

平成 22 年度
博士学位論文

最適化した低電圧パルス電流の生体適応応答における分子
機構の解明及び新規膵 β 細胞分化誘導法への応用

熊本大学大学院薬学教育部 分子機能薬学専攻

分子機能薬学講座 遺伝子機能応用学分野

矢野 脩一郎

Activation of cellular signaling pathways by optimized mild electrical stimulation (MES) and the induction of pancreatic beta cell differentiation by MES

Department of Molecular Medicine, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Kumamoto University

Shuichiro Yano

Low-intensity electrical current has been used as folk medicine and applied as treatment for various diseases. However, the molecular mechanisms that underlie its observed effects are yet undetermined. Previously, we showed that co-treatment with mild electrical stimulation (MES) and heat shock (HS) decreased fat accumulation and ameliorated diabetic phenotypes in type 2 diabetes mouse models. Furthermore, pre-treatment with MES and HS prevented liver ischemia-reperfusion injury and gastric ulcer in mice. In these studies, however, the mechanistic details of the effects of MES were unexplored. In the current study, my objective is to elucidate the molecular mechanism of the beneficial effects of MES for therapeutic applications. In addition, I explored the potential of MES for use in regenerative medicine. Because MES ameliorates diabetic phenotypes and affects stress response, I hypothesize that MES can impact on cellular signaling pathways such as the phosphoinositide-3-kinase (PI-3K)/Akt pathway and mitochondria-related signaling pathway.

Based on our previous data that MES with HS can ameliorate insulin resistance, I first focused on PI-3K/Akt, which is the main mediator of insulin signaling and glucose regulation. I observed that MES treatment activated the Akt most effectively at a voltage of 5 V (approximately 1 V/cm) and a pulse duration of 0.1 millisecond. The activation of Akt was dependent on PI-3K. Moreover, MES increased the expression of glucose transporter 4 (GLUT4) on the plasma membrane and enhanced the glucose uptake in rat skeletal muscle (L6) cells. These results suggested that MES activates the insulin-signaling pathway and might explain the reason for the effectiveness of MES in ameliorating the diabetic phenotype.

Because we observed previously that pre-treatment with MES together with HS protected mice against liver ischemia-reperfusion injury and gastric ulcer, which are forms of cellular stress and damage, I next investigated the effect of MES on mitochondria-related signaling. MES transiently decreased the mitochondrial membrane potential in L6 cells and enhanced adenosine monophosphate activated kinase (AMPK) phosphorylation in L6 cells and in worms (*C. elegans*) compared with non-treated

controls. More interestingly, pre-treatment with MES of the N₂ wild type *C. elegans* increased heat and oxidative stress resistance. In contrast, the *C. elegans* bearing the AMPK homologue (AAK-2) mutation TG38 did not exhibit MES-induced heat and oxidative stress resistance. These results suggested that MES increases stress resistance by activating AMPK via decreased mitochondrial membrane potential.

Because, as shown above, MES could activate cellular signaling, I explored the potential capability of MES to enhance embryonic stem (ES) cells differentiation into pancreatic progenitor cells (Pdx-1⁺ cells). Guided differentiation of ES cells into endodermal cells is prohibitively difficult compared with other germ layer cells. The efficiency of differentiation into pancreatic lineage is very low. Therefore, novel methods that can increase the efficiency of differentiation are very much needed. It is known that basic fibroblast growth factor activates Akt and enhances differentiation of ES cells into endodermal cells. Based on my result that MES activates PI-3K/Akt signaling, I investigated the effect of MES and HS on ES cells to induce pancreatic lineage differentiation. Interestingly, MES with HS enhanced the differentiation of ES cells into pancreatic progenitor cells (Pdx-1⁺ cells). In addition, co-treatment with liquid factor and MES with HS synergistically enhanced the ES cell differentiation into Pdx1⁺ cells. These results firstly show that physical stimulation by MES can increase the differentiation of ES cells into pancreatic progenitor cells (Pdx-1⁺ cells).

Taken together, my research works have elucidated the mechanistic details and effects of low-intensity current using optimized mild electrical stimulation. These findings could promote the use of MES for clinical therapeutic applications especially for diabetes, ischemia-reperfusion injury and other diseases caused by cellular stress, damage and dysregulated signaling pathways. Furthermore, MES could potentially be used to induce the differentiation of ES cells to pancreatic β cells for regenerative medicine.

最適化した低電圧パルス電流の生体適応応答における分子機構の解明及び新規膵 β 細胞分化誘導法への応用

分子機能薬学専攻 遺伝子機能応用学分野 矢野 脩一郎

極めて低強度の電流刺激は、古くから民間療法として用いられてきた。様々な疾患改善に有用であることが確認されているが、その作用機序について科学的検証はほとんど行われておらず、効果が疑問視されている現状にある。また、これまでに本研究室においても最適化した低電圧パルス電流 (MES) と温熱の併用処理 (MET 処理) は、糖尿病病態改善効果及び予防効果、内臓脂肪の減少、脂肪肝の抑制、さらに肝虚血再灌流障害の軽減や胃潰瘍予防にも顕著な作用を示すことを確認しているが、作用メカニズムについては十分な理解は得られていない。そこで、これまでに得られている知見をもとに phosphatidylinositol-3-kinase (PI-3K)/Akt シグナル及びミトコンドリアを介したシグナルに着目し、MES 処理の作用機構解明を行った。

1) PI-3K/Akt シグナルはインスリンシグナルに関わることから糖代謝制御において重要であり、また細胞生存シグナルとしても知られている。そこで、これまでに MES を用いた処理により、糖尿病病態改善効果がみられたこと、並びに肝虚血再灌流障害の軽減効果がみられたことから、PI-3K/Akt シグナルに着目し検討を行った。ラット骨格筋細胞株 L6 細胞を用いて検討を行った結果、Akt リン酸化状態を指標とする検討結果から、これまでに本研究室において様々な検討を重ねてきた電流条件が、最も細胞機能に影響を与えることを示した (0.1 millisecond, 55pps)。また、MES 処理により PI-3K 活性化及び PI-3K 活性化依存的な Akt リン酸化亢進が観察された。さらに、インスリンにより誘導される PI-3K/Akt シグナル活性化は、GLUT 4 膜上発現亢進を介した細胞内への糖取り込みを促進することが広く知られているが、MES 処理においても同様の効果がみられた。これらの結果から、MES 処理による PI-3K/Akt シグナル活性化は糖尿病病態改善に寄与していることが考えられる。

ミトコンドリアに低強度のストレスが負荷されると adenosine monophosphate activated kinase (AMPK) を介した細胞保護効果が得られる。これまでに、MES を用いた処理により、肝虚血再灌流障害の軽減効果、並びに胃潰瘍予防効果がみられたことから、ミトコンドリアを介したシグナルに着目し検討を行った。L6 細胞を用いた検討の結果、MES 処理により細胞死を誘導しない程度の一過性のミトコンドリア膜電位低下がみられ、ミトコンドリア膜電位低下依存的な AMPK リン酸化亢進が起こる

ことも確認できた。さらに興味深いことに、モデル動物線虫を用いた検討において野生型 N_2 線虫を用いた検討では、MES 前処理により、AMPK リン酸化亢進がみられるとともに、温熱及び酸化ストレスに対する耐性が付与されることが確認された。一方で線虫 AMPK ホモログ (AAK-2) 変異体 TG38 線虫では温熱及び酸化ストレスに対する耐性が付与されなかったことから、AMPK 依存的なストレス耐性の付与が確認できた。これらの結果から、MES 処理により一過性のミトコンドリア膜電位低下が引き起こされることで、AMPK を介したストレス耐性が付与されることが明らかになった。

2) 前述したように、MES 処理によるシグナル伝達活性化機構が明らかになったことを受け、MES を用いた処理の ES 細胞から膵前駆細胞 ($Pdx-1^+$ 細胞) への分化誘導における有用性を検討した。膵細胞を含む内胚葉系細胞への分化誘導に関しては、他の胚葉分化研究に比べ分化誘導効率は極めて低く、新たな方法論が強く求められている。そこで、これまでに膵前駆細胞 ($Pdx-1^+$ 細胞) への分化を促進する液性因子 basic fibroblast growth factor と同様に、Akt を MES 処理が活性化することが明らかになったため、ES 細胞から膵 β 細胞への分化誘導における MET 処理の効果を検討した。その結果、MET 処理により ES 細胞から膵前駆細胞 ($Pdx-1^+$ 細胞) への分化が促進されることが明らかになり、この効果は内胚葉細胞における膵前駆細胞 ($Pdx-1^+$ 細胞) の割合を増加させたものであった。さらに興味深いことに、液性因子と MET 処理を併用した場合においても膵前駆細胞 ($Pdx-1^+$ 細胞) への分化促進作用がみられた。これらの結果は、物理的刺激が内胚葉系細胞への分化を促進する事を初めて示すものであり、より効率的な分化誘導法確立が特に求められている膵 β 細胞分化誘導法において重要な知見を提起するものである。

以上、本研究は低強度であるが故に不明確であった微弱な電流による作用機構を、最も細胞機能に影響を与える最適化した電流条件である MES 処理を用いて明らかにした。したがって、抗糖尿病効果や肝虚血再灌流障害の軽減などこれまでに MES 処理を用いて有用性が認められていた疾患への積極的適用を促す科学的根拠を提供するものである。さらに膵 β 細胞分化誘導法への応用という MES 処理の新たな可能性を切り拓いた重要な基礎的知見であり、究極的な目標である臨床適用可能な膵 β 細胞分化誘導法開発研究に対し、大いに貢献し得る知見であると考えられる。

略語表

本論文では以下の略号を使用する.

AMPK	: adenosine monophosphate activated kinase
BCA	: bichinchonic acid
bFGF	: basic fibroblast growth factor
BSA	: bovine serum albumin
cDNA	: complementary deoxyribonucleic acid
CON	: control
DEPC	: diethyl pyrocarbonate
DNA	: deoxyribonucleic acid
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	: fetal bovine serum
HRP	: horseradish peroxidase
HS	: heat shock
Hsp	: heat shock protein
IgG	: immunoglobulin G
IGF-1	: insulin-like growth factor
LDH	: lactate dehydrogenase
MES	: mild electrical stimulation
mtK _{ATP}	: ATP-sensitive K channel
PAGE	: polyacrylamide gel electrophoresis
PBS (-)	: Ca ²⁺ , Mg ²⁺ free phosphate buffered saline
PCR	: polymerase chain reaction
PI-3K	: phosphatidylinositol 3-kinase
PVDF	: poly vinylidene difluoride
RNA	: ribonucleic acid

RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction
SDS : sodium dodecyl sulfate
TE buffer : Tris-HCl EDTA buffer
Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

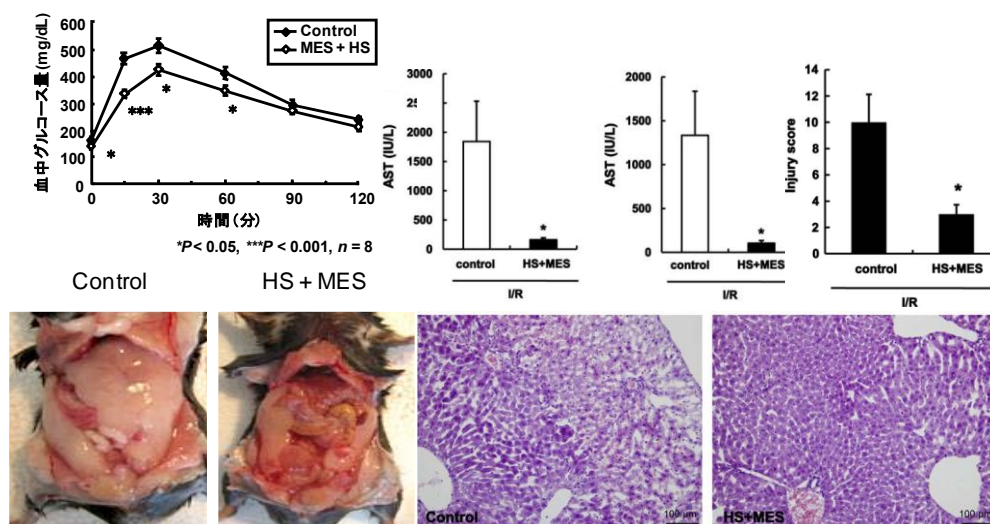
第1章 緒論	1
第2章 最適化した低電圧パルス電流の生体適応応答における分子機構の解明に関する検討	5
第1節 背景	5
第2節 実験成績	8
第1項 MES 処理の Akt リン酸化状態に与える影響	8
第2項 MES 処理による Akt リン酸化亢進における PI-3K の役割	10
第3項 MES 処理の GLUT4 膜上発現, 糖取り込みに与える影響	12
第4項 MES 処理と筋収縮誘導刺激の相違点	14
第5項 MES 処理のミトコンドリア膜電位に与える影響	16
第6項 MES 処理の細胞死に与える影響	18
第7項 MES 処理のミトコンドリア膜電位低下依存的転写制御機構に与える影響	19
第8項 MES 処理によるミトコンドリア膜電位低下作用における mitochondrial ATP-sensitive K ⁺ channel の役割	20
第9項 HS, MES と HS 併用処理のミトコンドリア膜電位低下作用に与える影響	22
第10項 MES 処理の線虫に対する効果の確認	24
第11項 MES 処理による温熱及び酸化ストレス耐性の付与	26
第12項 MES 処理による AMPK 依存的温熱及び酸化ストレス耐性の付与	28
第13項 MES 処理による線虫寿命の延長	31
第3節 考察	32
第3章 最適化した低電圧パルス電流及び温熱併用処理の新規膵 β 細胞分化誘導への応用	34
第1節 背景	34
第2節 実験成績	36
第1項 MES 及び HS の併用処理による膵前駆細胞 (Pdx-1 ⁺ 細胞) への分化誘導	36
第2項 MES 及び HS 併用処理と液性因子添加による膵前駆細胞 (Pdx-1 ⁺ 細胞) への分化誘導	38
第3項 MES 及び HS 併用処理による細胞内シグナル伝達の変化	40
第3節 考察	43
第4章 総括	45
第5章 実験材料及び実験方法	48

第1節	培養細胞を用いた検討	48
第1項	細胞の種類と入手先	48
第2項	細胞培養液	49
第3項	細胞の培養方法	49
第4項	細胞の分化誘導法	50
第5項	培養細胞からのタンパク質の回収及び濃度測定	50
第6項	Western blotting 法	51
第7項	Total RNA の抽出	52
第8項	Quantitative RT-PCR 法	52
第9項	ミトコンドリア膜電位変化の測定 (フローサイトメトリー)	53
第10項	フローサイトメトリー (FCM)	54
第11項	免疫蛍光染色法	54
第12項	Glucose uptake assay	55
第13項	細胞傷害活性測定法 (LDH 測定法)	56
第2節	線虫を用いた検討	57
第1項	線虫の培養	57
第2項	線虫の種類と入手先	57
第3項	線虫の同調培養	57
第4項	線虫からのタンパク質の回収及び濃度測定	58
第5項	Western blotting 法	58
第6項	Total RNA の抽出	59
第7項	Quantitative RT-PCR 法	59
第8項	線虫への温熱ストレス及び酸化ストレスの負荷	60
第9項	線虫の寿命測定	60
第3節	Bio Metronome	61
第4節	抗体	62
第5節	試薬	63
	謝辞	64
	参考文献	66

第1章 緒論

最適化した低電圧パルス電流 (MES) と温熱 (HS) の併用処理は、糖尿病病態改善効果及び予防効果、内臓脂肪の減少、脂肪肝の抑制など生体の代謝機構維持に極めて高い効果を示す¹。また、肝虚血再灌流障害の軽減や胃潰瘍予防にも顕著な作用を示すことから、生体が本来備えるストレスに対する防御機構を増強する効果があると考えられる^{2,3}(Figure 1)。

抗糖尿病効果及び脂肪蓄積抑制 肝虚血再灌流障害の軽減



胃潰瘍予防

塩酸エタノール

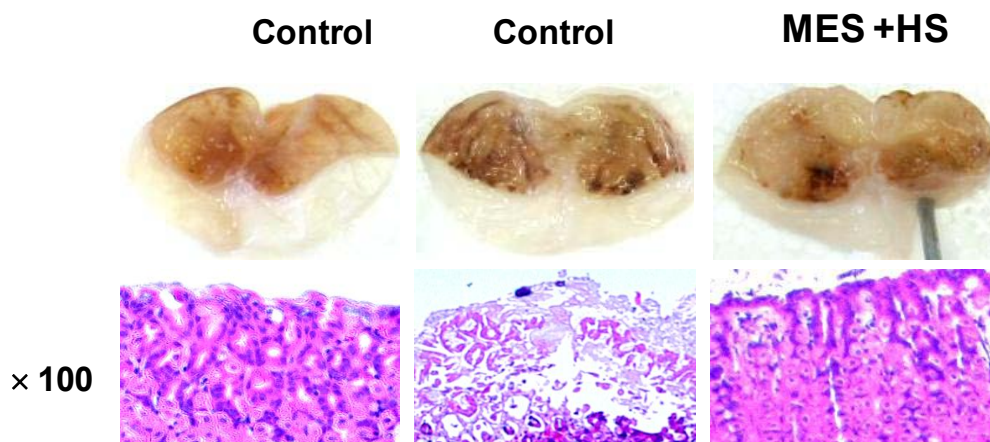


Figure 1. Effect of MES & HS on diabetes, fat accumulation, ischemia reperfusion injury and acute gastric ulcer.

では、このような代謝異常病態の改善効果やストレス応答の増強効果は、どのようにして得られるのか？ これまでの検討結果から、特殊低電圧パルス電流 (MES) と温熱併用処理による細胞内の Heat shock protein72 (Hsp72) 発現上昇がメカニズムの一端と考えられる⁴。しかし、MES 刺激は筋収縮やカルシウム流入を起こさないなど、これまでに報告されている電流刺激とは異なる性質を持つことから様々な角度から検証を行う必要があると考えられる。そこで第 1 章では、MES 刺激の作用メカニズムを分子生物学及び遺伝学的手法を用いて解析を行った。次に第 2 章では、第 1 章で得られた知見をもとに MES と HS 併用刺激の膵 β 細胞分化誘導法における有用性を検討した。

第 1 章では、生体は低強度の刺激に対して適応応答を示すこと、そしてこれまでに MES を用いた処理により有益な効果が得られている病態の改善及び予防に関わるシグナル経路に着目した (Figure 2)。MES 刺激は細胞死誘導効果を示さない低強度の刺激であるが、生体に有益な作用を示す。このような概念が類似する現象として、プレコンディショニング効果が想定された。プレコンディショニング効果とは、予め低強度の刺激を加えておくことで高強度の刺激に対し耐性になることを指す。外科手術時における虚血再灌流障害予防を目的とし、手術時の長時間にわたる血管狭窄の前処置として短時間の血管狭窄を行うことで組織障害が軽減されることは広く認知されている⁵。プレコンディショニング効果を得るために必要な細胞内シグナル伝達経路は、これまでに多くの報告がなされており、その全体像もみえてきている⁵。そこで、プレコンディショニング効果誘導刺激に関わる PI-3K/Akt シグナル及びミトコンドリア機能抑制により活性化するシグナル経路に着目した。また、これまでに MES を用いた処理により糖尿病病態改善や肝虚血再灌流障害軽減がみられているが、PI-3K/Akt シグナル及びミトコンドリア機能抑制に関連するシグナル経路の活性化はこれらの効果への関与が十分に考えられた。

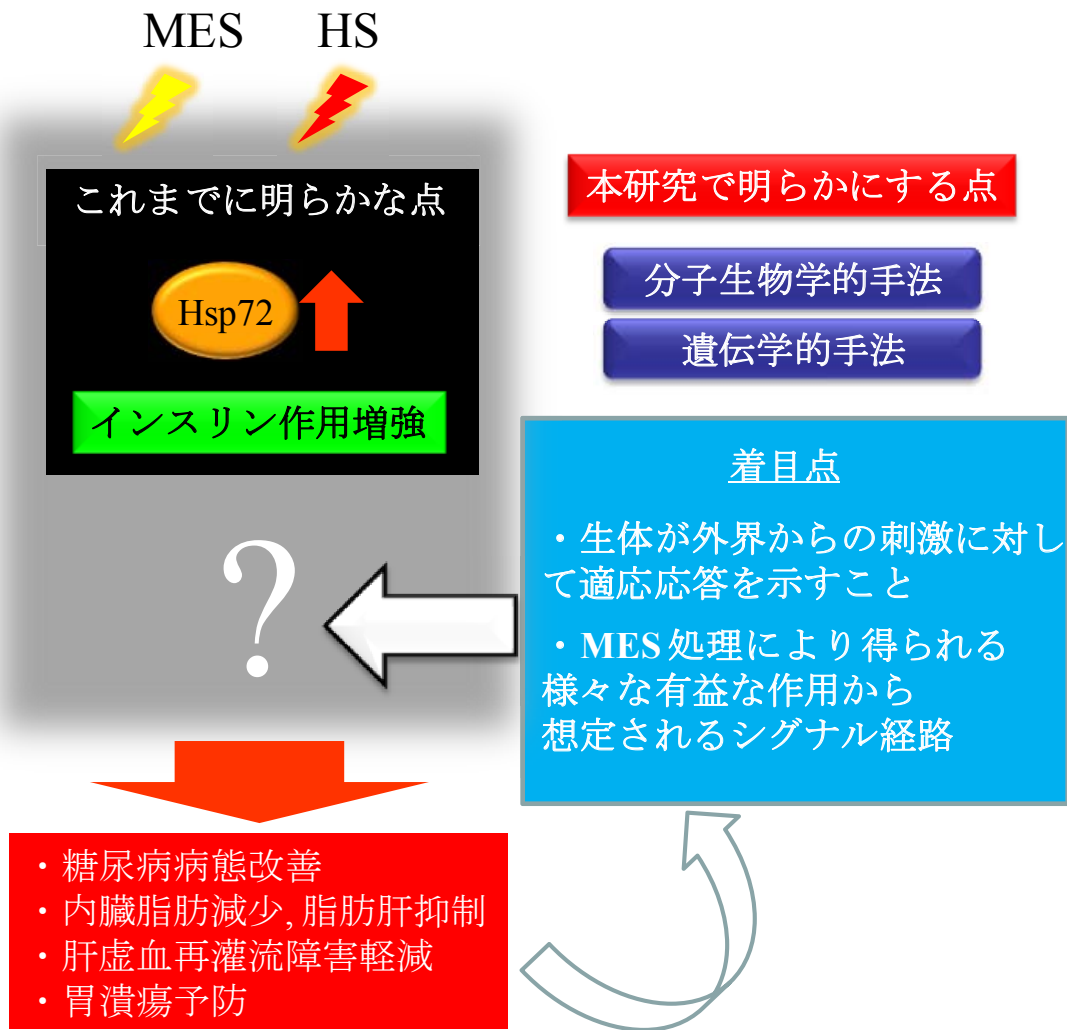


Figure 2. Purpose of project 1.

