



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15161
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95124
Type	doctoral thesis
File Information	Chinami_Matsumoto.pdf



博士学位論文

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

松本 千波

北海道大学大学院生命科学院

2022年9月

目次

目次.....	1
略語表.....	3
序論.....	5
第1章 シスプラチン誘発筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア機能不全の役割	7
第1節 背景	7
第2節 材料・実験方法	9
第1項 細胞培養と実験デザイン	9
第2項 Live/Dead Cell アッセイ	9
第3項 MTS アッセイ	9
第4項 カスパーゼ 3/7 アッセイ	10
第5項 蛍光免疫染色.....	10
第6項 ウェスタンブロット解析.....	10
第7項 RNA 抽出と RT-PCR.....	11
第8項 ミトコンドリア量測定と膜電位アッセイ	12
第9項 活性酸素レベルの評価.....	13
第10項 ATP アッセイ	13
第11項 XFp 細胞外フラックス測定	13
第12項 メタボローム解析.....	15
第13項 データおよび統計解析.....	16
第3節 実験結果	17
第1項 シスプラチンによる C2C12 筋管細胞の萎縮.....	17
第2項 シスプラチンによる C2C12 筋管細胞のミトコンドリア機能障害	19
第3項 ターゲットメタボロミクス	25
第4項 シスプラチン誘発筋管細胞萎縮に対する MitoQ の効果.....	26
第4節 考察	29
第2章 シスプラチン誘発筋管細胞萎縮における p53 の役割	35
第1節 背景	35
第2節 材料・実験方法	37
第1項 細胞培養と実験デザイン	37
第2項 ウェスタンブロット解析.....	37
第3項 RNA 抽出と RT-PCR.....	38

第4項	XFp 細胞外フラックス測定	39
第5項	活性酸素レベルの評価	40
第6項	ミトコンドリア量測定と膜電位アッセイ	40
第7項	データおよび統計解析	41
第3節	実験結果	42
第1項	シスプラチンによる C2C12 筋管細胞における p53 の活性化	42
第2項	シスプラチンによる解糖系低下に対する p53 阻害剤 PFT- α の効果	43
第3項	シスプラチンによるミトコンドリア機能障害に対する PFT- α の効果	44
第4項	C2C12 筋管細胞における p53 標的遺伝子の発現に対する PFT- α の効果	45
第5項	C2C12 筋管細胞における筋萎縮関連遺伝子の発現に対する PFT- α の効果	46
第6項	C2C12 筋管細胞における MyHC アイソフォーム遺伝子発現に対する MitoQ と PFT- α の効果	47
第4節	考察	50
第3章	シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスに関する基礎的研究と補中益気湯の効果	54
第1節	背景	54
第2節	材料・実験方法	55
第1項	実験動物	55
第2項	薬剤投与	55
第3項	測定・解剖	55
第4項	RNA 抽出と RT-PCR	56
第5項	ミトコンドリア DNA レベルの測定	57
第6項	免疫染色	58
第7項	データおよび統計解析	58
第3節	実験結果	59
第1項	シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスの病態解明	59
第2項	補中益気湯のシスプラチン誘発筋萎縮に対する効果	65
第4節	考察	70
総括		75
参考文献		77
謝辞		91

略語表

AhR	aryl hydrocarbon receptor
ASK1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	adenosine triphosphate
Bax	Bcl-2-associated X protein
cDNA	complementary DNA
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ECAR	extracellular acidification rate
eIF3-f	eukaryotic translation initiation factor 3-subunit F
FCCP	carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone
FOXO	forkhead box-O
GC-MS/MS	gas chromatography–tandem mass spectrometry
HET	hochuekkito (補中益氣湯)
IGF-1	insulin-like growth factor-1
JNK	c-Jun N-terminal kinases
MitoQ	Mitoquinone mesylate
mtDNA	mitochondria DNA
mTOR	mechanistic target of rapamycin
MuRF1	muscle RING finger 1
MyHC	myosin heavy chain
MyoD	myoblast determination protein 1
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1
NOX	NADPH oxidase
OCR	oxygen consumption rate
PFT- α	Pifithrin- α
Pgc-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor, gamma coactivator-1 α

phospho-p53	phosphorylated p53
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
QOL	quality of life
ROS	reactive oxygen species
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
Sod2	superoxide dismutase 2
SPE	Solid Phase Extraction
TCA	tricarboxylic acid
Tfam	mitochondrial transcription factor A
Tigar	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator

序論

骨格筋は、運動、姿勢保持、代謝のホメオスタシス、熱産生のための重要な器官であり、体重の約 40%、総タンパク質の 50%を占めている¹⁾。骨格筋の機能を維持することは、全身の健康を維持するために不可欠である。骨格筋の維持には、筋タンパク質合成と筋タンパク質分解のバランスを保つ必要があり、多様な機序がこのバランスの維持に関わっている。

骨格筋の量は、生後の発育過程で個々の筋線維の肥大という過程を通じて増加する²⁾。筋肥大は、全体的な筋タンパク質合成速度が筋タンパク質分解速度を上回ったときに起こる。筋タンパク質合成を制御するシグナル伝達経路で中心的な役割を果たすのが、インスリン様成長因子 1 (IGF-1) による PI3K/Akt/mTOR シグナル経路の活性化である²⁻⁴⁾。

一方、筋萎縮は筋タンパク質の分解速度が筋タンパク質合成速度を上回ったときに起こり、ユビキチン-プロテアソーム系、オートファジー系、カルパイン系の主要な 3 つのタンパク質分解経路が活性化され、筋量の減少に様々な形で寄与している。特にユビキチン-プロテアソーム系経路には、様々な筋萎縮関連遺伝子が関与しており、それらは Akt によって負に制御される FOXOs や、炎症性サイトカインによって活性化される NF- κ B などの特定の転写因子によって制御されている^{1-3, 5)}。

骨格筋量は、栄養状態、ホルモンバランス、身体活動/運動、および損傷や疾患などの要因の影響を受けやすい⁶⁾。加齢^{7, 8)}、廃用症候群^{9, 10)}をはじめ、がん化学療法^{11, 12)}、がん悪液質¹³⁾、糖尿病¹⁴⁾、腎不全¹⁵⁾、心不全¹⁶⁾、後天性免疫不全症候群¹⁷⁾、慢性閉塞性肺疾患¹⁷⁾、などの様々な疾患において、骨格筋の筋タンパク質合成と分解の不均衡を誘発し、筋萎縮に至ることが知られている。筋萎縮は、しばしば日常生活に支障をきたし、病状の悪化につながることもあるが、現在までのところ有効な治療法は確立されていない。

厚生労働省「(2020) 人口動態統計 (確定数) の概況」によると、2020 年にがんで死亡した人は全死因の 27.6%に当たり、日本においては 4 人に 1 人はがんで死亡している。癌の治療には、手術療法、放射線療法、化学療法があり、日々進歩しているが、これらの治療

後による全身衰弱は、筋萎縮や筋力低下を引き起こす。やがては廃用症候群に陥ることもあり、患者の筋萎縮が重要な問題になりつつある。

近年、化学療法剤による骨格筋障害の発生に注目が集まっている¹⁸⁻²⁰⁾。シスプラチン化学療法は二次的なサルコペニアを引き起こすことがあり、患者の生活の質（QOL）に悪影響を与えることが明らかになっている^{21,22)}。

シスプラチンは 1970 年代に開発された抗がん剤であるが、現在においても消化器癌、肺癌、頭頸部癌、精巣癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌など様々な癌に対して、標準的化学療法薬として使用されている。マウスにシスプラチンを投与すると、筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 ならびに Muscle RING finger 1（MuRF1）の活性化に伴い骨格筋萎縮が起こることが最近の研究から明らかとなっているが²³⁻²⁶⁾、その分子メカニズムについては不明な点が多い。Sirago ら²⁷⁾は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をはじめて報告したが、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。

そこで本研究では、シスプラチンによる筋萎縮メカニズムの解明が筋萎縮の予防や治療方法の確立につながる重要な意味を持つと考え、シスプラチン誘発 C2C12 筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア障害の役割について検討した。また、シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスの病態を解明するとともに、補中益気湯の有用性について検討を行った。

第1章 シスプラチン誘発筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア

機能不全の役割

第1節 背景

シスプラチンは、消化器癌、肺癌、頭頸部癌、精巣癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸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。シスプラチンの主な抗癌機序は、DNA のグアニン-N-7 位への結合による DNA の鎖内架橋で、DNA 合成、複製、翻訳を阻害し、腫瘍細胞の細胞分裂の阻害とアポトーシス誘導を引き起こすことが報告されている²⁸⁻³⁰⁾。シスプラチンの基本的な抗癌作用は DNA 損傷であると考えられているが、近年の研究により、細胞代謝、免疫調節、細胞内タンパク質や細胞内小器官への作用、腫瘍細胞とその微小環境との細胞間コミュニケーションへの干渉など、いくつかの別の機構も明らかになっている³¹⁾。シスプラチン化学療法は、腎毒性、耳毒性、神経毒性などの重篤な副作用を有するが^{32,33)}、これらに加えて、近年、骨格筋障害の発生に注目が集まっている¹⁸⁻²⁰⁾。シスプラチン化学療法は二次的なサルコペニアを引き起こし、患者の QOL に悪影響を与えることが明らかになっている^{21,22)}。

筋萎縮には、タンパク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。これまでの研究から、シスプラチンは、筋特異的ユビキチンリガーゼである Atrogin-1 と MuRF1 を活性化することにより骨格筋量を減少させることが明らかとなっている^{18, 20, 23-26)}。これらのユビキチンリガーゼは、筋萎縮の重要な制御因子である筋萎縮原因遺伝子群 (atrogenes) の主要な構成因子であり、多くの場合、転写因子の FOXO ファミリーによって制御されている。シスプラチンによる筋萎縮に関しては、FOXO1 および/または FOXO3a が重要な調節因子として認識されている^{23, 26, 34, 35)}。しかしながら、シスプラチンによる FOXO1/3a および筋特異的ユビキチンリガーゼの活性化に至る分子メカニズムはいまだ解

明されていない。

ミトコンドリアは、ATP 産生、活性酸素種 (ROS) 制御、アポトーシス誘導など、多くの細胞機能を制御する重要な役割を担っている³⁶⁾。これらのミトコンドリア機能の低下は、加齢に伴うサルコペニア³⁷⁻³⁹⁾や廃用性筋萎縮^{40, 41)}に関与することが示されている。最近の動物実験で、Sirago らはミトコンドリア障害がシスプラチン治療中に発生すると報告した²⁷⁾。しかしながら、彼らはミトコンドリア機能障害が MuRF1 や Atrogin-1 の活性化をもたらす機序を明らかにしておらず、ミトコンドリア機能障害と筋萎縮の因果関係についても検討をおこなっていない。

そこで本研究では、C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア機能、すなわち ATP 産生、細胞エネルギー代謝、活性酸素制御、アポトーシス誘導に対するシスプラチンの影響を明らかにすることを目的とした。さらに、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤 Mitoquinone mesylate (MitoQ)⁴²⁻⁴⁵⁾の有効性を検討し、シスプラチン誘発筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア障害の役割について検討した。

第2節 材料・実験方法

第1項 細胞培養と実験デザイン

マウス C2C12 筋芽細胞は、株式会社ケー・エー・シーより購入した。C2C12 筋芽細胞は、10%ウシ胎児血清（JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA）およびペニシリン-ストレプトマイシン（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM ; Thermo Fisher Scientific）中で 37°C, 5% CO₂ で培養した。C2C12 筋芽細胞を筋管細胞に分化させるために、培養液を DMEM+2%ウマ血清（Thermo Fisher Scientific）からなる分化培地に交換し、5 日間インキュベートした。分化誘導の間、筋芽細胞の分化培地は約 2 日に一度、新鮮な培地に交換した。分化後、筋管細胞はシスプラチン（479306 ; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA）または溶媒（0.02% DMSO）で処理し、その後、解析に供した。Mitoquinone mesylate（MitoQ ; HY-100116A）は、MedChemExpress（Monmouth Junction, NJ, USA）から購入した。MitoQ（0.16, 0.4 μmol/L）は、シスプラチン添加の 30 分前に添加した。

第2項 Live/Dead Cell アッセイ

Live/Dead Cell Staining Kit II（PK-CA707-30002 ; PromoCell, Heidelberg, Germany）を用いて生細胞率および死細胞率を測定した。C2C12 筋管細胞（ 4.5×10^4 個/cm²）を 6.25–50 μmol/L シスプラチンで 24 時間処理した後、キットに付属するプロトコルに従って、2 μmol/L Calcein-AM / 4 μmol/L EthD-III 染色液中で室温にて 30 分インキュベートした。Calcein-AM は生細胞を緑色に染色し（Ex/Em = 485/525 nm）、EthD-III は死細胞を赤色に染色する（Ex/Em = 544/612 nm）。蛍光は Flex station 3 multimode microplate reader（Molecular Devices, San Jose, CA, USA）を用いて測定した。

第3項 MTS アッセイ

細胞生存率は、CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay kit（G3580 ;

Promega Corporation, Madison, WI, USA) に付属する MTS 試薬を用いて測定した。C2C12 筋管細胞 (1.5×10^4 個/cm²) を 6.25–50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理し、製造元のプロトコルにしたがって MTS 試薬を添加した。Infinite 200 PRO マイクロプレートリーダー (Tecan, Grödig, Austria) を用いて、490 nm の吸光度を測定した。

第 4 項 カスパーゼ 3/7 アッセイ

C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 12.5–100 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理し、Amplite Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit (13502 ; AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) でメーカーのプロトコルにしたがって Caspase 3/7 活性を測定した。蛍光は Infinite 200 PRO マイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて Ex/Em = 350/450 nm で測定した。

第 5 項 蛍光免疫染色

C2C12 筋管細胞 (3.7×10^4 個/cm²) を 12.5–50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理し、4%パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液で室温にて 30 分間固定した。リン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄後、一次抗体として 10 μ g/mL マウス抗ヒトミオシン重鎖 (myosin heavy chain : MyHC) モノクローナル抗体 (MAB4470 ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で室温にて 3 時間インキュベートした。2 μ g/mL の濃度の蛍光標識二次抗体 Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (A-11029 ; Thermo Fisher Scientific) を加え、室温で 1 時間インキュベートした。MyHC の染色画像は、BZ-9000 HS オールインワン蛍光顕微鏡 (株式会社キーエンス、日本、大阪) を用いて取得した。各処理の各ウェルから筋管細胞 24 本を無作為に選択し、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) を用いて短径を測定し、1 ウェルあたりの平均値を算出した。

第 6 項 ウェスタンブロット解析

プロテアーゼ阻害剤とセリンホスファターゼ阻害剤を含む Cell Lysis Buffer (10 $\times$) (9803 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて、50 μ mol/L シスプラチン処

理 24 時間後の C2C12 筋管細胞 (3.7×10^4 個/cm²) からタンパク質を単離した。MyHC の含量は、キャピラリーベースの自動サイズ分離およびナノイムノアッセイシステムである Jess Simple Western System (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) を用いて評価した。分析は特に断りのない限り、製造元の標準的な方法に従って行った。等量の細胞溶解液 (約 900 µg/mL) を 0.1×サンプルバッファーと Fluorescent 5×Master mix (ProteinSimple) を 8 : 12 : 5 の割合で混合し、95°C で 5 分間変性させた。単離したタンパク質を 12-230-kDa Jess Separation Module (SM-W004 ; ProteinSimple) を用いて分離し、5 µg/mL anti-MyHC 抗体 (MAB4470 ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) で 30 分間プロービングを行った。結合した MyHC は、Anti-Mouse Detection Module (DM-002 ; ProteinSimple) を用いて検出した。その後、RePlex Module (RP-001 ; ProteinSimple) を用いて一次抗体と二次抗体を除去し、10 µg/mL の抗 GAPDH 抗体 (AF5718 ; Novus Biologicals, LLC, Centennial, CO, USA) でプロットを 30 分間再プロービングした。結合した抗 GAPDH 抗体は Anti-Goat Detection Module (DM-006 ; ProteinSimple) を用いて検出した。ピーク面積は Compass Simple Western software, version 5.0.1 (ProteinSimple) を用いて自動計算したが、手動設定でベースラインを調整し、それぞれのピーク面積を GAPDH のピーク面積で補正した。

第 7 項 RNA 抽出と RT-PCR

C2C12 筋管細胞 (3.7×10^4 個/cm²) を 6.25–50 µmol/L シスプラチンで 2、6、24 時間処理し、RNeasy Mini Kit (74106 ; QIAGEN, Valencia, CA, USA) に付属する Buffer RLT と 2-mercaptoethanol を加えて溶解させた。細胞溶解液をボルテックスで混合し、QIAshredder spin column (79656 ; QIAGEN) を用いてホモジナイズした。RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit を使用して行った。C2C12 筋管細胞から抽出した RNA を約 110 ng/µL に希釈し、70°C で 15 分間インキュベートした後、4°C に冷却した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA を相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。リアルタイム定量 PCR アッセイは、TaqMan Fast Advanced Master Mix (4444557 ; Thermo

Fisher Scientific)および遺伝子特異的 TaqMan プライマー/プローブ (Thermo Fisher Scientific) と QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。プライマー/プローブの情報は表 1 に記載した。18s rRNA は内在性コントロールとして用い、mRNA 発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

表 1 RT-PCR に使用するプライマー

Target	Gene name	Assay ID
Rn18s	18S ribosomal RNA	Mm04277571_S1
Atrogin-1 (Fbxo32)	F-box protein 32	Mm00499523_m1
MuRF1 (Trim63)	tripartite motif-containing 63	Mm01185221_m1
Foxo1	forkhead box O1	Mm00490672_m1
Foxo3	forkhead box O3	Mm01185722_m1
Foxo4	forkhead box O4	Mm00840140_g1
Bax	BCL2-associated X protein	Mm00432051_m1
Bcl2	B cell leukemia/lymphoma 2	Mm00477631_m1
Pgc-1 α	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1	Mm01208835_m1
Tfam	transcription factor A, mitochondrial	Mm00447485_m1
Sod2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Mm01313000_m1

第 8 項 ミトコンドリア量測定と膜電位アッセイ

C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 50 μ mol/L シスプラチンで 6 時間または 24 時間処理した。ミトコンドリアの量は、緑色の蛍光 (Ex/Em = 485/525 nm) を発するミトコンドリア染色色素である MitoGreen 試薬 (PK-CA707-70054 ; PromoCell) を用いて評価した。50 nmol/L MitoGreen をシスプラチン処理した細胞に添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。Image-iT TMRM 試薬 (I34361 ; Thermo Fisher Scientific) を用いてミトコンドリア膜電位を測定した。TMRM は細胞透過性の蛍光色素 (Ex/Em = 544/590 nm) であり、膜電位に異常を認めない活動性のミトコンドリアに蓄積される。細胞を 100 nmol/L TMRM とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。両アッセイとも、蛍光強度は Flex station 3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第9項 活性酸素レベルの評価

C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 50 μ mol/L シスプラチンで 0.5、2、6、24 時間処理した。シスプラチン処理後のミトコンドリアのスーパーオキシドレベルは、1 μ mol/L MitoSOX (M36008 ; Thermo Fisher Scientific) を 37°C で 10 分間インキュベーションして評価した。蛍光プローブとインキュベートした後、Infinite 200 PRO マイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて、Ex/Em = 510/580 nm で蛍光強度を測定した。細胞内 ROS 生成は、CM-H₂DCFDA (C6827 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。5 μ mol/L CM-H₂DCFDA をシスプラチン処理後の細胞に添加し、その後 37°C で 30 分間インキュベートした。蛍光強度は、Flex station 3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて、Ex/Em = 485/525 nm で測定した。

第10項 ATP アッセイ

細胞内 ATP 産生は Intracellular ATP 測定キット Ver.2 (IC2 100 ; 東洋ビーネット株式会社, 東京, 日本) を用いて評価した。C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 50 μ mol/L シスプラチンで 2、6 または 24 時間処理し、プロトコルに従って発光アッセイに供した。発光強度は、Infinite 200 PRO マイクロプレートリーダー (Tecan) を用いて測定した。

第11項 XFp 細胞外フラックス測定

C2C12 筋管細胞の酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸性化速度 (ECAR) は、XFp 細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定した。ミトコンドリア機能は、Seahorse XFp Mito Stress Test Kit (103010-100 ; Agilent Technologies) を用いて評価した。解糖の評価には、Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit (103017-100 ; Agilent Technologies) を用いた。Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit (103591-100 ; Agilent Technologies) を用いて、ミトコンドリア呼吸による ATP 産生速度と解糖による ATP

産生速度を測定した。センサーカートリッジは実験前日に水に浸し、CO₂フリーのインキュベーター内で 37°C にて一晩インキュベートした。実験の 2 時間前に水をキャリブレーション溶液と交換し、再び 37°C の CO₂ フリーインキュベーターに設置した。C2C12 筋芽細胞を 1×10^5 個/cm² の密度で XFp ミニプレートに播種し、上記のように筋管細胞に分化させた。50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理した後、以下に述べるアッセイに供した。得られたデータは、Pierce BCA Protein Assay (23225 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定したタンパク質量で補正した。

1) ミトコンドリア評価

ミトコンドリアの評価は、Seahorse XFp Mito Stress Kit を用いて行った。本製品はミトコンドリア機能を評価するための試薬キットである。実験当日、Seahorse XFp DMEM 培地、pH 7.4 (103575-100 ; Agilent Technologies) に 1 mmol/L ピルビン酸塩、2 mmol/L グルタミン、10 mmol/L グルコースを加え、アッセイ培地を調製した。OCR の測定には、ATP 合成酵素阻害剤オリゴマイシン、脱共役剤 Carbonyl cyanide-4 (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP)、ミトコンドリア複合体 I 阻害剤ロテノン/ミトコンドリア複合体 III 阻害剤アンチマイシン A の混合物をメーカーの説明とプロトコルに従って添加した。

2) 解糖評価

解糖の評価には、Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit を使用した。これは、細胞への糖取り込み量に応じて解糖能力を評価することができる試薬キットである。実験当日、Seahorse XFp DMEM 培地に 2 mmol/L のグルタミンを添加し、アッセイ用培地を調製した。ECAR の測定には、グルコース、オリゴマイシン、解糖阻害剤 2-デオキシ-D-グルコースをメーカーの説明書およびプロトコルに従って添加した。

3) ミトコンドリア呼吸および解糖による ATP 産生速度の評価

Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit を用いて、ミトコンドリアと解糖の ATP 産生速度を測定した。このキットは、生細胞のミトコンドリア呼吸と解糖による ATP 産生速度をリアルタイムで定量することができる。実験当日、Seahorse XFp DMEM 培地に 1 mmol/L

