筋繊維形成と小胞体ストレス 「正常」なストレスを筋芽細胞の培養に利用する

動物細胞の培養は約 100 年の歴史があり、合成培地と動物血清を用いるようになってからも半世紀以上経つ。培養細胞は大きく分けて、生体から取り出した細胞塊をバラバラにした初代培養細胞と、無限または多数回の細胞分裂ができるようになった株化細胞の 2 種類ある。細胞培養技術の基本はすでに確立しているといえてよく、様々な組織由来の細胞が培養可能である。筆者らは、骨格筋の分化過程におけるアポトーシスの研究を進めるうちに、小胞体ストレス（後述）が分化過程に組み込まれている可能性を見いだしたため、細胞培養条件を設定する上でストレスを考慮するという新たな試みを行なっている。

骨格筋のもととなる筋芽細胞は最終分化によって筋繊維（筋肉）となる。筋芽細胞はすでに筋肉へ分化することを決定づけられている細胞であるが、筋繊維となるまでに大きな変化を経験する。筋芽細胞どうしは多数融合して多核細胞（筋管）になり、細胞の中では筋肉特有のタンパク質（アクチン、ミオシンなど）が発現し筋原繊維を形成する（図 1）。小胞体は筋小胞体に変換する。小胞体は真核細胞がもつ細胞内小器官で、膜タンパク質、分泌タンパク質の合成、修飾、立体構造形成の場である他、カルシウム貯蔵、脂質合成の場でもある。筋小胞体は筋腹繊維を包み込むように発達し、カルシウムの放出によって筋収縮を起こさせる。そして筋原繊維が形成され、細胞が収縮能を獲得してはじめて筋肉らしくなる。この筋管、筋繊維の形成過程における遺伝子発現調節の変化や細胞内構造の変化を調べることによって分化機構の理解が進んできた。また、シャーレの中でつくられる筋繊維は薬剤のスクリーニングに用いられている。筋肉は食事で摂取された糖を最も多く取り込む組織であり⁽¹⁾、筋繊維の糖取り込みや糖代謝を変える薬剤は糖尿病に対する薬の開発につながることが期待されている。

シャーレの中で筋芽細胞を筋繊維細胞にする試みも半世紀ほど前に始まった。筋芽細胞は胚の筋節（筋肉になる予定の領域）に多く含まれる他、成体の筋肉では筋衛星細胞と呼ばれる未分化な細胞として存在する。株化細胞としてはマウスの C2C12 細胞、ラットの L6 細胞などが樹立されている。これらの筋芽細胞をゼラチンなどで

図1 ■ 筋分化の過程

筋芽細胞は融合して筋管からさらに筋繊維へと分化する。

コートしたシャーレの中でサブコンフルエント（シャーレの全面をほぼ覆うほど増殖した状態）まで培養し、培地を増殖培地から分化培地に換えると、細胞増殖が停止して分化が誘導される⁽²⁾。増殖培地と分化培地に含まれる血清の種類と濃度は大きく異なり、それぞれウシ胎仔血清（10～20%）、ウマ成体血清（1～2%）が用いられる。

株化筋芽細胞は実質的にいくらかでも増やすことができ、保存も容易である。しかし、同じ名前の株化細胞でも研究室が異なると分化能には大きな違いがあり、細胞融合がほとんど進まない場合もある。分化能の高いクローンを選び、培養開始から少ない経代数のうちに分化誘導する工夫が効率の良い分化には必要である。それでも多くの場合、小さな筋管が形成されるにとどまる。初代培養筋芽細胞から筋繊維をつくるのは比較的容易であるが、細胞採取のために生体を傷つける必要がある上、筋芽細胞以外の細胞種が混ざるのは避けがたく、再現性良く細胞を調製することは簡単ではない。

筋管が形成されるときは、すべての筋芽細胞が融合に加わるのではなく、一部の細胞はアポトーシスを起こして死ぬ。この現象は1世紀以上前にすでに観察されており⁽³⁾、同様の現象はシャーレの中の培養筋芽細胞についても見られていた。ただし、どのようにして死ぬのかはほとんどわかっていなかった。アポトーシスはカスパーゼ・プロテアーゼファミリーによって実行される。カスパーゼは高等動物の細胞内に10種類ほど常時存在して

おり、そのうちの4,5種類が組となって少なくとも3つの活性化カスケードを形成している⁽⁴⁾。アポトーシスの起こるきっかけはいろいろあり、たとえば細胞外から来るアポトーシス促進因子、栄養枯渇がそれぞれ特異的なカスパーゼ・カスケードを起動して細胞を死に至らしめる。

