

経口の食事により分泌が刺激される 消化管ホルモンを利用した新規骨格筋増強策の開発

豊橋創造大学大学院 後 藤 勝 正
(共同研究者) 同 青 島 恵
豊橋創造大学 横 山 真 吾

New Aspects of Oral Food Intake-Associated Hormone in Increasing of Skeletal Muscle Mass

by

Katsumasa Goto, Megumi Aoshima
*Department of Physiology, Graduate School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University*
Shingo Yokoyama
*Laboratory of Physiology, School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University*

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the effects of gastric inhibitory polypeptide (GIP), so-called glucose-dependent insulintropic polypeptide, and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonist exendin-4 (Ex4) on mouse myoblast-derived cell line C2C12. Muscle protein content in C2C12 myotubes was increased by 10^{-8} M GIP ($p < 0.05$). On the other hand, Ex4 (10^{-8} and 10^{-6} M) had no impact on muscle protein content of C2C12 myotubes. GIP-associated increase of muscle protein content in C2C12 myotubes was observed in GIP-receptor-knockdown cells. However, GIP-associated effects on C2C12 myotubes was partially attenuated by knockdown of GIP receptor. GIP receptor knockdown itself has a stimulating effect on

proliferative potential of C2C12 myoblasts. Evidences from this study strongly suggest that digestive hormone GIP may increase or maintain skeletal muscle mass. Oral food intake-associated digestive hormone(s) may be a potential tool for skeletal muscle hypertrophy.

要 旨

本研究では、骨格筋細胞のタンパク量変化に対する消化管ホルモンである GIP および GLP-1 受容体アゴニスト exendin-4 (Ex4) の影響を追究し、骨格筋量の維持・増量に対する経口の食事の意義を明らかにすることを目的とした。実験には、マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を用いて、培地に GIP あるいは Ex4 を添加して一定期間培養した後細胞を回収し、筋タンパク量から GIP あるいは Ex4 の影響を評価した。GIP は筋タンパク量を有意に増加させたが、Ex4 は筋タンパク量に有意な変化は与えなかった。GIP による筋タンパク量の増量効果は、siRNA を用いて GIP 受容体をノックダウンしても認められた。しかし、この GIP 依存性の筋タンパク増量作用は、GIP 受容体ノックダウンにより一部抑制された。また、GIP 受容体ノックダウンは、C2C12 筋芽細胞の増殖を促進することが確認された。したがって、経口の食事により分泌される消化管ホルモン GIP が骨格筋量の維持に寄与することが示唆された。

緒 言

一般に、食事や栄養の摂取は、一部に精神的な要素含まれる¹⁾ものの、カロリーや各種栄養素の補給としての意義が強調される傾向にある。実際、サプリメントと称する機能性食品が氾濫し、健康を意識する人々やスポーツ愛好家に好まれる傾向がある。

一方で、経口の食事により消化管から分泌が刺激されるホルモン「消化管ホルモン」の存在は古

くから知られている。消化管ホルモンは、食事のイメージによって一部分泌されるものもあるが、その多くは摂食した内容物が消化管運動により消化管を運搬されながら消化されるのに伴って、順次消化管より内分泌され、血液を介して消化管に作用して消化管における消化吸収機能を制御する働きを持つ。しかし最近になって、こうした消化管ホルモンには、消化管以外の組織への作用が確認されている²⁾。

例えば、胃運動を抑制する胃抑制性ポリペプチド (gastric inhibitory polypeptide : GIP) は消化管ホルモンとして古くから知られている³⁾が、膵臓 β 細胞に作用してインスリン分泌を刺激する作用を持つことが明らかにされている。この GIP はグルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1 : GLP-1) と共にインクレチンとして、インスリン分泌を促進するので、糖尿病治療の新規ターゲットとして注目されている^{4,5)}。インクレチンとしての GIP は発見された当初の胃抑制性ペプチドとしてではなく、インスリンを分泌される glucose-dependent insulinotropic polypeptide の略としても扱われている³⁾。

