

運動負荷を評価するためのマウス筋細胞の分化誘導と負荷条件の検討

Investigation of the Condition of Cell Culture and Induction for Estimating the Exercise Intensity in Murine Muscle Cell

内川拓也*・杉本優子**・羽野紗希***・小谷幸敏****

Takuya Uchikawa, Yuko Sugimoto, Saki Hano and Yukitoshi Kodani

* 食品開発研究所 農産食品・菓子担当、** 食品開発研究所 水畜産食品担当、

** 食品開発研究所 旧バイオ技術科、**** 食品開発研究所

実験動物を用いた運動負荷試験における評価を簡易・安価に評価できるための細胞培養評価系の開発を目的の1つとして、マウス由来筋芽細胞を用いた検討を行った。筋原繊維の構成単位であり評価細胞となる筋管細胞への分化誘導化と擬似的運動負荷手法に関する基礎条件について試験を実施した。筋芽細胞に分化誘導処理を行い、筋管細胞への誘導が認められたが、誘導化された細胞割合が低かったため、誘導化が高い細胞株のクローニングを行った。培養細胞へ擬似的運動負荷を与える手段として、ATP産生を促す働きがあるAMP活性化プロテインキナーゼ活性化剤(AICAR)による化学的負荷を考え、無毒性なAICARの投与濃度域について細胞毒性試験を実施した。AICAR濃度4mMまでの無毒性が確認できた一方で、細胞への負荷状態については有望な生体マーカーの検証と選択作業などが次の検討課題である。

1 はじめに

近年、超高齢化社会を向かえた日本では高齢者の加齢に伴う身体機能低下は介護の観点からも大きな社会問題となっている¹⁾。都市部への人口集中が進む一方で、過疎化が進む地域の高齢者に関わる問題はより重要な課題である²⁾。高齢者に限らず、私たちが医療や介護に依存せず自立した生活を送る、いわゆる健康寿命、を長く維持していくためには運動習慣は不可欠な要素として考えられ、適度な運動は働き世代での生活習慣病の予防をはじめ、健全な歩行機能の維持や認知機能の維持に関与していることが報告されている³⁾。しかし、運動不足や運動習慣が少ない人にとって運動による急な身体への負荷は筋肉や関節など運動器の不調に繋がり、運動習慣維持の障害要因になる場合がある。

運動機能の強化や補助する働きを持つ機能性成分はいくつか知られており⁴⁾、日常の食生活での摂取は運動習慣維持に役立つと考えられている。これら機能性成分の運動機能に対する有効な知見のほとんどは、実験動物やヒトを対象とした試験において検証がなされ

ている⁶⁾。しかしながら、これら試験の実施には高価な費用や専用設備の必要性、動物愛護に関する倫理的観点の問題もあり、大企業等の限られた事業者しか行うことができない現状がある。そのため、われわれは動物実験等よりもコストや設備のハードルが低くて取り組みやすく、近年、技術進歩により実用性が一層高まっている評価技術手法として細胞培養法に着目した。細胞培養による筋肉組織への運動負荷の試みはすでに大学等で研究が進められているが⁵⁾、いまだ簡便かつ実用的な評価手法は見出させていない。

そこで本研究では、実験動物の運動負荷を代替評価できる細胞系を基本に考え、マウス由来筋芽細胞C₂C₁₂を用いて、運動機能のうち運動負荷による筋組織における筋損傷を対象とした簡易かつ安易な機能性成分の評価が可能な細胞培養系の開発を目的に検討を行った。

2 実験方法

2.1 細胞と培養

細胞株は(国研)理化学研究所バイオリソース研究

センターより購入したマウス骨格筋由来筋芽細胞 C₂C₁₂株を使用した。培養は37°C、湿度95%、5% CO₂で行った。増殖培地には10%ウシ胎児血清 Fetal Bovine Serum (FBS) を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM 培地) を用い、分化誘導培地には2%ウマ血清 Horse Serum (HS) を含む DMEM 培地を使用した⁷⁾。筋芽細胞からの筋管細胞への分化誘導処理は 1 x 10⁴ cells/mL に調製した筋芽細胞 C₂C₁₂ 株を高グルコース (4.5 g/L) の増殖培地で培養し、約 70% コンフルエントに達したら分化誘導培地へ交換して 2 日毎に培地交換を行い、筋管細胞への分化誘導を行った。