第 2 章では, MES 及び HS 併用処理を用いた新規膵 β 細胞分化誘導法開発についての検討結果を示す. 1 型糖尿病ではもちろんのこと, 近年 2 型糖尿病が増加の一途を辿っている現在において, 再生医療による膵島の再生は強い社会的要求があり, 糖尿病治療に画期的な進歩をもたらすと考えられる. しかし, これまでに膵島の再生医療実現に向けた検討は様々なされているが, 臨床適用には至っていない. 問題点の一つとして, 低い分化効率が挙げられており, 従来用いられている液性因子による分化誘導刺激に加え, 新たな方法論が求められている⁶. そこで, MES 及び温熱併用処理を膵 β 細胞分化誘導の系に加えられるか検討を行った. 本研究は, 膵 β 細胞を用いた再生医療実現に向けた基礎的研究であるとともに, 工業化研究においても貢献し得る知見と考える (Figure 3).

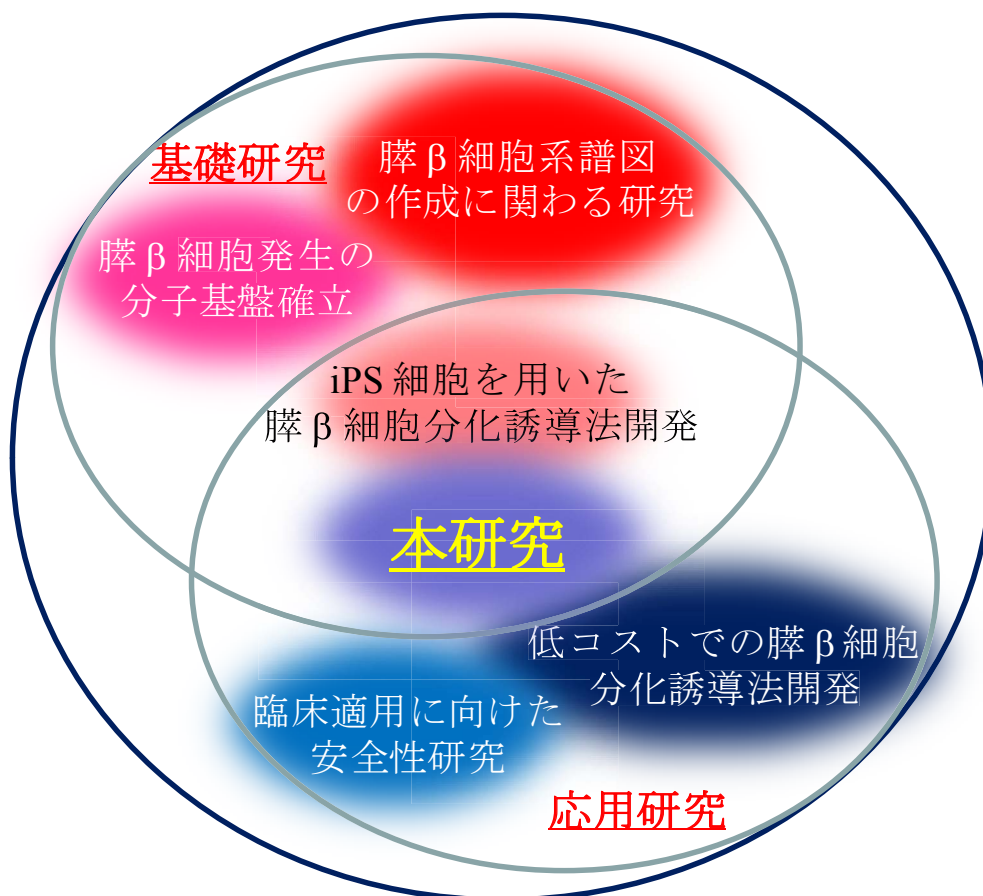


Figure 3. Purpose of project 2.

以下得られた知見を詳述する.

第 2 章 最適化した低電圧パルス電流の生体適応応答における分子機構の解明に関する検討

第 1 節 背景

生体は、単に外界からの刺激を受動的に受けるだけでなく、能動的に反応することで秩序ある安定状態を保っている。したがって、外界からの有害な刺激を避けると共に、有害な刺激に対する生体の応答を調節することは極めて重要であると考えられる。

このような生体のシステムを利用したものとしてプレコンディショニング効果が認知されている。これまでに、プレコンディショニング効果に関わるシグナル伝達経路として、PI-3K/Akt シグナル、ミトコンドリアを介したシグナルの重要性を示す報告がなされている (Figure 4)⁵。

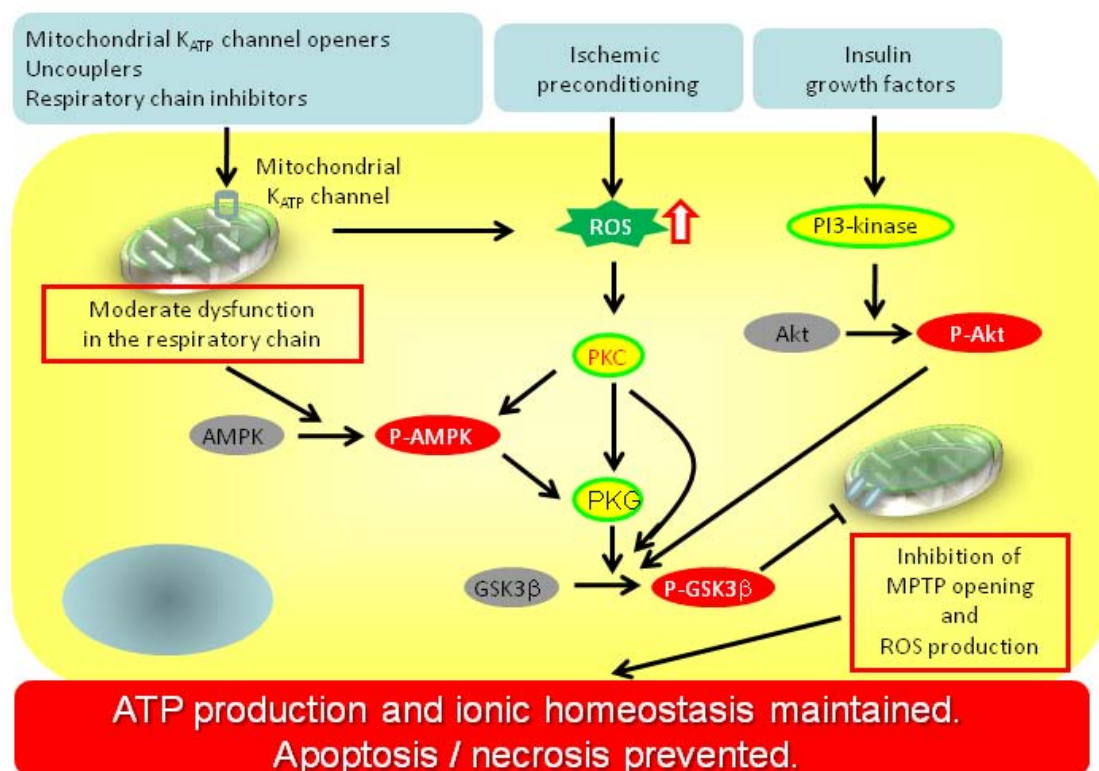


Figure 4. Suggested pathways by which preconditioning, K_{ATP} channel openers and other factors that perturb mitochondrial function may lead to inhibition of MPTP opening.

PI-3K/Akt シグナルは、インスリン及び IGF-1 を含めた種々の細胞外からの刺激が引き金になり活性化し、細胞のエネルギー源となる糖の取り込み促進など細胞生存を正に制御するシグナルとして知られている。また、生体が創傷を負うと創傷部位に向けた微弱な電流が生じることは、150 年以上前から確認されており、近年この微弱な電流による創傷治癒促進には PI-3K 活性化を介したシグナルが重要であることが証明された⁷。実際に、プレコンディショニング刺激と PI-3K 阻害剤または Akt 阻害剤を併用するとプレコンディショニング効果が得られないことが報告されている⁸。

一方で、プレコンディショニング効果においてミトコンドリアに存在する ATP 感受性 K^+ (mtK_{ATP}) チャネルを介した軽度のミトコンドリア膜電位低下が重要であるとされている。ミトコンドリア電子伝達系阻害剤によりプレコンディショニング効果が得られること、プレコンディショニング刺激と mtK_{ATP} チャネル阻害剤 (5-hydroxydecanoic acid, 5-HD) を併用するとプレコンディショニング効果が得られないことから、軽度のミトコンドリア膜電位低下の重要性が理解できる^{5,8}。また、ミトコンドリア膜電位が低下すると細胞のエネルギーセンサーとしても知られる AMPK 活性化が引き起こされる。AMPK は個体全体の糖及び脂質代謝を担うと共に、ストレス感受性への関与も示唆されている⁹。プレコンディショニング効果においては AMPK 不活性型変異体を発現するマウスではプレコンディショニング刺激を加えても効果が得られないことが報告されている⁵。

これまでに本研究室において、MES を用いた処理が生体の代謝機構維持に極めて高い効果を示すと共に、生体が本来備えるストレスに対する防御機構を増強する効果があることを見出している。また、MES を用いた処理を前処理することで、肝虚血再灌流障害の軽減効果が得られることから、これらの効果に対する作用メカニズムとしてプレコンディショニング効果に関わる PI-3K/Akt シグナル及びミトコンドリアを介したシグナルの関与が考えられた。

PI-3K/Akt シグナルは、インスリンにより活性化され骨格筋において糖取り込みの促進作用、また肝臓においては糖新生抑制を制御している。糖尿病病態時ではインスリンによるシグナル感受性低下が引き起こされており、このようなインスリン抵抗性状態を改善する、すなわち PI-3K/Akt シグナルを活性化することは、糖尿病治療を考える上で非常に重要である。一方でこれまでに、MES

を用いた処理によりインスリン抵抗性を改善できることが明らかになっている。したがって、MES を用いた処理による抗糖尿病効果のメカニズムの一つとして PI-3K/Akt シグナル活性化作用が考えられる。そこで、本章第 2 節第 1-4 項において、ラット骨格筋細胞株 L6 細胞を用いて、MES 処理により PI-3K/Akt シグナルが活性化されるか検討を行い、生理学的機能評価として GLUT4 膜上発現量の評価及び細胞内への糖取り込みを評価した。

ミトコンドリアは、プレコンディショニング刺激により誘導されるシグナルにおいて最上流及び最下流に位置づけられていることからその重要性が伺える (Figure 2)。MES を用いた処理を前処理することで、肝虚血再灌流障害の軽減効果が得られること、すなわち MES を用いた処理がプレコンディショニング刺激として働いている結果から、MES 処理がミトコンドリアに対し作用し、ストレス耐性を付与している可能性を考えた。そこで本章第 2 節第 5-13 項では、まず L6 細胞を用いて MES 処理のミトコンドリア膜電位に与える影響及び下流シグナルである AMPK 活性化状態変化を検討した。また、生理学的機能評価として、モデル動物線虫を用いてストレス耐性の付与を評価した。

以下、得られた知見を詳述する。

第 2 節 実験成績

第 1 項 MES 処理の Akt リン酸化状態に与える影響

PI-3K の活性化により下流分子 Akt が活性化することが知られているため、まず Akt リン酸化状態の変化を指標に、最適な MES 条件の決定を目的とし、検討を行った。

ラット骨格筋由来細胞株 L6 細胞を骨格筋細胞へと分化誘導後、様々な条件で電流処理を行った (Figure 5A : 0.01-10 msec, 5V, Figure 5B : 2-10 V, 0.1 msec). 処理後、直ちにタンパク質回収を行い Western blotting 法により検討を行った。その結果、これまでの本研究室における知見と同様に、パルス持続時間は 0.1 msec において最も細胞機能に影響を与え、Akt リン酸化亢進が観察され、1V/cm 以上の電圧条件において Akt リン酸化亢進が認められた (Figure 5A, B). したがって、以降の実験は 0.1 msec, 1V/cm の電流条件を用いて検討を行った。

次に、MES 処理による Akt リン酸化亢進の持続時間を検討した。MES 処理直後、1 時間後そして 2 時間後にタンパク質回収し検討を行った結果、MES 処理直後において最も顕著な Akt リン酸化亢進が観察され、処理から 2 時間後には定常状態レベルにまで Akt リン酸化状態は戻っていた (Figure 5C). また、MES 処理から 1 時間後までに AMPK リン酸化亢進はみられなかった (第 4 項において詳述する)。これらの結果から、MES 処理は処理後 2 時間以内において一過性に Akt リン酸化亢進作用がある事が明らかになった。

さらに、MES 処理が直接的に、PI-3K/Akt シグナル活性化作用を有しているのか明らかにするために、ウシ胎仔血清を含まない細胞培養液を用いて検討を行った。その結果、MES 処理により Akt リン酸化の亢進が観察されたことから、ウシ胎仔血清に含まれる成長因子非依存的に MES 処理は PI-3K/Akt シグナル活性化作用がある事が示唆された。

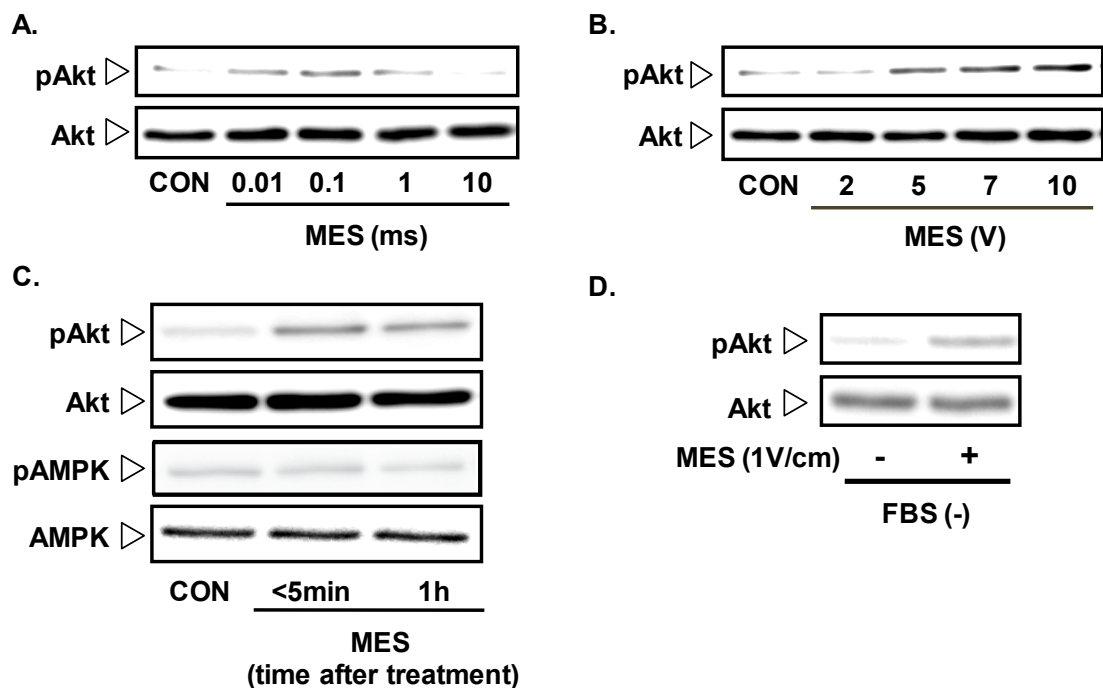


Figure 5. MES-induced Akt phosphorylation in L6 cells.

A, B) Differentiated L6 cells were treated for 10 min with MES at 1 V/cm and the indicated millisecond (ms) (A), or at 0.1 ms and the indicated voltage (B). Cell lysates were immediately extracted after treatment.

C) Differentiated cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min. Lysates were extracted immediately (<5 min) or 1 h after treatment.

D) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min under serum-free [FBS (-)] condition. Cell lysates were immediately extracted after treatment.

For panels A – D, cell lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.

第2項 MES 処理による Akt リン酸化亢進における PI-3K の役割

前項の結果から、MES 処理により Akt リン酸化が亢進することが明らかになったため、Akt の上流シグナルに関して検討を行った。

PI-3K の活性化により PIP₃ がセカンドメッセンジャーとして産生され、Akt リン酸化が亢進する¹⁰。そこで、MES 処理による Akt リン酸化亢進が PI-3K 活性化によるものか検討を行った。

免疫蛍光染色法を用いて、PIP₃ 発現量を指標として PI-3K 活性変化を検討した結果、MES 処理直後に PIP₃ 染色性が増強しており、PI-3K が活性化されていることが示唆された (Figure 6A)。

さらに、PI-3K 阻害剤を用いて、Akt リン酸化状態を指標として検討を行った。LY294002 (10 μM, 30 min pre-treated) 又は wortmannin (1 μM, 5min pre-treated) と MES 処理を併用し検討を行った結果、PI-3K 阻害剤存在下では MES 処理による Akt のリン酸化亢進はみられなかった (Figure 6B, C)。

これらの結果から、MES 処理は PI-3K/Akt シグナルを活性化する事が示唆された。

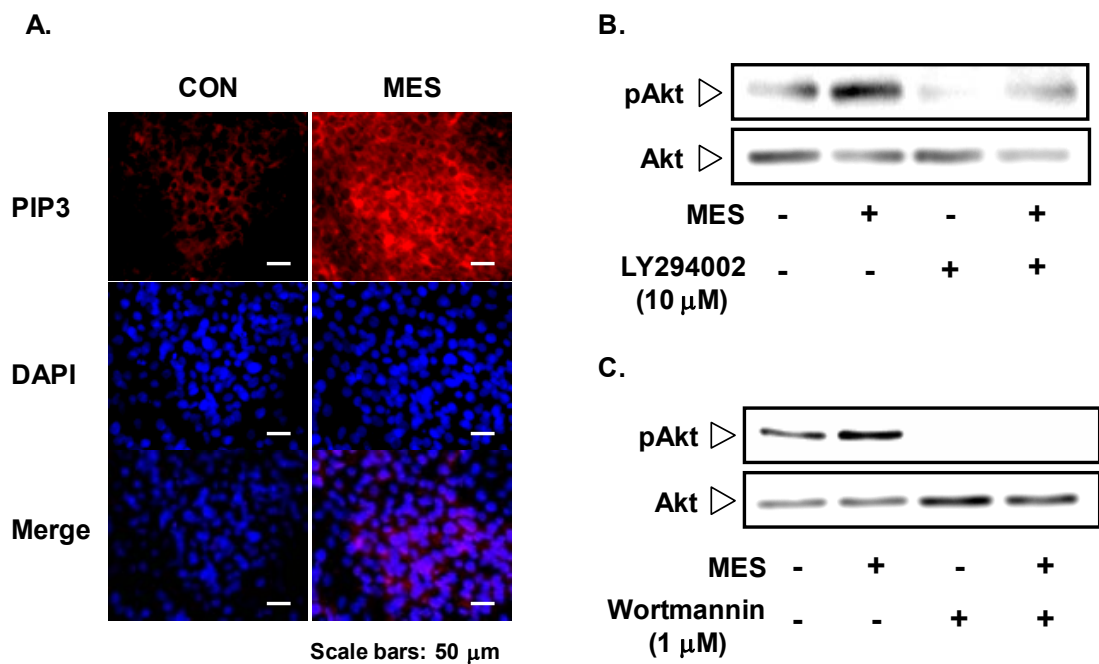


Figure 6. PI-3K–dependent Akt phosphorylation by MES.

A) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min, immediately fixed with 10% formalin, stained with PIP3 antibody and DAPI, and visualized using a confocal fluorescent microscope.

B, C) Differentiated L6 cells were treated with MES with or without pre-treatment of LY294002 (10 μ M, 30 min) (B) or wortmannin (1 μ M, 5 min) (C). Cell lysates were immediately extracted after treatment with MES and analyzed by Western blotting with the indicated antibodies.

第3項 MES 処理の GLUT4 膜上発現, 糖取り込みに与える影響

PI-3K/Akt シグナルの活性化は, GLUT4 膜上発現量を増加させ, 細胞内への糖の取り込みを促進する¹¹⁻¹³. そこで, GLUT4 膜上発現量, 細胞内への糖取り込みを評価し, MES による PI-3K/Akt シグナル活性化により実際の細胞機能変化が誘導されるか確認を行った.

GLUT 4 の細胞膜上での安定性は非常に低い事が知られているため, MES 処理後直ちに細胞を固定し, 免疫蛍光染色法により検討を行った. その結果, MES 処理により細胞膜上の GLUT 4 発現が上昇しており, 以前インスリンを用いて検討を行っている報告と同様な染色像が得られた (Figure 7A).

さらに, ³H 標識した 2-deoxy-glucose (2-deoxy-D-(³H)-glucose) を用いて, 細胞内への糖取り込みを評価した結果, GLUT4 膜上発現量増加と相関して, MES 処理により細胞内への糖の取り込みが促進していた (Figure 7B).

以上の結果より, MES 処理により PI-3K/Akt シグナルが活性化することが明らかになった.

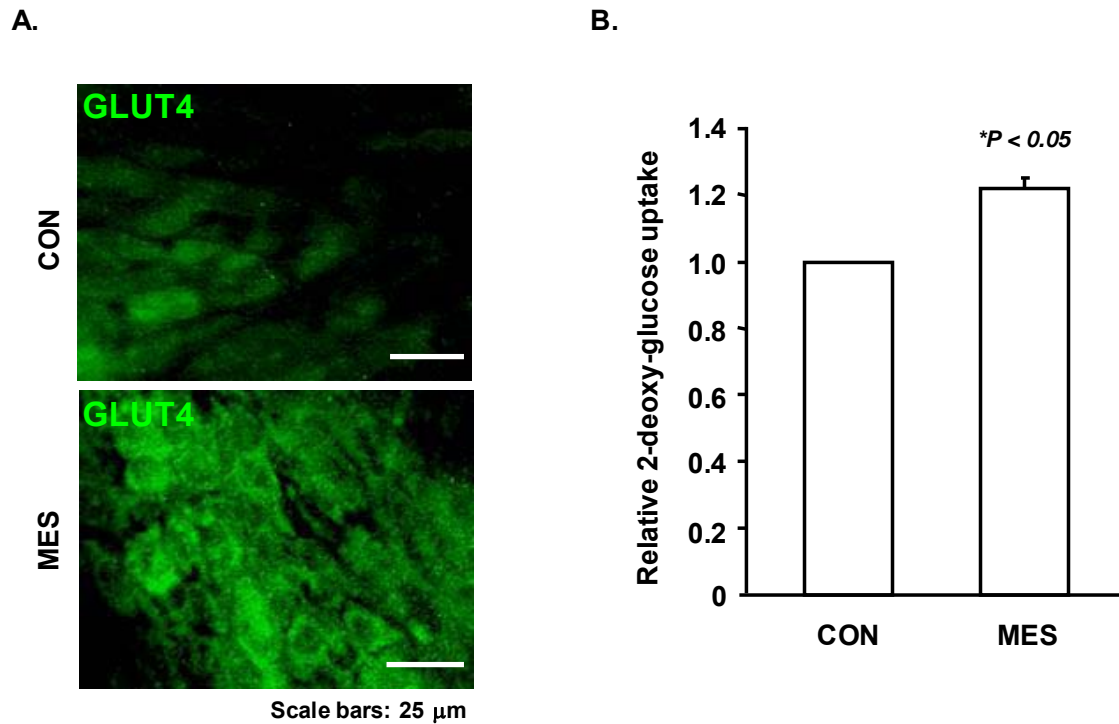


Figure 7. MES enhanced GLUT4 translocation and glucose uptake in L6 cells.

A) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min, immediately fixed with 10% formalin, stained with GLUT4 antibody, and visualized using a confocal fluorescent microscope.

B) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min. Then 2-deoxy-D-(3 H)-glucose was added and cells were subjected to scintillation counting. Data are presented as the mean \pm S.E.M. (n = 3 per group). * $P < 0.05$, assessed by one-way ANOVA.

第4項 MES 処理と筋収縮誘導刺激の相違点

従来、電気刺激は筋収縮を誘発し、AMPK 活性化を介した糖取り込みシグナル促進作用がある事が報告されている。一方で、筋収縮を誘導しうる程度の電気刺激では PI-3K/Akt シグナルの活性化は起こらない事が確認されている。したがって、MES 処理と筋収縮誘導刺激はシグナル制御の観点から異なると考えられたため、筋弛緩剤及び細胞膜脱分極誘導剤を用いて検討を行った。

まず、MES 処理による Akt リン酸化亢進作用に筋収縮の誘導が必要であるか筋弛緩剤 Dantrolene を用いて検討を行った¹⁴。Dantrolene (25 μ M) を 10 分間前処理し、さらに MES 処理時にも併用し検討を行った結果、Dantrolene 処理下においても MES 処理により Akt のリン酸化亢進が観察された (Figure 8A)。したがって、MES 処理による Akt リン酸化亢進作用は筋収縮誘導シグナル非依存性である事が示唆された。また、Dantrolene 単独処理により Akt のリン酸化は亢進しており、筋収縮とは相反する刺激と MES 処理は同様な作用を有している事からも、MES 処理と筋収縮誘導刺激は異なる事が考えられた。

次に、活動電位発生の観点から検討を行った。骨格筋における活動電位の発生は筋収縮を誘発する事が知られており、電気刺激による筋収縮は活動電位の発生によると考えられている^{14,15}。そこで、KCl (5-120 mM) を用いて活動電位を生じさせた場合と MES 処理時の Akt リン酸化状態の変化及び活動電位発生と相関して活性化がみられる AMPK リン酸化状態の変化を比較検討した。その結果、以前の報告と一致して活動電位発生誘導により AMPK リン酸化は誘導されたが、一方で Akt リン酸化に変化はなかった (Figure 8B)。また、MES 処理により処理後 1 時間までに AMPK リン酸化亢進は起こらないことも確認できている (Figure 5C)。これらの結果から、MES 処理と活動電位誘発刺激では細胞内シグナルへ与える影響が異なる事が示された。

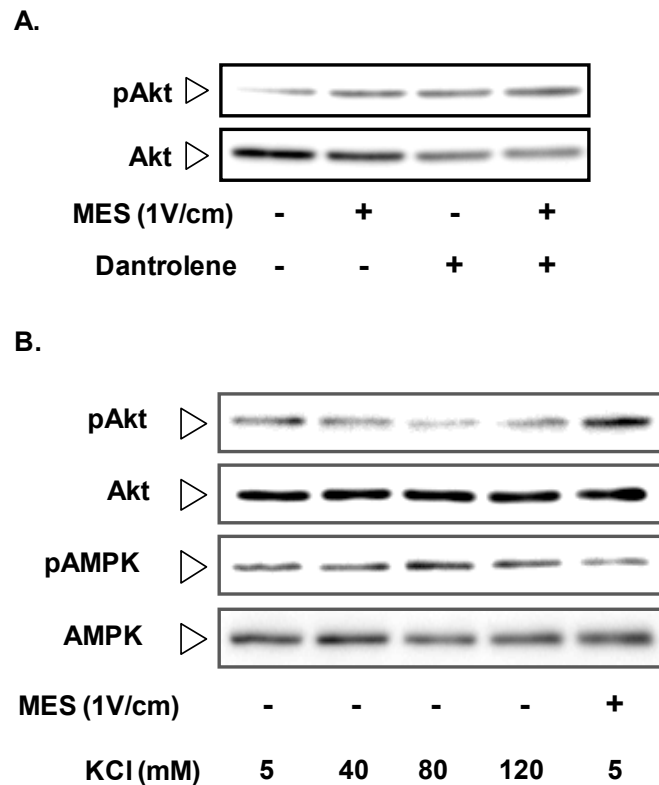


Figure 8. The mechanistic difference between MES and muscle contraction.

A) Differentiated L6 cells were pre-treated with dantrolene (25 μ M, 10 min) and then co-treated with MES for 10 min. Lysates were immediately extracted after treatment. Cell lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.

B) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 V/cm, 0.1 ms, 55 pps) for 10 min and/or with the indicated concentration of KCl. Cell lysates were immediately extracted after treatment. Cell lysates were analyzed by Western blotting using the indicated antibodies.

第5項 MES 処理のミトコンドリア膜電位に与える影響

本項からは、PI-3K/Akt シグナルと同様にプレコンディショニング効果において重要な、ミトコンドリアを介したシグナルに対し、MES 処理の与える影響を検討した結果を述べる。

まず、MES 処理のミトコンドリア膜電位に与える影響を経時的に評価した。L6 細胞を MES 処理直後と 2 時間後に回収し検討した。その結果、MES 処理直後に約 20% のミトコンドリア膜電位の低下が観察され、MES 処理から 2 時間後には未処理サンプルと同程度にミトコンドリア膜電位は回復していた (Figure 9A)。したがって、MES 処理はミトコンドリア膜電位を一過性に低下させることが明らかになった。

さらに、ミトコンドリア膜電位低下に伴いリン酸化が亢進することが報告されている AMPK のリン酸化状態を評価した^{16,17}。L6 細胞に MES 処理を行い、2 時間後にタンパク質を回収し、検討を行った結果、MES 処理から 2 時間後に AMPK のリン酸化が亢進していた (Figure 9B, C)。したがって、MES 処理はミトコンドリア膜電位低下に伴うシグナル伝達機構においても影響を与える事が確認できた。

なお、前項までの検討において MES 処理により AMPK リン酸化亢進はみられなかったが、この違いは MES 処理後の時間経過に違いがあるからであると考えられる。筋収縮を誘導する電気刺激では、処理直後から AMPK 活性化が観察されるのに対して、MES 処理では処理から 2 時間経過しないと AMPK リン酸化亢進はみられない。AMPK リン酸化亢進が観察される時間からも MES 処理と筋収縮を誘導する電気刺激では違いがみられる。

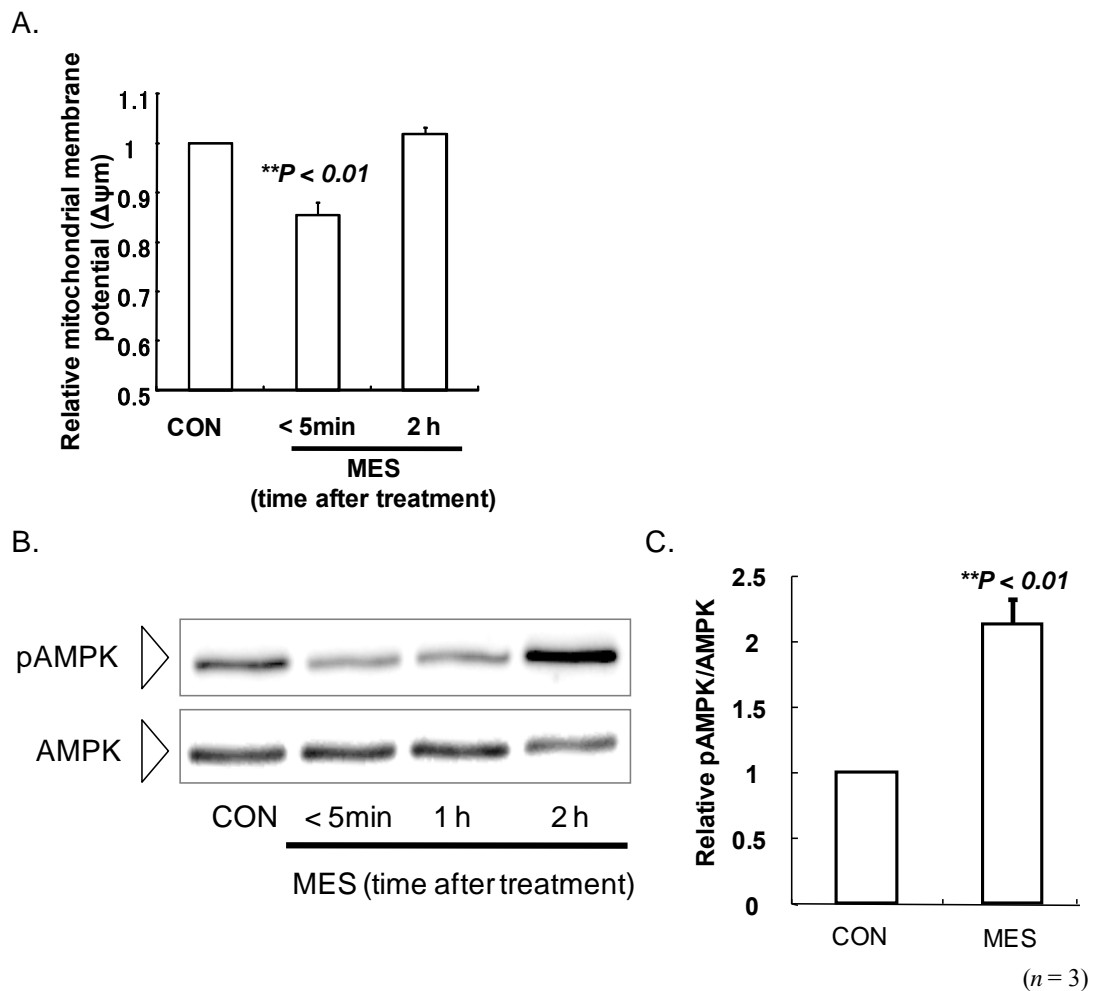


Figure 9. MES activates AMPK through decrease of mitochondrial membrane potential.

A) Differentiated L6 cells were treated with MES for 10 minutes. After treatment, cells were incubated for the indicated time, stained with JC-1 and subjected to flow cytometry. $\Delta\psi_m$ was presented as mean ratio of JC-1 aggregates (red fluorescence)/JC-1 monomer (green fluorescence). Data are presented as mean \pm S.E. $n=3$. $*P < 0.01$, assessed by one-way ANOVA.

B, C) Differentiated L6 cells were treated with MES for 10 minutes. Then whole cell lysates were subjected to Western blotting with anti-AMPK and anti-phosphorylated AMPK (pAMPK) antibodies (B). Relative pAMPK / AMPK (2 h after treatment with MES) is presented as mean \pm S.E. (C). $n=3$. $*P < 0.01$, assessed by one-way ANOVA.

第6項 MES 処理の細胞死に与える影響

一般に、ミトコンドリア膜電位の低下は、細胞死誘導の引き金になることが知られている¹⁸。したがって、ミトコンドリア膜電位低下作用がある MES 刺激により細胞死が誘導されるか検討を行った。

L6 細胞に MES 処理を行い、処理から 24 時間後に LDH assay により細胞死を検討した結果、以前の検討と同様に MES 処理により細胞死は誘導されなことが確認できた (Figure 10)。

したがって、MES 処理は一過性にミトコンドリア膜電位を低下させるものの、この効果は細胞死を誘導するには十分ではないと考えられる。

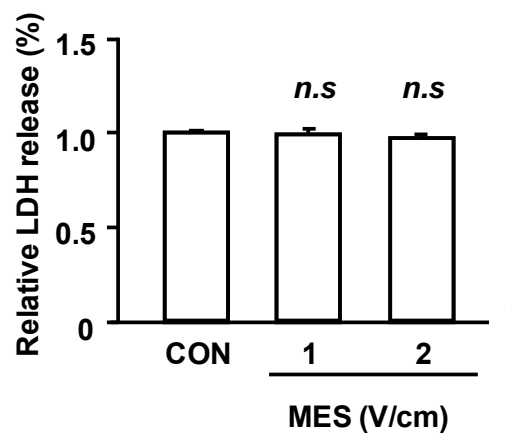


Figure 10. The effect of MES on cell death.

A, B) Differentiated L6 cells were treated with MES (1 or 2 V/cm) for 10 minutes. After treatment, cells were incubated for 24 h. Then, lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined. %LDH release was computed as follows: LDH in medium/total LDH. Data are presented as mean \pm S.E. n=3. not significant (n.s), assessed by one-way ANOVA.

第7項 MES 処理のミトコンドリア膜電位低下依存的転写制御機構に与える影響

これまでにミトコンドリア電子伝達系阻害剤により GLUT1 及び GLUT4 の mRNA 発現が上昇することが報告されている^{19,20}。したがって、MES 処理がミトコンドリア電子伝達系阻害剤と同様に GLUT1 及び GLUT4 mRNA 発現を上昇させるのか検討を行った。

L6 細胞に MES 処理を行い、1 時間後、2 時間後、8 時間後に RNA を回収した。また、実験のポジティブコントロールとして、ミトコンドリア電子伝達系阻害剤 rotenone (1 μ M, 8 h) 処理を行い RNA 回収を行った。検討の結果、MES 処理により GLUT1 及び GLUT4 mRNA 発現が、rotenone と同様に上昇していた (Figure 11A, B)。したがって、MES 処理はミトコンドリア膜電位低下に伴う転写制御機構においても影響を与える事が確認できた。

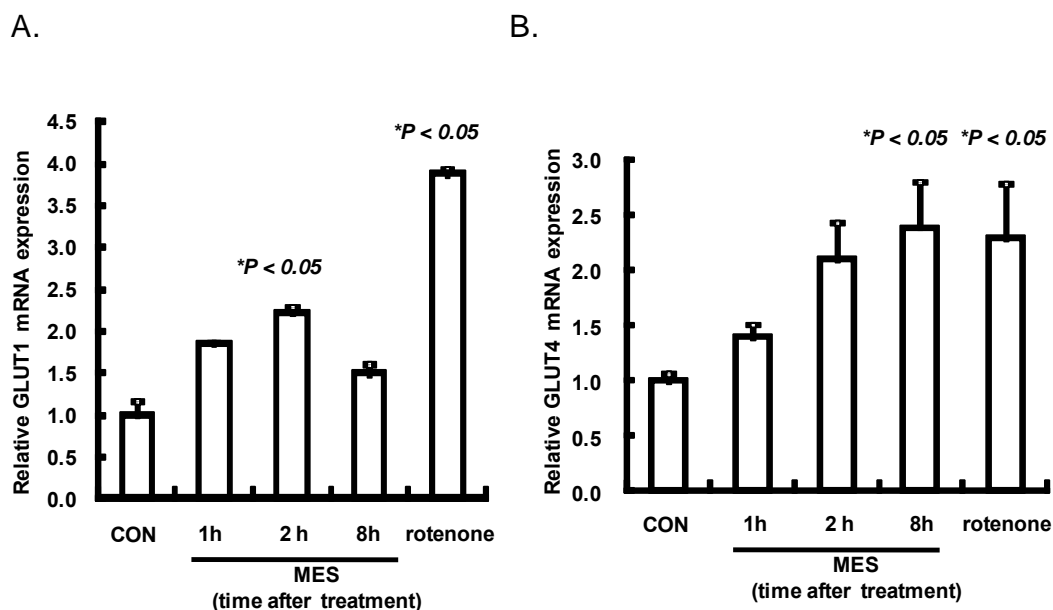


Figure 11. Decrease of mitochondrial membrane potential by MES increases GLUT1 and GLUT4 mRNA expression.

