

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16609

研究課題名（和文）セロトニン作動薬による骨格筋障害の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular mechanism of skeletal muscle injury caused by serotonin agonists

研究代表者

川幡 由希香（Kawabata-Sakata, Yukika）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80778473

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：骨格筋におけるセロトニンの役割、及びセロトニン投与による骨格筋障害のメカニズムを明らかにすることを目的とし、マウス骨格筋におけるセロトニン関連遺伝子の発現解析と、セロトニンを投与したC2C12細胞での遺伝子発現解析を行なった。その結果、マウスの骨格筋部位によってセロトニン産生や代謝が異なり、それらが筋肥大や筋萎縮に関わっている可能性が示唆された。培養細胞の解析では、高濃度で添加した際にエネルギー代謝関連遺伝子などの遺伝子発現が低下し、myotubeの形成が抑制された。今回行った高濃度のセロトニン添加は、骨格筋障害をもたらす細胞のモデルとなり得るため、今後、治療標的分子の発見につなげていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セロトニン症候群は、セロトニン作動薬の服用により現れる副作用で、精神症状、神経筋症状、自律神経症状などが認められる疾患である。重篤な場合は、横紋筋融解症などの骨格筋障害を引き起こす。しかし、なぜセロトニンにより骨格筋が障害されるのか、さらには骨格筋におけるセロトニンの役割も不明な点が多い。本研究により、骨格筋におけるセロトニン産生や代謝は筋線維タイプごとに異なる可能性が示され、骨格筋でのセロトニンの具体的機能を解明する手がかりを掴んだ。また、セロトニン添加時の培養細胞を骨格筋が障害されるモデルとして使用することで、今後、治療標的分子の同定につながっていくと期待される。

研究成果の概要（英文）：To clarify the role of serotonin in skeletal muscle and the mechanism of skeletal muscle damage caused by administration of serotonin, we performed expression analysis of serotonin-related genes in mouse skeletal muscle and gene expression analysis in serotonin-administered C2C12 cells. As a result, it was suggested that serotonin production and metabolism differ depending on the muscle fiber type, and that they may be involved in muscle hypertrophy and/or muscle atrophy. In the analysis of cultured cells, gene expression such as energy metabolism-related genes decreased when added at a high concentration, and the formation of myotube was suppressed. The high concentration of serotonin administered this time may be a model of C2C12 cells that cause skeletal muscle damage, we would like to use it to identify new therapeutic target molecules.

研究分野：神経内科学

キーワード：骨格筋 セロトニン セロトニン症候群 横紋筋融解症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

セロトニン (5-HT; 5-hydroxytryptamine) は生体アミンの一種で、中枢神経系では神経伝達物質、末梢組織ではホルモンとして働き、様々な行動や内分泌系の制御、平滑筋収縮などに関与する。セロトニン症候群は、抗うつ薬などのセロトニン作動薬の服用中に出現する副作用で、精神症状、神経筋症状、自律神経症状が認められる疾患である。重篤な場合、骨格筋細胞の融解・壊死により横紋筋融解症やミオグロビン尿症が起り、腎不全などを引き起こす (Volpi-Abadie *et al.*, 2013, *Ochsner J.*, 13:533-40)。また当研究室の先行研究において、セロトニン受容体アゴニスト 25B-NBOMe をゼブラフィッシュの稚魚に投与すると、筋原線維が壊れ、横紋筋融解症を反映することがわかっている (Kawahara *et al.*, 2017, *Forensic Toxicol.*, 35:369-75)。また、解糖系経路を刺激してグルコース代謝を増加させるという報告からセロトニンが筋芽細胞の増殖・分化やエネルギー代謝に関与すると考えられ (Coelho *et al.*, 2007, *Mol Genet Metab.*, 92: 364-70; Coelho *et al.*, 2013, *Mol Cell Biochem.*, 372:211-20)、セロトニン症候群において惹起される横紋筋融解症も骨格筋にセロトニンが直接影響を及ぼして引き起こされていると考えられる。しかし、なぜセロトニンにより骨格筋が障害されるのか、さらには骨格筋におけるセロトニンの機能については未だ十分な理解が得られていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

骨格筋におけるセロトニンの具体的機能、及びセロトニン投与による骨格筋障害のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 骨格筋におけるセロトニンの作用部位の同定

ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の骨格筋、ヒト骨格筋細胞株、ラットの骨格筋、およびマウスの骨格筋を用いて、ウェスタンブロッティング法と免疫組織化学法でセロトニン受容体の発現解析を行った。

#### (2) マウス骨格筋におけるセロトニン関連遺伝子の発現解析

12週齢のマウスのヒラメ筋 (SOL) と長趾伸筋 (EDL) を用いて、セロトニンの産生や代謝に関与する6種類の酵素の遺伝子発現を qPCR で解析した。さらに、腱切除あるいはクレンブテロール投与により筋肥大させたマウスの骨格筋、テールサスペンションによる筋萎縮を起こしたマウスの骨格筋、及びテールサスペンションから回復させたマウスの骨格筋においても同様の解析を行った。

#### (3) セロトニンを投与した C2C12 細胞での遺伝子発現解析

C2C12 細胞を以下の3つの条件下で培養した後、qPCR を用いてセロトニンの産生や代謝に関与する6種類の酵素の遺伝子、及び筋肥大や筋萎縮、エネルギー代謝に関連する遺伝子の発現変化を調べた。

- ① C2C12 細胞 (myoblasts) をセロトニンを各濃度 (0, 10, 100  $\mu$ M) で添加した培地で24時間培養
- ② myoblasts を2%HSを含む分化誘導培地で5日間培養し myotube に分化させた後、セロトニンを各濃度 (0, 10, 100  $\mu$ M) で添加した培地で24時間培養
- ③ myoblasts を2%HSを含む分化誘導培地にセロトニンを各濃度 (0, 10, 100  $\mu$ M) で添加した培地で6日間培養

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨格筋におけるセロトニンの作用部位の同定

本研究では、当初、ゼブラフィッシュ骨格筋におけるセロトニンの作用部位を同定することを目指した。そこで、セロトニン受容体の発現部位を免疫組織化学法により特定することを試みた。が、明確なシグナルを得ることができず、用いる試料および解析方法を追加して検討を行うこととした。ゼブラフィッシュ成魚の骨格筋に加えて、ヒト骨格筋細胞株、ラットの骨格筋、およびマウスの骨格筋を用いて、ウェスタンブローディング法と免疫組織化学法でセロトニン受容体の発現解析を行った。その結果、ウェスタンブローディング法においてラットおよびマウスの骨格筋で 5HTR<sub>2A</sub> のシグナルが得られ、骨格筋でセロトニン受容体が発現していることを示した。免疫組織化学法を用いた解析では、現在のところいずれの試料においても明確な結果は得られなかった。そのため、骨格筋におけるセロトニン受容体の解析からアプローチ方法を変えて、(2)に示す、セロトニンの産生や代謝について検討を行うこととした。

##### (2) マウス骨格筋におけるセロトニン関連遺伝子の発現解析

マウス骨格筋を用いて、セロトニンの産生や代謝に関与する 6 種類の酵素の遺伝子発現を解析した結果、マウスのヒラメ筋 (SOL) と長趾伸筋 (EDL) において、セロトニンの産生や代謝に関与する酵素の遺伝子発現に有意な差が認められた。さらに、筋肥大や筋萎縮のモデルマウスの骨格筋においてもこれらの遺伝子発現に変化がみられたことから、骨格筋部位もしくは筋線維タイプによってセロトニン産生や代謝が異なっており、それらが筋肥大や筋萎縮に関わっている可能性が考えられた。

##### (3) セロトニンを投与した C2C12 細胞での遺伝子発現解析

セロトニン添加培地で培養した C2C12 細胞において、筋肥大や筋萎縮、エネルギー代謝に関連する遺伝子の発現変化を調べた。セロトニンの投与期間、濃度によっては異なる結果が得られたため、培養細胞レベルでもセロトニン添加の効果を引き続き解析する必要があるものの、今回添加したセロトニンの濃度では、myotube の形成が抑制された。今回行った高濃度のセロトニン添加時の培養細胞を骨格筋が障害されるモデルとして使用することで、今後、治療標的分子の同定につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawabata-Sakata Yukika, Nishiike Yuji, Fleming Thomas, Kikuchi Yukiko, Okubo Kataaki	4. 巻 287
2. 論文標題 Androgen-dependent sexual dimorphism in pituitary tryptophan hydroxylase expression: relevance to sex differences in pituitary hormones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences	6. 最初と最後の頁 20200713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rspb.2020.0713	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------