Akt の活性化が誘導されないことを示している [43]。

そのため、亜鉛によって活性化される Akt の上流はインスリン受容体ではなく IGF-1 受容体であることが示唆されている[43]。そこで亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化はインスリン受容体よりも IGF-1 受容体を介していると考え、IGF-1 受容体過剰発現および変異体を過剰発現した C2C12 細胞を用いてその影響を検討したところ、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化には IGF-1 受容体が関与していることが分かった(図 12, 13, 14)。以上より、リザーブ細胞活性化は IGF-1 受容体が重要であり、リザーブ細胞に対する亜鉛の作用はインスリン受容体よりむしろ IGF-1 受容体を介して作用していると考えている。

IGF-1 受容体を介する作用として、亜鉛自体がリガンドとなりチロシンキナーゼ型受容体を活性化する可能性が考えられたが、亜鉛が直接的に受容体活性化を誘導することについては分かっていない。そこで、亜鉛添加が刺激となり IGF が産生され、それにより受容体が活性化した可能性を考えた。しかし亜鉛により IGF-1 および IGF-2 の mRNA 転写レベルは変化せず、IGF の産生は誘発されないことが分かった(図 16)。次にリザーブ細胞または筋管細胞に貯留されていた液性因子が培養液中へ分泌・放出された可能性を考えた。筋衛星細胞活性化機構の一つに、機械的刺激が起因となって誘発される筋細胞膜からの HGF 遊離が活性化に寄与することが明らかとされていることや[51]、運動によって筋線維膜から IGF-1 が遊離すると考えられていることから[19]、本研究で明らかとなった IGF-1 受容体の関与については、細胞内または細胞膜に貯留されていた IGF-1 が分泌・放出され作用したと考えている。さらに血清含有培養液と無血清培養液で誘導されたリザーブ細胞活性化を比較すると、血清含有培養液は約 2 倍活性化誘導効率が高いことから(図 8 B, 9 B)、亜鉛と血清成分が相互的に作用していると考えられる。IGF-1 中和抗体はリザーブ細胞活性化に対し有意な抑制効果が認められなかったことについて(図 15)、IGF-1 中和抗体量が不十分であり効率

よく IGF-1 の作用を抑制できなかつた可能性が考えられるが、IGF-2 をはじめ EGF、FGF、PDGF の成長因子や IL-6 などのサイトカインの液性因子も関与していると考えられる。

影響が考えられる液性因子の一つに S1P がある。S1P は細胞膜を構成するスフィンゴ脂質(スフィンゴミエリン)の代謝産物であり、セラミド、スフィンゴシンという代謝を経て産生され細胞生理活性を持つ。リザーブ細胞の活性化は成長因子だけではなく S1P によっても誘導される。また成長因子誘導性リザーブ細胞活性化にも S1P は関与しており、リザーブ細胞への EGF 刺激は S1P 産生を促進することが明らかとなっている。その機構は EGF によって誘導される ERK のリン酸化がスフィンゴシンキナーゼ活性を促進し、スフィンゴシンをリン酸化して S1P を産生する。S1P はセカンドメッセンジャーとしての働きの他、S1P 受容体のリガンドとして機能することが知られており、特に S1P2 は EGF 誘導性リザーブ細胞活性化に関与することが報告されている[18]。一方亜鉛は EGF 受容体の活性化を促進し、ERK をリン酸化させる作用を持つ[39, 43]。そのため亜鉛は EGF と類似した機能を有すると類推し、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化機構の一つに S1P の関与を考えた。本研究では、レトロウイルスベクターによって作製した S1P 受容体過剰発現 C2C12 細胞を使用し、その影響を検討した。しかし、塩化亜鉛を S1P 受容体過剰発現リザーブ細胞へ添加しても、コントロールベクターと比較し変化がなかった(図 17)。そのため、亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は S1P の産生を介さないことが示唆され成長因子誘導性の活性化とは異なる機構が働いていることが考えられた。

本研究では塩化亜鉛とインスリンを組み合わせると C2C12 リザーブ細胞の活性化が相乗的に増加することを見出した(図 18 A)。さらに、インスリンとの組み合わせは Akt のリン酸化シグナル強度を増加させ、そのリン酸化状態はインス

リン刺激と比較すると長時間保持された(図 19 A, B)。これはインスリン/EGF の結果と一致している(図 10)。細胞内の亜鉛イオンは PTPase の阻害因子であることが知られており、ラット脂肪細胞では、1 mM の亜鉛によりインスリン受容体の脱リン酸化を阻害することが報告されている[52]。そのため、私はリン酸化 Akt の増強は亜鉛の持つ PTPase 阻害効果によるものと考え PTPase 活性について検討した。しかし、亜鉛を細胞外に添加しても PTPase 活性に変化は認められなかった(図 21)。加えてライブイメージングと亜鉛蛍光指示薬を用いた亜鉛の細胞内取り込みについても検出できなかったため(data not shown)、リン酸化 Akt の増強は亜鉛が細胞内へ取り込まれ作用したのではなく、他の機構が働いていることが示唆された。その他の可能性として、ヒト IGF-1 受容体過剰発現 P2A2-LISN muscle cell では亜鉛によって IGF-1 と IGF-2 の IGF-1 受容体に対する親和性が高くなることが報告されていることから[53]、亜鉛によってインスリンおよび IGF-1 が親和性の高い状態で受容体へ結合したことが一つの要因であると考えている。その一方で C2C12 細胞へインスリンと亜鉛を組み合わせると作用させても、インスリン受容体のリン酸化増強は認められない[37]。そのため IGF-1 受容体への関与が一層考えられる。さらにカルシウムをキレートすることでリザーブ細胞活性化が阻害されたことから亜鉛/IGF-1 誘導性リザーブ細胞活性化はカルシウム依存的であることが分かる(図 22)。亜鉛は成長因子誘導性のカルシウム流入に必要である[47]。また、細胞内カルシウム濃度の増加と共に活性化するカルモジュリンキナーゼは Akt を含むプロテインキナーゼ B(Protein kinase B, PKB) を PI3K 非依存的に活性化することからも [54]、カルシウムが亜鉛/IGF-1 による相乗効果の一要因であることが考えられた。

本研究の結果から、私は亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化の制御機構について以下のことを考えた。

1) 亜鉛を添加することでC2C12細胞からIGF-1などの液性因子が分泌または遊離し、近傍細胞のIGF-1受容体を活性化することによってPI3K/AktおよびERKカスケードを活性化させる。2) 亜鉛によって活性化されたAkt、ERKの変化は成長因子によるものより遅く、IGF分泌・遊離を介することから亜鉛は成長因子とは異なる機構によってリザーブ細胞のAktとERKのリン酸化変化を引き起こしたと考えられる。3) インスリン、IGF-1、EGF存在下では、亜鉛は細胞内情報伝達系活性化を増強させることによって、リザーブ細胞活性化に協調的に働いている。さらに4) 亜鉛/IGF-1誘導性リザーブ細胞活性化にはカルシウムイオンが関与しており、これが細胞内情報伝達系へ影響を与えていることが考えられる。

(図23)

