

# 運動負荷後における糖尿病マウス筋の筋衛星細胞の 変化について

川手 豊子<sup>1)</sup> 長谷川 達也<sup>2)</sup> 坂本 宏史<sup>1)</sup>

## Development of skeletal muscle satellite cells after swimming exercise in DM mouse gastrocnemius muscle.

KAWATE Toyoko<sup>1)</sup>, HASEGAWA Tatsuya<sup>2)</sup>, SAKAMOTO Hiroshi<sup>1)</sup>

### 抄 録

〔目的〕糖尿病患者への運動療法は血糖値やHbA1c値を指標としてその効果が確認されつつあるが、高血糖状態における運動負荷が筋細胞に及ぼす影響についてはあまり報告がない。そこで糖尿病モデルマウスとコントロールマウスに運動負荷をかけ、筋衛星細胞の活性化を指標にして筋細胞の変化を見た。〔方法〕マウス腓腹筋のパラフィン切片を作成し免疫染色を行った。〔結果〕蛍光顕微鏡による観察で特定の筋細胞膜周囲と細胞核に紫外光による自家蛍光が観察された。これらの筋細胞は腓腹筋の深部に多く見られ、表層ではまばらで、自家蛍光は運動負荷後に増えていた。この自家蛍光部位と活性化した筋衛星細胞の部位はほぼ一致していた。〔考察〕これらの筋細胞はType 2a線維であり、運動負荷で増えることが示唆されている。筋細胞の自家蛍光はニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH) 或いは、flavinとflavin含有タンパクが蛍光を発する。骨格筋は加齢や運動により筋タイプの移行が起こるが、筋肉研究においてこれら自家蛍光もマーカーとして利用できるかもしれない。

キーワード：筋衛星細胞、CD34、糖尿病、運動、マウス

1) 健康科学大学 2) 山梨県環境科学研究所

## 「はじめに」

近年、肥満者や前糖尿病患者において運動が薬剤療法と同等の効果があるという結果が報告され<sup>1)</sup>、改めて運動療法の重要性が注目されてきている。しかしながら長期的継続する運動の効果が認められているにもかかわらず、実際食後の運動は一時的に血糖値を上げてしまうということが知られている<sup>2)</sup>。そのため運動の種類とタイミングについて、正常な或は前糖尿病患者における比較研究が行われているが、論文数はまだそれ程多くなく結果も様々である<sup>3)</sup>。ヒトでの運動効果の血糖値、中性脂肪値、インシュリン濃度などが指標になっているが、高血糖時の筋肉に運動負荷を課した場合の筋の状態についての文献は少ない。そこで今回、正常マウスと2型糖尿病モデルマウス (Diabetes mellitus mouse : DM マウス) に運動負荷をかけ筋肉の形態学的変化について、特に筋原線維の増加に関与する筋衛星細胞に注目して実験を行った。以下に筋肉の発生と筋衛星細胞について簡単に紹介する。

筋肉の発生は胎生 20 日頃から発達する体節 (沿軸中胚葉由来) を起源とし、これがほぐれて皮筋板、筋板を経て、体幹の筋へと発達する。体肢の筋は肢芽の間葉細胞に由来する。筋板や間葉細胞に生じた MyoD, myf5 を発現する細胞群が筋肉へと分化する筋芽細胞となる。この筋芽細胞が互いに融合し細長い円柱を作ると各々の核は中央に並ぶ、更に細胞膜周辺から筋原線維がつくられ核周囲が明るく見えることからこの融合した細胞は筋管細胞といわれる。その後筋管細胞の核は筋原線維の増加により細胞膜下に押しやられ、筋管細胞は成熟した筋細胞 (筋線維) となり神経支配が入力することによって分化が完成する<sup>4)</sup>。

骨格筋は運動負荷をかけると筋細胞内の筋原線維が増加し運動性肥大を起こす。このメカニズムについて、筋芽細胞が融合する際にその一部が筋形質膜と基底膜の間に残り静止状態の筋衛星細胞となる。この筋衛星細胞が運動負荷などの刺激によって活動を始め、筋細胞に融合し新たに筋原線維を作ることによって筋肥大をもたらすことによる。この筋衛星細胞は成長後の、筋の維持、修復、再生にも関与している。最近の研究では老化した筋の培養においても、筋衛星細胞は分裂し筋細胞をつくることができると報告されている<sup>5)</sup>。