ピルビン酸塩、2 mmol/L グルタミン、10 mmol/L グルコースを加えてアッセイ用培地を調製した。ミトコンドリア呼吸と解糖による ATP 産生速度を測定するために、オリゴマイシンとロテノン／アンチマイシン A 混合物をメーカーの説明書とプロトコルに従って添加し、その後、OCR と ECAR についてモニターした。ミトコンドリア呼吸に基づく OCR、解糖に基づく ECAR、mitoATP 産生速度、glycoATP 産生速度、総 ATP 産生速度は、Wave ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いて算出した。

第 12 項 メタボローム解析

SGL-M100 自動誘導体化システム (AiSTI SCIENCE, 和歌山県) とガスクロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (GC-MS/MS) を用いて、C2C12 筋管細胞中の代謝物を分析した。Vehicle または 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した C2C12 細胞 (3.7×10^4 個/ cm^2) に、内部標準として用いた 5 $\mu\text{g/mL}$ 2-isopropylmalic acid を含む 80%アセトニトリル 1 mL を添加した。氷上で 10 分間インキュベートした後、抽出液を回収し、遠心分離した。上清をバイアル瓶に移し、メタボローム解析に供した。解析は既報の方法に基づいて行った^{46,47)}。抽出された試料はイオン交換 Solid Phase Extraction (SPE) カートリッジにロードされ、目的の代謝物は SPE 内に保持された。Methoxyamine/pyridine、N-methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide を順次 SPE に直接添加し、代謝物の誘導体化を行った。誘導体化した代謝物を GCMS-TQ8040 システム (島津製作所、日本、京都) と膜厚 0.25 μm の BPX5 溶融シリカキャピラリーカラム (SGE、オーストラリア、メルボルン) を用いてメタボローム解析に供した。分析条件、クロマトグラムの取得、波形処理については、Kitagawa らが既にまとめている⁴⁶⁾。検出された各イオンのピーク強度を計算し、2-isopropylmalic acid のピーク強度により正規化した。さらに正規化した値を用いて解析を行った。メタボロームデータのクラスタリング解析は、MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>)⁴⁸⁾を用いて行い、クラスタリングアルゴリズムとして Ward's linkage を使用した。

第 13 項 データおよび統計解析

統計解析は GraphPad Prism software, version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均値±標準偏差 (SD) で表した。2 群間の統計解析は Student's t-test または Welch's t-test を用いて行った。多群の平均値の差は、Dunnett 検定または二元配置分散分析、それに続く Tukey 検定を用いて評価した。統計的有意性の水準は $p < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 シスプラチンによる C2C12 筋管細胞の萎縮

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。6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理したところ、最高用量のシスプラチン (50 $\mu\text{mol/L}$) 処理では、Calcein-AM 陽性の生細胞が Vehicle (対照) に比べ 15% 減少したが (図 1A)、EthD-III 陽性の死細胞は増加しなかった (図 1B)。ミトコンドリア脱水素酵素活性に比例する MTS ベースの代謝生存率アッセイでは、50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチン処理後、MTS シグナルの 16% の低下が見られた (図 1C)。一方、カスパーゼ 3/7 活性は、50 $\mu\text{mol/L}$ 以下の濃度のシスプラチンで 24 時間処理しても影響を受けなかった (図 1D)。50 $\mu\text{mol/L}$ のシスプラチンで処理すると、C2C12 筋管細胞の短径は、対照の C2C12 筋管細胞と比較して 72.6% と有意に減少し ($p < 0.001$; 図 1E)、MyHC のタンパク質レベルが低下した ($p < 0.05$; 図 1F)。細胞生存率アッセイでは、シスプラチン処理後に Calcein-AM 陽性細胞および MTS シグナルのわずかな減少が観察されたが、これらは細胞死を示すものではなく、シスプラチンによる C2C12 筋管細胞の細胞体積およびミトコンドリア機能の減少に起因すると思われる。従って、この結果はシスプラチンが細胞生存率に影響を与えることなく筋萎縮を誘導できることを示唆している。

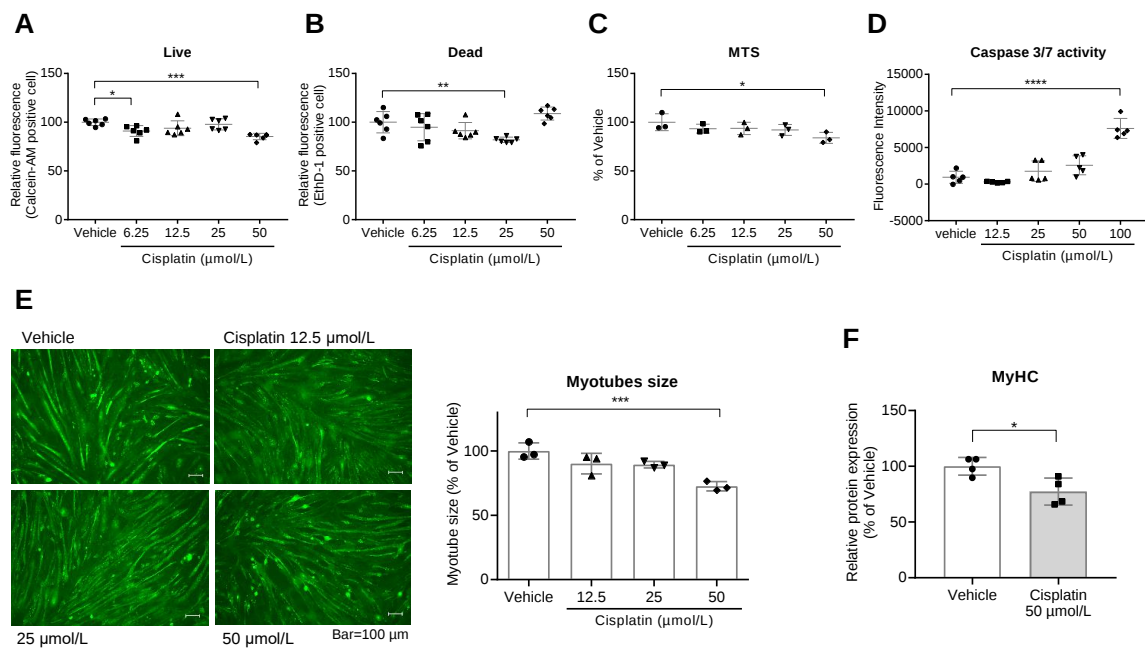


図 1 シスプラチンで処理した C2C12 筋管細胞の生存と萎縮の評価

(A および B) シスプラチン処理 24 時間後の C2C12 筋管細胞の生存率 (A : Calcein-AM 陽性細胞) および死細胞率 (B : EthD-III 陽性細胞) を Live/Dead Cell Staining Kit II を用いて測定した ($n = 6$)。 (C) シスプラチン処理 24 時間後の C2C12 筋管細胞の代謝生存率は MTS を用いて評価した ($n = 3$)。 (D) カスパーゼ 3/7 活性は、Fluorimetric Caspase 3/7 Assay Kit を用いて、C2C12 筋管細胞を 12.5–100 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで処理した 24 時間後に測定した ($n = 5$)。 (E) シスプラチンで 24 時間処理した筋管細胞における MyHC の蛍光免疫染色。C2C12 筋管細胞の短径の比較を示した。各処理の各ウェルから筋管細胞 24 個をランダムに選択し、その短径を測定した ($n = 3$)。Bar : 100 μm 。 (F) シスプラチン処理 24 時間後の C2C12 筋管細胞における MyHC タンパク質発現量 ($n = 4$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. Vehicle。

筋タンパク質の分解と筋萎縮を媒介する 2 つの筋特異的ユビキチンリガーゼである *Atrogin-1* と *MuRF 1* の mRNA の発現レベルは、25 $\mu\text{mol/L}$ と 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンによる 24 時間の処理後に有意に上昇した (図 2A および 2B)。また、*Foxo1* mRNA レベルに変化はなかったが、*Foxo3a* および *Foxo4* mRNA レベルがシスプラチン 24 時間処理後に顕著に増加した (図 2C)。これらの結果は、シスプラチンによる筋萎縮が FOXO 経路を介して起こることを示唆している。

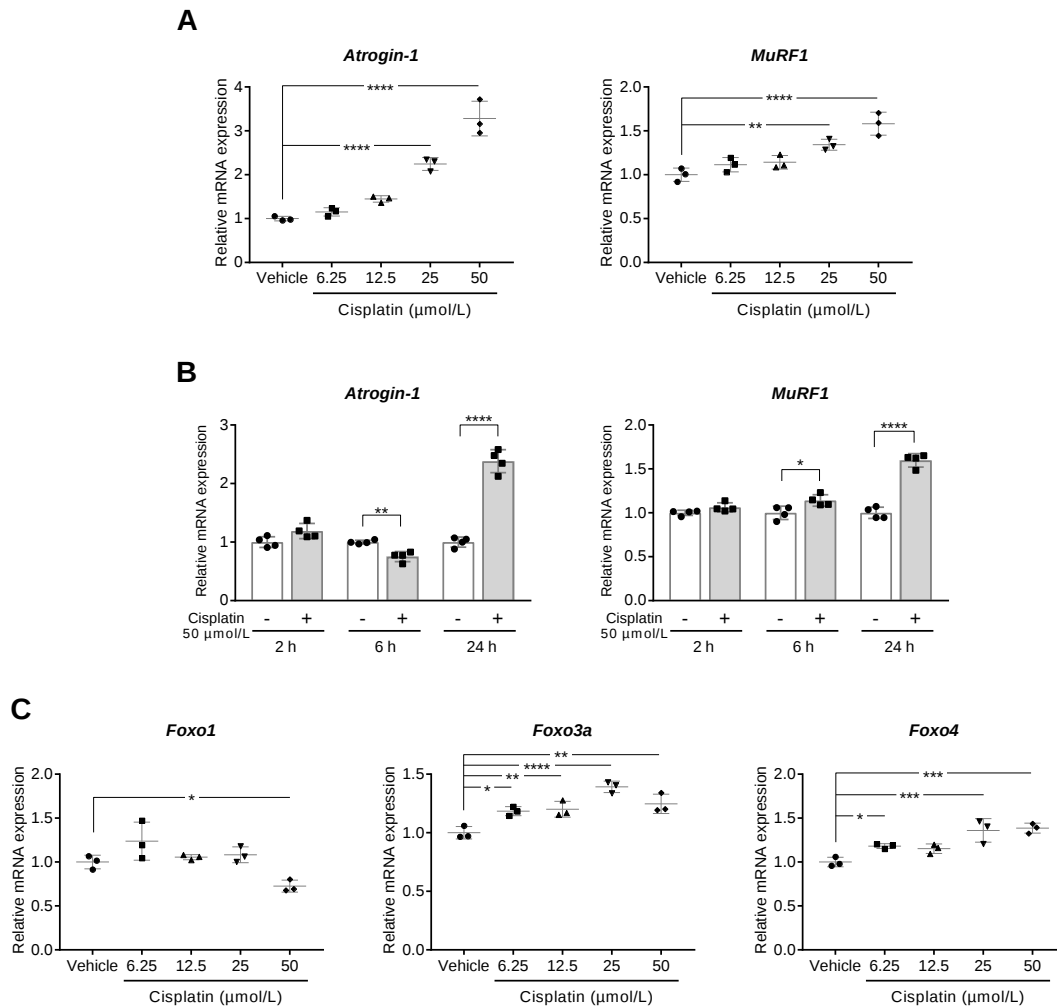


図2 C2C12 筋管細胞におけるユビキチン-プロテアソーム系に対するシスプラチンの影響

(A) 6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した C2C12 筋管細胞におけるユビキチンリガーゼ *Atrogin-1* と *MuRF1* mRNA 発現レベル ($n=3$)。 (B) 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 2、6、24 時間処理した C2C12 筋管細胞におけるユビキチンリガーゼ *Atrogin-1* と *MuRF1* mRNA 発現レベル ($n=4$)。 (C) 6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した C2C12 筋管細胞における FOXO ファミリー *Foxo1*、*Foxo3a*、*Foxo4* の mRNA 発現 ($n=3$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。 $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, $****p<0.0001$ vs. Vehicle。

第2項 シスプラチンによる C2C12 筋管細胞のミトコンドリア機能障害

50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで処理した C2C12 筋管細胞は、6 時間後はミトコンドリア量と膜電位に変化がなかったが、24 時間には両者ともに有意に低下した。(図 3A および 3B)。一方、6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 6 時間または 24 時間処理すると、ミトコンドリアの

プロアポトーシス制御因子である Bcl-2-associated X protein (*Bax*) の発現レベルが上昇し、*Bcl-2* の発現レベルはシスプラチン処理の濃度および時間依存的に減少した (図 3C および 3D)。興味深いことに、ミトコンドリアの新生や活性酸素除去にかかわるペルオキシソーム増殖因子活性化レセプター γ 共役因子-1 α (*Pgc-1 α*)、ミトコンドリア転写因子 A (*Tfam*)、ミトコンドリア局在スーパーオキシドディスムターゼ 2 (*Sod2*) の遺伝子発現レベルの上昇が認められた (図 3E)。これらは、*Bax/Bcl-2* 上昇にともなうアポトーシス誘導シグナルに拮抗して、アポトーシスを回避するように働いている可能性が高く、このことが 6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチン処理では *Bax/Bcl-2* が上昇するにもかかわらずアポトーシスが誘導されない理由のひとつと考えられる。

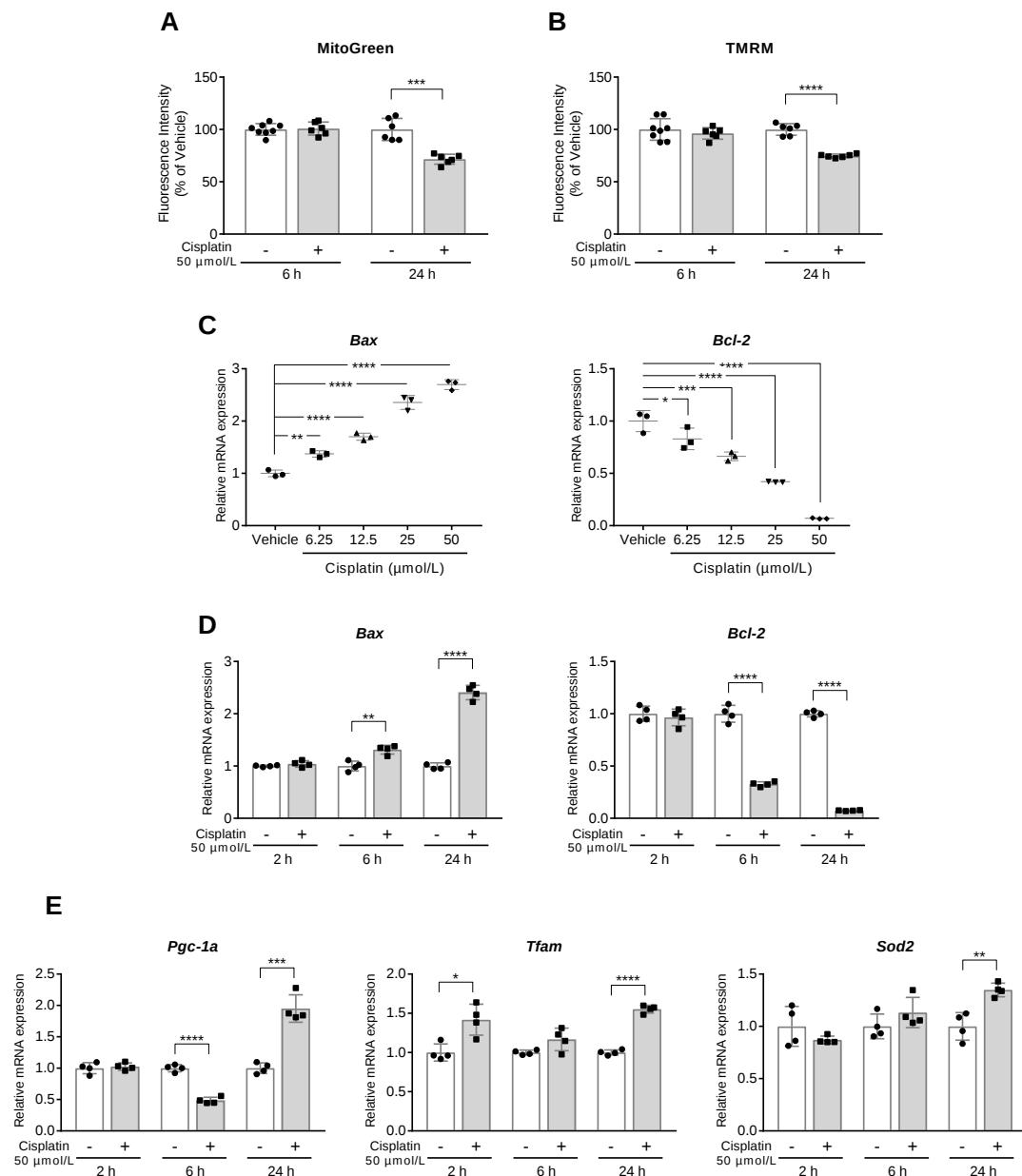


図 3 C2C12 筋管細胞におけるシスプラチン誘発ミトコンドリア障害

(A および B) C2C12 筋管細胞を 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 6、24 時間処理した。ミトコンドリア量 (A) およびミトコンドリア膜電位 (B) は MitoGreen および TMRM 蛍光色素を用いて測定した ($n = 6-8$)。 (C) C2C12 筋管細胞を 6.25-50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した。ミトコンドリアアポトーシス制御因子 *Bax* および *Bcl-2* の mRNA 発現 ($n = 3$)。 (D) C2C12 筋管細胞を 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 2、6、24 時間処理した。*Bax* および *Bcl-2* の mRNA 発現 ($n = 4$)。 (E) C2C12 筋管細胞を 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 2、6、24 時間処理した。ミトコンドリア関連遺伝子 *Pgc-1 α* 、*Tfam*、*Sod2* の mRNA 発現 ($n = 4$)。数値は平均値 $\pm$ SD で示した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. Vehicle。

次に、ミトコンドリアのスーパーオキシドレベルを MitoSOX で、細胞内 ROS レベルを CM-H₂DCFDA で測定し、ミトコンドリア ROS 生成と筋萎縮の関連性を検討した。C2C12 細胞のミトコンドリアスーパーオキシドレベルは、シスプラチン処理 2 時間後に一時的に 1.3 倍に増加したが、6 時間後と 24 時間後には基礎値に戻った (図 4A)。細胞内活性酸素レベルの増加は、シスプラチン処理 2 時間後に検出され、シスプラチン処理後 24 時間まで上昇したままであった (図 4B)。一方、細胞内 ATP 産生量はシスプラチン処理 6 時間後に上昇したが、シスプラチン処理 24 時間後には、Vehicle と比較して有意に減少した ($p < 0.001$; 図 4C)。

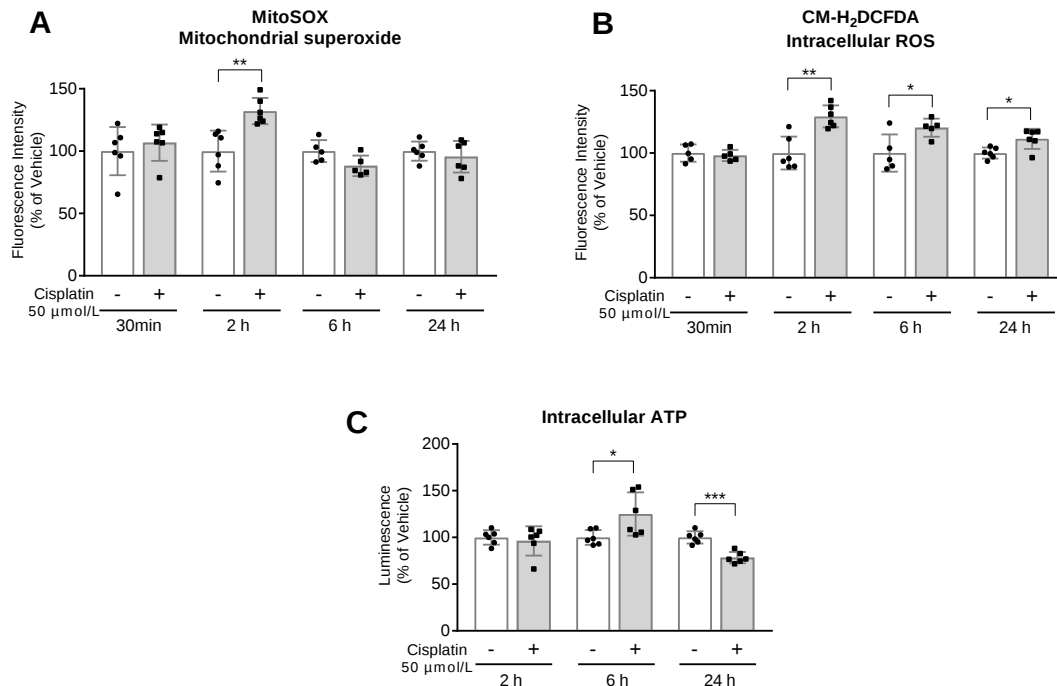


図 4 C2C12 筋管細胞にシスプラチンを処理した場合の活性酸素生成と細胞内 ATP 産生

(A) C2C12 筋管細胞を vehicle または 50 μ mol/L シスプラチンで 0.5、2、6、24 時間処理し、MitoSOX 蛍光プローブを用いてミトコンドリアのスーパーオキシドレベルを測定した ($n = 5-6$)。 (B) C2C12 筋管細胞を vehicle または 50 μ mol/L シスプラチンで 0.5、2、6、24 時間処理し、CM-H₂DCFDA を用いて細胞内 ROS レベルを測定した ($n = 5-6$)。 (C) C2C12 筋管細胞を vehicle または 50 μ mol/L シスプラチンで 2、6、24 時間処理し、発光 ATP アッセイを用いて細胞内 ATP 産生量を測定した ($n = 6$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. Vehicle。

