

論文の内容の要旨

論文題目 インスリン様成長因子とビタミン C は
低温における骨格筋細胞の分化を促進する

氏 名 島 亜衣

常時 37°C前後の深部体温を維持する恒温動物においても、体表面や四肢末端では体温が低下する。本研究では、このような低温環境が細胞の分化に与える影響について、骨格筋細胞を用いて調べた。骨格筋組織は全身に分布するため、生体内でも実際にさまざまな温度変化に曝されることが予想される。また、筋分化制御因子 (muscle regulatory factor; MRF) などの転写因子レベルで分化制御機構が明らかになっているため、細胞分化の温度感受性に関する研究モデルとして適当であると考えた。

マウス筋芽細胞株 C2C12 を 38°Cで増殖させた後、分化を誘導して 30°Cで培養すると、筋管形成が抑制された。30°Cでは MRF のうち MyoD は発現していたが、myogenin の発現が転写段階で大幅に抑制されていた。30°Cで培養すると、MRF の正の制御因子である E2A は 38°Cと同様に発現したが、38°Cでは分化に伴って減少する MRF の負の制御因子、分化抑制因子 Id3 の発現が高レベルで維持されていた。また、38°Cでは分化に伴って発現が増加する、骨格筋分化の制御に関与するマイクロ RNA (miR-1, -133a, -181a, -206) が 30°Cではほとんど発現しなかった。すなわち、30°Cでは骨格筋細胞の分化が著しく抑制されることが示された。

そこで、30°Cでも Id3 の発現が低下して筋分化が進行する条件を探索した。通常培養温度で myogenin 発現を促進させることが報告されているインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor; IGF) -I とビタミン C をそれぞれ 100 ng/ml と 200 μ M で培養液に添加したところ、30°Cでも Id3 の発現が低下し、myogenin が発現して 38°Cと同様に多核の筋管細胞が形成された。IGF-I は 30°Cでの myogenin 発現に対して濃度依存的に作用した。ただし、分化初期のみではなく、長期的な添加を必要とした。なお、IGF-II も 30°Cでの myogenin 発現と筋管形成を促進した。IGF-I と

ビタミン C の添加は骨格筋分化に関与するマイクロ RNA の発現も増加させた。これらの結果は、30°Cにおける筋分化抑制の原因が IGF とビタミン C によってレスキュー可能な特定段階の阻害であることを示唆する。IGF-I とビタミン C による筋分化促進作用は 30°C以下でも認められ、これらを同時に添加すると C2C12 はマウス深部体温より約 10°C低い 28°Cでも筋管細胞を形成し、25°Cでも myogenin を発現した。

次に、IGF-I 過剰発現マウス（以下 IGF-I Tg マウス）の長趾伸筋を用いて単一筋線維培養を行ない、筋衛星細胞の分化に対する低温の影響を調べた。IGF-I Tg マウスと野生型マウスから単離した筋線維をビタミン C は加えずに 38°Cと 30°Cで培養すると、どちらの温度でも IGF-I Tg マウス筋衛星細胞の myogenin 発現は野生型マウスよりも促進された。ただし、30°Cではほとんど myogenin を発現しなかった C2C12 とは異なり、30°Cで培養した野生型マウス筋衛星細胞は一定の割合で myogenin を発現していた。これは、分化した筋細胞自身が IGF やビタミン C のように低温でも myogenin 発現を促進する因子を分泌したためではないかと考えた。そこで、38°Cで分化させた C2C12 の培養上清を用いて 30°Cで C2C12 を培養したところ、myogenin の発現が促進されることを認めた。これらの結果から、生体内には、局所的に体温が低下しても筋分化が阻害されないように、温度低下に対する耐性を高めるメカニズムが存在することが示唆された。

これらの 30°Cにおける筋分化抑制と、IGF-I とビタミン C によるレスキュー効果は、マウス骨格筋細胞だけではなくヒト骨格筋細胞でも同様に認められた。従って、哺乳類の筋細胞に共通した現象である可能性が高いと考えられる。

最後に、低温での筋分化におけるミトコンドリアの役割について調べた。骨格筋細胞は分化に伴って酸化的リン酸化依存的なエネルギー産生に移行することが報告されており、多くの先行研究がミトコンドリアの機能阻害によって筋分化が抑制されることを示している。電子伝達系のシトクロム c 酸化酵素 (cytochrome c oxidase; COX) サブユニット I の発現を調べると、38°Cでは分化に伴って発現が増加したが、30°Cでは発現が低かった。また、蛍光試薬 JC-1 を用いてミトコンドリア膜電位を可視化したところ、30°Cでは膜電位の低い細胞が多かった。しかし、IGF-I とビタミン C を培養液に添加すると COX サブユニット I の発現とミトコンドリアの膜電位が回復したことから、低温におけるこれらの筋分化促進作用がミトコンドリアの機能回復を介することが示唆された。

本研究は、骨格筋細胞の分化に必須である筋分化制御因子の発現やミトコンドリアの機能に、温度が大きな影響を与えることを明らかにした。骨格筋細胞が温度を感知する機構や下流の情報伝達経路については未だ明らかになっていないが、IGF やビタミン C などの生体因子が低温の影響をキャンセルすると示したことは、今後、温度という物理的シグナルがいかにして化学的シグナルに変換されるのかを知る上で、大きな手掛かりとなると考える。本研究が、これから発展するであろう「温度生物学」の端緒となることを期待したい。