GIP の標的すなわち GIP の受容体は、胃および膵臓 β 細胞以外に、骨格筋細胞にも GIP 受容体が発現していることが明らかにされている^{6,7,8)}。GIP は骨格筋細胞に対してインスリン様作用すなわち骨格筋細胞への糖の取り込みを促進することが2014年に報告された⁹⁾。しかし、一方で、インスリンは骨格筋細胞に対して糖取り込みを促進するだけでなく、タンパク合成作用(アナボリック作用)を発現する¹⁰⁾が、GIP が骨格筋細胞に

対して直接アナボリック作用を持つか明らかでない。また、GLP-1は骨格筋細胞に対して毛細血管誘導作用や糖取り込み促進作用を示すことが報告されている⁹⁾が、骨格筋量に対するGLP-1の影響に関する報告も見当たらない。

そこで本研究では、骨格筋細胞のタンパク量変化に対するGIPおよびGLP-1の影響を追究し、骨格筋量の維持・増量に対する経口の食事の意義を明らかにすることを目的とした。

1. 方法

骨格筋細胞のタンパク質変化に対するGIPおよびGLP-1の影響を明らかにするために、培養骨格筋細胞実験を採用した。実験には、マウス筋芽細胞由来細胞株C2C12細胞を用いた。C2C12細胞は、タイプIコラーゲンがコーティングされた培養プレート（直径35mm）を用い、増殖培地にてサブコンフルエント状態にまで増殖させた。そして、分化誘導前の筋芽細胞および分化誘導後の筋管細胞を用いて検討した。

1. 1 GLP-1が骨格筋細胞に与える影響

GLP-1受容体アゴニストexendin-4 (Ex4)を用いて検討を行った。C2C12細胞を培養し、分化誘導4日後の細胞に対して、最終濃度が0 M, 10^{-8} M, 10^{-6} Mとなるようにdimethyl sulfoxide (DMSO)にて調整したEx4を培地に添加し、48時間培養を継続した。48時間の培養後、すべての細胞を回収し、分析用サンプルとした。なお、作用させるEx4濃度は、予備実験の結果、最大の効果が得られる濃度として決定した。

1. 2 GIPが骨格筋細胞に与える影響

C2C12細胞を培養し、分化誘導時に最終濃度が0 Mあるいは 10^{-8} MとなるようにDMSOにて調整したGIPを培地に添加し、その後6日間培養を継続した。6日間の培養終了後、すべての細

胞を回収し、分析用サンプルとした。なお、作用させるGIP濃度は、予備実験の結果、最大の効果が得られる濃度として決定した。また、C2C12細胞を播種1日後、増殖中の培地にGIPを添加し、24時間増殖を継続した。この実験により、C2C12筋芽細胞の増殖に対するGIPの影響を検討した。

本研究では、添加したGIPの作用がGIP受容体を介したのか確認するために、RNA干渉法¹¹⁾によりGIP受容体をノックダウンした細胞を用いて検討した。一部の細胞を対象に、分化誘導前にGIP受容体に対するsiRNA (Qiagen, siGIPR)をRNAiMAX (Life Technology)によりトランスフェクションし、GIP受容体のノックダウンを試みた。対照にはscrambled siRNA (siScramble: Qiagen)を同様に培地に添加して細胞にトランスフェクションした。サブコンフルエント状態のC2C12細胞をsiScrambleあるいはsiGIPRで24時間処理した後、分化培地に交換することで筋管細胞への分化を誘導した。分化培地にGIPを添加して、GIPの作用がGIP受容体を介したのか検討した。

1. 3 筋タンパク量の評価

本研究では、GLP-1 (exendin-4) およびGIPが骨格筋細胞に与える影響を、全筋タンパク量にて評価した。C2C12細胞をホモジネートバッファーであるCellLytic M (Sigma-Aldrich)にProtease Phosphatase Inhibitor Cocktail (Cell Signaling Technology)を用いて完全にホモジネートし、冷却遠心分離(12,000回転, 4°C, 15分間)して上清を得た^{11,12)}。この上清中に含まれるタンパク量をBradford法(Protein Assay Kit, Bio-Rad)により測定し、筋タンパク量として評価した¹³⁾。

