

論文内容の要旨

VDR regulates simulated microgravity-induced atrophy in C2C12 myotubes

VDR は C2C12 筋管において模擬微小重力誘発性筋萎縮を制御する

日本医科大学大学院医学研究科 腎臓内科学分野

大学院生 湯澤 令

Scientific Reports 12 卷 (2022) 掲載

【背景】

骨格筋量の減少は筋力・運動能力及び生活の質の低下、死亡率上昇の誘因となる。筋量維持には一定の機械的負荷が不可欠とされ、宇宙飛行や廃用など負荷減少時には筋萎縮が生じる。地上での一般的な筋萎縮では FBXO32 と TRIM63 という E3 ユビキチンリガーゼが誘導され、筋蛋白質の減少をもたらす。これらを欠損した筋組織は筋萎縮に対し抵抗性を示すが宇宙飛行では筋萎縮を来すため、宇宙飛行での筋萎縮は地上とは機序が異なることが示唆されている。本研究では模擬微小重力環境下($10^{-3} g$)で筋萎縮を誘導するエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目的とした。

事前実験でビタミン D 受容体(VDR)が模擬微小重力に反応する可能性を認めた。VDR は活性化ビタミン D($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)をリガンドとする核内受容体であり、リガンド非結合状態では細胞質に、結合状態では核内に局在する。核内受容体はリガンド結合の有無で作用が異なり、骨格筋における VDR の場合は先行研究においては筋発達及び恒常性維持と、筋萎縮及び損傷反応の 2 種の役割が示唆されている。

これらを踏まえて、模擬微小重力誘発性の筋萎縮の制御機構と VDR の関連について研究した。

【方法】

模擬微小重力環境下実験のため *in vitro* での培養筋管を使用した。筋管はマウス由来 C2C12 筋芽細胞を細胞培養フラスコに播種し、成長培地中で増殖させた後に分化培地内で細胞融合及び筋管形成を誘導した後、実験に使用した。

模擬微小重力環境は先行実験と同様に、3D-Clinorotation 装置を用いて実現した。

前述の細胞培養フラスコ内の C2C12 筋管を模擬微小重力環境下で 48 時間培養した。対照には、地上条件(1g)下で培養した C2C12 筋管を用いた。

エピジェネティック解析にはオープンクロマチン領域の DNA 塩基配列を解読する ATAC-seq と、DNA と特定の転写因子の相互作用を明らかにする ChIP-seq を用いた。

筋管の成熟及び萎縮の評価には形態学的評価、qRT-PCR 及び Western Blot を用いた。細胞内の VDR の評価には免疫細胞染色を実施した。

VDR 欠損による萎縮への影響の評価は、*Vdr*-ノックアウト(KO)C2C12 筋芽細胞を用いて実施した。増殖及び分化前の C2C12 筋芽細胞に一对のオリゴヌクレオチドを pSpCas9(BB)-2A-GFP プラスミドにより形質転換したあと、CRISPR-Cas9 システムを用いて遺伝子サイレンシングを実施した。並行して、非サイレンシング、コントロールプラスミドで形質転換した未分化 C2C12 筋芽細胞をコントロール(CT)として作製した。

統計解析は、Graph Pad Prism 9 ソフトウェアを使用して行い、 $p < 0.05$ を有意区間とした。

【結果】

ATAC-seq と、エンハンサー活性と相関するヒストン修飾であるアセチル化ヒストン H3 リジン 27 (H3K27ac) についての ChIP-Seq で、VDR は共通して有意な変化を認めた。

模擬微小重力環境下の C2C12 筋管では VDR の発現が亢進しており、また免疫染色で細胞質から核内へ局在が変化した。

Vdr-KO C2C12 筋芽細胞は Western Blot で VDR 蛋白が存在しないことを確認した。また、Vdr-KO 及び CT C2C12 筋芽細胞を地上条件下で培養及び筋管へ分化誘導して比較し、VDR 欠損による影響が乏しい事を確認した。

模擬微小重力環境下では CT 筋管では筋管の短小化、FBXO32 の mRNA およびタンパク質の増加、TRIM63 タンパク質のわずかな増加を認めたが、Vdr-KO 筋管ではいずれも認めなかった。

Fbxo32 と H3K27ac との Chip-PCR 結果は、模擬微小重力環境下培養前は CT 筋管と Vdr-KO 筋管とで有意差を認めなかったが、培養後には CT 筋管のみ増加し Vdr-KO 筋管では変化がなかった。このことから、VDR 欠損細胞では、模擬微小重力に対する Fbxo32 エンハンサーの反応性が失われていると考えられた。

これらの結果から、C2C12 筋管から VDR を欠損させると、微小重力による萎縮が抑制されることがわかった。

【考察・結論】

本研究では、微小重力環境下で筋萎縮を誘導するエピジェネティックな制御機構を明らかにするため、模擬微小重力環境を作り出し、*in vitro* で C2C12 筋管を培養・分化・融合し、筋萎縮を誘導することに成功した。

我々の実験で、VDR は模擬重力の変化に応答し、*in vitro* での模擬微小重力による筋萎縮時の遺伝子転写抑制を媒介する可能性が示唆された。

特に、リガンドである活性型ビタミン D を添加せずに模擬微小重力環境下で筋管における VDR の核内移行が促進され、また模擬微小重力環境下で不活性化されたクロマチン領域に VDR 結合モチーフが濃縮されていることから、萎縮した筋管では非リガンド型核内 VDR が転写抑制因子として作用している可能性がある。

今後、リガンド結合の有無とは無関係に、微小重力によって VDR の核内移行が制御される機構のさらなる解析と、廃用、脱神経、代謝変化由来など、他の筋萎縮モデルでの VDR の核内移行の有無の解明が重要と考える。また、非リガンド型 VDR が筋萎縮プログラムを仲介する方法の直接的な検証が必要と考える。

本研究での限界は、地上での模擬微小重力環境暴露に留まったことである。3D-Clinorotation 装置は回転動作を伴うため、培養細胞に培地の流動によるせん断応力が影響する可能性を否定できない。今後は、後肢懸垂モデルのような *in vivo* モデルでの VDR 機能の解析が必要と考える。