

筋芽細胞の増殖と分化に及ぼす酸化ストレスの影響

Effects of Oxidative Stress on the Proliferation and Differentiation of Myoblasts

福永 優子・村上 勇磨

Yuko FUKUNAGA and Yuma MURAKAMI

加齢による骨格筋の筋肉量の低下や筋力が低下した状態をサルコペニアといい、運動機能障害による様々な問題を引き起こす。サルコペニアの筋肉量減少に関わるメカニズムの1つにあげられる加齢による筋線維再生の減弱に、骨格筋の組織幹細胞であるサテライト細胞の関与が示されている。通常、サテライト細胞は、筋肉の損傷などにより活性化し、筋芽細胞へと分化する。さらに、筋芽細胞から筋管細胞への分化を経て筋線維が再生される。しかし、老化が進むと、サテライト細胞の増殖や筋芽細胞への分化が低下してしまうため、新たに作られる筋線維が減少し、筋肉量の減少につながると考えられている。一方、筋線維再生過程にある筋芽細胞の増殖に、老化がどのような影響を及ぼしているのかは明らかになっていない。加齢に伴う酸化ストレスの増加によって、様々な細胞障害を引き起こすことが知られているため、本研究では、筋芽細胞の増殖と筋管細胞への分化に及ぼす老化の影響を明らかにするために、株化筋芽細胞であるC2C12細胞に酸化ストレス負荷し、その後の細胞増殖と分化に及ぼす影響を検討した。その結果、サルコペニア発症のメカニズムに、サテライト細胞の増殖と分化の抑制だけでなく、筋芽細胞の増殖抑制も関与する可能性が示唆された。加えて、これまで報告されている酸化ストレスによる筋管細胞への分化抑制は、時間的に制御されたものであることが示唆された。

1. 緒言

加齢による骨格筋の筋肉量や筋力が低下した状態をサルコペニア（加齢性筋肉減少症）といい、運動機能障害によって日常生活動作を著しく阻害する。現在では、サルコペニアは人だけでなく犬や猫においても報告されており¹⁾、伴侶動物においては介護による飼い主の負担が問題となってきた。

骨格筋の基底膜と筋線維の間には、組織幹細胞であるサテライト細胞が存在しており、骨格筋の高い再生能力を支えている。通常、サテライト細胞は増殖しない細胞周期（G0期）に維持されているが、筋肉が損傷を受け

ると、増殖因子などの活性化シグナルにより増殖を開始し、筋前駆細胞である筋芽細胞への分化を開始する。筋芽細胞はさらに増殖し、やがて筋芽細胞同士が融合し、多核の筋管細胞へと分化する。最終的に、筋管細胞の筋線維への成熟と運動神経の再神経支配によって再生が完了する²⁾。このように、骨格筋の再生能力の重要な部分をサテライト細胞が担っていることから、サルコペニアの原因究明のために、これまでにサテライト細胞に関する多くの研究が蓄積されてきた。そしてサテライト細胞の増殖や分裂能の低下により、新たに作られる筋線維が減少し、筋肉量の減少や筋萎縮につながると考えられている。実際、加齢に伴ってサテライト細胞数や分裂能が減少することが分かっている³⁾。しかし一方で、サテライト細胞を欠損させた老齢マウスでは、野生型の老齢マウスと比較して、筋萎縮の度合いに変化が見られないことが報告されている⁴⁾。このことは、サテライト細胞以外にも、サルコペニアに関わる因子があると示唆して

連絡先：福永優子 yfukunaga@cis.ac.jp

千葉科学大学危機管理学部動物危機管理学科

Department of Animal Risk Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

(2018年10月2日受付, 2018年12月6日受理)

いる。筋再生過程においてサテライト細胞以外に重要な役割をするものに、筋芽細胞の増殖や分化能があげられる。これらのことから、加齢に伴う筋芽細胞の増殖や分化能の低下が、サルコペニアにおける筋肉量低下や筋萎縮に関与する可能性が示唆される。

