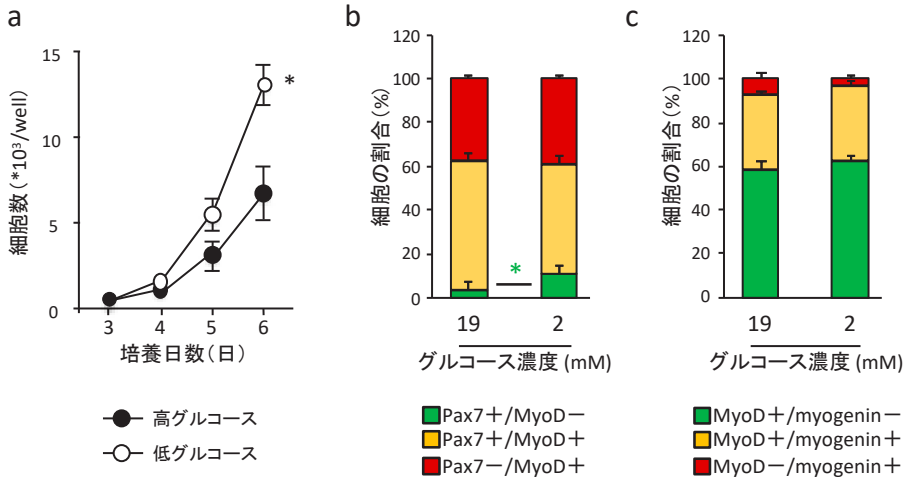
119　高濃度の糖が筋萎縮を促進させる機序の解明	古市　泰郎

【目的】骨格筋は損傷しても速やかに修復することのできる再生能力に富んだ組織である。筋再生の主役は骨格筋の体性幹細胞であるサテライト細胞である。サテライト細胞は損傷刺激を受けると活性化し、増殖、分化を経て筋線維を修復する。サテライト細胞の機能は筋再生のみならず、筋量の維持に重要であることから、その機能調節機序の理解が求められている。我々はこれまで、マウスの骨格筋から採取したサテライト細胞を培養し、その増殖能力を評価できるアッセイ系を構築してきた。その過程で、サテライト細胞はグルコース濃度の高い環境におかれると増殖能力が低下することを発見した。細胞増殖にはエネルギーが必要なため、ほとんどの細胞の場合、グルコースは増殖を促進させるように働き、枯渇すれば細胞は死滅してしまう。しかしサテライト細胞の場合は逆で、グルコースが多いほど増殖が抑制され、グルコースが少ないほど増殖が活発になる。以上の知見から、血糖値の高い疾患である糖尿病で骨格筋が萎縮するのは、高血糖によってサテライト細胞の増殖能力が低下するためであるという仮説が立てられたが、その機序は明らかにされていない。本研究の目的は、高濃度のグルコースがサテライト細胞の増殖力を抑制する分子機序を解明することである。

【方法】マウスの骨格筋（長指伸筋）から筋線維を単離し、酵素処理によってサテライト細胞を播種した。高グルコース培地（最終濃度 19 mM）と低グルコース培地（最終濃度 2 mM）をそれぞれ調製し、グルコース濃度の異なる条件で培養した。培養 3、4、5、6 日目に細胞を 4%PFA で固定し、筋分化のステージを同定するためにそれぞれの段階のマーカー・タンパク質の免疫染色を行った。また、エネルギー・センサーである AMP キナーゼ（AMPK）の関与を検証するために、AMPK 活性化薬である AICAR を添加し、AMPK のリン酸化と細胞増殖を評価した。さらに、グルコースがサテライト細胞の増殖および自己複製に及ぼす影響の分子機序を明らかにするために、培養 6 日目の細胞から RNA を回収し、RNA シーケンス解析を行った。

【結果】低グルコースで培養すると 6 日目の時点で高グルコース条件より細胞数が有意に増加し、高濃度のグルコースは細胞の増殖を抑制することが示された。また、Pax7 と MyoD を共染色した結果、Pax7 陽性かつ MyoD 陰性の細胞集団の割合が、高グルコースより低グルコース条件で有意に増加した。AICAR を 200 μM の濃度で高グルコース培地に添加し 6 日間培養したところ、AMPK のリン酸化の上昇が認められた。しかしながら、低グルコースで培養した細胞では AMPK のリン酸化の上昇が確認されなかった。また、同条件のサンプルを用い、培養 6 日目の細胞数を計測した結果、通常培養と AICAR 添加培養で細胞数に差は認められなかった。すなわち、低グルコース培養で生じるサテライト細胞の増殖亢進は、AMPK を薬理的に活性化しても再現されることはなかった。培養 6 日目の細胞で RNA シーケンス解析を行った結果、グルコース濃度で発現量が 2 倍以上変化する遺伝子を 1,207 個同定した。