ミトコンドリアの酸化的リン酸化の指標として OCR を測定した (図 5A (I))。シスプラチン処理により、基礎呼吸量 ($p < 0.01$; 図 5A (II))、電子輸送系の最大呼吸能 ($p < 0.05$; 図 5A (III)) および ATP 産生速度 ($p < 0.01$; 図 5A (IV)) が低下し、プロトンリークが制限される ($p < 0.05$; 図 5A (V)) ことが確認された。一方、その後、解糖の指標として ECAR を測定した (図 5B (I))。シスプラチンは、解糖能 ($p < 0.05$; 図 5B (II)) および最大解糖能 ($p < 0.05$; 図 5B (III)) を有意に低下させた。しかし、解糖予備能には変化が見られなかった (図 5B (IV))。ATP rate assay では、シスプラチン処理ではミトコンドリア ATP 産生速度、解糖系 ATP 産生速度、総 ATP 産生速度がそれぞれ約 40%、50%、40%低下した (図 5C (I)、5C (II)、5C (III))。

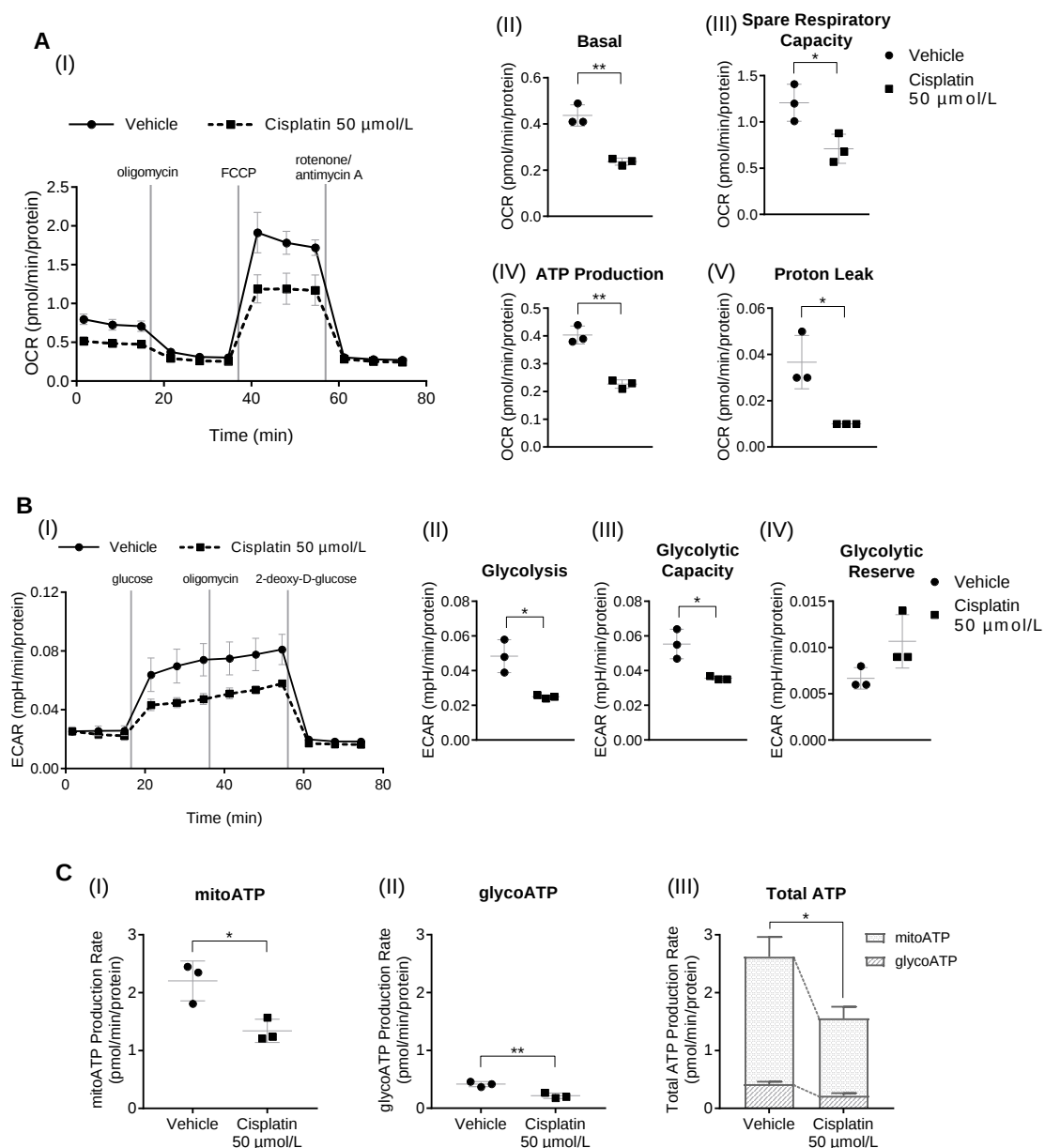


図 5 シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア機能および解糖の障害

Vehicle または 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した C2C12 筋管細胞における OCR および ECAR のリアルタイム測定。測定は細胞外フラックスアナライザーを用い、タンパク質量で補正した。(A) ミトコンドリア機能の評価。OCR は、基礎条件下においてオリゴマイシン、FCCP、ロテノン/アンチマイシン A を指示した時点で順次添加した後に測定した。データは、シスプラチン処理の C2C12 筋管細胞の OCR の時間経過 (I)、基礎呼吸能 (II)、最大呼吸能 (III)、ATP 産生速度 (IV)、プロトンリーク (V) を Vehicle と比較して示した。(B) 解糖の評価。ECAR は、基礎条件下においてグルコース、オリゴマイシン、解糖阻害剤 2-デオキシ-D-グルコースを順次注入した後、指示した時点で測定した。データは、シスプラチン処理の C2C12 筋管細胞における ECAR の時間経過 (I)、解糖能 (II)、最大解糖能 (III)、解糖予備能 (IV) を Vehicle と比較した。(C) ミトコンドリアおよび解糖系 ATP 産生速度。OCR と ECAR は、基礎条件下においてオリゴマイシンとロテノン/アンチマイシン A を順次添加した後、指示した時点で測定した。ミ

トコンドリア ATP (mitoATP) および解糖系 ATP (glycoATP) レベルは、検証済みのアルゴリズムを用いて、OCR および ECAR データからそれぞれ算出した。C2C12 筋管細胞のシスプラチン処理におけるミトコンドリア ATP 産生速度 (I)、解糖系 ATP 産生速度 (II)、総 ATP 産生速度 (III) を vehicle 処理と比較したデータである。数値は平均値±SD で表した ($n=3$)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs. Vehicle。

第3項 ターゲットメタボロミクス

C2C12 筋管細胞におけるシスプラチンの細胞内代謝物への影響について、GC-MS/MS を用いて解析し、糖、アミノ酸、有機酸、遊離脂肪酸など約 200 種類の水溶性代謝物のターゲットメタボロミクスを実施した。C2C12 筋管細胞におけるメタボローム解析により 60 種類の代謝物が検出され、階層的クラスタリング解析とヒートマップの構築に使用された (図 6A)。シスプラチン処理により、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸などのトリカルボン酸経路の中間代謝物レベルが低下し、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸などのアミノ酸レベルも低下した (図 6A および 6B)。シスプラチン処理では、グルコースとマンノースのレベルが vehicle 処理に比べて上昇し、解糖の最終産物である乳酸のレベルが低下した (図 6A および 6B)。これらのことから、シスプラチンは C2C12 筋管細胞において、TCA サイクルだけでなく解糖系も抑制している可能性が示唆された。

シスプラチン処理による *Bax* および *Bcl-2* レベルの変化は、MitoQ 前処理によって緩和された (図 7D および 7E)。 *Foxo4* mRNA レベルはシスプラチンで増加し、MitoQ 前処理で減少した (図 7F)。さらに、MitoQ はシスプラチンによる *Atrogin-1* 発現の増加を抑制し (図 7G)、MyHC タンパク質の発現量を増加させた (図 7H)。これらの結果は、シスプラチンによる筋管細胞萎縮には、ATP 低下の関与は少なく、過剰な活性酸素の産生が主要な役割をはたしている可能性を示唆している。

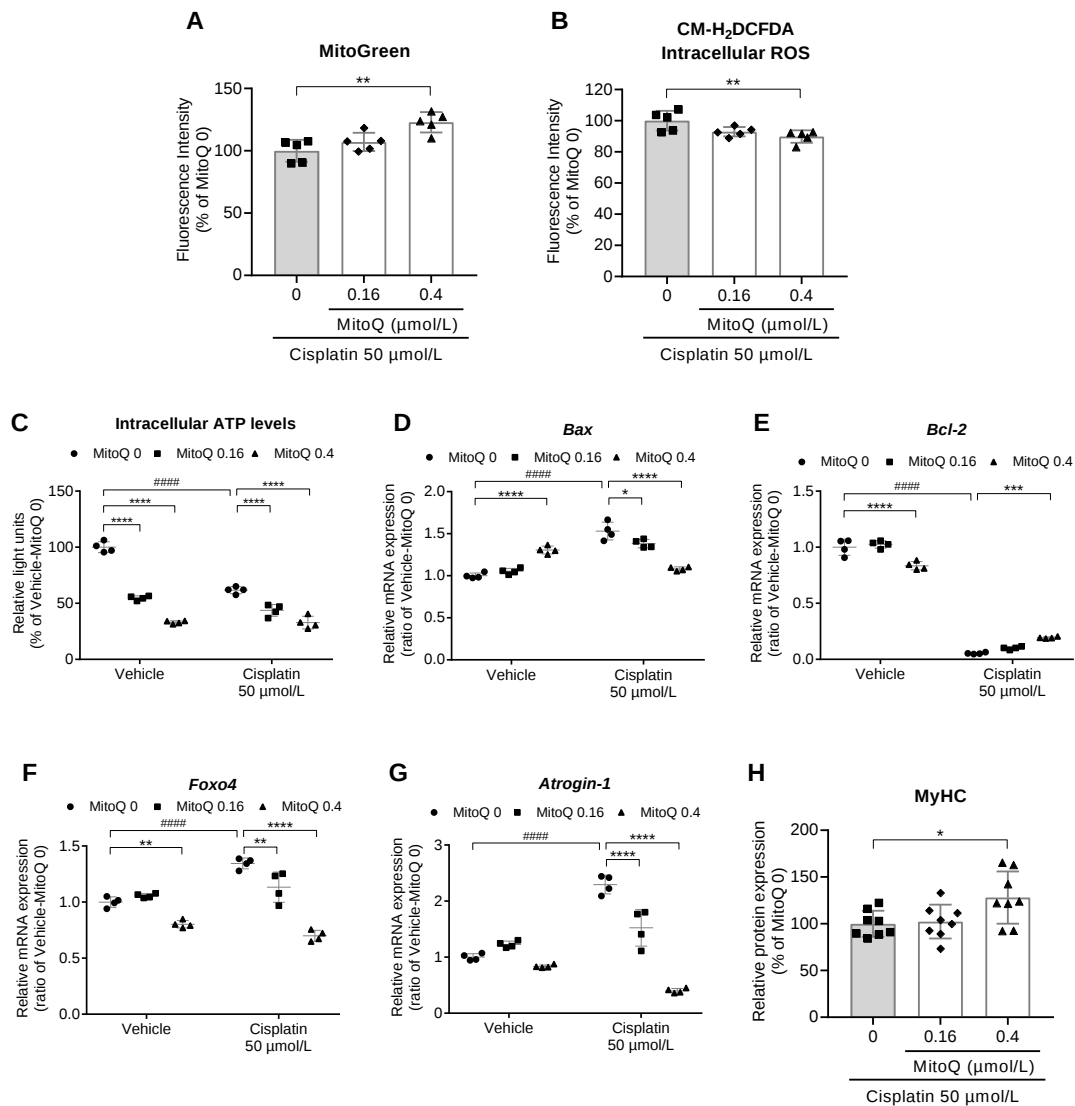


図7 シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア特異的抗酸化物質 MitoQ の効果

C2C12 筋管細胞を MitoQ (0.16, 0.4 μmol/L) で 30 分間処理し、その後 50 μmol/L シスプラチンで 24 時間処理した。(A) ミトコンドリア量は MitoGreen 試薬 ($n = 5$) を用いてシスプラチン処理後に測定した。(B) 細胞内 ROS 産生は CM-H₂DCFDA を用いて測定した ($n = 5$)。(C) 細胞内 ATP レベルは発光 ATP アッセイを用いて評価した ($n = 4$)。(D および E) アポトーシス制御因子である *Bax* および *Bcl-2* の mRNA 発現レベル ($n = 4$)。(F および G) 筋タンパク質分解に関連する制御因子である *Foxo4* および *Atrogin-1* の mRNA 発現レベル ($n = 4$)。(H) C2C12 筋管細胞における MyHC タンパク質の発現量 ($n = 8$)。数値は平均値 ± SD で表した。#### $p < 0.0001$ vs Vehicle, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs MitoQ 0。

第4節 考察

C2C12 筋管細胞に 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンを 24 時間処理すると、細胞 ATP レベルの低下、ミトコンドリアの酸化的リン酸化と解糖の阻害、細胞内 ROS レベルの持続的上昇を伴い、アポトーシスを引き起こすことなく細胞萎縮を引き起こすことが明らかとなった。ミトコンドリアを標的とした抗酸化物質 MitoQ は、細胞内 ATP レベルを回復させないが、細胞内の活性酸素生成および Atrogin-1 の活性化を抑制し、ミオシン重鎖レベルを回復させることがわかった。これらの結果は、シスプラチンによる筋管細胞萎縮は、ミトコンドリアの障害と相関があるにもかかわらず、ATP レベルの減少を含む代謝障害よりもむしろ細胞内の ROS 産生が主な原因であることを強く示唆している。

これまでの臨床研究^{18, 22, 49, 50)}および基礎研究^{25, 26, 51-53)}により、シスプラチンは骨格筋の萎縮を引き起こし、その際、Atrogin-1 および/または MuRF1 レベルの上昇により筋タンパク質分解が促進されることが示されている。Atrogin-1 と MuRF1 は、もともと尾部懸垂モデルを用いて発見された骨格筋特異的 E3 ユビキチンリガーゼであり、複数の標的タンパク質のユビキチン化と筋萎縮に重要な役割を果たしている。Atrogin-1 は、骨格筋の分化にかかわる MyoD や Myogenin、またタンパク翻訳開始複合体のひとつである eIF3-f を分解することで、筋タンパク合成を抑制する⁵⁴⁻⁵⁶⁾。一方、MuRF1 は、MyHC をはじめ、ミオシン軽鎖、トロポニン、titin など多くの骨格筋構造タンパク質を直接分解する⁵⁷⁻⁶⁰⁾。今回、C2C12 筋管細胞において、シスプラチン処理後に *Atrogin-1* および *MuRF1* mRNA の上昇が認められたことは、これまでの報告と一致している^{23, 52, 61)}。

ミトコンドリアは、細胞のエネルギー産生の主体をなす細胞内小器官であり、筋肉の活動、発達、維持に関与し、骨格筋の機能調節に重要な要素として働いている。加齢に伴うサルコペニア³⁷⁻³⁹⁾や廃用性筋萎縮症にはミトコンドリア障害が関与していることが報告されている^{40, 41)}。シスプラチンによるラットの悪液質に関する最近の研究では、ラットの骨格筋において、ミトコンドリア生合成 (PGC-1 α 、NRF-1、TFAM、mtDNA、ND1)、ミトコン

ドリア量 (porin およびクエン酸合成酵素活性)、および融合指数が減少することが示された²⁷⁾。しかし、ATP 産生、活性酸素生成、アポトーシス誘導などの基本的なミトコンドリア機能の変化については検討されておらず、ミトコンドリア機能障害と筋萎縮の因果関係も証明されていない。そこで、本研究では、シスプラチン処理後の C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア機能の変化を検討し、筋管細胞萎縮との関連性を明らかにすることを目的とした。

本研究では、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、細胞死をきたすことなく、細胞萎縮とミオシン重鎖レベルの減少を示した。このとき、ミトコンドリア数の減少、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア酸化的リン酸化活性と ATP 産生の著しい低下が観察され、ミトコンドリアのエネルギー産生が阻害されたことが明らかとなった。

興味深いことに、本研究では、シスプラチンを C2C12 筋管細胞に処理すると、解糖経路が著しく抑制され、解糖能と最大解糖能の両方が低下することが示された。さらに、メタボローム解析の結果も、シスプラチンが C2C12 筋管細胞の解糖系を阻害することを支持している。解糖系が p53 によって抑制されることはよく知られており⁶²⁻⁶⁵⁾、さらに、シスプラチンが近位尿細管細胞において p53 を活性化して解糖系を阻害することが最近の研究で明らかにされている^{66, 67)}。これらの知見は、シスプラチンによる筋管細胞の解糖能の低下に p53 が関与している可能性を示唆しているが、このことを証明するためには、さらなる研究が必要である。

細胞内の活性酸素生成の制御は、ミトコンドリアにおける重要な機能の一つである³⁶⁾。シスプラチンによって、ミトコンドリアに活性酸素の蓄積が観察されることが広く知られていることから^{31, 68, 69)}、シスプラチン誘発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に着目した。ここで、シスプラチンの 2 時間処理直後にミトコンドリア活性酸素 (スーパーオキシドアニオン) レベルの一過性の増加が観察され、その後 24 時間にわたり細胞内活性酸素レベル (主に H_2O_2) の持続的増加が見られた。これらの結果は、

シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞における Atrogin-1 活性化において、細胞内活性酸素の増加が重要な役割を演じていることを示唆している。

本研究では、シスプラチン処理後の持続的な活性酸素産生に關与する標的分子を明らかにすることはできなかった。今回の検討では、シスプラチン処理後 24 時間で細胞内活性酸素の増加が持続するにもかかわらず、ミトコンドリアでの活性酸素産生は一過性であった。このことは、ミトコンドリア以外の活性酸素産生機構、例えば NADPH oxidase (NOX) などがシスプラチンによる持続的活性酸素産生に關与している可能性を示唆する。Nox アイソザイム 2 (NOX2) は、ドキソルビシンによる心筋や腓腹筋の萎縮に關与することが報告されており⁷⁰⁾、腎組織における NOX4 の発現増加は、シスプラチンによる腎毒性と関連があるとされている^{71,72)}。現在のところ、シスプラチンによる筋萎縮における NOX の結果については報告がない。しかし、NOX1、2、4 が C2C12 細胞に発現していることを考えると⁷³⁾、NOX 由来の活性酸素が、シスプラチンによる持続的な活性酸素産生に關与している可能性があり、この点は今後の研究で明らかにしたい。

我々の研究では、C2C12 筋管細胞にシスプラチンを 6.25–50 $\mu\text{mol/L}$ と比較的低濃度で処理すると、*Bax/Bcl-2* 比がかなり増加するにもかかわらず、アポトーシスが誘導されないことが明らかになった。*Bcl-2* ファミリーは抗アポトーシスタンパク質とプロアポトーシスタンパク質からなり、*Bax/Bcl-2* 比の増加はアポトーシス誘導の前提条件であるミトコンドリア外膜の透過に対応するものである⁷⁴⁾。しかし、最近になって、*Bcl-2* ファミリータンパク質は、他の機能を持つことが示唆されている。例えば、ミトコンドリア ATP 産生の調節⁷⁴⁾やミトコンドリア ROS 生成の調節⁷⁵⁾などを有することが示唆されつつある。したがって、シスプラチン処理筋管細胞における *Bax/Bcl-2* 比の増加は、ミトコンドリア呼吸能力の低下と過剰な活性酸素の生成に關連している可能性がある。興味深いことに、*Pgc-1 α* 、*Tfam*、*Sod2* の発現量がシスプラチン処理後に増加していた。ミトコンドリア障害に対するこれらの代償機構が過剰な活性酸素に拮抗することによって、アポトーシスへの移行を阻止していると考えられた。

これまでの報告では、シスプラチン処理により筋の FOXO3a^{34, 35, 52, 76, 77)}あるいは FOXO1^{23, 26)}が活性化することが示されており、FOXO ファミリーが MuRF1 や Atrogin-1 の活性化に中心的役割を果たすことが示唆されていた。本研究では FOXOs の活性は調べていないが、*Foxo1* ではなく *Foxo3a* と *Foxo4* の遺伝子発現がシスプラチン処理により増加することを見出した。FOXO3a の活性化は、筋管細胞において FOXO3a⁷⁸⁾と FOXO4⁷⁹⁾のプロモーター活性を上昇させるが、FOXO1 には影響を与えない⁸⁰⁾。したがって、本研究では、シスプラチン処理した C2C12 筋管細胞において、主に FOXO3a が活性化されたと考えるのが妥当と思われる。

本研究では、シスプラチン処理により、C2C12 筋管細胞においてミトコンドリア活性酸素（スーパーオキシドアニオン）および細胞内活性酸素（H₂O₂）レベルが上昇した。細胞内活性酸素は、c-Jun N-terminal kinases（JNK）や mammalian sterile 20-like kinase 1 などの数種のプロテインキナーゼを活性化し、Akt を阻害して、FOXO の核移行と転写活性を促進することが知られている^{81, 82)}。また、FOXO は細胞内の ATP が枯渇すると、AMP 活性化プロテインキナーゼによってリン酸化され、活性化される⁸³⁾。したがって、ミトコンドリア障害に伴う活性酸素レベルの上昇と細胞内 ATP レベルの低下の両方が、シスプラチンによる FOXO の活性化と Atrogin-1/MuRF1 の発現上昇に寄与している可能性がある。

筋萎縮モデルにおいて、Atrogin-1 と MuRF1 の誘導は必ずしも同様の傾向で観察されず、活性酸素（H₂O₂）が Atrogin-1 のアップレギュレーションを刺激し⁸⁴⁾、MuRF1 は主にグルコース飢餓下で上昇することが報告されている⁸⁵⁾。本研究では、シスプラチン処理筋管細胞において、ATP 低下よりも活性酸素（特に H₂O₂）増加が筋萎縮関連遺伝子の増加に重要であることが示されたが、このことが、Atrogin-1 に比べて MuRF1 の増加が軽度であった理由の一つと考えられた。

MitoQ は、抗酸化物質ユビキノンのミトコンドリア標的誘導体で、ミトコンドリアに局在し、過酸化水素によるアポトーシスから様々な細胞を保護することが可能である⁴²⁻⁴⁵⁾。また、MitoQ は *in vitro* の試験で細胞内活性酸素とミトコンドリア活性酸素を減少させること

が報告されている^{43, 44)}。さらに、MitoQ はミトコンドリアの酸化的損傷に起因するいくつかの疾患を評価するための動物試験およびヒト試験で使用され、良好な結果が得られている⁴⁵⁾。しかし、シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞における MitoQ の保護作用については、いまだ検討がおこなわれていなかった。

シスプラチン処理をおこなった C2C12 筋管細胞において、MitoQ は細胞内 ROS レベルの上昇を抑制し、*Bax/Bcl-2* 比を改善した。さらに、*Foxo4* や *Atrogin-1* の遺伝子発現レベルを低下させ、MyHC タンパク質の量も回復させた。

