

## 理学療法基礎系7

### 619 電気刺激による培養骨格筋細胞の肥大は PI3K・mTOR を介して引き起こされる

平澤 純, 岩田全広, 西浜かすり, 鈴木重行

名古屋大学大学院医学系研究科

**key words** 電気刺激・筋肥大・培養骨格筋細胞

【目的】我々は先行研究において、培養骨格筋細胞に電気刺激を与えると、骨格筋細胞が肥大することを形態学的に示した。しかし電気刺激が、どのようにして筋肥大を引き起こすか、その分子メカニズムはわかっていない。一方、成長因子のひとつである insulin-like growth factor-1 (IGF-1) 刺激による筋肥大については、筋細胞の脂質キナーゼである phosphoinositide 3-kinase (PI3K) やタンパク質キナーゼである mammalian target of rapamycin (mTOR) を介して起こることが既に報告されている。そこで今回は、電気刺激による筋肥大においても PI3K や mTOR を介して肥大が引き起こされるかどうか検討した。

【材料と方法】培養骨格筋細胞は、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 を用いた。細胞外基質である collagen type I をコーティングした細胞培養皿に筋芽細胞を播種し、筋管細胞に分化させた。培養開始後 7 日目の筋管細胞に電気刺激を与えた。電気刺激条件は、100 Hz のパルス波、刺激持続時間 0.2 msec、刺激頻度 1 pulse/sec、電圧 50 V、刺激時間 1 時間/12 時間とし、合計 72 時間行った。また陽性対照として IGF-1 (10 ng/ml) を培養液に投与し 72 時間刺激した。筋肥大の評価は各刺激後にギムザ染色を行い、筋管細胞の横径を測定した。さらに、電気刺激と IGF-1 刺激の各刺激前に PI3K の阻害剤である Wortmannin (500 nM) を培養液に投与して、同様の実験を実施することにより PI3K の関与を調べた。また mTOR の阻害剤である Rapamycin (20 ng/ml) を用い、mTOR の関与についても調べた。統計検定には一元配置分散分析の後、多重比較検定を用いた。

【結果】筋管細胞の横径は、非刺激群 ( $14.4 \pm 3.1 \mu\text{m}$ ) に比べて電気刺激で  $17.8 \pm 4.0 \mu\text{m}$ 、IGF-1 刺激で  $17.7 \pm 4.0 \mu\text{m}$  と有意に増大し ( $p < 0.001$ )、筋肥大が確認できた。各刺激による筋肥大は、Wortmannin の前投与により非刺激群と同レベルにまで抑制された (電気刺激  $14.7 \pm 3.1 \mu\text{m}$ 、IGF-1 刺激  $15.2 \pm 2.9 \mu\text{m}$ )。また Rapamycin の前投与によっても、各刺激による筋肥大は非刺激群と同レベルにまで抑制された (電気刺激  $14.5 \pm 2.9 \mu\text{m}$ 、IGF-1 刺激  $14.5 \pm 3.4 \mu\text{m}$ )。

【考察】電気刺激による培養骨格筋細胞の筋肥大は、IGF-1 刺激による筋肥大と同様に、PI3K 及び mTOR を介することがわかった。今後、電気刺激による筋肥大に関わる分子メカニズムの解析をさらに進め、筋力増強、筋力低下の予防を目的とした科学的根拠に基づく治療方法の確立に繋げたい。

## 理学療法基礎系7

### 620 周期的一方向伸張刺激による糖の取込み促進には、筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出が重要である

岩田全広<sup>1)</sup>, 早川公英<sup>2)</sup>, 村上太郎<sup>3)</sup>, 河上敬介<sup>1)</sup>, 宮津真寿美<sup>1)</sup>, 鈴木重行<sup>1)</sup>

1) 名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻, 2) 科学技術振興機構・SORST・細胞力覚プロジェクト, 3) 中京女子大学健康科学部栄養科学科

**key words** 培養骨格筋細胞・伸張刺激・糖代謝

【目的】適度な運動により、筋外から筋内への糖の取込みが促進し、血糖値が低下することはよく知られている。負荷運動において筋が収縮すると、収縮力に対する応力(張力)が筋に働く。運動による糖の取込み促進には、この筋に加わる張力が重要な因子の一つであると考えられていて、その分子メカニズムとしては(1)insulinにより活性化される経路と(2) $\text{Ca}^{2+}$ を介する経路が考えられているが、まだわかっていない。昨年の本大会では、培養骨格筋細胞に周期的な一方向伸張刺激を加えると糖の取込みが促進するが、その機序は(1)ではないことを報告した。一方(2)については、これまで骨格筋に薬理的な処理を施して細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させると、糖の取込みが促進することが報告されている。伸張刺激は細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の流入や細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの放出により、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることが明らかとなっており、伸張刺激による糖の取込み促進においても細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が重要な役割を担う可能性が大きい。そこで今回は、伸張刺激による糖の取込み促進が細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の流入、または細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ ストアからの放出によって起こるかどうかという点について検討した。

【材料と方法】培養骨格筋細胞は、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 を用いた。collagen type I をコーティングしたシリコン膜上に筋芽細胞を播種し、筋管細胞に分化させた。培養開始後 7 日目の筋管細胞に、伸張装置を用いて周期的一方向伸張刺激(周期 1Hz、伸張率 10%、刺激時間 30 分)を加えた(伸張群)。同じ期間に伸張刺激を加えず、培養した細胞を非刺激群とした。次に、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ を除去する EGTA (2mM) を培養液に投与し

て伸張刺激を加えた(EGTA群)。また、筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ 放出を抑制する ryanodine (20  $\mu\text{M}$ ) を培養液に投与して伸張刺激を加えた(ryanodine群)。刺激直後に 2-Deoxy-glucose を 15 分間負荷して、細胞内への糖の取込み量を測定した。

【結果】伸張群の糖の取込みは、非刺激群に比べて  $23.1 \pm 7.3\%$  高かった。EGTA 群の糖の取込みは、非刺激群に比べて  $15.9 \pm 11.7\%$  高かった。一方、ryanodine 群の糖の取込みは、非刺激群に比べて  $2.7 \pm 8.7\%$  低く、非刺激群とほぼ同レベルにまで抑制された。

【まとめ】伸張刺激による糖の取込みは、EGTA により細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ を除去しても抑制されず、ryanodine により筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出を抑制すると、抑制されることがわかった。このことから、周期的一方向伸張刺激による糖の取込み促進には細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ の流入ではなく筋小胞体からの $\text{Ca}^{2+}$ の放出が重要であると考えられた。以上のような分子メカニズムが明らかにされることは、科学的根拠に基づく効果的で効率的な糖尿病運動療法の開発に繋がると考える。