

〈一般研究課題〉 CREG1 が骨格筋分化ならびに骨格筋再生に及ぼす影響

助成研究者 中部大学 後藤 亜由美



CREG1が骨格筋分化ならびに骨格筋再生に及ぼす影響

後藤 亜由美
(中部大学)

Effect of CREG1 on muscle differentiation and regeneration in C2C12 and skeletal muscle

Ayumi Goto
(Chubu University)

Abstract :

This study aimed to investigate the role of the cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1) in skeletal muscle regeneration and physical activity in adipocyte P2-CREG1-transgenic (Tg) mice and in muscle differentiation in C2C12 myotubes. Cardiotoxin-induced skeletal muscle regeneration demonstrated significantly higher CREG1 and phospho-AMPK α Thr¹⁷² levels in Tg mice than in wild-type (WT) mice. Furthermore, voluntary wheel running distance was significantly higher in Tg mice than in WT mice. Creg1 mRNA levels increased substantially after 1–3 days of differentiation stimulation in C2C12 cells. These results suggest that CREG1 stimulates muscle differentiation by increasing muscle regeneration. CREG1 plays a role in the regulation of muscle differentiation, thereby affecting skeletal muscle regeneration and physical activity in Tg mice.

1. はじめに

ヒトは、30歳を過ぎると筋肉量が低下し始め、60歳を超えるとその減少率は大幅に加速することが知られている[1]。加齢に伴う骨格筋量や筋力の低下は加齢性筋減弱症(以下、サルコペニア)とよばれ、高齢者の転倒、骨折、寝たきりなどの要因となっている。超高齢社会を迎えた我が国において寝たきりとなる高齢者をできるだけ増やさないよう努めることは極めて早急に取り組むべき重要な課題である。しかしながら現状ではサルコペニアへの有用な改善策は特定されておらず、その鍵となる骨格筋発達の分子機序の理解が不可欠である。

サルコペニアの発生原因の一つとして筋分化能の低下による骨格筋の再生能力低下が関与してい

ることが報告されている。筋損傷後の再生の中心的役割を担うのが筋線維に隣接して存在している筋衛星細胞であり、筋損傷が生じると筋芽細胞へと分化し筋再生を促す。さらに筋衛星細胞の活性化に最も重要な成長因子としてInsulin-like growth factor 1 (IGF1)があげられる。IGF1 シグナルは筋衛星細胞の増殖と分化を促進することで筋再生能力を高める[2]。IGF2も IGF1 受容体とのクロストークによりタンパク質合成経路を活性化することができるが[3]、遊離 IGF2 レベルはサイレント受容体である IGF2 受容体との結合により調節されている。つまり筋再生には IGF1 に加えて IGF2 が IGF2 受容体よりも IGF1 受容体と結合することが重要であると考えられる。実際に、骨格筋の再生に関する興味深い知見として、中和抗体によるIGF2 受容体の遮断は筋再生を改善させることが明らかとなった[4]。一方で、Cellular repressor of E1A-stimulated genes 1 (CREG1)は骨格筋を含む全身に発現する分子量24,000 の分泌糖タンパク質であり、IGF2 受容体に結合することが明らかとなっている。またCREG1 は IGF2 受容体に結合することで細胞増殖抑制に寄与し[5]、細胞分化を促進することが示唆されているが、その作用メカニズムについてはほとんど分かっていない。我々はこれまでにCREG1 が褐色脂肪細胞への分化を誘導する活性化因子として働くことを報告している[6]。さらに、我々はこれまでの研究過程で脂肪組織特異的にCREG1を過剰発現させた遺伝子改変マウス (Tg)を作成し解析してきたところ、Tg マウスは野生型(WT)マウスに比べて暗期での活動量が有意に高いことを見出した。これらの結果は、CREG1 は骨格筋における筋の発達や分化に関与することを示唆する興味深いデータである。しかしながら、CREG1 が骨格筋におけるCREG1 の発現制御や骨格筋分化／筋再生、さらには筋の発達に対する運動量における役割など全く分かっていない。そこで本研究では、CREG1 が骨格筋分化／再生制御機構ならびに身体運動量に及ぼす影響を検討し、CREG1 がサルコペニア改善の標的分子となりえるかを明らかにすることを目的とした。

2. 試料および実験方法

2.1 倫理規定の遵守

本研究における全ての動物実験は、中部大学が定める動物実験規定に基づき、中部大学倫理委員会の審査・承認を経て実施された。

2.2 対象と検討方法

A) 培養細胞を用いた実験

i) 実験の対象

培養細胞はマウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12 を用いた。

ii) 培養条件と分析用サンプル

C2C12 細胞を増殖培地 (D-MEM high glucose + 10% fetal bovine serum)にて 3日間培養し、サブコンフルエント状態まで増殖させた。その後、培地を分化培地 (D-MEM low glucose + 2% horse serum) に交換して培養することで筋管細胞に分化させ、経時的にサンプルを回収した。

B) 動物を用いた実験

i) 実験の対象

骨格筋再生モデル実験には雌性の生後 9 ヶ月齢の WT マウス (4 匹) と Tg マウス (4 匹) を用いた。運動量計測実験には 2 型糖尿病モデル KK-Ay マウスと CREG-Tg マウスを交配して得られたオスの KK-Ay/CREG1-WT (KK-Ay/WT) マウスと KK-Ay/Creg1-Tg (KK-Ay/Tg) マウスを用いた (図1)。

全てのマウスは気温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗サイクル 12 時間の環境下で飼育した。なお、餌および水は自由摂取とした。

