

原著

C2C12細胞の増殖期に発現するB cell translocation遺伝子が fenofibrate誘発細胞毒性に及ぼす影響

三浦大作、山田 萌、清宮健一

兵庫医科大学薬学部

Effects of B Cell Translocation Genes Expressed during the Growth Phase of C2C12 Cells on
Fenofibrate-Induced Cytotoxicity

Daisaku MIURA, Moe YAMADA, Ken-ichi KIYOMIYA

School of Pharmacy, Hyogo Medical University

抄 録

薬物誘発性横紋筋融解症は、HMG-CoA還元酵素阻害薬やフィブレート系薬などで引き起こされることが知られているが、その発症機序については十分に解明されていない。我々は、本研究中で、マウス筋芽細胞由来C2C12細胞にfenofibrateを処置すると、増殖期と分化後でADP/ATP比に差があることを見出し、増殖期と分化後のC2C12細胞で発現量の異なる遺伝子がfenofibrate処置によって生じるADP/ATP比の違いに関与しているのではないかと考えた。C2C12細胞の増殖期と分化後で発現量が異なる遺伝子をcDNAサブトラクション法により調査する過程で、増殖期特異的に発現している候補遺伝子の1つとしてB cell translocation gene (*Btg1*) を同定した。さらに、マウス*Btg1* 遺伝子発現ベクターを構築し、CHO-K1細胞に発現させ、fenofibrate誘発細胞毒性発現に対するマウス*Btg1* タンパク質発現の影響を調査した。

CHO-K1細胞では、48時間の300 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate処置により生細胞数が27% 減少し、*Btg1* の遺伝子導入でも生細胞数が28% 減少した。また、*Btg1* を遺伝子導入したCHO-K1細胞では、mock遺伝子導入細胞と比較して、48時間の300 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate処置により生細胞数がさらに37% 減少した。以上のことから、マウス*Btg1* の遺伝子発現は、CHO-K1細胞のfenofibrateに対する感受性を増加させることが示唆され、アポトーシスを誘導する可能性が考えられた。さらには、*Btg1* が薬物誘発性横紋筋融解症に関与する可能性も示唆された。

キーワード：薬物誘発性横紋筋融解症、fenofibrate、B cell translocation gene(*Btg1*)、C2C12細胞、
cDNA サブトラクション

脚注：HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; ADP, Adenosine diphosphate; ATP, Adenosine triphosphate; cDNA, complementary DNA; PCR, Polymerase chain reaction; RIPA バッファー, Radioimmunoprecipitation バッファー; SDS-PAGE, Sodium dodecyl sulfate - poly-acrylamide gel electrophoresis; PVDF, Polyvinylidene difluoride; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

I はじめに

脂質異常症治療薬であるHMG-CoA還元酵素阻害薬・フィブラート系薬やニューキノロン系抗菌薬などでは、骨格筋細胞が融解、壊死して筋肉痛や脱力を生じる横紋筋融解症がまれに起こることが知られている。横紋筋融解症は、多臓器不全などを併発し、重篤な病態に陥ることもあるため、厚生労働省の重篤副作用疾患別対応マニュアル¹⁾にも収載されている。しかし、その発生機序については十分に解明されていない。

Oguraらは、増殖期や分化後よりも分化中のマウス筋芽細胞由来C2C12細胞で、HMG-CoA還元酵素阻害薬のsimvastatinに対する感受性が強いことを報告した²⁾。そこで我々は、本研究中において、フィブラート系薬のfenofibrateをC2C12細胞に処置したところ、増殖期と比べて分化後のADP/ATP比が有意に増加する結果を得たことから、増殖期と分化後で発現量が異なる遺伝子が影響しているのではないかと考えた。そこで、我々はcDNAサブトラクション法を用いてC2C12細胞の増殖期と分化後で発現量が異なる遺伝子を探索し、fenofibrate誘発細胞毒性発現にどのように影響するのか調査することにより、薬剤性横紋筋融解症の発現機序の解明に資することとした。

II 材料と方法

1. 材料

FenofibrateはSigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)から購入した。C2C12細胞およびCHO-K1細胞は理化学研究所バイオリソース研究センターより分与された。