2.2 分化誘導細胞の確認

筋管細胞へと分化誘導される細胞の確認方法として、筋細胞における細胞分化マーカーである Myogenin に着目し、1 次抗体に抗マウス抗 Myogenin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社) を用いた細胞染色観察およびウエスタンブロットによる測定を行った⁸⁾。2 抗体抗体には抗ヤギ抗マウス IgG (H + L) Alexa Fluor 546 (Invitrogen 社) を使用した。分化誘導によって形成される筋管細胞を、NADH-Tetrazolium reductase (TR) 法による細胞染色を行い⁹⁾、分化誘導具合を観察した。

2.3 高誘導細胞株のクローニング

高い割合で分化誘導する細胞株を得るために細胞のクローニングを行った。培養した C₂C₁₂ 株を 10 cell/mL に調製し、96-well プレートに 100 μL ずつ接種し細胞 1 個からの培養を行った。増殖した各細胞株を 24-well プレートで増殖させた後に φ35 mm デッシュ 3 枚に移して培養・分化誘導処理を行って、分化誘導状態を NADH-TR 染色法による細胞染色観察から調べた⁹⁾。分化誘導化が高い細胞株の選抜は 2 段階で行い、24-well プレートで増殖した細胞のうち、有望な細胞を一次選抜し、選抜された細胞株を再度、35 mm デッシュに開始細胞密度 1 x 10⁴ cells/mL で培養・分化誘導を行い、細胞染色観察より 2 次選抜を行った。選抜した細胞株は培養液にジメチルスルフォオキシド (DMSO) を添加混和し、-80°C にて保存した。

2.4 細胞毒性試験

培養細胞へ疑似的運動負荷を掛けるために使用する化学物質について、適正な投与濃度域を調べるため細胞毒性試験を行った。試験は WST 法に従い 96-well プレートを用いた系で検討し¹⁰⁾、被験物質として AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) の活性剤である AICAR を使用した。測定にはマイクロプレートリーダー (TECAN 社、infinite F200) を用いて行った。

