

平成 30 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462836

研究課題名(和文) 新たな骨格筋形成調節因子としてのカートデュースンの役割と遺伝性筋疾患との関連

研究課題名(英文) Potential role of cartducin as a novel regulator of skeletal myogenic differentiation and maturation

研究代表者

前田 隆史 (MAEDA, Takashi)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80324789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔の横隔膜や背筋などの形成期の骨格筋組織にカートデュースンの強い発現が認められた。また、C2C12細胞を用いた筋芽細胞から筋管細胞への分化過程において、カートデュースンの発現が誘導されることが明らかになった。カートデュースンには筋芽細胞に対する増殖促進作用や、筋芽細胞から筋管細胞への分化抑制作用があることが明らかになり、これらの作用にはERK1/2を介するシグナル伝達経路が関わっていることが示された。さらに、TGF-beta3が筋芽細胞の分化過程におけるカートデュースン遺伝子の発現を調節している因子の一つであることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Cartducin is a member of the C1q and tumor necrosis factor-related protein (CTRP) superfamily. In the present study, we provide evidence for a physiological role of the cartducin in myogenesis using C2C12 myoblasts. Cartducin was expressed in developing skeletal muscle tissues, and the expression level of cartducin was increased during myogenic differentiation of C2C12 cells. Recombinant cartducin promoted the proliferation of undifferentiated C2C12 myoblasts and this response required activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling pathway. In contrary, it inhibited myogenic differentiation and fusion of C2C12 cells by suppressing the expression of myogenic marker genes. Cartducin mRNA expression was increased in C2C12 myoblasts treated with TGF- $\beta$ 3, suggesting that TGF- $\beta$ 3 is one of the extracellular factors regulating cartducin expression during myogenesis. These results indicate a novel physiological role for cartducin during skeletal myogenesis.

研究分野：病態科学系歯学

キーワード：発生・分化 Cartducin 骨格筋 筋芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 自然免疫における補体系の最初の分子である C1q の C 末端部球状ドメインや腫瘍壊死因子 (TNF) と同様の構造をもつ一連の分子群が「C1q/TNF スーパーファミリー」として総称されるようになり、アディポネクチンパラログとして注目されていた。これらの分子はアディポネクチンと同様に、多量体構造をとる分泌蛋白質であり、細胞外に分泌されることにより細胞間シグナルを伝達する分子として多彩な機能をもつことが知られていた。研究代表者らが軟骨細胞から同定し、「軟骨から産生される分泌蛋白質」という意味で“Cartducin (カートデューシン)”と名付けられた分子は分子量 26-kDa の機能未知の分泌蛋白質をコードしており、「C1q/TNF スーパーファミリー」に CTRP3 として属することが明らかになっていた。

(2) 研究代表者らは、カートデューシンが局所的には骨形成促進因子として骨格の成長発育において重要な役割を果たしていることや、精巣においてテストステロン産生に関わっていることなどを主に明らかにしていた。また、海外の研究者らによって、カートデューシンには血漿蛋白質として抗炎症作用や血糖降下作用、心筋保護作用などがあることが報告されていた。これらのことから多様な生理的・病理的作用を持つ新たな生理活性物質としてのカートデューシンの重要性が明らかになってきていた。

(3) 骨格の軸となる骨や軟骨、骨格筋の細胞は発生学的に添軸中胚葉の細胞に由来することが知られていた。そこで、いろいろな時期のマウス胎仔の組織でカートデューシン蛋白質の発現を免疫組織化学的に調べたところ、形成過程の骨格筋に特異的な発現があることが判明した。骨格筋の筋肉は、単核の筋芽細胞が分化とともに互いに融合して細長く多核の筋管細胞となり、続いて筋管細胞が集合して作られる。このように、骨格筋形成には筋芽細胞の増殖と分化、細胞融合などからなる複雑なプロセスが関わっていることが知られていたが、これらのプロセスにおけるカートデューシンの役割は不明であった。

(4) しかしながら、遺伝的に筋肉の肥大を示すウシの骨格筋ではカートデューシンの発現量が著しく減少していることや、カートデューシンと立体構造のよく似たアディポネクチンが筋芽細胞から筋管細胞への分化、細胞融合を促進することが報告されていたので、研究代表者らはカートデューシンが骨格筋形成調節因子として何らかの生理的役割を果たしているのではないかという仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