2. 細胞培養

C2C12細胞およびCHO-K1細胞には、10%牛胎児血清(FBS、Biowest, Nuaille, France)およびペニシリン・ストレプトマイシン溶液(終濃度100U/mLペニシリンおよび100mg/mLストレプトマイシン、富士フイルム和光純薬、大阪)を加えたDulbecco's modified Eagle medium(DMEM、富士フイルム和光純薬)を増殖用培養液として用いた。また、Oguraらの方法²⁾に従い、C2C12細胞は、0.5% FBSおよびペニシリン・ストレプトマイシン溶液を加えたDMEMを用い、4日間培養することで分化させた。細胞培養は全て37℃、5% CO₂、100%湿度の条件で行った。

3. C2C12細胞にfenofibrateを処置した際の細胞生存率およびADP/ATP Ratioアッセイ

C2C12細胞にfenofibrateを処置した時の細胞死の様式を調査するために、細胞生存率を測定し、さらにADP/ATP比を求めた。増殖期および分化後のC2C12細胞を調製し、dimethyl sulfoxide(DMSO)に溶解したfenofibrateを0、10、100および1000 μmol/Lで48時間処置した。Fenofibrate処置時間終了後、クリスタルバイオレット法により細胞生存率を求めた。クリスタルバイオレット法では、細胞をPBS(-)で1回洗浄し、10%中性緩衝ホルマリン液(富士フイルム和光純薬)で10分間固定した。固定された細胞は0.1%クリスタルバイオレット液(富士フイルム和光純薬)で10分間染色し、水道水で洗浄後に乾燥させた。細胞に残留したクリスタルバイオレットを色素抽出液(エタノール30：酢酸1：水69)で抽出し、SPECTRAMax M2e(Molecular Devices)を用いて570 nmの吸光度を測定することにより生細胞数を求め細胞生存率を算出した。また、EnzyLight™ ADP/ATP Ratio Assay Kit(BioAssay Systems, Hayward, CA, USA)およびSpectra Max L(Molecular Devices)を用いて発光量を測定することにより細胞内ADPおよびATP量を求め、ADP/ATP比を算出した。なお、細胞にfenofibrateを処置する際には、溶媒のDMSOが培養液に対して1%(v/v)となるようにした。

4. cDNAサブトラクション法

増殖期および分化後のC2C12細胞からそれぞれISOGEN II(ニッポン・ジーン、東京)を用いてtotal RNAを抽出し、Nucleo Trap® Mini(MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)によりpolyA⁺ RNAに精製した。増殖期細胞由来polyA⁺ RNA、分化後細胞由来polyA⁺ RNAおよびPCR-Select™ cDNA Subtraction Kit(Clontech, Mountain View, CA, USA)を用いて、cDNAサブトラクションを行った。増殖期特異的に発現している遺伝子ライブラリーを作製するため、tester cDNAを増殖期細胞由来のもの、driver cDNAを分化後細胞由来のものとし、キットのユーザーマニュアルに従って実施した。cDNAサブトラクションで得られたPCR産物は、TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてサブクローニングし、プラスミド抽出後にBigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems™, Foster City, CA, USA)で塩基配列を決定した。得られた塩基配列をもとにBasic Local Alignment Search

Tool(BLAST)検索を行った。

5. マウス *Btg1* 発現ベクターコンストラクト作製

C2C12細胞から得たtotal RNAをPrimeScript II (タカラバイオ、草津市)でcDNAに逆転写後、マウス *Btg1* のコード領域全長に *Hind* III および *Eco* RI 認識配列を付加した領域を増幅するプライマーおよびPrimeSTAR® GXL (タカラバイオ)を用いてPCRを行った。PCR産物と発現ベクターpcDNA3.1(+) (Invitrogen)を制限酵素で切断後にライゲーションし、マウス *Btg1* 発現ベクター(pcDNA3.1(+)-*Btg1*)を作製した。さらに、pcDNA3.1-V5/HisにサブクローニングしV5/His融合タンパク質発現ベクター(pcDNA3.1-*Btg1*-V5/His)を作製した。