3 結果と考察

3.1 筋管細胞の形成

図 1 に分化誘導処理による筋管細胞への形成変動を NADH-TR 染色で細胞染色図を示す。

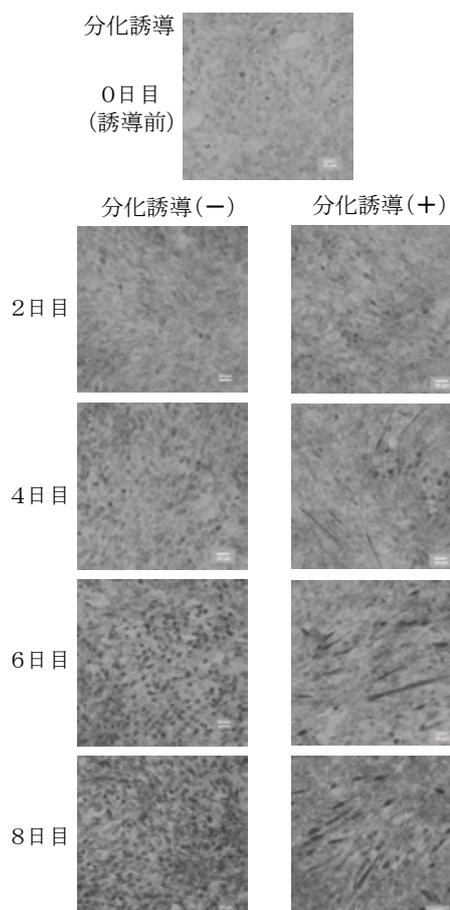


図 1 分化誘導処理による筋芽細胞から筋管細胞の形成

分化誘導処理を行って培養 4 日目より筋芽細胞が融合・多核化して形成される筋管細胞が観察された。当初は分化誘導され細胞の確認手段として、筋芽細胞の

分化初期から中期に発現するタンパク質 Myogenin に着目し、Myogenin 抗体を用いた細胞免疫染色による確認を試みた。誘導 2-4 日目に高い Myogenin の発現を予測したが、本実験において細胞観察からは分化誘導処理による Myogenin 発現を観察できなかつた(図2)。他の確認手段として、分化誘導処理した細胞を回収してタンパク質抽出を行い、SDS-PAGE に供したのち、抗 Myogenin 抗体を用いたウェスタンブロット法 (WB 法) による Myogenin タンパク質の発現確認を行った。しかしながら、WB 法においても分化誘導処理による明確な Myogenin 発現の変化は認められなかつた(データ未掲載)。骨格筋への筋細胞分化は、サテライト細胞 → 筋芽細胞 → 筋細胞 → 筋管細胞 → 筋原繊維 という形成過程で進んでいき、特異的に発現する因子として6つのタンパク質が知られている¹¹⁾。このうち、Myogenin は筋芽細胞から筋管細胞の分化形成時期に特異的に発現するため、発現の一時的な増加を過ぎた後は筋管細胞の形成過程に移行していることが期待される¹²⁾。本研究と同じく C₂C₁₂ 細胞を用いた報告において、分化誘導処理による筋管細胞形成に3~14 日のばらつきがあり、細胞状態や細かな条件によって大きく変動していることも考えられる^{7), 12), 13)}。

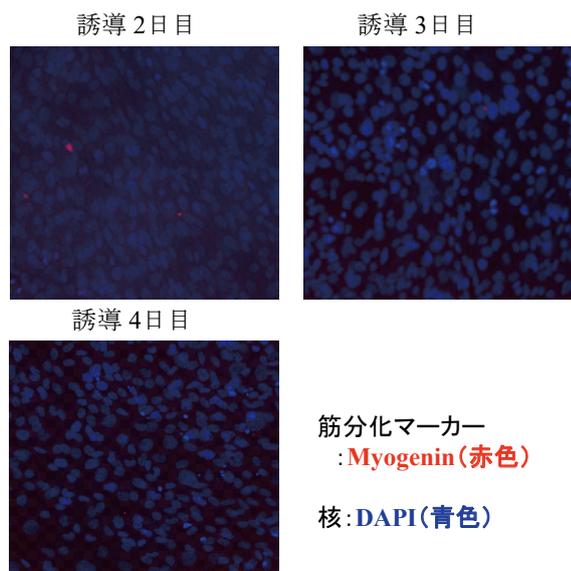


図2 免疫抗体染色による筋分化マーカーの発現確認

今回、筋分化マーカーが観察できなかつた要因について、特に2つの可能性が考えられた。1つは培養における細胞の分化誘導が正常にできておらず Myogenin がほとんど発現していない可能性、2つめは分化誘導処理によって Myogenin がタンパク質発現しているが発現量が少なく検出できていない可能性がある。未染色状態での細胞観察においても細長い筋管細胞の形状はあまり認められなかつたことから、培養した筋芽細胞自体の分化能が低い可能性が考えられた。購入した基準細胞株においても、各細胞によって細胞の分化能に潜在的なバラツキがあることも推測されるため、次に高い分化能を有する筋管細胞株のクローニングを試みた。

3.2 高い筋分化能を有する細胞株の選抜

前述 2.3 の方法に従い、購入した筋芽細胞 C₂C₁₂ 株の中から、高い割合で筋分化する細胞のクローニングを行った。単離培養した 167 種類の細胞株より 29 株を1次選抜し、さらに2次選抜にて最終的に3つの細胞株を選び、-80°Cで保管した。選抜前の細胞での筋分化状態(図1)に比べるとかなり分化状態がよい細胞株が得られた(図3)。この株を用いて筋分化した筋管細胞を作成し、疑似的運動負荷の検討を行うこととした。