驚くべきことに、MitoQ はミトコンドリア呼吸と ATP 産生を回復させることができず、むしろ悪化させた。これまでの報告では、MitoQ は活性酸素生成に対して二相性を示し⁴³⁾、MitoQ の高用量ではプロオキシダント性を示すことが明らかにされている⁴⁴⁾。さらに、ミトコンドリア呼吸に対して非特異的な作用を示すことも報告されている⁸⁶⁻⁸⁹⁾。今回得られた MitoQ による ATP の低下という予想外の結果は、これらの過去の報告と一致するものであり、MitoQ の特異的な性質に由来するものであると考えられる。

先に述べたように、シスプラチン処理した C2C12 筋管細胞における FOXO の活性化は、活性酸素の過剰産生だけでなく、ATP 低下にも起因している可能性がある。MitoQ が、ATP 産生を回復させることなく ROS 産生を減少させ、FOXO ファミリーの発現を抑制したという結果は、シスプラチンによる筋管細胞萎縮には、主に細胞内 ROS 産生が関与しており、ATP 減少の影響は少ないことを強く示唆する。

本研究で得られた結果を総合して、シスプラチンによる筋管細胞萎縮の機構モデルを提案する (図 8)。すなわち、シスプラチンはミトコンドリアの活性酸素産生を誘導し、それについて *Bax/Bcl-2* 比を上昇させ、さらにミトコンドリアの完全性を損ない、その代償機構を破壊し、最終的に機能障害をもたらす。さらに、持続的な活性酸素の生成は、FOXO シグナル経路を活性化し、*Atrogin-1*/*MuRF1* の転写活性化につながる。

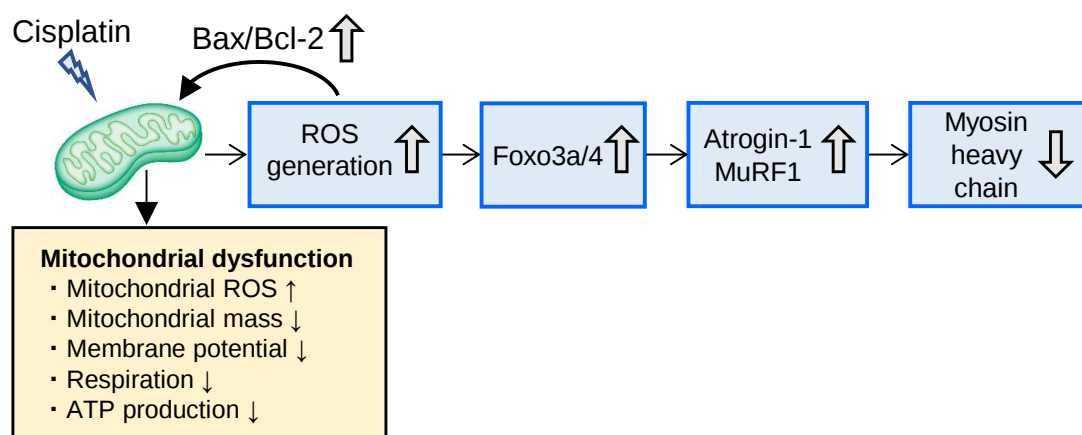


図8 C2C12 筋管細胞におけるシスプラチンによる筋萎縮のメカニズムの概要

本章の結論として、シスプラチンは細胞内に過剰な活性酸素を発生させるとともに、ミトコンドリアの酸化的リン酸化と解糖による ATP 産生を低下させ、アポトーシスを伴わない筋管細胞萎縮を誘発することが明らかになった。さらに、ミトコンドリアを標的とした抗酸化物質 MitoQ は、シスプラチン処理した C2C12 筋管細胞において、細胞内 ROS 発生を減少させ、Atrogin-1 活性化と MyHC タンパク質発現量の減少を回復させることが確認された。これらの結果は、ATP の回復ではなく、ミトコンドリアの保護や活性酸素の消去が、シスプラチンベースの化学療法に伴う筋萎縮を防ぐための有望な戦略である可能性を示唆している。

第2章 シスプラチン誘発筋管細胞萎縮における p53 の役割

第1節 背景

第1章では、シスプラチン誘発 C2C12 筋管細胞萎縮の機序検討において、以下の点を明らかにした。

- 1) シスプラチンは C2C12 筋管細胞に対してアポトーシスを生じない条件下で細胞萎縮を起こした。
- 2) シスプラチンはミトコンドリアの活性酸素産生を誘導し、それに続いて *Bax/Bcl-2* 比を上昇させ、ミトコンドリアの機能障害をもたらした。
- 3) シスプラチンは酸化的リン酸化のみならず、解糖系も阻害した。
- 4) MitoQ は細胞内活性酸素レベルを減少し、*Bax/Bcl-2* 比および *Atrogin-1* の上昇を抑制し、MyHC タンパク質の発現量を増加させた。

以上の結果より、ミトコンドリア障害に伴って発生する持続的な活性酸素がシスプラチン誘発 C2C12 筋管細胞萎縮の発症因子になっており、その機序として Bax および Bcl-2 などのプロアポトーシス制御因子の関与が示唆された。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 により負に制御を受けることが報告されている⁹⁰⁾。また、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⁹¹⁾こと、さらに解糖系が p53 によって抑制されることが知られている⁶²⁻⁶⁵⁾。加えて、活性酸素が様々な細胞で p53 を活性化することがいくつかの研究により証明されている⁹¹⁻⁹³⁾。以上の事実より、シスプラチン処理 C2C12 細胞に生じた細胞萎縮の進行過程において、p53 の活性化が重要な役割をはたしている可能性が強く示唆される。しかしながら、これまでこのことを明らかにした報告はない。

そこで、本研究ではシスプラチン筋萎縮における p53 の役割を明らかにする目的で、

p53 タンパク質の発現およびリン酸化状態、p53 標的遺伝子発現レベルを検討した。さらに、p53 阻害薬 Pifithrin- α (PFT- α)⁹⁴⁻⁹⁷⁾を用いて、シスプラチンによる解糖系低下およびミトコンドリア機能障害に対する p53 阻害の影響について検討をおこなった。

第2節 材料・実験方法

第1項 細胞培養と実験デザイン

マウス C2C12 筋芽細胞は、株式会社ケー・エー・シーより購入した。C2C12 筋芽細胞は、10%ウシ胎児血清 (JRH Biosciences, Lenexa, KS, USA) およびペニシリン-ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM ; Thermo Fisher Scientific) 中で 37°C, 5% CO₂ で培養した。C2C12 筋芽細胞を筋管細胞に分化させるために、培養液を DMEM+2%ウマ血清 (Thermo Fisher Scientific) からなる分化培地に交換し、5 日間インキュベートした。分化誘導の間、筋芽細胞の分化培地は約 2 日に一度、新鮮な培地に交換した。分化後、筋管細胞はシスプラチン (479306 ; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) または溶媒 (0.02%DMSO) で処理し、その後、解析に供した。Pifithrin- α (PFT- α ; P4359) は Sigma-Aldrich より購入した。Mitoquinone mesylate (MitoQ ; HY-100116A) は、MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA) から購入した。PFT- α (20, 50 μ mol/L) および MitoQ (0.16, 0.4 μ mol/L) は、シスプラチン添加の 30 分前に添加した。

第2項 ウェスタンブロット解析

プロテアーゼ阻害剤とセリンホスファターゼ阻害剤を含む Cell Lysis Buffer (10 $\times$) (9803 ; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を用いて、50 μ mol/L シスプラチン処理 0.5、2、6、24 時間後の C2C12 筋管細胞 (3.7×10^4 個/cm²) からタンパク質を分離した。MyHC、p53、およびリン酸化 p53 (phospho-p53) の含量は、キャピラリーベースの自動サイズ分離およびナノ免疫測定システムである Jess Simple Western System (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) を用いて評価した。分析は、特に断りのない限り、製造者の標準的な方法に従って行った。等量の細胞溶解液 (約 900 μ g/mL) を 0.1 $\times$ サンプルバッファーと Fluorescent 5 $\times$ Master mix (ProteinSimple) を 8 : 12 : 5 の割合で混合し、95°C で 5 分間変性させた。単離し

たんぱく質を 12-230 kDa Jess Separation Module (SM-W004 ; ProteinSimple) を用いて分離し、5 µg/mL anti-MyHC 抗体 (MAB4470 ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) , 25 µg/mL anti-p53 抗体 (AF1355 ; R&D Systems) , 50 倍希釈抗 phospho-p53 (Ser15) 抗体 (9284S ; Cell Signaling Technology) で 30、120、120 分間それぞれプロービングした。結合した MyHC、p53、phospho-p53 抗体は、Jess、Wes、Peggy Sue または Sally Sue 用 Anti-Mouse、Goat、Rabbit Detection Module (DM-002, DM-006, DM-001 ; ProteinSimple) を用いて検出した。その後、RePlex Module (RP-001 ; ProteinSimple) を用いて一次抗体と二次抗体を除去し、10 µg/mL の抗 GAPDH 抗体 (AF5718 ; Novus Biologicals, LLC, Centennial, CO, USA) でプロットを 30 分再プロービングした。結合した抗 GAPDH 抗体を Anti-Goat Detection Module for Jess, Wes, Peggy Sue or Sally Sue (DM-006 ; ProteinSimple) を用いて検出した。ピーク面積は Compass Simple Western software, version 5.0.1 (ProteinSimple) を用いて自動計算したが、手動設定でベースラインを調整し、それぞれのピーク面積を GAPDH のピーク面積で補正した。

第3項 RNA 抽出と RT-PCR

C2C12 筋管細胞 (3.7×10^4 個/cm²) を 50 µmol/L シスプラチンで 2、6 または 24 時間処理し、RNeasy Mini Kit (74106 ; QIAGEN, Valencia, CA, USA) に付属する Buffer RLT と 2-mercaptoethanol の混合物を加えて溶解させた。細胞溶解液をボルテックスで混合し、QIAshredder spin column (79656 ; QIAGEN) を用いてホモジナイズした。RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit を使用して行った。C2C12 筋管細胞から抽出した RNA を約 110 ng/µL に希釈し、70°C で 15 分間インキュベートした後、4°C に冷却した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA を相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。リアルタイム定量 PCR アッセイは、TaqMan Fast Advanced Master Mix (4444557 ; Thermo Fisher Scientific) および遺伝子特異的 TaqMan プライマー/プローブ (Thermo Fisher Scientific) と QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。プライマー/プローブの情報は表 2 に記載した。18s rRNA は内在性コン

トロールとして用い、mRNA 発現量は $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。

表 2 RT-PCR に使用するプライマー

Target	Gene name	Assay ID
Rn18s	18S ribosomal RNA	Mm04277571_S1
p21 (Cdkn1a)	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Mm00432448_m1
Tigar	Trp53 induced glycolysis regulatory phosphatase	Mm00621530_m1
PUMA (Bbc3)	BCL2 binding component 3	Mm00519268_m1
Bax	BCL2-associated X protein	Mm00432051_m1
Foxo4	forkhead box O4	Mm00840140_g1
Atrogin-1 (Fbxo32)	F-box protein 32	Mm00499523_m1
Myh7	myosin, heavy polypeptide 7	Mm00600555_m1
Myh2	myosin, heavy polypeptide 2	Mm01332564_m1
Myh1	myosin, heavy polypeptide 1	Mm01332500_gH
Myh4	myosin, heavy polypeptide 4	Mm01332541_m1

第 4 項 XFp 細胞外フラックス測定

C2C12 筋管細胞の酸素消費率 (OCR) と細胞外酸性化率 (ECAR) は、XFp 細胞外フラックスアナライザー (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて測定した。解糖の評価には、Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit (103017-100 ; Agilent Technologies) を用いた。Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit (103591-100 ; Agilent Technologies) を用いて、ミトコンドリア呼吸による ATP 産生速度と解糖による ATP 産生速度を測定した。センサーカートリッジは実験前日に水に浸し、CO₂ フリーのインキュベーター内で 37°C にて一晩インキュベートした。実験の 2 時間前に水をキャリブレーション溶液と交換し、再び 37°C の CO₂ フリーインキュベーターに設置した。C2C12 筋芽細胞を 1×10^5 個/cm² の密度で XFp ミニプレートに播種し、上記のように筋管細胞に分化させた。50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理した後、以下に述べるアッセイに供した。得られたデータは、Pierce BCA Protein Assay (23225 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定したタンパク質量で補正した。

1) 解糖評価

解糖の評価には、Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit を使用した。これは、細胞への糖取り込み量に応じて解糖能力を評価することができる試薬キットである。実験当日、Seahorse XFp DMEM 培地に 2 mmol/L のグルタミンを添加し、アッセイ用培地を調製した。ECAR の測定には、グルコース、オリゴマイシン、解糖阻害剤 2-デオキシ-D-グルコースをメーカーの説明書およびプロトコルに従って添加した。

2) ミトコンドリア呼吸および解糖による ATP 産生速度の評価

Seahorse XFp Real-Time ATP Rate Assay Kit を用いて、ミトコンドリアと解糖の ATP 産生速度を測定した。このキットは、生細胞のミトコンドリア呼吸と解糖による ATP 産生速度をリアルタイムで定量することができる。実験当日、Seahorse XFp DMEM 培地に 1 mmol/L ピルビン酸塩、2 mmol/L グルタミン、10 mmol/L グルコースを加えてアッセイ用培地を調製した。ミトコンドリア呼吸と解糖による ATP 産生速度を測定するために、オリゴマイシンとロテノン／アンチマイシン A 混合物をメーカーの説明書とプロトコルに従って添加し、その後、培養物を OCR と ECAR についてモニターした。ミトコンドリア呼吸に基づく OCR、解糖に基づく ECAR、mitoATP 産生速度、glycoATP 産生速度、総 ATP 産生速度は、Wave ソフトウェア (Agilent Technologies) を用いて算出した。

第 5 項 活性酸素レベルの評価

C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理した。シスプラチン処理後の細胞内 ROS 産生は、CM-H₂DCFDA (C6827 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。5 μ mol/L CM-H₂DCFDA をシスプラチン処理後の細胞に添加し、その後 37°C で 30 分間インキュベートした。蛍光強度は、Flex station 3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて、Ex/Em = 485/525 nm で測定した。

第 6 項 ミトコンドリア量測定と膜電位アッセイ

C2C12 筋管細胞 (4.5×10^4 個/cm²) を 50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理した。ミ

トコンドリアの量は、緑色の蛍光 (Ex/Em = 485/525 nm) を発するミトコンドリア染色色素である MitoGreen (PK-CA707-70054 ; PromoCell) を用いて評価した。50 nmol/L MitoGreen をシスプラチン処理した細胞に添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。Image-iT TMRM 試薬 (I34361 ; Thermo Fisher Scientific) を用いてミトコンドリア膜電位を測定した。TMRM は細胞透過性の蛍光色素 (Ex/Em = 544/590 nm) であり、膜電位に異常を認めない活動性のミトコンドリアに蓄積される。細胞を 100 nmol/L TMRM とともに 37°C で 30 分間インキュベートした。両アッセイとも、蛍光強度は Flex station 3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

第 7 項 データおよび統計解析

統計解析は GraphPad Prism software, version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) で表した。2 群間の統計解析は Student's t-test または Welch's t-test を用いて行った。多群の平均値の差は、Dunnett 検定または二元配置分散分析、それに続く Tukey 検定を用いて評価した。統計的有意性の水準は $p < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 シスプラチンによる C2C12 筋管細胞における p53 の活性化

シスプラチン処理した C2C12 筋管細胞において p53 が活性化しているかどうかを調べた。p53 および phospho-p53 のレベルは、シスプラチン処理後 6 時間で Vehicle 処理と比べて有意に上昇し、24 時間ではその差はさらに著明となった (図 9A および 9B)。さらに p53 の標的遺伝子である *p21*, TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (*Tigar*) および *PUMA* の発現レベルも同様にシスプラチンによって上昇した (図 9C-9E)。これらの結果は、シスプラチンによって C2C12 細胞の p53 が活性化したことを示している。

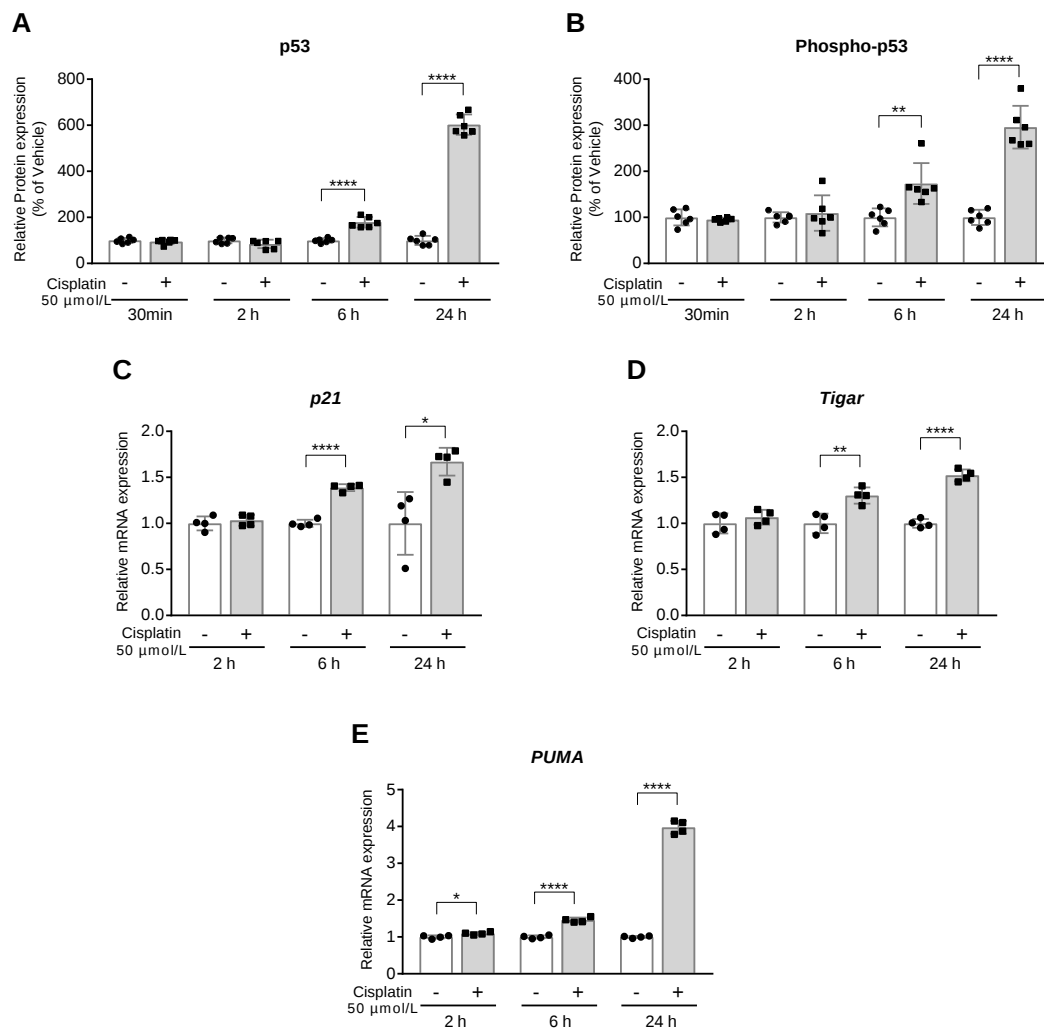


図 9 シスプラチン処理した C2C12 筋管細胞における p53 の発現

(A および B) シスプラチンで 0.5、2、6、24 時間処理した C2C12 筋管細胞における p53 (A) と phospho-p53 (B) のタンパク質発現量 ($n = 6$)。 (C-E) シスプラチンで 2、6、24 時間処理した C2C12 筋管細胞における p53 標的遺伝子 *p21*, *Tigar* および *PUMA* の mRNA 発現レベル ($n = 4$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. Vehicle。

第 2 項 シスプラチンによる解糖系低下に対する p53 阻害剤 PFT- α の効果

シスプラチンを処置した C2C12 細胞に p53 阻害剤 PFT- α を添加した結果、ECAR レベルが上昇し (図 10A)、解糖能 ($p < 0.01$; 図 10B) および最大解糖能 ($p < 0.05$; 図 10C) が有意に上昇した。解糖予備能も増加傾向が認められた (図 10D)。これらの結果から、シスプラチンによる解糖能低下作用に対して、p53 の活性化が関与していることが示唆された。

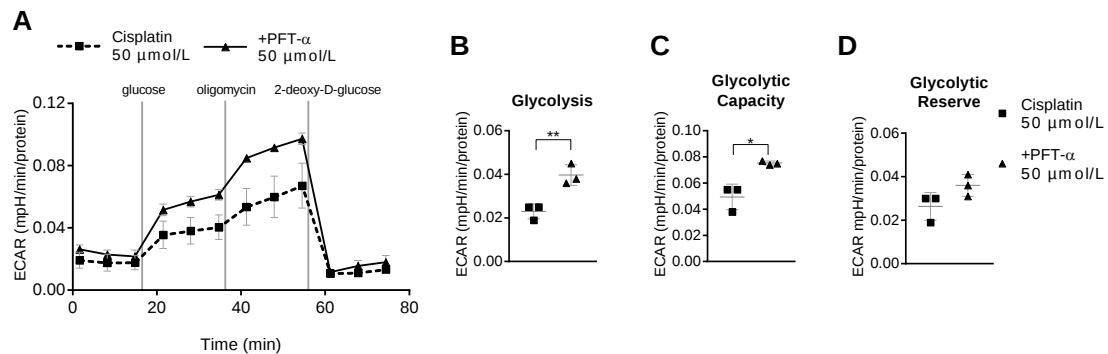


図 10 シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞における解糖系に対する p53 阻害剤 PFT- α の効果
 C2C12 筋管細胞を 50 μ mol/L PFT- α で 30 分間処理した後、50 μ mol/L シスプラチンで 24 時間処理した。解糖 ECAR の評価は、基礎条件下においてグルコース、オリゴマイシン、解糖阻害剤 2-デオキシ-D-グルコースを注入した後に行った。データは、シスプラチン+PFT- α における ECAR の時間経過 (A)、解糖能 (B)、最大解糖能 (C) および解糖予備能 (D) をシスプラチンと比較して示した ($n = 3$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs シスプラチン。

