

Title	Glucosamine induces lipid accumulation and adipogenic change in C2C12 myoblasts
Author(s)	藤田, 拓也
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54242">https://hdl.handle.net/11094/54242</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【158】

氏 名	藤 田 拓 也
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 0 7 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Glucosamine induces lipid accumulation and adipogenic change in C2C12 myoblasts (C2C12細胞におけるグルコサミンによる脂質蓄積と脂肪細胞様変化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 下 村 伊 一 郎 (副査) 教 授 木 村 正 教 授 大 藪 恵 一

#### 論 文 内 容 の 要 旨

##### [ 目 的 ]

高血糖に誘導されるヘキソサミン生合成経路 (Hexosamine Biosynthesis Pathway, 以下 HBP と略す) の亢進は、骨格筋においてインスリン抵抗性を進展させることが知られている。本研究では、肥満糖尿病モデルである KKA<sup>y</sup>マウスの骨格筋における HBP の亢進状況を調べ、更に、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞を用いて、HBP 亢進の及ぼす影響について検証を行った。

[ 方法ならびに成績 ]

肥満糖尿病における HBP の亢進状況を調べる目的で、15 週齢正常マウス (C57BL/6J) 及び肥満糖尿病モデルマウス (KKA<sup>y</sup>) の骨格筋及び肝臓における UDP-GlcNAc 含量 (HBP の最終産物) を測定した。組織を PBS 中でホモジナイザーを用いて破碎し、そのうち少量をタンパク定量に使用した。残りの大部分について、TCA 沈殿を行い、その上清を回収した。上清に含まれる TCA を、ジエチルエーテルを用いて除去した後、完全に乾燥させ、少量の超純水に再溶解した。こうして得た抽出サンプルを HPLC にて分析した。Whatman Partisil SAX anion-exchange column (4.6 x 250 mm) を用いて、1 mL/min の流速で、40 mM ammonium phosphate にて展開した。検出は UV 光の吸収 (A<sub>254</sub>) にて行い、UDP-GlcNAc の標品 (Sigma Aldrich) から得られるピークの高さの値を用いて濃度を算出した。その結果、肝臓 UDP-GlcNAc 含量に差は認められなかったが、骨格筋 UDP-GlcNAc 含量については、KKA<sup>y</sup> マウスで上昇していた。

骨格筋における HBP 亢進の影響を調べる目的で、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞にグルコサミン処理を行った。コラーゲンタイプ 1 でコート処理されたプレートに C2C12 細胞を播種し、細胞密度が 100% に達した時点から、10 mM グルコサミンを含む培養液にて培養した。4 日間のグルコサミン処理によって、脂肪細胞様の形態変化が観察された。細胞は丸く膨らみ、細胞質に顆粒様のものが多数観察された。Nile Red 染色の結果、これら顆粒は、その構成成分として脂質を主に含有していることが示唆された。また、グルコサミン処理によって生じる各種遺伝子の発現量の変化について、定量的 RT-PCR 法を用いて解析したところ、PPAR $\gamma$ , adiponectin, aP2, leptin, SREBP-1c, PAI-1 の発現量が上昇していた。

次に、グルコサミン処理によって C2C12 細胞で認められた現象が、in vivo においても生じ得るのかどうかについて検証を行った。正常 Sprague-Dawley ラットを 18 時間絶食した後、生理食塩水或いは 600 mM グルコサミン溶液を右頸静脈に挿入したカテーテルから持続注入した (30  $\mu$ mol/kg/min)。4 時間の持続注入後、ヒラメ筋を摘出し、遺伝子発現量の変化を定量的 RT-PCR 法にて解析を行った。グルコサミン注入によって、PPAR $\gamma$ , adiponectin, aP2 の発現量に上昇が認められた。

[ 総括 ]

本研究の主要な発見は、HBP の中間代謝物であるグルコサミンによって、1) C2C12 細胞に形態的な変化が生じ、脂質の蓄積が観察されたこと、2) 脂肪細胞分化や脂質生成に関連する遺伝子に発現上昇が認められたこと、3) 同様の遺伝子発現変化が、グルコサミンを持続注入した正常 Sprague-Dawley ラットの骨格筋でも認められたことである。PPAR $\gamma$  は脂肪細胞分化における重要因子であることから、C2C12 細胞のグルコサミンによる脂肪細胞様形態変化においても、PPAR $\gamma$  の発現上

昇は何らかの関連があるのかもしれない。

ヒト及びげっ歯類の骨格筋において、細胞内の脂質蓄積量とインスリン感受性が逆相関することが報告されている。肥満糖尿病モデルである KKA<sup>y</sup> マウスの骨格筋で HBP の亢進が認められたこと、C2C12 細胞においてグルコサミンは脂質蓄積を誘導したことから、骨格筋における脂質蓄積に HBP の亢進が一部関与しており、これがインスリン抵抗性の進展につながっていく可能性が考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

高血糖に誘導されるヘキソサミン経路の亢進は、骨格筋においてインスリン抵抗性を進展させることが知られている。本論文では、肥満糖尿病モデルである KKA<sup>y</sup> マウスの骨格筋におけるヘキソサミン経路の亢進状況を調べ、更に、マウス骨格筋由来の細胞株である C2C12 細胞及び正常ラットの骨格筋におけるヘキソサミン経路亢進の及ぼす影響について検討を行っている。その結果、KKA<sup>y</sup> マウスの骨格筋において、ヘキソサミン経路が亢進していることが確認された。また、C2C12 筋芽細胞及び正常 SD ラットの骨格筋をグルコサミンに暴露することで、脂肪細胞様の遺伝子発現変化が誘導され、細胞内にトリグリセライドが蓄積する可能性が示唆された。骨格筋トリグリセライド含量とインスリン抵抗性が相関することが報告されていることから、ヘキソサミン経路亢進によるインスリン抵抗性進展のメカニズムのひとつとして、トリグリセライド蓄積が関与する可能性が考えられた。

ヘキソサミン経路亢進とインスリン抵抗性進展に関する新たな可能性を示唆した本論文の内容は、学位に値するものと認める。