

マウス由来筋芽細胞の増殖におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

佐藤勝祥¹, 堤優樹¹, 小池晶琴¹, 横尾正樹¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部アグリビジネス学科

近年, EU 諸国を中心にアニマルウェルフェア (動物福祉) の概念を畜産現場にも定着させようという動きが広まっている。ストレスは家畜の成長や畜産物の品質に悪影響をおよぼす可能性があることから, 畜産の現場においてストレスの少ない飼育環境の構築は重要な課題である。筆者らは, ストレス応答ホルモンに着目して研究を続けているが, 本研究ではストレス応答ホルモンが筋肉の成長におよぼす影響を検討することを目的として, マウス由来筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を用いて, アペリン, オキシトシンおよびセロトニン刺激試験を行った。本研究から, C2C12 細胞にはアペリン受容体およびセロトニン受容体 (1B, 2C 受容体) が発現していることが明らかとなった。また, ストレス応答ホルモン刺激試験の結果から, アペリンが C2C12 細胞の増殖を促進することが明らかとなり, オキシトシンおよびセロトニンには C2C12 細胞の増殖を抑制する効果が明らかとなった。これらの結果から, アペリン, オキシトシンおよびセロトニンが筋肉の成長において重要な役割を担っていることが示された。

キーワード: アペリン, オキシトシン, セロトニン, 筋芽細胞, C2C12 細胞

近年, EU 諸国を中心にアニマルウェルフェア (動物福祉) の概念を畜産現場にも定着させようという動きが広まっている。日本国内においては, 平成 23 年に「アニマルウェルフェアの考え方に対応した肉用牛の飼養管理指針」が発表され, 平成 25 年の「動物の愛護及び管理に関わる法律」の改正の際に「産業動物の飼養及び保管に関する基準」の中で快適性に配慮した飼養管理が歌われるようになった。また, ストレスは家畜の成長や畜産物の質に悪影響をおよぼす可能性があることから, ストレスの少ない飼育環境の構築は畜産現場において重要な課題である。筆者らは, ストレス応答ホルモンを指標としてストレスの少ない飼育環境の構築を目指しており, 特に, アペリン, オキシトシンおよびセロトニンの3つのホルモンに着目して研究を行っている。アペリンは, ヤギやヒツジにおけるストレス反応によって分泌が促進されることが明らかとなっており, 反芻動物におけるストレス応答において重要な役割を担っていることが報告されている (Sato *et al.*, 2012)。また, オ

キシトシンには母性行動や攻撃性をコントロールする働きがあり (Takayanagi *et al.*, 2005), セロトニン不足はストレス耐性の低下や, 睡眠障害を引き起こすことが知られている。

ところで, 筋肉の成長や筋肉の質は, 運動負荷などの物理的な刺激によって調節されていると考えられていたが, 最近の報告では内分泌ホルモンによる調節機構の存在が明らかになってきている。Elabdらは老齢マウスへのオキシトシン投与によって骨格筋の再生能が回復することを報告し (Elabd *et al.*, 2014), 渡邊らは高脂肪食由来の肥満マウスへのセロトニン投与が I 型筋繊維割合を増加させることを報告している (Watanabe *et al.*, 2016)。これらの報告から, ストレス応答ホルモンが筋肉の成長と肉質へ影響を与える可能性が示唆されている。

本研究ではアペリン, オキシトシンおよびセロトニンによる骨格筋への影響を検討することを目的とした。

材料および方法

細胞培養

本研究では、理化学研究所から購入したマウス由来筋芽細胞株 (C2C12 細胞株) を用いた。ダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM, high-glucose) に、ウシ胎児由来血清 (FBS) を 10%、抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン) を 1% 添加して増殖用培地とした。2 日おきに培地交換を行い、4 日ごとに継代操作を行った。培養条件は、37°C, 5%CO₂, 95% 空気とした。

受容体 mRNA 発現解析

C2C12 細胞株に発現が確認されていない、アペリン受容体およびセロトニン受容体の mRNA 発現解析を行った。RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いて細胞を回収し、mRNA を抽出した後、逆転写キット (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser; タカラバイオ) を用いて cDNA を作成した。PCR 反応によってアペリン受容体 (APJR) およびセロトニン受容体 (5HTR) DNA を増幅した。内部標準には 18s rRNA を用い、表 1 に示したプライマーを使用した。PCR 条件は、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) を用いて、98°C で 10 秒間、62°C で 30 秒間、72°C で 30 秒間を 30 サイクル実施した。増幅した PCR 産物を、2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、発現を解析した。