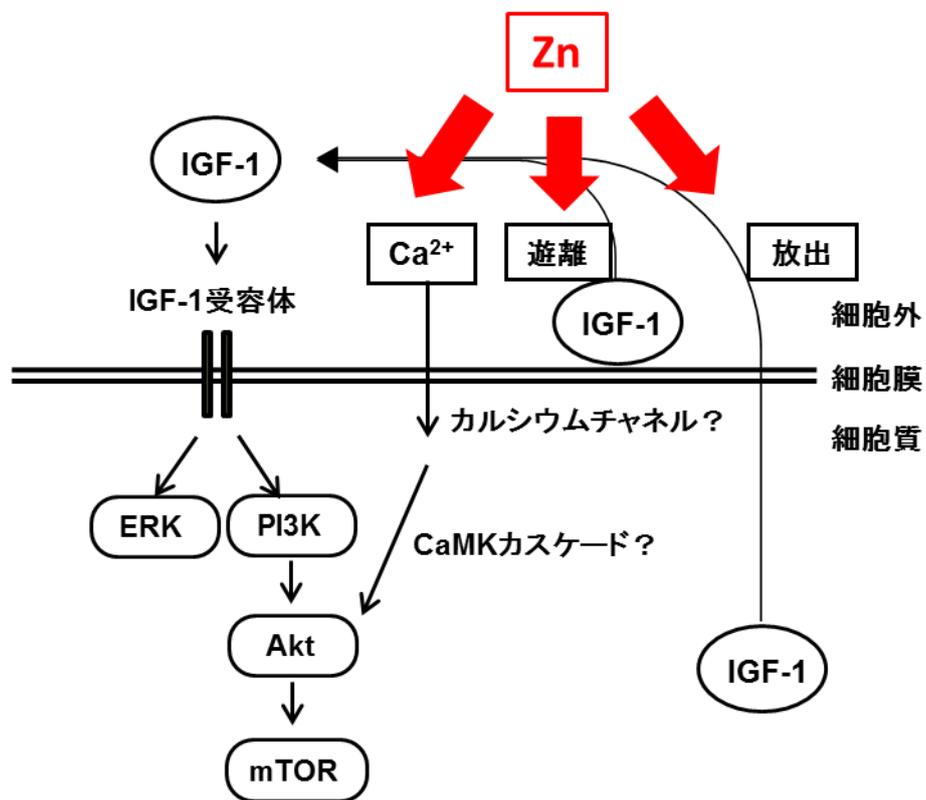


図23. 亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化のモデル

第3章 筋芽細胞増殖・分化に対する亜鉛の影響

筋損傷時、休眠状態から逸脱した筋衛星細胞は増殖能を発揮することで多数の筋前駆細胞を産出し損傷部位を埋め合わせる。その後筋芽細胞へと分化し、互いに融合することで筋管を形成し成熟した筋線維へと再生する。筋細胞の分化は MyoD や myogenin などの筋分化制御因子により厳密に制御される。MyoD は筋衛星細胞の活性化とともに発現し、分化後期になると myogenin が発現して最終分化過程となる[3]。筋管が形成されると、収縮タンパクの構成要素である骨格筋型ミオシン重鎖(myosin heavy chain, MyHC)やクレアチンキナーゼ(creatine kinase, CK)が発現する。これらは筋管に発現することから分化の標識として用いられる。特に CK は骨格筋からの逸脱酵素として骨格筋損傷の指標としても使用される。

亜鉛は筋芽細胞の分化制御過程に作用する。ニワトリ胚から摘出した骨格筋筋芽細胞を DTPA と共に培養すると筋分化が抑制され、そこへ亜鉛を加えると筋分化抑制が減弱する[55]。また、亜鉛は筋芽細胞の初期分化に関与しているとの報告もある[56]。

亜鉛は DNA 合成酵素、転写酵素、アミノアシル t-RNA 等の構成要素であることから、細胞増殖には必須である[44]。亜鉛と細胞増殖については種々の細胞でその関係が認められており、DTPA によって DNA 合成・細胞増殖が抑制される[57]。またマウス 3T3 細胞では、亜鉛欠乏によって成長因子が起因となる細胞内へのカルシウム流入が減弱し、それにより細胞増殖が抑制される[47]。一方で、亜鉛は細胞内でセカンドメッセンジャーとして働くことで細胞増殖に寄与することや[58]、生体内で成長ホルモンの分泌および IGF-1 分泌に影響を与えることが報告されており、亜鉛が間接的に細胞増殖促進へ作用すると考えられている

[44, 59]。しかし、亜鉛の細胞増殖に対する詳細な作用機序は明らかではなく、特に細胞外亜鉛の筋芽細胞増殖に対する作用は不明である。本章では、亜鉛による筋芽細胞の増殖と分化への影響について検討を行った。

実験材料と方法

C2C12 細胞増殖の評価

細胞増殖の評価は BrdU または EdU によって行った。5×10³ 個の C2C12 細胞を 8 穴のチャンバースライド、あるいは 1×10⁴ 個の C2C12 細胞を 0.1%ゼラチンで塗布した 24 穴培養皿に播種し、20% FBS/DMEM で 24 時間インキュベートし細胞を培養皿へ定着させた。細胞定着後 2% HS/DMEM、または 0.1% BSA/DMEM へ培養液を交換し、塩化亜鉛、硫酸亜鉛、インスリンを加え 48 時間培養した。細胞の固定は 10%ホルマリン溶液によって行い、固定前の 2 時間に BrdU または EdU を細胞核へ取り込ませた。全細胞核および 2 時間における BrdU、EdU 陽性細胞を計測し増殖細胞の割合を算出した(図 5)。

C2C12細胞分化の評価

C2C12細胞は5×10⁴個に調整し35mmの細胞培養皿へ播種後、20% FBS/DMEM で24時間培養し細胞を培養皿へ定着させた。その後、塩化亜鉛を加えた ITS/DMEMに培養液を交換し、分化誘導3日目に10%ホルマリン溶液によって固定した。細胞分化に対する亜鉛の影響は、分化誘導3日目のC2C12細胞における全細胞核に対するmyogenin発現の割合、myogenin発現細胞に対するMyHC発現細胞の割合、Fusion IndexおよびCK活性によって評価した。

また、亜鉛による細胞分化に対する可逆的変化を検討した。ITS/DMEM分化培養液に塩化亜鉛を添加し3日間培養後、亜鉛を除去するため新しい ITS/DMEM分化培養液に交換した。さらに2日間培養を行い合計で5日間培養し固定した。固定は10%ホルマリン溶液によって行い、その後筋管細胞に特異的に発現するMyHCを免疫染色した。

免疫染色

C2C12細胞を10%ホルマリン溶液で30分間固定し、5分間0.5% Triton X-100 (ICN Biomedicals)によって細胞膜透過処理を行った。一次抗体反応後、Alexa Fluor標識抗体により検出し、細胞核は100 ng/mlのHoechst33258で標識した。

一次抗体はウサギ抗myogeninポリクローナル抗体(Santa CruzBiotechnology, SantaCruz, CA)、マウス抗Myosin Heavy Chain (MyHC) モノクローナル抗体(clone MF20, Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, IA)、ラット抗BrdUモノクローナル抗体(clone BU1/75, Abcam)を用いた。

CK 活性測定

ITSB/DMEM によって分化誘導した C2C12 細胞を、分化誘導後 3 日目に PBS で洗浄し細胞を回収した。その後、プロテアーゼ阻害剤を含む Complete Lysis-M Reagent を用い超音波処理で細胞を破砕し、細胞上清に含まれる CK を富士ドライケムスライド CPK-PⅢクレアチニンキナーゼキット(富士フィルム, 東京)を用い Fujifilm DRI-CHEM 3500s (富士フィルムメディカル, 東京)によって測定した。

統計解析

測定は同様の実験を 3 から 5 回繰り返す、800 個前後の細胞数を計測することによって行った。2 群間による比較には Student's t-test を用い、3 群間以上の比較には one-way analysis of variance (ANOVA) Turkey の多重比較検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし、数値は平均値±標準誤差で示した。

結果

C2C12細胞分化に対する亜鉛の影響

C2C12細胞分化に対する亜鉛の影響は、まず分化誘導時に塩化亜鉛を加えることでその影響を観察した。なお、分化は増殖培養液からITSB/DMEMの無血清分化培養液への交換によって誘導した。塩化亜鉛濃度は100、50 μM で用いたが、100 μM 加えた細胞では細胞毒性がみられ3日間培養を続けることができなかった。50 μM を加えた細胞では分化誘導後3日目に顕微鏡下で筋管細胞の形成抑制が観察された(図24)。そこで、分化誘導3日目におけるC2C12細胞の分化を評価した。分化の指標にはmyogeninと全筋核数に対する融合細胞核の割合(Fusion Index)およびmyogenin陽性細胞に対するMyHC陽性細胞の割合を評価した。さらに骨格筋形成や損傷マーカーとして使用されているCK活性を筋管細胞形成の指標として用いた。その結果、亜鉛添加によりmyogenin陽性細胞の割合(図25 A)、Fusion Indexは有意に減少した(図25 B)。CK活性については、有意差は認められなかったが減少傾向にあった(図25 C)。一方、myogenin陽性細胞に対するMyHC陽性細胞の割合に関しては、亜鉛の有無によって変化は認められなかった(図25 D)。