グルコース濃度によるサテライト細胞の増殖と運命決定の変化



119. 高濃度の糖が筋萎縮を促進させる機序の解明

古市　泰郎

*首都大学東京 人間健康科学研究科 運動分子生物学研究室

Key words：骨格筋，サテライト細胞，糖尿病，筋萎縮

緒　言

糖尿病は血糖値（血中グルコース濃度）が高くなる疾患で、最近は、骨格筋が萎縮することのリスクが注目されている。糖尿病罹患者は健常者よりも加齢による筋萎縮の程度が 30%も大きく［1]、重度の筋萎縮は、単に日常生活に支障を来すだけでなく、ガンに代表される種々の疾病リスクを高めることが知られている。また、骨格筋は血中グルコースの最大の消費器官であるため、筋萎縮はグルコースの処理能力の低下を招き、糖尿病がさらに悪化するという悪循環が繰り返される。そのため、筋萎縮を抑制することで糖尿病および合併症の進行を抑えるという、新たな治療方法も提唱されている。

骨格筋は常に傷害を受けているが、優れた再生能力を備えているため、筋量を維持することができる。その主役が、骨格筋の体性幹細胞であるサテライト細胞である。自らが付着している近辺の筋細胞が傷害を受けると、サテライト細胞はいったん増殖して数を増やし、その後、傷害部位を埋めるように融合し筋細胞の一部となる（分化する）ことで修復する。サテライト細胞の増殖能力と融合・分化能力は加齢と伴に低下するため、高齢者では筋再生が不十分となって筋萎縮が生じやすくなる。我々はこれまで、マウスの骨格筋から採取したサテライト細胞を培養し、その増殖能力を評価できるアッセイ系を構築してきた。その過程で、サテライト細胞はグルコースが多い環境におかれると増殖能力が低下することを発見した。細胞増殖にはエネルギーが必要なため、ほとんどの細胞の場合、グルコースは増殖を促進させるように働き、枯渇すれば細胞は死滅してしまう。しかしサテライト細胞の場合は逆で、グルコースが多いほど増殖が抑制され、グルコースが少ないほど増殖が活発になる（未発表）。以上の知見から、糖尿病患者で骨格筋が萎縮するのは、高血糖によってサテライト細胞の増殖能力が低下するためであるという仮説が立てられたが、その機序は明らかにされていない。本研究の目的は、高濃度のグルコースがサテライト細胞の増殖力を抑制する分子機序を解明することである。糖尿病が筋萎縮を促進させる機序を明らかにすることで、糖尿病治療を見据えた運動処方の確立と治療薬の開発に発展させる。

方　法

1.　サテライト細胞の初代培養

C57BL/6 マウス（6～15 週齢）から、長指伸筋を摘出した。摘出骨格筋を 0.2% Collagenase Type 1 溶液中で、120 分間 37℃で振とうした。酵素処理後の骨格筋をパスツールピペットでピペッティングし、単一筋線維にほぐした。その後、筋細胞以外の組織片を取り除いて単一筋線維のみを回収し、Accutase で 10 分間酵素処理した。増殖培地に酵素処理後の筋線維を懸濁し、それを 24 well 培養プレートに播種した。播種した線維は、37℃、5% CO_2に保たれたインキュベーター内で培養した。増殖培地は 30% volume のウシ胎児血清（FBS）を含む DMEM を基本組成とした。DMEM は 4.5 g/L と 0.0 g/L のグルコース濃度のものを用い、それぞれ高グルコース培地（最終濃度 19 mM）と低グルコース培地（最終濃度 2 mM）を調製した。低グルコース培地の DMEM にはグルコースは含まれていないものの、FBS にはグルコースが含まれていた。培養 3 日目以降、24 時間毎に増殖培地を交換し、6 日間培養した。

