

Title	Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes
Author(s)	戎井, 力
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40378
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	戎 井 力 <small>えびす い ちから</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 7 月 8 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes (マウス C2C12筋管細胞における IL-6における蛋白分解系の亢進とそのメカニズム)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 岡 田 正 教 授 内 山 安 男

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

多発外傷，重度熱傷，敗血症などのストレス下において筋肉は主要なアミノ酸の供給源として分解消費され萎縮する。この筋の崩壊はストレス時に放出される筋崩壊誘導因子 (muscle proteolysis inducing factor ; MPIF)－蛋白分解酵素－アミノ酸放出という過程によりもたらされると考えていたが，その詳細は不明であった。しかし，近年 in vivo の実験によりストレス下の筋崩壊での炎症性サイトカイン (TNF α ，IL-1，IL-6など) の関与が報告され，炎症性サイトカインがMPIFである可能性が指摘されるようになった。一方，筋蛋白分解に関与する細胞内蛋白分解酵素としてはATP依存性の多機能蛋白分解酵素複合体であるプロテアソームヤリソゾーム酵素の一つであるカテプシンBおよびLがあげられる。なかでも最近その分子構造が明らかになった活性型26Sプロテアソームは中心部の不活性型20Sプロテアソームと両端の制御蛋白群がATP依存的に分子集合した分子量約2000 KDaの蛋白質複合体であり，Heat shock protein の一つであるユビキチンに代表される分解シグナルの提示により細胞内の蛋白質を分解するため，ストレス下での生理作用に注目が集まっている。

本研究は培養筋管細胞を用いた in vitro の系において炎症性サイトカイン (TNF α ，IL-6) の蛋白分解および蛋白分解酵素 (プロテアソームおよびカテプシンB，L) への影響を解析し，ストレス下における筋崩壊過程のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【方 法】

マウス骨格筋由来のC2C12筋芽細胞を1% FBS下で6日間培養しC2C12筋管細胞を作製した。炎症性サイトカインとしてrhTNF α およびrhIL-6を用いた。細胞内蛋白分解の指標としては細胞内蛋白の大部分を占める long-lived protein の半減期を測定した。まず³H]-tyrosineにてlabelした筋管細胞を各種サイトカイン存在下で培養し，12時間後の筋管細胞中に残存する放射活性の割合 (細胞内放射活性残存率) を求めた。さらに細胞内放射活性残存率を縦軸に時間を横軸に半対数プロットし，50%の残存率となる時間を蛋白の半減期とした。プロテアソーム活性はグリセロール密度勾配遠心法にて活性型の26Sと不活性型の20Sに分離した後，またカテプシンBおよびB+L活性はcell

homogenate を作製後、それぞれの合成ペプチドの分解活性で測定した。プロテアソームの mRNA レベルは20S プロテアソームのサブユニット RC2, RC8と26S プロテアソームのサブユニット S4の cDNA を用い、またカテプシンBおよびLの mRNA レベルはそれぞれの cDNA を用い、Northern blotting にて定量した。

【結果】

1) 細胞内 long-lived protein の半減期は1% FBS 存在下では100 U/ml rhIL-6投与により、また0.5 mg/ml BSA 存在下では10 U/ml rhIL-6投与によりそれぞれ6%および11%短縮した。一方、TNFについては1% FBS 存在下1000 U/ml rhTNF α 投与により半減期が10%延長した。以上より、rhIL-6に蛋白分解を亢進させる作用が認められ、MPIF の1つであることが示唆された。

2) 1% FBS 存在下、100 U/ml rhIL-6投与により26S プロテアソーム、カテプシンB、B+L 活性の活性はそれぞれ31.5%、53.5%、21.3%上昇し、さらに転写レベルでもプロテアソームのサブユニット RC2, RC8, S4、カテプシンBおよびLの mRNA の発現量の増加を認めた。一方、1% FBS 存在下、1000 U/ml rhTNF α 投与では26S プロテアソーム、カテプシンB、B+L 活性の活性はそれぞれ29.7%、64.6%、54.9%低下した。しかし mRNA の発現量への影響は認められなかった。以上より、rhIL-6投与による蛋白分解の亢進には細胞内蛋白分解酵素の活性化を伴うことが明らかとなった。

【総括】

ストレス下での筋崩壊のメカニズムを解明するため、C2C12筋管細胞培養系を用い、サイトカイン蛋白分解系への影響を調べた。C2C12筋管細胞において、recombinant human IL-6は細胞内 long-lived protein の半減期を短縮させ、同時に蛋白分解酵素であるプロテアソームおよびカテプシンB、Lの活性および mRNA の発現量を増加させた。一方、TNF α には蛋白分解を亢進させる作用はみられなかった。

以上より IL-6には筋崩壊誘導因子の一つとしてストレス下の筋崩壊に深く関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は C2C12筋管細胞を用いた in vitro の系において炎症性サイトカイン (TNF α , IL-6) の蛋白分解および蛋白分解酵素への影響を解析し、ストレス下における筋崩壊過程のメカニズムを明らかにすることを目的としたものである。細胞内蛋白分解の指標として細胞内蛋白の大部分を占める long-lived protein の半減期を、また細胞内蛋白分解酵素としてプロテアソーム (26S, 20S) およびカテプシンB、Lの活性と mRNA レベルを測定した。C2C12筋管細胞培養系において recombinant human IL-6の投与により細胞内 long-lived protein の半減期は短縮し、さらに26S プロテアソーム、カテプシンB、B+L 活性の上昇とプロテアソームのサブユニット RC2, RC8, S4、カテプシンBおよびLの mRNA の発現量の増加を認めた。一方 TNF α には蛋白分解を亢進させる作用はみられなかった。以上より、IL-6に蛋白分解を亢進させる作用が認められ、同時に細胞内蛋白分解酵素の活性化を伴うことが明らかとなった。本研究は、IL-6に筋崩壊誘導因子の一つとしてストレス下の筋崩壊に深く関与していることを示したものであり、学位に値すると考える。