## 「材料と方法」

この動物実験は健康科学大学動物実験指針 (許可番号 : 24 - 7) に基づき行われている。

**動物 :** 2型糖尿病モデルマウス (C57BL/6JHamSlc-ob/ob mouse) (7週齢4匹) とコントロールマウス (C57BL/6JHamSlc+/+ mouse) (7週齢4匹) (日本 SLC、浜松) をそれぞれ2匹ずつ2群に分け、運動負荷群と通常飼育群とした。これらマウスは山梨県環境科学研究所動物飼育室 (20℃、1気圧、12時間昼夜管理) で飼育し、運動負荷は同施設で2週間毎日 (土日を除く) 行った。運動負荷の方法は、プラスチック水槽 (46cm × 33cm) (水温約 30 - 33℃) 内で5分水泳、10分休憩、5分水泳で行った。この間、運動負荷前に体重測定 (毎回)、血糖値測定 (ニプロフリースタイルフリーダムライト S) (4回)、HbA1C

測定（3回）を行っている。

2型糖尿病モデルマウス（DM マウス）とコントロールマウスは運動負荷 2 週間後に、4 % パラホルムアルデヒドで心臓から灌流固定を行い、直ちに腓腹筋を取り出し同固定液で 2 4 時間後固定を行った。その後、通常の方法でパラフィン包埋を行い、スライドガラス上にパラフィン切片を作成した。

**免疫組織科学：**上記で作成した腓腹筋のパラフィン切片を脱パラフィンの後、EDATA-Tris buffer（約 <math>pH9.0</math>）にいれオートクレーブ（121℃ 5分）で抗原賦活化を行い、充分冷却した後、免疫染色に用いた。一次抗体は筋衛生細胞のマーカーとして anti-CD34 antibody（Rat Monoclonal Antibody）を用い、二次抗体は Cy3-conjugated donkey anti-rat IgG（Jackson Immunoresearch）で蛍光標識をするか、ABC kit（Vector Laboratory）で酵素抗体法を行った。染色された切片は正立蛍光顕微鏡（OLYMPUS BX50）で観察した。

## 【結 果】

DM マウスとコントロールマウスの体重、血糖値、HbA1C 値を測定し、その結果を表 1、2、3 にまとめた。体重は灌流固定前（10 週齢）で DM マウスが正常マウスの約 2 倍で、四肢が身体に埋まるような状態で腹部をこすりながら歩いていた。血糖値も灌流固定前で DM マウスでは 200mg/dl 以上あり高血糖状態であった。HbA1c 値は飼育 2 週間後の測定値でやはり 6 % 以上で高血糖状態を示していた。このように DM マウスとコントロールマウス間での測定値の違いは明らかであったが、実験期間が 2 週間と短期間であったためコントロールマウス間、DM マウス間の運動負荷の効果がこれらの測定結果に反映されることはなかった。しかしながら、運動負荷群における生体の活発度は明らかに違いがあり、運動負荷をかけていない DM マウスは毛づやも悪くほとんど動かない状態であった。また、図で示してはいないが、運動負荷をかけていない DM マウスは腓腹筋筋膜の内側に脂肪が蓄積しており、筋内に脂肪が入り込んでいる様子も見られたが、腓腹筋の最大径は通常飼育のものとはほとんど変わらなかった。

図 1 は通常飼育を行ったコントロールマウスと DM マウスの腓腹筋と足底筋（図 1 - b、c に表示）である。この図は蛍光染色を行っているが、Cy 3 による赤色蛍光ではなく、白く点状に見えている部位は紫外光（UV）によって自家蛍光を発した筋細胞膜周囲と細胞核である。自家蛍光は図の左側（骨側）の筋細胞に多く見られ、右側（筋の表層）ではまばらであった。運動負荷を課した腓腹筋において、定量化を行っていないが明らかに自家蛍光を発する筋細胞が筋深部で増えており、筋表層でもやや増えている像が見られた。これらの自家蛍光は Cy3 染色（抗 CD34 抗体反応）を行った赤色蛍光とほぼ一致していたが、染色を行っていない緑色蛍光が自家蛍光の一部と重なって観察された。これらの自家蛍光はパラフィン切片察でも直接観見られたが、HE 染色切片ではやや薄いものもあったがほと

表1 体重の変化 (g) 各数値は n=2 の平均

マウス群	実験前	灌流固定前	増加率
1 (水泳)	24.7	27	1.09
2 (通常飼育)	23	25.4	1.1
3 (水泳)	41.6	50.6	1.22
4 (通常飼育)	39.3	47.2	1.2

マウス群 1、2はコントロールマウス 3、4はDM マウス

表2 血糖値 (mg/dl) 各数値は n=2 の平均

マウス群	実験前	灌流固定前	増加率
1 (水泳)	113	155.5	1.38
2 (通常飼育)	139	167.5	1.21
3 (水泳)	170	204	1.2
4 (通常飼育)	224.5	227.5	1.01

マウス群 1、2はコントロールマウス 3、4はDM マウス

表3 HbA1c (%) 各数値は n=2 の平均 (\*ヒト平均 5.0 ± 0.35%)

