

報告番号	※甲	第	号
------	----	---	---

主論文の要旨

論文題目 Research on the mechanism that heat preconditioning suppress glucocorticoid-induced muscle atrophy
(温熱刺激によるグルココルチコイド誘導性筋萎縮の進行抑制作用機序の解明に関する実験的研究)

氏名 土田 和可子

論文内容の要旨

【緒言】

グルココルチコイド (GC) 療法は抗炎症, 抗免疫, 抗アレルギー作用を期待して多くの疾患に適用されるが, 多様な副作用が問題となる。中でも, 副作用の1つである GC 誘導性筋萎縮の予防対策は喫緊の医学的課題である。筋萎縮は, GC 投与の他にさまざまな疾病 (癌, 敗血症, 糖尿病) や絶食, 除神経などにおいても認められる。すべての筋萎縮に共通した現象は, 筋タンパク質の合成と分解のアンバランスによる筋タンパク質量の減少が, 筋線維の萎縮を引き起こしていることである。近年の先行研究を概観すると, プレコンディショニングとして骨格筋細胞に温熱刺激を行うことで, 非荷重や不動化に伴う廃用性筋萎縮や GC 誘導性筋萎縮の進行を抑制できる可能性が示唆されている。例えば, Morimoto ら (2015) は, 2 mg/kg の GC を傍脊柱に皮下投与 (6 回/週) する過程で, 42°C に設定した恒温層内に後肢を 60 分間浸漬する方法で温熱刺激 (1 回/3 日) を行ったラットと, GC 投与のみを行ったラットの長趾伸筋線維直径を比較したところ, 前者の方が減少が抑制されたと報告している。そして, この効果の機序としては, 温熱刺激によって誘導される分子量 70kDa の熱ショックタンパク質 (Hsp) ファミリーに属する Hsp72 が持つ, 分子シャペロンとしてタンパク質を保護するだけでなく, そのタンパク質保護機能を介して情報伝達分子を修飾し, その下流の転写因子の活性を制御する作用によると考えられている (Senf SM, et al., 2013)。実際, 遺伝子導入によって Hsp72 を過剰発現させたマウス骨格筋由来の C2C12 筋管細胞では, GC 投与によって生じるタンパク質キナーゼである Akt の脱リン酸化と, それに伴うフォークヘッド型転写因子 (FoxO) の脱リン酸化を介したユビキチン-プロテアソーム系の活性化による筋タンパク質の分解亢進が抑制され, 結果的に GC 誘導性筋萎縮の進行が抑制されたとの報告がなされている (Kukreti H, et al., 2013)。しかしながら, 温熱刺激による GC 誘導性筋萎縮の進行抑制作用の詳細な機序は未だ解明されていない。

本研究の目的は, GC 投与により萎縮が生じる C2C12 筋管細胞に対して温熱刺激を行い, その GC 誘導性筋萎縮の進行抑制作用と, 筋タンパク質合成に関わる情報伝達経路および筋タンパク質分解に関わる情報伝達経路との関連について明らかにすることである。

【材料および方法】

実験には C2C12 筋管細胞を用い, 通常培養をした対照群, 合成 GC であるデキサメタゾン

(Dex, 10 μ M) を培地に投与することで萎縮を誘導した Dex 群, 温熱刺激を行い, その 6 時間後に Dex を培地に投与した Heat+Dex 群の 3 群に分けた。温熱刺激は, Goto ら (2003) の報告を参考に, 41°C に設定した恒温層内に細胞培養皿を 60 分間留置する方法で行った。本方法で温熱刺激を行うと, C2C12 筋管細胞内の Hsp72 タンパク質発現量が温熱刺激終了から 4~6 時間後で有意に増加することを予備実験で確認している。そこで, 本実験では Dex 投与の 6 時間前に温熱刺激を行った。筋萎縮の評価指標は, 細胞直径と速筋型ミオシン重鎖 (MyHC-f) タンパク質発現量とし, Dex 投与から 24 時間後に画像解析ソフトウェアまたは western blot 法を用いて測定した。筋タンパク質合成に関わる情報伝達経路 (REDD1 mRNA 発現量, Akt リン酸化量, p70S6K1 リン酸化量, GSK3 β リン酸化量) は, Dex 投与から 3 時間後に western blot 法または定量 RT-PCR 法を用いて測定した。筋タンパク質分解に関わる情報伝達経路 (KLF15 mRNA 発現量, Akt リン酸化量, FoxO3a リン酸化量, FoxO1 リン酸化量, MuRF1 mRNA 発現量) は, Dex 投与から 6 時間後に western blot 法または定量 RT-PCR 法を用いて測定した。また, GC 誘導性筋萎縮に対する温熱刺激の進行抑制作用機序に PI3K/Akt 情報伝達経路が関与しているかどうかを検討するために, PI3K 阻害剤である wortmannin (W, 100 nM) を培地に投与した 2 時間後に温熱刺激を行い, Dex を投与した W+Heat+Dex 群を設けた。そして, Dex 投与から 3 時間後に筋タンパク質合成に関わる情報伝達経路 (Akt リン酸化量, p70S6K1 リン酸化量, GSK3 β リン酸化量) の測定を, Dex 投与から 24 時間後に細胞直径の測定を行った。

【結果・考察】

Dex 群の細胞直径は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示した。同様に, Dex 群の MyHC-f タンパク質発現量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示した。したがって, プレコンディショニングとして温熱刺激を行うと, GC 投与に伴う C2C12 筋管細胞の萎縮進行が抑制されることを確認できた。Dex 群の REDD1 mRNA 発現量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に高値を示し, Dex 群の Akt リン酸化量, p70S6K1 リン酸化量, GSK3 β リン酸化量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示した。また, Dex 群の KLF15 mRNA 発現量, MuRF1 mRNA 発現量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に高値を示し, Dex 群の Akt リン酸化量, FoxO3a リン酸化量, FoxO1 リン酸化量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示した。したがって, 温熱刺激は, GC 投与によって生じる筋タンパク質合成に関わる情報伝達経路の不活性化および筋タンパク質分解に関わる情報伝達経路の活性化を抑制することが示唆され, この背景には温熱刺激により誘導された Hsp72 の発現増加が関与することが推察された。W+Heat+Dex 群の Akt リン酸化量, p70S6K1 リン酸化量, GSK3 β リン酸化量は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示した。また, W+Heat+Dex 群の細胞直径は, 対照群および Heat+Dex 群と比較して有意に低値を示したが, Dex 群と比較して有意に高値を示した。したがって, GC 誘導性筋萎縮に対する温熱刺激の進行抑制作用機序の少なくとも一部は, PI3K/Akt 情報伝達経路を介することが示唆された。

【結語】

GC 投与前に Hsp72 の発現を誘導する温熱刺激を行うことは, GC 投与によって生じる筋タンパク質合成に関わる情報伝達経路の不活性化および筋タンパク質分解に関わる情報伝達経路の活性化を抑制することにつながり, 結果的に GC 誘導性筋萎縮の進行を抑制する。