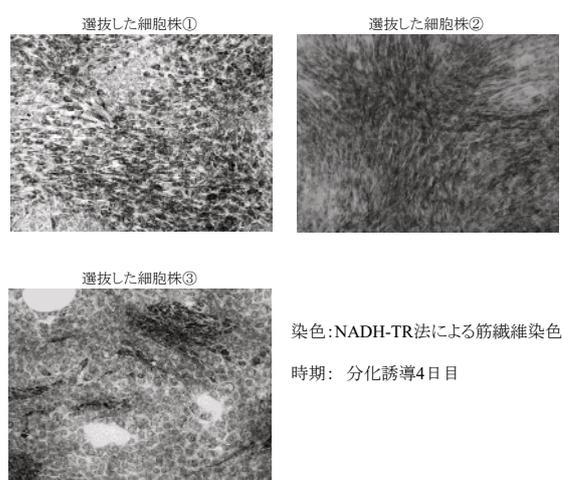


図3 選抜した細胞株を用いた分化誘導処理による筋管細胞形成

3.3 AICARによる細胞毒性への影響

培養細胞に疑似的運動負荷を与える手段として、AMPK 活性の誘導を介して ATP 産生を促す働きがあり、糖尿病治療にも用いられている AICAR に着目した。AMPK 活性は運動時の骨格筋において、組織内に産生される活性酸素種 (ROS) に起因して活性誘導されることが知られている¹⁴⁾。マウスを用いた実験において、AICAR 投与は主に速筋に特異的に AMPK 活性を増加誘導させ、運動時と同様に核内受容体であるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ) を介して細胞の活動能が高い状態にすることができる¹⁴⁾。

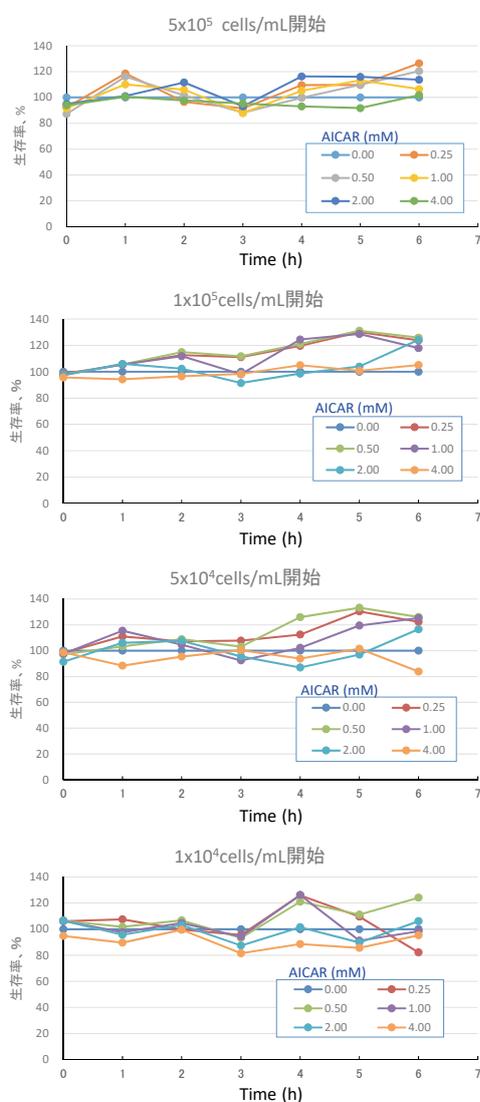


図4 C₂C₁₂細胞株のAICARに対する影響

培養細胞に AICAR を投与した研究は、糖尿病に関係した因子やエネルギー代謝に関するものが多く、投与濃度は 1 mM までの濃度域である^{14)–16)}。本研究では運動負荷に近い状態を想定しているため、より高濃度の AICAR 投与によって細胞への負荷強度を高めることが可能かを検討したいと考えた。そのため、実際に使用する培養細胞株を用いて、AICAR による細胞への毒性を検討し、使用可能な濃度域を調べた。試験は前述 2.4 の方法に従い、被験物質の最終濃度を 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM の 6 段階に設定して曝露 6 時間で行った。また、筋芽細胞の細胞数を 4 段階に設定して試験を実施した。培養した筋芽細胞の生存率から、試験最高濃度 4mM までの濃度域では毒性は認められなかった(図 4)。より高い濃度域や投与手段の違いによる影響など、AICAR 投与に関して更にいくつか検討を行う必要性があると考えられる。また、AICAR 以外の疑似的運動負荷を与える手段として、心筋の心拍増加に用いられる β 作動薬や筋収縮を増大させる作用を有するホスソジェステラーゼ III 阻害剤などの薬剤投与も候補として考えたが、試薬コストもあり、AICAR 処理を第一候補に選定した。また薬物的負荷とは異なる疑似的運動負荷の手段として、低酸素状態や ROS の添加、ヒートショックによる方法を調査した。このうち、低酸素を作り出す手段には塩化コバルトを培地中に添加する方法があり、筋芽細胞において ROS 負荷を誘導させている報告がある¹⁷⁾。しかし細胞負荷指標への検証が少なく、投与濃度も 150 または 200 μ M だけなので、この手法を採用する場合にも細胞毒性試験が必要と考えられる¹⁷⁾。細胞実験において、薬剤による代謝活性の人為的誘導は生物個体の運動時の細胞状態に近づける有望な手段であることから、他の薬剤との組み合わせについても調査・検討を進めていきたいと考える。また使用条件として、細胞に悪影響が出ない範囲での負荷誘導が必須条件となることから、細胞毒性試験は候補物質を選定した際に最初に実施しなければならない試験であると考えられる。