A, B) Differentiated L6 cells were treated with MES for 10 minutes or with the mitochondrial respiratory chain inhibitor rotenone (1 μ M, 8 h). Rotenone was used as a positive control. After treatment, cells were incubated for the indicated time. Total RNA was extracted and subjected to quantitative real-time RT-PCR to detect GLUT1 (A) and GLUT4 (B) mRNA. These mRNA were normalized to the level of 18s ribosomal RNA (internal control). Data are presented as mean \pm S.E. n=3. * $P < 0.05$, assessed by one-way ANOVA.

第8項 MES 処理によるミトコンドリア膜電位低下作用における mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel の役割

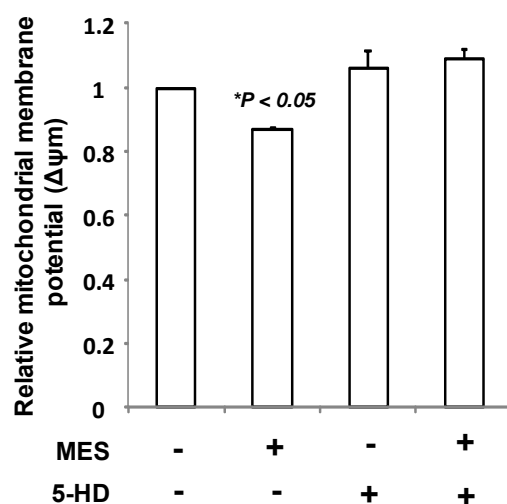
ミトコンドリアを介したプレコンディショニング刺激は、mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel 阻害剤 5-HD を併用することでプレコンディショニング効果が得られなくなることが広く知られている。そこで、MES 処理がミトコンドリアを介したプレコンディショニング刺激と同様の作用機序があるのかを検討するために、MES 処理と 5-HD 処理を併用し、ミトコンドリア膜電位変化及び AMPK リン酸化を指標に検討を行った。

L6 細胞に 5-HD を 5 分間前処置した後、MES 処理を併用しミトコンドリア膜電位変化を検討した。その結果、MES と 5-HD を併用した場合にミトコンドリア膜電位の低下がみられなかった (Figure 12A)。

さらに、同様の条件で 5-HD 処理を行い、MES 処理から 2 時間後にタンパク質を回収し、AMPK リン酸化状態変化を検討した。その結果、ミトコンドリア膜電位変化を検討した結果と相関して、MES と 5-HD を併用した場合に AMPK のリン酸化亢進がみられなかった (Figure 12B)。

これらの結果から、MES によるミトコンドリア膜電位低下作用に mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel が関与していることが示唆された。

A.



B.

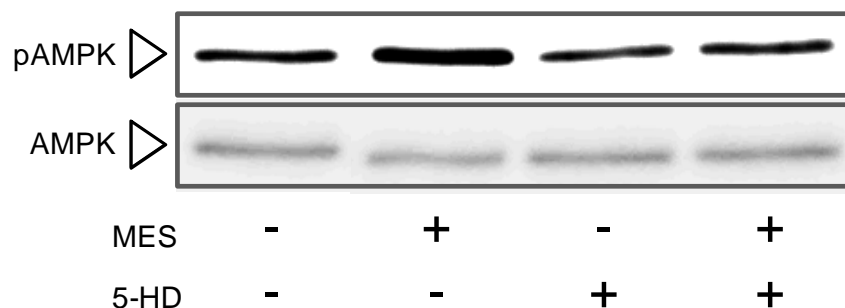


Figure 12. AMPK was activated after mitochondrial membrane potential was decreased by MES.

A) Differentiated L6 cells were pre-treated with 5-Hydroxydecanoic acid (5-HD, 100 μ M, 5 min) and then co-treated with MES for 10 minutes. After treatment, stained with JC-1 and subjected to flow cytometry. Data are presented as mean \pm S.E. n=3. * $P < 0.05$, assessed by one-way ANOVA.

B) Differentiated L6 cells were pre-treated with 5-Hydroxydecanoic acid (5-HD, 100 μ M, 5 min) and then co-treated with MES for 10 minutes. Then whole cell lysates were subjected to Western blotting with anti-AMPK and anti-phosphorylated AMPK (pAMPK) antibodies.

第9項 HS, MES と HS 併用処理のミトコンドリア膜電位低下作用に与える影響

肝虚血再灌流障害軽減や胃潰瘍の予防効果は, MES 及び HS 併用処理により得られていた. このようなストレスに対する MES 及び HS 併用処理によるプレコンディショニング効果において, ミトコンドリアを介したシグナルを活性化させる刺激は MES 処理のみであるのか又は HS 処理においても活性化の誘導はみられるのか検討を行った. さらに, MES 処理により得られるミトコンドリア膜電位低下作用は, MES 処理条件を交流電流条件に変換させても観察されるのか検討を行った.

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を用いて, MES, HS (42°C), MES 及び HS 併用処理をそれぞれ 10 分間行い, 処理直後のミトコンドリア膜電位変化を検討した. その結果, HS 単独処理ではミトコンドリア膜電位の低下はみられなかったが, MES 処理と MES 及び HS 併用処理ではミトコンドリア膜電位の低下がみられた (Figure 13A). また, MES 処理に比べ, MES 及び HS 併用処理で同程度のミトコンドリア膜電位の低下がみられたことから, MES 及び HS 併用処理によるミトコンドリア膜電位の低下は MES 処理によるものであると考えられる.

次に, RAW264.7 細胞を用いて, 交流電流刺激を行い, 処理直後のミトコンドリア膜電位変化を検討した. その結果, 交流電流刺激ではミトコンドリア膜電位の低下がみられず, ミトコンドリア膜電位を低下させるには直流電流である必要性が明らかになった (Figure 13B).

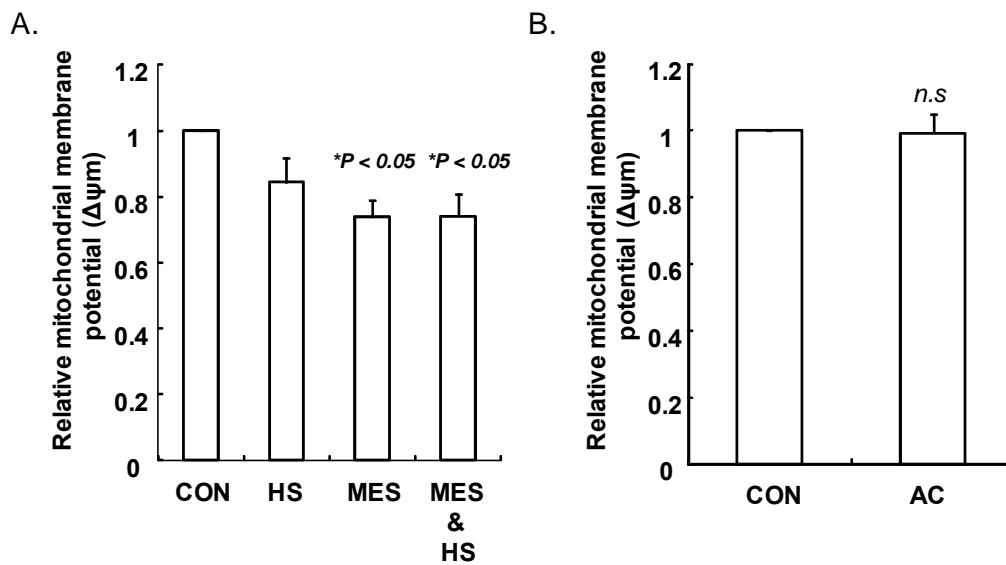


Figure 13. Effect of physical stimulation on mitochondrial membrane potential.

A) Raw264.7 cells were treated with MES and/or HS for 10 minutes. After treatment, stained with JC-1 and subjected to flow cytometry. Data are presented as mean \pm S.E. $n=3$. $*P < 0.05$, assessed by one-way ANOVA.

B) Raw264.7 cells were treated with alternate current (AC, 1V/cm, 0.1 msec, 110 Hz) for 10 minutes. . After treatment, stained with JC-1 and subjected to flow cytometry. Data are presented as mean \pm S.E. $n=3$. *n.s.*, assessed by one-way ANOVA.

第 10 項 MES 処理の線虫に対する効果の確認

MES 処理によるプレコンディショニング効果を *in vivo* において確認するために、モデル動物線虫を用いて検討を行った²¹。

線虫に MES 処理を行う場合にマウス、培養細胞を用いた検討と同様の効果を得られるのか確認するために、MES 処理によりユビキチン化タンパク質の増加がみられるか検討を行った。

同調培養し得られた野生型線虫株 N₂ が成虫になった後、MES (1 V/cm 又は 3.5 V/cm) 処理を行った。MES 処理から 8 時間後にタンパク質を回収し、検討を行った結果、1 V/cm の電圧条件においては 10, 15, 20 分間いずれの処理時間においてもユビキチン化タンパク質の蓄積がみられなかったが、一方で 3.5 V/cm の電圧条件においては MES 処理の処理時間依存的なユビキチン化タンパク質の蓄積がみられた (Figure 14A, B)。また、MES 処理直後、3, 5, 8, 10, 12 時間後にタンパク質回収を行った結果からもユビキチン化タンパク質の蓄積が確認できた (Figure 14C)。

これらの結果から、マウス、培養細胞と同様の効果を線虫で得るためには、電圧条件は 3.5 V/cm に設定する必要があることが確認できた。

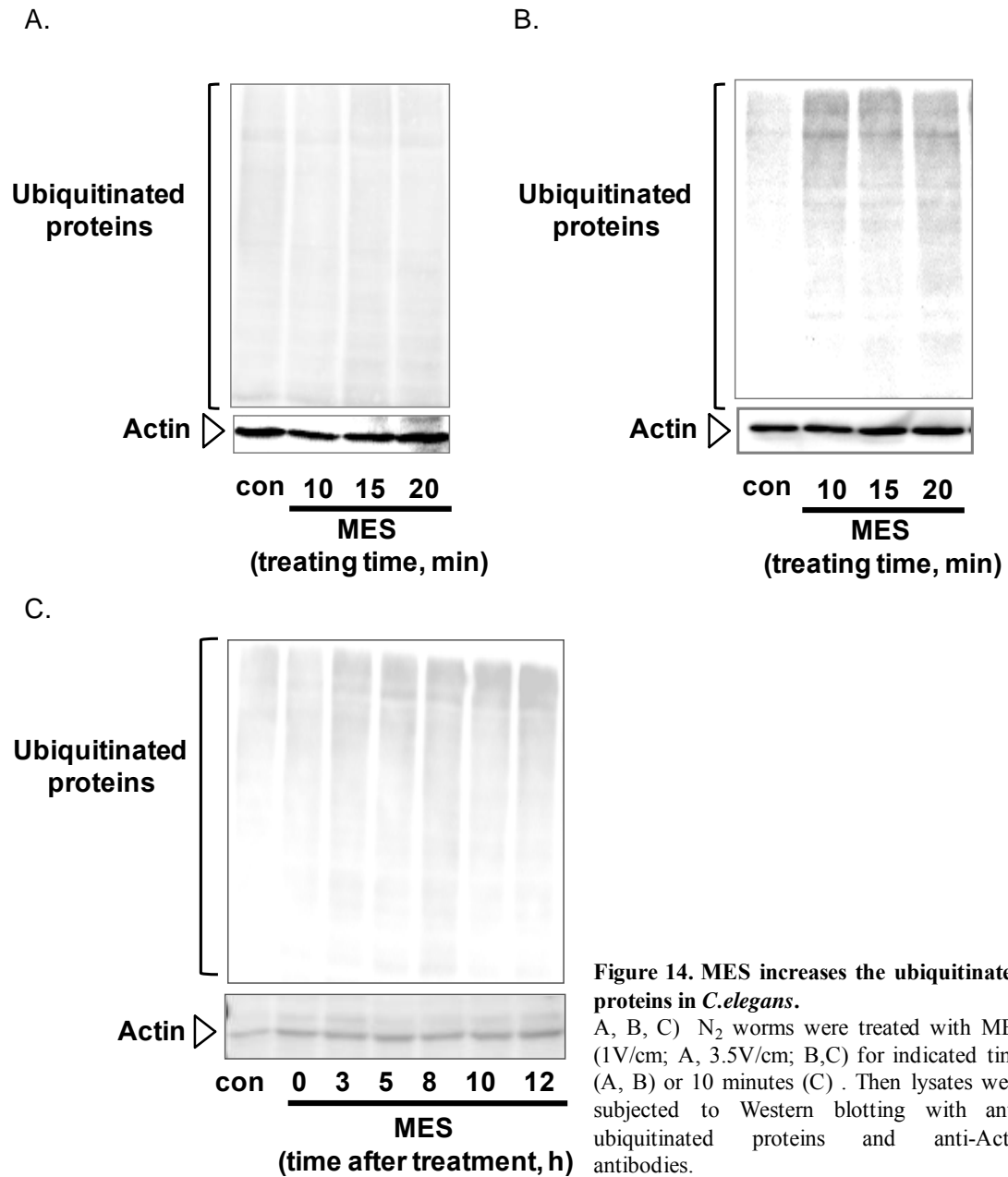


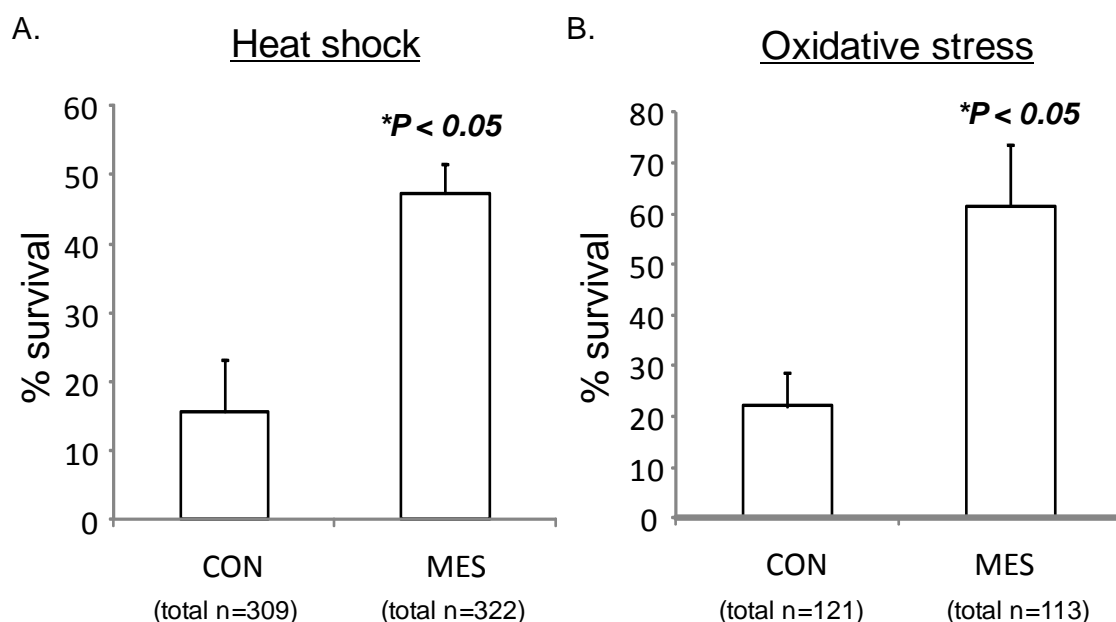
Figure 14. MES increases the ubiquitinated proteins in *C.elegans*.

A, B, C) N_2 worms were treated with MES (1V/cm; A, 3.5V/cm; B,C) for indicated time (A, B) or 10 minutes (C) . Then lysates were subjected to Western blotting with anti-ubiquitinated proteins and anti-Actin antibodies.

第 11 項 MES 処理による温熱及び酸化ストレス耐性の付与

前項の結果から、線虫においても MES 処理を行う場合にマウス、培養細胞を用いた検討と同様の効果が得られることが確認できたため、本項では野生型 N_2 線虫を用いて MES 処理によりプレコンディショニング効果が得られるか検討を行った²¹。

N_2 線虫を同調培養し、幼虫期の 3 日間に 1 日 1 回計 3 回 MES 処理をそれぞれ 20 分間行い、最終処理直後に温熱 (30°C) 又は酸化ストレス (4 mM パラコート) 条件下に移した^{9,22-26}。24 時間毎に生死判定を行う事で生存率を算出した。その結果、興味深い事に温熱ストレス負荷から 72 時間後において MES 処理群の生存率がコントロール群に比べて有意に高く、さらに酸化ストレス負荷から 72 時間後においても MES 処理群の生存率がコントロール群に比べて有意に高いことが明らかになった (Figure 15A, B)。また、MES による温熱ストレス耐性付与と相関して、hsp70 mRNA 発現が増加しており、MES 処理による hsp70 発現上昇により温熱ストレス耐性が付与されていると考えられる (Figure 15C)。一方で、MES による酸化ストレス耐性付与と相関して、sod-1, 2, 3 及び sod-5 mRNA 発現が増加しており、MES 処理による sods 発現上昇により酸化ストレス耐性が付与されていると考えられる (Figure 15 D-H)。



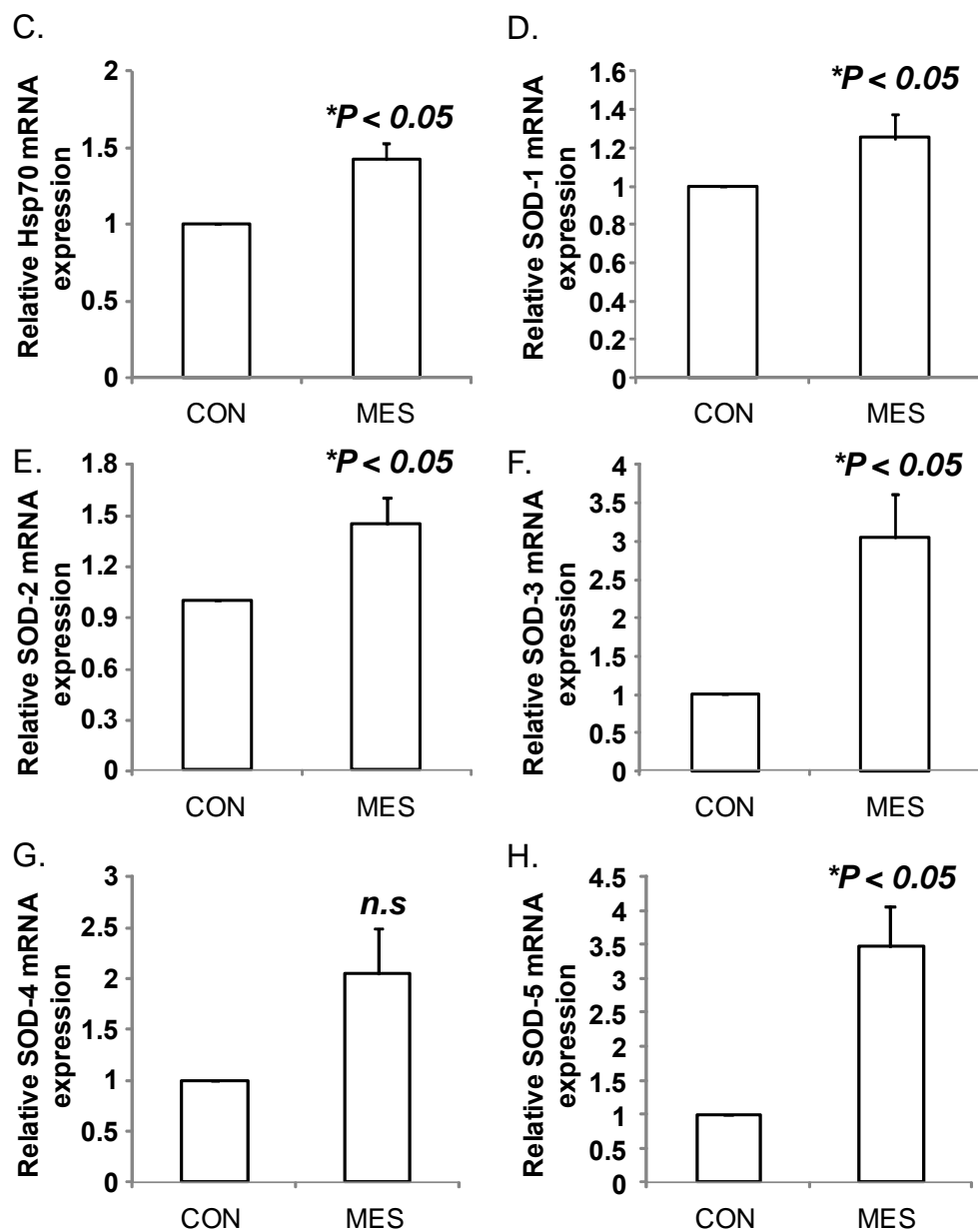


Figure 15. MES induces heat and oxidative stress resistance in wt N_2 worms.