第 3 項 シスプラチンによるミトコンドリア機能障害に対する PFT- α の効果

シスプラチン誘発ミトコンドリア機能低下における p53 の関与について検討した。PFT- α 処理により、ミトコンドリア ATP 産生速度がシスプラチン単独処理に比べ約 1.3 倍増加し、OCR 値で示されるミトコンドリア呼吸が回復した (図 11A および 11B)。また、PFT- α はシスプラチンによって生成された細胞内活性酸素の発生を抑制し (図 11C)、ミトコンドリア量およびミトコンドリア膜電位を増加させた (図 11D および 11E)。したがって、シスプラチンによる活性酸素の発生およびミトコンドリア障害に対して p53 が関与している可能性が考えられる。

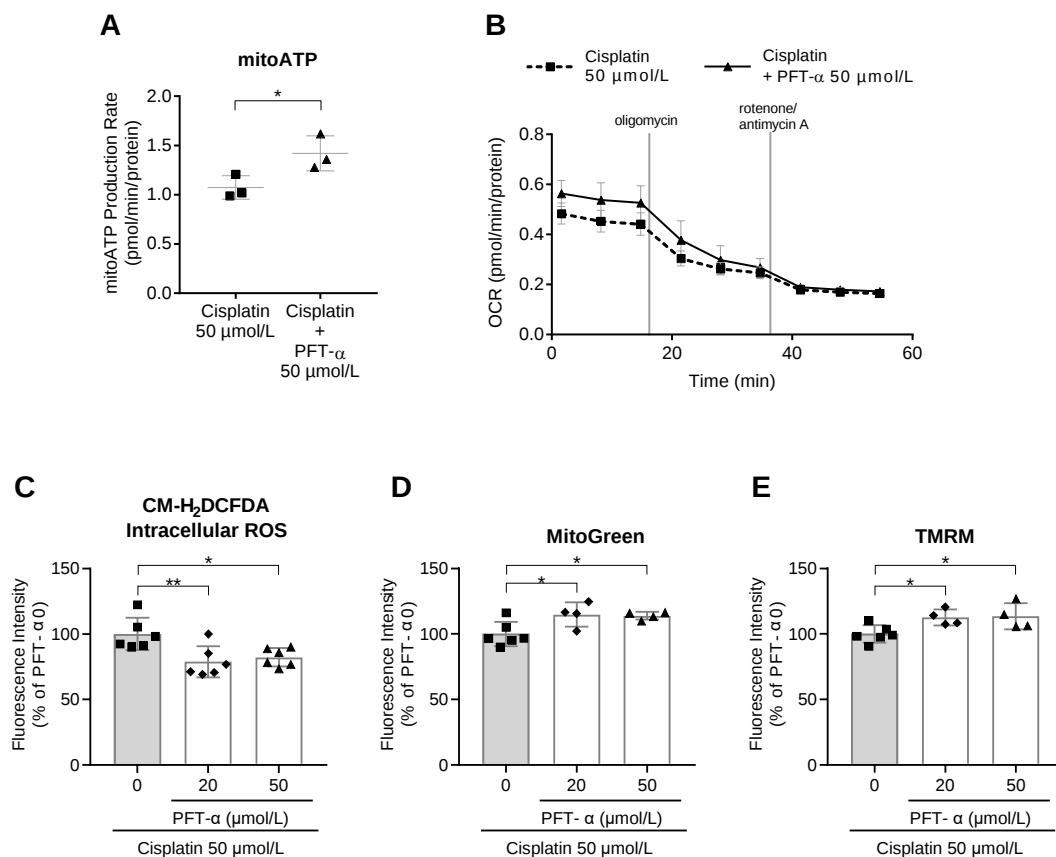


図 11 シスプラチン処理 C2C12 筋管細胞におけるミトコンドリア機能に対する p53 阻害剤 PFT-α の効果

C2C12 筋管細胞を 20 および 50 μmol/L PFT-α で 30 分間処理した後、50 μmol/L シスプラチンで 24 時間処理した。(A および B) ミトコンドリア ATP 産生速度 (A) および OCR (B) は、基礎条件下においてオリゴマイシンおよびロテノン/アンチマイシン A を順次注入した後、指示した時点で測定した。ミトコンドリア ATP 産生速度は、検証済みのアルゴリズムを用いて算出した ($n=3$)。 (C) 細胞内 ROS 産生は CM-H₂DCFDA を用いて測定した ($n=6$)。 (D および E) ミトコンドリア量 (D) およびミトコンドリア膜電位 (E) は、それぞれ MitoGreen および TMRM 試薬を用いてシスプラチン処理後に測定した ($n=4-6$)。数値は平均値±SD で表した。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs シスプラチン。

第 4 項 C2C12 筋管細胞における p53 標的遺伝子の発現に対する PFT-α の効果

PFT-α は、p53 標的遺伝子のうちシスプラチン処理による *PUMA* の発現上昇を抑制した (図 12A)。また、統計的に有意な差はなかったが、*p21* のレベルも低下する傾向にあった (図 12B)。しかし、PFT-α は *Bax* や *Tigar* の発現には影響を与えなかった (図 12C および 12D)。

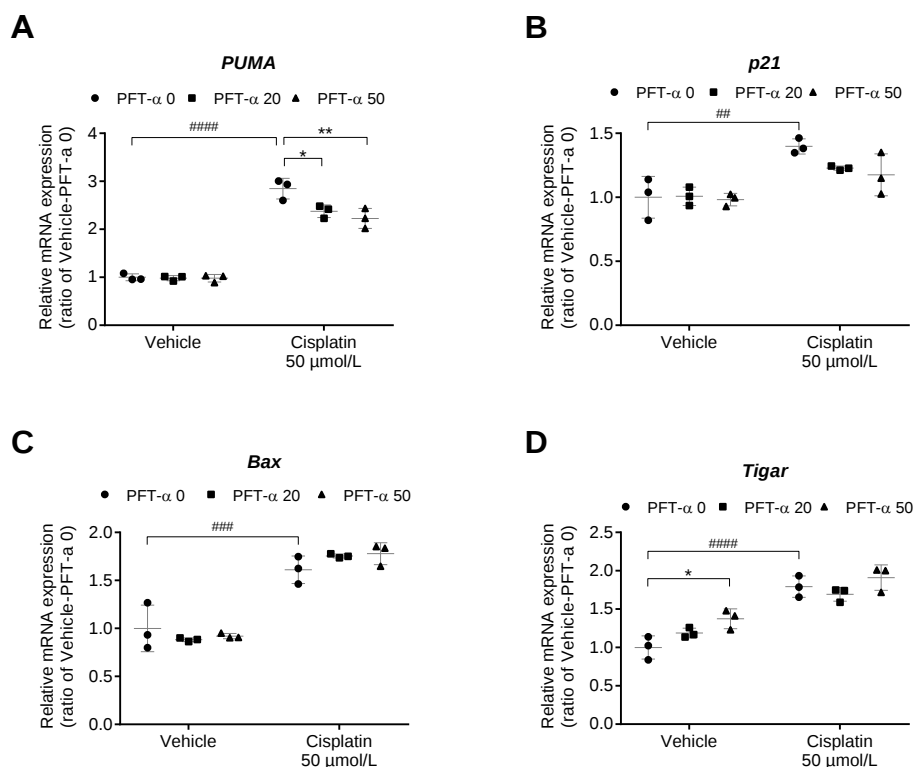


図 12 C2C12 筋管細胞における p53 標的遺伝子の発現に対する p53 阻害剤 PFT- α の効果

C2C12 筋管細胞を vehicle または 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した。PFT- α (20 および 50 $\mu\text{mol/L}$) はシスプラチン添加の 30 分前に添加した。p53 標的遺伝子 *PUMA* (A)、*p21* (B)、*Bax* (C)、*Tigar* (D) の mRNA 発現レベル ($n=3$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。## $p<0.01$, ### $p<0.001$, #### $p<0.0001$ vs. Vehicle。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs PFT- α 0。

第 5 項 C2C12 筋管細胞における筋萎縮関連遺伝子の発現に対する PFT- α の効果

PFT- α は、シスプラチンによる *Foxo4* の発現上昇に対して抑制傾向を示し (図 13A)、*Atrogin-1* 発現の増加を有意に抑制した (図 13B)。したがって、p53 がシスプラチンによるユビキチン-プロテアソームシステムの活性化に関与していることが明らかとなった。一方、PFT- α は MyHC タンパク質発現量には影響を及ぼさなかった (図 13C)。

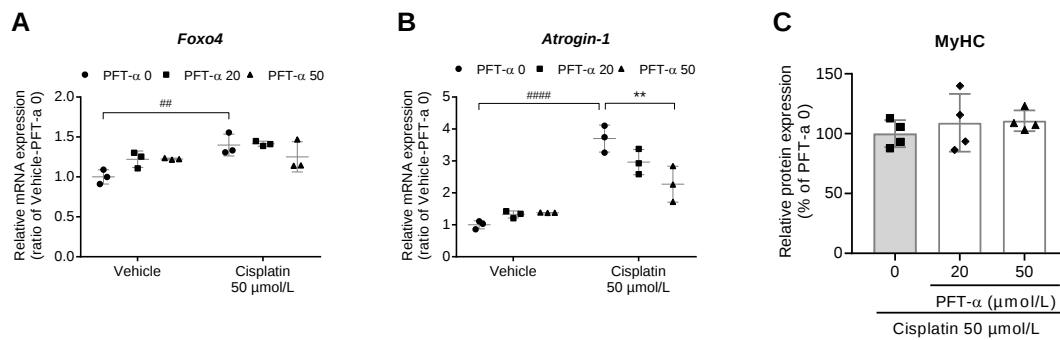


図 13 C2C12 筋管細胞における筋萎縮関連遺伝子および MyHC タンパク質発現に対する p53 阻害剤 PFT-α の効果

C2C12 筋管細胞を Vehicle または 50 μmol/L シスプラチンで 24 時間処理した。PFT-α (20 および 50 μmol/L) はシスプラチン添加の 30 分前に添加した。(A および B) *Foxo4* (A) および *Atrogin-1* (B) の mRNA 発現レベル ($n=3$)。 (C) C2C12 筋管細胞における MyHC タンパク質発現量 ($n=4$)。数値は平均値±SD で表した。## $p < 0.01$, ##### $p < 0.0001$ vs.Vehicle. ** $p < 0.01$ vs PFT-α 0。

第 6 項 C2C12 筋管細胞における MyHC アイソフォーム遺伝子発現に対する MitoQ と PFT-α の効果

MitoQ と PFT-α はともにシスプラチンによるミトコンドリア障害を軽減させ FOXO-Atrogin-1 経路を抑制したが、MyHC に対する効果は異なっていた。その理由を明らかにするために、筋線維合成能に対するシスプラチンの影響について検討し、PFT-α の効果を MitoQ と比較した。げっ歯類における骨格筋線維の MyHC には、MyHC I (遅筋型、酸化的)、MyHC IIA (速筋型、酸化的)、MyHC IIX (中間型) および MyHC IIB (速筋型、解糖的) という 4 種類の MyHC アイソフォームが存在し、それぞれ *Myh7*、*Myh2*、*Myh1* および *Myh4* という遺伝子によってコードされている⁹⁸⁾。本研究では、MyHC タンパク質発現に対する MitoQ と PFT-α の効果の違いについて、遅筋型 *Myh7* および速筋型 *Myh2*、*Myh1*、*Myh4* の遺伝子発現への影響を検討した。

シスプラチンは、C2C12 筋管細胞において、*Myh7*、*Myh2*、*Myh1* および *Myh4* の遺伝子発現をいずれも有意に低下させ、特に、遅筋型 *Myh7* に比べ速筋型 *Myh4* の発現を強く抑制した (図 14)。以上より、シスプラチンは、MyHC タンパク質合成を、転写レベルで抑制す

ることが明らかとなった。

MitoQ は、速筋型 *Myh2* については作用を示さなかった（図 14B）が、シスプラチンによって低下した遅筋型 *Myh7* レベルを正常レベルまで改善し（図 14A）、速筋型 *Myh1* および *Myh4* レベルも正常レベルの半分まで増加させた（図 14C および 14D）。一方、PFT- α はいずれのアイソフォームに対しても改善作用を示さなかった（図 14E-14H）。

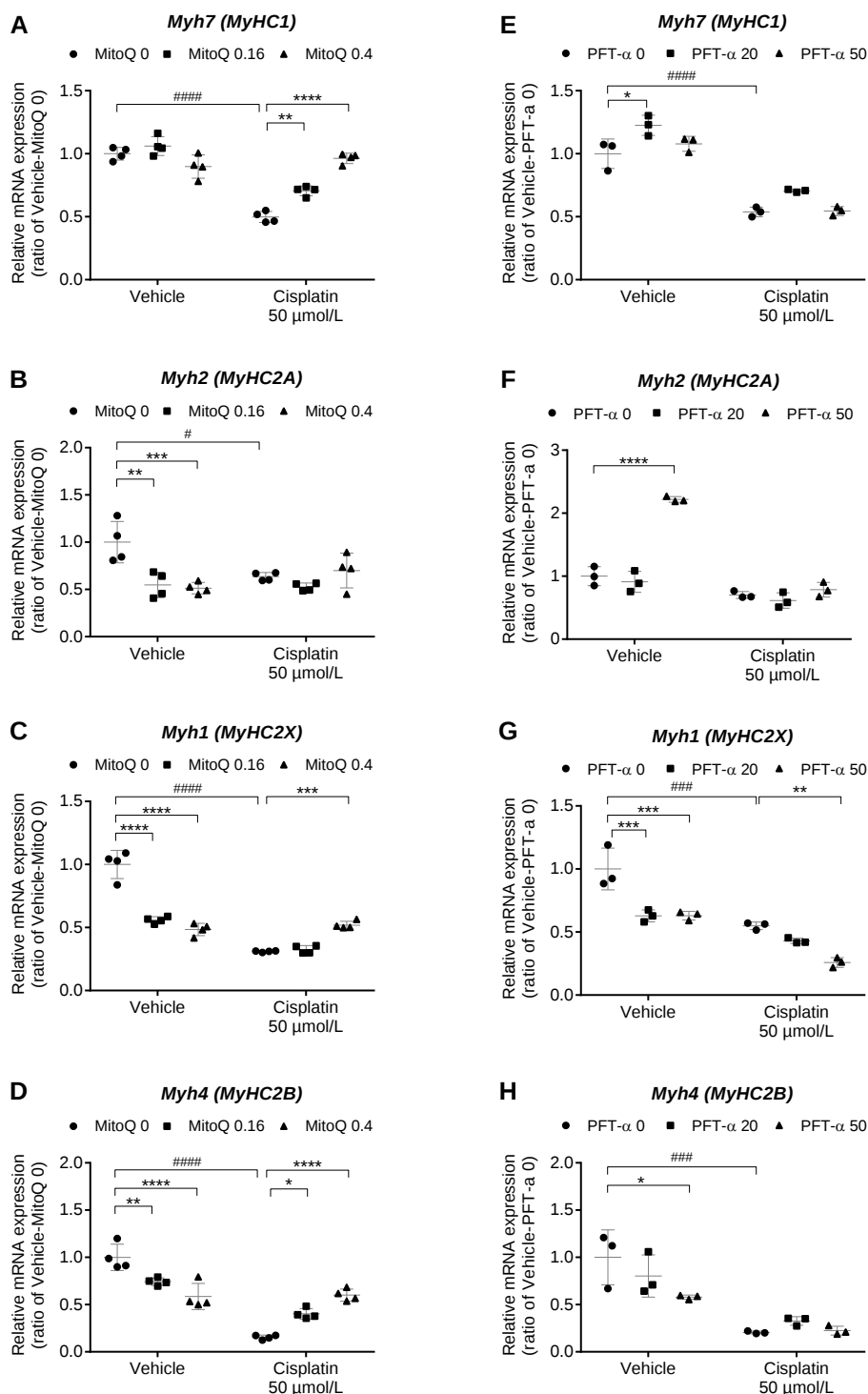


図 14 C2C12 筋管細胞における MyHC アイソフォーム遺伝子発現に対するミトコンドリア特異的抗酸化剤 MitoQ および p53 阻害剤 PFT- α の効果

C2C12 筋管細胞を vehicle または 50 $\mu\text{mol/L}$ シスプラチンで 24 時間処理した。MitoQ (0.16, 0.4 $\mu\text{mol/L}$) , PFT- α (20, 50 $\mu\text{mol/L}$) はシスプラチン添加の 30 分前に添加した。(A および E) *Myh7*、(B および F) *Myh2*、(C および G) *Myh1*、(D および H) *Myh4* の mRNA 発現レベル ($n = 3$)。数値は平均値 $\pm$ SD で表した。 $\#p < 0.05$, $\###p < 0.001$, $\####p < 0.0001$ vs.Vehicle。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs MitoQ 0 または PFT- α 0。

第4節 考察

p53 は骨格筋の筋形成とサルコペニアの両方で重要な役割を果たすことが知られている^{99,100)}。通常のスレスのない状態では、p53 が筋分化を促す^{101,102)}。一方、p53 は代謝スレスに対する細胞の適応を媒介する転写因子であることから¹⁰³⁾、これまで筋萎縮と p53 のかわりについて多くの研究がなされてきた。たとえば、高齢者や加齢動物の骨格筋において p53 mRNA の発現が増強している¹⁰⁴⁻¹⁰⁷⁾、不動や除神経による筋萎縮モデルにおいて p53 タンパク質の発現が増強する¹⁰⁸⁻¹¹¹⁾などの報告がある。p53 の過剰発現は、老化形質の発現や筋萎縮を引き起こし^{108,112)}、筋肉特異的な p53 ノックアウトマウスは、不動化によって誘発される骨格筋の萎縮に対して部分的に抵抗性であったと報告¹⁰⁸⁾されている。その一方で、筋肉特異的な p53 遺伝子のノックアウトは老化による筋萎縮を抑制しないとの報告¹¹³⁾や、p53 が持久運動時の骨格筋のミトコンドリア量と筋パフォーマンスの向上に関与するなどの報告¹¹⁴⁾がある。このように筋萎縮に対する p53 の役割については、必ずしも一致した結果が得られていない。また、シスプラチンによる骨格筋萎縮と p53 との関連については、これまで検討が行われていなかった。

本研究において、シスプラチン処理をおこなった C2C12 筋管細胞において、p53 の活性化が生じることが明らかとなった。第1章において、シスプラチンにより細胞内活性酸素 (H_2O_2) レベルが持続的に上昇することを明らかにしたが、 H_2O_2 は、C2C12 筋芽細胞のミトコンドリア透過性遷移孔開口と p53 活性化を引き起こすと報告されている¹¹⁵⁾。活性酸素は、ストレス応答キナーゼ apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) を活性化し、さらに ASK1 は JNK や p38 を活性化する¹¹⁶⁾。例えば、ドキソルビシンは JNK-p38 および p53 を介したシグナル伝達経路の活性化を介して心臓のアポトーシスを誘導し、 H_2O_2 はこれらの経路のメディエーターとして作用する¹¹⁷⁾。また、TNF- α による C2C12 筋管細胞の萎縮モデル実験において、JNK、p38 MAPK 活性化および p53 遺伝子の発現増強が生じると報告されている¹¹⁸⁾。以上より、C2C12 筋管細胞において、シスプラチンによる活性酸素の増加が、ASK1

による JNK/p38 経路の活性化を介して、p53 活性化をきたした可能性が高いと考えられる。

PFT- α は、p53 の転写活性抑制を指標として見いだされた化合物であり、p53 依存性のアポトーシスを阻害する⁹⁴⁾。実際に、マウス心臓のドキソルビシン誘発アポトーシス¹¹⁹⁾、蝸牛および前庭有毛細胞のシスプラチン誘発アポトーシス¹²⁰⁾、様々な細胞でのアポトーシスを防ぐことが示されている。一方、Pifithrin- μ (PFT- μ) は、抗アポトーシスタンパク質 Bcl-xL および Bcl-2 に対する p53 の親和性を下げることにより、p53 のミトコンドリアへの結合を阻害する¹²¹⁾。p53 のミトコンドリアへの移行を特異的に阻害する PFT- μ の神経保護的役割は、PFT- α の作用よりも強い⁹⁷⁾。このことは、PFT- α が p53 機能の一部しか阻害できない可能性を示唆するものであり、実験結果の解釈には注意を要する。

また、PFT- α は、細胞内で p53 非依存性の活性を示すことも報告されている¹²²⁻¹²⁵⁾。例えば、PFT- α は強力な AhR のアゴニストとして作用することが明らかとなっている¹²⁵⁾。AhR は Bax の転写を促進する^{126,127)}ことから、本研究において、PFT- α がシスプラチンによる Bax の発現増加に影響を与えなかった理由として、PFT- α が AhR 活性化を介して Bax の転写を促進した可能性が考えられる。さらに AhR 活性化は ROS を減少させる¹²²⁾ことから、これが PFT- α による ROS 減少の一端を担っているのかもしれない。

以上のように、PFT- α のオフターゲット作用の関与は否定できないものの、本研究において、PFT- α 処理により、シスプラチンによって誘導される PUMA の発現、活性酸素の発生、ミトコンドリア量および膜電位の低下が改善することを確認した。これらの結果は、シスプラチンのミトコンドリア障害に対する p53 活性化の関与を強く示唆するものである。さらに PFT- α はシスプラチンによる Atrogin-1 の上昇を半分程度まで抑制したことから、筋萎縮制御因子の誘導においても p53 活性化の影響が及んでいる可能性が考えられる。しかしながら、PFT- α は MyHC タンパク量の回復効果を示さなかった。そこで筋線維合成能を評価する目的で MyHC mRNA 発現について測定した結果、シスプラチンはすべてのアイソフォームの mRNA 発現を強く抑制することが明らかとなった。さらに MitoQ は、MyHC mRNA 発現量の低下を改善したのに対し、PFT- α は MyHC mRNA に対して全く効果を示さなかつ

た。従って、MitoQ と PFT- α 両者の MyHC 合成能と分解能に対する効果の差が、MyHC タンパク質量の結果の違いに反映したものと考えられる（表 3）。すなわち、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タンパク質分解には p53 の活性化が関与するものの、筋タンパク質合成能低下への関与はないと結論づけた。

表 3 MitoQ と PFT- α の MyHC 合成能と分解能に対する効果の違い

シスプラチン	MyHC タンパク質分解 ↑	MyHC タンパク質合成 ↓	MyHC タンパク質量 ↓
MitoQ	○	○	○
PFT- α	○	×	×

○：有効，×：無効

第 1 章における我々の研究では、C2C12 筋管細胞にシスプラチンを処理すると、解糖能が低下することを見出した。メタボローム解析の結果からも、シスプラチンによる解糖系経路の阻害が証明された。これまでの報告において p53 が解糖系を抑制することが明らかにされており⁶²⁻⁶⁵⁾、ヒト近位尿細管細胞における腎毒性の研究では、シスプラチンによって活性化された p53 が解糖系経路を阻害することが示されている^{66, 67)}。本研究では、C2C12 筋管細胞に PFT- α を前処理することで、シスプラチンによる解糖能の低下が改善された。このことは、シスプラチンによる解糖能の低下に p53 が関与し、筋萎縮因子の誘導のみならず、筋力などに関わる代謝エネルギー産生に影響を与えている可能性が示唆される。しかしながら、今回は MyHC タンパク質量の減少メカニズムについての検討は行っておらず、今後の研究において明らかにする必要がある。