骨格筋の形成過程におけるカートデューシンの役割については不明である。そこで本研究では、カートデューシンの骨格筋形成調節因子としての役割を詳細に解明することを試みた。具体的には、(1)筋芽細胞の増殖や分化、細胞融合に対する生理作用、(2)カートデューシンの刺激に応答する細胞内分子群とシグナル伝達経路、(3)筋芽細胞におけるカートデューシン遺伝子の発現調節機構、(4)カートデューシンノックアウトマウスの表現型、の各項目を明らかにして、骨格筋形成に関するカートデューシンの新たな病態生理学的意義の理解を深めることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 試薬：マウス組換えカートデューシン蛋白質は、HEK293 細胞を用いて C 末端に FLAG を付加した蛋白質として作製した。ヒト組換え TGF-beta3 蛋白質は Pepro-Tech 社から購入した。抗マウスカートデューシン抗体は R&D 社から購入した。抗 MHC II 抗体、および抗 ERK1/2 抗体は Sigma 社から購入した。抗リン酸化型 ERK1/2 抗体は Cell Signaling 社から購入した。MEK1/2 の阻害剤である U0126 は Calbiochem 社から購入した。

(2) 免疫組織化学染色：生後 4 週齢のマウスから摘出した骨格筋、および胎性 12.5-13.5 日齢のマウス胎仔を 4%パラホルムアルデヒドで固定後にパラフィン包埋した。薄切したパラフィン切片を通常法にて脱パラフィン処理および親水処理を行った。続いてオートクレーブを用いて抗原賦活化処理と過酸化水素/メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの失活処理を行い、室温で 30 分ブロックした。抗マウスカートデューシン抗体を 1 次抗体として用いて 4 晩反応させた。2 次抗体としてビオチン標識抗 IgG 抗体を用い、シグナルの検出は HRP 標識アビジン・ビオチンシステムを用いた化学発色法にて行った。

(3) 細胞株および細胞培養：マウス筋衛星細胞由来筋芽細胞株 C2C12 は理研細胞銀行より購入した。C2C12 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM 培地で 37 で培養した。一方、C2C12 細胞を筋芽細胞から筋管細胞に分化させるためには、コンフルエント後に 2% ウマ血清を含む DMEM 培地 (分化誘導培地) で培養した。シグナル伝達経路の活性化を調べる実験では、C2C12 細胞を無血清培地で 6 時間培養した後、5 µg/ml のカートデューシン蛋白質を添加し、5-60 分後に細胞を溶解して蛋白質を回収した。U0126 阻害剤を用いた実験では、カートデューシン蛋白質を添加する 1 時間前に C2C12 細胞を阻害剤で前処理した。

(4) DNA 合成能の測定：増殖期にある C2C12 細胞を無血清培地で 24 時間培養後、各濃度の組換えカートデュエシン蛋白を添加してさらに 24 時間培養した。培養終了 3 時間前に BrdU を添加し、細胞への取り込み量を測定した。

(5) 定量的 RT-PCR：C2C12 細胞より QIAGEN 社の RNeasy キットを用いて total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を TaKaRa-Bio 社の PrimeScript RT キットを用いて逆転写して cDNA を合成した。カートデュエシン、MHC II、Myogenin、IGF-1、Myostatin、TGF-beta1、TGF-beta2、TGF-beta3 および HPRT の各遺伝子に対して特異的なプライマーを用いて定量的 RT-PCR を行った。

(6) ウェスタンブロット：プロテアーゼ阻害剤とフォスファターゼ阻害剤を含む細胞溶解バッファーで C2C12 細胞から蛋白を回収した。各蛋白を SDS-PAGE にて分離後 PVDF 膜に転写し、室温で 120 分ブロッキングした。上記の抗体を 1 次抗体として用いて 4℃ で一晩反応させた。2 次抗体としてアルカリフォスファターゼ標識抗 IgG 抗体を用い、シグナルの検出は化学発色法にて行った。

