

# 飲水糖負荷がマウスの大腿四頭筋における Myosin Light chain 1 の発現に及ぼす影響

森 拓也<sup>1)2)</sup>, 川原 勲<sup>1)2)</sup>, 後藤 桂<sup>1)3)</sup>, 國安 弘基<sup>1)MD)</sup>

- 1) 奈良県立医科大学 大学院 医学研究科 分子病理研究室
- 2) 医療法人 和幸会 阪奈中央病院 リハビリテーション科
- 3) 医療法人 和敬会 星田南病院 リハビリテーション科

**キーワード：** グルコース・骨格筋・ミオシン軽鎖

## はじめに

骨格筋は、生体内における最大の代謝器官であり、骨格筋量は生命予後と関連する。骨格筋における活動のエネルギーとして必須である ATP は主に糖代謝から生成する。骨格筋における糖代謝に関する報告は多いが、糖質摂取が骨格筋の増殖・分化に与える影響についての報告は少なく、Grabiec らがマウス筋芽細胞株 C2C12 で高糖濃度が増殖・分化を促進すると報告しているのが目を引く。われわれも先行研究として Glucose 濃度の筋芽細胞増殖への影響を検証し、高 Glucose 濃度により筋芽細胞の増殖・分化の促進と筋成熟に寄与することを明らかにした。これらの知見から、糖摂取が骨格筋構造タンパクの形成において促進性に作用すると考えられた。このため、本実験においては、飲水糖負荷マウスモデルにより下肢骨格筋の構造タンパクの変化を明らかにすることを目的とした。

## 方法

### In Vitro 実験 (先行研究)

培養液中の Glucose 濃度の差異がマウス筋芽細胞株 C2C12 の増殖と分化に与える影響を検証した。

細胞はマウス筋芽細胞株 C2C12 を使用し、培養培地環境は、10% FBS 添加ダルベッコ変法イーグル最小培地 (DMEM) を使用し、培養環境は 37°C, 5% CO<sub>2</sub> にて培養を行った。Glucose 濃度 0, 1, 2.25, 4.5 g/L の 4 群を作成し、Insulin 濃度 1mg/mL で各群同数の C2C12 細胞を処理し分化誘導を行った。6 日後に細胞形態を暗視野で観察、写真撮影を施行し細胞数を計測した。

### In vivo 実験 (本実験)

飲水糖負荷がマウスの大腿四頭筋の Myosin Light chain 1 の発現に与える影響を検証した。

BALB/c マウス (雄, 週齢 6 週) 7 匹 (両側大腿四頭筋 14 肢) について群分けを行い、自動給水の Control 群 3 匹 と 2 群の

Glucose 飲水群; 10%Glucose 群 2 匹, 50%Glucose 群 2 匹 とした。2 週後に飲水量, 体重, 血糖値を測定, 安楽殺を施行し, 両側大腿四頭筋を採取した。得られた骨格筋は湿重量を測定し, -80°C 保存後ハンマーにより粉碎, 筋膜等の線維を除去した。各群同重量のサンプルから RIPA-Buffer を用いてタンパク抽出を行い, 骨格筋構造タンパクである Myosin Light chain 1 含量を ELISA KIT (COSMOBIO) にて解析した。なお得られたデータの統計解析は Steel-Dwass 検定により, 有意水準は 0.05 未満とした。本実験は奈良県立医科大学の動物倫理審査委員会の承認を得て実施した。

## 結果

### In Vitro 実験 (先行研究)

顕微鏡像では, 4.5 g/L 群で Myoblast への分化が著明であった (Figure1)。処理前細胞数 (個/mL) 1807.6 ± 149 に対し, 処理後細胞数は, 0, 1, 2.25, 4.5 g/L の各群それぞれ 38.3 ± 4, 31.6 ± 3, 408 ± 20.3, 2554 ± 46.4 であった (Figure2)。

### In vivo 実験 (本実験)

結果 (Control 群 / 10%Glucose 群 / 50%Glucose 群) は, 飲水量 (mL) (自動給水 / 362 / 430), 血糖値 (mg/dL) (141 ± 7 / 128 ± 0 / 115 ± 6.3), 体重 (g) (23.1 ± 0.1 / 22.9 ± 0.7 / 23.8 ± 1.5) で, いずれも各群に有意差は認められなかった。骨格筋湿重量 (mg) に関しては, (219 ± 40 / 259 ± 37 / 251 ± 32) であり, 有意差はないものの糖摂取群で重量増加の傾向が見られた。Myosin Light chain 1 の筋タンパク含量 (μg/mg) は (1.42 ± 0.6 / 1.74 ± 0.5 / 1.99 ± 0.4) であり, 50%Glucose 群が Control 群と比較し有意に増加していた (P < 0.05) (Figure3)。

## 考察

今回, われわれが行った検討では, 飲水による糖負荷マウスモデルにおいて, 糖負荷が SDS 可溶性 Myosin light chain 1 (MYL1) の増加を誘導する可能性が示唆された。

SDS 可溶性 MYL1 は骨格筋成熟とよく相関することをわれわれ輪以前に確認しており, SDS 可溶性 MYL1 の濃度が糖負

Fig1. Effect of glucose on myoblast differentiation of C2C12 cells.

