

別紙 2

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 大橋和也

本研究は、筋衛星細胞に対する亜鉛の作用および作用機序に関して筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて検討した研究である。

筋衛星細胞は基底膜と形質膜の間に位置する骨格筋再生に必要不可欠な細胞で、通常は細胞増殖を停止した休眠状態で存在する。しかし、損傷等の刺激が加わると増殖を開始する。休眠状態から増殖細胞への移行は筋衛星細胞の活性化と呼ばれ、活性化した筋衛星細胞は増殖、分化し骨格筋を再生する。その機構の解明には休眠状態の筋衛星細胞モデルとして主に C2C12 細胞のリザーブ細胞を用いた研究が行われているが、未解明な点が多い。当研究室の先行研究により、リザーブ細胞は、インスリンや上皮細胞成長因子(epidermal growth factor, EGF)の組み合わせ(インスリン/EGF)により活性化されることが明らかとなっている。

一方、必須ミネラルの亜鉛は 70 キログラムのヒト体内に 2 グラム程度存在し、そのほとんどは骨格筋と骨に蓄積されている。亜鉛の最大保有組織の一つである骨格筋に対して、亜鉛の作用は多数報告されているが、筋衛星細胞に対する影響はそのほとんどが不明である。

亜鉛はインスリン受容体、インスリン様成長因子(insulin-like growth factor, IGF)受容体および EGF 受容体下流の情報伝達系活性化にも影響を及ぼすことから、亜鉛はリザーブ細胞の活性化を誘導し得ると考えられる。そこで、本論文の第 2 章ではリザーブ細胞活性化に対する亜鉛の影響を検討した。

リザーブ細胞を、塩化亜鉛を含む培養液を用いて培養したところ、増殖細胞の指標である Ki67 陽性細胞とブロモデオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxy-uridine, BrdU)を取り込んだ細胞の割合が増加した。したがって、亜鉛はリザーブ細胞活性化の誘導因子であることが示唆された。亜鉛によるリザーブ細胞活性化機構を検討するため、まずインスリン/EGF によりリザーブ細胞が活性化される際の細胞内情報伝達系変化を Akt と細胞外シグナル調節キナーゼ(extracellular signal-regulated kinase, ERK)のリン酸化状態に着目し検討した。その結果、インスリンと EGF によって Akt と ERK はリン酸化され、インスリン/EGF では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示された。次にリザーブ細胞に塩化亜鉛を加えた時の Akt および ERK のリン酸化の変化を検討したところ、塩化亜鉛によって Akt、ERK とともにリン酸化されていた。

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 受容体のチロシンキナーゼに対する阻害剤を使用したところ、(1)

亜鉛によるリザーブ細胞活性化は有意に抑制された。次に亜鉛誘導性の Akt 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、IGF-1 受容体に着目し

た。そこでリザーブ細胞に対し、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による効果を検討した。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。これらの結果から亜鉛誘導性リザーブ細胞活性化は IGF-1 受容体が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は、亜鉛を加えたことにより C2C12 細胞から IGF-1 が培養液中に放出または分泌された可能性が高いと考えられた。そこで、まず IGF-1 中和抗体を用いて培養液中の IGF-1 の作用を抑制したところ、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。次に、RT-PCR によって IGF-1 および IGF-2 mRNA の転写に及ぼす亜鉛の影響を検討したところ、亜鉛添加によってそれぞれの mRNA レベルに減少傾向が認められた。これらの結果から、亜鉛を加えたことにより C2C12 リザーブ細胞の IGF 産生が促進されたのではなく、細胞内に蓄積されていた IGF が放出され、受容体に作用していると考えられた。

亜鉛は細胞に対しインスリンまたは EGF に類似した作用を示す。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、それぞれ片方の作用を補完すると考えた。そこでリザーブ細胞に対し、塩化亜鉛とインスリンあるいは EGF、IGF-1 を各々組み合わせたところ、すべての組み合わせでリザーブ細胞活性化は相乗的に増加した。また塩化亜鉛とインスリンの組み合わせ(亜鉛/インスリン)による情報伝達系変化はインスリン/EGF による変化と同様の結果を得た。さらに亜鉛/インスリンは Akt のリン酸化シグナル強度を増強、長時間維持させた。一方、ERK は、組み合わせによる変化は認められなかった。次に、阻害剤を用いて 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)の活性化を抑制したところ、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。

次に、細胞増殖に必須のカルシウムに着目した。成長因子による細胞内へのカルシウム流入は、亜鉛欠乏で抑制されるなど、亜鉛はカルシウムイオンの細胞内流入を制御していると考えられている。培養液のカルシウムイオンをエチレンジグリコールビス 2 アミノエチルエーテル四酢酸(ethylene glycol tetraacetic acid, EGTA)によって除去し、塩化亜鉛/IGF-1 によってリザーブ細胞活性化の誘導を試みたところ BrdU 陽性細胞の割合は減少した。そのため、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。

以上の結果から、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。細胞外の亜鉛は、C2C12 細胞に対し IGF-1 の分泌または遊離に作用する。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。

(2)

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の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リザーブ細胞を活性化したと考えられる。

本論文の第3章では、筋芽細胞増殖および分化に対する亜鉛の影響について検討した。

C2C12 細胞の分化誘導時、培養液に塩化亜鉛を加えたところ、筋管細胞の形成が抑制された。また、亜鉛を加えた細胞では 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。そこで、増殖中の C2C12 細胞に塩化亜鉛を加えその増殖に対する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)陽性細胞の割合が有意に増加した。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結論づけた。

審査会では、本論文の完成度を上げるため、審査員より幾つかのコメントが寄せられ、一部、加筆を行った。専門に関する試問に対しても的確に回答し、大橋和也は全員一致で博士(学術)の学位を授与するにふさわしいと認定した。(文責 主査 松田良一)