4. おわりに

今回実施した試験において、筋管細胞への分化誘導条件を決定でき、クローニングによって高い割合で分化誘導する細胞株を得ることが出来た。また、擬似的運動負荷については化学的処理による手法としてAICARに着目し、細胞毒性試験から投与濃度域の細胞への安全性を確認することが出来た。しかしながら、本研究において重要な検証項目である細胞への擬似的運動負荷状態などの検討については未だ着手できておらず、負荷状態を判定する生体指標の選定や、他の手段による負荷状態の作成など多くの検討課題を残している。すでに調査を行い別の負荷処理候補についても研究を進める中で、複数の負荷条件を組み合わせることで、より運動時の細胞状態に近い擬似的運動負荷を作り出せる可能性も予測される。最初の大きな到達点と考えられる評価系の構築までには、擬似的運動負荷状態の作成条件を作成した後も、実際に既知食品成分での確認検証などの検討課題が想定される。これらの課題を解決した先に、ようやく実用的な評価系として利用できる段階に近づけると想定され、まだ多く残る検討課題を早くクリアできるように努めていきたい。

文 献

- 1) 牧迫飛雄馬; 老化とフレイル, 理学療法のみ, 10(1), p.3-10(2017).
- 2) 范翔ら; 過疎地域に在住する高齢女性と身体特性, 生活習慣ならびに社会的特性との関係, 生涯スポーツ学研究, 28(1), p.21-30(2014).
- 3) 小原史郎, 松下智之; 運動・スポーツの習慣化・継続化に関する調査研究, 愛知工業大学研究報告, 50, p.58-70(2015).
- 4) 佐藤隆一郎; ロコモーション機能向上に寄与する食品の開発, 生物工学会誌, 95(5), p.252-253(2017).
- 5) 中尾誠ら; 培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用, 生体医工学, 47(6), p.560-565(2009).
- 6) Langone F, et al.; Metformin protects skeletal muscle from cardiotoxin induced degeneration, PLoS One. 9, e114018 (2014).
- 7) Terruzzi I, et al.; Ranolazine promotes muscle differentiation and reduces oxidative stress in C2C12 skeletal muscle cells, Endocrine, 58, p.33-45(2017).
- 8) Cell Signaling Technology; A guide to successful Western Blotting, p.13(2013).
- 9) 西野一三; 総説筋病理の基本, 51(9), p.669-676 (2011).
- 10) 同人化学研究所; DOJINDO 2018/2019 プロトコル 31st Edition, p.1-6(2018).
- 11) Cervelli M, et al.; Skeletal Muscle Pathophysiology: The Emerging Role of Spermine Oxidase and Spermidine, Med. Sci., 14;6(1), e14(2018).
- 12) Horie M, et al.; Cytoprotective Role of Nrf2 in Electrical Pulse Stimulated C2C12 Myotube, PLoS One, 14;10(12), e0144835(2015).
- 13) Maarman GJ, et al.; Melatonin protects against uric acid-induced mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and triglyceride accumulation in C2C12 myotubes, J. Appl. Physiol., 122(4), p.1003-1010(2017).
- 14) Sasaki T, et al.; Role of AMPK and PPAR γ 1 in exercise-induced lipoprotein lipase in skeletal muscle, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 306(9), e1085-1092(2014).
- 15) Kurauti MA, et al.; Acute Exercise Improves Insulin Clearance and Increases the Expression of Insulin-Degrading Enzyme in the Liver and Skeletal Muscle of Swiss Mice, PLoS One, 11(7), e0160239(2016).
- 16) Troy L. Merry, et al.; Nuclear factor erythroid - derived 2 - like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise - induced mitochondrial biogenesis and the anti - oxidant response in mice, J. Physiol., 594(18), p.5195-5207(2016).
- 17) Rui Chen, , et al.; Necrostatin-1 protects C2C12 myotubes from CoCl₂-induced hypoxia, Int. J. Mol. Med., 41(5), p.2565-2572(2018).