ストレス応答ホルモン刺激

ストレス応答ホルモンとして Pyr-1 apelin-13, oxytocin, serotonin (ペプチド研究所, 大阪) を用いた。増殖用培地に各ホルモンを 0.01, 0.1, 1.0 μM の濃度で添加して刺激用培地を作成した。6well プレートを用いて、1wellあたり 9×10⁴個 (1.0×10⁴個 / cm²) 程度になるように細胞を播種し、2 日おきに培地を交換しながら、37°C, 5%CO₂, 95%空気の条件下で 7 日間培養を行った。対照区には増殖用培地を用いた。

細胞数の測定

トリプシン (wako) を用いて細胞を回収し、トリパンブルー染色後、血球計算盤を用いて細胞数を測

表 1 プライマー配列

遺伝子	塩基配列
APJR	5'-TGATGGTTACAACACTACTATGGGGCT-3' 5'-GTCAAACCTCCCGGTAGGTATAAGTG-3'
5HTR 1A	5'-CCTGCCACATGAAGCCATTG-3' 5'-GGTGTGGACACCCTACAGGCTTA-3'
5HTR 1B	5'-TGGCCGCATCTATGTGGAAAG-3' 5'-TATCAACTGGGCTCGGGTCAA-3'
5HTR 1D	5'-CATCTGCAGGGACTCTTGTGG-3' 5'-CGCTTGTGCGAAAGTCTTCGTTG-3'
5HTR 1F	5'-CAGATCGGAACTGAAGCATGAGAA-3' 5'-ACCCAAGATCAATCCCAGGGTAG-3'
5HTR 2A	5'-TAGCCGCTTCAACTCCAGAACC-3' 5'-AAGACCTTCGAATCATCTGTAGCC-3'
5HTR 2B	5'-CGGGCTACTGCATTCATCAAGA-3' 5'-AGCTCACAGGTGACATTGTGTGG-3'
5HTR 2C	5'-CATGTTCCCAGTAACCTGTGTTTCCA-3' 5'-GCTCACTCCAAGGTGTGCAAGTAG-3'
5HTR 3A	5'-AGCCAACAAGACTGATGACTGCTC-3' 5'-CAACATGGCTGCAGTGGTTTC-3'
5HTR 3B	5'-TTCAGGGTCAACATGTCTGATGAAG-3' 5'-GGGCCATGCAGACGGTAAAG-3'
5HTR 4	5'-AAGTACATGTGTGCCTGCTGTTGAG-3' 5'-TAGCCAACCAGTTCATGACACCA-3'
5HTR 5A	5'-TTTACAGGGCGGCGAAAT-3' 5'-CGGACCGTGAACACCATCT-3'
5HTR 5B	5'-AGTTTCGATTCCGGTCGCGAGA-3' 5'-TCAGACTCCGGAGGTGCTTC-3'
5HTR 6	5'-CTGACCACCAAGCATAGCAGGA-3' 5'-CAGCCATGTGAGGACATCGAA-3'
5HTR 7	5'-CTAACGCACAATCCCATGCTTC-3' 5'-GCAACACATTCAACACGATGCTTAC-3'
18s rRNA	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3' 5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'

定した。刺激区ごとに 7 枚のプレートを用意し、培養開始 1 日目から 24 時間ごとに 1 枚のプレート (6well 分) の細胞数を測定した。

統計処理

培養 1 日目の細胞数を 100 として、細胞増殖率を算出した。結果は、平均値±標準誤差を示している。刺激ホルモン区ごとに統計処理を行った。二元配置分散分析処理後、Turkey の多重比較検定を行い、危険率 5%未満を有意な差と判定した。

