

## 論文の内容の要旨

### 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

筋衛星細胞は骨格筋の再生に必要不可欠な骨格筋幹細胞である。平静時は細胞増殖を停止した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を発揮する。その後損傷部位を埋め合わせるため増殖、分化し骨格筋は再生される。

筋衛星細胞の活性化を誘導する因子は骨格筋および血清中に含まれる成分が協調的に働いていると考えられているが、その詳細は未解明である。筋衛星細胞活性化機構に対する研究は、休眠状態の筋衛星細胞のモデルである 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は、インスリンや上皮細胞成長因子(epidermal growth factor, EGF)単独ではほとんど誘導されないが、両者を組み合わせる(インスリン/EGF)ことで血清と同程度誘導され、これには細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase, ERK)のリン酸化が必要であると報告されている。

亜鉛は必須ミネラルの一つでありヒト体内に 1.4-2.3g 存在している。そのほとんどが骨格筋と骨に蓄積され両者を合わせると全亜鉛量の 85%以上を占める。亜鉛は細胞生理活性を持ち、特に細胞増殖に関与することが認められている。また骨格筋に対する影響について、亜鉛は骨格筋の単収縮張力向上や筋持久力の向上に関与する。さらに亜鉛含有薬 Z-103 は遺伝性筋原疾患である Duchenne 型筋ジストロフィーの筋機能向上に関与する。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である。

亜鉛は細胞内情報伝達系へ影響する。特にインスリン受容体およびインスリン様成長因

子(insulin-like growth factor, IGF)受容体、EGF 受容体下流の情報伝達系の活性化に影響することから、亜鉛はインスリン/EGF 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。そこで私は生理活性を持つ亜鉛がリザーブ細胞活性化へ影響すると考えた。

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ところ、リザーブ細胞に塩化亜鉛を加えることで増殖細胞に発現する Ki67 と増殖中の細胞核に取り込まれるブロモデオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxy-uridine, BrdU)の陽性細胞の割合が増加したことから、亜鉛はリザーブ細胞活性化の誘導因子であることが分かった。

次にリザーブ細胞活性化における細胞内情報伝達系について検討するため、リザーブ細胞活性化因子のインスリン/EGF による Akt と ERK のリン酸化変化を調べた。その結果、インスリンと EGF によって Akt と ERK はリン酸化した。また両者を組み合わせることによって各々を単独で加えた場合よりも Akt のリン酸化状態が強く維持されることが分かった。そこでリザーブ細胞に塩化亜鉛を加えた時の Akt および ERK のリン酸化変化を検討したところ、塩化亜鉛によって Akt、ERK とともにリン酸化が検出された。

Akt と ERK の活性化はインスリン受容体や IGF 受容体の活性化によって誘導される。そこでインスリン受容体、IGF-1 受容体チロシンキナーゼの阻害剤を使用したところ、亜鉛によるリザーブ細胞活性化を有意に抑制した。亜鉛による 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ため、本研究では IGF-1 受容体が亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に関与すると考えた。詳細を検討するため、C2C12 細胞に対し IGF-1 受容体全長およびキナーゼドメイン欠失型変異体の過剰発現を行い亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対する影響を検討した。その結果、IGF-1 受容体全長過剰発現細胞では BrdU 陽性細胞の割合が有意に増加し、変異体過剰発現細胞では有意に抑制された。以上より亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は IGF-1 受容体に関与していることが示唆された。

IGF-1 受容体の関与について、亜鉛を加えたことによって C2C12 細胞から IGF-1 が放出または分泌された可能性を考え、IGF-1 中和抗体を用いて培養液中の IGF-1 の作用を抑制した。その結果、IGF-1 中和抗体は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。

以上の結果から、私は亜鉛が C2C12 細胞に作用し IGF 産生を促した可能性を考え、亜鉛添加による IGF-1 および IGF-2 の mRNA 転写レベルの変化を RT-PCR によって検討した。ところが亜鉛添加によって IGF-1 および IGF-2 mRNA 転写レベルは減少傾向が認められ、産生は促進されることが分かった。

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。そのため、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、塩化亜鉛とインスリン、EGF、IGF-1 を各々組み合わせその効果を検討した。その結果、すべての組み合わせでリザーブ細胞活性化が相乗的に増加した。また塩化亜鉛とインスリンによる Akt と ERK のリン酸化変化を検討したところ、Akt については両者を組み合わせた場合、各々を単独で加えた時と比較しリン酸化シグナル強度が増強し、長時間維持された。一方 ERK については、リン酸化は検出できたものの組み合わせ

せたことによる変化は認められなかった。

次に、ERK と Akt さらにホスホイノシチド3 キナーゼ(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、哺乳類ラパマイシン標的タンパク質(mammalian target of rapamycin, mTOR)の活性化がリザーブ細胞活性化へ作用するか阻害剤を用いて検討した。その結果、すべての阻害剤によって BrdU 陽性細胞の割合が減少した。これより亜鉛/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。

細胞の増殖はカルシウム依存的に生じる。また、亜鉛の欠乏によって 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。そこで亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化に対するカルシウムイオンの影響を検討した。カルシウムイオンを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)によってキレートしたところ塩化亜鉛/IGF-1 による BrdU 陽性細胞の割合は減少したことから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。

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。亜鉛を添加することで、C2C12 細胞から IGF-1 が分泌または遊離し、それにより近傍細胞の IGF-1 受容体が活性化を受け PI3K/Akt および ERK カスケードが活性化される。また、インスリン、IGF-1、EGF 存在下では、亜鉛は細胞内情報伝達系の活性化を増加させることでリザーブ細胞活性化に協調的に働いている。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た。

亜鉛はリザーブ細胞活性化に影響することが明らかとなったが、その他に細胞分化や増殖にも作用することが報告されている。しかし筋芽細胞に対する細胞外亜鉛の作用は不明である。

そこで C2C12 細胞の分化に対する亜鉛の影響について検討したところ、亜鉛を加えた細胞で筋管細胞の形成抑制が観察された。また亜鉛添加により myogenin 陽性細胞の割合、Fusion Index は有意に減少したことから、亜鉛は C2C12 細胞の分化を抑制することが分かった。

亜鉛による C2C12 細胞の分化抑制作用は、細胞の増殖が促進したために分化への移行が妨げられたことが原因であると考えた。そこで、増殖中の C2C12 細胞に塩化亜鉛を加え細胞増殖への影響を検討したところ、塩化亜鉛によって BrdU および 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)の取り込みが有意に増加し、インスリンを組み合わせた際にはさらに増加した。以上の結果から、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考えている。

筋衛星細胞の活性化と増殖は筋再生の初期に起こる。本研究で、亜鉛はリザーブ細胞活性化と C2C12 細胞増殖を促進することが分かった。そのため亜鉛は筋再生促進に貢献できると推察された。