6. 発現ベクターコンストラクトの遺伝子導入

CHO-K1細胞を 2×10^5 cells/mLで播種し、24時間後にLipofectamine™ 3000(Invitrogen)を用いて発現ベクターコンストラクトを遺伝子導入した。遺伝子導入24時間後に培養液を増殖用培養液に置換した。なお、遺伝子導入の手順は試薬のプロトコルに従って実施した。

7. ウェスタンブロット解析

CHO-K1細胞にpcDNA3.1-*Btg1*-V5/Hisを遺伝子導入し、24時間および48時間後にprotease inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich)を1%(v/v)添加したRIPAバッファー(富士フイルム和光純薬)で可溶化し、細胞溶解液とした。細胞溶解液はRC/DC Protein Assay Kit(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)でタンパク質濃度測定を行った。細胞溶解液は、Laemmliサンプルバッファーで希釈後、95℃で5分間加熱してSDS-PAGEに供した。各レーンにタンパク量が10 µgとなるようにポリアクリルアミドゲル(SuperSep™ Ace, 5-20%、富士フイルム和光純薬)にアプライしてSDS-PAGEを行い、泳動後にタンパク質をPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜は5%スキムミルク(富士フイルム和光純薬)および0.1% Tween-20(富士フイルム和光純薬)含有PBSで室温、2時間ブロッキングした。ブロッキング後のPVDF膜は一次抗体に抗V5タグモノクローナル抗体(V5 Tag Monoclonal Antibody, Invitrogen)もしくは抗GAPDHモノクローナル抗体(富士フイルム和光純薬)を、二次抗体に抗マウスIgG(H+L), ウサギ, F(ab')₂, ペルオキシダーゼ結合(富士フイルム和光純薬)を用いて標識した。標識タンパク質はイムノ

スターLD(富士フイルム和光純薬)で化学発光させ、ImageQuant 400(GEヘルスケア)で画像取得した。

8. CHO-K1細胞に対するfenofibrate処置の用量設定

CHO-K1細胞を 2×10^5 cells/mLで播種し、24時間後に培養液を0、1、3、10、30、100、300および1000 µmol/L fenofibrate含有増殖用培養液に置換し、48時間処置した。Fenofibrate処置時間終了後、C2C12細胞と同様に、クリスタルバイオレット法により細胞生存率を求めた。

9. マウス *btg1* 発現細胞におけるfenofibrate処置時の細胞生存率測定

CHO-K1細胞にpcDNA3.1(+)-*Btg1*を遺伝子導入した24時間後に培養液を300 µmol/L fenofibrate含有増殖用培養液に置換した。Fenofibrateを48時間処置後、クリスタルバイオレット法により細胞生存率を算出した。

10. 統計解析

*P*値が0.05未満と計算された場合に統計学的有意差ありとした。Fenofibrate処置したC2C12細胞の生存率、ADP/ATP比およびCHO-K1細胞におけるfenofibrateの用量設定はDunnett多重比較検定で、*Btg1*発現細胞の細胞生存率は一元配置分散分析の後にBonferroniの多重比較検定で統計解析した。

III 結果

1. 増殖期と分化後のC2C12細胞にfenofibrateを処置した際の生存率およびADP/ATP比測定

増殖期と分化後のC2C12細胞にfenofibrateを0、10、100および1000 µmol/Lで48時間処置したところ、100および1000 µmol/Lで増殖期および分化後両方において細胞生存率の有意な低下が認められ、ADP/ATP比の有意な増加は、分化後細胞にのみ認められた(図1)。

2. cDNAサブトラクション法によるC2C12細胞増殖期特異的発現遺伝子の探索

C2C12細胞の増殖期特異的に発現している遺伝子をcDNAサブトラクション法で探索し、得られた37個のcDNAクローンの塩基配列をBLAST解析し、B cell translocation遺伝子(*Btg1*)が得られた。