1. 4 リアルタイム RT-PCR

本研究では、siRNA 処理によるノックダウンの効率の評価は、siScramble に対する siGIPR 処理による GIP 受容体の mRNA 発現量により評価した。mRNA 発現量の評価は、リアルタイム RT-PCR にて実施した¹²⁾。サンプル中の RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) により抽出した。抽出した RNA サンプル (~40 ng RNA) は、cDNA synthesis kit Prime Script RT Master Mix (Perfect Real Time) for mRNA : タカラバイオ]を用いて complementary DNA (cDNA) に逆転写した。合成した cDNA は Takara SYBR Premix Ex Taq II を用いて、Takara Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Software Ver. 4.00 (タカラバイオ) を使い、reverse-time reverse transcription-PCR (Thermal Cycler Dice[®] Real Time System II MRQ : タカラバイオ) を行った。反応状況は、95℃で30秒を40サイクル、95℃で5秒、60℃で30秒とした。各遺伝子の増幅に用いたプライマーの配列は、GIP 受容体は 5' -GCCAAACTGGCCTTTGAAATC (forward), 5' -ACGTGGACCTGCTCTTGA (reverse) とした。内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA を用い、GAPDH に対する各遺伝子発現レベルの相対的発現量の評価した。GAPDH のプライマーの配列として、3' -TGTGTCCGTCGTGTGGATCTGA-5' (forward), 3' -TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-5' (reverse) を用いた。

1. 5 統計処理

Ex4 が筋タンパク量の及ぼす影響に関しては、一元配置分散分析後、多重比較検定 (Tukey-Kramer) により Ex4 濃度による差の検定を行った。一方、GIP の影響に関しては、Student's t-test を用いて、群間差の検定を行った。また GIP 受

デサントスポーツ科学 Vol. 40

容体ノックダウンが GIP による筋タンパク増加に及ぼす影響については、siRNA 処理と GIP 添加を要因とした二元配置分散分析を行い、交互作用が認められた場合は多重比較検定 (Tukey-Kramer) を行った。危険率 5% 未満をもって統計学的に有意差ありと判定した。

2. 結果

2. 1 Ex4 が筋タンパク量に及ぼす影響

図 1 に筋タンパク量に及ぼす GLP-1 受容体アゴニストとしての Ex4 の影響を示した。低濃度の Ex4 (10^{-8} M) では筋タンパクに変化は認めなかった。一方、高濃度 (10^{-6} M) の Ex4 は筋タンパク量を増加させる傾向が認められたが、統計学的な有意差は認めなかった。

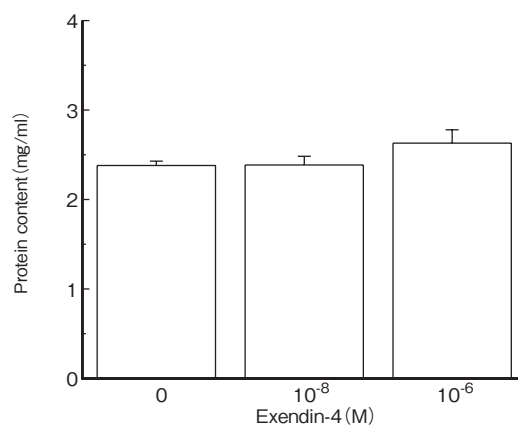


図1 グルカゴン様ペプチド-1 (glucagon-like peptide-1 : GLP-1) 受容体アゴニスト exendin-4 (Ex4) が C2C12 筋管細胞タンパク量に及ぼす影響

平均値 ± 標準誤差, n = 5 (0 M), 4 (10^{-8} M), 5 (10^{-6} M)

2. 2 GIP が筋タンパク量に及ぼす影響

本研究では、分化誘導時に GIP を培地に添加 (10^{-8} M) し、GIP が筋タンパク量に及ぼす影響を評価した。その結果、GIP は筋タンパク量を増加させた (図 2, $p < 0.05$)。この GIP による筋タンパク量の増加作用が GIP 受容体を介したものが確認するために、GIP 受容体のノックダウンを