*現在の所属：東京都立大学 人間健康科学研究科 運動分子生物学研究室

2. 細胞数の計測

筋線維を 24 well plate へ、1 well につき 20 本播種した。培養 3 日目、4 日目、5 日目、および 6 日目に、細胞を 4% パラホルムアルデヒド（PFA）溶液で固定し、0.2μg/ml の DAPI（4',6-Diamidino-2-Phenylindole）溶液で細胞核を染色した。染色後のサンプルを BZ-X710（Keyence）で観察・解析し、DAPI 陽性細胞数を計測した。

3. 免疫染色

上記と同様の方法で細胞を 6 日間培養し、PFA 溶液で固定した。細胞を洗浄した後、細胞を 10% Goat 血清溶液あるいは 10% BSA 溶液に浸し、室温で 30 分間ブロッキングした。その後、標的のタンパク質特異的な一次抗体を 4℃で一昼夜反応させた。Pax7 は休止期状態にある細胞、MyoD は活性化した細胞、そして myogenin は筋分化に入った細胞のマーカーとして用いた。二次抗体にはマウス IgG 抗体とウサギ IgG 抗体を用い、室温で一時間反応させた。二次抗体を洗浄後、0.2μg/mL の DAPI 溶液で細胞を浸し、細胞核を染色した。染色後のサンプルを BZ-X710（Keyence）で観察・解析し、各タンパク質の陽性細胞数を計測した。

4. ウエスタンブロッティング

6 日間培養した細胞に氷上で Lysis buffer を加え、セルスクレイパーで細胞を素早く回収した。これを超音波破砕機でホモジェナイズし、遠心（13,000 g、15 min、4℃）の後、上清を回収して細胞抽出液とした。タンパク質量 15μg のサンプルを SDS-PAGE によって分離し、ゲルから PVDF メンブレンにタンパク質を転写した。メンブレンは 2.5% BSA／スキムミルク溶液で、1 時間室温にて振とうさせ、Phospho-AMPK 抗体およびβ-actin 抗体を 4℃で一昼夜反応させた。続いて二次抗体（ウサギ IgG 抗体）での反応を行い、ECL 試薬を用いて化学発光シグナルを検出した。

5. RNA シーケンス解析

筋線維を 4 well plate へ、1 well につき 100 本播種した。高グルコースと低グルコース培地でサテライト細胞を 6 日間培養し、PureLink RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて RNA を回収した。次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行って全ての転写産物を読み、さらに発現量を定量した（DNA チップ研究所に委託）。

結果および考察

1. グルコース濃度がサテライト細胞の運命決定機構に及ぼす影響

図 1a に示された通り、低グルコースで培養すると 6 日目の時点で細胞数が高グルコース条件よりも有意に増加し、高濃度のグルコースは細胞の増殖を抑制することが示唆された。また、Pax7 と MyoD を共染色した結果、Pax7 陽性かつ MyoD 陰性の細胞集団の割合が、高グルコースより低グルコース条件で有意に増加したことが示された（図 1b）。一方で、MyoD および myogenin の染色をしたところ、活性化期（MyoD のみ陽性）や分化初期（myogenin のみ陽性）にある細胞数の割合には、差が認められなかった（図 1c）。

2. AMPK の活性化がサテライト細胞の増殖に及ぼす影響

グルコース濃度の増減が細胞増殖を制御する機序を調べるため、AMP キナーゼ（AMPK）に注目した。AMPK は細胞内の ATP/AMP レベルの低下（つまりエネルギーの低下）によって活性化するタンパク質で、細胞内のエネルギー・センサーとして知られる［2］。AICAR を 1、10、200μM の濃度で高グルコース培地に添加し、6 日間培養した。200μM の AICAR によって AMPK のリン酸化の上昇が認められた（図 2a）。この際、低グルコースで培養した細胞においても同様に測定したが、AMPK のリン酸化の上昇は確認できなかった（図 2a）。したがって、低グルコース刺激はサテライト細胞の AMPK 活性を上昇させる刺激にはなっていないことが示された。

同条件のサンプルを用い、培養 6 日目の細胞数を計測した結果、通常培養と AICAR 添加培養で細胞数に差は認められなかった（図 2b）。すなわち、低グルコース培養で生じるサテライト細胞の増殖亢進は、AMPK を薬理的に活性化しても再現されることはなかった。

