

第二次審査(論文公開審査)結果の要旨

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, volume 12, 1377, 2022 掲載

DOI 10.1038/s41598-022-05354-0

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。TRIM63 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。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 (OH)₂D₃) 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。

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て筋萎縮と VDR の関連について観察した。

模擬微小重力環境下実験には *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、対照には、地上条件 (1 g) 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。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。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)とした。

ATAC-seq と、エンハンサー活性と相関するアセチル化ヒストン H3 リジン 27 (H3K27ac) についての ChIP-seq から VDR 結合モチーフ、転写活性は模擬微小重力に反応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、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。*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たところ 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。以上より、C2C12 筋管から VDR を欠損させると、模擬微小重力による *Fbxo32* エンハンサーの反応性が失われ、筋萎縮が抑制されることが明らかとなった。

二次審査においては微小重力環境 (3D-Clinorotation)の原理、VDR との関係、細胞の分化誘導について、Vit D 依存性の可能性、転写活性についての質問があり、いずれも先行研究、本研究、過去の報告を基に的確な回答を得た。

本研究から VDR は重力の変化に応答し、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。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したことは学位論文として価値あるものと判断した。