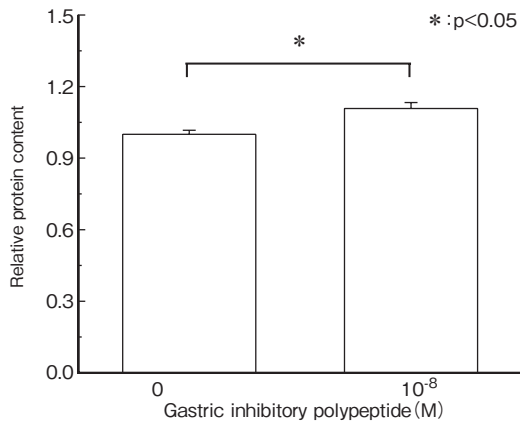


図 2 胃抑制性ポリペプチド (gastric inhibitory polypeptide: GIP) が C2C12 筋管細胞タンパク量に及ぼす影響

GIP が 0 M の条件でのタンパク量を基準 (1.0) として, GIP が 10⁻⁸ M の条件でのタンパク量を相対値で表示している. 平均値 ± 標準誤差, n = 5.

試みた.

本研究で用いた方法により, GIP 受容体発現量が約 50% 低下した (図には示していない). この GIP 受容体がノックダウンされた細胞に対して GIP (10⁻⁸ M) を作用させて筋タンパク量を評価した. 二元配置分散分析の結果, 有意な主効果 (siRNA 処理および GIP 添加) ならびに交互作用が認められた (図 3). GIP 受容体ノックダウンしても, GIP 添加は筋タンパク量を有意増加させた (p<0.05). しかし, GIP 添加による筋タンパ

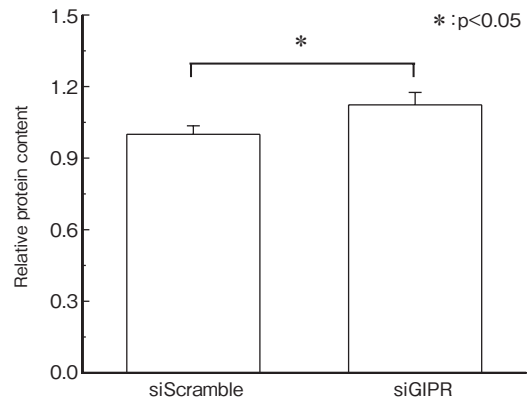


図 4 胃抑制性ポリペプチド (gastric inhibitory polypeptide: GIP) 受容体ノックダウンが C2C12 筋芽細胞タンパク量に及ぼす影響

siScramble: 対照条件, siGIPR: GIP 受容体ノックダウン条件. 対照条件 (siScramble) でのタンパク量を基準 (1.0) として, siGIPR 条件で得られたタンパク量を相対値で表示している. 平均値 ± 標準誤差, n = 6.

ク量のレベルは, GIP 受容体ノックダウンにより有意に低下した (p<0.05).

また, GIP 受容体ノックダウンが C2C12 筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を評価した. GIP 受容体ノックダウンは, 筋芽細胞の増殖を促して, 筋タンパク量を増加させた (図 4, p<0.05)

3. 考 察

本研究では, 消化管ホルモンである GLP-1 受

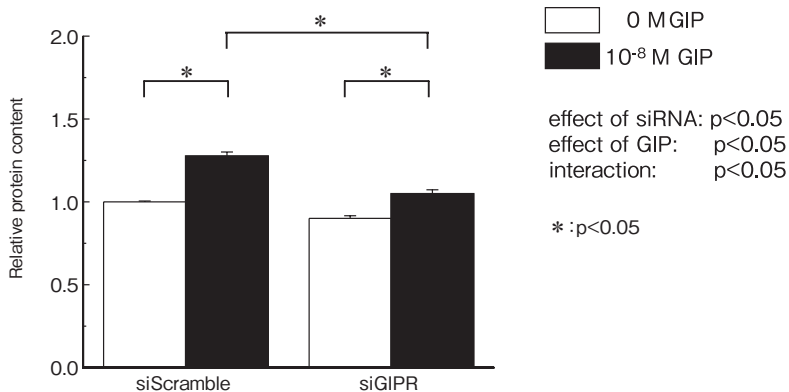


図 3 胃抑制性ポリペプチド (gastric inhibitory polypeptide: GIP) 受容体ノックダウンならびに GIP が C2C12 筋管細胞タンパク量に及ぼす影響

