



Title	シスプラチンによる骨格筋萎縮発症機序に関する基礎的研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松本, 千波
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第15161号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87210
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Chinami_Matsumoto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 松本千波

学位論文題名

シスプラチンによる骨格筋萎縮発症機序に関する基礎的研究

シスプラチンは、消化器癌、肺癌など様々な癌の治療に広く使用されている抗癌剤であるが、腎障害、神経障害、内耳障害など重篤な副作用を伴うことが多く、これらは化学療法を完遂する上で大きな妨げとなる。さらに、シスプラチンが骨格筋萎縮をもたらすことがごく最近明らかとなってきた。骨格筋萎縮は、化学療法中の癌患者の QOL を低下させ、生命予後に影響を与えており、その病態解明や予防・治療法の開発は重要な課題である。

筋萎縮には、蛋白質の分解と合成を制御する多様なシグナル伝達経路が関与している。シスプラチンは、筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 と MuRF1 を活性化することが明らかになっている。しかしながら、その分子メカニズムについては不明な点が多い。一方、シスプラチンの抗癌作用並びに副作用の発症にアポトーシスが関与し、その機序にミトコンドリア障害が介在していることが示唆されている。ミトコンドリアは、アポトーシス誘導以外にも ATP 産生、活性酸素種 (ROS) 生成などの多くの細胞機能を制御する重要な役割を担っている。最近、動物実験において、シスプラチンが骨格筋のミトコンドリア障害を引き起こすことが報告されたが、その機序や筋萎縮との因果関係については検討がなされていない。

本研究では、シスプラチン誘発マウス C2C12 筋管細胞萎縮モデル (*in vitro*) を作製し、シスプラチンによる筋管細胞萎縮および筋特異的ユビキチンリガーゼの活性化とミトコンドリア障害の関連性について検討した。また、シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスに関する基礎的検討を行い、さらに補中益気湯の効果を検討した。

C2C12 筋管細胞の生存と萎縮に対するシスプラチンの影響を評価した。50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した C2C12 筋管細胞は、アポトーシスを誘導することなく細胞萎縮し、ミオシン重鎖 (MyHC) 蛋白量が減少した。また *Atrogin-1* および *MuRF1* mRNA 発現レベルが上昇した。

次に筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア障害と活性酸素生成の関連性を経時的に検討した。シスプラチン処理 2 時間後にミトコンドリア活性酸素レベルの一過性の増加が観察され、その後 24 時間まで細胞内 ROS レベルの持続的な増加が認められた。また、6 時間以降にアポトーシス制御因子 *Bax* mRNA の発現レベルが上昇し、*Bcl-2* mRNA の発現レベルが減少した。

さらに、シスプラチン処理により、ミトコンドリアの酸化的リン酸化の指標である酸素消費速度の低下、解糖の指標である細胞外酸性化速度の低下および ATP 産生の低下が認められた。

以上の結果より、シスプラチンは筋管細胞においてミトコンドリア機能障害を引き起こすことが明らかとなり、これが筋管細胞萎縮をもたらす可能性が示唆された。このことを明らかにするために、ミトコンドリアを標的とした抗酸化物質 Mitoquinone mesylate (MitoQ) の効果を検討した。MitoQ はシスプラチン処理筋管細胞において、細胞内 ROS を減少させ、*Bax* および *Bcl-2* mRNA の変化を緩和した。さらに MitoQ はシスプラチンによる *Atrogin-1* mRNA 増加を抑制し、MyHC 蛋白量を増加させた。一方、MitoQ は ATP 産生速度および細胞内 ATP 量を改善しなかった。以上より、シスプラチンによる Atrogin-1/MuRF1 活性化に

は、ミトコンドリア障害およびそれにもなう持続的な活性酸素の上昇が主要な役割を果たしていることが明らかとなった。

シスプラチンにより、*Bax/Bcl-2* 比が変動することが明らかとなったが、*Bax* は *p53* の代表的な標的遺伝子のひとつであり、*Bcl-2* の転写も *p53* で制御を受けることが報告されている。さらにミトコンドリア外膜上の *Bax* および *Bcl-2* は、ミトコンドリアへ移行した *p53* によって直接的な制御を受けること、解糖系が *p53* によって抑制されることが知られている。以上より、シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞において *p53* が活性化した可能性が示唆されたため、細胞萎縮における *p53* の関与について検討した。

シスプラチンは total *p53* および phospho-*p53* レベルを上昇させた。*p53* 特異的阻害剤 Pifithrin- α (PFT- α) は、細胞内 ROS レベルおよび *p53* 標的遺伝子である *PUMA* の発現を抑制し、*Atrogin-1* mRNA の上昇を有意に抑制したが、MyHC 蛋白量を改善させなかった。

その原因を明らかにするため、次に筋線維合成能について検討した。シスプラチンは、4種の MyHC アイソフォーム mRNA の発現をいずれも著明に低下させた。これに対して PFT- α は改善効果を示さなかったが、MitoQ には増加作用が認められ、筋線維合成能の回復が示唆された。従って、MyHC 合成能に対する MitoQ と PFT- α の効果の差が、MyHC 蛋白量への影響の差に反映されたと考えられた。すなわち、*p53* の活性化は、シスプラチンによる筋管細胞のミトコンドリア障害と筋線維蛋白分解に関与するものの、MyHC 合成能低下への関与は少ないと結論された。

次に C57BL/6J 雄マウスに 3 mg/kg シスプラチンを 4 日間腹腔内投与して筋萎縮モデルマウスを作製し、骨格筋重量とその制御因子の経日変化を検討した。腓腹筋重量は、Day4、7、14 のいずれにおいても有意な低下が認められ、シスプラチン投与によって長期間にわたり筋萎縮が持続することが明らかとなった。Day4~Day7 (傷害期) において、*Atrogin-1* mRNA 量および腓腹筋ミトコンドリア DNA 量は、それぞれ増加および低下したが、Day14 (回復期) ではいずれも回復した。一方、筋分化制御因子 *MyoD* mRNA は Day4 では変化がなかったものの、Day7 および Day14 において有意に低下した。

以上の結果から、シスプラチン投与後の傷害期には筋分解系が活性化し、その後回復するが、筋合成系は Day14 まで持続的に低下すると考えられた。

さらにシスプラチンの腓腹筋に対する影響を詳細に解析するために、遅筋線維を多く含む赤筋および速筋線維を多く含む白筋に分離し、それぞれの重量を測定した。シスプラチン投与後の傷害期では腓腹筋の赤筋および白筋ともに低下したが、その後赤筋は早期に回復傾向を示すのに対し白筋の萎縮は持続することが明らかとなった。したがって速筋線維を多く含む白筋の回復が遅れることが、シスプラチンによる持続的な筋萎縮の原因のひとつと考えられた。

最後に補中益気湯のシスプラチン誘発筋萎縮に対する効果を検討した。補中益気湯がシスプラチンによる腓腹筋重量の低下を改善させたが、その効果は白筋よりも赤筋に対してより明確であった。特に、赤筋に多く分布している MyHC アイソフォーム 7 陽性遅筋線維の断面積の増加は注目すべき点と考えられた。

本研究の成果により、シスプラチンによる筋萎縮の発症には、活性酸素の発生と *p53* 活性化によるミトコンドリアの機能低下の関与が示唆された。ミトコンドリアを保護することが、シスプラチン系化学療法による筋萎縮の予防・治療に有用であることが示唆された。