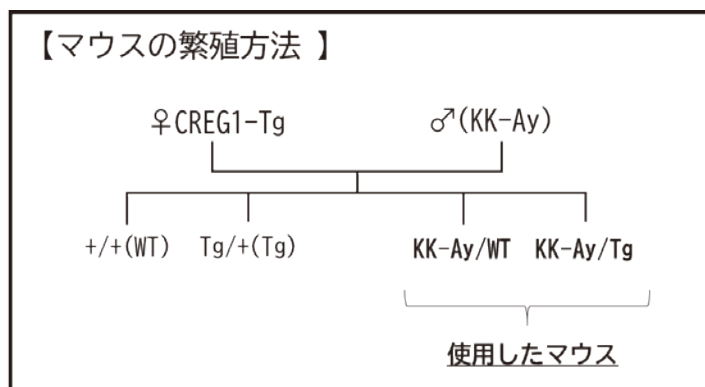


図1. マウスの繁殖方法

ii) 骨格筋再生の惹起

全てのマウスの右前脛骨筋には生理食塩水 (PS) 0.1ml、左前脛骨筋には筋再生を促すために $10\mu\text{M}$ のカルディオトキシン (CTX) を 0.1ml 注入した。CTX 刺激後 2 日で両側の前脛骨筋を採取した。

III) 運動量の計測

KK-Ay/ WT と KK-Ay/ Tg マウスを無作為に安静対照群と自発運動群に分けた。自発運動群にはケージ内にマウス用回転かご (メルクエスト、図 2) を入れ、運動量を算出した (図 2)。



図2. マウス用回転かご

3. 実験結果

3.1 CREG1 が筋分化へ及ぼす影響

骨格筋への分化前と分化誘導後 1-5 日の筋管細胞における Creg1 mRNA の発現変化を評価したところ、骨格筋分化誘導 1 日～3 日は分化誘導前と比較して Creg1 の mRNA 発現が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

3.2 CREG1 が骨格筋再生へ及ぼす影響

CTX 刺激によるタンパク質発現量を評価したところ、CREG1 のタンパク質発現は PS 刺激と比較して有意に高値を示し、さらに WT と Tg を比較すると Tg で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。CREG1 の受容体である IGF2R の発現は CTX 刺激により有意に高値を示したが、WT と Tg で変化はなかった。オートファジー経路に関連する AMP-activated protein kinase のリン酸化においては、CTX 刺激において WT と比較して Tg で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。同じくオートファジー経路に関連する microtubule-associated protein1 light chain 3-II や p62/Sequestosome1 の発現量は、CTX 刺激において WT と比較して Tg で高値を示す傾向が認められた ($p = 0.07$, $p = 0.05$)。

3.3 CREG1 が身体運動量へ及ぼす影響

本研究で使用したマウスにおける体重及び体重増加量では、KK-Ay/WT と KK-Ay/Tg との間に有意な変化は認められなかった。さらに摂食量及び飲水量においては KK-Ay/WT と KK-Ay/Tg 間において有意な差は認められなかった。一方で運動量及び総走行距離は、KK-Ay/WT よりも KK-Ay/Tg で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

4. まとめ

本研究では、骨格筋細胞ならびに骨格筋組織を用いて、CREG1 が骨格筋分化、骨格筋再生ならびに運動量に及ぼす影響について検討を行った。その結果、以下の 3 点が新たに明らかとなった。1) CREG1 は筋細胞分化に伴い発現が増加する遺伝子であることが確認された。2) CREG1 過剰発現マウスは骨格筋再生過程における早期段階でオートファジー経路の活性化により再生を促進させる可能性が示唆された。3) CREG1 過剰発現マウスは筋の発達により自発運動における運動量や総走行距離が有意に高値を示した。

これまでの研究で我々は、CREG1 が褐色脂肪細胞の分化を誘導する内分泌因子であることを解明し、褐色脂肪細胞の分化に伴い CREG1 の発現が増加することを報告してきた[6] が、CREG1 は褐色脂肪のみならず骨格筋においても分化や再生に関与する可能性が示唆され、CREG1 はサルコペニア改善の標的分子として貢献する可能性が考えられた。しかしながら現在のところ CREG1 の骨格筋での作用機序は不明であり、今後より詳細な検討が必要であると考えられる。

参考文献

1. Lexell J, Taylor CC, Sjöström M (1988). What is the cause of the ageing atrophy? *J Neurol Sci* 84:275-294.
2. Zanou N, Gailly P (2013). Skeletal muscle hypertrophy and regeneration: interplay between

- the myogenic regulatory factors (MRFs) and insulin-like growth factors (IGFs) pathways. *Cell Mol Life Sci* 70:4117–4130.
3. Wilson EM, Rotwein P (2006). Control of MyoD function during initiation of muscle differentiation by an autocrine signaling pathway activated by insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem* 281: 29962–29971.
 4. Bella P, Farini A, Banfi S, Parolini D, Tonna N, Meregalli M, Belicchi M, Erratico S, D'Ursi P, Bianco F, Legato M, Ruocco C, Sitzia C, Sangiorgi S, Villa C, D'Antona G, Milanesi L, Nisoli E, Mauri P, Torrente Y (2020). Blockade of IGF2R improves muscle regeneration and ameliorates Duchenne muscular dystrophy. *EMBO Mol Med*. 12(1): e11019.
 5. Sacher M, Di Bacco A, Lunin VV, Ye Z, Wagner J, Gill G, Cygler M (2005). The crystal structure of CREG, a secreted glycoprotein involved in cellular growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(51):18326–18331.
 6. Kusudo T, Hashimoto M, Kataoka N, Li Y, Nozaki A, Yamashita H (2019). CREG1 promotes uncoupling protein 1 expression and brown adipogenesis in vitro. *J Biochem*. 165(1):47–55.