siScramble: 対照条件, siGIPR: GIP 受容体ノックダウン条件. 対照条件 (siScramble) かつ GIP が 0 M の時のタンパク量を基準 (1.0) として, 各条件で得られたタンパク量を相対値で表示している. 平均値 ± 標準誤差, n = 3

容体アゴニスト Ex4 および GIP が骨格筋細胞に及ぼす影響について、C2C12 細胞を用いて筋タンパク量から検討した。GIP は筋タンパク量を増加させたが、Ex4 は筋タンパク量に影響を与えなかった。GIP による筋タンパク量の増加は、GIP 受容体をノックダウンしても認められた。しかし、この GIP 依存性の筋タンパク増量作用は、GIP 受容体ノックダウンにより一部抑制された。また、GIP 受容体ノックダウンは、C2C12 筋芽細胞の増殖を促進した。

本研究では、消化管ホルモンの 1 つである GIP は筋タンパク量を増加させた。これまで、GIP が筋タンパク量に及ぼす影響に関する報告はなく、本研究が初めての報告である。本研究結果は、食事の経口摂取に伴い内分泌される GIP が、骨格筋量の維持あるいは増量に寄与する作用を持つことを強く示唆するものであると考えられる。しかし、本研究の結果は、培養骨格筋細胞を対象としたものであることから、今後さらに動物実験などを含めた検討が必要であると考えられる。

一方、同じ消化管ホルモンの GLP-1 の受容体アゴニストである Ex4 に筋タンパク量を増加させる作用は認められなかった。骨格筋における GLP-1 受容体の発現はすでに報告されている¹⁴⁾が、本研究で用いた C2C12 筋芽細胞および筋管細胞における GLP-1 受容体発現についての報告はない。そこで、本研究では C2C12 筋芽細胞ならびに筋管細胞に GLP-1 受容体が発現していること、さらに筋芽細胞に比べて筋管細胞にその発現量が高いことは予備実験の段階で確認した(データは示していない)。一方、これまで Ex4 は骨格筋細胞のグルコース取り込みを促進すること⁹⁾が報告されているが、骨格筋量に対する Ex4 あるいは GLP-1 の作用に関する委報告はない。したがって、GIP とは異なり GLP-1 は骨格筋増量作用を持たないことが示唆される。

本研究で認められた GIP による筋タンパク増

加は、GIP 受容体ノックダウンにより一部抑制された。したがって、GIP の筋タンパク増量作用の一部は GIP 受容体を介したものであると考えられた。しかし、GIP 受容体ノックダウンしても GIP による筋タンパク増量効果が部分的に残存したことは興味深い。

1 つの仮説として、GIP 受容体ノックダウンにより GIP の作用は喪失しているものの、GIP 受容体ノックダウン自体に、筋タンパク量を増加させる作用があることが考えられる。本研究では、C2C12 筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導直前、すなわち筋芽細胞の GIP 受容体のノックダウンを試みた。もし、GIP 受容体ノックダウンが筋芽細胞の増殖を刺激すると、結果として筋タンパク量の増加が少なからず起こると考えた。そこで、GIP 受容体ノックダウンが C2C12 筋芽細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果、予想通り GIP 受容体ノックダウンは筋芽細胞の増殖を促進した(図 4)。このことが、GIP 受容体ノックダウン細胞でも GIP 添加による筋タンパク増量効果を残存させたのかもしれない。GIP 受容体ノックダウンが増殖を抑制する分子機序は不明であり、今後さらなる検討が必要である。