細胞内でつくられるタンパク質のうち半分程度は小胞体を通り、その間に立体構造を形成する。何らかの原因で小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積した状態を小胞体ストレスといい、アポトーシスを引き起こすことがここ10年ほどの間に明らかにされてきた。小胞体ストレスによって特異的に起動するカスケードについてはマウスを用いた研究が進んでおり、カスパーゼ12を起点とするカスケードが活性化していることが示唆されている^(5,6)。カスパーゼ12がマウス胚の筋組織に多く発現していることから、筋繊維形成に伴うアポトーシスとこのプロテアーゼの関係が調べられた。マウス胚で筋繊維形成が始まる胎生13.5日の時期にカスパーゼ12の発現上昇が起こり、アポトーシスを起こしている細胞ではカスパーゼ12が活性化していることが判明した⁽⁷⁾。カスパーゼ12の活性化は小胞体ストレスが生じていることを強く示唆しており、実際に、同じ時期にストレス応答タンパク質の発現上昇が起こる。カスパーゼ12の活性化と小胞体ストレスマーカーの発現上昇はC2C12細胞の分化でも認められている。興味深いことに、小胞体ストレスシグナル系を遮断する薬剤を用いて筋芽細胞を処理すると、分化誘導培地中におけるアポトーシスおよび筋管の形成が著しく阻害される⁽⁷⁾。分化中の筋芽細胞小胞体内に構造異常タンパク質が蓄積しているか否かは不明であるが、小胞体ストレスシグナルがアポトーシスや筋分化を促進することが示唆される。

培養筋分化系でも小胞体ストレス(様)ストレスが生じるが、培養条件を確立する上でストレスは考慮されていない。小胞体ストレスを付加してから分化誘導を行なうとどうなるのだろうか。小胞体に存在する酵素の阻害剤の中には小胞体ストレスを引き起こすものがある。この阻害剤処理を短時間行なってから分化を誘導すると、筋繊維形成効率、アポトーシスともに劇的に増えた⁽⁸⁾。そして、融合細胞あたりの核数、サイズとも1桁以上増大し、筋原繊維を含み自立的収縮能を示す筋繊維細胞が多数出現した(図2)。ストレス処理がない場合には筋原繊維は検出されず、収縮する細胞はほとんどない。また、

図2 ■ ストレス処理後の細胞内に検出された筋原繊維
アクチン結合タンパク質の免疫染色によって、ストレス処理群には筋原繊維の縞模様が見える。

処理しない場合に比べて短期間により多くの細胞でアポトーシスが起った。ストレス処理によって筋繊維形成、アポトーシスともに効率が上昇したのである。

細胞培養では細胞を丁寧に扱うことが基本であり、熱、乾燥、圧力などといったショックを細胞に与えないようにする気遣いが大事である。しかし、細胞分化過程においては細胞構造、遺伝子発現、タンパク質合成、分解、分泌など細胞自身に様々な大変化が起こる。これがある種のストレスとなり、小胞体で検知されているらしい。小胞体ストレスが筋繊維形成促進効果をもつことは、ストレスが分化過程に組み込まれて役に立っていることを示唆している。生体内での小胞体ストレス(様)ストレスの実体を探ることとともに、筋分化系以外の分化系においてストレスが何らかのポジティブな働きをしているかどうか検討する価値がある。

- 1) R. A. DeFronzo, E. Jocot, E. Jequier, E. Maeder, J. Wahren & J. P. Felber: *Diabetes*, **30**, 1007 (1981).
- 2) F. E. Stockdale & M. Holtzer: *Exp. Cell Res.*, **24**, 508 (1961).
- 3) E. Godlewski: *Arch. mikr. Anat.*, **60**, 111 (1902).
- 4) K. F. Ferri & G. Kroemer: *Nature Cell Biol.*, **3**, E255 (2001).
- 5) T. Nakagawa, H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner & J. Yuan: *Nature*, **403**, 98 (2000).
- 6) N. Morishima, K. Nakanishi, H. Takenouchi, T. Shibata & Y. Yasuhiko: *J. Biol. Chem.*, **277**, 34287 (2002).
- 7) K. Nakanishi, T. Sudo & N. Morishima: *J. Cell Biol.*, **169**, 555 (2005).
- 8) K. Nakanishi, N. Dohmae & N. Morishima: *FASEB J.*, **21**, 2994 (2007).

(森島信裕, 中西慶子, 理化学研究所中央研究所)