老化は身体内で起こる進行性の現象であり、活性酸素によるDNAやタンパク質、脂質の損傷が加齢に伴って蓄積し、身体の機能障害を引き起こしていると考えられている⁵⁾。そして加齢性の疾患であるサルコペニアの発症にも、この酸化ストレスが関わるということが報告されている⁶⁾。酸化ストレス負荷による培養筋芽細胞や培養筋管細胞の細胞死誘導に関してはこれまで多くの研究が行われているが^{7, 8)}、培養筋芽細胞の増殖に及ぼす影響については報告がない。また、酸化ストレス負荷条件下では、株化C2C12筋芽細胞から筋管細胞への分化が抑制されることは報告されているが⁹⁾、細胞死ではなく細胞増殖に影響を及ぼす程度の酸化ストレス負荷が筋管細胞への分化に及ぼす影響については知見がない。そこで本研究では、筋芽細胞の増殖に及ぼす酸化ストレスの影響と、細胞増殖に影響を及ぼす程度の酸化ストレスが筋管細胞への分化におよぼす影響について検討を行った。

2. 材料と方法

2. 1 細胞培養と酸化ストレス負荷

24穴プレートにCell Matrix type IA（新田ゼラチン、大阪）を加えゲル化させた。その上に筋芽細胞のC2C12細胞（ATCC, VA, USA）を 1.0×10^4 cells/wellになるよう播種し、成長培地（DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin）を用いて、CO₂インキュベーター内で培養した。筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導は、C2C12細胞の播種後5日目または9日目に100%コンフルエントを確認した後、培地を成長培地から分化用培地（DMEM, 5% Horse serum, 1% Penicillin/Streptomycin）に置換することにより行った。分化誘導後は毎日培地交換を行った。酸化ストレス物質には、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカル、次亜塩素酸などがあるが、フリーラジカルであるスーパーオキシドやヒドロキシラジカルは寿命が短いため、細胞への酸化ストレス負荷は過酸化水素処置により行った。本研究では、C2C12筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を明かにする目的のため、細胞死を誘導しない過酸化水素処置条件（20 μ M以下、3時間以下：予備実験）で検討を行った。

2. 2 細胞の増殖

C2C12細胞を計数するために、細胞の核染色を行った。培養した細胞をPBSで洗浄した後、100%エタ

ノールで5分間処置した。0.5 mg/ml Propidium Iodide（Dojindo、熊本）/PBSを20分間処置した。その後Aqua-Poly/Mount（Polysciences, Pennsylvania, USA）で封入し、蛍光顕微鏡（IX73、オリンパス、東京）で撮影した。核の数を計数し、撮影面積あたりの細胞数を算出した。1回の実験につき10視野の細胞数の平均値を算出し、独立して3回の実験を行った。3回の実験の平均値と標準誤差をもとめた。増殖曲線の曲線下面積（AUC）および増殖期の回帰直線の傾きを算出した。コントロールとの多重比較検定には、Dunnettの検定法を用いた。

2. 3 筋管細胞への分化効率

筋管細胞への分化効率を定量化するために、C2C12細胞にミオシン重鎖に対する免疫染色を行った。C2C12細胞を4% Paraformaldehydeで10分間固定した。その後3% 正常ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミンおよび0.5% Triton X100を含むPBS溶液で1時間ブロッキングした後、3% 正常ヤギ血清、1% ウシ血清アルブミン、0.5% Triton X100および0.05% アジ化ナトリウムを含むPBS溶液で1/500に希釈した抗ミオシン重鎖抗体（MF20, DSHB）を室温で1時間処置した。次にブロッキング用溶液で1/500に希釈した抗マウスIgG抗体-Alexa Flour 555（abcam, Cambridge, UK）を室温で1時間処置した。Immunoselect Antifading Mounting Medium（Dianova, Hamburg, Germany）で封入し、蛍光顕微鏡で撮影した。画像解析用ソフトImage J（NIH, Maryland, USA）を用いて、撮影面積あたりのミオシン陽性細胞が占める面積を測定した。1回の実験につき10視野の面積の平均値を算出し、1回の実験データとした。独立して3回の実験を行い、3回の平均値を算出しグラフを作成した。t検定により有意差検定を行った。