本研究で得られた総合的な結果に基づき、シスプラチンによる筋管細胞萎縮の機構モデルを提案する（図 15）。

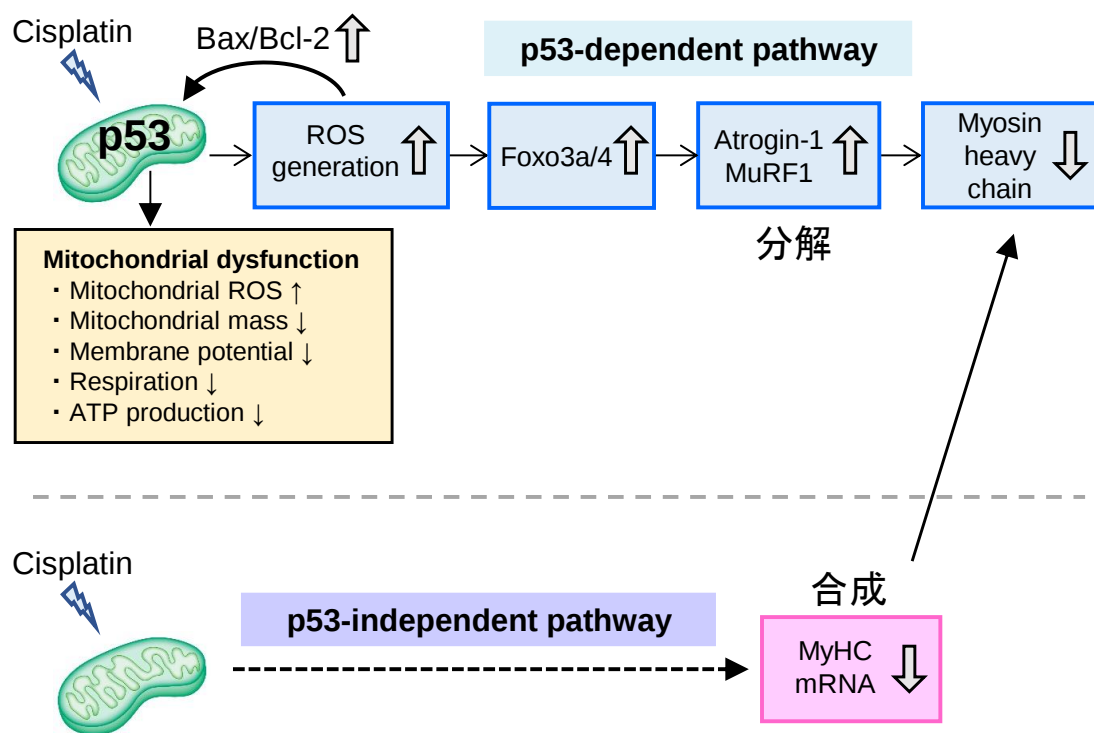


図 15 シスプラチンによる筋管細胞萎縮の機構モデル

すなわち、シスプラチンはミトコンドリア内で活性酸素を持続的に発生させ、p53 の活性化を引き起こす。そして、活性化した p53 は Bax/Bcl-2 比を上昇させてミトコンドリアの機能障害と持続的な細胞内 ROS の上昇をもたらし、最終的に筋タンパク質分解を亢進させる。一方、p53 はシスプラチンによる MyHC 合成抑制には関与しないことから、ミトコンドリア障害は p53 に依存しない別の経路で筋タンパク質合成を抑制すると考えられた。以上より、シスプラチンによる筋萎縮を阻止するためには、分解亢進と合成低下の両者を同時に抑制する必要がある、そのための具体的な戦略として、ミトコンドリアの保護が有望と考えられる。

第3章 シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスに関する基礎的研究 と補中益気湯の効果

第1節 背景

第1章および第2章では、C2C12 筋管細胞を用い、シスプラチンによる萎縮発症機序について検討した。その結果、シスプラチンは、ミトコンドリアの機能障害によって活性酸素を持続的に発生させ、筋線維タンパク質の分解亢進および合成阻害によって細胞萎縮を起こすこと、さらにミトコンドリア障害、細胞内活性酸素上昇と筋線維タンパク質の分解に p53 活性化が関与することが明らかとなった。そこで本章では、シスプラチンをマウスに投与して筋萎縮モデルを作製し、骨格筋重量とその制御因子の経日変化ならびにミトコンドリア障害との関連について検討した。

さらに、シスプラチンによる骨格筋萎縮に対して有用な薬物学的治療手段を提案する目的で、漢方薬である補中益気湯に注目した。補中益気湯は、重症筋無力症に対して筋機能改善効果を有することが、中国の臨床試験における大規模な疫学調査において示唆されている¹²⁸⁾。また動物試験では、尾部懸垂筋萎縮モデル¹²⁹⁾、マウス Colon 26 癌カヘキシアモデル¹³⁰⁾および筋萎縮性側索硬化症モデル¹³¹⁾において、補中益気湯は腓腹筋重量の低下を改善するとの報告がある。しかしながら、補中益気湯がシスプラチンによる筋萎縮を改善したという報告は臨床および基礎研究においてこれまでにない。

そこで本章では、補中益気湯がシスプラチンによる筋萎縮を改善できるのではないかと仮説を立て、以下の検討を行った。

- 1) シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスの病態解明
- 2) 補中益気湯のシスプラチン誘発筋萎縮に対する効果

第2節 材料・実験方法

第1項 実験動物

SPF の C57BL/6J 雄マウスをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社より購入し、5 日間以上検疫および馴化飼育した後、実験に用いた。週齢はシスプラチン投与時 8 週齢となる週齢で購入した。室温 20-26℃、湿度 30-70%、12 時間の明暗サイクルの下、マウス用プラスチックケージ (230×310×155 mm) にオートクレーブ滅菌したペパークリーン (日本エスエルシー株式会社、紙製) を敷き、1 ケージ当たり 1 匹収容し飼育した。本動物実験は、株式会社ツムラの「動物実験倫理規程 (承認番号: 18-043-1、18-043-2、19-013)」に従って実施した。

第2項 薬剤投与

シスプラチン (039-20093、033-20091 ; 富士フイルム和光純薬株式会社) は、3 mg/10mL で生理食塩水に溶解させ、10 mL/kg でマウスに腹腔内投与した。投与初日を Day0 とし、Day0-3 まで 1 回/日、4 日間投与後 Day4、7、14 まで飼育・観察した。補中益気湯は株式会社ツムラ製を使用した。補中益気湯は、日局オウギ (4)、日局ソウジュツ (4)、日局ニンジン (4)、日局トウキ (3)、日局サイコ (2)、日局タイソウ (2)、日局チンピ (2)、日局カンゾウ (1.5)、日局ショウマ (1)、日局ショウキョウ (0.5) の 10 種類の生薬を括弧内の割合で混合した熱水抽出物であり、スプレードライ方式にて乾燥させたエキス粉末を用いた。1.5 または 3%補中益気湯混餌飼料は、補中益気湯および MF 飼料を用いて、オリエンタル酵母工業株式会社にて作製し、シスプラチン投与開始 2 週間前 (Day-14) より自由摂餌にて与えた。対照群には同様に作製した MF コントロール飼料を与えた。

第3項 測定・解剖

体重は、飼育期間中の平日に毎日測定した。摂餌量は、シスプラチン投与期間中に毎日、

それ以外は2回/週測定した。自発活動量 (Locomotor activity test) は、実験動物用自発活動量センサー (NS-AS01 ; 株式会社ニューロサイエンス) を用いて測定した。握力測定は Day7 および Day14 に、齋藤式マウス用握力測定装置 (MK-380M ; 室町機械株式会社) を用い、マウスを測定用の網の上に置き、尾を手で水平引いた時、動物が引いた力に耐え切れずつかんだ網を離してしまうまでの握力を測定した。Day4、7、14 にイソフルランもしくはセボフルラン麻酔下にて開腹し、後大静脈切開による脱血致死後、腓腹筋を摘出し重量を測定、さらに赤色部分と白色部分に分離し¹³²⁾、重量を測定した。一部分は液体窒素で凍結後、各測定まで-80℃で保存し、一部分はホルマリン固定後、パラフィンプロックを作製し、免疫染色に供した。

第4項 RNA 抽出と RT-PCR

腓腹筋を、QIAzol Lysis Reagent (79306 ; QIAGEN) を添加してビーズとともにマイクロスマッシュ (株式会社トミー精工) にて破砕を行った。クロロホルム (2120861 ; 国産化学) を加え混合し、遠心分離後に上清を回収した。回収した上清と同量の 70%エタノールを加え混合し、RNeasy Mini Kit (74106 ; QIAGEN, Valencia, CA, USA) に付属する RNeasy Mini Spin Columns に添加、遠心を行った。その後、RNase-Free DNase Set (79254 ; QIAGEN) を用いて DNase 処理を行った。RNeasy Mini Kit に付属する Buffer RPE をカラムに添加、遠心を2回繰り返したのち、空の状態ですべての成分を回収した。RNase free water にて溶出し、total RNA を得た。抽出した RNA を約 100 ng/μL に希釈し、70℃で5分間インキュベートした後、4℃に冷却した。その後、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368813 ; Thermo Fisher Scientific) を用いて、RNA を相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。リアルタイム定量 PCR アッセイは、TaqMan Fast Advanced Master Mix (4444557 ; Thermo Fisher Scientific) および遺伝子特異的 TaqMan プライマー/プローブ (Thermo Fisher Scientific) と QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。プライマー/プローブの情報は表 4 に記載した。GAPDH の解析は内在性コントロールとして用い、mRNA 発現量は $\Delta\Delta Ct$

法を用いて算出した。

表 4 RT-PCR に使用するプライマー

Target	Gene name	Assay ID
GAPDH	Gapdh	Mm99999915_g1
Atrogin-1 (Fbxo32)	F-box protein 32	Mm00499523_m1
MuRF1 (Trim63)	tripartite motif-containing 63	Mm01185221_m1
Myostatin	Mstn	Mm01254559_m1
IGF-1	Igf1	Mm00439560_m1
MyoD	Myod1	Mm00440387_m1
Myogenin	Myog	Mm00446194_m1
Myh7	myosin, heavy polypeptide 7	Mm00600555_m1
Myh2	myosin, heavy polypeptide 2	Mm01332564_m1
Myh1	myosin, heavy polypeptide 1	Mm01332500_gH
Myh4	myosin, heavy polypeptide 4	Mm01332541_m1
PGC-1 α	Ppargc1a	Mm01208835_m1
SOD2	Sod2	Mm01313000_m1
Rpph1	ribonuclease P RNA component H1	Mm04336066_s1
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1	Mm04225274_s1

第 5 項 ミトコンドリア DNA レベルの測定

腓腹筋をビーズとともにマイクロスマッシュ（株式会社トミー精工）で破碎を行った。その後、QIAamp DNA Mini Kit（51304；QIAGEN）付属の Buffer ATL、Proteinase K を添加し、完全に溶解するまで 56℃でインキュベートを行った。RNase A (17,500 U) (19101; QIAGEN) を添加、混和後、Buffer AL を加えて 70℃で 10 分間インキュベートを行った。室温に戻し、エタノール（96～100%）を加え、Kit 付属の QIAamp Mini Spin Column に添加し、遠心分離を行った。Buffer AW1 を添加、遠心、Buffer AW2 添加、遠心を行ったのち、メンブレン乾燥のため空の状態です遠心を行った。Buffer AE を添加し、遠心分離により溶出し、DNA を得た。リアルタイム定量 PCR アッセイは、TaqMan Fast Advanced Master Mix および遺伝子特異的 TaqMan プライマー/プローブと QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System を用いて実施

した。プライマー/プローブの情報は表 4 に記載した。ミトコンドリア DNA (mtDNA) 量として NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) コピー数を測定し、ribonuclease P RNA component H1 (Rpph1) で補正した。

第 6 項 免疫染色

Myosin (Skeletal, Slow および Fast) の免疫染色は、株式会社バイオ病理研究所にて実施した。脱パラフィン後、オートクレーブにより 120℃、10 分間で賦活化し、スキムミルクにてブロック後、Monoclonal Anti-Myosin (Skeletal, Slow または Fast) antibody produced in mouse (M8421、M4276 ; Sigma-Aldrich) を 100 倍希釈したもので、4℃で一晩抗原抗体反応を行った。ヒストファインシンプルステインマウス (M) および DAB 溶液で発色させた後に、ヘマトキシリンで核染色を行った。筋線維の断面積は、ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) で算出した。

第 7 項 データおよび統計解析

統計解析は StatLight (Yukms Co. Ltd) もしくは GraphPad Prism software, version 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。データは平均値±標準誤差 (SE) で表した。2 群間の統計解析は Student's t-test または Aspin-Welch t-test を用いて行った。一方、複数群による多重比較には Tukey-Kramer 検定または Steel-Dwass 検定を用い、また 2 元配置分散分析 (Two-way ANOVA) では Bonferroni 法を用い、統計的有意性の水準は $p < 0.05$ とした。

第3節 実験結果

第1項 シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスの病態解明

C57BL/6J 雄性マウスを、生理食塩水投与群 (Vehicle, $n=8$) とシスプラチン 3 mg/kg 投与群 (Cisplatin, $n=8$) に群分けし、体重、摂餌量、握力、腓腹筋量を測定した。体重は、シスプラチン投与 Day2 より対照群と比較して有意に低下し、Day6 に最低値となった。その後回復する傾向を示したが、Day14 でも対照群に比べ有意な低下が持続していた (図 16)。摂餌量は、Day3 で有意な低下が見られたが、その後回復した (図 17)。

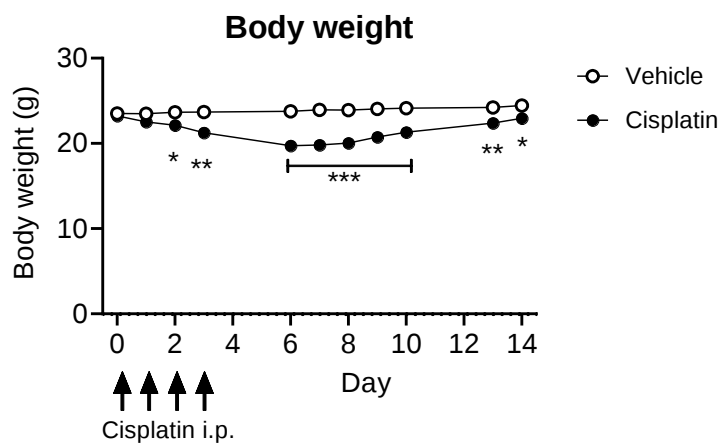


図 16 シスプラチン誘発筋萎縮マウスの体重推移

数値は平均値±SE で表した ($n=8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehicle 群。

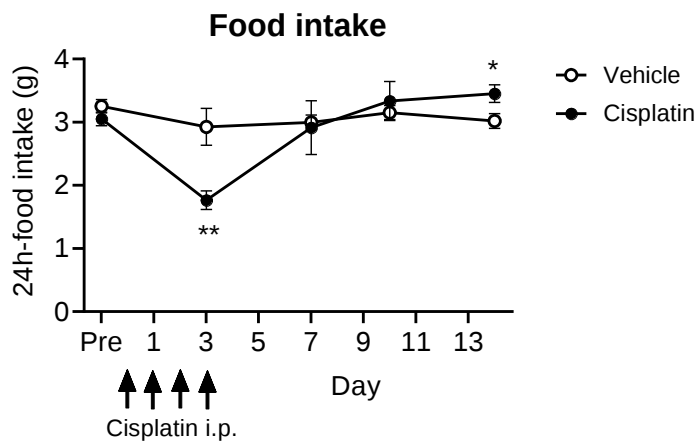


図 17 シスプラチン誘発筋萎縮マウスの摂餌量推移

数値は平均値±SE で表した ($n = 8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle 群。

腓腹筋重量は、Day4、7、14 のいずれにおいても有意な低下がみられ (図 18)、握力は、シスプラチン投与 Day7 と Day14 において有意な低下が認められた (図 19)。以上の結果より、シスプラチン投与後、筋萎縮が長期間にわたり持続することが明らかとなった。

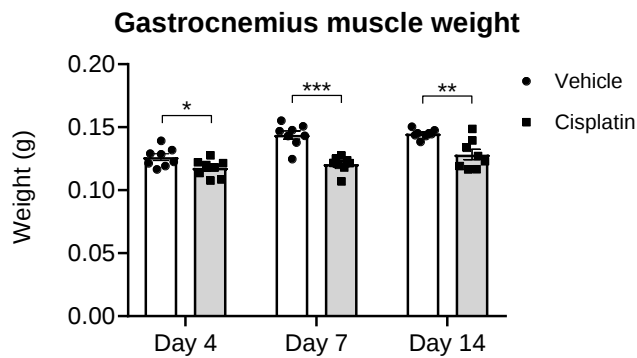


図 18 シスプラチン誘発筋萎縮マウスの腓腹筋重量への影響

数値は平均値±SE で表した ($n = 8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehicle 群。

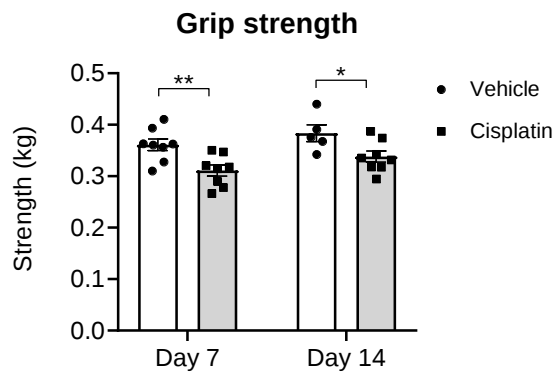


図 19 シスプラチン誘発筋萎縮マウスの握力への影響

数値は平均値±SE で表した ($n = 5-8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle 群。

筋線維タンパク質分解にかかわる筋特異的ユビキチンリガーゼおよび Myostatin に対するシスプラチンの影響を検討した。*Atrogin-1* mRNA の腓腹筋内発現量は、Day4 に有意に上昇し、Day7 にも上昇傾向が認められたが、Day14 では対照群より有意に低下した(図 20A)。*MuRF-1* mRNA についても、有意差はないものの同様の傾向を示した(図 20B)。*Myostatin* mRNA については、Day4 で増加傾向、Day7 で有意な増加が見られたものの、Day14 では対照群と同程度であった(図 20C)。

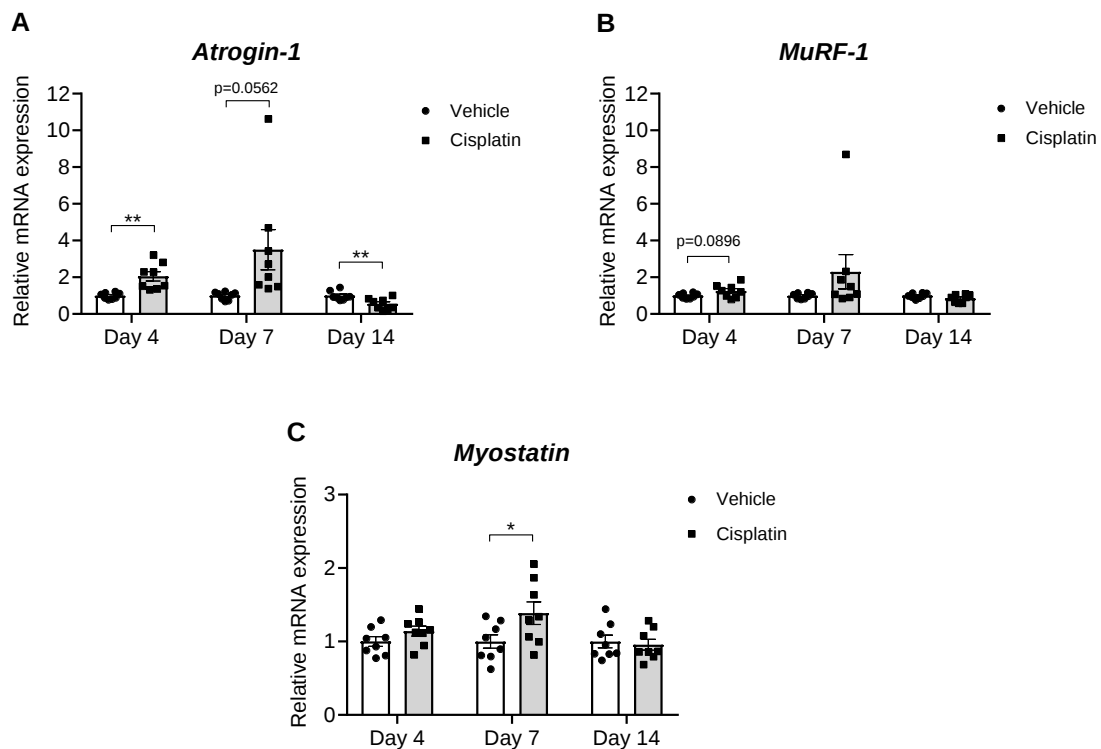


図 20 腓腹筋における筋分解系に対するシスプラチンの作用

(A) *Atrogin-1*、(B) *MuRF1*、(C) *Myostatin* mRNA 発現レベル
 数値は平均値±SE で表した ($n = 8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle 群。

次に、腓腹筋における筋合成および筋分化に関わる因子の遺伝子発現について検討した結果、インスリン様成長因子 *Igfl* mRNA 発現量は、シスプラチン投与 Day4、Day7 において対照群に比べ有意に低下していた (図 21A)。さらに *MyoD* mRNA 発現量は 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 (図 21B)。しかし *Myogenin* の発現量には有意な変化は見られなかった (図 21C)。さらに、筋線維の合成能を評価するために、Day4 において MyHC アイソフォームの遺伝子を測定した。その結果、速筋線維である *Myh4* が有意に低値を示したが、他のアイソフォームにはほとんど変化が見られないことがわかった (図 21D)。以上の結果から、シスプラチン投与 Day4 から Day7 に活性化した筋分解系は Day14 には回復するが、筋タンパク質合成系の低下は Day14 まで持続することが明らかとなった。このことが、シスプラチン投与中止後の腓腹筋重量の回復が不

