

報告番号	甲栄 第 228 号
論 文 内 容 要 旨	
氏 名	越智 ありさ
題 目	<i>N</i> -Myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle (<i>N</i> 末端へミリスティル化を施したCbl-bユビキチン化活性阻害剤は、グルココルチコイド誘導性の筋萎縮を抑制する。)
<p>寝たきりや無重力環境など、筋肉に機械的な負荷が掛からない状態のことをUnloadingと呼ぶ。Unloading状態が長期に及ぶと、筋肉は萎縮し、その機能が大きく失われる。これを、廃用性筋萎縮と呼ぶ。超高齢化社会を迎えた我が国において、廃用性筋萎縮の予防・治療法の開発は重要な問題であるが、未だ実用可能なものはない。本研究では、筋萎縮予防効果を持つペプチドに修飾を付加し、その効果を増強することで、治療法の実用化を目指した。</p> <p>これまでに我々は、Unloading状況下で発現が増加するユビキチンリガーゼCbl-bが、IRS-1をユビキチン化し、筋肉の肥大に重要な役割を担うIGF-1シグナルを負に制御する、筋萎縮の原因の一つであることを見出した。さらに、このCbl-bとIRS-1の結合を阻害し、筋萎縮を抑制するペプチドCblin (Cbl-b inhibitor)を開発した。しかしながら、Cblinの効果を坐骨神経切除マウスへの投与で得るには、一日6 mgもの大量投与を必要とした。我々は、その原因としてCblinがペプチドであるため生体内では、アミノペプチダーゼによる分解を受け、効果が減弱すると考え、CblinのN端に修飾を施すことを考えた。</p> <p>Cblinを修飾するにあたり、我々は、生体内で起こる翻訳語修飾であるミリスティル化に着目した。ミリスティル化は、脂質修飾であり、膜アンカー機能を持つことが報告されている。このミリスティル化をCblinのN端に施したミリスティル化Cblinの効果を、グルココルチコイド誘導性の筋萎縮モデルにて検討を行った。</p> <p>初めに、ミリスティル化がCblinの効果を増強するかを検討するため、HEK293細胞にユビキチン、Cbl-b、IRS-1を強発現させ、各ペプチドのIRS-1ユビキチン化を検出した。その結果、ミリスティル化Cblinは、Cblinよりも低濃度でIRS-1のユビキチン化を抑制した。したがって、ミリスティル化はCblinの効果を増強することが示された。</p> <p>次に、筋管萎縮モデルである筋管細胞へのデキサメタゾン添加におけるCblinおよびミリスティル化Cblinの萎縮抑制効果を検討した。マウス筋芽細胞C2C12を分化させた筋管細胞に、デキサメタゾンを添加する筋管径が減少する。ここにCblinを同時に添加すると、筋管径の減少が抑制された。よって、Cblinはグルココルチコイド誘導性の筋萎縮の抑制にも有効であることが示された。また、デキサメタゾン誘導性の筋管萎縮に対し、ミリスティル化Cblinは、Cblinよりも低濃度で筋管径の減少、IRS-1のユビキチン化および筋萎縮関連遺伝子の発現を抑制した。</p> <p>我々は、ミリスティル化のCblinの効果増強作用が、膜アンカー機能に由来するものではないかと考え、各ペプチドの細胞内取り込み量を検討した。HEK293細胞に各ペプチドを添加し、細胞内分画に取り込まれたペプチド量をHPLCにて解析した。その結果、ミリスティル化はCblinの細胞内取り込み量を顕著に増加させることが示された。</p> <p>最後に、我々は、グルココルチコイド誘導性の筋萎縮に対するCblinおよびミリスティル化Cblinの効果を<i>in vivo</i>にて検討した。マウスの腹腔へデキサメタゾンを継続的に投与すると、全身の骨格筋の萎縮が引き起こされる。このマウスの腓腹筋に、Cblinおよびミリスティル化Cblinを投与すると、筋湿重量および筋横断面積の減少が抑制された。また、このときミリスティル化Cblinは、Cblinよりも低濃度でその効果を示した。筋管細胞の系と同様に、マウスへのデキサメタゾン投与は、IRS-1の分解を引き起こし筋萎縮関連遺伝子の発現を増加させたが、ミリスティル化Cblinは、</p>	