マウス群	実験前	2週間後	増加率
1 (水泳)	3.8	3.6	0.95
2 (通常飼育)	3.5	2.8	0.8
3 (水泳)	4.8	6.2	1.29
4 (通常飼育)	5.2	6	1.15

マウス群 1、2はコントロールマウス 3、4はDM マウス

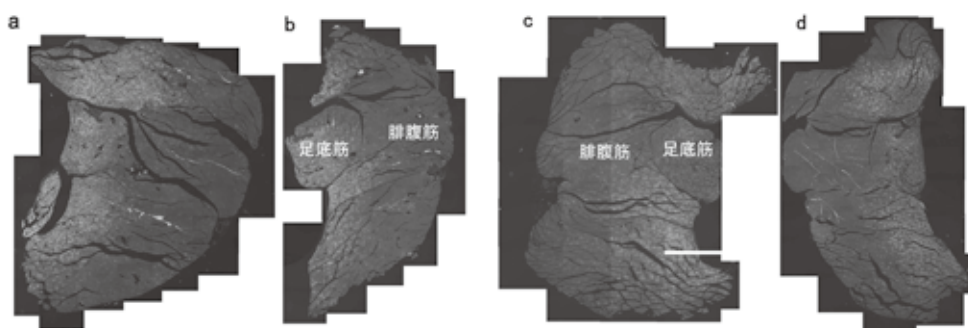


図1 腓腹筋・足底筋における自家蛍光 (UV 励起による)

図1-aは通常飼育運動負荷マウス

図1-bは通常飼育コントロールマウス

図1-cは運動負荷2型糖尿病モデルマウス

図1-dはコントロール2型糖尿病モデルマウス

図1-a, cは運動負荷群で自家蛍光を持つ細胞が筋の深部で多く見られた。

図1-b, cに腓腹筋・足底筋を示す。

んど観察されなかった。

図2は酵素抗体法(ABC法)による抗CD34抗体反応の結果を示しており、筋衛星細胞の活性化を示している。反応産物は図1で自家蛍光を発していた細胞とほぼ同じ部位で、細胞膜下で活性化した筋衛星細胞(図2-b:矢印)が観察され、\*で示した筋細胞では細胞膜周囲で筋衛星細胞が分裂増殖しているような像が見られる。

## 〔考 察〕

近年、糖尿病患者の増加に伴い生活習慣の改善や栄養指導、薬物療法の研究が進んできているが、特に前糖尿病患者に対して運動療法が注目されてきている。現在食後血糖値を下げる効果がある運動について、空腹時か食後か、或は有酸素運動か持久力を必要とする運動かなど、様々な要素について検討がなされている<sup>3)</sup>。しかしながら、糖尿病の筋が運動によってどのように変化するのかということについての記述は少ない。そこで、2型糖尿病モデルマウス(ob/ob mice)(DMマウス)を用いて、運動負荷をかけ筋原線維を作る筋衛星細胞の変化を形態学的に調べた。また、DMマウスの一般状態、高血糖状態を把握するために体重、血糖値、HbA1c値を測定した。

DMマウスとコントロールマウスの測定値の違いは明らかであったが、運動負荷の効果がこれらの測定結果に反映されることはなかった。これは実験に用いたDMマウスがレプチン欠損マウス(ob/ob mice)で、食欲の制御が効かず運動効果は現れにくかったか、或いは運動負荷が2週間と短かったため測定値に効果が現れなかったのかもしれない。

正常な筋細胞は運動負荷により筋衛星細胞が活性化し筋原線維を増やし、運動性肥大を起こすことが知られている。今回ABC法における観察からコントロールマウスとDMマウ

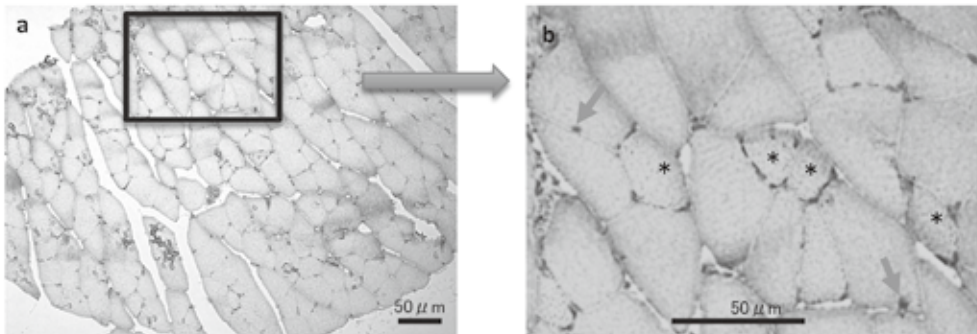


図2 腓腹筋筋衛星細胞(ABC法)