結果

受容体 mRNA 発現解析

図 1 に電気泳動結果を示す。C2C12 細胞株にはアペリン受容体が発現していることが明らかとなった

(a)。また、セロトニン受容体は 1B および 2C 受容体が発現していることが明らかとなった (b)。

ストレス応答ホルモン刺激による細胞増殖への影響

細胞増殖率の結果を表 2 に示す。

アペリン刺激による細胞増殖への影響は、培養日数と刺激区に有意差が認められ、交互作用が見られた (いずれも $P < 0.01$)。3 日目では、 $1.0 \mu\text{M}$ 刺激区が他の区に比べて有意に細胞増殖率が低かった。また、4 日目以降では $0.1 \mu\text{M}$ 刺激区の細胞増殖率が、対照区に比べて有意に高い値となった。

オキシトシン刺激による細胞増殖への影響は、培養日数と刺激区において有意差 ($P < 0.01$) が認めら

れたが、交互作用は見られなかった。試験期間を通じて、オキシトシン刺激によって細胞増殖が抑制された。

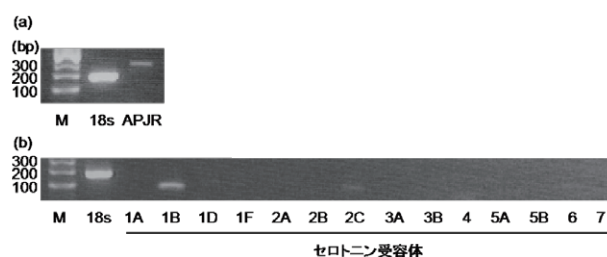


図 1 PCR 産物の電気泳動結果。(a)アペリン受容体 (b)セロトニン受容体

セロトニン刺激による細胞増殖への影響は、培養日数と刺激区に有意差が認められ、交互作用が見られた (いずれも $P < 0.01$)。5 日目では、 $0.1 \mu\text{M}$ 刺激区の細胞増殖率が対照区に比べて有意に高い値となった。また、 $0.01 \mu\text{M}$ 区と $1.0 \mu\text{M}$ 区では 6 日目以降、 $0.1 \mu\text{M}$ でも 7 日目の細胞増殖率が対照区よりも有意に低い値となった。

表 2 ストレス応答ホルモン刺激による細胞増殖への影響

刺激区	1 日目	2 日目	3 日目	4 日目	5 日目	6 日目	7 日目
アペリン							
対照区	100±6	233±18	699±104	1190±87	1274±55	1712±85	1446±58
0.01μM	100±14	352±37	586±50	1599±85	1519±57	1900±123	1703±85
0.1μM	100±10	389±31	698±32	1675±58*	1764±95*	2164±126*	1815±107*
1.0μM	100±9	253±9	315±34*	1407±61	1548±73*	1713±65	11680±89
オキシトシン							
対照区	100±8	392±35	855±30	1432±93	1461±88	2042±48	1889±98
0.01μM	100±10	292±28	656±60	1164±21	1003±49	1198±64	1400±31
0.1μM	100±7	338±23	790±62	1133±97	1154±77	1438±80	1525±54
1.0μM	100±10	324±22	705±43	1441±98	1247±61	1711±109	1861±111
セロトニン							
対照区	100±14	334±35	1294±80	1497±108	2347±78	3027±122	3836±111
0.01μM	100±6	284±30	884±36*	1230±81	2283±127	2913±138*	2796±196*
0.1μM	100±14	317±27	1160±59	1517±73	2717±83*	3323±52	2905±162*
1.0μM	100±13	316±16	987±64	1342±51	2484±149	2969±132*	2937±170*

1 日目の細胞数を 100 とし、細胞増殖率±標準誤差を表示。

* : 対照区と比較して有意差有り ($P < 0.05$)。

考察とまとめ

本研究結果から、マウス由来筋芽細胞株（C2C12細胞株）にはアペリン受容体が発現しており、またセロトニン受容体の中でも1Bおよび2C受容体の発現が明らかとなった。加えて、Leeらの報告で、オキシトシン受容体も同様に発現していることが明らかになっており(Lee ES et al., 2008)、これらの結果から、本研究で供試したストレス応答ホルモン、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンがC2C12細胞に対して直接的に刺激を与えることが可能であることが示唆された。