(7) 免疫細胞化学染色：C2C12 細胞を 8  $\mu$ g/ml のカートデュエシン蛋白を添加しながら分化誘導培地で 5 日間培養し、4%パラホルムアルデヒドで細胞層を固定した。過酸化水素/メタノールによる内因性ペルオキシダーゼの失活処理と Triton-X 100 による細胞膜透過処理を行い、室温で 30 分ブロッキングした。抗 MHC II 抗体を 1 次抗体として用いて 4℃ で一晩反応させた。2 次抗体としてビオチン標識抗 IgG 抗体を用い、シグナルの検出は HRP 標識アビジン・ビオチンシステムを用いた化学発色法にて行った。

(8) 統計解析：Student's *t*-test を用いて、 $P < 0.05$  を有意とみなした。

#### 4. 研究成果

(1) 骨格筋の発生過程におけるカートデュエシンの発現：マウス胎仔の切片を用いて発生過程の骨格筋組織におけるカートデュエシン蛋白の局在を免疫組織化学染色で調べた結果、胎性 12.5-13.5 日齢の横隔膜や背筋などの骨格筋組織にカートデュエシンの強い発現が認められた(図 1)。一方、生後 4 週齢のマウス骨格筋組織の切片を用いて免疫組織化学染色を行いカートデュエシンの局在を調べた結果、カートデュエシンの発現は全く認められなかった。また、市販のヒトマルチプルティッシュノーザンブロットを用いたノーザン解析でも、胎児のヒト骨格筋ではマウスと同様にカートデュエシン遺伝子の発現が認められたが、成人のヒト骨格筋

ではその発現が認められなかった。

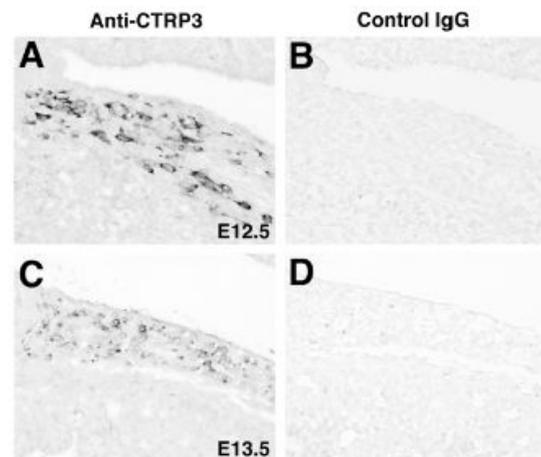


図 1 マウス胎仔骨格筋の免疫組織染色

(2) C2C12 筋芽細胞の分化誘導に伴うカートデュエシンの発現：発生過程の骨格筋組織においてカートデュエシンの強い発現が認められたことから、筋芽細胞から筋管細胞への分化過程においてカートデュエシンの発現が誘導される可能性が考えられた。そこで、C2C12 筋芽細胞を筋管細胞へ分化誘導させる培養系を用いてカートデュエシンの発現を遺伝子レベルおよび蛋白レベルで調べた。その結果、カートデュエシン遺伝子の発現は分化誘導後 5 日で強いピークを示した(分化誘導前と比較して約 60 倍)(図 2 左)。また、カートデュエシン蛋白も C2C12 細胞の分化に伴って発現の増加を示し、分化誘導後 5 日から 8 日にかけて強い発現が認められた(図 2 右)。

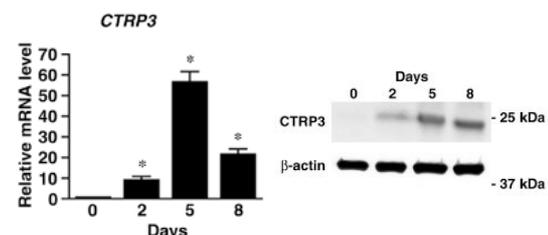


図 2 C2C12 筋芽細胞の分化誘導に伴うカートデュエシンの発現上昇  
(左) 定量的 RT-PCR 法 (右) ウェスタンブロット法

これらの結果から、筋芽細胞から筋管細胞への分化過程においてカートデュエシンの発現が誘導されることが明らかになった。

(3) C2C12 筋芽細胞の増殖に対するカートデュエシンの作用：骨格筋の発生と再生には筋芽細胞の増殖が重要であることが知られている。そこで、C2C12 筋芽細胞に対してカートデュエシンが増殖作用を持つかどうかを細胞培養系で調べた。その結果、カートデュエシンは C2C12 細胞に対して濃度依存性に増殖促進作用を持つことが判明した。