3. 結果

3. 1 細胞増殖に及ぼす過酸化水素の影響

実験にはマウス由来の筋芽細胞株であるC2C12細胞を用いた。C2C12細胞は、本実験条件下では、図1のコントロールで示すように播種後増殖し、静止期に達したのは播種4日目であった（図2A）。播種24時間（1日）目に、培養液中に過酸化水素を添加し、3時間インキュベーションしたところ、5 μ M および 10 μ M の過酸化水素を処置しても、コントロールと同様に細胞数が増加し、静止期は播種4日目であった（図1、2A）。一方、20 μ M の過酸化水素を処置した細胞では、細胞増殖が抑制された（図1、図2A）。また、得られた増殖曲線の曲線下面積は、20 μ M の過酸化水素処置群のみ有意に減少した（図2B）。また図2Aに示した増殖曲線の増殖期の回帰直線の傾きが、20 μ M の過酸化水素処

置群のみ有意に減少した。以上の結果より、 $20\mu\text{M}$ の過酸化水素は C2C12 細胞の増殖速度を抑制することが示された (図 2C)。

3. 2 増殖抑制された筋芽細胞の筋管細胞への分化に及ぼす過酸化水素の影響

C2C12 細胞は、細胞密度が 100% コンフルエントの状態、成長培地を低濃度のウマ血清が添加された培地に置換することにより筋管細胞に分化誘導することができる。図 1 に示すように、本実験では播種 4 日目に C2C12 細胞が 100% コンフルエントに達するため、播種 5 日目に分化誘導を開始した。筋管細胞への分化状態を観察するために、分化誘導前および分化誘導 1、3、5 および 7 日後に、筋管細胞の分子マーカーとして一般的に用いられるミオシン重鎖に対する抗体で免疫染色を行った。分化誘導 3 日目以降で見られるように、筋芽細胞が融合していくことで、筋管細胞に特徴的な細長い形態を呈するようになる (図 3A)。ミオシン重鎖の発現は、分化誘導前および分化誘導 1 日目で見られるように、細長い形態になる前から認められた (図 3A)。そして、この初期のミオシン重鎖の発現は、 $20\mu\text{M}$ の過酸化水素処置によって抑制された (図 3A)。ミオシン重鎖の陽性細胞が占める面積を測定し、筋管細胞への分化効率を定量化したところ、分化誘導 5 日目に、筋管細胞への分化が抑制される傾向を示した (図 4A)。これらの結

果は、過酸化水素によってミオシン重鎖の発現が抑制され、その結果筋管細胞への分化誘導にも影響を及ぼすことを示唆している。しかし、増殖曲線の曲線下面積 (図 4C) と回帰直線の傾き (図 4D) には、明らかな差は認められなかった。

図 1 に示すように、C2C12 細胞に過酸化水素を処置すると、細胞増殖が抑制されるため、過酸化水素処置群の細胞は、播種 5 日目では細胞密度は 100% コンフルエントの状態にはなっていない。このような分化誘導時の細胞密度の違いが、その後の分化誘導の効率に影響を与えている可能性が考えられたため、過酸化水素を処置した細胞の密度が 100% コンフルエントになる播種 9 日目にも同様の検討を行った。播種 9 日目に分化誘導した細胞のミオシン重鎖を染色したところ、分化誘導前でもすでに細長い形態を示す程度に分化が進んだ筋管細胞が認められた。また筋管細胞に混じって、形態学的に筋管細胞になっていないミオシン重鎖陽性細胞も認められた。播種 5 日目に分化誘導を開始した細胞と異なり、これらのミオシン重鎖発現は、過酸化水素処置による影響を受けなかった (図 3B)。筋管細胞への分化効率の解析結果からも、播種 9 日目に分化誘導した培養細胞において、筋芽細胞の増殖を抑制する過酸化水素処置は、筋管細胞への分化に影響を及ぼさないことが明らかとなった (図 4B, C, D)。