次に、亜鉛によって抑制されたC2C12細胞の分化は可逆的変化かどうか亜鉛を除去することで検討した。分化3日目で、塩化亜鉛を加えたC2C12細胞では筋管細胞形成が抑制され先の結果と同じ結果を得た。その後、培養液交換により亜鉛を除去しさらに2日間培養を続けると、抑制された筋管細胞は亜鉛無添加の細胞と同程度の形成を認めた(図26)。

以上より亜鉛によって生じた分化の抑制は可逆的変化であると分かった。

亜鉛はC2C12細胞の増殖促進に作用する

亜鉛はC2C12細胞分化に抑制的に作用した。筋芽細胞の分化抑制にはトランスフォーミング成長因子- β (transforming growth factor, TGF- β)ファミリーであるmyostatinの作用や、亜鉛の細胞毒性などいくつかの要因が考えられるが、その一つに細胞増殖が促進したために分化への移行が妨げられた可能性もある。

そこで、私は増殖中のC2C12細胞に塩化亜鉛を加え細胞増殖に対する影響を検討した。細胞増殖は、2% HS/DMEMの血清含有培養液および0.1% BSA/DMEMの無血清培養液の2つの培養条件で検討し、EdUおよびBrdUの取り込みを評価した。まず血清含有培養液に亜鉛を25、50 μ Mで加えたところ、EdU取り込みの割合は亜鉛添加によって増加した(図27 A)。さらに顕微鏡下1視野あたりの細胞数も増加した(図27 B)。

無血清培養液の培養条件でも細胞増殖への効果が認められ、塩化亜鉛によりEdUの取り込み(図27 C)、および1視野あたりの細胞数が有意に増加した(図27 D)。また血清含有培養液は、より増殖促進作用が高かった。

さらに硫酸亜鉛を用いてC2C12細胞増殖に関して検討を行ったところ、硫酸亜鉛でもBrdUの取り込みが増加した(図28)。

これらの結果は、亜鉛が筋芽細胞増殖に促進的に作用したことを示し、さらにその作用は血清成分と協調的に作用していることを示唆している。

亜鉛とインスリンの協調作用

血清含有培養液に亜鉛を加えた時のC2C12細胞増殖は、無血清培養液を使用した時よりも増殖促進作用が高いことから、塩化亜鉛が血清成分と協調的に作用している可能性が考えられた。そこで、私は増殖中のC2C12細胞に塩化亜鉛とインスリンを組み合わせ加えBrdUの取り込みを評価したところ、塩化亜鉛とイ

ンスリンを組み合わせた場合には、各々単独で添加した際と比較して有意に BrdUの取り込みが増加した(図29)。

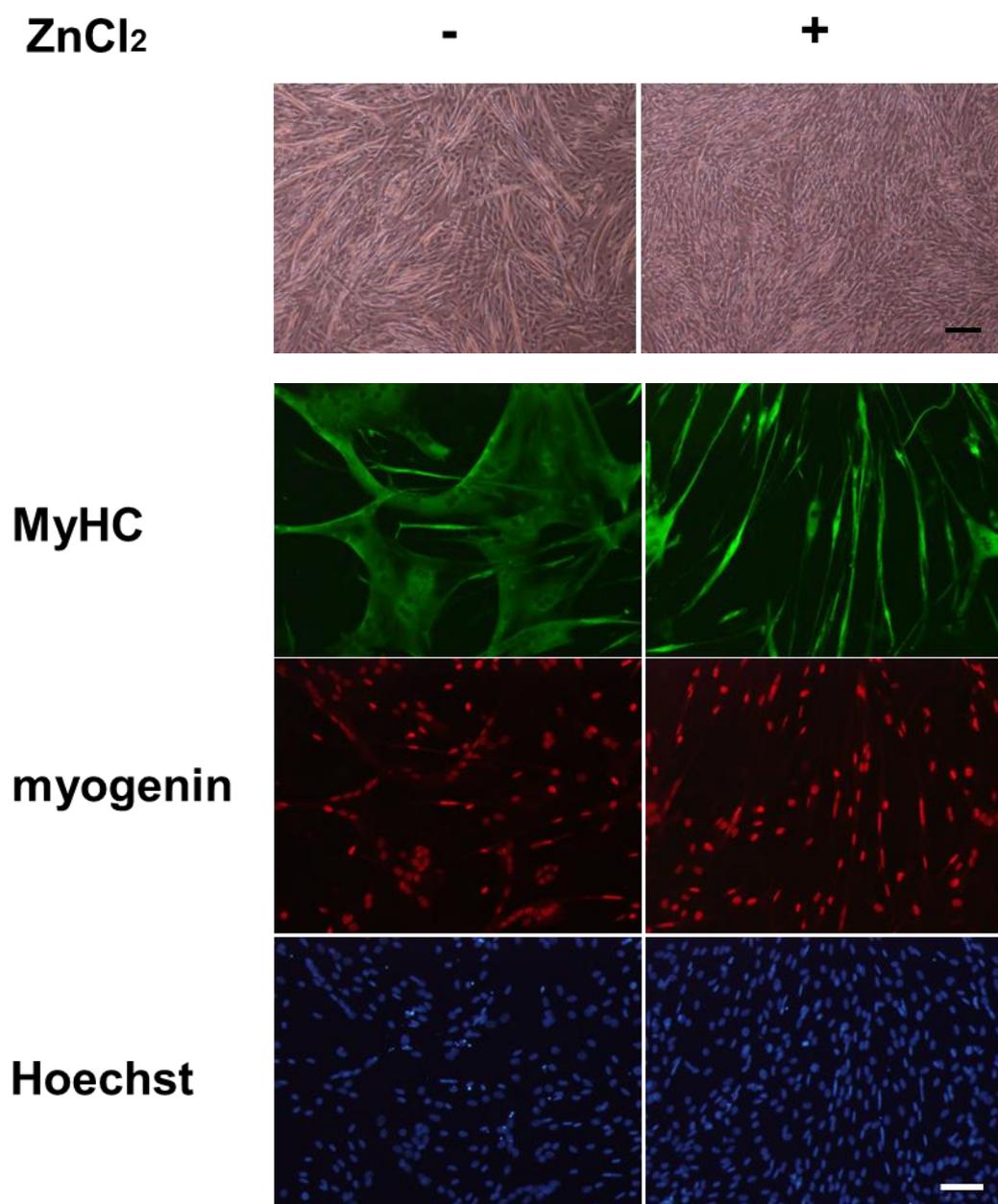


図24. C2C12細胞分化に対する亜鉛の影響

C2C12細胞分化誘導時50 μ Mの塩化亜鉛を加え、分化3日目の筋管形成を位相差顕微鏡で観察した。その後、免疫染色によってMyHC、myogeninとHoechstを検出した。