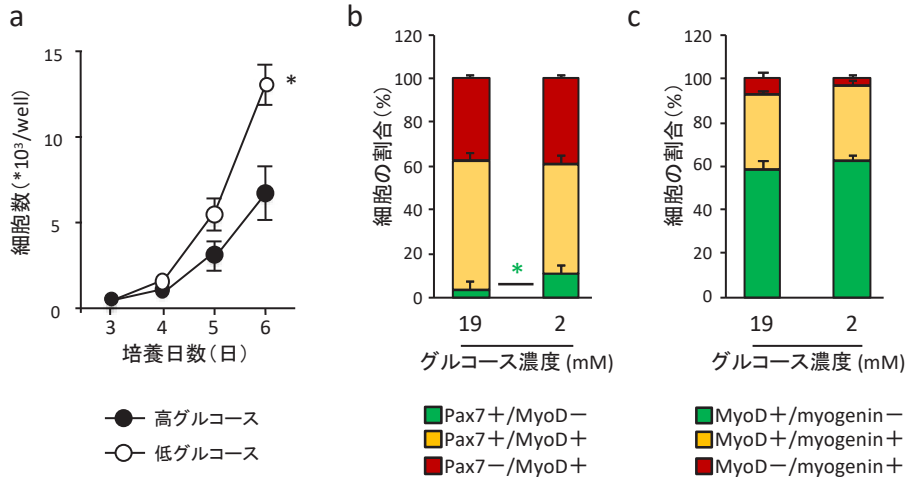


図 1.　グルコース濃度によるサテライト細胞の増殖と運命決定の変化

a)　サテライト細胞を高グルコース（19 mM）と低グルコース（2 mM）の増殖培地で培養した際の細胞数の変化を示した。培養 6 日目において、低グルコース条件の方が高グルコースよりも有意に細胞数は増加していた。統計解析は Student's t-test を用いた（* : $p < 0.05$）。

b)　培養 6 日目のサテライト細胞を固定し、Pax7 および MyoD 抗体で免疫染色後、細胞数を計測した。Pax7＋/MyoD－細胞の細胞集団の割合は、低グルコース（2 mM）で有意に増加した。統計解析は Student's t-test を用いた（* : $p < 0.05$）。

c)　培養 6 日目の筋サテライト細胞を固定し、MyoD および myogenin 抗体で免疫染色後、細胞数を計測した。いずれの細胞集団もグルコース濃度でその割合は変化しなかった。

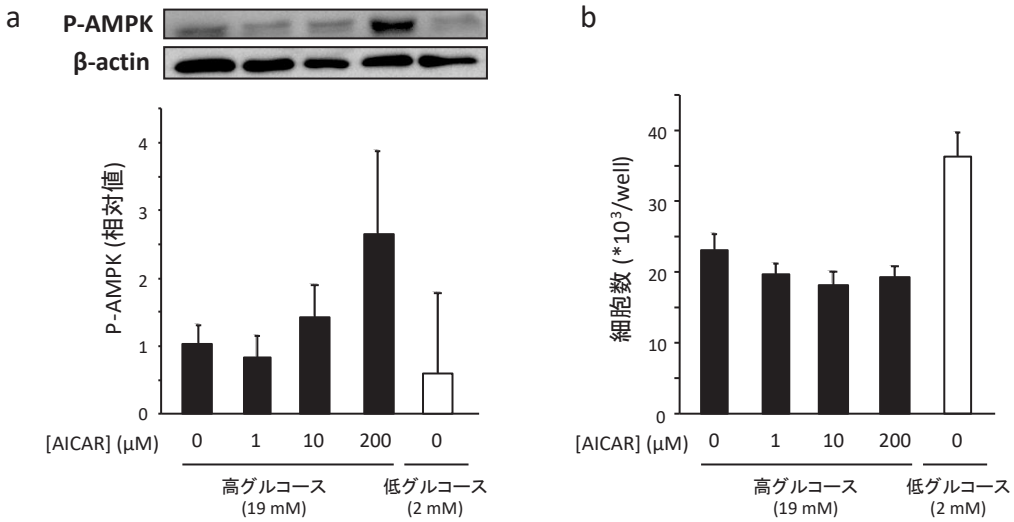


図 2.　AMPK の活性化が細胞増殖に及ぼす影響

a)　AMPK の活性化剤である AICAR を異なる濃度で高グルコース培地に添加し、6 日間培養した。ウエスタンブロッティングによって AMPK のリン酸化を測定したところ、200 μM の条件で上昇傾向が見られた。低グルコース条件では AMPK のリン酸化は上昇しなかった。

b)　同様の条件で培養した細胞を固定し、細胞数を計測した。AMPK のリン酸化が上昇した 200 μM の条件では、細胞数は増加していなかった。低グルコース条件では細胞数は増えていた。

