

主論文の要旨

β -Hydroxy- β -methylbutyrate facilitates PI3K/Akt-dependent mammalian target of rapamycin and FoxO1/3a phosphorylations and alleviates tumor necrosis factor α /interferon γ -induced MuRF-1 expression in C2C12 cells

β -Hydroxy- β -methylbutyrateはC2C12細胞において、PI3K/Akt依存的にmammalian target of rapamycin とFoxO1/3a のリン酸化を促進し、tumor necrosis factor α /interferon γ により誘導されるMuRF-1の発現を軽減させる

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻

発育・加齢医学講座 老年科学分野

(指導：葛谷 雅文 教授)

木村 薫

【緒言】

超高齢社会を迎えた我が国において、加齢に伴う疾患は医学的・社会的な重要性を増している。特に加齢に伴う筋力や筋肉量の極度の低下はサルコペニアと称され、ふらつきや転倒、さらには虚弱にも関連し、患者の生活の質 (QOL) の低下や、要支援・要介護状態への移行を招きかねない。従って、サルコペニアの原因を究明し、予防・治療法を確立することが重要となる。

サルコペニアの発病と進行に關与する要因としてはホルモンや炎症性サイトカインなどが提唱されているが、副作用の問題などからこれらを操作することは難しい。そこで、筋肉の維持に重要なタンパク質の合成促進、分解抑制作用があるとしてアミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸が注目されている。分岐鎖アミノ酸のロイシンの代謝産物である β -Hydroxy- β -methylbutyrate (HMB) もタンパク質の合成促進、分解の抑制作用があることが知られているが、その機序については未だ不明な点も多い。本研究では HMB が筋肉の合成・分解に与える影響を PI3K/Akt 経路に着目して検討を行なった。

【方法】

細胞培養

本研究では、C2C12 マウス筋芽細胞を用い、10%FBS を含む DMEM 中で培養し、コンフルエントになったところで 2%ウマ血清を含む DMEM に交換して分化を誘導した。分化誘導から 4~5 日後、筋管が形成されたところで無血清培地に交換し 12 時間処理したところで 50 μ M HMB を添加し、検討を行なった。PI3K 阻害剤である LY294002 (25 μ mol/l) は HMB 刺激の 30 分前に添加した。また TNF- α (20 ng/ml) および IFN- γ (400 U/ml) は HMB 刺激の 30 分後に添加した。

遺伝子発現の評価

HMB 添加 4 時間後にサンプリングを行ない、細胞溶解液から mRNA を抽出し、RT-PCR 法を用いてターゲット遺伝子発現を定量した。内在性コントロールとして 18s を用いて補正を行った。

タンパク発現の評価

HMB 添加後、図に示した時間でサンプリングを行ない、細胞溶解液からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを実施した。

統計分析

データは平均 \pm SD として表した。2 群間の比較は One-way ANOVA (Tukey post hoc tests) 法で統計解析を行った。P 値<0.05 を有意差ありと判断した。

【結果】

1. HMB での刺激 10 分後より、Akt のリン酸化が亢進し、30 分後にピークに達した後、60 分後からは低下した。また Akt の上流に位置する PI3K 阻害剤 LY294002 により、この Akt のリン酸化は完全に抑制された (図 1)。
2. HMB での刺激より 30 分後、mTOR のリン酸化の亢進が認められたが、PI3K 阻害

剤 LY294002 によりそのリン酸化は抑制された。(図 2)。

3. HMB での刺激 30 分後、Foxo1、Foxo3a ともにリン酸化の有意な上昇が認められた。また、PI3K の阻害により、それらのリン酸化は抑制された (図 3)。
4. ユビキチンリガーゼである atrogen-1 と MuRF の mRNA の発現は、両者ともに HMB の単独添加による有意な変化は認められなかった。しかし PI3K 阻害剤 LY294002 により atrogen-1、MuRF ともに発現が有意に上昇し、この上昇は HMB を添加しても変化がなかった (図 4)。
5. HMB 添加 12 時間後の atrogen-1 および MuRF タンパクは、両者ともに HMB の単独添加による発現の有意な変化は認められなかった。しかし、PI3K 阻害剤 LY294002 により atrogen-1、MuRF ともに発現が有意に上昇し、この上昇は HMB を添加しても変わらず上昇したままで、有意差は認められなかった (図 5)。
6. TNF- α /IFN- γ の刺激により、atrogen-1、MuRF ともに発現が有意に増加した。さらに HMB を添加することにより、atrogen-1 は有意な発現上昇の抑制は認めなかったが、MuRF では TNF- α /IFN- γ を添加していないものと同じレベルまで発現の増加が抑制された。(図 6)

【考察】

HMB が細胞内に取り込まれると、PI3K を介して Akt を活性化し、さらに一般的にタンパク合成系に関わる mTOR を活性化することが確認された。また、活性化した Akt がタンパク分解に関わる転写因子 Foxo をリン酸化し、不活性型にすることが確認された。しかし代表的なユビキチンリガーゼである atrogen-1 と MuRF の発現は HMB による明らかな抑制効果は認められなかった。一方、炎症性サイトカイン TNF- α /IFN- γ により atrogen-1 と MuRF ともに発現が有意に上昇したが、HMB の添加により atrogen-1 では発現の抑制は認められなかったものの、MuRF では TNF- α /IFN- γ を添加しないものと同じレベルにまで発現が抑制された。これらの結果より、HMB は PI3K/Akt 依存性 mTOR リン酸化経路を介してタンパク合成の亢進に関与すること、および TNF- α /IFN- γ により発現が誘導された MuRF の発現を抑制することにより、タンパク分解の抑制に関与することが示唆された。

【結語】

本研究より、HMB は筋肉細胞の維持に重要なタンパク質の合成促進、分解抑制に関与していることがわかり、今後サルコペニアの予防、改善への有用性が示唆された。