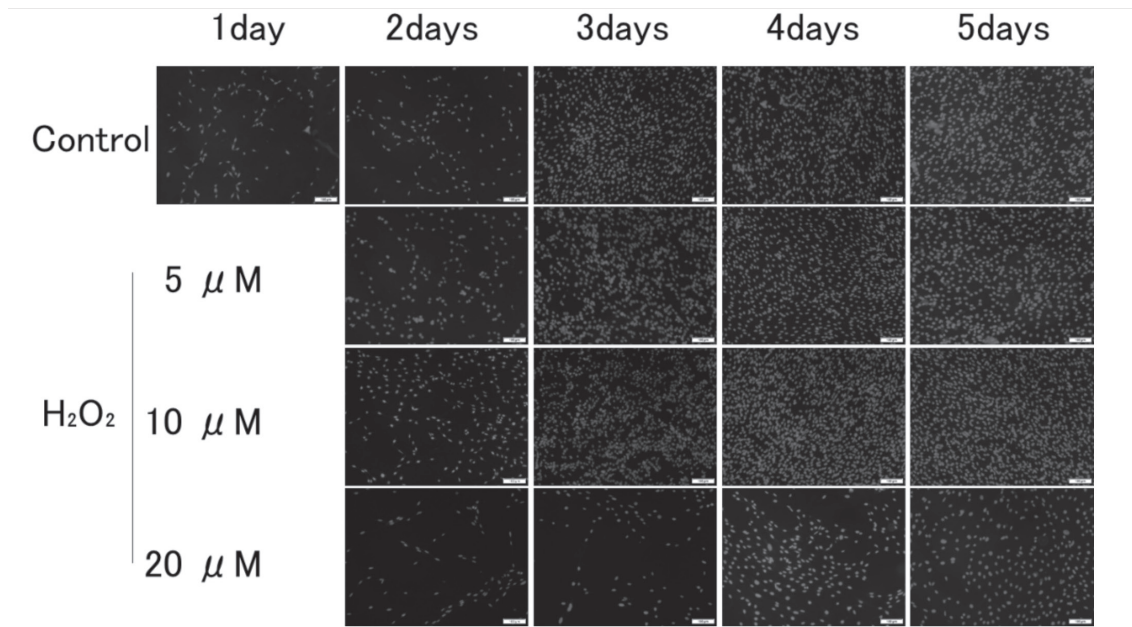


図1 C2C12細胞の増殖に及ぼす過酸化水素の影響

C2C12細胞を播種後5日目まで培養した。播種24時間後に過酸化水素 (H_2O_2) を処置し、3時間後に成長培地に交換した。コントロールの細胞は過酸化水素を含まない成長培地で液交換のみ行った。Bar=100 μm

