

## 論文内容要旨

報告番号	甲栄第 286 号	氏名	ANAYTULLA
題目	<p>Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes (C2C12筋管細胞においてモリンはデキサメタゾン誘導性の酸化ストレスと筋萎縮を抑制する)</p>		
<p>デキサメタゾン (以下、Dex) は、炎症性疾患の治療に最もよく用いられる人工グルココルチコイド剤である。しかし、Dexは、副作用として筋肉のタンパク質分解を増加させ、タンパク質合成を減少させることにより、筋萎縮を誘導する。その筋萎縮誘導のメカニズムとして、グルココルチコイド受容体 (以下、GR) を介する経路と酸化ストレスを介する経路の二つが知られている。前者は、DexがGRと結合後、転写因子KLF15の発現が高まり、その結果、MAFbx/Atrogin1やMuRF1などのユビキチンリガーゼによる筋萎縮が亢進する経路である。後者は、Dex処理により筋細胞内に酸化ストレスが蓄積し、その結果、酸化ストレス応答性のユビキチンリガーゼCbl-bによりInsulin-like growth factor-1 (IGF-1)シグナルが障害され筋萎縮にいたる経路である。実際、これまでも様々な研究により、抗酸化物質がグルココルチコイドによる骨格筋の萎縮を緩和することが示されている。そこで、本研究では、マウスC2C12筋管細胞を用いて、ポリフェノールの中でも強い抗酸化作用を持つモリンがDexによって誘発される酸化ストレスと筋萎縮に及ぼす影響を検討した。</p> <p>まず、24時間のDex (10 <math>\mu</math>M) 処理で、C2C12筋管細胞の筋管径と速筋タイプのみオシン重鎖量が有意に減少した。この間、MAFbx/atrogin-1, MuRF-1やCbl-bの筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現量も増大した。また、Dexは処理後6時間後に酸化ストレスの一過性の増大を起こすと同時に、酸化ストレスマーカータンパク質であるP66shcの発現を上昇させた。一方、Dex処理1時間前のモリン処理は、Dex誘導性の筋管萎縮 (筋管径の減少、速筋タイプのみオシン重鎖の減少、筋萎縮関連遺伝子の発現亢進など) や酸化ストレスの蓄積をすべて軽減させた。興味深いことに、GRのターゲット分子である、KLF15はDexにより発現上昇するものの、モリン前処理により変化が見られなかったことより、上記のモリンの抗筋管萎縮作用は、酸化ストレスの軽減による効果であると考えられた。</p> <p>次に、筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現に関与するFoxo3のリン酸化と遅筋タイプのみオシン重鎖の発現に関与するPGC-1aの発現に対するモリンの効果調べた。モリンは、DexによるFoxo3の脱リン酸化 (活性化) を抑制し筋萎縮関連ユビキチンリガーゼの発現を減弱させていることがわかった。一方、モリンは速筋タイプのみオシン重鎖量を回復させるだけでなく、遅筋タイプのみオシン重鎖量の増大を導いたが、それはPGC-1aの発現量の増大が関与していることが示唆された。</p> <p>最後に、モリンの抗筋管萎縮作用が、抗酸化効果によるものであることを確認するためにGRをノックダウンしたC2C12筋管細胞にDexとモリンを処理した。そもそもGRをノックダウンしたC2C12筋管細胞ではDexを投与しても筋管萎縮も酸化ストレスの蓄積も起こらない。そのような細胞にモリンを処理しても筋管細胞の肥大などは観察されなかったので、モリンの抗酸化作用が抗筋萎縮効果の主要な因子であると考えられた。</p> <p>以上の研究より、抗酸化作用の強いポリフェノールであるモリンはグルココルチコイドによる筋萎縮を予防する有益な生理活性物質 (食材) となりうると考えられた。</p>			

