

論 文 内 容 要 旨

題 目

Flavones inhibit LPS-induced atrogen-1/MAFbx expression in mouse C2C12 skeletal myotubes

(C2C12筋管細胞においてフラボンはLPS誘導性atrogen-1/MAFbxの発現を抑制する)

著 者

塩田 智子

内容要旨

背景と目的

敗血症などの急性炎症病態においては、咀嚼筋を含む骨格筋における筋タンパク質分解が亢進し、筋萎縮を発症することが知られている。その分子機構として、筋萎縮関連遺伝子の1つであるatrogen-1/MAFbx (muscle atrophy F-box)の発現誘導が挙げられる。すなわち血中に増大したlipopolysaccharide (LPS)が、toll like receptor-4 (TLR4)を介してatrogen-1/MAFbxの発現を誘導し、筋タンパク質分解が亢進する。一方、フラボノイドは抗炎症、抗酸化作用を有する有機化合物で、中には骨格筋における筋萎縮関連遺伝子発現を抑制するものも報告されている。そこで、本研究では急性炎症におけるatrogen-1/MAFbx発現誘導を抑制しうるフラボノイドの探索とその抑制機構の解明を目的とした。

材料と方法

マウス由来筋芽細胞株C2C12を10% FBS添加DMEM中で95~100%コンフルエントになるまで培養した。その後、2% Horse Serum添加DMEMにて3日間培養し、筋管細胞へと分化させた。続いて筋管細胞に対して、DMSO(dimethyl sulfoxide)に溶解させた9種類のフラボノイドを培地に添加し、筋管細胞に1時間前処理を行った後、PBSに溶解させた100 ng/ml LPS (E. coli O111:B4)にて2時間処理し、mRNAを抽出した。Atrogen-1/MAFbxとGAPDH (内部標準)のmRNA発現量をreal-time RT-PCRにて解析し、9種類のフラボノイドの中で、LPS誘導性atrogen-1/MAFbx発現に対する抑制効果の最も強いフラボノイドを特定し、以下の筋管径測定および抑制機構の検討を行った。

筋管径測定については、分化させた筋管細胞を100 ng/ml LPSおよび25 μ Mの同定したフラボノイドにて48時間処理し、計測を行った。

さらに、シグナル伝達の解明を目的として、筋管細胞を同定したフラボノイド25 μ Mにて1時間前処理し、100 ng/ml LPSにて30分間処理したうえで、JNKのリン酸化をウェスタンブロッティングにより検討した。さらに、筋管細胞を25 μ M JNK inhibitorにて1時間処理した後、2時間100 ng/ml LPS 刺激を加えたうえで、atrogen-1/MAFbx発現抑制効果に関して、real-time RT-PCRによる解析を実施した。また、ルシフェラーゼアッセイにて、C2

C12細胞におけるフラボノイドによる転写活性への影響を検討した。統計学的解析については、Scheffe's検定により、各群間の有意差を検討した。

結果：

9種類のフラボノイドのうち、アピゲニン、ルテオリン、ケンフェロール、ダイゼイン、ゲニステインの5つのフラボノイドによる前処理をした際に、筋管細胞におけるLPS誘導性atrogin-1/MAFbx発現が抑制された。なかでもアピゲニンあるいはルテオリン添加時に有意な抑制効果を示した。そこで、アピゲニンとルテオリンをLPS誘導性atrogin-1/MAFbx発現抑制機能を有するフラボノイドに同定した。

LPS刺激1時間前にアピゲニンあるいはルテオリンにて前処理を行うと、その濃度依存的にatrogin-1/MAFbx発現誘導は有意に抑制された。アピゲニンとルテオリンはフラボンに分類され、その共通骨格である5,7-ジヒドロキシクロモンをフラボノイドと同様の条件にて処理したところ、LPS誘導性atrogin-1/MAFbx発現抑制効果を認めなかった。さらに、フラボンによる筋萎縮関連遺伝子抑制機構について検索した結果、JNKのリン酸化の抑制を認めた。

結論：

本研究により、急性炎症病態における筋萎縮関連遺伝子の発現誘導を抑制するフラボノイドとしてアピゲニンとルテオリンを同定した。この2種類のアピゲニンとルテオリンはフラボンに分類され、その化学構造的に共通骨格である5,7-ジヒドロキシクロモンでは効果を認めなかったことから、共通骨格以外のB環の側鎖において抑制効果を示す可能性が示唆された。またその抑制機構については、JNKのリン酸化が関与している可能性が示唆された。今後、これらフラボンの経口投与により筋萎縮の予防・治療効果が確認されれば、薬剤のような副作用の懸念が少なく、日常的食事において長期的な摂取が可能となり、新たな食品成分による筋萎縮への治療法や予防法の確立が期待される。