そこで、カートデューシンの刺激にตอบสนองしてリン酸化される C2C12 細胞内のシグナル伝達分子をウェスタンブロット法で調べた結果、カートデューシンの培養系への添加によって 5 分後からリン酸化された ERK1/2 (MAPキナーゼの一つ) の増加が検出され、1 時間後には元のレベルまで減少することが判明した。実際、ERK1/2 の特異的阻害剤である U0126 を用いて ERK1/2 の活性化を阻害すると、カートデューシンによる C2C12 細胞に対する増殖促進作用がほぼ完全に抑制されることを見いだした。

これらの結果から、カートデューシンの筋芽細胞に対する増殖促進作用には ERK1/2 を介するシグナル伝達経路が関わっていることが明らかになった。

(4) C2C12 筋芽細胞の筋管細胞への分化に対するカートデューシンの作用：筋芽細胞から筋管細胞への分化誘導時にカートデューシンの発現が著しく上昇していることから、カートデューシンが C2C12 細胞の分化に影響を与えている可能性が考えられた。そこで、C2C12 細胞を 8  $\mu\text{g/ml}$  のカートデューシン蛋白を添加しながら分化誘導培地で 5 日間培養して分化に及ぼす影響を調べた。その結果、カートデューシン添加群では筋管細胞同士の融合が阻害されて筋管細胞への分化が抑制された (図 3)。また、分化マーカーである Myogenin および MHC II 遺伝子の発現も対照群と比較して著しく減少していた。

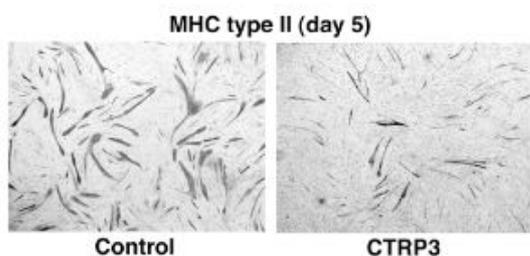


図 3 カートデューシンによる筋芽細胞の分化抑制作用

ERK1/2 を介するシグナル伝達経路は、筋芽細胞の増殖に必要であるのみならず、筋芽細胞の分化を抑制的に調節することが知られている。そこで、分化誘導培地で 2 日間培養した分化中の C2C12 細胞をカートデューシンで刺激して、ERK1/2 がリン酸化されるかどうかをウェスタンブロット法で調べた。その結果、カートデューシンの培養系への添加によって 15 分後からリン酸化された ERK1/2 の増加が検出され、1 時間後までレベルの増加が続くことが判明した。

これらの結果から、カートデューシンの筋芽細胞から筋管細胞への分化抑制作用には ERK1/2 を介するシグナル伝達経路が関わっていることが明らかになった。

(5) 筋芽細胞の分化過程におけるカートデ

ューシン遺伝子の発現調節機構：筋芽細胞の分化はいろいろな成長因子によって調節されていることが知られている。これらの因子の一つである TGF-beta は筋芽細胞の増殖を促進するが、筋芽細胞の分化を抑制することが報告されている。そのため、TGF-beta が筋芽細胞におけるカートデューシンの発現の調節に関わっているのではないかと考えた。まず始めに、C2C12 筋芽細胞の分化過程において TGF-beta の各サブタイプの遺伝子発現がどのように変化するのかを分化誘導後 5 日の C2C12 細胞を用いて定量的 PCR で調べたところ、TGF-beta3 遺伝子のみが分化に伴い発現量が 2 倍以上に増加することが分かった。そこで、C2C12 細胞におけるカートデューシン遺伝子の発現に対する TGF-beta3 の影響を調べた。その結果、TGF-beta3 で刺激した C2C12 細胞では、8 時間後にカートデューシン遺伝子の発現量が対照群と比較して 3 倍以上に上昇し、24 時間後にはピークからは減少することが判明した (図 4)。

