



Overexpression of the transcriptional coregulator Cited2 protects against glucocorticoid-induced atrophy of C2C12 myotubes

飛松, 和俊

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4479

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004479>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	飛松 和俊
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4479 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Overexpression of the transcriptional coregulator Cited2 protects against glucocorticoid-induced atrophy of C2C12 myotubes

(転写共役因子 Cited2 の過剰発現はグルコルチコイドにより誘導される C2C12 筋管細胞の萎縮を防止する)

審 査 委 員

主 査	教 授	片岡 徹
	教 授	饗場 篤
	教 授	平田 健一

敗血症・飢餓・悪液質・高度インスリン欠乏など、蛋白異化作用が亢進する様々な病態において、骨格筋が萎縮することが観察されている。これらの病態ではグルココルチコイドが相対的に過剰であり、この過剰なグルココルチコイドがユビキチン-プロテオソーム経路による筋繊維蛋白の分解を亢進させるため、骨格筋の萎縮が誘導される。骨格筋の萎縮は運動能力の低下や疾患の治療効果への影響などを通じ QOL を悪化させるため、グルココルチコイドによる筋萎縮の分子メカニズムの解明が、特に注目されている。

転写共役因子である p300 は、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンによって活性化され、デキサメサゾンの蛋白分解作用に必須であることが報告されている。しかし、筋萎縮時において、p300 と相互作用する転写調節因子や p300 の標的遺伝子については明らかではない。

CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 2 (Cited2) は、最初に p300 とその paralog である CBP (CREB binding protein) の CH 1 領域 (cysteine-histidine-rich region 1) に結合する転写共役因子として同定された。Cited2 は p300/CBP の標的遺伝子の発現を正あるいは負に調節し、さまざまな生物学的過程に関与していることが報告されている。しかしながら、骨格筋における役割については明らかではない。

今回我々は、デキサメサゾンにより誘導される培養筋管細胞の萎縮に対する、Cited2 の過剰発現の効果を検討し、Cited2 が p300 を通じて、骨格筋量を調節していることを示す。

Cited2 は、異種間で高度に保存された 3 つの領域 (CR 1 から CR 3) を持ち、そのなかでも C 末端に位置する CR 2 が p300 と結合する領域であることが知られている。そこで、Cited2 の機能を検討するために、野生型 Cited2 と、CR 2 を欠失し p300 との結合能を失った変異型 Cited2 (ΔC) を発現するアデノウィルスを作成した。これを用いて、分化した C2C12 筋管細胞に野生型及び変異型 Cited2 を過剰発現させることに成功した。

続いて、C2C12 筋管細胞へのデキサメサゾン刺激に対する Cited2 の過剰発現の効果を検討した。デキサメサゾンで刺激すると、統制群としての β ガラクトシダーゼや変異型 Cited2 を過剰発現させた筋管細胞では、配列異常や長径の縮小など、萎縮の特徴となるような形態学的異常を示したが、野生型 Cited2 を過剰発現させた細胞では、このような形態学的異常はあきらかではなかった。また、骨格筋繊維の主要な構成蛋白である myosin heavy chain (MHC) の蛋白量についてもウェスタンブロットにて検討した。デキサメサゾン刺激により、 β ガラクトシダーゼや変異型 Cited2 を過剰発現させた筋管細胞では、MHC の蛋白量が 50% 以下にまで減少したが、野生型 Cited2 を過剰発現させた筋管細胞では、MHC

の減少は抑えられており、その程度は Cited2 の用量に依存していた。以上の結果から、Cited2 は *in vitro* の実験系において、グルココルチコイドの筋萎縮誘導効果を抑制することが示唆された。