3. CHO-K1細胞に対するマウスBtg1タンパク質強制発現のウエスタンブロット法による解析

内因性に発現するチャイニーズハムスター由来Btg1タンパク質と区別するために、CHO-K1細胞にはpcDNA3.1-Btg1-V5/Hisを遺伝子導入し、マウスBtg1タンパク質が強制発現されることをウエスタンブロット法により確認した(図2)。マウスBtg1タンパク質は遺伝子導入後24時間で発現が認められ、遺伝子導入後48時間ではさらに強い発現が認められた。このウエスタンブロット解析の結果から、マウスBtg1を遺伝子導入したCHO-K1細胞へのfenofibrate処置時間を48時間に設定することとした。

4. CHO-K1細胞に対するfenofibrate処置の用量設定

CHO-K1細胞を 2×10^5 cells/mLで播種し、24時間後に培養液を0、1、3、10、30、100、300および1000

μmol/L fenofibrate含有増殖用培養液に置換し、48時間処置して細胞生存率を求めた結果、100 μmol/L以上のfenofibrate濃度で細胞毒性が認められた(図3)。この結果から、マウスBtg1を強制発現させたCHO-K1細胞に対するfenofibrate処置濃度は、溶媒対照群と比較して生細胞数80%程度で明らかな細胞毒性が認められる300 μmol/Lとすることとした。

5. マウスBtg1発現CHO-K1細胞に対するfenofibrateの作用

CHO-K1細胞にpcDNA3.1(+)-Btg1を遺伝子導入し、300 μmol/L fenofibrateを48時間処置後、細胞生存率を算出した。Mock-transfected controlとしてpcDNA3.1(+)を導入したCHO-K1細胞では、300 μmol/L fenofibrate処置により生細胞数が平均27%減少し、pcDNA3.1(+)-Btg1を遺伝子導入した細胞で

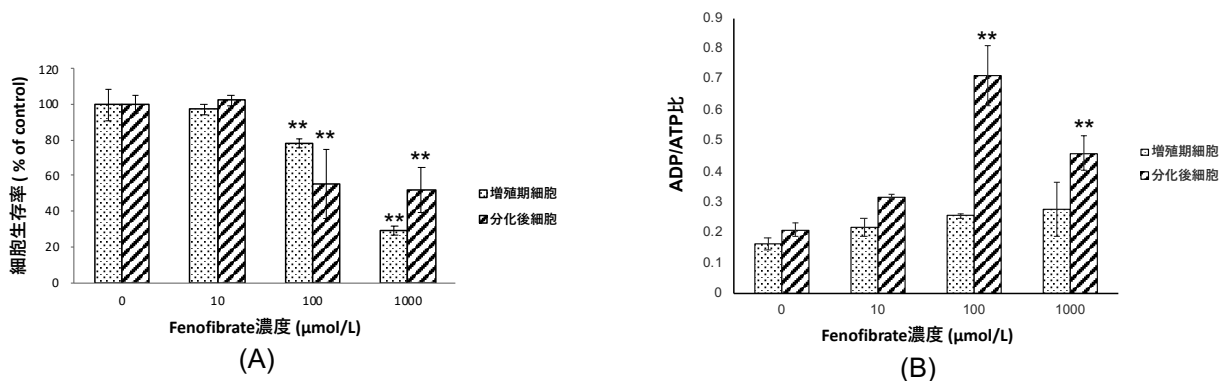


図1. 増殖期と分化後のC2C12細胞にfenofibrateを処置した際の細胞生存率およびADP/ATP比測定

増殖期および分化後のC2C12細胞を調製してfenofibrateを48時間処置し、クリスタルバイオレット法により生存率を測定し(A)、EnzyLight™ ADP/ATP Ratio Assay Kitを用いて細胞内ADPおよびATP量を測定してADP/ATP比を算出した(B)。

データは平均値±標準偏差で表した。統計解析は、Dunnettの多重比較検定を行った。

** 0 μmol/L fenofibrate群と比較して有意差有り (**p < 0.01)

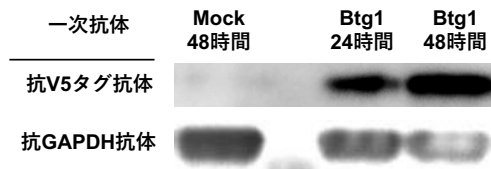


図2. CHO-K1細胞に対するマウスBtg1発現のウエスタンブロット法による解析

CHO-K1細胞にpcDNA3.1-V5/His(Mock)もしくはpcDNA3.1-Btg1-V5/Hisをリポフェクション法により遺伝子導入し、24時間もしくは48時間後に抗V5タグ抗体を用いたウエスタンブロット法により導入遺伝子産物の発現を解析した。ハウスキーピングタンパク質の検出には抗GAPDH抗体を用いた。

