

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792289

研究課題名(和文) 抗ユビキチン化ペプチドを用いた骨格筋萎縮治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the inhibition of skeletal muscle atrophy with anti-ubiquitination of oligopeptide

研究代表者

川合 暢彦(KAWAI, Nobuhiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：40437588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：萎縮筋ではCbl-bがIRS-1をユビキチン化し、IGF-1シグナル伝達阻害を起こす。そこで、IRS-1のアミノ酸配列をもとに競合阻害によりCbl-bによるIRS-1のユビキチン化を阻害するオリゴペプチドを作製し、投与実験を行った。低栄養培養を行ったC2C12細胞ではAKTのリン酸化が有意に減少したが、Cbl-b阻害ペプチド添加群では認められなかった。また、坐骨神経切除を施した野生型マウスにCbl-b阻害ペプチドを投与したところ、筋萎縮に対し抑制傾向を示した。よって、本機能性ペプチドはIGF-1シグナルを回復することで筋萎縮を抑制することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In atrophied muscles, ubiquitin ligase, Cbl-b, increases and it stimulates the ubiquitination and degradation of IRS-1, an intermediate in IGF-1 signaling pathway, resulting in IGF-1 resistance. In this study, we evaluate the efficacy of application of anti-ubiquitination oligopeptide that inhibits the interaction between Cbl-b and IRS-1 into starved C2C12 myotubes and denervated tibialis anterior muscle of C57BL/6 wild-type mice. Oligopeptide significantly inhibited the decrease of AKT phosphorylation in starved myotubes. In addition, sectional area of denervated muscle fibers treated with oligopeptide was significantly larger compared to non-treated denervated muscles. These results suggest that application of anti-ubiquitination oligopeptide could be an effective tool for therapeutic use in muscular atrophy diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、矯正・小児系歯学

キーワード：骨格筋萎縮 ユビキチン-プロテアソーム経路 IGF-1シグナル

1. 研究開始当初の背景

骨格筋萎縮は長期間の寝たきりやギブス固定による筋の活動低下のほか、癌や糖尿病といった様々な病態により引き起こされる。この筋萎縮は患者の身体機能を低下させ、さらなる病状の悪化を招くため、高齢化の進む日本においては深刻な問題であり、その機序の解明と治療法の開発が急務となっている。

通常、骨格筋はタンパク質合成と分解のバランスを保つことで一定の筋量を保っているが、骨格筋への機械的負荷が減少すると増殖因子に対する筋細胞の感受性が低下し、タンパク質分解が亢進することにより萎縮が起こると考えられている。本研究グループではラット萎縮筋をDNAマイクロアレイ解析し、ユビキチンリガーゼの一つである Cbl-b (Casitas B-lineage lymphoma-b) が著明に活性化していることを見出した。さらに Cbl-b 遺伝子欠損マウスにより、Cbl-b が筋の成長に重要な IGF-1 (insulin-like growth factor-1) シグナルの細胞内シグナル分子である IRS-1 (insulin receptor substrate-1) をユビキチン化することにより分解に導くことが示され、Cbl-b による IGF-1 シグナル伝達阻害が筋萎縮の原因であることを明らかにした。

これらの結果より、IRS-1 のアミノ酸配列をもとに競合阻害により Cbl-b による IRS-1 のユビキチン化を阻害するオリゴペプチドを作製した。しかし、ペプチドは生体内で安定性が低いと単独投与では十分な活性を得ることは難しい。そのため、効率よくかつ安定的に導入する適切なデリバリーシステムの開発が重要である。

2. 研究の目的

本研究は抗ユビキチン化ペプチドの投与実験を行い新規の筋萎縮治療法の確立を目指す。なお、本研究ではデリバリー担体としてアテロコラーゲンを使用した。

はじめに、萎縮条件下でのマウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞に対し、合成オリゴペプチドを添加し、本ペプチドによる抗萎縮効果のメカニズムと投与条件を *in vitro* において検討した。次いで、筋萎縮モデルマウスを用いて合成オリゴペプチドによる個体レベルでの筋萎縮回復効果の検討を行った。