一方で、GIP 受容体ノックダウンのみでは、筋タンパクに有意な差は認めなかった。したがって、本研究で用いた GIP 受容体ノックダウン細胞には GIP 感受性が残存していた可能性が高いと考えられる。実際、本研究で用いた方法では、GIP 受容体は約 50% 程度抑制されていたことから、逆に GIP 受容体は 50% 程度残存していたとも捉えることが可能である。今後さらなる検討を加えることで、GIP による筋タンパク増量の分子機序の全貌解明を目指したいと考えている。

4. 結 論

本研究では、消化管ホルモンの 1 つである GIP は筋タンパク量を増加させた。この GIP による

筋タンパク増量作用のすべてが GIP 受容体を介したものではないことが示唆されたものの、経口の食事により上部小腸 K 細胞から分泌される消化管ホルモン GIP が骨格筋量の維持に寄与するという新規生理機能が明らかとなった。食事は口から摂取することで骨格筋量すなわち筋機能を維持するということが明らかになり、「経口の食事」の生理的意義に注目すべきであろう。また、GIP 分泌を促すような食事（栄養素や食量、摂食タイミングなど）を見出すことができれば、我々の運動機能の食事による介入という新規骨格筋増量法が確立できるであろう。

謝 辞

本研究に対して助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 日本臨床栄養学会(監修). 臨床栄養医学(初版). 東京: 南山堂, p80-85, 534-539, 587-595(2009)
- 2) 菅沼由美, 山田祐一郎, インクレチンの臓器保護作用. 医学の歩み 256: 933-937(2016)
- 3) Brown J.C., Dryburgh J.R., A gastric inhibitory polypeptide. II. The complete amino acid sequence, *Can. J. Biochem.*, 49: 867-872(1971)
- 4) 李相翔, 長嶋理晴, 平野勉, 渡辺琢也. 糖尿病治療を変える新たな糖尿病薬インクレチン. 昭和医会誌, 70: 34-44(2010)
- 5) Hare K.J., Knop F.K., Incretin-based therapy and type 2 diabetes, *Vitam. Horm.*, 84: 389-413(2010)
- 6) Drucker D.J., The role of gut hormones in glucose homeostasis, *J. Clin. Invest.*, 117: 24-32(2007)
- 7) Drucker D.J., The biology of incretin hormones, *Cell. Metab.*, 3: 153-165(2006)
- 8) Xie D., Cheng H., Hamrick M., Zhong Q., Ding K., Correa D., Williams S., Mulloy A., Bollag W., Bollag R.J., Runner R.R., McPherson J.C., Insogna K., Isales C.M., Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover, *Bone*, 37: 759-769(2005)
- 9) Abdulla H., Philips B., Smith K., Wilkinson D., Atherton P.J., Idris I., Physiological mechanisms of actin of incretin and insulin in regulating skeletal muscle metabolism, *Curr. Diabetes Rev.*, 10: 327-335(2014)
- 10) James H.A., O'Neill B.T., Nair K.S., Insulin regulation of proteostasis and clinical implications, *Cell. Metab.*, 26: 310-323(2017)
- 11) Egawa T., Ohno Y., Goto A., Ikuta A., Suzuki M., Ohira T., Yokoyama S., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., AICAR-induced activation of AMPK negatively regulates myotube hypertrophy through the HSP72-mediated pathway in C2C12 skeletal muscle cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 306: E344-E354(2014)
- 12) Goto A., Ohno Y., Ikuta A., Suzuki M., Ohira T., Egawa T., Sugiura T., Yoshioka T., Ohira Y., Goto K., Up-regulation of adiponectin expression in antigravitational soleus muscle in response to unloading followed by reloading, and functional overloading in mice, *PLOS ONE.*, 8: e81929(2013)
- 13) Ito R., Higa M., Goto A., Aoshima M., Ikuta A., Ohashi K., Yokoyama S., Ohno Y., Egawa T., Miyata H., Goto K., Activation of adiponectin receptors has negative impact on muscle mass in C2C12 myotubes and fast-type mouse skeletal muscle, *PLOS ONE.*, 13: e0205645(2018)
- 14) Bullock B.P., Heller R.S., Habener J.F., Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor, *Endocrinology*, 137: 2968-2978(1996)