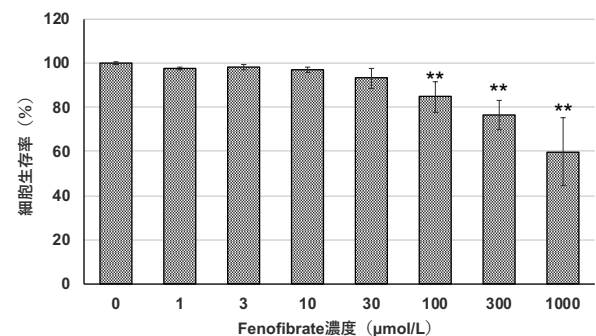


図3. CHO-K1細胞に対するfenofibrate処置の用量設定

CHO-K1細胞にfenofibrateを処置し、48時間後に生細胞数をクリスタルバイオレット法で測定した。データは平均値±標準偏差で表した。統計解析は、Dunnettの多重比較検定を行った。

** 0 μmol/L fenofibrate群と比較して有意差有り (**p < 0.01)

は、生細胞数が平均28%減少した。また、pcDNA3.1(+)-*Btg1*を遺伝子導入したCHO-K1細胞では、ベクターのみを導入した細胞と比較して、300 $\mu\text{mol/L}$ fenofibrate処置により生細胞数がさらに37%減少した(図4)。

IV 考察

増殖期と分化後のC2C12細胞にfenofibrateを48時間処置したところ、100 $\mu\text{mol/L}$ 以上のfenofibrate処置で増殖期および分化後共に細胞生存率が有意に低下した。また、分化後の細胞では、fenofibrateを100および1000 $\mu\text{mol/L}$ 処置した時に、ADP/ATP比の有意な増加が認められた。増殖期のC2C12細胞では、細胞毒性が認められた100 $\mu\text{mol/L}$ 以上のfenofibrate処置でもADP/ATP比が増加傾向にあるものの、有意な差とはならなかった。しかし、分化後のC2C12細胞では、100 $\mu\text{mol/L}$ 以上のfenofibrate処置でADP/ATP比の有意な増加が認められた。細胞内ATP量の増加とADP量の減少は、ADP/ATP比の低下につながり、細胞が増殖していることを意味し、逆に細胞内ATP量の減少とADP量の増加は、ADP/ATP比の増加につながり、細胞死が起きていることを意味している。また、細胞内ATP量の減少とADP量の増加は、アポトーシスよりもネクローシスの方が顕著であることから、ADP/ATP比の著しい増加は、ネクローシスが生じていると考えられている^{3,4)}。増殖期C2C12細胞

に100および1000 $\mu\text{mol/L}$ のfenofibrateを処置した際の生存率はそれぞれ78%および29%であるが、このときのADP/ATP比はどちらも0.25程度であったことと、分化後C2C12細胞に100および1000 $\mu\text{mol/L}$ のfenofibrateを処置した際の生存率はどちらも55%程度で、このときのADP/ATP比はそれぞれ0.7および0.45であったことから、増殖期ではADP/ATPの大きな増加を伴わない細胞死、つまりアポトーシスが起きていることが強く示唆された。しかし、分化後では、生存率の低下に伴うADP/ATP比の有意な増加が生じており、アポトーシス以外の細胞死が生じている可能性があると考えられた。このように、C2C12細胞にfenofibrateを処置した時の細胞死が増殖期ではアポトーシス、分化後ではネクローシス優位となる可能性が示唆され、増殖期と分化後で発現が異なる遺伝子もしくは遺伝子産物がfenofibrate誘発横紋筋融解症の責任遺伝子となり得ることが予想された。