これらの結果より、本ペプチドによる廃用性筋萎縮回復機構を解明するとともに、その有用性および最適投与条件を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ペプチド/アテロコラーゲン複合体の投与条件の検討

マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を分化誘導培地 (2%ウマ血清) にて3日間培養後、N末端に蛍光色素 (FITC) を付与した合成オリゴペプチドとアテロコラーゲン (AteloGene™, 高研, 東京) を培地に添加した。24時間後に蛍光顕微鏡にて観察を行った。

(2) ペプチド/アテロコラーゲン複合体による抗筋管萎縮効果の検討

筋萎縮モデルとして低栄養培養を使用した。マウス筋芽細胞由来 C2C12 細胞を分化誘導培地 (2%ウマ血清) にて3日間培養後、無血清培地に変更するとともにペプチド/アテロコラーゲン複合体を添加した。24時間後に位相差顕微鏡にて筋管の直径を計測した。また、細胞を回収し AKT のリン酸化をウェスタンブロット法で解析した。

(3) 筋萎縮モデルマウスへの合成オリゴペプチドの投与と萎縮筋の性状解析

12週齢の C57BL/6 野生型マウスを使用した。偽手術群、切除群、投与群を設定し、右側坐骨神経切除を行った。投与群では手術直後および3日ごとにペプチド/アテロコラーゲン複合体を前頸骨筋に筋肉内投与を行った。手術9日後に、それぞれの群の筋を摘出し組織学的検討を行った。

4. 研究成果

(1) ペプチド/アテロコラーゲン複合体の投与条件の検討

N末端に蛍光色素 (FITC) を付与した Cbl-b 阻害ペプチドとアテロコラーゲンの複合体を分化誘導培地に添加し、24時間後の複合体の形状を蛍光顕微鏡で観察した。アテロコラーゲンの比率により粒状から繊維状と異なる複合体の形状が観察された。細胞への導入効率は粒状が高いことが知られているため本研究では Cbl-b 阻害ペプチドとアテロコラーゲンの比率を 1:1 とすることとした (図1)。

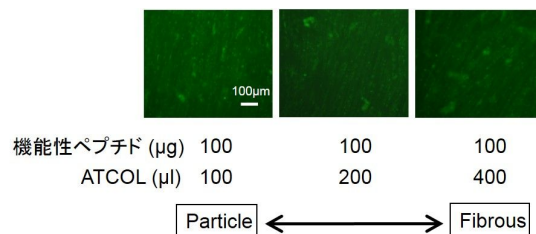


図1 培養細胞中の Cblin/ATCOL 複合体の形状

(2) ペプチド/アテロコラーゲン複合体による抗筋管萎縮効果の検討

24時間の低栄養刺激により筋管直径は有意に減少したが ($p < 0.01$)、ペプチド/アテロ

コラーゲン複合体を添加した群では直径が維持された。また、分化誘導培地にて培養した細胞にCb1-b阻害ペプチドを添加しても筋管直径は増加しなかったことから、Cb1-b阻害ペプチドの抗萎縮効果は合成を促進するものではなく、分解を抑制するものであることが示された(図2)。

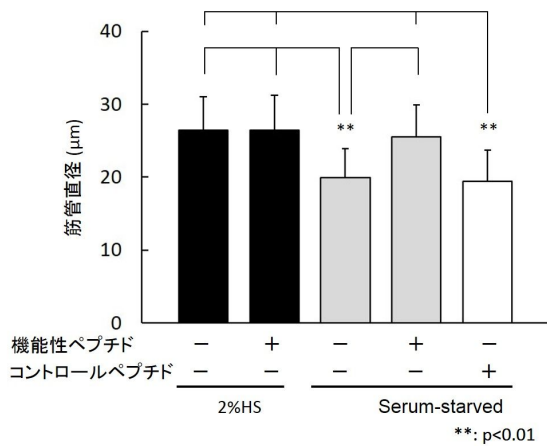


図2 Starvation24時間後の筋管直径

低栄養刺激によりAKTのリン酸化が有意に減少したが、Cb1-b阻害ペプチド添加群では認められなかったことから、本ペプチドによる萎縮抑制がIGF-1シグナルの回復によるものであることが示された(図3)。