十分である理由のひとつと考えられた。

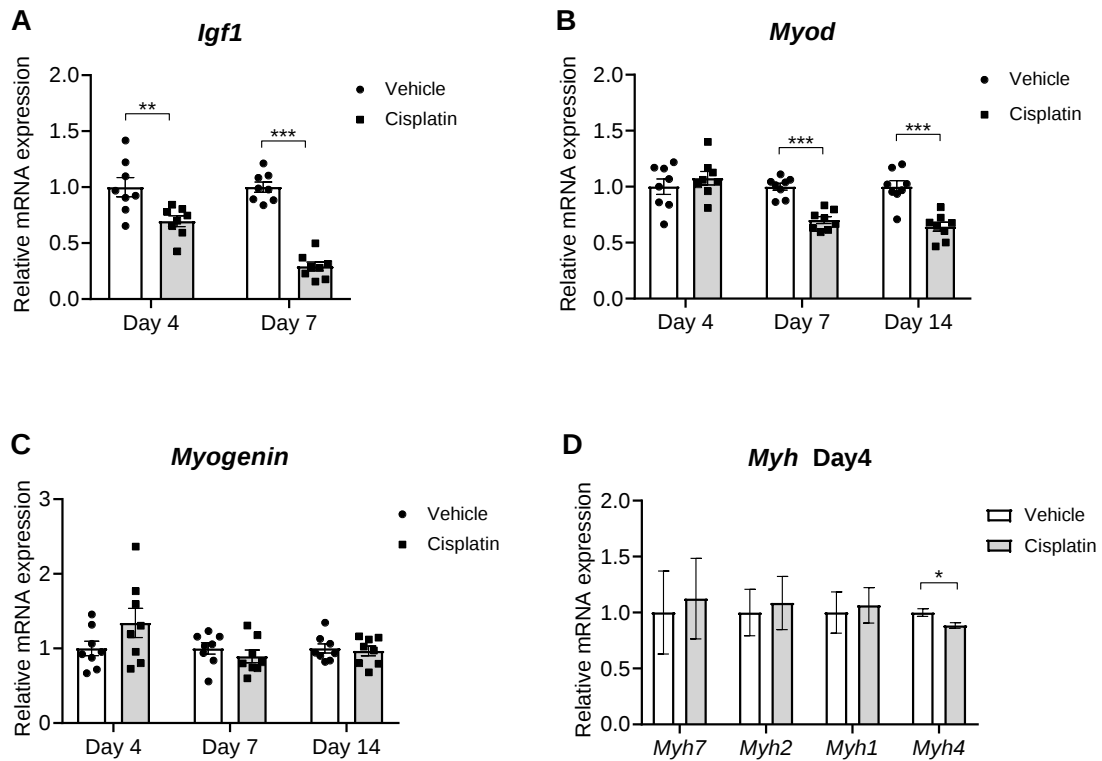


図 21 腓腹筋における筋合成系に対するシスプラチンの作用

(A) *Igf1*、(B) *MyoD*、(C) *Myogenin*、(D) MyHC アイソフォーム mRNA 発現レベル
数値は平均値±SE で表した ($n = 8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Vehicle 群。

次にシスプラチンの腓腹筋ミトコンドリアに対する影響を明らかにするために、ミトコンドリア DNA (mtDNA) 量を測定した。mtDNA は、対照群と比較して Day4 で有意に低下しており、Day7 では低下傾向が見られたが、Day14 では差は認められなかった(図 22A)。またミトコンドリア生合成を制御する *Pgc-1 α* (図 22B)、ならびにミトコンドリアに局在する活性酸素消去酵素 *Sod2* の mRNA も Day7 において低下した(図 22C)。したがって、シスプラチン投与後の Day4-7 にミトコンドリア障害が起こっていると考えられた。

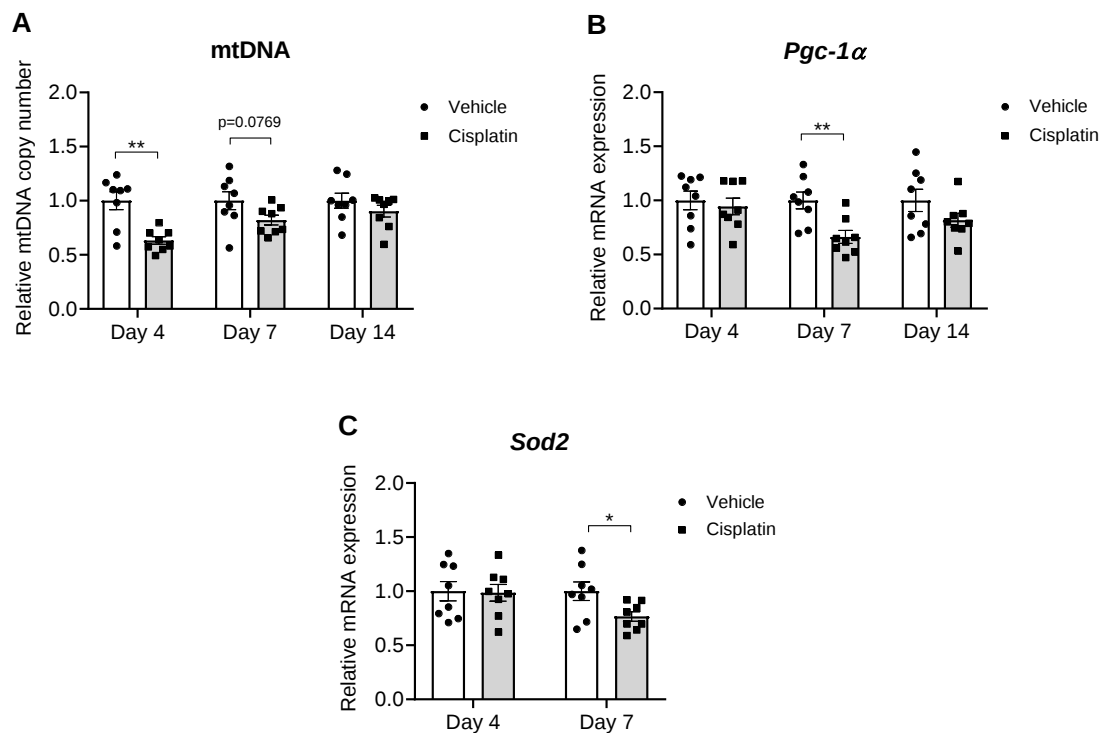


図 22 腓腹筋におけるミトコンドリアに対するシスプラチンの作用

(A) mtDNA、(B) *Pgc-1α* mRNA 発現レベル、(C) *Sod2* mRNA 発現レベル
 数値は平均値±SE で表した ($n = 8$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. Vehicle 群。

次に、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色部分（赤筋）と速筋線維を多く含む白色部分（白筋）に分離し、それぞれの重量を測定した。その結果、シスプラチン投与 Day7 では腓腹筋の赤筋重量、白筋重量がともに有意に低下していたのに対し、Day14 では白筋重量のみ有意な低下が認められ、赤筋は対照群と差がなかった（図 23A-23C）。したがって、シスプラチンによる筋萎縮において、赤筋が早期に回復傾向を示すのに対し、白筋の回復は遅く、これが筋萎縮が持続する原因になっていると考えられた。

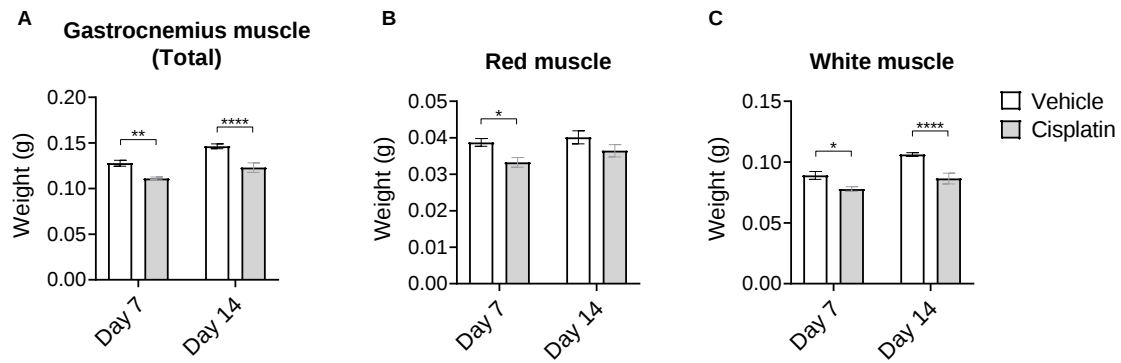


図 23 腓腹筋重量、赤筋重量および白筋重量に対するシスプラチンの作用

(A) 腓腹筋重量、(B) 腓腹筋赤筋重量、(C) 腓腹筋白筋重量

数値は平均値±SE で表した ($n = 10$)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. Vehicle 群。

第2項 補中益気湯のシスプラチン誘発筋萎縮に対する効果

シスプラチン筋萎縮モデルマウスに補中益気湯を混餌投与し、その効果を検討した。シスプラチン投与による体重および摂餌量の低下に対して、補中益気湯投与は有意な影響を与えなかった (図 24 および図 25)。実験最終日 Day14 に、腓腹筋重量 (体重の影響を除くため体重当たりの腓腹筋量) に対する補中益気湯の効果について検討をおこなった。その結果、シスプラチン投与により腓腹筋全重量の低下が認められたが、補中益気湯 1.5% および 3% 混餌投与により有意に回復することがわかった (図 26A)。さらに、その効果は白筋よりも赤筋に対してより明確であり、補中益気湯投与 3% 投与により赤筋は有意に増加したが、白筋は増加傾向を示すにとどまった (図 26B および 26C)。

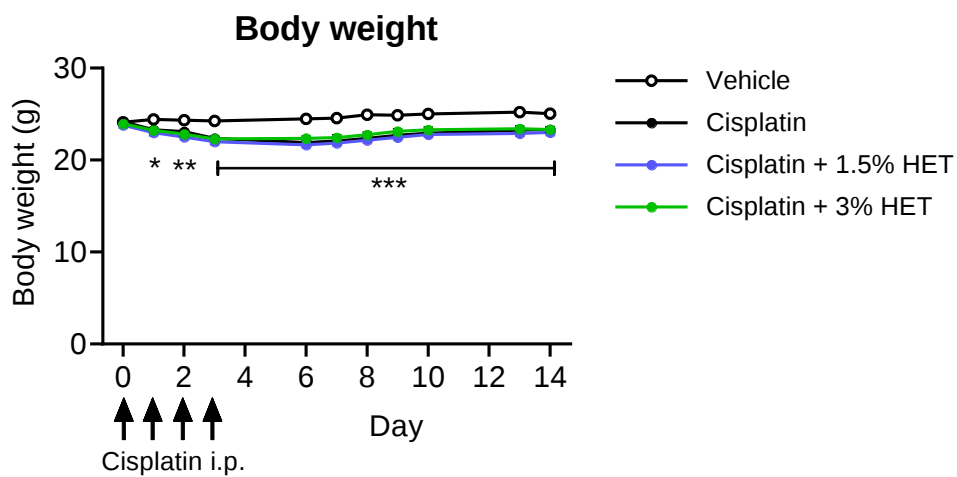


図 24 シスプラチン誘発筋萎縮マウスにおける体重に対する補中益気湯の効果
 数値は平均値±SE で表した ($n = 9-10$)。HET：補中益気湯。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$
 Vehicle 群 vs. Cisplatin 群。

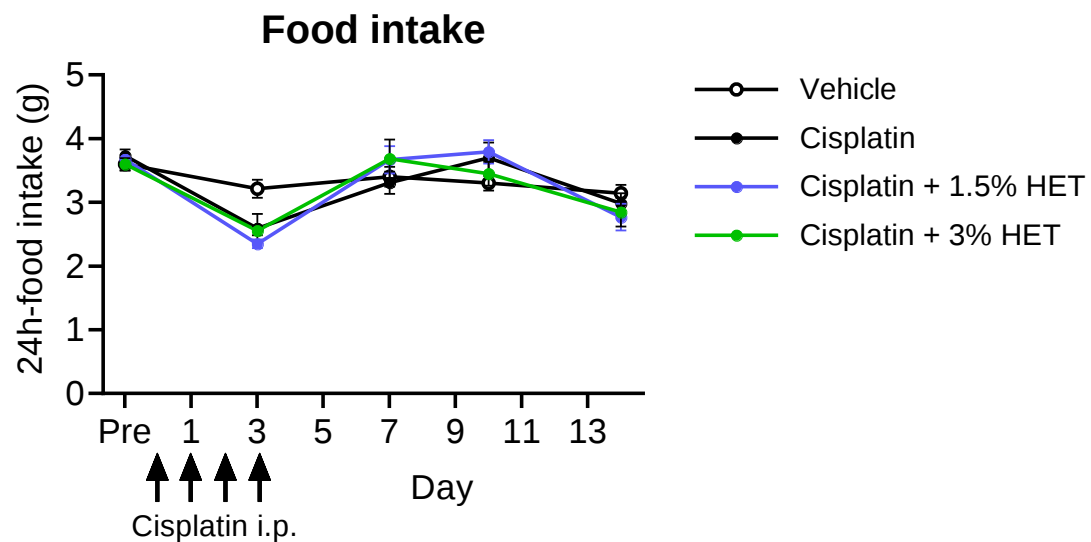


図 25 シスプラチン誘発筋萎縮マウスにおける摂餌量に対する補中益気湯の効果
 数値は平均値±SE で表した ($n = 8-10$)。HET：補中益気湯。

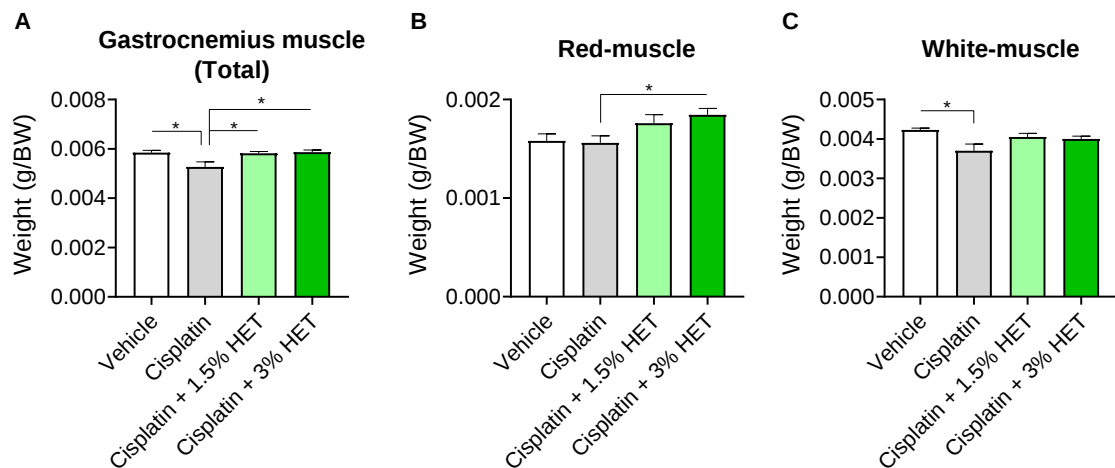


図 26 シスプラチン筋萎縮モデルにおける腓腹筋重量、赤筋重量および白筋重量に対する補中益気湯の効果

(A) 腓腹筋重量、(B) 腓腹筋赤筋重量、(C) 腓腹筋白筋重量

数値は平均値±SE で表した ($n = 9-10$)。HET : 補中益気湯。* $p < 0.05$ vs. Cisplatin 群。

次に、腓腹筋パラフィンブロックを横断面で薄切し、MyHC アイソフォーム 7 (Myosin7) 陽性遅筋線維の免疫染色を行い (図 27A)、赤筋部位の Myosin7 陽性遅筋線維の断面積を測定した。対照群とシスプラチン群で Myosin7 陽性遅筋線維の断面積に差は見られなかったが、補中益気湯投与群ではシスプラチン群と比較して有意な増加が認められた (図 27B)。以上より、補中益気湯は、シスプラチン筋萎縮モデルにおいて、腓腹筋の遅筋線維を増加させると考えられた。

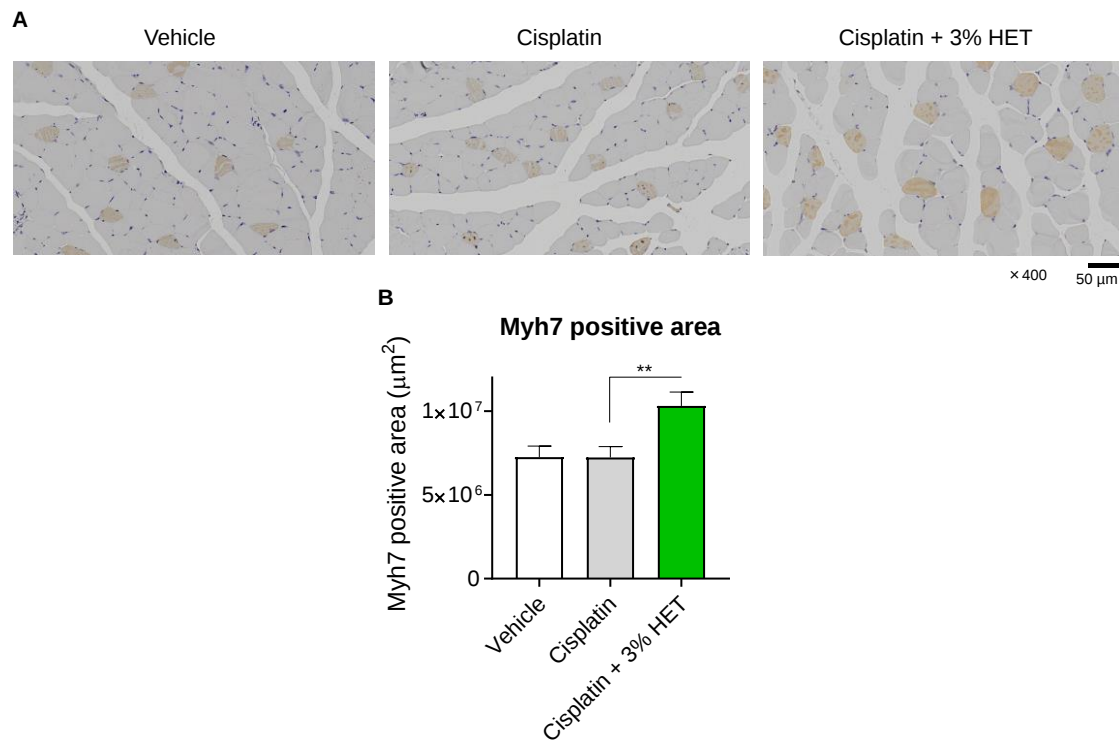


図 27 シスプラチン筋萎縮モデルにおける遅筋線維断面積に対する補中益気湯の効果

(A) 免疫組織染色画像、(B) Myosin7 陽性遅筋線維の断面積

数値は平均値±SE で表した ($n = 8-10$)。HET：補中益気湯。Bar：50 μm。 ** $p < 0.01$ vs. Cisplatin 群。

自発活動量は、シスプラチン投与 Day1-7 において顕著な低下が認められ、その後対照群レベルまで回復した。補中益気湯投与群は、Day10-13 において活動量が増加する傾向を示した (図 28)。Day13 に握力を測定したところ、シスプラチン群は対照群と比べ低下傾向を示し、補中益気湯投与群で改善傾向が認められた (図 29)。

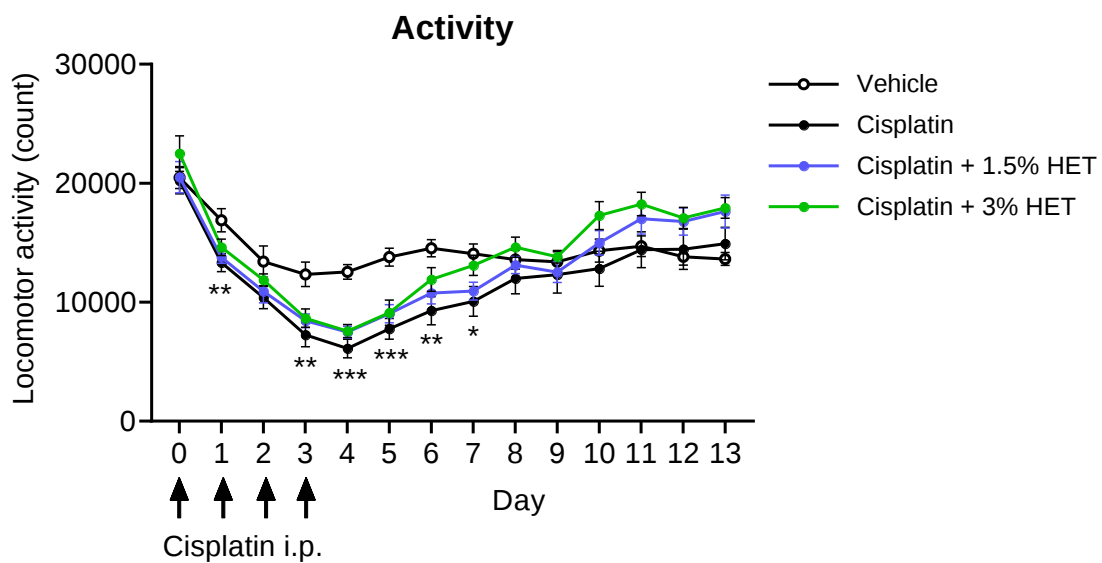


図 28 シスプラチン筋萎縮モデルにおける自発活動量に対する補中益気湯の効果
 数値は平均値±SE で表した ($n = 9-10$)。HET：補中益気湯。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$
 Vehicle 群 vs. Cisplatin 群。

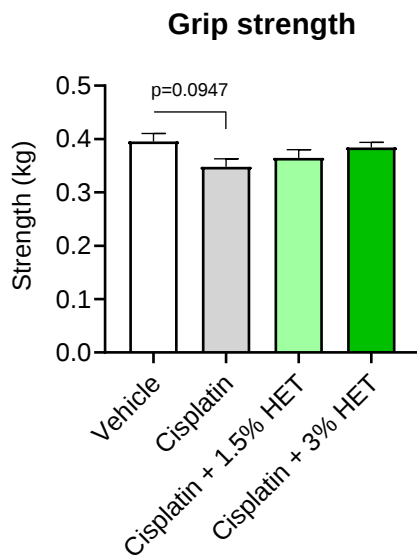


図 29 シスプラチン筋萎縮モデルにおける握力に対する補中益気湯の効果
 数値は平均値±SE で表した ($n = 9-10$)。HET：補中益気湯。

第4節 考察

C57BL/6J 雄マウスにシスプラチン 3 mg/kg を Day0～Day3 まで連日腹腔内投与してシスプラチン誘発筋萎縮モデルを作製し、その病態解明を実施した。体重および腓腹筋重量、筋萎縮関連遺伝子の推移から、Day0～Day7 を傷害期、Day8～Day14 を回復期と定義して、検討をおこない、以下の点を明らかにした。