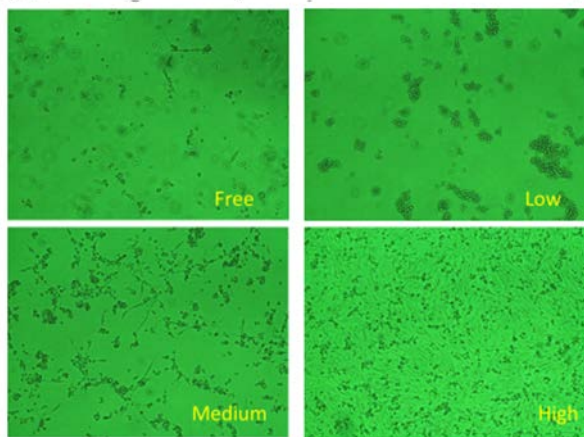


Fig1. A photos C2C12 for 6 days on differentiation medium. (×4倍 PhL)  
 Free: no differentiation Low Glc: no differentiation  
 Medium Glc: partial differentiation High Glc: marked differentiation

Fig2 Effect of glucose on cell counts of C2C12 Cells

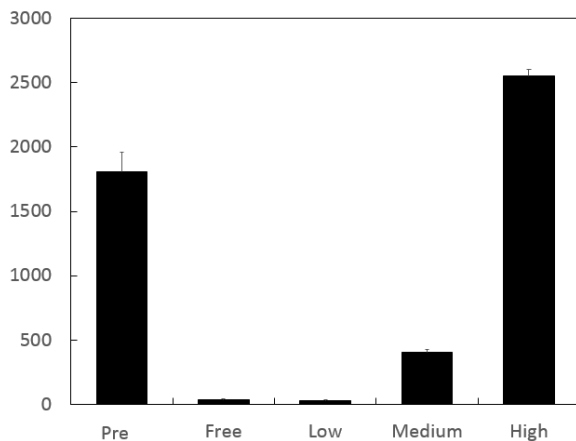


Fig2. A graph shows the mean values  $\pm$  standard deviation of the cell counts in the start cell counts, (Pre) ,0 mg/dL (Free) , 100 mg/dL (Low) , 225mg/dL (Medium) , 450 mg/dL (High) .

Fig3. Effect of sugar load on mouse body weight , Blood sugar, muscle weight, Myosin light chain 1(MYL1)

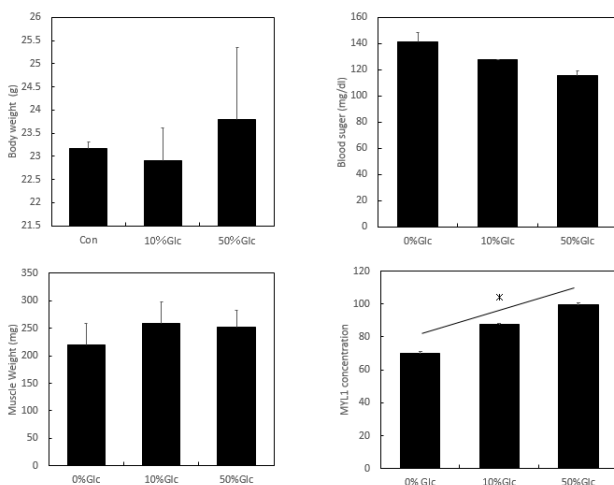


Fig1. A graph shows the mean values  $\pm$  standard deviation of the body weight, blood sugar, muscle weight, MYL1 in the Control group(Con),10% glucose intake(10%Glc) group,50% glucose intake group(50%Glc). It was Steel-Dwass test. The significance level was set at 0.05%.

荷量に相関して MYL1 濃度が増大した結果が, 糖による骨格筋の維持に果たす役割を示している. 通常骨格筋は血中の 70~80%の Glucose を筋恒常性の維持や運動のために取り込み, ATP 産生に利用するとされ, MYL1 は ATP の利用に関連する<sup>2)</sup>. また, マウス筋芽細胞を用いて, Glucose 濃度の上昇が骨格筋細胞の増殖と分化を増殖する報告も多く<sup>1), 3), 4)</sup>, 糖質負荷にて骨格筋への糖取り込みの促進が行われたことにより, MYL1 濃度が糖濃度に相関して増加したと考えられる. これはわれわれの先行研究での C2C12 細胞において高 Glucose 濃度で分化が誘導された結果と一致した. また Grabiec らの報告とも矛盾しない.

また本実験では, 糖負荷マウス群において Control 群と比較し血糖・体重に有意差が認められず, 2 型糖尿病とは異なりインスリン抵抗性のない状態が確認された. よって, インスリン抵抗性がない場合に, 生体内においても Glucose の摂取は骨格筋量の維持と成熟に対し促進性に作用する可能性が示唆された. なお, 本基礎実験では, 50%Glucose 飲水負荷を行なっているが, この系を直接ヒトに対し当てはめることは, 負荷強度の点で問題がある. 今後, 適切な糖負荷量や期間, 運動やその他の物理的手段との併用等を検討・考慮し, 適切なヒト・モデルを確立していきたい.

## 文 献

- 1) Grabiec ., et al.: The influence of high glucose and high insulin on mechanisms controlling cell cycle progression and arrest in mouse C2C12 myoblasts: the comparison with IGF-I effect. *J Endocrinol. Invest.* 37:233-245 (2014)
- 2) Takashima S.: Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ. J.* 73, 208-13 (2009)
- 3) Li W., et al.: Response of C2C12 myoblasts to hypoxia: the relative roles of glucose and oxygen in adaptive cellular metabolism. *Biomed Res. Int.* 2013, 326346 (2013)
- 4) Elkalaf M., et al.: Low glucose but not galactose enhances oxidative mitochondrial metabolism in C2C12 myoblasts and myotubes. *PLoS One.* 8, e70772 (2013).