Scale bar: 位相差顕微鏡像 200 μ m、免疫染色像 100 μ m

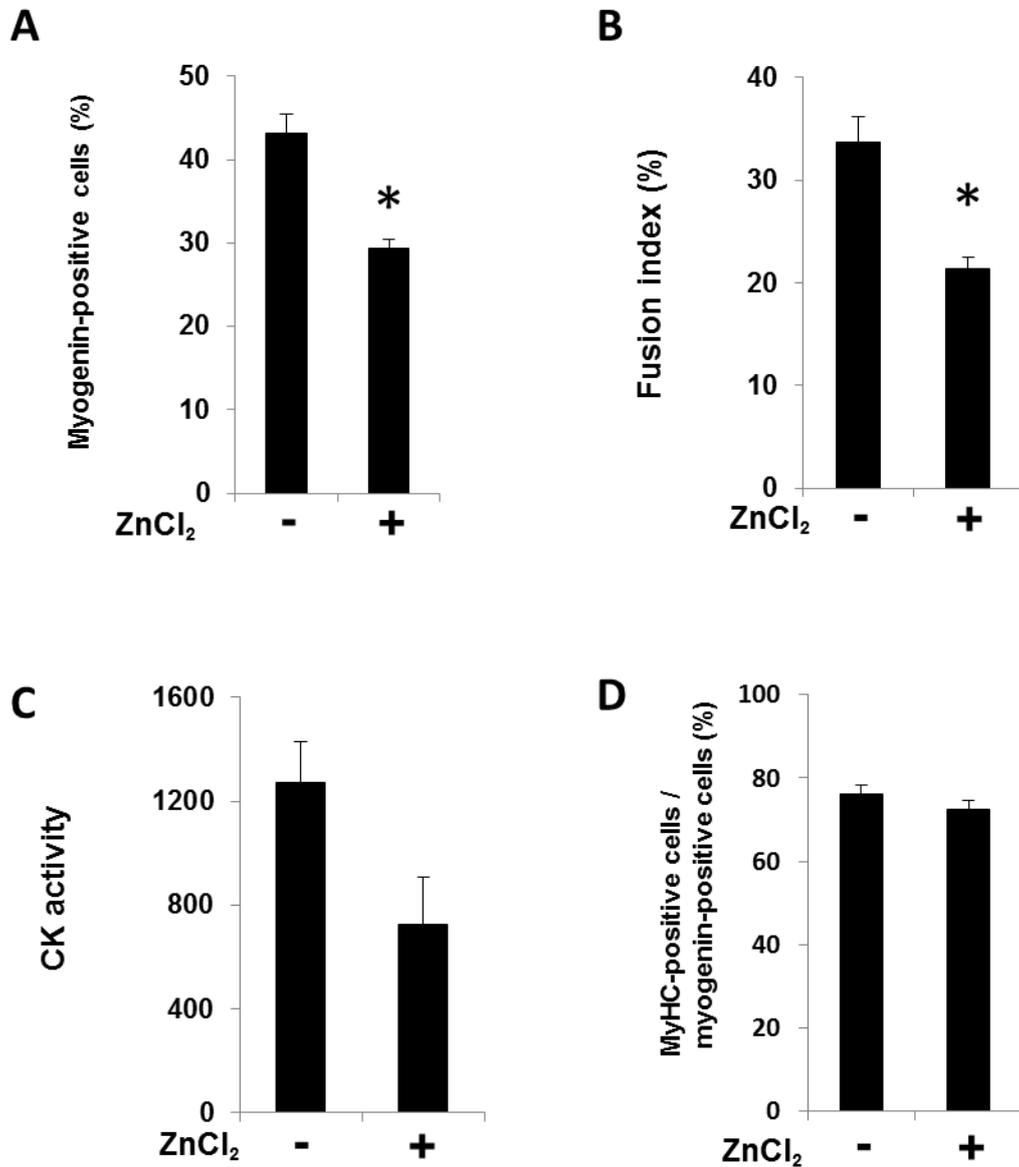


図25. C2C12細胞分化に対する亜鉛の影響

分化誘導時に50 μ Mの塩化亜鉛を加え分化3日目のmyogeninとMyHC発現を検出した。分化の評価は、myogenin陽性細胞の割合(A)、Fusion index(B)、CK活性(C)、myogenin陽性細胞におけるMyHC陽性細胞の割合(D)を評価した。*は有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