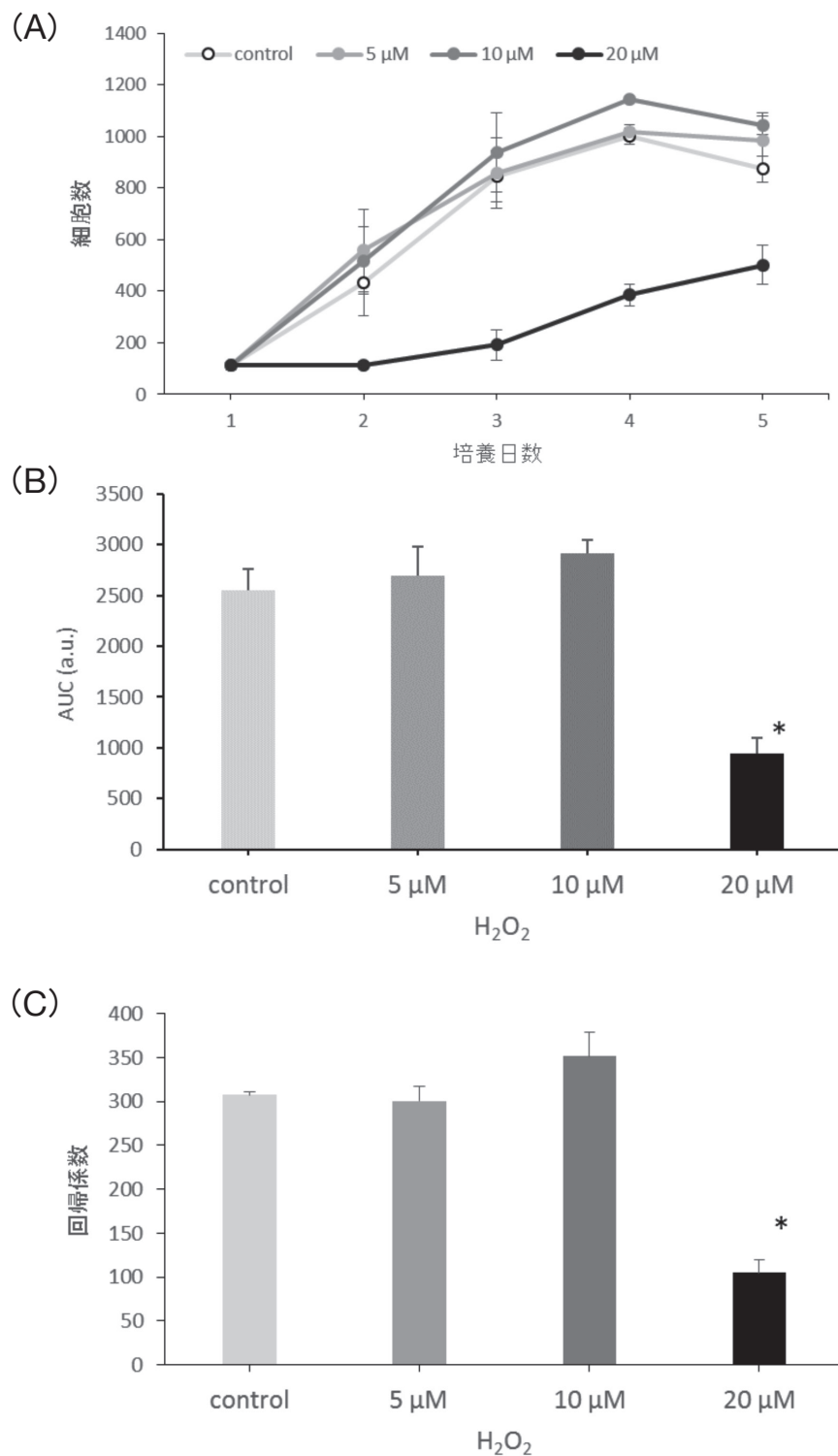


図2 C2C12細胞の増殖解析

(A) コントロールおよび過酸化水素を処置した時のC2C12細胞の細胞増殖曲線を示した。

(B) (A) の増殖曲線の曲線下面積を算出した。

* $P < 0.05$ vs control AUC, Area under the curve, a.u., arbitrary unit

(C) 増殖期における回帰直線の傾きを算出した。