細胞の増殖期と分化後で発現量が異なる遺伝子には、増殖期で発現するが分化後には発現が消失するものと、増殖期には発現がなく分化後に発現するものの二通りが考えられる。本研究では、増殖期と分化後で発現量が異なる遺伝子をcDNAサブトラクション法で探索することを試みた。増殖期特異的に発現する遺伝子については解析が終了し、分化後特異的に発現する遺伝子についてはまだ解析途中である。

増殖期特異的に発現する遺伝子として、cDNAサブトラクション法で得られた37個のクローンの中にはtubulin beta 5遺伝子、vimentin遺伝子、actin, gamma, cytoplasmic 1遺伝子といった細胞骨格関連の遺伝子も含まれていたが、CHO-K1細胞に発現させてもfenofibrate誘発細胞毒性には何ら影響しなかった(データは示されていない)。

C2C12細胞の増殖期特異的に発現する遺伝子として得られたマウス*Btg1*をCHO-K1細胞に強制発現させるにあたり、BLAST解析からマウス*Btg1*とハムスター*Btg1*の塩基配列が98.1%一致していることが判明した。したがって、CHO-K1細胞に遺伝子導入してマウス*Btg1*タンパク質の発現をウエスタンブロット法で確認する際には、V5/His融合タンパク質発現ベクターを用い、抗V5タグ抗体で検出した。ウエスタンブロット解析から、マウス*Btg1*-V5/His融合タンパク質の発現が確認できたため、fenofibrate細胞毒性に対するマウス*Btg1*発現の影響を解析する際には、発現ベクターコンストラクトとしてpcDNA3.1(+)-*Btg1*を用いた。

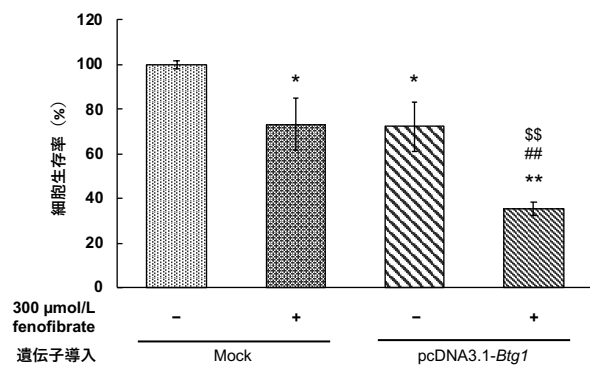


図4. マウス*Btg1*発現CHO-K1細胞に対するfenofibrateの作用
CHO-K1細胞にpcDNA3.1(+)(Mock transfected control)もしくはpcDNA3.1-*Btg1*を遺伝子導入し、300 $\mu\text{mol/L}$ のfenofibrateを処置して48時間後に生細胞数をクリスタルバイオレット法で測定した。データは平均値 \pm 標準偏差で表した。統計解析は、一元配置分散分析の後にBonferroniの多重比較検定を行った。

*, ** mock-fenofibrate(-)群と比較して有意差有り(* $p<0.05$, ** $p<0.01$)

mock-fenofibrate(+)群と比較して有意差有り(** $p<0.01$)

§§ pcDNA3.1-*Btg1*-fenofibrate(-)群と比較して有意差有り(§§ $p<0.01$)

CHO-K1細胞では、マウス *Btg1* を強制発現させることで、mock-transfected controlと比較して生細胞数が平均28% 減少した。*Btg1* はリンパ系悪性腫瘍で染色体転座の性質を持つ遺伝子としてクローニングされ、細胞増殖を負に調節するタンパク質の一つであり⁵⁾、Tリンパ球、線維芽細胞、上皮細胞および神経細胞などの様々な細胞における細胞増殖制御に関与することが知られている⁶⁾。さらに、がん抑制遺伝子と考えられていた*Btg1* が結合組織の分化に関わるということも報告されている⁷⁾。また*Btg1* タンパク質／タンパク質アルギニンメチルトランスフェラーゼ1複合体は、低酸素や飢餓などの生理的ストレスに対する反応の際に、アミノ酸代謝の促進や活性酸素の軽減に関わる遺伝子の転写を誘導する転写活性化因子4(ATF4)を正に制御し、ストレス環境下にある細胞では、*Btg1* の発現を抑制することによりストレスの抵抗性を高め、アポトーシスの回避を図っていることが示唆されている⁸⁾。本研究の結果と併せて考えると、*Btg1* が発現している増殖期のC2C12細胞でfenofibrate処置により誘導された細胞死がアポトーシス優位であったということと矛盾しないと考えられた。

