

論文内容要旨

報告番号	甲 栄 第 255 号	氏名	内田 貴之
題 目	Reactive oxygen species up-regulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells (筋萎縮関連ユビキチンリガーゼCbl-bの発現調節における酸化ストレスの重要性)		
<p>要旨</p> <p>筋肉に機械的負荷のかからない unloading 状態による筋萎縮の進展には酸化ストレスが関係している。我々は、上昇した筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) が筋細胞の insulin receptor substrate 1 (IRS-1) をユビキチン化しその分解を亢進することが筋萎縮の原因の一つであることを報告した。しかしながら、unloading 状態による筋萎縮において、unloading による酸化ストレスがどのようにユビキチンリガーゼの発現に関与するかについては不明なままであった。本研究で、筋細胞において(模擬)微小重力環境により誘導される酸化ストレスが Cbl-b を発現するシグナル・トランスダクションについて解析した。</p> <p>まず、L6 筋管細胞を実際の宇宙空間に打ち上げ、国際宇宙ステーション・日本実験棟「きぼう」内で 10 日間培養した。その L6 筋管細胞を地上に回収し、筋管径測定したところ、1G コントロール群に比べ、微小重力群の筋管径の有意な低下が見られた。地上の模擬微小重力モデルである 3D-Clinorotation に供した L6 筋管細胞でも同様の結果を得た。宇宙空間で培養した細胞では酸化型グルタチオンの増加が見られたことや、模擬微小重力環境下で培養した細胞では O_2^- (スーパーオキシドアニオン) の増大が見られたことから、unloading 状態では筋細胞に酸化ストレスが蓄積することを確認した。さらに、プロモーターアッセイおよびゲルシフトアッセイにより、Cbl-b のプロモーター領域-60bp から-110bp に酸化ストレス応答性領域があることと、Cbl-b の発現を転写因子 early growth response 1/2 (Egr1/2) が制御していることを明らかにした。実際に、3D-Clinorotation 上で培養した、あるいは H_2O_2 を添加した L6 筋管細胞では Egr1/2 と Cbl-b の上昇が見られ、Cbl-b の発現上昇は Egr の発現上昇に続いて起こることも確認した。一方、Egr の発現を誘導する因子として、我々は mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路に着目した。L6 筋管細胞の MAPK シグナル経路中で ERK 経路のみが、3D-Clinorotation 開始 10 分後という非常に早い時期に活性化された。さらに、Egr1/2 siRNA と ERK1/2 リン酸化阻害剤は、unloading 誘導性の Cbl-b と Egr1/2 の発現上昇をそれぞれ抑制した。興味深いことに、N-acetylcysteine (NAC) や TEMPOL のような抗酸化剤の添加は、以上の unloading 誘導性の ERK 活性化と Cbl-b 発現を抑制した。</p> <p>これらの結果より、無重力環境における筋細胞では酸化ストレスが蓄積し、その酸化ストレスが ERK-Egr 経路を介しユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現を制御するという筋萎縮シグナルを明らかにすることができた。</p>			

報告番号	甲 栄 第 255 号	氏名	内田 貴之
審査委員	主査 河合 慶親 副査 宮本 賢一 副査 竹谷 豊		
題目	Reactive oxygen species up-regulate expression of muscle atrophy-associated ubiquitin ligase Cbl-b in rat L6 skeletal muscle cells (筋萎縮関連ユビキチンリガーゼCbl-bの発現調節における酸化ストレスの重要性)		
著者	<u>Takayuki Uchida</u> , Yoshihiro Sakashita, Kanako Kitahata, Yui Yamashita, Chisato Tomida, Yuki Kimori, Akio Komatsu, Katsuya Hirasaka, Ayako Ohno, Reiko Nakao, Atsushi Higashitani, Akira Higashibata, Noriaki Ishioka, Toru Shimazu, Takeshi Kobayashi, Yuushi Okumura, Inho Choi, Motoko Oarada, Edward Mills, Shigetada Teshima-Kondo, Shin'ichi Takeda, Eiji Tanaka, Keiji Tanaka, Masahiro Sokabe, and Takeshi Nikawa.		
	平成 30年 2月 27日 American Journal of Physiology-Cell Physiologyに受理済		

要旨

筋肉に機械的負荷のかからない unloading 状態による筋萎縮の進展には、酸化ストレスが関係している。上昇した筋萎縮関連ユビキチンリガーゼ casitas B-lineage lymphoma-b (Cbl-b) が筋細胞の insulin receptor substrate 1 をユビキチン化し、その分解を亢進することが筋萎縮の原因の一つであることを報告した。しかしながら、unloading による酸化ストレスの蓄積が、どのようにユビキチンリガーゼの発現に関与するかについては不明なままであった。本研究では、(模擬)微小重力環境に曝露した筋細胞を用いて、酸化ストレスが Cbl-b 発現を誘導するシグナルについて解析した。

まず、L6 筋管細胞を実際の宇宙空間に打ち上げ、国際宇宙ステーション・日本実験棟「きぼう」内で 10 日間培養した。その L6 筋管細胞を地上に回収し、筋管径を測定した。その結果、1G コントロール群に比べ、微小重力群の筋管径が有意に低下した。地上の模擬微小重力モデルである 3D-Clinorotation に供した L6 筋管細胞でも同様の結果を得た。宇宙空間で培養した細胞では酸化型グルタチオンの増加が見られたことや、模擬微小重力環境下で培養した細胞では O_2^- の増大が見られたことから、unloading 状態では筋細胞に酸化ストレスが蓄積することを確認した。さらに、プロモーターアッセイおよびゲルシフトアッセイにより、Cbl-b のプロモーター領域 -60bp から -110bp に酸化ストレス応答性領域があることと、Cbl-b の発現を転写因子 early growth response 1/2 (Egr1/2) が制御していることを明らかにした。実際に、3D-Clinorotation 上で培養した、あるいは H_2O_2 を添加した L6 筋管細胞では Egr1/2 と Cbl-b の上昇が見られた。また、Cbl-b の発現上昇は Egr の発現上昇に続いて起こることも確認した。一方、Egr の発現を誘導する因子として、mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路に着目した。L6 筋管細胞の MAPK シグナル経路中で extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路のみが、3D-Clinorotation 開始後 10 分という非常に早い時期に活性化された。さらに、Egr1/2 siRNA と ERK1/2 リン酸化阻害剤は、unloading 誘導性の Cbl-b と Egr1/2 の発現上昇をそれぞれ抑制した。興味深いことに、*N*-acetylcysteine や TEMPOL のような抗酸化剤の添加は、以上の unloading 誘導性の ERK 活性化と Cbl-b 発現を抑制した。

これらの結果より、無重力環境における筋細胞では酸化ストレスが蓄積し、その酸化ストレスが ERK-Egr 経路を介しユビキチンリガーゼ Cbl-b の発現を制御するという筋萎縮シグナルを明らかにすることができた。

この研究は、無重力による筋萎縮発生メカニズムを解明し、その栄養学的治療法のターゲットとなる酸化ストレスの重要性を明らかにしていることから、博士 (栄養学) に値すると判断した。