A, B) N_2 worms were once a day treatment with MES (3.5 V/cm, 20min) for 3 days at larval stage. After last treatment, worms were incubated under the condition of heat (A) or oxidative stress (B). Data are presented as mean \pm S.E. $*P < 0.05$, assessed by one-way ANOVA.

C-H) N_2 worms were once a day treatment with MES (20min) for 3 days. After last treatment, Total RNA was extracted and subjected to quantitative real-time RT-PCR to detect Hsp70 (C), SOD-1 (D), SOD-2 (E), SOD-3 (F), SOD-4 (G) and SOD-5 (H) mRNA. These mRNA were normalized to the level of Actin mRNA (internal control). Data are presented as mean \pm S.E. $n=3$. $*P < 0.05$ or not significant (*n.s.*), assessed by one-way ANOVA.

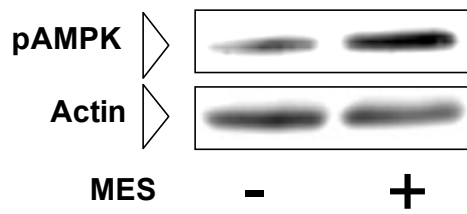
第 12 項 MES 処理による AMPK 依存的温熱及び酸化ストレス耐性の付与

前項の結果から、MES 処理による温熱及び酸化ストレス耐性の付与がみられた。これまでの検討結果から、MES 処理により PI-3K/Akt シグナル及びミトコンドリアを介したプレコンディショニングシグナル活性化がみられることが確認できている。線虫におけるストレス耐性付与の観点から両シグナルを比較すると、ミトコンドリアを介したシグナル活性化ではストレス耐性は付与されるものの、PI-3K/Akt シグナル活性化では逆にストレスに対する抵抗性が低下することが報告されている²³。したがって、MES 処理によるストレス耐性付与機構解明にあたり、ミトコンドリアを介したシグナルつまり AMPK に焦点を絞って検討を行った⁹。

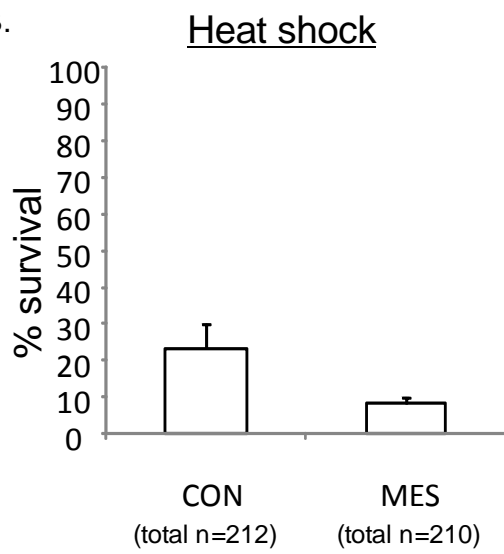
まず、培養細胞と同様に線虫においても AMPK リン酸化亢進がみられるか検討するために、N₂ 線虫に幼虫期の 3 日間に 1 日 1 回計 3 回 MES 処理をそれぞれ 20 分間行い、最終処理から 2 時間後にタンパク質を回収し検討を行った。その結果、MES 処理により AMPK リン酸化が線虫においても亢進されることが明らかになった (Figure 16A)。

そこで、線虫 AMPK ホモログ (AAK-2) 変異体 TG38 株を用いて、MES によるストレス耐性付与に AMPK が関与しているのか検討を行った。TG38 線虫を同調培養し、幼虫期の 3 日間に 1 日 1 回計 3 回 MES 処理をそれぞれ 20 分間行い、最終処理直後に温熱 (30°C) 又は酸化ストレス (4 mM パラコート) 条件下に移した。24 時間毎に生死判定を行う事で生存率を算出した。その結果、N₂ 株を用いた検討と異なり、TG38 株では MES 処理により温熱及び酸化ストレスいずれに対してもストレス耐性は付与されなかった (Figure 16B, C)。また、N₂ 線虫を用いた検討では、MES 処理により hsp70, sod-1, 2, 3 及び sod-5 mRNA 発現上昇がみられたが、AAK-2 変異体 TG38 線虫ではこれらの遺伝子発現上昇はみられなかった (Figure 16D-J)。したがって、MES 処理による温熱及び酸化ストレスに対する耐性の付与に AMPK が重要な役割を担っていることが明らかになった。

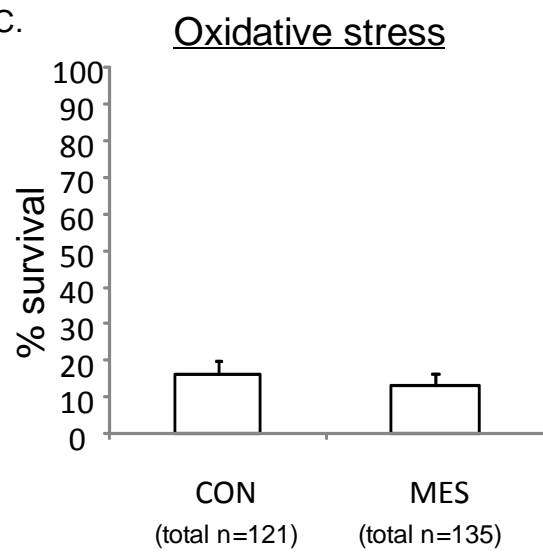
A.



B.



C.



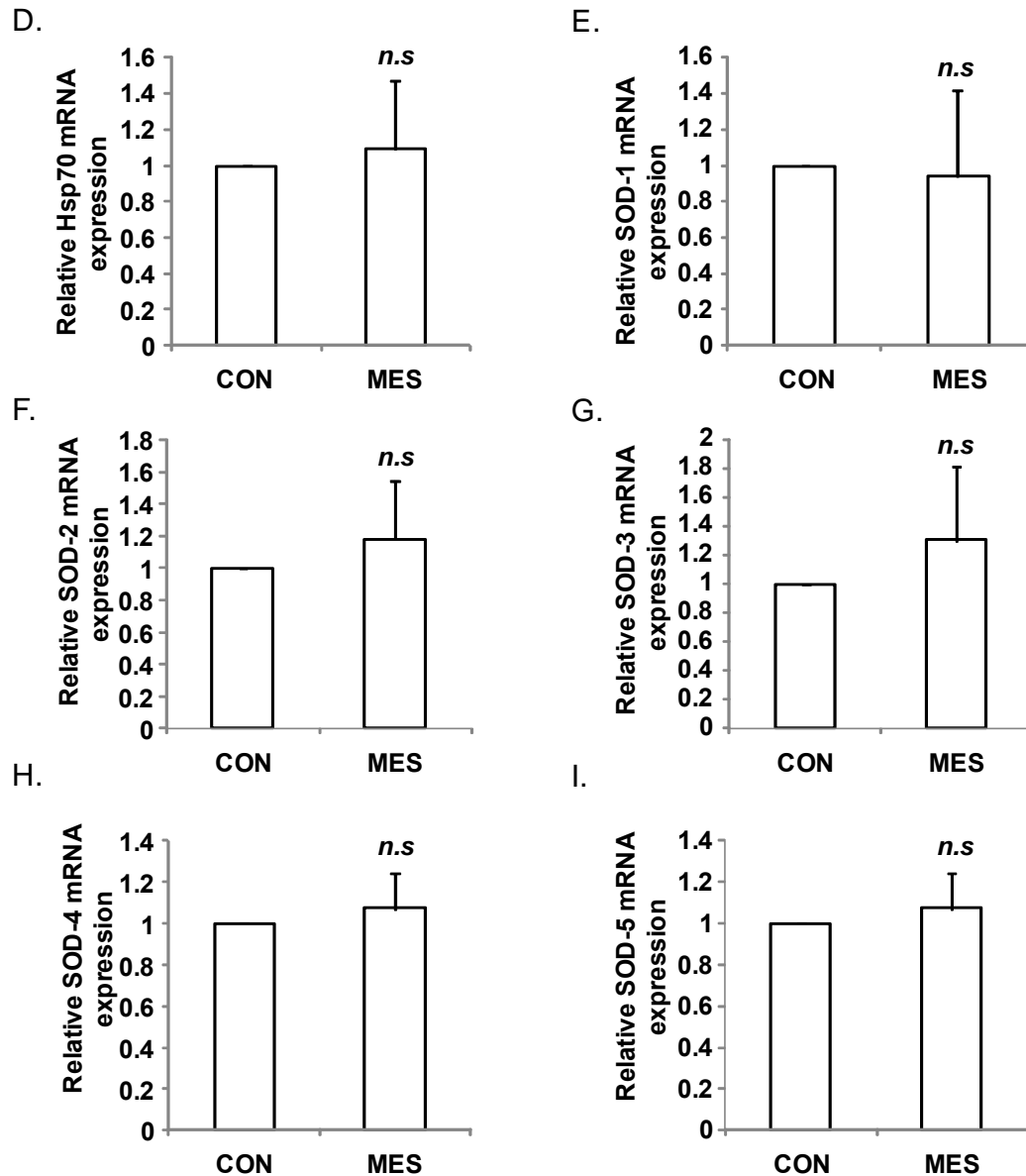


Figure 16. MES does not induce heat and oxidative stress resistance in *aak-2* mutant worms.

A) N_2 worms were once a day treatment with MES (3.5 V/cm, 20min) for 3 days at larval stage. After last treatment, lysates were subjected to Western blotting with anti-phospho-AMPK and anti-AMPK antibodies.

B, C) TG38 worms were once a day treatment with MES (20min) for 3 days at larval stage. After last treatment, worms were incubated under the condition of heat (B) or oxidative stress (C). Data are presented as mean \pm S.E. *not significant* (*n.s.*), assessed by one-way ANOVA.

D-I) TG38 worms were once a day treatment with MES (20min) for 3 days. After last treatment, Total RNA was extracted and subjected to quantitative real-time RT-PCR to detect Hsp70 (D), SOD-1 (E), SOD-2 (F), SOD-3 (G), SOD-4 (H) and SOD-5 (I) mRNA. These mRNA were normalized to the level of Actin mRNA (internal control). Data are presented as mean \pm S.E. *n*=3. *not significant* (*n.s.*), assessed by one-way ANOVA.

第 13 項 MES 処理による線虫寿命の延長

ストレス耐性が付与される多くの場合に、線虫寿命の延長効果も観察される^{22,27}。そこで、MES 処理は線虫において温熱及び酸化ストレス耐性を付与したことから、寿命延長効果についても検討を行った。

N₂ 線虫を同調培養し、幼虫期の 3 日間に 1 日 1 回計 3 回 MES 処理をそれぞれ 60 分間行い、通常の培養条件の下 2-3 日毎に生死判定を行った。その結果、MES 処理により寿命の延長効果が得られた (Figure 17)。この検討からも MES 処理によるストレス耐性付与を支持する結果が得られた。

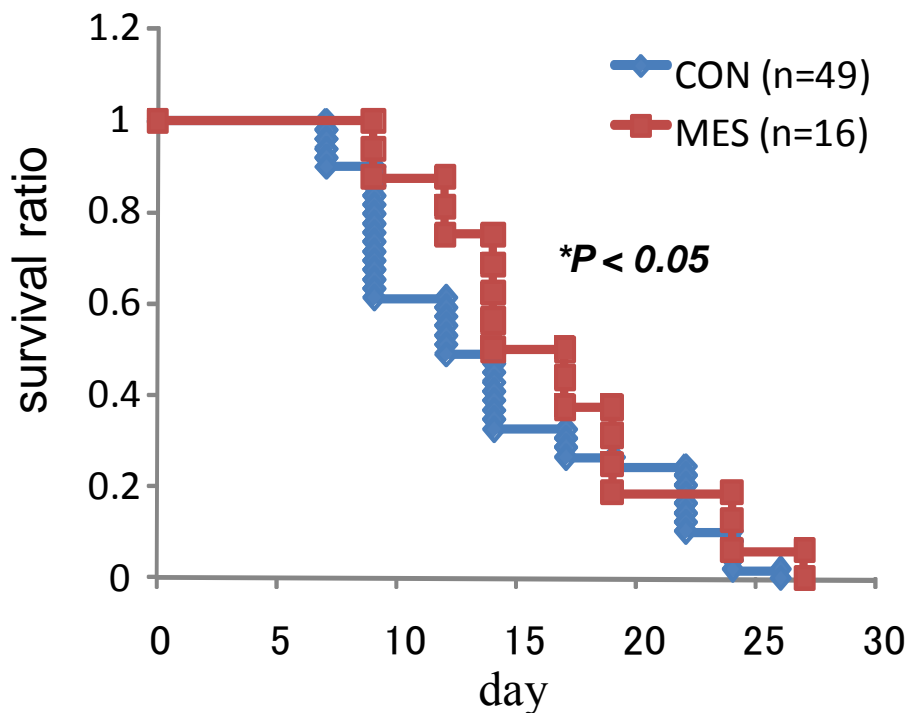


Figure 17. MES increases lifespan in wt N₂ worms.

N₂ worms were once a day treatment with MES (3.5 V/cm, 60min) for 3 days at larval stage. After last treatment, survival ratio was assessed. * $P < 0.05$, assessed by Log-rank test.

第3節 考察

本章では、MES 処理により PI-3K/Akt シグナル及びミトコンドリアを介したシグナルが活性化されることを示すと共に、これらのシグナル活性化が生理学的に意義あるものであることを示した。

まず、PI-3K/Akt シグナルに関しては、Akt リン酸化状態を指標とする検討結果から、これまでに本研究室において様々な検討を重ねてきた電流条件が、最も細胞機能に影響を与えることを示した。また、ウシ胎仔血清を含まない細胞培養液を用いて検討を行った結果から、MES 処理がウシ胎仔血清に含まれる成長因子非依存的にシグナル活性化を誘導していると考えられる。さらに、MES 処理により PI-3K 活性化及び PI-3K 活性化依存的な Akt リン酸化亢進が観察された。インスリンにより誘導される PI-3K/Akt シグナル活性化は、GLUT 4 膜上発現亢進を介した細胞内への糖取り込みを促進することが広く知られているが、MES 処理においても同様の効果がみられた。したがって、インスリン作用の増強を報告した本研究室における以前の知見に加え、MES 処理はインスリン非依存的な糖取り込み促進効果を示すと考えられる。本結果は、MES と HS 併用処理により得られる抗糖尿病効果を作用メカニズムの観点から支持する結果であると考えられる。確かに、MES 処理による Akt リン酸化亢進は一過性の効果であるが、骨格筋は個体全体における約 80% の糖取り込みを担っていることから、MET 処理により得られる抗糖尿病効果への寄与は十分に考えられる。これまでに電気刺激が筋収縮を誘発し、AMPK 依存的に糖取り込みを促進することが、運動による代謝機能亢進において重要であると考えられている。本研究において、MES による Akt リン酸化亢進に筋収縮は必要ではなく、また KCl を用いて活動電位を生じさせた場合には Akt リン酸化亢進はみられなかったこと、さらに MES 処理により AMPK リン酸化亢進がみられた時間では糖取り込みの促進はみられなかったことから (data not shown)、従来用いられている電気刺激と MES 処理による作用には違いがあると考えられる。

次に、ミトコンドリアを介したシグナルに関する検討では、MES 処理により細胞死を誘導しない程度の一過性のミトコンドリア膜電位低下がみられた。さらに、ミトコンドリア膜電位低下依存的な AMPK リン酸化亢進が起これ、この効果は 5-HD 併用によりみられなくなった。これらの結果から、MES 処理はプ

レコンディショニング刺激と同等の効果を示すことが考えられる。実際に、線虫を用いた検討において MES 前処理により、温熱及び酸化ストレスに対する耐性が AMPK 依存的に付与されることが確認できた。また、MES 及び HS 併用を前処理にすることにより肝虚血再灌流障害が軽減されるという本研究室の知見からもこの解釈の妥当性が支持される。

現在、どのようにしてプレコンディショニング効果を得るのかという点に臨床の現場における関心が集まっている。短時間の血管狭窄を用いた方法は倫理上の問題があり、薬理的プレコンディショニングとして期待される薬剤は単独使用での有用性は十分なものではないという指摘もある^{28,29}。このような現状の中、本研究結果を含め、科学的根拠を積み重ねてきた MES 及び HS 併用処理または MES 処理を用いた方法は、新たなプレコンディショニング効果誘導法として有用であると考えられる。

第3章 最適化した低電圧パルス電流及び温熱併用処理の新規膵β細胞分化誘導への応用

第1節 背景

再生医療の臨床適用が期待されている疾患として糖尿病が挙げられている。糖尿病は抗膵島抗体が膵β細胞を破壊するために生じる1型糖尿病とインスリン分泌低下や作用不足が主体となる2型糖尿病に分類されている。いずれにおいても、糖尿病の根治を考える上で膵島再生の実現にかかる期待は大きい³⁰。

ES細胞は全ての細胞系譜へと分化可能な多能性を有する細胞である。したがって、再生医療実現に向けた研究において広く用いられている⁶。これまでの研究では、ES細胞から中胚葉及び外胚葉細胞系譜への分化誘導に関して、効率的な分化誘導法が報告されている^{31,32}。しかしながら、膵細胞を含む内胚葉系細胞への分化誘導に関しては、分化効率の観点から十分な報告は無く、新たな方法論が強く求められている。

近年、ES細胞から内胚葉細胞へと分化する過程においてどのようなシグナルが重要であるか明らかになってきた。bFGF及びActivinの添加により膵前駆細胞への分化が促進されることが報告されており、bFGFにより活性化されるシグナル分子としてAkt, ERK, ActivinによりSmad2/3, p38MAPKが活性化されることがES細胞から内胚葉細胞さらに膵前駆細胞(Pdx-1⁺細胞)への分化に重要である(Figure 18)^{6,33,34}。

ここで、第2章で明らかにしたMES処理によるPI-3K/Aktシグナル活性化作用に着目した。Aktは、ES細胞から膵前駆細胞(Pdx-1⁺細胞)への分化を促進するbFGF刺激により活性化することから、MES処理により同様の分化促進作用が得られるのではないかと考えた。また、温熱(HS)刺激によりAktが活性化する報告があり³⁵、MES及びHS併用処理により相加的なAktリン酸化亢進も認められたため、MES及びHS併用処理を未だ十分な分化誘導法の確立されていない膵前駆細胞(Pdx-1⁺細胞)への分化誘導の系に組み込み検討を行った。

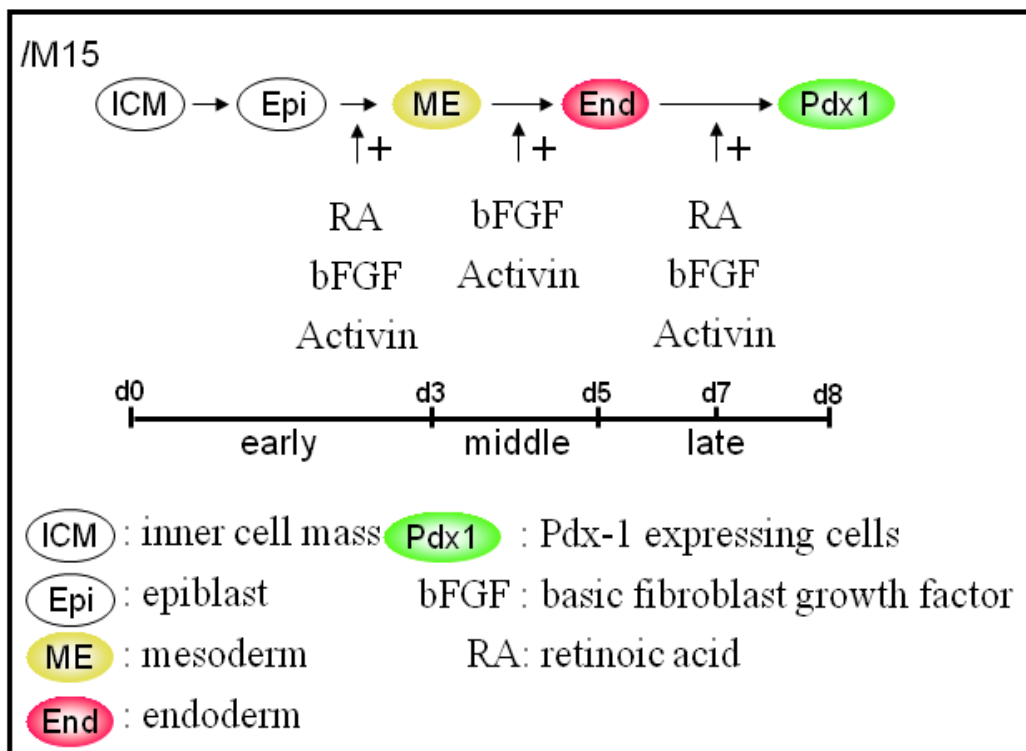


Figure 18. A schematic drawing of the signaling events in ES cells differentiate into pancreatic progenitor cells (Pdx-1⁺ cells).