CHO-K1細胞にマウス *Btg1* を発現させると生細胞数が28%減少し、マウス *Btg1* を発現させたCHO-K1細胞に300 $\mu\text{mol/L}$ のfenofibrateを処置すると、さらに生細胞数がさらに37%減少した。CHO-K1細胞に300 $\mu\text{mol/L}$ のfenofibrateを処置した際の生細胞数の減少は27%であった。本研究では、CHO-K1細胞にfenofibrateを処置したときの細胞死の様式については調査していないが、*Btg1* を発現している増殖期のC2C12細胞と同様に、fenofibrate処置CHO-K1細胞では内因性の*Btg1* に加えて、マウス *Btg1* の強制発現によってアポトーシスが誘導されていることが考えられる。筋組織においては、増殖期にある細胞はほとんど存在しないであろうが、*Btg1* の発現が低下もしくは消失した筋細胞では、fenofibrate処置によりアポトーシスに誘導されることなくネクローシスが生じることが考えられる。ネクローシスによる細胞死は、炎症性物質を含む細胞成分が細胞外へ急速に流出し、周囲の細胞に免疫反応を誘発して広範な細胞死を促進する⁹⁾ことが知られており、*Btg1* の発現量がfenofibrate暴露により生じる横紋筋融解の発症に影響する可能性も考えられる。

本邦では、フィブラート系薬とHMG-CoA還元酵素阻害薬の併用は原則禁忌となっていないが、両者の併用は横紋筋融解の危険を増加させる^{1, 10)}とされてい

る。HMG-CoA還元酵素阻害薬の筋毒性の研究は広く行われており、ミトコンドリアの機能破壊¹¹⁾と筋萎縮誘導タンパク質の正の調節¹²⁾が考えられている。ミトコンドリア機能に対するHMG-CoA還元酵素阻害薬の作用には、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を阻害する直接的な影響¹³⁾およびユビキノンレベルを低下させる間接的な影響¹⁴⁾があることが示唆されている。近年では、セリンスレオニンキナーゼAktのリン酸化がHMG-CoA還元酵素阻害薬の筋毒性と関連がある¹⁵⁾という報告や、simvastatinはC2C12細胞の筋管よりも筋芽細胞により強く細胞内ATP量の低下をもたらし、筋芽細胞の増殖と筋管形成を阻害した¹⁶⁾という報告もあり、筋細胞の分化度の違いが薬物誘発性横紋筋融解症の発症と関連するのではないかという我々の仮説を支持するものとする。また、ラットL6細胞にHMG-CoA還元酵素阻害薬とbezafibrateを併用処置すると、筋芽細胞もしくは筋管の両方でゲラニルゲラニルニリン酸の生合成を阻害し細胞死を誘導するが、筋管ではRho/Akt経路の活性化を通して細胞死を誘導することも報告されている¹⁰⁾。本研究では、*Btg1* とRho/Akt経路との関係は調査していないが、抗増殖性遺伝子ファミリーに属する*Btg1* は、Rho/Akt経路活性化によるアポトーシス誘導とは独立して、HMG-CoA還元酵素阻害薬とbezafibrateの併用処置により、分化後C2C12細胞で*Btg1* の発現が誘導され、細胞死を生じる可能性も考えられた。

本研究結果から、*Btg1* を発現する増殖期のマウス筋芽細胞由来C2C12細胞では、fenofibrate処置によりアポトーシスによる細胞死が誘導され、分化後には*Btg1* の発現低下もしくは消失によりネクローシスによる細胞死が生じる可能性が示された。また、CHO-K1細胞において、内因性の*Btg1* に加えてマウス *Btg1* の強制発現がfenofibrate誘発細胞毒性を増強することが示されたことから、*Btg1* はfenofibrateに誘発される細胞死をネクローシスではなくアポトーシスに誘導することにより、広範な細胞死が生じないように機能していることが考えられ、薬物誘発性横紋筋融解症に関与する可能性も示唆された。