* $P < 0.05$ vs control

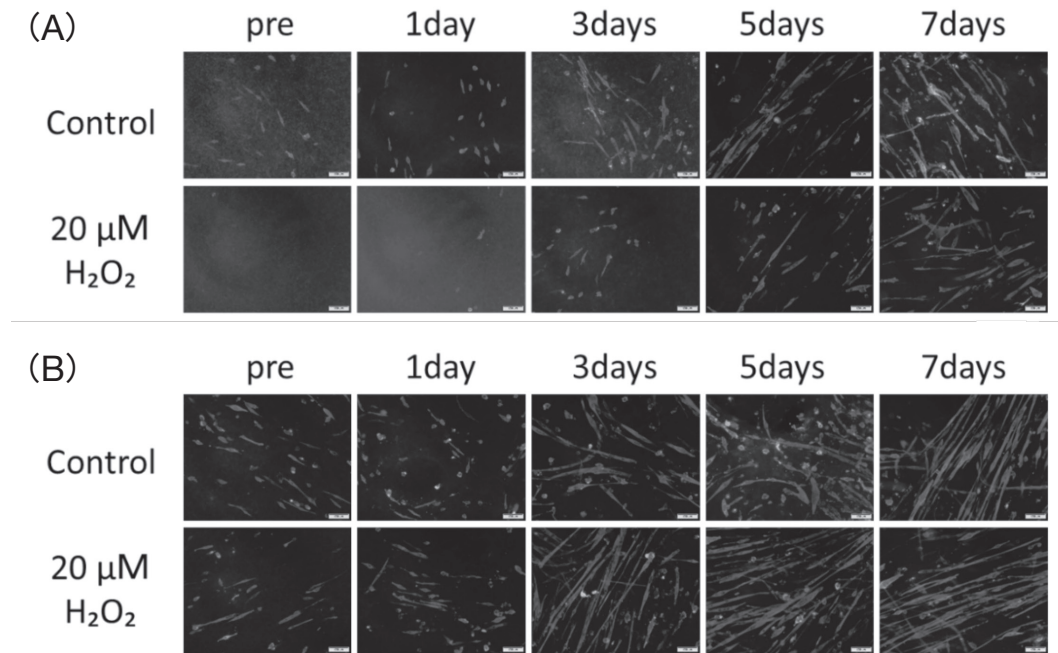


図3 増殖抑制された筋芽細胞の筋管細胞の分化に及ぼす過酸化水素の影響
C2C12筋芽細胞を筋管細胞に分化誘導した。分化誘導前、誘導後1、3、5および7日目にミオシン重鎖を免疫染色した。過酸化水素 (H₂O₂) は播種24時間後に3時間処置した。(A) 播種5日後に分化誘導した細胞 (B) 播種9日後に分化誘導した細胞、Bar=100 μm