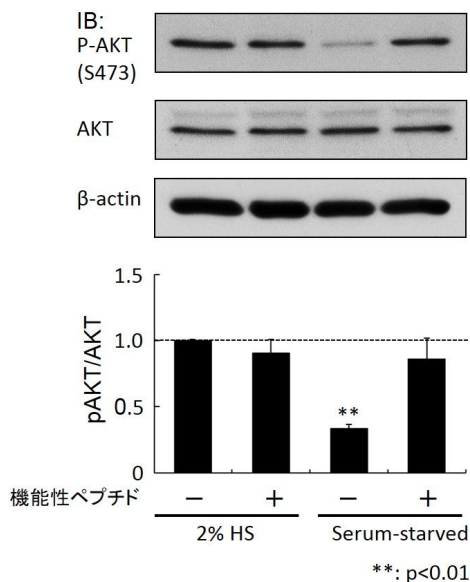
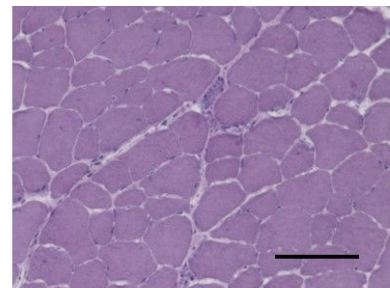


図3 StarvationによるAKTのリン酸化への影響

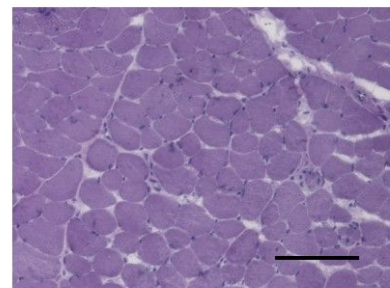
(3)筋萎縮モデルマウスへの合成オリゴペプチドの投与と萎縮筋の性状解析

切除群では偽手術群に対して筋線維は萎縮しており、筋細胞における中心核および結

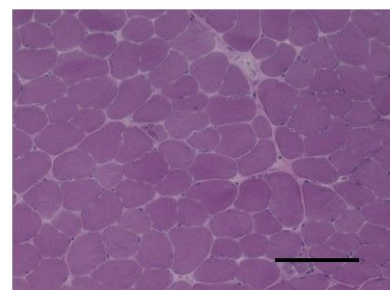
合組織の増加を認めた。一方投与群では健全な組織像を認め、萎縮に対し抑制傾向を示した。本研究結果より、アテロコラーゲンをデリバリー担体とした機能性ペプチドの適用は筋萎縮を抑制することが示唆された(図4)。



偽手術群



手術群



投与群 Bar: 100μm

図4 坐骨神経切除による骨格筋への影響

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local applications of myostatin-siRNA with atelocollagen increase skeletal muscle mass and recovery of muscle function. PLoS One 8: e64719, 2013, 査読有, doi:10.1371/journal.pone.0064719.

Nakamura S, Kawai N, Ohnuki Y, Saeki Y, Korfage JA, Langenbach GE, Kitayama T, Watanabe M, Sano R, Tanne K, Tanaka E. Changes in activity and structure of jaw muscles in Parkinson's disease model rats. Journal of Oral Rehabilitation 40: 205-213, 2013, 査読有, doi: 10.1111/joor.12030.

〔学会発表〕(計2件)

川合 暢彦, 平坂 勝也, 七條 なつ子, 塩田 智子, 森 博世, 木内 奈央, 二川 健, 田中 栄二. 抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮抑制法の開発. 第72回日本矯正歯科学会大会 (長野県. 松本市), 2013年10月7-9日

川合 暢彦, 平坂 勝也, 塩田 智子, 越智 ありさ, 安倍 知紀, 真板 綾子, 近藤 茂忠, 田中 栄二, 二川 健. アテロコラーゲンを担体とした抗ユビキチン化ペプチドによる骨格筋萎縮抑制. 日本宇宙生物科学会・第27回大会 (茨城県. つくば市), 2013年9月27-28日.

6. 研究組織

(1)研究代表者

川合 暢彦 (KAWAI Nobuhiko)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号: 40437588