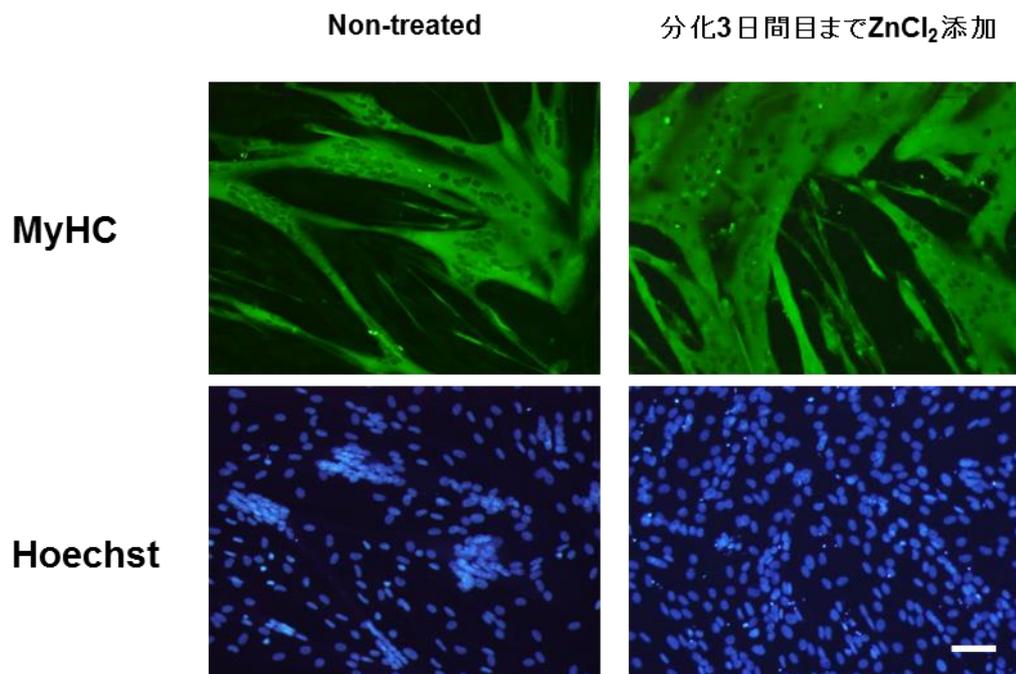


図26. 亜鉛によるC2C12細胞分化抑制の可逆的変化

C2C12細胞分化誘導時50 μMの塩化亜鉛を加え、分化3日目に新しい培養液に交換し、さらに2日間培養した。免疫染色でMyHCとHoechstを検出した。

Scale bar: 100μm

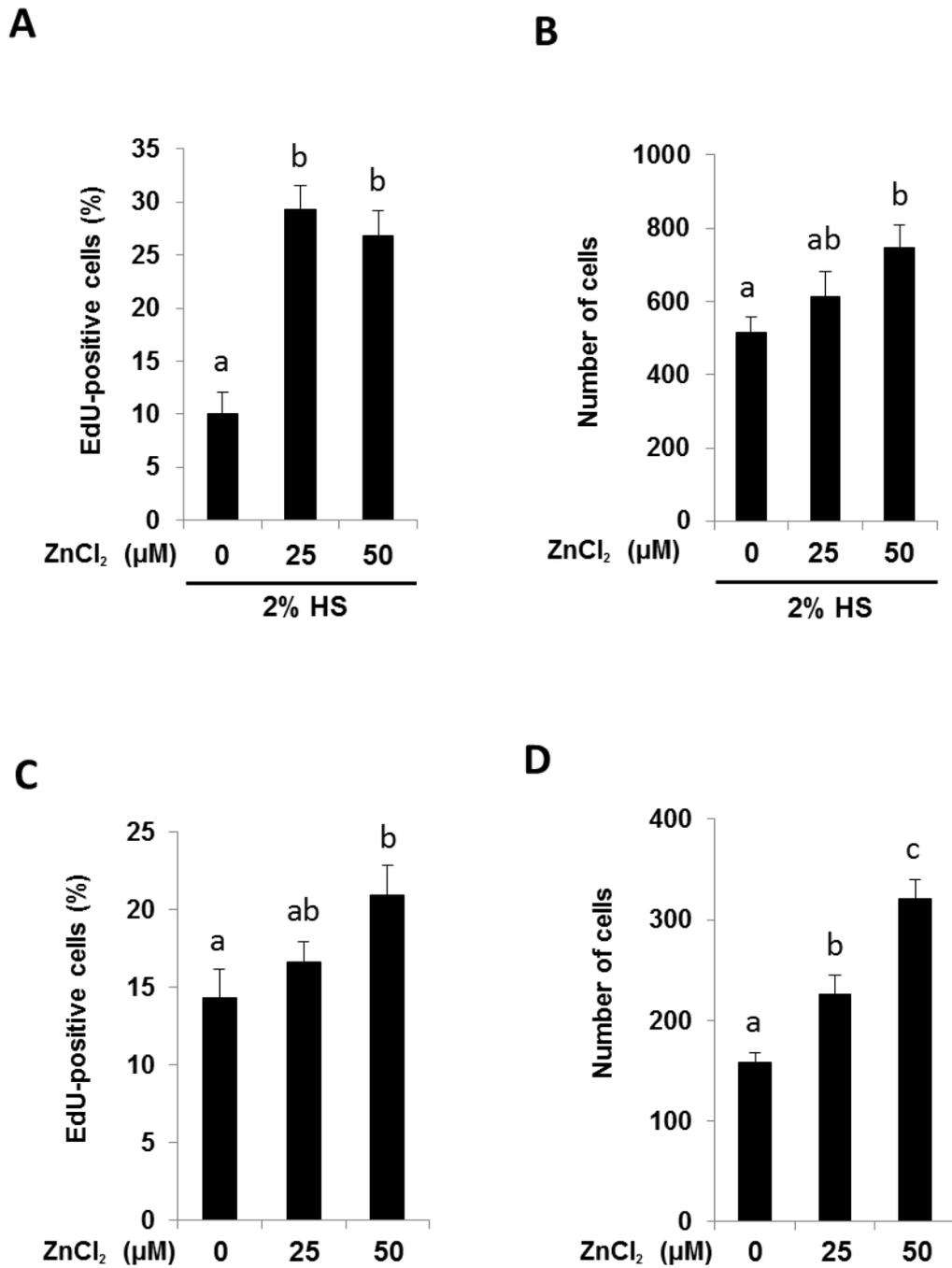


図27. C2C12細胞増殖に対する塩化亜鉛の影響

増殖中のC2C12細胞に塩化亜鉛を加え培養した。培養液は2%HS/DMEM(A, B)または0.1%BSA/DMEM(C, D)の無血清培養液を用いた。2時間EdUを取り込ませることで増殖細胞を標識し、EdU陽性細胞の割合(A, C)と一視野における細胞数(B, D)を計測した。異なるアルファベットは有意差($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

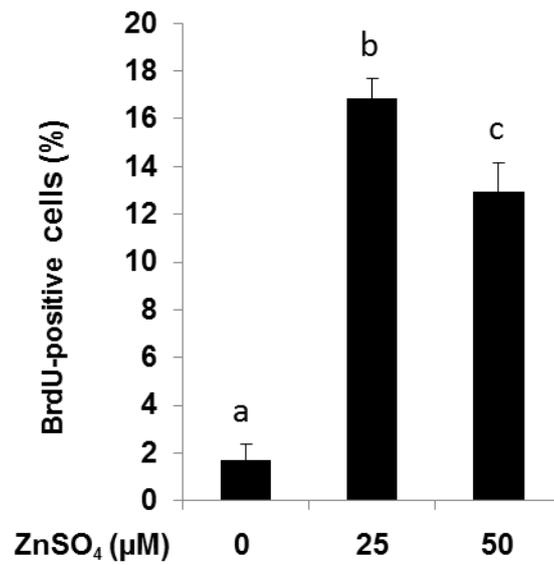


図28. C2C12細胞増殖に対する硫酸亜鉛の影響

増殖中のC2C12細胞へ硫酸亜鉛を加え、46時間培養後にBrdUを加え、さらに2時間培養した。免疫染色によってBrdUを検出し、BrdU陽性細胞の割合を算出した。異なるアルファベットは有意差 ($p < 0.05$)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

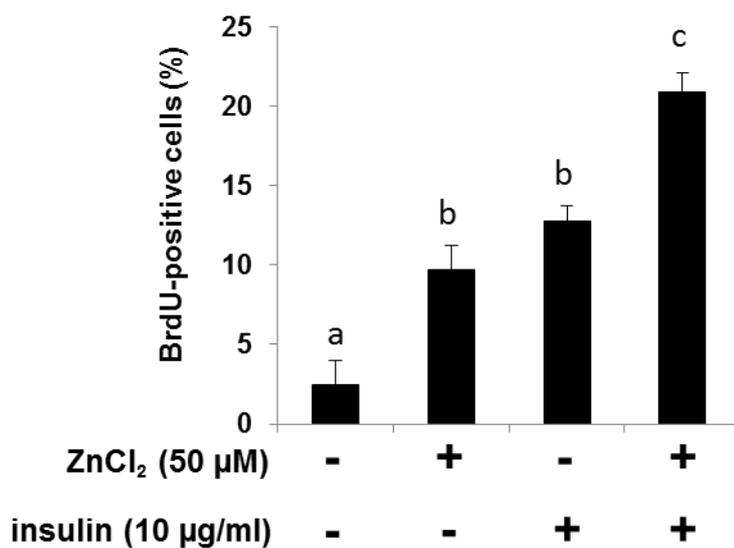


図29. 亜鉛のC2C12細胞増殖への相乗効果

増殖中のC2C12細胞へ塩化亜鉛とインスリンを組み合わせ添加した。その後46時間後にBrdUを添加し細胞に2時間取り込ませた。免疫染色によってBrdUを検出し、陽性細胞の割合を算出した。異なるアルファベットは有意差(p<0.05)があることを示す。データは平均値±標準誤差で表示した。

考察

亜鉛は筋分化に重要な機能を持ち、ニワトリ胚筋芽細胞では金属イオンを DTPA により除去すると筋分化が抑制され、亜鉛イオンを加えることによって再び筋分化能を取り戻す[55]。また、亜鉛は初期の筋分化に必要である[56]。本研究では、C2C12 細胞の分化誘導時に塩化亜鉛を加えると、筋管細胞形成が抑制された(図 24, 25)。興味深いことに、myogenin 陽性細胞中の MyHC 陽性細胞の割合に違いが認められなかったことから(図 25 D)、亜鉛は一度 myogenin を発現し分化に運命決定した細胞には影響を及ぼさないことが考えられた。そのため、亜鉛は C2C12 細胞分化に対し分化初期の抑制に作用するが、分化へ運命決定された細胞に対しては作用しないことが示唆された。これらの結果は亜鉛が筋分化に必要とする先行研究と矛盾する結果を得た。しかし、先行研究は亜鉛イオン欠如に対する影響であることや、本研究で用いた塩化亜鉛は生体内濃度と比較すると高濃度であることから、細胞分化に対する亜鉛は適した濃度条件があると考えられる。また、細胞所見上、亜鉛を加えた細胞では細い筋管細胞が見受けられたため、高濃度の亜鉛は筋管細胞の成熟を抑制することも示唆された。

骨格筋筋芽細胞の増殖と分化への移行は主に FGF や IGF が作用し厳密に制御されていると考えられている[60, 61, 62, 63]。特に FGF は筋芽細胞増殖に重要な因子の一つとして同定されており、培養液から FGF2 を除去した際には速やかに分化へ移行する。本研究で、亜鉛は C2C12 細胞増殖を促進することを示した。さらに、亜鉛によって分化抑制された C2C12 細胞は亜鉛除去によって速やかに発達した筋管細胞へと分化した(図 26)。以上のように、亜鉛は C2C12 細胞に対して FGF と似た性質を示した。さらに亜鉛による分化抑制は細胞増殖促進作用によって分化への運命決定が遅延したことが原因であると示唆された。

亜鉛による細胞増殖促進作用は、無血清培養液よりも血清含有培養液で促進

効果が高かった(図 27)。また、増殖中の C2C12 細胞でもインスリンと塩化亜鉛を組み合わせた際に相乗的に細胞増殖促進作用がみられた(図 29)。細胞の増殖にはカルシウムの細胞内流入が必要であり、マウス 3T3 細胞では成長因子により誘導される Ca イオンの流入には亜鉛が必要であることが報告されている[47]。そのため、私はリザーブ細胞活性化と同様に亜鉛が IGF-1 や EGF 等の血清成分と協調して働いている可能性を考えている。

