

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三 重 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 乙 生 命 医 科 学 専 攻 臨 床 医 学 系 講 座 運 動 器 外 科 学 ・ 腫 瘍 集 学 治 療 学 分 野	氏 名	なかにし たくや 中 西 巧 也
-----	---	-----	---------------------

主論文の題名

Protective Effect of Edaravone Against Oxidative Stress in C2C12 Myoblast and Impairment of Skeletal Muscle Regeneration Exposed to Ischemic Injury in Ob/ob Mice

主論文の要旨

【背景】サルコペニアなど骨格筋委縮の病態機序は未だ不明な点も多いが、その要因の一つとして酸化ストレス障害の関与は多く示されている。また肥満は異所性脂肪沈着により、局所に慢性炎症をきたす疾患で、心血管組織や肝臓など多くの組織に障害をきたすことはよく知られている。その病態機序は、過剰に沈着した異所性脂肪による慢性炎症や酸化ストレスといった“lipotoxicity”が考えられており、骨格筋も異所性脂肪沈着の標的組織であるために同様の障害に曝されている可能性がある。また肥満では末梢動脈疾患を合併する例も多く、血流障害が肥満における筋委縮に関連する可能性も疑われる。また酸化ストレス障害は肥満と筋委縮の両者に重要であり、抗酸化治療が有用な治療方法となりうることが考えられる。そこで本研究では、まず C2C12 筋芽細胞の酸化ストレス障害に対するフリーラジカル除去剤であるエダラボンの影響を解析し、次に肥満の動物モデルである ob/ob マウスの骨格筋を評価し、さらに ob/ob マウス後脚における血流障害後の骨格筋再生に対するエダラボン投与の効果を検討した。

【方法】In vitro では、C2C12 筋芽細胞を 250 μ M の H₂O₂ へ 4 時間曝露することで酸化ストレス負荷を加えた。100 μ M のエダラボンを 1 時間前に前投与した群と、投与しなかった群で、細胞の生存率および tumor necrosis factor alpha(TNF- α)発現を、それぞれ 3-(4,5-dimethylthiazol2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-ulfophenyl)-2H-tetrazolium(MTS)アッセイおよび real-time polymerase chain reaction(PCR)で計測し比較検討した。In vivo では、C57/BL6-ob/ob マウスと、その対照系統である C57/BL6 マウスを用いて実験を行った。前脛骨筋と腓腹筋の血流量を測定した後、筋肉を摘出し湿重量を測定した。摘出した筋肉を用いて Hematoxylin Eosin(HE)染色による組織形態学的評価、Malondialdehyde(MDA)定量を行った。また、右大腿動脈を結紮切離することで血流障害モデルを作成し、7 日後に同様に筋肉を摘出して MyoD 発現を免疫組織化学的解析と Western blotting 法で評価した。さらに、エダラボンの効果を検討するため、大腿動脈結紮の 30 分前にエダラボンを投与し、同様の解析を行った。

【結果】C2C12筋芽細胞の生存率は、H₂O₂での処理によりコントロール群の11.3 \pm 2.20%まで減少したが、エダラボンの前投与群では、コントロール群の18.9 \pm 1.53%であり、エダラボン非投与群に比して生存率の低下を有意に抑制した。また、TNF- α 発現は、H₂O₂での処理でコントロール群

の 4.46 ± 0.89 倍まで増加がみられたのに対し、エ达拉ボン投与群はコントロール群の 2.68 ± 0.45 倍と有意に抑制された。In vivoでは、まずob/obマウスでは著明な体重増加に反して骨格筋湿重量はコントロールマウスよりも有意に低かった。骨格筋に対する組織学的検討では、ob/obマウスでは多角形状を失った筋線維を、コントロールマウスよりも有意に多く認め、MDAも有意に高かった。また骨格筋の血流量は両群間で有意差はなく、大腿動脈の結紮7日後には両群ともに骨格筋血流は著明に減少したが、やはり両群間で差はなかった。また、組織学的評価でも両群間で筋損傷スコアに有意差はなかったが、免疫組織化学的検討とwestern blottingにおいてob/obマウスでは大腿動脈結紮後に骨格筋のMyoD発現の低下を認めた。これらの筋損傷スコアやMyoD発現は、エ达拉ボン投与によりob/obマウスでも有意に改善が示された。

【考察】骨格筋萎縮の病態生理は完全には解明されていないが、酸化ストレスが要因の一つと考えられる。実際に、悪性腫瘍、糖尿病、肥満などの疾患では、骨格筋と血漿の酸化ストレスマーカーの増加が示されている。本研究では、ob/obマウスの骨格筋の評価と、フリーラジカル除去剤であるエ达拉ボンの効果を検討した。その結果、エ达拉ボンはC2C12筋芽細胞における酸化ストレスに対する有意な保護効果を示した。エ达拉ボンには抗炎症効果はないが、フリーラジカルの除去による直接的な保護効果により、炎症性サイトカインの産生が抑制され、間接的にも骨格筋細胞を保護しうると考えられた。また、ob/obマウスの骨格筋湿重量はコントロールマウスよりも低く、組織学的には多角形状のない萎縮性筋線維が認められ、さらに骨格筋のMDAが高値であったことから、異所性脂肪による脂質過酸化障害が筋萎縮に関与していると考えた。また肥満は末梢動脈疾患の危険因子であり、当初はob/obマウスにおいて骨格筋血流の減少を予想したが、実際には減少していなかった。しかし大腿動脈の結紮7日後の骨格筋のMyoD発現は、ob/obマウスでは低く、ob/obマウスでは骨格筋の血流障害に対する再生能力が乏しいことが示された。中高年の肥満では末梢動脈疾患を合併する例が多く、このことが肥満型サルコペニアの病態機序の一つである可能性が考えられた。また、エ达拉ボン投与は肥満での骨格筋血流障害に対して有用である可能性があり、他の抗酸化治療を含めてさらに検討を重ねたい。