3. RNA シーケンスによる網羅的解析

サテライト細胞の増殖がグルコースに応答して変化する機序を探るために、RNA シーケンスによる網羅的解析を行った。高グルコースと低グルコースでそれぞれ 6 日間培養したサテライト細胞から、RNA を抽出した。次世代シーケンサーによる RNAseq 解析を行って全ての転写産物を読み、さらに発現量を定量した。グルコース濃度によって発現量が 2 倍以上変化した遺伝子は 1,207 個認められた。また、全体の 5%にあたる上位 30 個の遺伝子は約 5.7 倍（LogFC = 2.5）以上変化したため、特に重要な遺伝子として考えられる。今後はこれらの分子からグルコース応答性の細胞増殖制御因子を絞り込む。

細胞にとってグルコースは主要なエネルギー源の一つで、高濃度グルコースは細胞の増殖を促進させると広く認識されている［3］。しかし、骨格筋の組織幹細胞であるサテライト細胞にとっては、低濃度のグルコース条件下の方が細胞増殖は高まることが明らかとなった。また、活性化したサテライト細胞が再び休止期に戻る自己複製は、低濃度グルコースによって促進し、細胞外のグルコース濃度はサテライト細胞の運命制御にも寄与することが示された。

通常の細胞培養で用いられる高グルコース培地のグルコース濃度は、生体内の血中濃度に換算すると重篤な糖尿病患者のそれに相当する。実際に、糖尿病は骨格筋の再生低下や加齢による筋萎縮を悪化させるリスクファクターの一つと報告されている［4, 5］。サテライト細胞は高濃度の糖で増殖能力と自己複製能力が低下するという本研究での発見は、糖尿病誘発性の筋萎縮の原因であると推察される。その分子機構に AMP キナーゼによる情報伝達機構は関与していなかったが、RNA シーケンス解析によって多くの遺伝子発現の変化が伴うことが分かった。その分子機構を解明することは糖尿病による筋萎縮の原因究明と治療方法の開発につながると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京都立大学運動分子生物学研究室の川端有紀氏、石田瑞稀氏、眞鍋康子准教授、藤井宣晴教授である。また、東京大学大学院農学生命科学研究科獣医薬理学教室の堀正敏教授には、次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析においてご助力いただき、感謝致します。

文　献

1） Buford TW, Anton SD, Judge AR, Marzetti E, Wohlgemuth SE, Carter CS, Leeuwenburgh C, Pahor M, Manini TM. Models of accelerated sarcopenia: critical pieces for solving the puzzle of age-related muscle atrophy. Ageing Res Rev. 2010 Oct;9(4):369-83. Epub 2010 May 14. PMID: 20438881 DOI: 10.1016/j.arr.2010.04.004.

2） Mounier R, Théret M, Lantier L Foretz M4, Viollet B. Expanding roles for AMPK in skeletal muscle plasticity. Trends Endocrinol Metab. 2015 Jun;26(6):275-86. Epub 2015 Mar 26. PMID: 25818360 DOI: 10.1016/j.tem.2015.02.009.

3） Ito M, Makino N, Matsuda A, Ikeda Y, Kakizaki Y, Saito Y, Ueno Y, Kawata S. High Glucose Accelerates Cell Proliferation and Increases the Secretion and mRNA Expression of Osteopontin in Human Pancreatic Duct Epithelial Cells. Int J Mol Sci. 2017 Apr 12;18(4). pii: E807. PMID: 28417915 doi: 10.3390/ijms18040807.

4） Fu X, Zhu M, Zhang S, Foretz M, Viollet B, Du M. Obesity Impairs Skeletal Muscle Regeneration Through Inhibition of AMPK. Diabetes. 2016 Jan;65(1):188-200. Epub 2015 Sep 17. DOI: 10.2337/db15-0647.

5） Theret M, Gsaier L, Schaffer B, Juban G, Ben Larbi S, Weiss-Gayet M, Bultot L, Collodet C, Foretz M, Desplanches D, Sanz P, Zang Z, Yang L, Vial G, Viollet B, Sakamoto K, Brunet A, Chazaud B, Mounier R. AMPKα1-LDH pathway regulates muscle stem cell self-renewal by controlling metabolic homeostasis. EMBO J. 2017 Jul 3;36(13):1946-1962. Epub 2017 May 17. DOI: 10.15252/embj.201695273.