

博士(医学) 小野太祐

学位論文題名

クルクミンはタンパク分解亢進を抑制して糖尿病に伴う
下肢骨格筋の萎縮を軽減する

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

糖尿病患者は増加の一途をたどっており、様々な合併症によって、生活の質に悪影響を及ぼす。糖尿病はインスリンの欠乏または抵抗性により発症し、さまざまな代謝異常により特徴づけられる。

糖尿病に伴う骨格筋の萎縮も報告されており、特に1型糖尿病(T1DM)で明らかである。骨格筋萎縮を伴う体重減少は死亡率の増加と密接にかかわっており、臨床上の大きな問題点である。骨格筋萎縮は主にユビキチーノテアソーム(UP)系による筋線維タンパクの分解亢進によって引き起こされる。骨格筋萎縮を引き起こす機序として、炎症性サイトカインの上昇が関わっていることが示唆されている。ストレプトゾトシン(STZ)投与によるT1DMマウスは骨格筋萎縮を発症することが知られているが、骨格筋萎縮を抑制すると報告されているものはインスリンなど少ない。

クルクミン(Cur)は、スパイスの一種であるウコンの構成成分であり、伝統的な漢方薬として広く用いられている。その主な作用機序として、炎症性サイトカインの抑制が知られており、T1DMに合併する骨格筋萎縮に対して抑制作用が期待される。そこでわれわれはSTZ投与によるT1DMマウスにおける骨格筋萎縮にクルクミンが抑制効果を有するか検討した。

【材料と方法】

8~10週齢のオスC57BL/6J野生型マウスを無作為に2群に分け、STZ(200mg/kg)あるいはクエン酸バッファーを単回腹腔内投与した。マウスをさらに無作為に2群に分け、投与後から1%wt/wt Curの混餌、あるいは通常の餌で飼育した。本研究では、Control群、Control+Cur群、STZ群、STZ+Cur群の4群で実験を行った。3日後に随時血糖を測定し、300mg/dlを上回るものを糖尿病発症とし、以後の実験に用いた。nは各群とも10であった。

2週間後に体重、血糖、血清インスリンを測定した。下肢骨格筋を摘出し、大腿直筋、腓腹筋、ヒラメ筋に分離し、組織重量を測定した。骨格筋組織はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、骨格筋細胞横断面積を測定した。またTUNEL染色を行い、アポトーシスについて評価した。

骨格筋組織でのタンパク発現をウェスタンプロット法により測定した。1次抗体には抗Akt抗体、抗リン酸化Akt抗体(セリン473)、抗Ubiquitin抗体、抗Caspase-3抗体、抗cleaved Caspase-3抗体を用い、対応する2次抗体を用いシグナルを検出した。

骨格筋でのMuRF1、Atrogin-1/MAFbx、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法により測定した。

【結果】

STZ投与後3日での血糖はSTZ群とSTZ+Cur群で有意差がなかった。2週間での体重は、STZ群およびSTZ+Cur群でControl群に対して有意に低下した。STZ+Cur群ではSTZ群に対し体重低下が有意に抑制された。STZ群およびSTZ+Cur群でControl群に対して有意に血糖が上昇し、インスリンが低下した。STZ群とSTZ+Cur群の血糖およびインスリンには有

意差を認めなかった。

Control 群に比し STZ 群で、いずれの筋重量も有意に低かった。STZ 群に比し STZ+Cur 群では大腿直筋および腓腹筋重量の低下が有意に抑制された。ヒラメ筋重量は STZ 群と STZ+Cur 群で違いがなかった。大腿直筋細胞横断面積は Control 群と比較して STZ 群で有意に小さかったが、STZ+Cur 群ではこの変化は有意に抑制された。

大腿直筋でのユビキチン結合タンパクは、Control 群に比べて STZ 群で有意に増加した。STZ 群に比し STZ+Cur 群ではユビキチン結合タンパクは有意に減少した。また筋特異的 E3 ユビキチン酵素である MuRF1 および Atrogin-1 / MAFbx の mRNA 発現は、Control 群に対して STZ 群でいずれも有意に増加した。また STZ 群に比し STZ+Cur 群でいずれも有意に抑制された。大腿直筋での Akt のセリンリン酸化は、Control 群に対して STZ 群および STZ+Cur 群で低下したが、STZ 群と STZ+Cur 群の間には差を認めなかった。

TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現は Control 群に対して STZ 群で有意に増加した。STZ 群に比し STZ+Cur 群では有意に増加が抑制された。IL-6 は有意な変化はなかった。

大腿直筋を用いて TUNEL 染色を行ったが、いずれの群においても TUNEL 陽性細胞数は有意な変化はなかった。また Caspase-3 タンパクの発現も変化しなかった。

【考察】

今回の研究結果の最も重要な所見は、STZ 投与による T1DM モデルマウスの下肢骨格筋萎縮が生じ、このような変化がクルクミン投与により軽減されたことであった。下肢骨格筋萎縮は特に大腿直筋、腓腹筋（速筋群）に強く認められた。ヒラメ筋（遅筋群）においても萎縮は生じたが、萎縮の程度は小さかった。今回生じた骨格筋萎縮はクルクミン投与により大腿直筋、腓腹筋において有意に抑制されたが、ヒラメ筋では抑制されなかった。ヒラメ筋においては酸化ストレス耐性が高いことなどが知られており、クルクミンの効果を小さくしたと考える。

下肢骨格筋萎縮に伴い、MuRF1、Atrogin-1 / MAFbx の mRNA 発現はいずれも STZ 群で増加した。またユビキチン結合タンパクも STZ 群で増加した。これらはクルクミン投与でいずれも有意に減少した。すなわち T1DM では骨格筋における UP 系の活性化を介して骨格筋萎縮が生じ、クルクミンは UP 系の活性亢進を抑制することにより骨格筋萎縮を抑制したことが示された。

骨格筋萎縮には一部アポトーシスが関与していることが報告されている。しかし大腿直筋を用いた TUNEL 染色では STZ 群で有意な TUNEL 陽性細胞の増加はなかった。さらに、STZ 群で Caspase-3 のタンパク発現の有意な増加はなかった。本研究における下肢骨格筋萎縮において、骨格筋細胞のアポトーシスが関与する可能性は低いと考える。さらに骨格筋萎縮に対するタンパク合成の低下の関与を検討したが、血中インスリンレベルや Akt のセリンリン酸化とともに STZ 群と STZ+Cur 群で差がなかった。クルクミンによる骨格筋萎縮の抑制には、タンパク合成低下の抑制は関与していないと考える。

炎症性サイトカインは骨格筋萎縮を引き起こす主要な因子であり中でも TNF- α が重要な役割を果たしている。骨格筋組織での TNF- α の mRNA 発現は、STZ 群で有意に増加し、クルクミン投与で有意に抑制された。IL-1 β でも同様の結果であった。組織での炎症性サイトカインの増加が骨格筋萎縮の主要な因子となり、クルクミンにより抑制されたことが、骨格筋萎縮の軽減に関わっていると考える。

【結語】

T1DM で認められる下肢骨格筋の萎縮は、クルクミン投与により軽減した。このようなクルクミンの作用には骨格筋でのタンパク合成低下の抑制より、タンパク分解亢進の抑制が重要な役割を果たした。糖尿病をはじめとする様々な筋萎縮をきたす病態において、クルクミンは有効な治療法となりうると考える。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　筒　井　裕　之
副　查　教　授　小　池　隆　夫
副　查　教　授　畠　山　鎮　次

学　位　論　文　題　名

クルクミンはタンパク分解亢進を抑制して糖尿病に伴う 下肢骨格筋の萎縮を軽減する

糖尿病に伴う骨格筋の萎縮が報告されている。骨格筋萎縮を伴う体重減少は死亡率の増加と密接にかかわっており、臨床上の大きな問題点である。骨格筋萎縮は主にユビキチンープロテアソーム（UP）系による筋線維タンパクの分解亢進によって引き起こされる。機序として炎症性サイトカインの上昇が関わっていることが示唆されている。クルクミン（Cur）は、スパイスの一種であるウコンの構成成分であるが、その主な作用機序として、炎症性サイトカインの抑制が知られており、骨格筋萎縮に対して抑制作用が期待される。そこでわれわれは 1 型糖尿病モデルマウスにおける骨格筋萎縮にクルクミンが抑制効果を有するか検討した。