第2節 実験成績

第1項 MES 及び HS の併用処理による膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化誘導

MES 及び HS 併用処理の膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化に対する効果を検討するために, Pdx1 プロモーター下に GFP を導入した組み換え遺伝子をホモでもつ遺伝子組み換えマウスの胚盤胞から樹立した Pdx1/GFP 細胞 (SK7 ES 細胞) を用いて検討を行った⁶. Pdx-1 KO マウスでは, 膵原基は形成されるが, 成熟外分泌細胞及び内分泌細胞を欠いていること, Pdx-1 発現細胞から外分泌, 内分泌及び導管細胞が発生することなどが報告されていることなどから, Pdx-1 は膵前駆細胞マーカーとして用いられている.

SK7 ES 細胞を分化誘導メディウムで培養を開始し (day0), 三胚葉への運命決定後 (day7) に MES 及び HS 併用処理を行った (Figure 19A). 処理から 24 時間後に 内胚葉マーカーである E-cadherin 及び Cxcr4 の細胞表面発現を指標とし, FCM により検討を行った結果, MES 及び HS 併用処理により内胚葉細胞数に変化はみられなかった (Figure 19B, C). 一方で興味深いことに, 内胚葉細胞における膵前駆細胞 (Pdx-1⁺) の割合が約 2 倍増加していた (Figure 19B, C). さらに, MES 及び HS 併用処理により内在性 Pdx-1 mRNA 発現が増加していることから MES 及び HS 併用処理が膵前駆細胞 (Pdx-1⁺) への分化を促進していることが確認できた (Figure 19D).

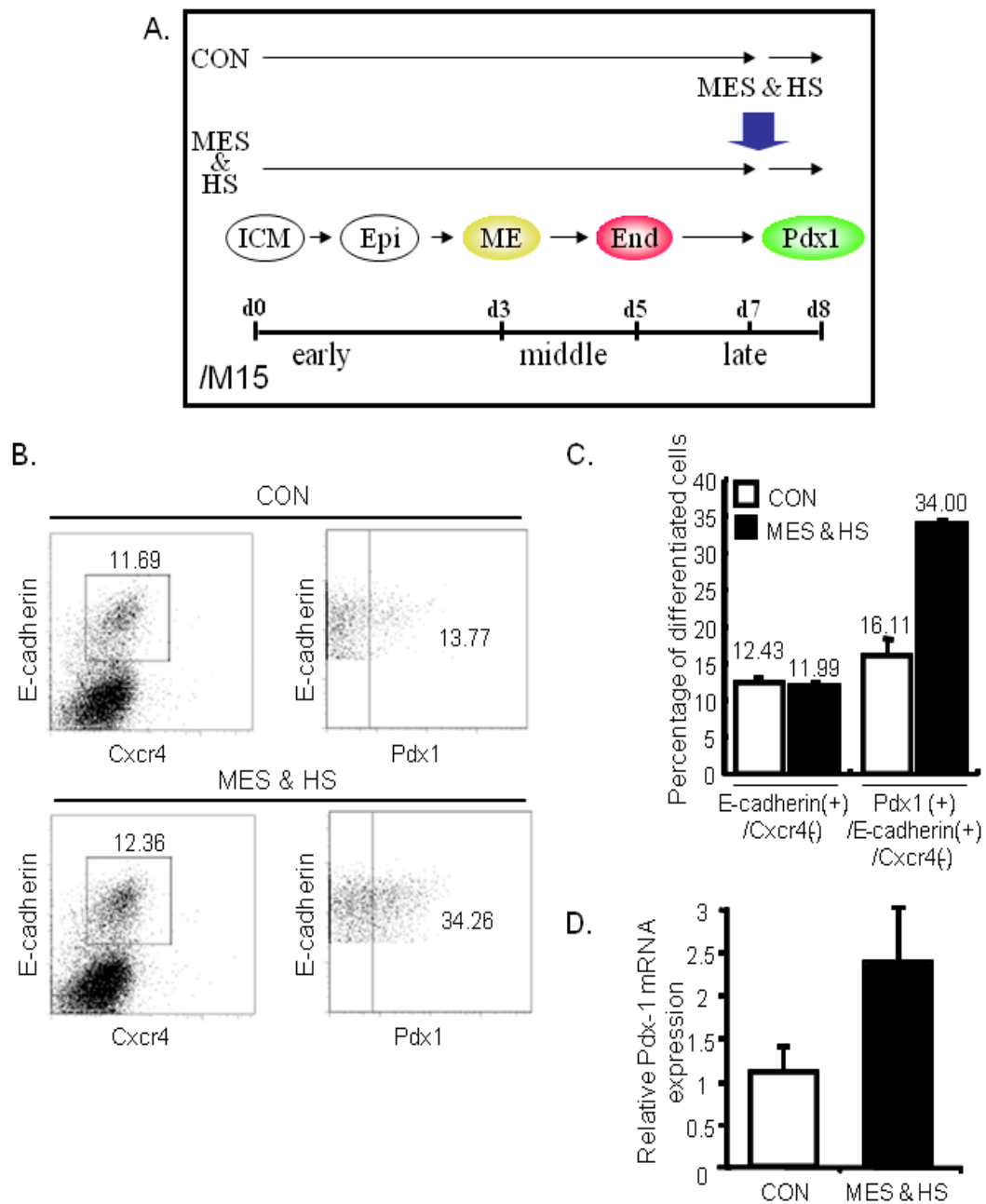


Figure 19. MES with HS enhances the generation of Pdx1-expressing cells derived from mouse ES cells.

A) A schematic drawing of experimental protocol.

B) Numbers indicate the proportion of E-cadherin+/Cxcr4+ definitive endoderm cells within total ES cell culture (left panels). Numbers indicate the proportion of E-cadherin+/Pdx1+ pancreatic progenitor cells within definitive endoderm cells (right panels).

C) Percentage of differentiated cells/ total cells (%). Left columns shows E-cadherin+/Cxcr4+ definitive endoderm cells within total ES cell culture. Right columns shows E-cadherin+/Pdx1+ pancreatic progenitor cells within definitive endoderm cells.

D) Relative Pdx-1 mRNA expression is presented as mean \pm S.E. n=2.

第2項 MES 及び HS 併用処理と液性因子添加による膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化誘導

前節の結果から, MES 及び HS 併用処理による膵前駆細胞への分化促進効果が認められたため, 従来用いられてきた液性因子 (activin 及び bFGF 共刺激) を用いた分化誘導法の系に MES 及び HS 併用処理を加え検討を行った (Figure 20A). その結果, activin 及び bFGF 共刺激下においても MES 及び HS 併用処理による膵前駆細胞 (Pdx-1⁺) への分化促進効果が観察された (Figure 20B-D). したがって, MES 及び HS 併用処理といった物理的刺激を用いる事で, 従来の液性因子を用いた ES 細胞から膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化誘導法の更なる効率化が可能であると考えられる.

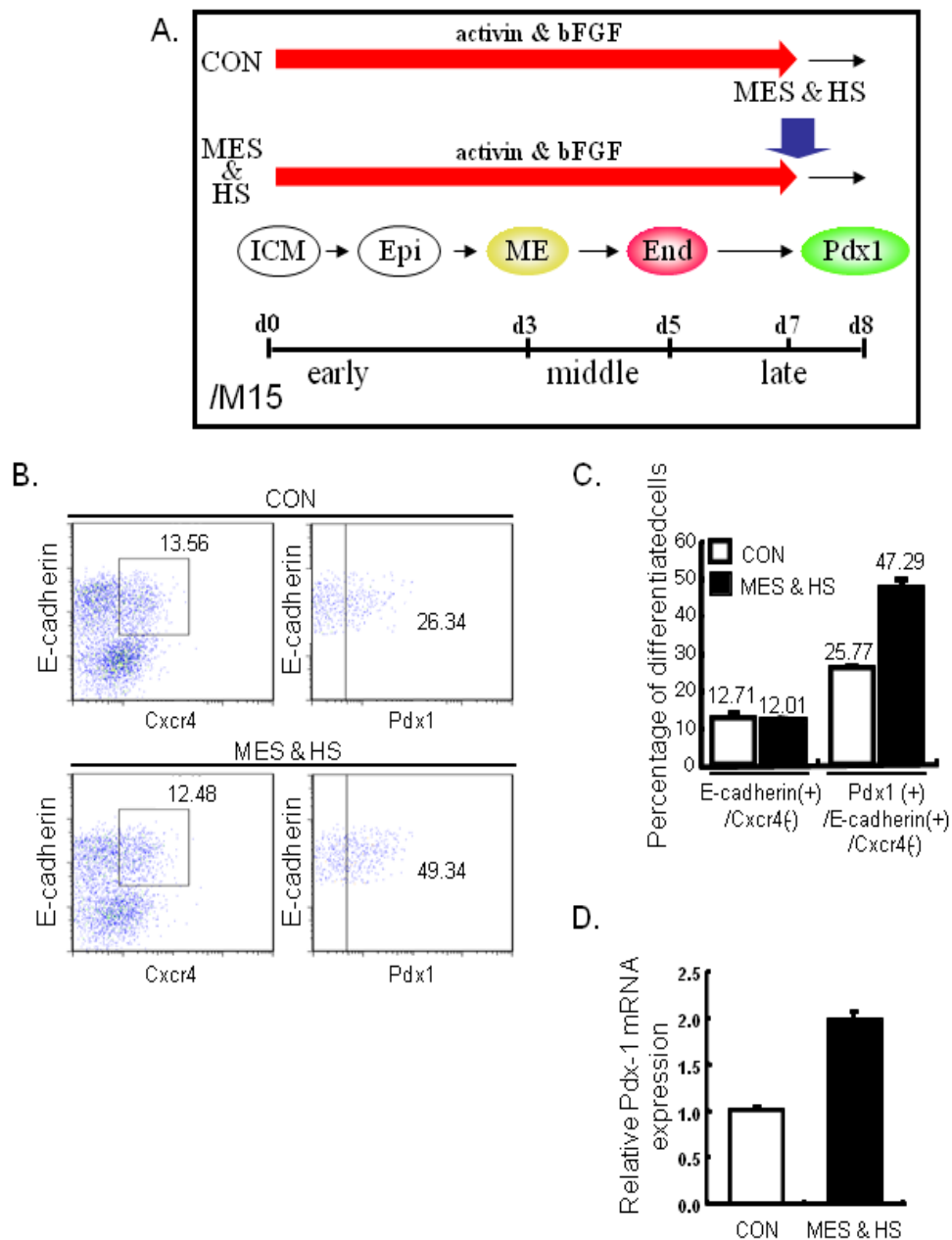


Figure 20. MES + HS with activin & bFGF synergistically enhances the generation of Pdx1-expressing cells derived from mouse ES cells.

A) A schematic drawing of experimental protocol.

B) Numbers indicate the proportion of E-cadherin+/Cxcr4+ definitive endoderm cells within total ES cell culture (left panels). Numbers indicate the proportion of E-cadherin+/Pdx-1+ pancreatic progenitor cells within definitive endoderm cells (right panels).

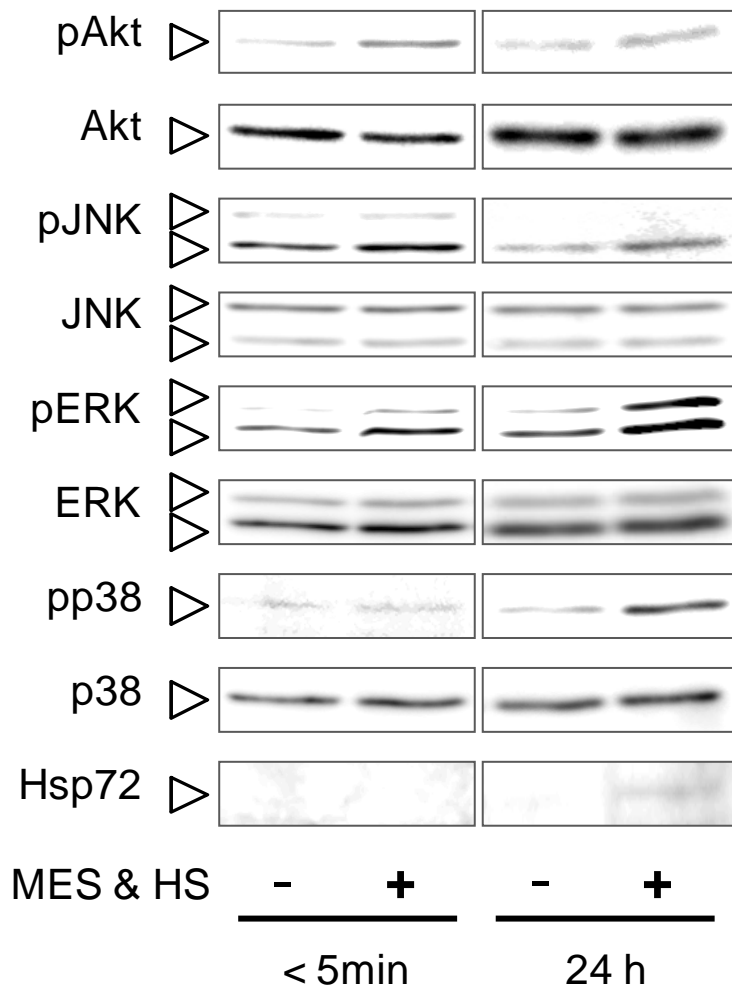
C) Percentage of differentiated cells/ total cells (%). Left columns shows E-cadherin+/Cxcr4+ definitive endoderm cells within total ES cell culture. Right columns shows E-cadherin+/Pdx-1+ pancreatic progenitor cells within definitive endoderm cells.

D) Relative Pdx-1 mRNA expression is presented as mean \pm S.E. n=2.

第3項 MES 及び HS 併用処理による細胞内シグナル伝達の変化

MES 及び HS 併用処理により膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化が促進されるメカニズム解明を目指し, MES 及び HS 併用処理による細胞内シグナル伝達の変化を検討した. Day 7 まで activin 及び bFGF 共刺激による膵細胞系譜への分化誘導を行い, MES 及び HS 併用処理を行った. その後, 経時的にタンパク質を回収し検討を行った結果, MES 及び HS 併用処理直後において bFGF 刺激と同様に Akt リン酸化亢進がみられ, 一方で JNK リン酸化亢進がみられた (Figure 21A-C). また, MES 及び HS 併用処理から 24 時間後においては bFGF 刺激と同様に ERK リン酸化亢進がみられ, 一方で Activin 刺激と同様に p38 MAPK リン酸化亢進がみられた (Figure 21A, D, E). さらに, MES 及び HS 併用処理から 24 時間後において Hsp72 発現上昇も観察された (Figure 21A, F). これらの結果から, まず MES 及び HS 併用処理により直接的に Akt, JNK リン酸化亢進を介した分化促進効果が得られ, MES 及び HS 併用処理による間接的な効果として, ERK 及び p38MAPK リン酸化亢進を介した分化誘導効果が得られると考えられる.

A.



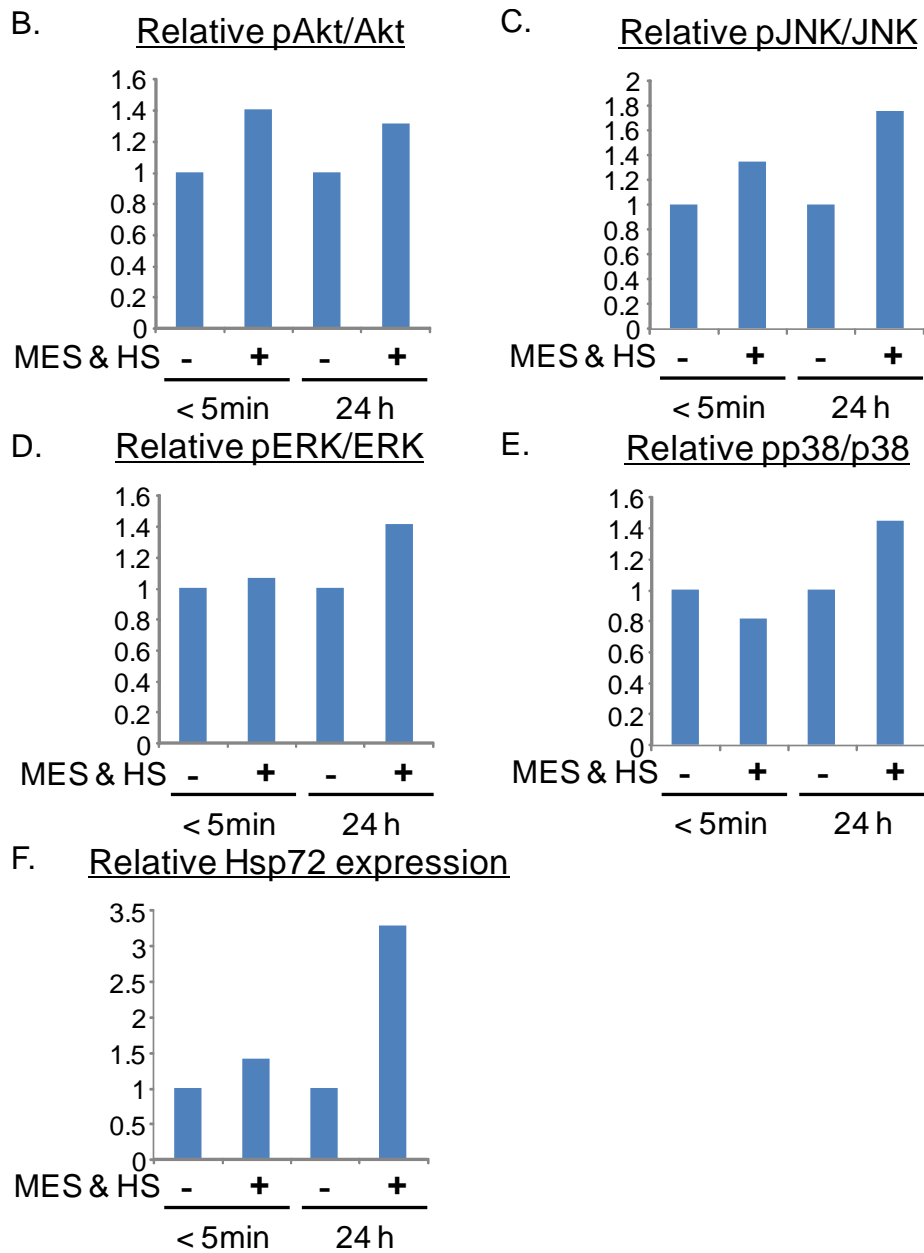


Figure 21. MES with HS activates various signal molecules and increases Hsp72 expression in differentiated mouse ES cells.

A) SK7 ES cells were grown on M15 with activin (10 ng/ml) and bFGF (5 ng/ml) for 7 days. Then, treated with MES and HS for 10min, lysates were extracted immediately (<5 min) or 24 h after treatment. Lysates were subjected to Western blotting with anti-phospho-Akt, anti-Akt, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-phospho-ERK, anti-ERK, anti-phospho-p38 MAPK, anti-p38 MAPK and anti-Hsp72 antibodies.