筋衛星細胞の活性化と増殖は骨格筋再生初期に起こる事象であり、これらの過程を促進可能であれば骨格筋再生に促進的に働くことが考えられている。本研究で亜鉛は休眠化した筋衛星細胞のモデルであるリザーブ細胞の休眠状態からの活性化を促進し、さらに増殖中の細胞の増殖促進に働く結果を得た。

以上より、私は亜鉛の投与によって骨格筋再生が促進的されるのではないかと考え、マウス骨格筋を蛇毒カルジオトキシンによって損傷させ損傷1週目における骨格筋を評価した。ヘマトキシリン-エオジン染色による病理所見および、再生筋線維数に目立った違いは観察されなかった(data not shown)。先行研究では筋再生に対する亜鉛の影響について、高濃度亜鉛食を与えたマウスでは通常食のマウスと比較し筋再生に差は認められないことが報告されている[64]。しかし、同じ報告の中で低濃度亜鉛食を与えたマウスでは骨格筋再生の遅延が認められた。亜鉛は骨格筋に豊富に含まれているため骨格筋損傷によって血中に漏出することが考えられており、激しい運動によっても血中の亜鉛濃度は増加することが報告されている[49]。以上のことから私は、骨格筋再生を促進するための十分量の亜鉛は筋線維内に存在しており、筋損傷により筋線維から漏出した亜鉛は骨格筋再生に貢献していると考えた。そのため、亜鉛キレート作用を持つ薬剤の投与や慢性的に亜鉛不足の状態となっている糖尿病等のモデル動物によって筋再生への影響を検討することで、亜鉛投与による筋再生促進の可能性につ

いて調べることができると考えている。

第4章 総括

本研究で、亜鉛は休眠状態であるC2C12リザーブ細胞の活性化およびC2C12細胞の増殖を促進することを示した。亜鉛は多くの酵素の構成成分として存在しDNA合成等、生命活動に必須のミネラルである。また亜鉛の作用について種々の細胞でその効果が研究されているものの、細胞に対する作用機序については未だ不明な点が多く、特に細胞外に存在する亜鉛の直接的作用については不明である。さらに亜鉛の作用に関する報告は、そのほとんどが増殖中の細胞が研究対象であり休眠状態を積極的に維持した細胞への影響は不明のままであった。特にin vitroによる実験系では積極的に休眠状態を維持する細胞は少ないため、筋芽細胞のリザーブ細胞が有用であった。本研究では亜鉛が骨格筋筋芽細胞の増殖促進作用を持つことが明らかとなり、さらに休眠状態のリザーブ細胞活性化に関与することを明らかにした。

本研究では亜鉛を加えることが起因となり細胞外へIGF-1などの液性因子が分泌され、それが細胞へ作用している可能性を示した。IGFは通常IGF結合タンパク質 (IGF bind protein, IGFBP) に結合し、受容体へ作用するタイミングが制御されている。亜鉛イオンはIGFBPへ結合するIGFを減少させ、IGF-1受容体への結合を増加させることが分かっている。IGFBPはシステインリッチNドメイン1に亜鉛イオン結合サイトを持ち、IGFに対するrapid association作用を有する。そのため、亜鉛イオンのIGFBPへの結合はIGFBPの構造変化をもたらしIGFに対する結合性を制御していると推察されている[65, 66]。さらに、IGF-1受容体は細胞膜外の α サブユニットにシステインリッチドメインを持ち、4または5つの亜鉛分子が結合する[66]。細胞外亜鉛はIGFの受容体親和性を増加することからも[53]、亜鉛イオンはIGFのIGF-1受容体結合に重要な機能をもつと考えられる。そのため亜鉛の作用機序について、細胞外亜鉛はIGFBPとIGF-1受容体間のIGFの動態を

制御する可能性も考えられる。

他にリザーブ細胞活性化に対する亜鉛の作用機序について、亜鉛イオンの持つPTPase活性の阻害効果について検討した。PTPase活性を測定することで亜鉛イオンの細胞内流入の指標となり、さらに亜鉛/インスリンによって増強したりリン酸化Aktに関与していると考えた。しかし、亜鉛の有無によってPTPase活性に変化は認められなかった。本研究では、弱酸性条件でp-nitrophenyl phosphateを基質とする脱リン酸化反応を測定したため酸性ホスファターゼ活性全般を検出した。しかし、受容体や膜貫通タンパクを制御するPTPaseは100以上あることからPTPaseに対する亜鉛の影響について特異的な基質を用いるなど、より詳細な検討が必要である。

本研究では、亜鉛誘導性リザーブ細胞の活性化機序の一つに細胞外カルシウムが影響していることを示した。カルシウムイオンは細胞増殖に必須であるため、筋芽細胞増殖促進にも影響を与えていることが考えられる。亜鉛とカルシウムについてSwiss 3T3細胞で成長因子によるカルシウム流入に亜鉛が関与することが報告されている[47]。また近年、亜鉛がGPR39/オベスタチン受容体に作用し細胞内カルシウムの濃度調節を担っていると報告された[67, 68]。GPR39/オベスタチン受容体は亜鉛感受性Gタンパク共役型受容体であり損傷骨格筋に高発現している[69]。細胞外亜鉛は細胞内カルシウムを上昇させ、その結果細胞内情報伝達系活性化に関与することが示唆されていることから[70]、本研究における情報伝達系の変化についても影響を与えていると考えている。今後、メタボローム解析やmRNAなどの網羅的解析を行うことで亜鉛の作用機序がより詳細に分かると思われる。

筋衛星細胞活性化および筋芽細胞増殖は損傷骨格筋再生に対する初期のプロセスであり、これらの機能が促進可能であれば筋再生に対し促進的に働くこと

が考えられる。本研究では、亜鉛が筋衛星細胞の活性化および増殖促進に作用する可能性についてC2C12細胞を用いて示した。しかし、先行研究で高濃度亜鉛食を与えたマウスの筋再生は促進されないことが示されている[64]。その一方で、亜鉛不足の状態では筋再生能は低下した[64]。糖尿病では、亜鉛の排泄機構の破綻によって膵臓に含有されている亜鉛濃度が健常人と比較して約50%低いことが報告されている。さらに、糖尿病モデルマウスでは損傷骨格筋からの再生が遅延する[71]。そのため、糖尿病マウス等の亜鉛欠乏を生じる疾患マウスでは亜鉛の投与が骨格筋再生促進に作用すると推察される。

さらに本研究の結果から、リザーブ細胞活性化において亜鉛はIGF-1と相乗効果を持つことが明らかとなった。レジスタンストレーニング後では血漿亜鉛濃度が増加すること[49]、マウスでは自発的運動を行わせるだけで血中IGF-1濃度が増加することから[72]、運動は損傷骨格筋からの再生を促す可能性も推察された。これは、リハビリテーションで行われる運動療法が骨格筋再生に促進的に働くという「科学的根拠に基づいた理学療法」の確立へ貢献できる可能性も考えられる。今後、亜鉛の骨格筋再生に対する作用を解明することで、疾患治療およびリハビリテーションに貢献することを期待している。

引用文献

1. J.G. Tidball, Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration., *Compr. Physiol.*, 1 (2011) 2029-2062.
2. P. Seale, M.A. Rudnicki, A new look at the origin, function, and “stem-cell” status of muscle satellite cells., *Dev. Biol.*, 218 (2000) 115–124.
3. P.S. Zammit, T.A. Partridge, Z. Yablonka-Reuveni, The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came inform the cold., *J. Histochem. Cytochem.*, 54 (2006) 1177–1191.
4. P.S. Zammit, J.P. Golding, Y. Nagata, V. Hudon, T.A. Partridge, J.R. Beauchamp, Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal?., *J. Cell Biol.*, 166 (2004) 3347-3357.
5. C.T. Chasapis, A.C. Loutsidou, C.A. Spiliopoulou, M.E. Stefanidou, Zinc and human health: an update., *Arch Toxicol.*, 86 (2012) 521-534.
6. C. Andreini, L. Banci, I. Bertini, A. Rosato, Counting the zinc-proteins encoded in the human genome., *J. Proteome Res.*, 5 (2006) 196-201.
7. J. Suliburska, S. Cofta, E. Gajewska, G. Kalmus, M. Sobieska, W. Samborski, Z. Krejpcio, S. Drzymala-Czyz, P. Bogdanski, The evaluation of selected serum mineral concentrations and their association with insulin resistance in obese adolescents., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 17 (2013) 2396–2400.
8. 駒井三千夫, 神戸大朋, 亜鉛の機能と健康 -新たに分かった多彩な機能-, 建帛社
9. H.J.A. Likuski, R.M. Forbes, Effect of phytic acid on the availability of zinc in amino acid and casein diets fed to chicks., *J. Nutr.*, 84 (1964)

145-148.