図2-aは腓腹筋の一部で、図2-bは図2-aの一部を拡大したものである。抗CD34抗体に反応した筋衛星細胞は茶色に染色され筋細胞周囲に局在する。図2-bの矢印は、活性化した筋衛星細胞が筋細胞内に入った状態を示している。図2-bの\*で示した細胞は、筋細胞周囲が点状に濃染していることから筋衛星細胞が分裂増加している像であるかもしれない。

スの筋で、明らかに運動負荷群で筋衛星細胞の活性化が観察され、比較的小型の筋細胞周囲で筋衛星細胞が増殖しているような像が見られた。これらは運動負荷を与えなかった DM マウスではあまり見られなかったことから、高血糖状態の DM マウスにおいても筋は運動負荷に応答したということを示している。

今回の実験では、ホルマリン固定後パラフィン切片を作成し、これを免疫組織科学的方法で染色した。この切片を観察した結果、特定の筋細胞に自家蛍光のあることがわかり、しかもその分布が腓腹筋の深部と浅部で異なることが観察された。この自家蛍光を発する筋細胞は Type 2a 線維 (但しマウスの場合赤筋) であることが報告されている<sup>6)</sup>が、深部と浅部で分布に差があることについてはよくわかっていないようである。筋細胞の自家蛍光は NADH が UV (350nm) と 440-470nm で、flavin と flavin 含有タンパクが 488nm と 520-560nm の間で蛍光を発することがわかっている。このことから、筋衛星細胞は活性化、或は増殖をする際に上記の物質を多く含むのではないだろうか。筋肉研究を行う際はこれら自家蛍光に十分に注意を払う必要があるが、この自家蛍光を発する筋細胞が筋の再生に関係があるかもしれないということは興味深い。

骨格筋は加齢或は運動により筋タイプの移行が生ずることも示唆されている。糖尿病状態での筋がどの程度再生可能であるかということは興味ある課題である。

謝 辞:この実験は「平成 24 年度健康科学大学研究助成金」を得ておこなわれたものであり、大学並びに研究委員長山本康宏教授に謝意を表します。パラフィン包埋とパラフィン切片作成は山梨大学医学工学総合研究部大学院病理学講座人体病理学教室の加藤良平教授、依田美紀子技官のご協力を得ました。両氏に心から謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Huseyin Naci researcher fellow, John P A Ioannidis director (2013) : Comparative effectiveness of exercise and drug interventions on mortality outcomes: metaepidemiological study. *BMJ*, 347: f5577 doi: p1-14
- 2) Szwieczek J, Dulawa J, Strzalkowska D, Hornik B, Kawecki G. (2007) : Impact of the short-term, intense exercise on postprandial glycemia in type 2 diabetic patients treated with gliclazide. *J Diabetes Complications*; 21: 101-107.
- 3) Haxhi J, Scotto di Palumbo A, Sacchetti M. (2013) : Exercising for metabolic control: Is timing important? *Ann Nutr Metab*; 62: 14-25.
- 4) 安田峯生訳 : ラングマン人体発生学 (第 10 版)、メディカル・サイエンス・インターナショナル、pp73-85, 2010.
- 5) 壺中征哉 : 臨床のための筋病理学 (第 4 版)、日本医事新報社、pp19-25, 2011.
- 6) Jackson KA et al (2004) : Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence : potential for engraftment artifacts. *Stem Cells*, 22 : 180-187

## Abstract

Previous studies have reported the effects of kinetic therapy in patients with diabetes mellitus by measuring blood glucose or HbA1c levels. However, only few studies have reported on the influence of forced exercise on muscle fibers under hyperglycemia condition. Therefore, the current study examined the effect of forced exercises on the skeletal muscles by measuring satellite gastrocnemius muscle cells activities in control and type 2 diabetes mellitus mice. Paraffin sections from the gastrocnemius muscles of these mice were used for immunohistochemistry. The results indicated that autofluorescence through exposure to ultraviolet light was observed in particular gastrocnemius muscle cells and cell nucleus. These cells were present in clusters in the deep area but were sparse in the superficial area of the gastrocnemius muscle. Moreover, the autofluorescence muscle cells were increased after forced exercise. It was found that such autofluorescence areas and the area where satellite cell activation was observed were highly overlapped. These autofluorescent cells are suggested to be type 2a muscle fibers and have the potential to be increased through forced exercises. Autofluorescence of muscle fibers on ultraviolet light is attributed to the presence of NAD<sup>+</sup> and NADH, which reflect light at wavelengths of 440–470 nm, and flavin and flavin-containing protein, which reflect light at wavelengths of 488 nm and 520–560 nm. The skeletal muscles are altered to the fiber type with exercise or aging. Thus, it may be possible to study skeletal muscles of diabetes patients using the autofluorescence property of type 2a fibers.

Key words : skeletal muscle satellite cells

CD34

diabetes mellitus

exercise

mouse