B-F) Relative activity or expression of Akt (B), JNK (C), ERK (D), p38 MAPK (E) and Hsp72 (F).

第3節 考察

本章の結果から、MES 及び HS 併用処理により ES 細胞から腭前駆細胞 (Pdx-1⁺) への分化が促進されることが明らかになった。MES 及び HS 併用処理を分化誘導開始から 7 日目に行い検討した結果、内胚葉細胞の割合に変化はないものの、内胚葉細胞における腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) の割合に増加がみられた。また、液性因子と MES 及び HS 併用処理を併用した場合においても腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化促進作用がみられた。より効率的な分化誘導法の開発を目指す上で、従来用いられている液性因子に加え、新たな方法を提起する重要な知見であると考えられる。MES 及び HS 併用処理による腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化誘導効果は、分化誘導開始から 1, 3, 5 日目に処理を行った場合にはみられなかったことから (data not shown), MES 及び HS 併用処理を行うタイミングの重要性が考えられる。これまでにミトコンドリア膜電位の低い ES 細胞サブクラスにおいて、中胚葉への効率的な分化誘導がみられるという報告があり、ミトコンドリア膜電位の低下と分化促進において関連性が示唆されている³⁶。これまでの検討の結果から、MES 処理によるミトコンドリア膜電位低下作用は、ミトコンドリアの数及びエネルギー産生経路におけるミトコンドリアへの寄与率に依存している事が考えられる (data not shown)。ES 細胞はミトコンドリアの数が少なく、ミトコンドリアが未発達である事が報告されていることから、三胚葉決定前に MES 及び HS 併用処理を行ってもミトコンドリア膜電位低下が起こらず、腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化促進作用はみられないが、三胚葉決定後に刺激を行うとミトコンドリア膜電位の低下がみられ、分化促進作用が得られるのではないかと考えられる。

MES 及び HS 併用処理による腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化促進作用のメカニズムについては本研究では十分に明らかにできていない。今回、MES 及び HS 併用処理により Activin 及び bFGF 刺激と同様に Akt, ERK, p38 MAPK リン酸化亢進がみられたため、同様のシグナル活性化機序による分化促進効果が考えられる。したがって、各種阻害剤と MES 及び HS 併用処理を併用することでどのシグナル経路が重要であるのか検討する必要がある。また、JNK リン酸化亢進及び Hsp72 発現上昇については腭前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化過程における重要性は明らかではないが、他の胚葉への分化及び成熟

化においての重要性が指摘されているため、阻害剤等を用いた検討を行うことで、膵前駆細胞 (Pdx-1⁺ 細胞) への分化過程のをより詳細に理解する際に有用な知見が得られると考えられる。

第4章 総括

本研究では、生体が低強度の刺激に対して適応応答を示すこと及びこれまでに MES を用いた処理により得られる有益な作用から、MES 処理の作用メカニズム解明と新規膵 β 細胞分化誘導法への応用に向けた基礎検討を行った。

第2章においては MES 処理の作用メカニズム解明を目的とし検討を行った。まず、MES 処理による PI-3K/Akt シグナル活性化では、骨格筋細胞に対して外部刺激として電流を用いた検討では初めて PI-3K を活性化させる事を示した。一方で、従来電流処理は骨格筋に活動電位を生じさせ、筋収縮を誘発させることを目的として用いられ、PI-3K/Akt シグナルは活性化しないことが多くの論文において示されている。

同じ刺激であっても、高い強度では有害である一方で、低い強度では有益な生体现象を誘導することは、一般にホルミシス効果として認識されており、このような概念は薬理学分野においては、*hormetic dose-response model* として提唱されている³⁷⁻³⁹。すなわち、極めて低用量では薬の薬理作用に反する生体の応答性が観察され、ある用量以上では薬の薬理作用が観察されるということである³⁷。MES 処理と活動電位を生じさせるような電流処理の作用の違いについても、細胞の刺激に対する受け取り方の違いから生じていると考えられる。MES 処理による PI-3K/Akt シグナル活性化において筋収縮は重要ではなく、また活動電位を誘発させた際に PI-3K/Akt シグナル活性化はみられなかったことから、MES 処理と活動電位を生じさせるような電流処理との作用の違いが考えられる。

次に、MES 処理により一過性のミトコンドリア膜電位低下が引き起こされ、AMPK を介したシグナル活性化がストレス耐性を付与することを示した。近年、ミトコンドリア機能を軽度に低下させることで糖尿病病態の改善及び肥満抑制が可能であることが報告されている⁴⁰。これまでに、MES 及び HS 併用処理により糖尿病病態の改善及び内臓脂肪の蓄積抑制といったこの報告と一致する効果が得られていることから、今回明らかにした MES による一過性のミトコンドリア膜電位低下作用が代謝病態改善作用を示すメカニズムに関わることが考えられる。同様に、MES 及び HS 併用処理を前処理しておくことで肝虚血再灌流障害が軽減されるメカニズムへの関与も考えられる。今回、MES 処理による

ミトコンドリア膜電位の低下及び AMPK リン酸化亢進がプレコンディショニング刺激の阻害剤として広く用いられている 5-HD 併用によりみられなくなることから、MES 処理が他のプレコンディショニング刺激と同様の作用を示すことが考えられる。

第 3 章では、MES 及び HS 併用処理の新規膵 β 細胞分化誘導法における有用性を検討することを目的とした。その結果、MES 及び HS 併用処理により ES 細胞から膵前駆細胞 (Pdx-1^+) への分化が促進されることを示した。この結果は、物理的刺激により、内胚葉系細胞への分化が促進される事を初めて示すものである。

これまでに、植物においては、主根から側根の形成時に遺伝子発現に関連して電流が流れる事、胚形成部位に電流が流れ込むことが報告がされている⁴¹。また、ニワトリ胚を用いた検討において、神経系の発達及び発生段階における重要性を示す報告も存在する⁴²。さらに、脊髄神経細胞の発達や神経筋機構の適切な成熟化では欠かせない役割を担っている^{43,44}。このような内因的電流発生と個体及び組織の発生、細胞分化の関連性を根拠に ES 細胞から神経細胞等への分化誘導効果の報告がなされてきたが、内胚葉系細胞への分化における重要性は明らかではない。

しかしながら、逆説的に考察すると、今回明らかになった知見から膵細胞の正常発生においても微弱な電流と温熱のような物理的刺激が細胞分化の駆動力として重要ではないかと考えられる。電気刺激により ES 細胞から分化の誘導がみられている神経細胞では、微弱な電流を制御因子としてその機能を調節しているが、ニワトリ胚を用いた検討において、胎生 4 日目から電流が発生し、正常発生において重要な役割を果たしていることが報告されている⁴⁵。膵 β 細胞ではグルコース刺激に応答して起こる電流の発生がインスリン分泌に不可欠であることから、神経細胞と同様に膵 β 細胞の正常発生過程においても電流の関与があるのではないかと考えられる。

今回 MES 及び HS 併用処理は、従来膵前駆細胞への分化誘導に用いられている液性因子の併用の有無にかかわらず分化促進効果を示した。分化効率の観点では、MES 及び HS 併用のみ及び液性因子併用処理のいずれにおいても、十分な効果は得られていない。MES 及び HS 併用処理条件などさらに検討を行う必要はあるものの、低コストで行える分化誘導刺激として有用であると考えられるとともに、より詳細に検討を行うことで、膵前駆細胞への分化誘導に必要

なこれまでに報告されていないシグナル経路の探索研究においても貢献し得るのではないかと考えられる.

第5章 実験材料及び実験方法

第1節 培養細胞を用いた検討

培養に用いた器具はすべてオートクレーブ、あるいは乾熱滅菌による滅菌処理を施し、溶液類の調製には注射用水 (大塚製薬) あるいは Elix 純水装置システム (MILLIPORE) によって精製した純水を用いた。また、すべての操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。

第1項 細胞の種類と入手先

ラット骨格筋由来細胞株 L6 細胞は熊本大学生命科学研究部代謝内科学分野 荒木 栄一 教授より譲渡していただいた。Pdx1 プロモーター下に GFP を導入した組み換え遺伝子をホモでもつ遺伝子組み換えマウスの胚盤胞から樹立した Pdx1/GFP 細胞 (SK7 ES 細胞) 及びマウス胚中腎由来の M15 細胞は熊本大学発生医学研究所多能性幹細胞分野 糸 昭苑 教授より譲渡していただいた。マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞は熊本大学薬学教育部、製剤設計学分野、有馬英俊教授より譲渡していただいた。ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 細胞は RIKEN Cell Bank、ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 細胞は American Type Culture Collection より購入した。

第2項 細胞培養液

L6, HepG2, HEK293 細胞の培養には Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (DMEM, Wako) を用い, 10% ウシ胎仔血清及び抗生物質 (penicillin G 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL, Sigma) を添加して培養を行った. RAW264.7 細胞の培養には Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (SIGMA) を用い, 10% 非働化ウシ胎仔血清及び抗生物質 (penicillin G 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL Sigma) を添加して培養を行った. 細胞がサブコンフルエント状態に達したらその都度細胞を 0.05% トリプシン溶液 (0.05% trypsin, 1 mM EDTA) で処理して継代培養を行った.

SK7 ES 細胞の培養には 1% ゼラチンでコーティングした Glasgow minimum essential medium (GMEM, Invitrogen) を用い, 15% Knock-out Serum Replacement (KSR), 1% ウシ胎仔血清及び抗生物質 (penicillin G 50 units/mL, streptomycin 50 µg/mL, Sigma, nonessential amino acids 100 µM, Invitrogen, L-glutamine 2mM, Invitrogen, sodium pyruvate 1mM, Invitrogen, β-mercaptoethanol 100 µM, Sigma, leukemia inhibitory factor (LIF) 1000 units/ml, Chemicon) を添加して培養を行った. 細胞がサブコンフルエント状態に達したら 0.25% トリプシン溶液 (0.25% trypsin, 5 mM EDTA) で処理して実験に用いた.

M 15 細胞の培養には 1% ゼラチンでコーティングし DMEM (Invitrogen) を用い, 10% ウシ胎仔血清及び抗生物質 (penicillin G 50 units/mL, streptomycin 50 µg/mL, Sigma, L-glutamine 2mM, Invitrogen, β-mercaptoethanol 100 µM, Sigma) を添加して培養を行った. 細胞がサブコンフルエント状態に達したら 0.25% トリプシン溶液 (0.25% trypsin, 5 mM EDTA) で処理して実験に用いた.

第3項 細胞の培養方法

細胞は 5% CO₂, 37°C 下にて静置培養した.

第4項 細胞の分化誘導法

L6 細胞の骨格筋細胞への分化誘導は、サブコンフルエント状態に達した後 Dulbecco's Modified EAGLE MEDIUM (Wako) を用い、2% ウシ胎仔血清及び抗生物質 (penicillin G 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL, Sigma) を添加して培養し行った。2 日毎にメディウム交換をし、分化誘導開始から 6 日後に骨格筋細胞として実験に用いた。分化誘導効率は細胞の融合及び多核化で判断した。

SK7 ES 細胞の分化誘導は、マイトマイシン C (Sigma) 処理 (200 µg/ml, 37 °C, 2.5 h) した M15 細胞をフィーダー細胞として用いた。M15 細胞上に SK7 ES 細胞を 5×10^4 cells 播種し、24h 後に分化誘導メディウム (DMEM, 10% ウシ胎仔血清, penicillin G 50 units/mL, streptomycin 50 µg/mL, nonessential amino acids 100 µM, L-glutamine 2mM, β-mercaptoethanol 100 µM) に交換し培養を行った。2 日毎にメディウム交換し、実験に用いた。

第5項 培養細胞からのタンパク質の回収及び濃度測定

培養した細胞から培地を除き、cold PBS(-) で 2 回洗浄した。Lysis buffer (25 mM HEPES, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 100mM NaF, 5mM EDTA, 2mM Na_3VO_4 , 1% Triton X-100) を加え、セルスクレイパーにて細胞を回収し、12,000 rpm で、15 分間 4°C で遠心した。遠心後、得られた上清をタンパク質サンプルとした。得られたタンパク質サンプルは BCA 法を用いて定量した。タンパク質サンプルは実験に用いるまで -80°C にて保存した。

第6項 Western blotting 法

培養細胞から抽出したタンパク質をサンプルとして用いて、各サンプルのタンパク質量を一定にし、Western blotting 法を行った。7.5% ポリアクリルアミドゲルを作製し、SDS-PAGE を行った後、PVDF 膜にブロッキング (250 mA, 2 時間) した。ブロッキングした PVDF 膜は 5% スキムミルクを加えた 0.1% Tween 20-TBS でブロッキング (室温, 1 時間) を行った。次に、5% スキムミルクを加えた 0.1% Tween 20-TBS または Can Get Signal™ (TOYOBO) で 500-1000 倍に希釈した 1 次抗体で抗体反応 (室温, 1-3 時間) を行った。1 次抗体反応後、0.1% Tween20-TBS で PVDF 膜を洗浄し、0.1% Tween20-TBS または Can Get Signal™ で 5000 倍に希釈した HRP 標識 2 次抗体で抗体反応 (室温, 1-3 時間) を行った。0.1% Tween 20-TBS で PVDF 膜を洗浄した後、Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE) で抗体反応を検出した。各抗体の希釈は以下に示す。

Antibody	Dilution ratio
Anti-phosphoAkt (rabbit)	1 : 1000
Anti-Akt (rabbit)	1 : 1000
Anti-phosphoAMPK (rabbit)	1 : 1000
Anti-AMPK (rabbit)	1 : 1000
Anti-Actin (goat)	1 : 500
Anti-ubiquitinated protein (mouse)	1 : 1000
Anti-phosphoERK (rabbit)	1 : 1000
Anti-ERK (rabbit)	1 : 1000
Anti-phosphoJNK (rabbit)	1 : 1000
Anti-JNK (rabbit)	1 : 1000
Anti-phosphop38 MAPK (rabbit)	1 : 1000
Anti-p38 MAPK (rabbit)	1 : 1000
Anti-Hsp72 (rabbit)	1 : 1000
Anti-mouse IgG-HRP	1: 5000
Anti-rabbit IgG-HRP	1: 5000
Anti-goat IgG-HRP	1: 5000

第7項 Total RNA の抽出

培養細胞からの total RNA の抽出には TRIZOL (ニッポンジーン) を用い、そのプロトコールに従って操作を行った。以下にその概略を示す。

細胞に各種処理を行った後、細胞から培地を除き、PBS (-) にて細胞を洗浄した。これに 1 mL の TRIZOL を加えて細胞を可溶化した。この細胞可溶化物に 0.2 mL のクロロホルムを加え、よく攪拌し、5 分間室温にて放置した。その後、遠心分離 (12,000 rpm, 4°C, 15 分) し、水相を別チューブに移した。この水相に 0.5 mL の isopropanol を加えて攪拌後、isopropanol 沈殿を行った。得られたペレットを 70% ethanol で洗浄した後、DEPC 処理水に溶解し、以後の実験に用いた。本法で得られた total RNA の収量は UV (260 nm) の吸光度より求めた。また、OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio が 1.80 以上であり、高純度の RNA が得られていることを確認した。なお、用いた器具及び試薬類は全て乾熱滅菌、オートクレーブもしくは DEPC 処理を行った。

第8項 Quantitative RT-PCR 法

定量的 RT-PCR 法には Prime Script RT reagent kit を使用し、RT 反応を行った。なお、以下の操作は RNase の混入を防ぐために細心の注意を払った。培養細胞から抽出した total RNA 0.25 µg/reaction を鋳型とし、Oligo dT primer を用いて、逆転写反応 (38°C for 30 min, 85°C for 10 sec) を行った。その後、それぞれの primer を用いて PCR を行った。PCR 反応には、iQ5 リアルタイム PCR 解析システムにより、cDNA を Premix Ex Taq II を用い、(95 °C, 10 sec, 60 °C 1 min, and plate read) の条件で行った。相対的な Target gene の mRNA 発現は、Comparative CT methods により算出した。本法は、標的遺伝子の得られた CT 値を、internal control の CT 値により正規化することで算出する方法である。

本実験に用いた PCR の条件及び Primer を以下に示す.

RT-PCR Primers

5'-Q-RT-GLUT1: 5'-GGTGTGCAGCAGCCTGTGTA-3'

3'-Q-RT-GLUT1: 5'-GACGAACAGCGACACCACAGT-3'

5'-rat-QRT-GLUT4: 5'-GTCATCAACGCCCCACAGAA-3'

3'-rat-QRT-GLUT4: 5'-GCAAGGACAGTGGACGCTCTCTTTC-3'

5'-QRT-18s: 5'-CTTTGGTCGCTCGCTCCTC-3'

3'-QRT-18s: 5'-CTGACCGGGTTGGTTTTGAT-3'

mPdx-1-FW: 5'-AAATCCACCAAAGCTCACGCGTGGA-3'

mPdx-1-Rv: 5'-AATTCCTTCTCCAGCTCCAGCT-3'

m_bata-actinQRT-FW: 5'-GGCGTATTCCCCTCCATCG-3'

m_bata-actinQRT-RV: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

第9項 ミトコンドリア膜電位変化の測定 (フローサイトメトリー)

ミトコンドリア膜電位変化の測定は, MitoProbe™ JC-1 Assay Kit を用いて行った.

60 mm 細胞培養皿に細胞を播き, サブコンフルエント状態に達した時点で処置を行った. その後, 培養した細胞から培養メディウムを除き, 温めた PBS (-) で1回洗浄し, 0.05% trypsin を用いて細胞を回収した. 回収した細胞を培養メディウムにて懸濁し, 1×10^6 cells/ml になるよう調製した. その後, 各サンプルに JC-1 を 10 μ l 加え, 37°C で 30 分間静置した. 遠心 (1500 rpm, 4°C, 5 min) 後, 上清を取り除き, PBS (-) で洗浄した後メッシュ (38 μ m) 濾過したものをサンプルとして用いた. 各サンプルの蛍光強度を, FACSCalibur® (Becton Dickinson) を用いて測定し, Cell Quest により解析した.

JC-1 試薬は, ミトコンドリア内に取り込まれた後, ミトコンドリア膜電位依存的に JC-1 単量体 (緑色; 529 nm) から JC-1 会合体 (赤色; 590 nm) へと変化し, JC-1 会合体の状態でもミトコンドリア内に留まることが知られている⁴⁶. したがって, ミトコンドリア膜電位を以下に示す計算式で算出した.

ミトコンドリア膜電位 ($\Delta \phi_m$) = JC-1 会合体 (red) \div JC-1 単量体 (green)

第 10 項 フローサイトメトリー (FCM)

細胞を Cell Dissociation Buffer (Invitrogen) で 37°C, 20 分間静置する事で回収した. 1×10^6 cells/サンプル (50 μ l) の濃度に調製し, 抗体を用いて染色した. 染色した細胞を 1% FBS 及び propidium iodide を含む Hank's buffered salt solution (SIGMA) に再溶解し, 40 μ m メッシュで濾過し, 解析用サンプルとした. サンプルは FACS Cant (Becton Dickinson) を用いて測定し, Flowjo program (Tree Star) により解析した. 使用した抗体を下に記す.

biotin-conjugated anti-E-cadherin monoclonal antibody
phycoerythrin-conjugated anti-Cxcr4 monoclonal antibody

第 11 項 免疫蛍光染色法

カバーガラス上に培養した細胞から培養液を除き, PBS (-) で 3 回洗浄し, 10% formalin / PBS (-) を加え, 室温で 30 分間静置し, 細胞を固定した. 固定後, PBS (-) で平衡化した後, normal goat serum にて室温で 2 時間ブロッキングし, ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を 4°C で一晩反応させた. 一時抗体反応後, PBS (-) で洗浄し, ブロッキング溶液で希釈した二次抗体にて室温で 2 時間反応させた. 二次抗体反応後, DAPI にて核染色を行い, PBS (-) で洗浄した. その後, Prolong Antifade kit でマウントし, 蛍光顕微鏡 (KEYENCE BIOZERO, BZ-8000) で解析を行った. 各抗体の希釈は以下に示す.