10. R.A. Al-Marroof, S.S. Al-Sharbatti, Serum zinc levels in diabetic patients and effect of zinc supplementation on glycemic control of type 2 diabetics., *Saudi Med. J.*, 27 (2006) 344-350.
11. D.A. Scott, A.M. Fisher, The insulin and the zinc content of normal and diabetic pancreas., *J. Clin. Invest.*, 17 (1938) 725-728.
12. A. Isaacson, A. Sandow, Effects of zinc on responses of skeletal muscle., *J. Gen. Physiol.*, 46 (1963) 655-677.
13. M. Krotkiewski, M. Gudmundsson, P. Backström, K. Mandroukas, Zinc and muscle strength and endurance., *Acta Physiol. Scand.*, 116 (1982) 309-311.
14. T. Tameyasu, M. Ohta, M. Tanaka, K. Ogihara, S. Takahashi, T. Yamanobe, Effect of zinc-carnosine complex on muscular function in frail dystrophin-deficient (mdx) mice., *Jpn. J. Physiol.*, 52 (2002) 449-456.
15. T. Tameyasu, M. Yamada, M. Tanaka, S. Takahashi, Effect of zinc-carnosine chelate compound on muscle function in mdx mouse., *Jpn. J. Physiol.*, 52 (2002) 111-120.
16. N. Yoshida, S. Yoshida, K. Koishi, K. Masuda, Y. Nabeshima, Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'., *J. Cell Sci.*, 111 (1998) 769-779.
17. Y. Nagata, Y. Honda, R. Matsuda, FGF2 induces ERK phosphorylation through Grb2 and PKC during quiescent myogenic cell activation., *Cell Struct. Funct.*, 35 (2010) 63-71.
18. Y. Nagata, K. Ohashi, E. Wada, Y. Yuasa, M. Shiozuka, Y. Non omura, R.

- Matsuda, Sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced muscle satellite cell activation., *Exp. Cell Res.*, 326 (2014) 112–124.
19. U. Berg, P. Bang, Exercise and circulating insulin-like growth factor 1., *Horm. Res.*, 62 (2004) 50-58.
20. D.Z. Ewton, J.R. Florine, Effects of the somatomedins and insulin on myoblast differentiation *in vitro.*, *Dev. Biol.*, 86 (1981) 31-39.
21. D. Jarocha, K. Stangel-Wojcikiewicz, A. Basta, M. Majka, Efficient myoblast expansion for regenerative medicine use., *Int. J. Mol. Med.*, 34 (2014) 83-91.
22. J.A. Roe, A.S. Baba, J.M. Harper, P.J. Buttery, Effects of growth factors and gut regulatory peptides on nutrient uptake in ovine muscle cell cultures., *Comp. Biochem. Physiol. A. Physiol.*, 110 (1995) 107-114.
23. J.P. Golding, E. Calderbank, T.A. Partridge, J.R. Beauchamp, Skeletal muscle stem cells express anti-apoptotic ErbB receptors during activation from quiescence., *Exp. Cell Res.*, 313 (2007) 341-356.
24. W. Kwasniewski, J. Kotarski, G. Polak, A. Gozdicka-Jozefiak, J. Kotarski, The role of human insulin growth factor (IGF)- Axis in carcinogenesis., *Advances in cell biology*, 4 (2014) 25-42.
25. F. Relaix, P.S. Zammit, Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage., *Development*, 139 (2012) 2845-2856.
26. R. Bischoff, A satellite cell mitogen from crushed adult muscle., *Dev. Biol.*, 115 (1986) 140-147.

27. R. Tatsumi, J.E. Anderson, C.J. Nevoret, O. Halevy, R.E. Allen, HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells., *Dev. Biol.*, 194 (1998) 114-128.
28. L. Ramalingam, E. Oh, D.C. Thurmond, Novel roles for insulin receptor (IR) in adipocytes and skeletal muscle cells via new and unexpected substrates., *Cell Mol. Life Sci.*, 70 (2013) 2815-2834.
29. C. Rommel, S.C. Bodine, B.A. Clarke, R. Rossman, L. Nunez, T.N. Stitt, G.D. Yancopoulos, D.J. Glass, Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways., *Nat. Cell Biol.*, 3 (2001) 1009-1013.
30. M.V. Chakravarthy, T.W. Abraha, R.J. Schwartz, M.L. Fiorotto, F.W. Booth, Insulin-like growth factor-1 *in vitro* replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G₁/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway., *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 35942–35952.
31. T. Schmelzle, M. N. Hall, TOR, a central controller of cell growth., *Cell*, 103 (2000) 253–262.
32. D.C. Fingar, C.J. Richardson, A.R. Tee, L. Cheatham, C. Tsou, J. Blenis, mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E., *Mol. Cell Biol.*, 24 (2004) 200–216.
33. D.J. Glass, Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 37 (2005) 1974–1984.
34. E. Erbay, J. Chen, The mammalian target of rapamycin regulates C2C12

- myogenesis via a kinase-independent mechanism., *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 36079–36082.
35. I.H. Park, E. Erbay, P. Nuzzi, J. Chen, Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase activity and S6K1., *Exp. Cell Res.*, 309 (2005) 211–219.
36. J.W. Ramos, The regulation of extracellular signaling-regulated kinase (ERK) in mammalian cells., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 40 (2008) 2707–2719.
37. E.R. Miranda, C.S. Dey, Effect of chromium and zinc on insulin signaling in skeletal muscle cells., *Biol. Trace Elem. Res.*, 101(2004) 19–36.
38. J.P. McClung, T.N. Tarr, B.R. Barnes, A.G. Scrimgeour, A.J. Young, Effect of supplemental dietary zinc on the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in skeletal muscle and liver from post-absorptive mice., *Biol. Trace Elem. Res.*, 118 (2007) 65–76.
39. W. Wu, L.M. Graves, I. Jaspers, R.B. Devlin, W. Reed, J.M. Samet, Activation of the EGF receptor signaling pathway in human airway epithelial cells exposed to metals., *Am. J. Physiol.*, 277 (1999) L924–L931.
40. M. Fortier, N. Figeac, R.B. White, P. Knopp, P.S. Zammit, Sphingosine-1-phosphate receptor 3 influences cell cycle progression in muscle satellite cells., *Dev. Biol.*, 382 (2013) 504-516.
41. S.Y. Corbel, F.M. Rossi, Latest developments and *in vivo* use of the Tet system: *ex vivo* and *in vivo* delivery of tetracyclin-regulated genes., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13 (2002) 448-452.
42. P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P.

- Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84 (1987) 7413-7417.
43. D. Beyersmann, H. Haase, Functions of zinc signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells., *BioMetals.*, 14 (2001) 331-341.
44. N.R. Pandey, G. Vardatsikos, M.Z. Mehdi, A.K. Srivastava, Cell-type-specific roles of IGF-1R and EGFR in mediating Zn²⁺- induced ERK 1/2 and PKB phosphorylation., *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15 (2010) 399–407.
45. M. Tamaki, Y. Fujitani, Role of zinc in type 2 diabetes, *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 69 (2014) 15-23.
46. R.S. MacDonald, The role of zinc in growth and cell proliferation., *J. Nutr.*, 130 (2000) 1500S–1508S.
47. B.L. O'Dell, J.D. Browning, Zinc deprivation impairs growth factor-stimulated calcium influx into murine 3T3 cells associated with decrease cell proliferation., *J. Nutr.*, 141 (2011) 1036–1040.
48. E. Wada, M. Yoshida, Y. Kojima, I. Nonaka, K. Ohashi, Y. Nagata, M. Shiozuka, M. Date, T. Higashi, I. Nishino, R. Matsuda, Dietary phosphorus overload aggravates the phenotype of the dystrophin deficient mdx mouse., *Am. J. Pathol.*, 184 (2014) 3094-3104.
49. T.G. Mundie, B. Hare, Effect of resistance exercise on plasma, erythrocyte, and urine Zn., *Biol. Trace Elem. Res.*, 79 (2001) 23-28.
50. X. Tang, N.F. Shay, Zinc has an insulin-like effect on glucose transport mediated by phosphoinositol-3-kinase and Akt in 3T3-L1 fibroblasts and adipocytes., *J. Nutr.*, 131 (2001) 1414–1420.

51. R. Tatsumi, A. Hattori, Y. Ikeuchi, J.E. Anderson, R.E. Allen, Release of hepatocyte growth factor from mechanically stretched skeletal muscle satellite cells and role of pH and nitric oxide., *Mol. Biol. Cell*, 13 (2002) 2909-2918.
52. R.A. Mooney, K.L. Bordwell, Differential dephosphorylation of the insulin receptor and its 160-kDa substrate (pp160) in rat adipocytes., *J. Biol. Chem.*, 267 (1992) 14054–14060.
53. R.H. McCusker, M. Kaleko, R.L. Sackett, Multivalent Cations and ligand affinity of the type 1 insulin-like growth factor receptor on P2A2-LISN muscle cells., *J. Cell Physiol.*, 176 (1998) 392-401.
54. S. Yano, H. Tokumitsu, T.R. Soderling, Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway., *Nature*, 396 (1998) 584-587.
55. L. Petrie, J.K. Chesters, M. Franklin, Inhibition of myoblast differentiation by lack of zinc., *Biochem. J.*, 276 (1991) 109–111.
56. L. Petrie, J.N. Buskin, J.K. Chesters, Zinc and the initiation of myoblast differentiation., *Nutr. Biochem.*, 7 (1996) 670–676.
57. R.S. MacDonald, L.C. Wollard-Biddle, J.D. Browning, W.H. Thornton Jr., B.L. O' Dell, Zinc deprivation of murine 3T3 cells by use of diethylenetrinitrilopentaacetate impairs DNA synthesis upon stimulation with insulin-like growth factor-1 (IGF-1)., *J. Nutr.*, 128 (1998) 1600–1605.
58. F. Grummt, C. Weinmann-Dorsch, J. Schneider-Schaulies, A. Lux, Zinc as a second messenger of mitogenic induction Effects on diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and DNA synthesis., *Exp. Cell Res.*, 163 (1986)

191-200.

59. B.L. Vallee, D.S. Auld, Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins., *Biochemistry*, 29 (1990) 5647–5659.
60. S.M. Sheehan, R.E. Allen, Skeletal muscle satellite cell proliferation in response to members of the fibroblast growth factor family and hepatocyte growth factor., *J. Cell Physiol.*, 181 (1999) 499–506.
61. Z. Yablonka-Reuveni, R. Senger, A.J. Rivera, Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats., *J. Histochem. Cytochem.*, 47(1999) 23–42.
62. C.H. Clegg, T.A. Linkhart, B.B. Olwin, S.D. Hauschka, Growth factor control of skeletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in G₁ phase and is repressed by fibroblast growth factor., *J. Cell Biol.*, 105 (1987) 949–956.
63. S.M. Rosenthal, Z.Q. Cheng, Opposing early and late effects of insulin-like growth factor I on differentiation and the cell regulatory retinoblastoma protein in skeletal myoblasts., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92 (1995) 10307–10311.
64. N. Jinno, M. Nagata, T. Takahashi, Marginal zinc deficiency negatively affects recovery from muscle injury in mice., *Biol. Trace. Elem. Res.*, 158 (2014) 65-72.
65. R.H. McCusker, J. Novakofski, Zinc partitions insulin-like growth factors (IGFs) from soluble IGF binding protein (IGFBP)-5 to the cell surface receptors of BC3H-1 muscle cells., *J. Cell Physiol.*, 197 (2003) 388-399.
66. R.H. McCusker, R.L. Mateski, J. Novakofski, Zinc alters the kinetics of

- IGF- II binding to cell surface receptors and binding proteins., *Endocrine*, 21 (2003) 279-288.
67. M. Hershinkel, A. Moran, N. Grossman, I. Sekler, A zinc-sensing receptor triggers the release of interacellular Ca^{2+} and regulates ion transport., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98 (2001) 11749-11754.
68. L. Besser, E. Chorin, I. Sekler, W.F. Silverman, S. Atkin, J.T. Russell, M. Hershinkel, Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus., *J. Neurosci.*, 29 (2009) 2890-2901.
69. U. Gurriaran-Rodriguez, I. Santos-Zas, O. Al-Massadi, C.S. Mosteiro, D. Beiroa, R. Noqueiras, A.B. Crujeiras, L.M. Seoane, J. Senaris, T. Garcia-Caballero, R. Gallego, F.F. Casanueva, Y. Pazos, J.P. Camina, The obestatin/GPR39 system is up-regulated by muscle injury and functions as an autocrine regenerative system., *J. Biol. Chem.*, 287 (2012) 38379-38389.
70. H. Sharir, A. Zinger, A. Nevo, I. Sekler, M. Hershinkel, Zinc released from injured cells is acting via the Zn^{2+} -sensing receptor, ZnR, to trigger signaling leading to epithelial repair., *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 26097-26106.
71. M.H. Nguyen, M. Cheng, T.J. Koh, Impaired muscle regeneration in ob/ob and db/db mice., *The Scientific World J.*, 11 (2011) 1525-1535.
72. C. Cetinkaya, A.R. Sisman, U.M. Camsari, C. Gencoglu, B. Baykara, I. Aksu, N. Uysal, Positive effects of aerobic exercise on learning and memory functioning, which correlate with hippocampal IGF-1 increase in adolescent rats., *Neurosci. Lett.*, 549 (2013) 177-181.

謝辞

本研究を進めるにあたり多くの方々に大変お世話になり心より感謝しております。

レトロウイルスベクターを使用するにあたりKing' College LondonのPeter S. Zammit先生には大変お世話になりました。英語での会話もままならない私を半年間研究室へ受け入れてくださり、実験手技をはじめ研究についての考え方などを学ばせていただきました。また、様々なイベントへご招待していただきイギリスでの生活をストレスなく過ごせるようご配慮いただきました。さらに研究室の皆様には、半年という短い期間でしたが快く受け入れていただき、研究をはじめ様々な面で助けていただいたこと誠に感謝しております。

松田研究室の皆様には多くの助けをいただきました。同期の和田英治氏には研究をはじめ5年間共に研究を進める中で多くの刺激を受け、励ましをいただきました。助教の長田洋輔先生には、松田研究室に所属する以前より分子生物学の研究手法を一から教えていただき、また研究内容について議論していただき大変お世話になり感謝しております。

最後に、博士課程で松田研究室へ所属させていただき以前よりご指導いただいた松田良一先生には大変感謝しております。生物学について全くの素人であった私を快く受け入れてくださり、多くの知識や考えをご教授いただきました。また、海外の研究室への留学や学会参加など多くの機会を与えていただきました。研究に対する姿勢や研究以外にも多くの活動をされているのを間近で拝見し、とても刺激を受け励みとなりました。心より感謝申し上げます。