報告番号	甲 栄 第 286 号	氏名	ANAYTULLA
審査委員	主査 瀬川 博子 副査 酒井 徹 副査 馬渡 一諭		
<p>題目</p> <p>Morin attenuates dexamethasone-mediated oxidative stress and atrophy in mouse C2C12 skeletal myotubes                  (C2C12筋管細胞においてモリンはデキサメタゾン誘導性の酸化ストレスと筋萎縮を抑制する)</p> <p>著者</p> <p>Anayt Ulla, Takayuki Uchida, Yukari Miki, Kosuke Sugiura, Atsushi Higashitani, Takeshi Kobayashi, Ayako Ohno, Reiko Nakao, Katsuya Hirasaka, Iori Sakakibara, Takeshi Nikawa</p> <p>令和 3 年 4 月発行 Archives of Biochemistry and Biophysics誌                  第704巻第108873号に発表済</p> <p>要旨</p> <p>デキサメタゾン(Dex)は、炎症性疾患の治療に最もよく用いられる合成グルココルチコイドである。しかし、Dexは筋蛋白質の分解促進し筋萎縮を誘導する副作用も有する。このDexによる筋萎縮誘導の機序として転写因子Krüppel-like factor 15 (KLF-15)を介する経路と酸化ストレスを介する経路の二つがある。前者は、Dexがグルココルチコイド受容体(GR)と結合後、KLF15の転写活性が高まり、Muscle atrophy F-box(MAFbx)/Atrogin-1やMuscle ring finger protein 1 (MuRF1)などのユビキチンリガーゼによる筋萎縮を亢進する経路である。後者は、Dex処理により筋細胞内に酸化ストレスが蓄積し、酸化ストレス応答性のユビキチンリガーゼCasitus B-lineage lymphoma-b (Cbl-b)によりInsulin-like growth factor-1 シグナルが障害され筋萎縮にいたる経路である。一方、抗酸化作用を有するケルセチンやβ-カテキンなどのポリフェノールは抗筋萎縮作用を有することが知られている。</p> <p>本研究では、マウスC2C12筋管細胞を用いて、ケルセチンの異性体ポリフェノールであるモリンのDexによる筋萎縮に及ぼす影響を検討した。まず、Dex (10 μM)処理は、24時間後にC2C12筋管細胞の筋管径と速筋型ミオシン重鎖量を有意に減少させた。この間、Dexは、MAFbx/Atrogin-1, MuRF-1やCbl-bなどのユビキチンリガーゼの発現も亢進した。一方、Dex処理は、6時間後に酸化ストレスを一過性に増大させ、酸化ストレス応答蛋白質のP66shcの発現を上昇させた。興味深いことに、モリン前処理はこのようなDex誘導性の筋管萎縮（筋管径の減少、速筋型ミオシン重鎖量の減少、筋萎縮関連遺伝子の発現亢進など）や酸化ストレスの蓄積をすべて軽減させた。また、モリン前処理はDexによる速筋型ミオシン重鎖量の減少を回復させるだけでなく、モリン単独でも遅筋型ミオシン重鎖量を増大させることがわかった。さらに、モリン前処理は、KLF-15経路の活性化を示すKLF-15の発現亢進には影響しなかったことより、このモリンの抗筋管萎縮作用は、酸化ストレスの軽減による効果であると考えられた。</p> <p>次に、MAFbx/Atrogin-1やMuRF-1の発現に関与するForkhead box O 3 (Foxo3)のリン酸化と遅筋型ミオ</p>			

シン重鎖の発現に關与するPeroxisome proliferative activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )の発現に対するモリンの効果を検討した。モリンは、DexによるFoxo3の脱リン酸化(活性化)を抑制しユビキチンリガーゼの発現を減弱させていることがわかった。また、モリンは、PGC-1 $\alpha$ の活性化を介して遅筋型ミオシン重鎖の発現量を増大していることが示唆された。

最後に、GRをノックダウンしたC2C12筋管細胞にDexとモリンを処理した。GRをノックダウンしたC2C12筋管細胞ではDexによる酸化ストレスの蓄積やモリンによる萎縮抑制も観察されなかったことより、モリンの抗筋萎縮効果はその抗酸化作用によるものであると考えられた。

以上の研究より、モリンはグルココルチコイドによる筋萎縮を予防する有益な生理活性物質(ポリフェノール)であることが示された。本研究は、グルココルチコイドによる筋萎縮に対するモリンの有効性とその作用機序を明らかにしたものであり、学位(栄養学)に値すると判定した。