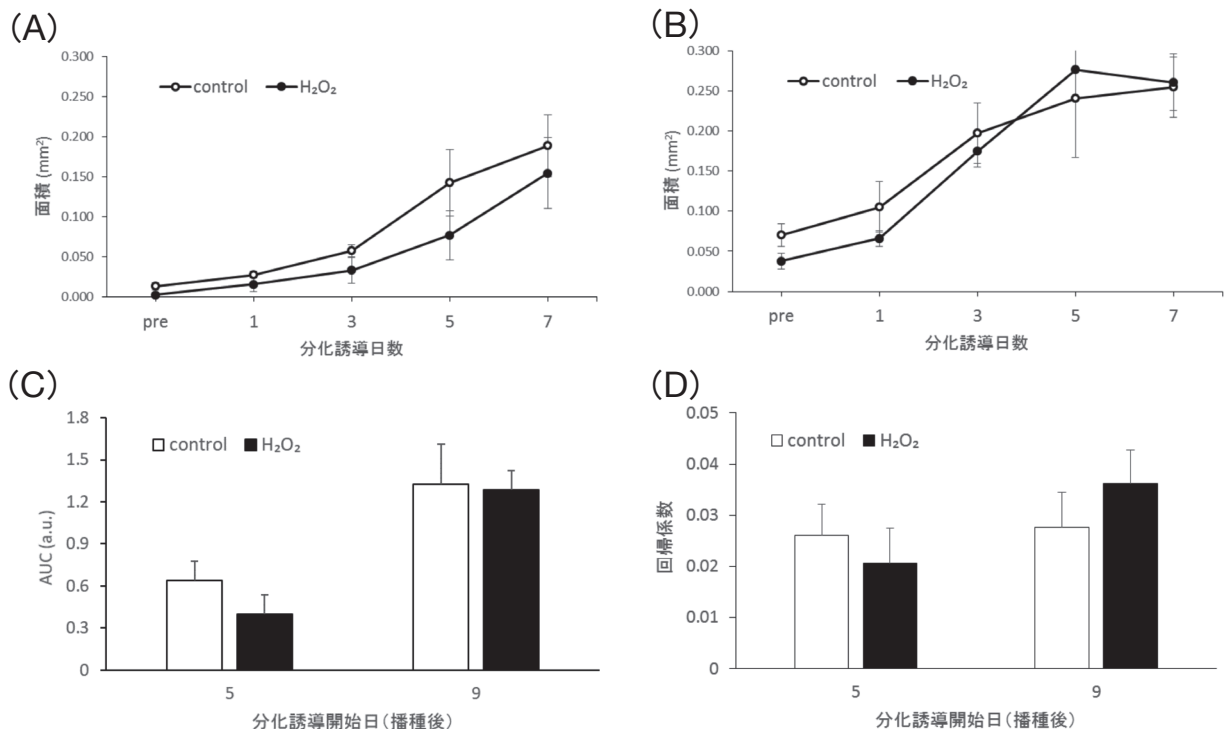


図4 C2C12筋管細胞の分化解析
コントロールおよび20 μM過酸化水素を処置した時のミオシン重鎖陽性細胞が占める面積の推移を示した。(A) 播種5日後に分化誘導した細胞 (B) 播種9日後に分化誘導した細胞 (C) (A) および (B) の増殖曲線の曲線下面積を算出した。AUC, Area under the curve、a.u., arbitrary unit (D) 増殖期における回帰直線の傾きを算出した。

4. 考察

ミトコンドリアは、細胞内に取り込んだ酸素の一部を好氣的なエネルギー代謝により活性酸素として放出する。しかし細胞内で産生された活性酸素は、カタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼなどの消去酵素の作用により無害な物質へと変換されているため、細胞内のレドックス状態は平衡状態に保たれている。加齢に伴い、活性酸素が過剰に産生されたり、消去酵素の発現が減少したりすると、DNAやタンパク質などの生体高分子を傷害し、細胞レベルから個体レベルの様々な階層における老化状態をもたらす。実際、培養細胞に過酸化水素を処理して酸化ストレスを負荷すると、細胞老化が誘導されることが報告されている¹⁰⁾。細胞レベルの酸化ストレス応答にはアポトーシス以外に、細胞周期をG0/G1期に留めることによる細胞増殖の停止があげられる^{11, 12)}。本研究において、筋芽細胞に20 μ Mの過酸化水素を添加し酸化ストレスを負荷すると、細胞増殖が抑制された。この時の増殖期の回帰直線の傾きが、コントロールと比べ過酸化水素処置群では低下することと、培養日数を増やすことで、細胞密度がコントロールと同様に100%コンフルエントに達することから、過酸化水素処置による細胞増殖の抑制は、酸化ストレスによるアポトーシスの誘導ではなく、細胞周期の停止による影響であると考えられる。

活性酸素は、細胞にとって常に有害なものというわけではなく、特定の細胞内情報伝達経路の一端を担っているため、生体内においては活性酸素の量が厳密に制御されていることが重要である。実際、活性酸素は、細胞の増殖や分化に必須な因子であることが知られている¹³⁾。一方で、その量が過剰になると、生体に様々な影響をおよぼす。加齢によるサルコペニアの病態についても、酸化ストレスの関与が示唆されている。例えば、サテライト細胞から筋芽細胞への分化や³⁾、筋芽細胞から筋管細胞への分化は、分化誘導時の酸化ストレス負荷により阻害される⁹⁾。また増加した酸化ストレスが、IL-6などの炎症性サイトカインや筋特異的E3ユビキチンリガーゼの発現を誘導し、筋タンパク質を減少させ、最終的に骨格筋量が減少する⁶⁾。これら酸化ストレスの多様な影響に加え、本研究ではさらに、筋芽細胞の増殖の抑制もまた、加齢による筋肉量の減少に関わる可能性があることを示した。

本研究では、20 μ Mの過酸化水素負荷によって細胞増殖が抑制された筋芽細胞は、その後の筋管細胞への分化誘導には変化が認められなかった。一方、Hansenらは、筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導時に25 μ Mの過酸化水素を添加することで、筋管細胞への分化が抑制されることを示した⁹⁾。これら過酸化水素の濃度はほぼ同じであるため、筋芽細胞の細胞分裂と筋管細胞への分化

に対し、酸化ストレスがそれぞれ独立して影響し、酸化ストレス負荷による筋芽細胞から筋管細胞へ分化への抑制は、分化段階で働き始める細胞内情報伝達経路への影響によるものであると考えられた。

本研究の結果より、老化による筋肉量の低下のメカニズムには、これまで示されてきたサテライト細胞の増殖と分化の抑制や筋タンパク質量の減少だけでなく、筋芽細胞の増殖抑制も関与する可能性が示唆された。