ストレス応答ホルモン刺激試験結果から、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンがC2C12細胞の増殖に影響をおよぼすことが明らかとなった。アペリンは、C2C12細胞の増殖を促進する結果となった。アペリンはこれまでの研究から成長ホルモンの分泌を促進する働きが明らかになっており（Sato et al., 2012）、アペリンは成長促進効果があることが示唆された。また、オキシトシンはC2C12細胞の増殖を抑制する結果となった。オキシトシンが老齢マウスの筋肉修復を促すという報告がされているが、本研究から、単純な筋芽細胞の増殖においては逆の効果を示すことが明らかとなった。これらの結果から、オキシトシンは筋肉の成長を調節する重要な因子であるが、調節機構はさらに下流にある因子によって制御されている可能性が示唆された。セロトニン刺激も同様に、C2C12細胞の増殖を抑制する効果が示唆された。C2C12細胞には1Bおよび2C受容体の発現が確認されたが、これらの受容体は採食量と体重増加を調節することが報告されており（Lee DD., et al. 2010）、また、セロトニンによる肥満抑制効果が確認されている（Watanabe et al., 2016）。これらのことから、セロトニンは成長を抑制する効果を有する可能性が示唆された。

以上の結果から、ストレス応答ホルモンは筋肉の成長において重要な役割を担っていることが明らかになった。今後は、ストレスの少ない飼育環境の構築に加えて、生産性の向上にも有効な内分泌動態を明らかにしていく。

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成27年度学長プロジェクト「若手スタートアップ奨励研究」の支援を受けて行った。

文献

- Elabd C, Cousin W, Pavan U, Chen RY, Choolijian MS, Ju Li, Kung S, Jiang KP, Conboy IM. (2014). Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration. *Nature communications* 2014; 5: 4082
- Lam DD, Garfield AS, Marston OJ, Shaw J, Heisler LK. (2010). Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* vol.97 1; 84-91
- Lee E. Uhm KO, Lee YM, Kwon J, Park SH, Soo KH. (2008). Oxytocin stimulates glucose uptake in skeletal muscle cells through the calcium-CaMKK-AMPK pathway. *Regulatory Peptides* vol151 1-3; 71-74
- Sato K, Takahashi T, Kobayashi K, Hagino A, Roh SG, Katoh K. (2012). Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone and growth hormone in the ruminant. *Domestic Animal Endocrinology* 42(3):165-72.
- Takayanagi Y, Yoshida M, Bielsky IF, Rosss HE, Kawamata M, Onaka T, Yanagisawa T, Kimura T, Matzuk MM, Young LJ, Nishimori K. (2005). Pervasive social deficits, but normal parturition, in oxytocin receptor-deficient mice. *PNAS* vol. 102 no. 44: 16096-16101
- Watanabe H, Nakano T, Saito R, Akasaka D, Saito K, Ogasawara H, Minashima T, Miyazawa K, Kanaya T, Takakura I, Inoue N, Ikeda I, Chen Xi, Miyake M, Kitazawa H, Shirakawa H, Sato K, Tahara K, Nagasawa Y, Rose MT, Ohwada S, Watanabe K, Aso H. (2016). Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice. *PLoS One* 14;11(1):e0147143

〔 平成 28 年 7 月 20 日 受付 〕
〔 平成 28 年 7 月 31 日 受理 〕

The effects of stress-related hormones on mouse myoblast cell growth

Katsuyoshi Sato¹, Yuki Tsutsumi¹, Akiko Koike¹, Masaki Yokoo¹

¹*Department of Agribusiness, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University*

In recent years, interest in animal welfare has grown in animal husbandry. Stress adversely affects productivity and the quality of animal products. Thus, it is important to reduce stress in livestock. We have studied stress-related hormones associated with animal husbandry. In particular, we investigated the effect of stress-related hormones (apelin, oxytocin, and serotonin) on mouse myoblast cell growth. We used the mouse myoblast cell line C2C12 from RIKEN. We determined the expression of the apelin receptor (APJR) and serotonin receptors (5HT-R) in C2C12 cells using RT-PCR. APJR, 5HT-1B, and 5HT-2C receptor mRNA was expressed in C2C12 cells. We also investigated the effect of apelin, oxytocin, and serotonin on C2C12 cell growth. Apelin stimulated cell growth, whereas oxytocin and serotonin inhibited cell proliferation. Thus, apelin, oxytocin, and serotonin play an important role in muscle growth.

Keywords: apelin, oxytocin, serotonin, myoblast, C2C12