V 謝辞

本研究の遂行にあたり、菅(関)まどか、竹内由香梨、濱本真輝、富川弘基、前村遥、杉本結佳の諸氏には多大なご協力を頂きました。ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) 重篤副作用疾患別対応マニュアル. 横紋筋融解症. 厚生労働省. <https://www.mhlw.go.jp/topics/2006/11/dl/tp1122-1c09.pdf> (参照 2023-07-07).
- 2) Ogura Takeharu; Tanaka Yoshiyuki; Nakata Tetsushi et al. Simvastatin reduces insulin-like growth factor-1 signaling in differentiating C2C12 mouse myoblast cells in an HMG-CoA reductase inhibition-independent manner. *J Toxicol Sci.* 2007, 32(1), p.57-67.
- 3) Bradbury D.A.; Simmons T.D.; Slater K.J. et al. Measurement of the ADP:ATP ratio in human leukaemic cell lines can be used as an indicator of cell viability, necrosis and apoptosis. *J Immunol Methods.* 2000, 240(1-2), p.79-92.
- 4) Zamaraeva M.V.; Sabirov R.Z.; Maeno E. et al. Cells die with increased cytosolic ATP during apoptosis: a bioluminescence study with intracellular luciferase. *Cell Death Differ.* 2005, 12(11), p. 1390-7.
- 5) Jean-Pierre Rouault; Ruth Rimokh; Chantal Tessa et al. BTG1, a member of a new family of antiproliferative genes. *EMBO J.* 1992, 11(4), p.1663-70
- 6) Matsuda Satoru; Jean-Pierre Rouault; Jean-Pierre Magaud et al. In search of a function for the TIS21/PC3/BTG1/TOB family. *FEBS Lett.* 2001, 497(2-3), p. 67-72.
- 7) Carlos I. Lorda-Diez; Juan A. Montero; Juan A. Garcia-Porrero et al. The tumor suppressor BTG1 is expressed in the developing digits and regulates skeletogenic differentiation of limb mesodermal progenitors in high density cultures. *Cell Tissue Res.*, 2016, 364 (2) , p. 299-308.
- 8) Yuniati Laurensia; van der Meer Laurens T.; Tijchon Esther et al. Tumor suppressor BTG1 promotes PRMT1-mediated ATF4 function in response to cellular stress. *Oncotarget*, 2016, 7(3), p. 3128-43.
- 9) Proskuryakov S.Y.; Konoplyannikov A.G.; Gabai V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res.* 2003, 283(1), p.1-16.
- 10) Tsubaki M.; Takeda T.; Matsuda T. et al. Combination treatment with statins and bezafibrate induces myotoxicity via inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate biosynthesis and Rho activation in L6 myoblasts and myotube cells. *J Physiol. Pharmacol.*, 2022, 73 (1) , doi:10.26402/jpp.2022.1.14.
- 11) Kaufmann P.; Török M.; Zahno A. et al. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci.* 2006, 63(19-20), p.2415-25.
- 12) Cao Peirang; Hanai Jun-ichi; Tanksale Preeti et al. Statin-induced muscle damage and atrogen-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect. *FASEB J.* 2009, 23 (9), p.2844-54.
- 13) Folkers Karl; Langsjoen Per; Willis Richard et al. Lovastatin decreases coenzyme Q levels in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990, 87(22), p.8931-4.
- 14) Nadanaciva Sashi; Dykens James A.; Bernal Autumn et al. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007, 223(3), p.277-87.
- 15) Mullen Peter J.; Zahno Anja; Lindinger Peter et al. Susceptibility to simvastatin-induced toxicity is partly determined by mitochondrial respiration and phosphorylation state of Akt. *Biochim Biophys Acta.* 2011, 1813(12), p.2079-87.
- 16) Sanvee Gerda M.; Bouitbir Jamal; Krähenbühl Stephan C2C12 myoblasts are more sensitive to the toxic effects of simvastatin than myotubes and show impaired proliferation and myotube formation. *Biochem Pharmacol.* 2021, 190:114649, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.04.010.