Antibody dilution for Immunohistochemistry

Antibody	Dilution ratio
Anti-PIP3 (mouse)	1 : 100
Anti-GLUT4 (rabbit)	1 : 100
Alexa Fluor [®] 546 Anti-Mouse IgM (goat)	1 : 200
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Rabbit IgM (goat)	1 : 100

第 12 項 Glucose uptake assay

細胞内への糖取り込みの評価は、³H 標識した 2-deoxy-glucose (2-deoxy-D-(³H)-glucose) を用いて液体シンチレーションカウントにより行った。

インキュベーションメディウム (ウシ胎仔血清及びグルコースを含まない DMEM (SIGMA) を基礎培地とし, penicillin G 100 units/mL, streptomycin 100 µg/mL, グルタミン酸を 5% になるように添加した培養液) にて 4 時間細胞を培養した。MES 処置から 1 時間後, アッセイメディウム (インキュベーションメディウムに 2-deoxy-D-(³H)-glucose 0.5 µCi/ml 及び 2-deoxy-D-glucose 10 µM となるように調製した培地) に置換後, 37°C, 30 分間静置した。静置後, 培養液を除き, PBS (-) にて 3 回洗浄後, 0.3M NaOH を加え, 得られた細胞溶解液をサンプルとした。サンプル 400 µl に対してシンチレーションカクテル 5 ml 加え, 混和後, 液体シンチレーションカウンターにて計数を行った。

第 13 項 細胞傷害活性測定法 (LDH 測定法)

各種処理を 1% FBS を含む培養液を用いて実験を行った。細胞傷害により細胞から放出された LDH (乳酸脱水素酵素) を含む上清は、回収後に遠心して細胞塊を取り除いた。細胞培養皿上に残った付着細胞は、1% Triton X-100 を含む 1% FBS 培養液を加え、37°C で 30 分間静置し溶解させた。上清、付着細胞の各サンプルの溶液を回収した。

各サンプル中の LDH 活性の測定は Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Applied Science) を用いて行った。本法の原理の概要を以下に示す。LDH により乳酸の脱水素化を触媒し、ピルビン酸と NADH を生成させる。この NADH はジアホラーゼの触媒によりテトラゾリウム塩を還元し、490 nm の吸収をもつ赤色のホルマザン色素を形成する。したがって、LDH 活性を 490 nm の吸光度量の増大で測定することができる。

次に具体的な操作について示す。適切な希釈倍率で希釈した回収サンプル 50 μ L と LDH 測定 Kit 反応混合液 50 μ L を 96 well assay plate 上で混合し室温で 30 分間遮光、静置し反応させた後、プレートリーダーの本波長 450 nm、対照波長 595 nm により測定した。上清中の LDH を細胞傷害による LDH 放出量とし、培養皿上に残った付着細胞も含んだすべての LDH 量の合計を全 LDH 量とした。

$$\text{LDH 放出量 (\%)} = 100 \times \text{LDH 放出量} \div \text{全 LDH 量}$$
の計算式で算出する LDH 放出量 (%) を、各種処理による細胞死の割合とした。

第2節 線虫を用いた検討

第1項 線虫の培養

線虫の培養は 20℃ の恒温インキュベーター内で行った。

NGM 培地 (NaCl 3g, peptone 2.5g, Agar 17g, cholesterol 5mg, 100mM CaCl₂ 10 ml, 1M MgSO₄ 1 ml, 1M K-phosphate buffer (pH 6.0) 25 ml/1L) に線虫のエサとしてウラシル要求性大腸菌株 OP50 株を塗布し培養を行った。

線虫は卵から孵化し、3 日後に繁殖可能な成虫となる為、3-4 日毎に白金線を用いて新しい培地に移し、継代培養を行った。

第2項 線虫の種類と入手先

野生型線虫 N₂ 株は、熊本大学発生医学研究所分子細胞制御分野 山中 邦俊准教授より譲渡していただいた。線虫 AMPK ホモログ (AAK-2) 変異体 TG38 株は The Caenorhabditis Genetics Center より購入した。

第3項 線虫の同調培養

繁殖期にある線虫が多く存在する培地から、S-basal (NaCl 5.9g, 1M K-phosphate buffer (pH 6.0) 50ml, cholesterol 5mg/1L) により、線虫及び卵を回収した。次亜塩素酸ナトリウム (花王ハイター) 100 µl, 10 N NaOH 20 µl を加え激しく転倒混和し、線虫を溶解させ卵を得た。S-basal にて 3 回洗浄し、遠心 (6000 rpm, 室温, 10 sec) 後、新しい培地に移すことで世代を同調させた線虫を得た。全ての実験において同調培養した線虫を用いた。

第4項 線虫からのタンパク質の回収及び濃度測定

線虫を M9 buffer (KH₂PO₄ 3 g, Na₂HPO₄ 6 g, NaCl 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/1L) により回収し, 大腸菌を取り除くために M9 buffer で 3 回洗浄した. 静置する事で線虫を沈殿させ, Lysis buffer を加えた. その後, ソニケーションし, 遠心 (12000 rpm, 4°C, 15 min) 後の上清をタンパク質サンプルとした. 得られたタンパク質サンプルは BCA 法を用いて定量した. タンパク質サンプルは実験に用いるまで -80°C にて保存した.

第5項 Western blotting 法

線虫タンパク質サンプルは, 培養細胞サンプルを用いた検討と同様の手法で Western blotting を行い, 抗体反応についても同様の手法を用いた (第1節第6項).

第6項 Total RNA の抽出

線虫を M9 buffer により回収し, 大腸菌を取り除くために M9 buffer で 3 回洗淨した. 静置する事で線虫を沈殿させ, TRIZOL を加えた. その後, ソニケーションし, 培養細胞における Total RNA の抽出と同様の手法で高純度の RNA を得た.

第7項 Quantitative RT-PCR 法

線虫より抽出した Total RNA は, 培養細胞を用いた検討と同様の手法で RT 反応, リアルタイム PCR 解析を行った (第1節第8項). また, Comparative CT methods により相対的な Target gene の mRNA 発現を算出した.

本実験に用いた PCR の条件及び Primer を以下に示す.

RT-PCR Primers

cSOD1-Fw: 5'-TTCTCACTCAGGTCTCCAACGCGAT-3'
cSOD1-Rv: 5'-CTGGTCATTTTCGGACTTCTGTGTG-3'
cSOD2-Fw: 5'-TTCACGAGGCGGCTCCAAAGGAAA-3'
cSOD2-Rv: 5'-TGGTTCTCCTCCGTCCTTTGCCAAA-3'
cSOD3-Fw: 5'-TTGTTCAACCGGTTGCGGGAGTTCT-3'
cSOD3-Rv: 5'-AGAACTCCCGCAACCGGTTGAACAA-3'
cSOD4-Fw: 5'-GAAGCTTAACGGATCGGTTTCCGGA-3'
cSOD4-Rv: 5'-TGCACCATGGCTCAGCTTATGAGGA-3'
cSOD5-Fw: 5'-TTGGCTTACCCAGAAAGCCGAAGGT-3'
cSOD5-Rv: 5'-GACGTACATCCATCGGTTGAGTCTC-3'
cHSP70-Fw: 5'-GAAAGGTTGAAATCCTCGCGAACTC-3'
cHSP70-Rv: 5'-TCCGGATTACGAGCGGCTTGATCTC-3'
cACT1-Fw: 5'-CCAAGAGAGGTATCCTTACCCTCAA-3'
cACT1-Rv: 5'-TCTTCTGGGGCAACACGAAGCTCAT-3'

第 8 項 線虫への温熱ストレス及び酸化ストレスの負荷

線虫に温熱ストレスを負荷するために、30℃ に設定したインキュベーター内で線虫を OP 50 を塗布した NGM 培地上で飼育し検討を行った。酸化ストレス負荷実験では、NGM 培地を作成する際に酸化ストレス誘導剤として、methyl viologen dichloride hydrate (パラコート, SIGMA) を 4 mM となるように混ぜ込んだ培地を用いた。いずれの検討においても、24 時間毎に白金線を用いて動いていない線虫に触れ、反応がなければ死んでいると判定した。

第 9 項 線虫の寿命測定

線虫の寿命測定は、前項と同様に 2-3 日毎に白金線を用いて動いていない線虫に触れ、反応がなければ死んでいると判定した。生存率を Kaplan Meier 法により算出し、生存曲線を作成した。また、log-rank test により有意差検定を行った。

第3節 Bio Metronome

Bio Metronome は、つちやゴム (株) 社製の遠赤外線を発生する電磁波シールドゴムを活用して作製した。微弱パルス電流と温熱を同時に処置できる特徴を有している。特殊低電圧パルス電流は 55 pulses per second (pps) のパルス直流電流である。用いた装置を以下に示す。



Bio Metronome



The electrode plates in Bio Metronome.

培養細胞を用いた検討では、細胞培養液中に電極を浸し MES 処理を行った。また、線虫を用いた検討では、M9 buffer 中に電極を浸し MES 処理を行った。

第4節 抗体

Anti-phosphoAkt, Akt, Anti-phosphoAMPK, Anti-AMPK, Anti-phosphoERK, Anti-ERK, Anti-phosphoJNK, Anti-JNK, Anti-phosphop38 MAPK, Anti-p38 MAPK Antibody は, Cell signaling Technology, Inc. から, Anti-ubiquitinated proteins Antibody は BIOMOL から, Anti-Actin Antibody は SANTA CRUZE BIOTECHNOLOGY, INC. から, Anti-Hsp72 antibody は Stressgen Biotechnology から, Anti-PIP3 Antibody は Ehelon Bioscience Inc. から, Anti-GLUT4 Antibody は CHEMICON International から, peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L), peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) は, Jackson ImmunoResearch LABORATORIES, INC. から, Alexa Fluor[®]546 Anti-Mouse IgM, Alexa Fluor[®]488 Anti-Rabbit IgM は Molecular Probes からそれぞれ購入した.

第5節 試薬

本研究に際し、使用した主な試薬を以下に記した.

trypsin, Bacto[®] TRYPTONE, Bacto[®] YEAST EXTRACT (以上, Difco), penicillin-streptomycin, bovine serum albumin, fetal bovine serum Qualified (以上, GIBCO), 注射用水 (大塚製薬), Tween 20, Dulbecco's Modified Eagle Medium (Wako), Triton X-100, phenylmethylsulfonyl fluoride, dithiothreitol, ampicillin sodium salt, kanamycin sodium salt (以上, ナカライテスク), bovine serum albumin (Fatty acid free, Low endotoxin), PROTEASE INHIBITOR COCKTAIL (以上, Sigma), Precision Plus Protein Dual Color Standards[™] (Bio-Rad), TaKaRa RNA PCR Kit ver.3.0(AMV), ECL[™] Western Blotting Analysis System (Amersham), Super Signal[®] west pico chemiluminescent substrate (PIERCE), Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche Applied Science),

その他の試薬及び無機塩類はすべて市販の特級品を使用した.

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜り、本稿作成にあたり多大なる御教示、御助力を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 甲斐 広文 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 荒木 栄一 教授ならびに 近藤 龍也 助教に心より深謝申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学教育部 糸 昭苑 教授、白木 伸明 助教に心より深謝申し上げます。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学教育部 小椋 光 教授、山中 邦俊 准教授に心より深謝申し上げます。

本論文作成に際し、御指導ならびに御校閲を賜りました 熊本大学大学院医学薬学研究部 山田 源 教授、三隅 将吾 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を賜りました 熊本大学大学院医学教育部 首藤 剛 講師、Mary Ann Soten Suico 助教、古賀 沙緒里 博士、古賀 友紹 博士、佐藤 卓史 博士に深謝致します。

本研究に際し、BioMetronome[®] を提供して頂きましたつちやゴム株式会社 倉田 雄平 氏に深謝致します。

本研究に際し、共同研究者として多大なるご協力を頂きました 松田 朋子 修士, 松野 嵩 修士, 島内 祐一郎 学士, 井上 奈津子 学士, 松山 真吾 学士, 岡本 有加 氏, 四反田 伊穂李 氏に厚く感謝致します。

本研究に際し、有益なる御助言, 御教示を頂きました 大庭 真理子 博士, 菅原 卓哉 博士, 田浦 学 博士, 宮田 将徳 博士をはじめとする研究室所属当初から御世話になった諸先輩方に謝意を表します。

本研究ならびに学生生活に際し、日夜御協力頂きました遺伝子機能応用学分野の諸氏に深く謝意を表します。特に、友人として私を支えてくれた 及川 貴美子 修士, 小松 賢生 修士, 島崎 省吾 修士, 杉山 崇 修士, 関本 絵梨果 修士に心から感謝致します。

放射性同位元素使用に際し、有益なる御教示を頂いた 熊本大学薬学部放射性同位元素総合研究室 川原 修 氏に感謝致します。

参考文献

1. Morino, S., *et al.* Mild electrical stimulation with heat shock ameliorates insulin resistance via enhanced insulin signaling. *PloS one* **3**, e4068 (2008).
2. Oba, M., *et al.* Modified mild heat shock modality attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury. *The Journal of surgical research* **162**, 213-220.
3. Kai, H., *et al.* A novel combination of mild electrical stimulation and hyperthermia: general concepts and applications. *Int J Hyperthermia* **25**, 655-660 (2009).
4. Morino, S., *et al.* Mild electrical stimulation increases ubiquitinated proteins and Hsp72 in A549 cells via attenuation of proteasomal degradation. *Journal of pharmacological sciences* **108**, 222-226 (2008).
5. Halestrap, A.P., Clarke, S.J. & Khaliulin, I. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochimica et biophysica acta* **1767**, 1007-1031 (2007).
6. Shiraki, N., *et al.* Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 874-885 (2008).
7. Zhao, M., *et al.* Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN. *Nature* **442**, 457-460 (2006).
8. Davidson, S.M., Hausenloy, D., Duchon, M.R. & Yellon, D.M. Signalling via the reperfusion injury signalling kinase (RISK) pathway links closure of the mitochondrial permeability transition pore to cardioprotection. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**, 414-419 (2006).
9. Lee, H., *et al.* The *Caenorhabditis elegans* AMP-activated protein kinase AAK-2 is phosphorylated by LKB1 and is required for resistance to oxidative stress and for normal motility and foraging behavior. *The Journal of biological chemistry* **283**, 14988-14993 (2008).
10. Newton, A.C. Lipid activation of protein kinases. *Journal of lipid research* **50 Suppl**, S266-271 (2009).
11. Gonzalez, E. & McGraw, T.E. Insulin signaling diverges into Akt-dependent and -independent signals to regulate the recruitment/docking and the fusion of GLUT4 vesicles to the plasma membrane. *Molecular biology of the cell* **17**, 4484-4493 (2006).

12. Taniguchi, C.M., Emanuelli, B. & Kahn, C.R. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nature reviews* **7**, 85-96 (2006).
13. Petersen, K.F. & Shulman, G.I. Etiology of insulin resistance. *The American journal of medicine* **119**, S10-16 (2006).
14. Wijesekara, N., Tung, A., Thong, F. & Klip, A. Muscle cell depolarization induces a gain in surface GLUT4 via reduced endocytosis independently of AMPK. *American journal of physiology* **290**, E1276-1286 (2006).
15. Ito, Y., *et al.* Passive stretching produces Akt- and MAPK-dependent augmentations of GLUT4 translocation and glucose uptake in skeletal muscles of mice. *Pflugers Arch* **451**, 803-813 (2006).
16. Konrad, D., *et al.* Troglitazone causes acute mitochondrial membrane depolarisation and an AMPK-mediated increase in glucose phosphorylation in muscle cells. *Diabetologia* **48**, 954-966 (2005).
17. Samudio, I., Fiegl, M. & Andreeff, M. Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism. *Cancer research* **69**, 2163-2166 (2009).
18. Hockenbery, D.M. Targeting mitochondria for cancer therapy. *Environmental and molecular mutagenesis* **51**, 476-489.
19. Brown, A.E., Elstner, M., Yeaman, S.J., Turnbull, D.M. & Walker, M. Does impaired mitochondrial function affect insulin signaling and action in cultured human skeletal muscle cells? *American journal of physiology* **294**, E97-102 (2008).
20. Bashan, N., *et al.* Mechanisms of adaptation of glucose transporters to changes in the oxidative chain of muscle and fat cells. *The American journal of physiology* **264**, C430-440 (1993).
21. Wojtovich, A.P., Burwell, L.S., Sherman, T.A., Nehrke, K.W. & Brookes, P.S. The *C. elegans* mitochondrial K⁺(ATP) channel: a potential target for preconditioning. *Biochemical and biophysical research communications* **376**, 625-628 (2008).
22. Galbadage, T. & Hartman, P.S. Repeated temperature fluctuation extends the life span of *Caenorhabditis elegans* in a *daf-16*-dependent fashion. *Mechanisms of ageing and development* **129**, 507-514 (2008).
23. McColl, G., *et al.* Insulin-like signaling determines survival during stress via posttranscriptional mechanisms in *C. elegans*. *Cell metabolism* **12**, 260-272.
24. Schulz, T.J., *et al.* Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell*

- metabolism* **6**, 280-293 (2007).
25. Swindell, W.R. Heat shock proteins in long-lived worms and mice with insulin/insulin-like signaling mutations. *Aging* **1**, 573-577 (2009).
 26. Yokoyama, K., *et al.* Extended longevity of *Caenorhabditis elegans* by knocking in extra copies of hsp70F, a homolog of mot-2 (mortalin)/mthsp70/Grp75. *FEBS letters* **516**, 53-57 (2002).
 27. Anson, R.M. & Hansford, R.G. Mitochondrial influence on aging rate in *Caenorhabditis elegans*. *Aging cell* **3**, 29-34 (2004).
 28. Downey, J.M. & Cohen, M.V. Why do we still not have cardioprotective drugs? *Circ J* **73**, 1171-1177 (2009).
 29. Bahde, R. & Spiegel, H.U. Hepatic ischaemia-reperfusion injury from bench to bedside. *The British journal of surgery* **97**, 1461-1475.
 30. Hori, Y. Insulin-producing cells derived from stem/progenitor cells: therapeutic implications for diabetes mellitus. *Medical molecular morphology* **42**, 195-200 (2009).
 31. Cazillis, M., Lelievre, V. & Gressens, P. [Neural differentiation of murine embryonic stem cells ES]. *Med Sci (Paris)* **21**, 484-490 (2005).
 32. Yoder, M.C. Developing reagents and conditions to induce mesoderm subsets from ES cells. *Cell stem cell* **1**, 603-604 (2007).
 33. Kubo, A., *et al.* Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development (Cambridge, England)* **131**, 1651-1662 (2004).
 34. Skoudy, A., *et al.* Transforming growth factor (TGF)beta, fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells. *The Biochemical journal* **379**, 749-756 (2004).
 35. Wei, H. & Vander Heide, R.S. Ischemic preconditioning and heat shock activate Akt via a focal adhesion kinase-mediated pathway in Langendorff-perfused adult rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **298**, H152-157.
 36. Schieke, S.M., *et al.* Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* **283**, 28506-28512 (2008).
 37. Calabrese, E.J. Hormesis and medicine. *British journal of clinical pharmacology* **66**, 594-617 (2008).
 38. Tapia, P.C. Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent

- fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Medical hypotheses* **66**, 832-843 (2006).
39. Cypser, J.R., Tedesco, P. & Johnson, T.E. Hormesis and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Experimental gerontology* **41**, 935-939 (2006).
 40. Pospisilik, J.A., *et al.* Targeted deletion of AIF decreases mitochondrial oxidative phosphorylation and protects from obesity and diabetes. *Cell* **131**, 476-491 (2007).
 41. Kropf, D.L., Lupa, M.D., Caldwell, J.H. & Harold, F.M. Cell polarity: endogenous ion currents precede and predict branching in the water mold achyla. *Science (New York, N.Y)* **220**, 1385-1387 (1983).
 42. Martin-Caraballo, M. & Dryer, S.E. Activity- and target-dependent regulation of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in developing chick lumbar motoneurons. *J Neurosci* **22**, 73-81 (2002).
 43. Ho, S. & O'Donovan, M.J. Regionalization and intersegmental coordination of rhythm-generating networks in the spinal cord of the chick embryo. *J Neurosci* **13**, 1354-1371 (1993).
 44. Chub, N. & O'Donovan, M.J. Blockade and recovery of spontaneous rhythmic activity after application of neurotransmitter antagonists to spinal networks of the chick embryo. *J Neurosci* **18**, 294-306 (1998).
 45. Milner, L.D. & Landmesser, L.T. Cholinergic and GABAergic inputs drive patterned spontaneous motoneuron activity before target contact. *J Neurosci* **19**, 3007-3022 (1999).
 46. Salvioli, S., Ardizzoni, A., Franceschi, C. & Cossarizza, A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS letters* **411**, 77-82 (1997).