グルココルチコイドによる萎縮を示した骨格筋において、MHC 蛋白の分解には、骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである MuRF1 が関与していることが報告されている。そこで、この酵素の発現を Cited2 が調節しているのかどうかを、QRT-PCR にて検討した。 β ガラクトシダーゼを発現させた筋管細胞をデキサメサゾンで刺激すると、MuRF1 の mRNA は 2.5 倍以上に増加していた。野生型 Cited2 を発現させた筋管細胞では、デキサメサゾンで刺激した群でも刺激しなかった群でも、MuRF1 の発現は抑制されていた。一方、変異型 Cited2 を発現させた筋管細胞では MuRF1 の発現抑制効果は限定されたものであった。デキサメサゾンはもう一つの骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである MAFbx の発現を増加させることも報告されている。これについても検討したが、野生型 Cited2 によって発現が抑制され、変異型 Cited2 では抑制されなかった。

今回の我々の実験結果から、筋管細胞に Cited2 を過剰発現させると、グルココルチコイドによる形態的な変化・MHC 蛋白の減少が抑えられることが示され、骨格筋量の維持に Cited2 が重要な役割を担っていることが示唆された。またこれらの効果は、Cited2 の CR2 領域の有無に大きく依存していることから、p300/CBP との相互作用が重要であることも示唆された。骨格筋特異的なユビキチンリガーゼである MuRF1 や MAFbx が Cited2 によって抑制されることから、Cited2 が p300/CBP を介して、グルココルチコイドによるユビキチン-プロテオソーム経路の活性化を負に調節する可能性が考えられた。

結論として、Cited2 の機能を向上させることが、骨格筋の萎縮に対する、新たな治療・創薬の標的となる可能性があることを提案する。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1970号	氏 名	飛 松 和 俊
論文題目 Title of Dissertation	Overexpression of the transcriptional coregulator Cited2 protects against glucocorticoid-induced atrophy of C2C12 myotubes (転写共役因子 Cited2 の過剰発現はグルココルチコイドにより誘導される C2C12 筋管細胞の萎縮を防止する)		
審査委員 Examiner	主 査 片 岡 徹 Chief Examiner 副 査 饗 場 篤 Vice-examiner 副 査 平 田 健 一 Vice-examiner		
審査終了日	平成21年 1月 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

敗血症・飢餓・悪液質など、蛋白質異化が亢進するさまざまな病態において、骨格筋の萎縮という現象が観察されている。このような病態で過剰に産生されるグルココルチコイドが、骨格筋特異的萎縮関連ユビキチンリガーゼである MuRF1 や atroglin1 の発現を増加させ、その結果ユビキチン-プロテアソーム経路を介した蛋白質分解が活性化することで、骨格筋の萎縮を促す。転写共役因子 p300/CBP はグルココルチコイドによって活性化し、この病理的過程に関与しているが、その具体的な転写制御のメカニズムについては明らかではない。本研究では、CBP/p300 の CH1 領域と結合する転写共役因子である、CBP/p300-interacting transactivator with ED-rich tail 2 (Cited2) が筋萎縮を制御していることを、マウス C2C12 筋管細胞を用いた *in vitro* の実験系を用いて示した。

本研究者は、C2C12 筋管細胞にアデノウィルスベクターを用いて野生型 Cited2 を過剰に発現させると、合成グルココルチコイドであるデキサメサゾンによって誘導される C2C12 筋管細胞の形態学的変化やミオシン重鎖蛋白質量の減少など、C2C12 筋管細胞の萎縮の特徴となるような変化が抑制されることを発見した。さらに、野生型 Cited2 は、デキサメサゾンによって誘導される MuRF1 や atroglin1 の発現を抑制していることを確認した。またこのような萎縮抑制効果は、C 末端を欠失し p300/CBP との結合能を失った変異型 Cited2 (ΔC) を過剰に発現させても認められず、p300/CBP 依存性であると推測された。

以上の結果から、本研究者は、Cited2 は p300/CBP を介して、グルココルチコイドによるユビキチン-プロテアソーム経路の活性化を負に調節し、C2C12 筋管細胞の萎縮を抑制しているものと結論づけた。この実験結果から、Cited2 の機能を何らかの方法で活性化させることで、グルココルチコイドを介した骨格筋の萎縮を防止する可能性を提唱した。

本研究は、グルココルチコイドを介した骨格筋の萎縮について、その転写共役因子 CBP/p300 を介した制御機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった転写共役因子 Cited2 による負の制御機構について重要な知見を得たものとして価値あ

る集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。