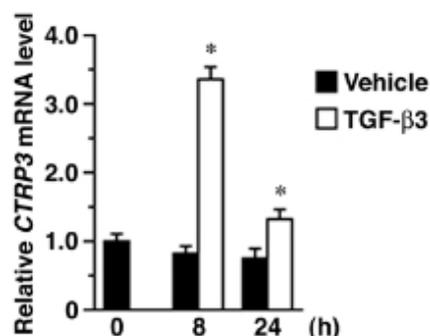


図 4 C2C12 細胞における TGF-beta3 によるカートデューシン遺伝子の発現誘導

これらの結果から、TGF-beta3 が筋芽細胞の分化過程におけるカートデューシン遺伝子の発現を調節している因子の一つであることが明らかになった。

(6) カートデューシンノックアウトマウスの骨格筋の表現型：これまでの解析の結果、カートデューシンが骨格筋の形成に関わっている可能性が示唆されたので、カートデューシンノックアウトマウスにおいて骨格筋に何らかの形態異常が生じることが予想された。しかしながら、カートデューシンノックアウトマウスにおいて骨格筋形成の明らかな異常は見られなかった。

この結果は、他の C1q/TNF スーパーファミリー分子との機能的リダンダンシーによるものではないかと考えられた。

(7) 総括：胎生期の骨格筋に発現しているカートデューシンは、筋芽細胞の増殖を促進する一方、筋芽細胞から筋管細胞への分化を抑制して、骨格筋の形成に関わっている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

Nishimoto, H., Yamamoto, A., Furukawa, S., Wakisaka, S. and Maeda, T. (2017) C1q/TNF-related protein 3 expression and effects on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells. *Cell. Biol. Int.*, 41: 197-203. (査読有)  
DOI:10.1002/cbin.10674.

Matsumoto, Y., Sato, S., Maeda, T., Kishino, M., Toyosawa, S., Usami, Y., Iwai, S., Nakazawa, M., Yura, Y. and Ogawa, Y. (2016) Transcription factors related to chondrogenesis in pleomorphic adenoma of the salivary gland: a mechanism of mesenchymal tissue formation. *Lab. Invest.*, 96: 16-24. (査読有)  
DOI:10.1038/labinvest.2015.124.

Otani, M., Furukawa, S., Wakisaka, S. and Maeda, T. (2015) A novel adiokine C1q/TNF-related protein 3 is expressed in developing skeletal muscle and controls myoblast proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biochem.*, 409: 271-282. (査読有)  
DOI:10.1007/s11010-015-2531-y.

Shimamoto, H., Sumida, I., Kakimoto, N., Marutani, K., Okahata, R., Usami, A., Tsujimoto, T., Murakami, S., Furukawa, S. and Tetradis, S. (2015) Evaluation of the scatter doses in the direction of the buccalmucosa from dental metals. *J. Appl. Clin. Med. Phys.*, 16: 5374. (査読有)  
DOI:10.1120/jacmp.v16i3.5374.

Nishino, K., Shimamoto, H., Kakimoto, N., Tsujimoto, T., Chindasombatjaroen, J., Murakami, S. and Furukawa, S. (2014) Influence of an object's z-axis location and location on the axial plane on the voxel value representation and uniformity in cone beam computed tomography. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.*, 118: 619-624. (査読有)  
DOI:10.1016/j.oooo.2014.08.010.

Sumida, I., Yamaguchi, H., Kizaki, H., Yamada, Y., Koizumi, M., Yoshioka, Y., Ogawa, K., Kakimoto, N., Murakami, S. and Furukawa, S. (2014) Evaluation of imaging performance of megavoltage cone-beam CT over an extended period. *J.*

*Radiat. Res.*, 55: 191-199. (査読有)  
DOI:10.1093/jrr/rrt100.

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~oal/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 隆史 (MAEDA, Takashi)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：80324789

(2)研究分担者

古川 惣平 (FURUKAWA, Souhei)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：80173524

(平成29年3月17日削除：死亡のため)

(3)連携研究者

佐藤 淳 (SATO, Sunao)  
大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：70335660