これらを顕著に抑制した。

以上のことより、Cblinは、Unloadingのみならずグルココルチコイド誘導性の筋萎縮を抑制すること、またミリストイル化はCblinの細胞内取り込み量を増加させることで、Cblinの効果を増強させることを示す。

論文審査の結果の要旨	
報告番号	甲栄第 228 号 氏名 越智 ありさ
審査委員	主査 宮本 賢一 教授 副査 阪上 浩 教授 副査 竹谷 豊 教授
題目	<i>N</i> -Myristoylated ubiquitin ligase Cbl-b inhibitor prevents on glucocorticoid-induced atrophy in mouse skeletal muscle (N末端へミリストイル化を施したCbl-bユビキチン化活性阻害剤は、グルココルチコイド誘導性の筋萎縮を抑制する。)
著者	Arisa Ochi, Tomoki Abe, Reiko Nakao, Yoriko Yamamoto, Kanako Kitahata, Marina Takagi, Katsuya Hirasaka, Ayako Ohno, Shigetada Teshima-Kondo, Gwag Taesik, Inho Choi, Tomoyuki Kawamura, Hisao Nemoto, Rie Mukai, Junji Terao, Takeshi Nikawa 平成27年2月16日 Archives of Biochemistry and Biophysicsに受理済
要旨	<p>寝たきりや無重力環境など、筋肉に機械的な負荷が掛からない状態のことをUnloadingと呼ぶ。Unloading状態が長期に及ぶと、筋肉は萎縮しその機能が大きく失われる。これを廃用性筋萎縮と呼ぶ。超高齢化社会を迎えた我が国において、筋萎縮の予防・治療法の開発は重要な問題であるが、未だ実用化されているものは少ない。そこで、申請者は筋萎縮予防効果を持つペプチドに修飾を付加し、その効果を増強することで、新規の治療法の開発を目指した。</p> <p>得られた結果は以下のとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Casitas B lineage lymphoma-b (Cbl-b)によるInsulin receptor substrate 1 (IRS-1)のユビキチン化を阻害するペプチドCblin (Cbl-b inhibitor) をミリストイル化することにより、その効果作用の増強を試みた。無細胞系ユビキチン化アッセイにおいて、修飾によるIRS-1ユビキチン化阻害効果の増強は見られなかったが、培養細胞系においてミリストイル化はCblinの効果を増強させた。その時のミリストイル化CblinのIC₅₀は30 μMでありCblinのIC₅₀が120 μMであるのと比較し低濃度でIRS-1のユビキチン化を抑制した。 2) マウス筋芽細胞C2C12において合成グルココルチコイド(デキサメタゾン)は、Cbl-bの発現をmRNA及びタンパク質レベルで増加させた。ミリストイル化Cblinは、Cblinよりも低濃度でデキサ

メタゾンによるIRS-1のユビキチン化と筋管萎縮を抑制した。

- 3) Cblinのミリストイル化による阻害効果増強の機序を解明するため、ミリストイル化Cblinの細胞内取り込み量を検討した。その結果、ミリストイル化CblinはCblinと比較し約10倍量が細胞内に取り込まれていた。よって、ミリストイル化は、Cblinの細胞内取り込み量を増加させてその阻害効果を増強していることが示唆された。
- 4) グルココルチコイド誘導性筋萎縮に対する *in vivo*でのCblinの抑制効果を検討するため、マウス腹腔内への10日間のデキサメタゾン投与と同時に、腓腹筋へのCblinまたはミリストイル化Cblinの筋注投与を行った。デキサメタゾンの投与により腓腹筋内のCbl-bの発現増加とIRS-1の分解が起こり、腓腹筋の筋湿重量の低下と筋繊維横断面積の減少が起こった。Cblinとミリストイル化Cblinの投与はともに腓腹筋の萎縮を抑制したが、ミリストイル化CblinはCblinよりも低濃度で効果を示した。

以上の結果より、Cblinは、Unloadingによる筋萎縮だけでなくグルココルチコイド誘導性筋萎縮においても有効であった。すなわち、グルココルチコイド誘導性筋萎縮もCbl-bによるIRS-1のユビキチン化を阻害することにより筋萎縮抑制作用を示した。さらに、Cblinへのミリストイル化はCblinの阻害効果を増強させ低濃度で筋萎縮を抑制できることが示唆された。

本研究は、筋萎縮に対する新たな栄養学的治療法の開発に貢献するもので博士(栄養学)の学位授与に値すると判定した。