謝辞

千葉科学大学危機管理学部環境危機管理学科の細胞培養に関わる装置をお借りしました。心より感謝いたします。

参考文献

- 1) Freeman LM. Cachexia and sarcopenia : Emerging syndromes of importance in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 26, 3-17, 2012
- 2) Dumont NA, Bentzinger CF, Sincennes MC, Rudnicki MA. Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Comprehensive Physiology*, 5, 1027-1059, 2015
- 3) García-Prat L, Sousa-Victor P, Muñoz-Cánoves P. Functional dysregulation of stem cells during aging : A focus on skeletal muscle stem cells. *The FEBS journal*, 280, 4051-4062, 2013
- 4) Fry CS, Lee JD, Mula J, Kirby TJ, Jackson JR, Liu F, Yang L, Mendias CL, Dupont-Versteegden EE, McCarthy JJ, Peterson CA. Inducible depletion of satellite cells in adult, sedentary mice impairs muscle regenerative capacity but does not contribute to sarcopenia. *Nature medicine*, 21, 76-80, 2015
- 5) Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 13, 757-772, 2018
- 6) Meng SJ, Yu LJ. Oxidative stress, molecular inflammation and sarcopenia. *International journal of molecular sciences*, 11, 1509-1526, 2010
- 7) Koh J-E, Kim Y-J, Jang M-H, Shin M-S, Kim C-J, Kim T-W, Lee C-Y. Effect of *N*-acetylcysteine on hydrogen peroxide-induced apoptosis in mouse C2C12 myoblast cells. *스트레스研究*, 17, 313-321, 2009
- 8) Siu PM, Wang Y, Alway SE. Apoptotic signaling induced by H2O2-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life sciences*, 84, 468-481, 2009
- 9) Hansen JM, Klass M, Harris C, Csete M. A reducing redox environment promotes C2C12 myogenesis : Implications for regeneration in aged muscle. *Cell biology international*, 31, 546-553, 2007
- 10) Chen QM, Bartholomew JC, Campisi J, Acosta M, Reagan JD, Ames BN. Molecular analysis of H2O2-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts : P53 and Rb control G₁ arrest but not cell replication. *The Biochemical journal*, 332 (Pt 1), 43-50, 1998
- 11) Chiu SC, Lin YJ, Huang SY, Lien CF, Chen SP, Pang CY, Lin JH, Yang KT. The role of intermittent hypoxia on the proliferative inhibition of rat cerebellar astrocytes. *PLoS one*, 10, e0132263, 2015
- 12) Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, 37, 614-636, 1965
- 13) Hamanaka RB, Glasauer A, Hoover P, Yang S, Blatt H,

Mullen AR, Getsios S, Gottardi CJ, DeBerardinis RJ, Lavker RM, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species promote epidermal differentiation and hair follicle development. *Science signaling*, 6, ra8, 2013

Effects of Oxidative Stress on the Proliferation and Differentiation of Myoblasts

Yuko FUKUNAGA and Yuma MURAKAMI

Department of Animal Risk Management, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science

Sarcopenia is an age-associated syndrome defined as the progressive loss of muscle mass and strength, which plays a major role in the increased functional impairment. One of several causes of sarcopenia is an age-related impaired regeneration of skeletal muscle. Satellite cells, tissue stem cells of skeletal muscle, is activated and differentiated into myoblasts after muscle damage. Finally, myofibers are regenerated by maturation of myotubes formed by fused myoblasts. Proliferation of satellite cells and their differentiation into myoblasts is reduced in aging muscle. This is consequently, associated with the reduction of myofibers formations and muscle mass. These findings indicate the involvement of satellite cells in the etiology of sarcopenia. On the other hand, the role of proliferation of myoblasts has not been fully investigated. An age-associated increase in oxidative stress causes multiple cellular dysfunction. In this study, therefore, C2C12 myoblasts was exposed to hydrogen peroxide known as reactive oxygen species to analyze the impacts of aging on proliferation of satellite cells and their differentiation into myoblasts. It is suggested that the reduction of proliferation of myoblasts also participate in the pathophysiological mechanism of sarcopenia and the effect of reactive oxygen species on their differentiation into myotubes is temporally controlled.