材料と方法：8～10 週齢のオス C57BL/6J マウスを無作為に 2 群に分け、ストレプトゾトシン（STZ）あるいはクエン酸バッファーを単回腹腔内投与した。マウスをさらに無作為に 2 群に分け、投与後から 1% wt/wt Cur の混餌、あるいは通常の餌で飼育した。2 週間後に体重、血糖、血清インスリンを測定した。下肢骨格筋を摘出し、組織重量を測定した。また骨格筋細胞横断面積を測定した。また TUNEL 染色を行い、アポトーシスについて評価した。骨格筋組織でのタンパク発現をウェスタンプロット法により測定した。骨格筋での mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。

結果：STZ 群で、筋重量は有意に低かった。STZ+Cur 群では大腿直筋および腓腹筋重量の低下が有意に抑制された。大腿直筋細胞横断面積は STZ 群で有意に小さかったが、STZ+Cur 群ではこの変化は有意に抑制された。ユビキチン化タンパクは、STZ 群で有意に増加した。STZ+Cur 群ではユビキチン化タンパクは有意に減少した。また筋特異的 E3 ユビキチン酵素である MuRF1 および Atrogin-1/MAFbx の mRNA 発現は、STZ 群でいずれも有意に増加した。また STZ+Cur 群でいずれも有意に抑制された。Akt のセリンリン酸化は、STZ 群と STZ+Cur 群の間には差を認めなかった。TNF- α 、IL-1 β の mRNA 発現は STZ 群で有意に増加した。STZ+Cur 群では有意に増加が抑制された。TUNEL 染色ではいずれの群においても陽性細胞数は有意な変化はなかった。Caspase-3 タンパクの発現も変化しなかった。

考察：今回の研究結果の最も重要な所見は、STZ 投与により骨格筋萎縮が生じ、このような変化がクルクミン投与により軽減されたことであった。下肢骨格筋萎縮に伴い、MuRF1、Atrogin-1 / MAFbx の mRNA 発現はいずれも STZ 群で増加した。またユビキチン結合タンパクも STZ 群で増加した。これらはクルクミン投与でいずれも有意に減少した。骨格筋における UP 系の活性化を介して骨格筋萎縮が生じ、クルクミンは UP 系の活性亢進を抑制することにより骨格筋萎縮を抑制したことが示された。骨格筋萎縮に対するタンパク合成の低下の関与を検討したが、インスリンや Akt のセリンリン酸化とともに STZ 群と STZ+Cur 群

で差がなかった。クルクミンによる骨格筋萎縮の抑制には、タンパク合成低下の抑制は関与していないと考える。炎症性サイトカインは骨格筋萎縮を引き起こす主要な因子であり中でも TNF- α が重要な役割を果たしている。骨格筋組織での TNF- α の mRNA 発現は、STZ 群で有意に増加し、クルクミン投与で有意に抑制された。IL-1 β でも同様の結果であった。組織での炎症性サイトカインの増加が骨格筋萎縮の主要な因子となり、クルクミンにより抑制されたことが、骨格筋萎縮の軽減に関わっていると考える。

口頭発表に際し、畠山教授からユビキチン化酵素の発現制御のメカニズムについての質問があった。さらに骨格筋タンパクユビキチン化が病態に果たす役割やオートファジーの関わりについての質問がなされた。次いで小池教授から炎症性サイトカインが骨格筋において発現が亢進している点についての質問がなされた。さらに自己免疫性疾患にはたずクルクミンの役割についての質問がなされた。最後に筒井教授から骨格筋萎縮を抑制することが報告されている他の物質と、それに対してのクルクミンの位置づけは何かについての質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果および過去の文献を引用し、適切な回答を行った。

この論文は、クルクミンが 1 型糖尿病における骨格筋萎縮を軽減し、またその機序として炎症性サイトカインおよびタンパクユビキチン化の抑制が関係することを示し、骨格筋萎縮に対する新たな治療戦略の可能性として意義のあるものと評価された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した。