- 1) シスプラチン投与 Day7 において腓腹筋の赤筋および白筋重量はともに低下したが、Day14 では赤筋は回復傾向にあるが白筋の萎縮は持続した。
- 2) シスプラチン投与 Day4 および Day7 の傷害期において *Atrogin-1* および *Myostatin* mRNA の増加、*Igf1* mRNA の低下が認められ、これらが萎縮に関与した可能性が示唆された。
- 3) mtDNA, *Pgc-1 α* および *Sod2* mRNA が傷害期に低下したことから、ミトコンドリア障害が示唆された。
- 4) 筋分化制御因子 *MyoD* mRNA は回復期まで持続的に低下したが、*Myogenin* mRNA は変化しなかった。

骨格筋萎縮を起こす疾患において、加齢に伴うサルコペニア³⁷⁻³⁹⁾や廃用性筋萎縮^{40, 41)}ではミトコンドリア障害が関与していると報告されているが、シスプラチンによるミトコンドリア障害と筋萎縮の因果関係については詳細に検討されていない。第1章ではシスプラチンはC2C12筋管細胞においてミトコンドリア障害に伴いROSを産生し、それによるアポトーシスは回避されたものの細胞萎縮を起こすことを明らかにした。本章においても、シスプラチン投与マウスの腓腹筋において、ミトコンドリア関連因子である *Pgc-1 α* ならびに *Sod2* の遺伝子発現および mtDNA の低下が認められたことから、腓腹筋のミトコンドリアに機能障害が生じていることが示唆された。

シスプラチン筋萎縮モデル動物におけるミトコンドリアの関与について、いくつかの

研究において同様の結果が報告されている。シスプラチン投与したラットの長趾伸筋において *Pgc-1 α* 発現の低下が示されており²⁴⁾、さらに、シスプラチン投与ラット前脛骨筋ではミトコンドリア量の減少と *Pgc-1 α* タンパク質発現の低下が認められている²⁷⁾。一方、加齢に伴うサルコペニアにおいてもミトコンドリア障害の関与が報告されている^{39, 40, 133)}。加齢に伴うミトコンドリア生合成の低下は、様々な刺激に対する *Pgc-1 α* の反応性の欠如に起因している可能性があり¹³⁴⁾、ミトコンドリアは加齢およびサルコペニアの中心的な制御因子の一つであると考えられている。

そこで、次にミトコンドリア障害と筋タンパク質制御因子との関連性について検討した。シスプラチンによるミトコンドリア関連因子の変動は Day4 および Day7 の傷害期において認められ、*Atrogin-1* の増加時期と一致した。したがって、C2C12 筋管細胞の結果とあわせて考えると、シスプラチン投与傷害期ではミトコンドリア機能障害とともに ROS が発生し、*Atrogin-1* を誘導することで筋萎縮を起こしているものと推察された。さらに腓腹筋では *Myostatin* の増加、筋合成に重要である *Igf1* の低下が認められた。*Myostatin* は、骨格筋に多く発現し筋量を負に制御する細胞外サイトカインであり、*atrogenes* のアップレギュレーションと筋形成に重要な遺伝子 (*MyoD* や *Pax3* など) のダウンレギュレーションを引き起こす¹³⁵⁾。今回の検討において、*Atrogin-1* および *Myostatin* の増加が、ともに Day7 の傷害期に強く認められたことから、*Atrogin-1* の活性化に *Myostatin* が関与した可能性が示唆される。一方、IGF-1 は Akt を活性化することで FoxO/*Atrogin-1* 系を抑制するとともに mTOR を介して筋タンパク質合成に関与し、筋管細胞において autocrine/paracrine に制御する機能を有していることから、シスプラチンによる *Igf1* の発現低下は筋萎縮に大きな影響を与えていると考えられる¹³⁶⁾。しかしながら、*Myostatin* や IGF-1 とミトコンドリア障害との関連については明確ではなく、今後の重要な検討課題の一つである。

骨格筋は、見かけ上の色の違いから赤い筋線維 (赤筋) と白い筋線維 (白筋) に分類される¹³⁷⁾。この色の違いはミオグロビンの色素タンパク量の違いによるものであるが、赤筋と白筋は、収縮速度の違いからそれぞれ遅筋と速筋として分類されることもある。腓腹筋は

遅筋および速筋からなる混合筋であることから、既報¹³²⁾の様に、遅筋線維を多く含む赤筋と速筋線維を多く含む白筋に分離して評価することは、より詳細なメカニズム解明につながると考えられる。

本研究では、シスプラチン投与後、Day7（傷害期）において、赤筋重量および白筋重量はともに低下したが、Day14（回復期）では、赤筋は萎縮の回復が認められるのに対し白筋では回復はほとんど認められなかった。これらの結果は、Day4において速筋 MyHC アイソフォーム遺伝子 *Myh4* が低下したこと、またシスプラチンが C2C12 筋管細胞の遅筋 MyHC アイソフォーム遺伝子 *Myh7* と比較して *Myh4* を強く抑制したことから、速筋線維の合成能が低下していることが示唆された。すなわち、シスプラチンは、遅筋よりも速筋優位に強力かつ長期的に大きな影響を及ぼしていると考えられた。

速筋では遅筋に比べて MyoD の発現量が多く、Myogenin の発現量が少ない。一方、遅筋では Myogenin をより多く発現している¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾。本研究ではシスプラチンが長期にわたって腓腹筋 *MyoD* を低下させたが、腓腹筋 *Myogenin* には影響を与えなかった。すなわち、速筋線維が多い白筋萎縮の長期化は、MyoD および MyoD/Myogenin 比の持続的減少が原因となっているかもしれない。

本研究では、傷害期において、既報⁷⁶⁾と同様に Atrogin-1 の上昇が認められた。Atrogin-1 の過剰発現は、MyoD による分化を抑制し、筋管形成を阻害することが報告されている⁵⁴⁾。Day4 では *MyoD* mRNA には変化はないが、Atrogin-1 が増加したことにより MyoD タンパク質が分解されて MyoD の筋分化作用が減弱している可能性もあり、白筋萎縮の一つの要因となっていたかもしれない。

一方、遅筋線維が多い赤筋は、傷害期に筋重量が低下したが、その後回復した。骨格筋は筋タンパク質の分解と合成により恒常性が維持されており¹⁴¹⁾、廃用性筋萎縮モデルでは再負荷により、筋タンパク質合成系が亢進し、筋量が完全に回復する¹⁴²⁾。シスプラチン誘発筋萎縮をはじめとする様々なモデルにおいて、運動が筋萎縮を予防できると報告されているが^{35, 143-145)}、同様の効果を有する薬剤はいまだ見いだされていない。今後、筋萎縮の予

防あるいは回復促進効果を有する薬物が開発されれば、骨格筋萎縮治療の有用な手段になりうると思われる。

漢方薬の補中益気湯は補剤として知られており、体力や気力などの生体のもつエネルギーが低下したときに不足したものを補い、病態を回復させるとされている。「病後の体力増強」や「食欲不振」や「感冒」などの効能効果をもつ医療用漢方製剤である。異らは、老年期慢性閉塞性肺疾患に伴う栄養状態の改善や体重の有意な増加を確認している¹⁴⁶⁾。また、がん患者のがんに伴う疲労感に利用されてきた¹⁴⁷⁾。一方、筋萎縮に対しては、補中益気湯が腓腹筋量の低下を抑制することが、臨床ならびに基礎研究にて報告されている¹²⁸⁻¹³¹⁾。本試験においても、シスプラチンによる腓腹筋重量の低下を補中益気湯が改善させることを明らかにした。さらに注目すべきは、白筋よりも赤筋の重量に対する効果が明確であり、赤筋に多く分布している Myh7 陽性遅筋線維の断面積が増加する結果が得られたことである。また興味深いことに、シスプラチン投与傷害期においては、補中益気湯の効果は見られなかったが、回復期において効果が認められた。しかしながら、本研究では補中益気湯の効果が赤筋優位である点や回復期に効果を示すなどの特徴的な薬理作用に関し、その機序を明らかにすることができなかった。近年、尾部懸垂筋萎縮モデルにおいて、補中益気湯が Myogenin や MyHC の低下を改善するとの報告があり¹²⁹⁾、今回のシスプラチン誘発筋萎縮モデルにおいても筋線維タンパク質合成を促進した可能性が考えられる。

本研究ではシスプラチンによるミトコンドリア機能障害に対する補中益気湯の効果についても明確にできなかった。近年、基礎研究において補中益気湯がミトコンドリアの代謝機能を改善すると報告されており¹⁴⁸⁾、また老化マウス肝臓のミトコンドリア新生を回復をさせる¹⁴⁹⁾ことから、骨格筋のミトコンドリアに対しても補中益気湯が効果を示す可能性がある。本研究では、補中益気湯は遅筋優位に作用していることから、ミトコンドリアに対して何らかの作用を示すことが考えられるが、この点は今後の検討で明らかにしたい。

また本研究では、補中益気湯は傷害期における活動量に効果を示さなかったが、回復期において赤筋重量の改善とともに握力や活動量の回復傾向を示した。このことより、握力は

おもに赤筋の機能を反映していると考えられた。また自発活動量の増加は、骨格筋量や筋パフォーマンス改善の結果と考えられるが、逆に何らかの別の原因による自発運動量の増加が、筋タンパク質合成系を亢進して筋量を回復させた可能性も否定できない。このように、骨格筋量増加と運動量増加は、相互に作用している可能性が高く、慎重に評価する必要がある。

補中益気湯は多成分製剤であり、多彩な作用を示す可能性がある。今後、さらなる補中益気湯の作用メカニズム解明研究が必要となるものの、臨床における筋萎縮の治療薬として提案できることを見出した。

総括

シスプラチンは種々の癌治療に用いられている抗がん剤であるが、ごく最近、骨格筋萎縮により癌患者の QOL や生命予後に悪影響を与えることが明らかとなってきた。マウスにシスプラチンを投与すると、筋特異的ユビキチンリガーゼ Atrogin-1 ならびに MuRF1 の活性化に伴い骨格筋萎縮が起こることが報告されているが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。一方、シスプラチンは骨格筋のミトコンドリア障害を引き起こすが、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。そこで本研究では、シスプラチンによる筋萎縮メカニズムの解明が筋萎縮の予防や治療方法の確立につながる重要な意味を持つと考え、シスプラチン誘発 C2C12 筋管細胞萎縮におけるミトコンドリア障害の役割について検討した。また、シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスの病態を解明するとともに、補中益気湯の有用性について検討した。

1) シスプラチン誘発筋管細胞萎縮病態におけるミトコンドリア機能不全の関与

C2C12 筋管細胞を用いた研究において、シスプラチンはアポトーシス細胞死を誘導することなく細胞萎縮を惹起した。その機序として、ミトコンドリアおよび細胞内活性酸素 (ROS) の増加に伴い、Bax/Bcl-2 比を上昇させミトコンドリア機能を障害すること、さらにそれが持続的な ROS 生成を助長することにより、FOXO シグナル経路を活性化し、Atrogin-1/MuRF1 の転写活性化に至ることを解明した。さらに、シスプラチンは筋管細胞において酸化リン酸化のみならず解糖系も阻害すること、一方で ATP 産生低下は筋萎縮への関与が少ないことを突き止めた。これまで知られていなかったシスプラチン筋萎縮のメカニズムの一部が解明され、有益な結果であると考えられた。以上の結果より、ミトコンドリアの保護や活性酸素の消去が、シスプラチンベースの化学療法に伴う筋萎縮を防ぐための有望な戦略である可能性が示唆された。

2) シスプラチン誘発筋管細胞萎縮における p53 の役割

p53 はミトコンドリア外膜上 Bax/Bcl-2 や解糖系を制御する役割を有している。そこでシスプラチンによる C2C12 筋管細胞萎縮に対する p53 の関与について検討した。その結果、シスプラチンが *Atrogin-1/MuRF1* mRNA を増加させる経路の多くは p53 転写活性に依存するが、*MyHC* mRNA の低下は p53 に依存しないことが明らかとなった。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タンパク質分解には p53 の活性化が関与するものの、筋タンパク質合成能低下への関与はないと結論づけた。

3) シスプラチン誘発筋萎縮モデルマウスに関する基礎的研究と補中益気湯の効果

In vivo 検討において、シスプラチン投与後 7 日までの傷害期において、摂餌量、体重とともに腓腹筋量が低下した。その後 14 日目まで体重の回復は見られたものの、速筋を中心とした筋萎縮が持続的に生じることを確認した。傷害期において、*Atrogin-1* および *Myostatin* mRNA の増加、*Igf1* mRNA の低下が認められ、これらが萎縮に関与した可能性が示唆された。また、mtDNA、*Pgc-1 α* および *Sod2* mRNA が傷害期に低下したことから、ミトコンドリアの障害が示唆された。一方、回復期においては、*MyoD* mRNA の低下が認められ、筋萎縮の持続に関与している可能性が示唆された。補中益気湯はシスプラチンによる腓腹筋の萎縮を改善した。特に赤筋重量および遅筋線維断面積の増加が認められた。

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することが示唆された。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考えられる。

参考文献

- 1) Yin L, Li N, Jia W, Wang N, Liang M, Yang X, Du G: Skeletal muscle atrophy: From mechanisms to treatments. *Pharmacol Res*, **172**, 105807 (2021).
- 2) Schiaffino S, Dyar KA, Ciciliot S, Blaauw B, Sandri M: Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. *FEBS J*, **280**, 4294-4314 (2013).
- 3) Sandri M: Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*, **23**, 160-170 (2008).
- 4) Yoshida T, Delafontaine P: Mechanisms of IGF-1-Mediated Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy. *Cells*, **9**, (2020).
- 5) Bodine SC, Baehr LM: Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **307**, E469-484 (2014).
- 6) Frontera WR, Ochala J: Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif Tissue Int*, **96**, 183-195 (2015).
- 7) Wilkinson DJ, Piasecki M, Atherton PJ: The age-related loss of skeletal muscle mass and function: Measurement and physiology of muscle fibre atrophy and muscle fibre loss in humans. *Ageing Res Rev*, **47**, 123-132 (2018).
- 8) Marzuca-Nassr GN, SanMartin-Calisto Y, Guerra-Vega P, Artigas-Arias M, Alegria A, Curi R: Skeletal Muscle Aging Atrophy: Assessment and Exercise-Based Treatment. *Adv Exp Med Biol*, **1260**, 123-158 (2020).
- 9) Kramer CL: Intensive Care Unit-Acquired Weakness. *Neurol Clin*, **35**, 723-736 (2017).
- 10) Piva S, Fagoni N, Latronico N: Intensive care unit-acquired weakness: unanswered questions and targets for future research. *F1000Res*, **8**, (2019).
- 11) Sugiyama K, Narita Y, Mitani S, Honda K, Masuishi T, Taniguchi H, Kadowaki S, Ura T, Ando M, Tajika M, Muro K: Baseline Sarcopenia and Skeletal Muscle Loss During Chemotherapy Affect Survival Outcomes in Metastatic Gastric Cancer. *Anticancer Res*, **38**, 5859-5866 (2018).
- 12) Davis MP, Panikkar R: Sarcopenia associated with chemotherapy and targeted agents for cancer therapy. *Ann Palliat Med*, **8**, 86-101 (2019).

- 13) Dolly A, Dumas JF, Servais S: Cancer cachexia and skeletal muscle atrophy in clinical studies: what do we really know? *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **11**, 1413-1428 (2020).
- 14) Lipina C, Hundal HS: Lipid modulation of skeletal muscle mass and function. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **8**, 190-201 (2017).
- 15) Cohen S: Role of calpains in promoting desmin filaments depolymerization and muscle atrophy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, **1867**, 118788 (2020).
- 16) Lavine KJ, Sierra OL: Skeletal muscle inflammation and atrophy in heart failure. *Heart Fail Rev*, **22**, 179-189 (2017).
- 17) Cao RY, Li J, Dai Q, Li Q, Yang J: Muscle Atrophy: Present and Future. *Adv Exp Med Biol*, **1088**, 605-624 (2018).
- 18) Moreira-Pais A, Ferreira R, Gil da Costa R: Platinum-induced muscle wasting in cancer chemotherapy: Mechanisms and potential targets for therapeutic intervention. *Life Sci*, **208**, 1-9 (2018).
- 19) Campelj DG, Goodman CA, Rybalka E: Chemotherapy-Induced Myopathy: The Dark Side of the Cachexia Sphere. *Cancers (Basel)*, **13**, (2021).
- 20) Conte E, Bresciani E, Rizzi L, Cappellari O, De Luca A, Torsello A, Liantonio A: Cisplatin-Induced Skeletal Muscle Dysfunction: Mechanisms and Counteracting Therapeutic Strategies. *Int J Mol Sci*, **21**, (2020).
- 21) Lin KY, Cheng HC, Yen CJ, Hung CH, Huang YT, Yang HL, Cheng WT, Tsai KL: Effects of Exercise in Patients Undergoing Chemotherapy for Head and Neck Cancer: A Pilot Randomized Controlled Trial. *Int J Environ Res Public Health*, **18**, (2021).
- 22) Abe H, Takei K, Uematsu T, Tokura Y, Suzuki I, Sakamoto K, Nishihara D, Yamaguchi Y, Mizuno T, Nukui A, Kobayashi M, Kamai T: Significance of sarcopenia as a prognostic factor for metastatic urothelial carcinoma patients treated with systemic chemotherapy. *Int J Clin Oncol*, **23**, 338-346 (2018).
- 23) Chen JA, Splenser A, Guillory B, Luo J, Mendiratta M, Belinova B, Halder T, Zhang G, Li YP, Garcia JM: Ghrelin prevents tumour- and cisplatin-induced muscle wasting: characterization of multiple mechanisms involved. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **6**, 132-143 (2015).
- 24) Conte E, Camerino GM, Mele A, De Bellis M, Pierno S, Rana F, Fonzino A, Caloiero R, Rizzi

- L, Bresciani E, Ben Haj Salah K, Fehrentz JA, Martinez J, Giustino A, Mariggio MA, Coluccia M, Tricarico D, Lograno MD, De Luca A, Torsello A, Conte D, Liantonio A: Growth hormone secretagogues prevent dysregulation of skeletal muscle calcium homeostasis in a rat model of cisplatin-induced cachexia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **8**, 386-404 (2017).
- 25) Sakai H, Ikeno Y, Tsukimura Y, Inomata M, Suzuki Y, Kon R, Ikarashi N, Chiba Y, Yamada T, Kamei J: Upregulation of ubiquitinated proteins and their degradation pathway in muscle atrophy induced by cisplatin in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, **403**, 115165 (2020).
 - 26) Wu CT, Liao JM, Ko JL, Lee YL, Chang HY, Wu CH, Ou CC: D-Methionine Ameliorates Cisplatin-Induced Muscle Atrophy via Inhibition of Muscle Degradation Pathway. *Integr Cancer Ther*, **18**, 1534735419828832 (2019).
 - 27) Sirago G, Conte E, Fracasso F, Cormio A, Fehrentz JA, Martinez J, Musicco C, Camerino GM, Fonzino A, Rizzi L, Torsello A, Lezza AMS, Liantonio A, Cantatore P, Pesce V: Growth hormone secretagogues hexarelin and JMV2894 protect skeletal muscle from mitochondrial damages in a rat model of cisplatin-induced cachexia. *Sci Rep*, **7**, 13017 (2017).
 - 28) Florea AM, Busselberg D: Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, **3**, 1351-1371 (2011).
 - 29) Ghosh S: Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem*, **88**, 102925 (2019).
 - 30) Riddell IA: Cisplatin and Oxaliplatin: Our Current Understanding of Their Actions. *Met Ions Life Sci*, **18**, (2018).
 - 31) Raudenska M, Balvan J, Fojtu M, Gumulec J, Masarik M: Unexpected therapeutic effects of cisplatin. *Metallomics*, **11**, 1182-1199 (2019).
 - 32) Pabla N, Dong Z: Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int*, **73**, 994-1007 (2008).
 - 33) Santos N, Ferreira RS, Santos ACD: Overview of cisplatin-induced neurotoxicity and ototoxicity, and the protective agents. *Food Chem Toxicol*, **136**, 111079 (2020).
 - 34) Sakai H, Sagara A, Arakawa K, Sugiyama R, Hirosaki A, Takase K, Jo A, Sato K, Chiba Y, Yamazaki M, Matoba M, Narita M: Mechanisms of cisplatin-induced muscle atrophy. *Toxicol Appl Pharmacol*, **278**, 190-199 (2014).
 - 35) Sakai H, Kimura M, Isa Y, Yabe S, Maruyama A, Tsuruno Y, Kai Y, Sato F, Yumoto T, Chiba Y, Narita M: Effect of acute treadmill exercise on cisplatin-induced muscle atrophy in the

- mouse. *Pflugers Arch*, **469**, 1495-1505 (2017).
- 36) Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N: Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **20**, 267-284 (2019).
 - 37) Calvani R, Joseph AM, Adhihetty PJ, Miccheli A, Bossola M, Leeuwenburgh C, Bernabei R, Marzetti E: Mitochondrial pathways in sarcopenia of aging and disuse muscle atrophy. *Biol Chem*, **394**, 393-414 (2013).
 - 38) Ferri E, Marzetti E, Calvani R, Picca A, Cesari M, Arosio B: Role of Age-Related Mitochondrial Dysfunction in Sarcopenia. *Int J Mol Sci*, **21**, (2020).
 - 39) Marzetti E, Calvani R, Cesari M, Buford TW, Lorenzi M, Behnke BJ, Leeuwenburgh C: Mitochondrial dysfunction and sarcopenia of aging: from signaling pathways to clinical trials. *Int J Biochem Cell Biol*, **45**, 2288-2301 (2013).
 - 40) Hyatt H, Deminice R, Yoshihara T, Powers SK: Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Arch Biochem Biophys*, **662**, 49-60 (2019).
 - 41) Ji LL, Yeo D: Mitochondrial dysregulation and muscle disuse atrophy. *F1000Res*, **8**, (2019).
 - 42) Kelso GF, Porteous CM, Coulter CV, Hughes G, Porteous WK, Ledgerwood EC, Smith RA, Murphy MP: Selective targeting of a redox-active ubiquinone to mitochondria within cells: antioxidant and antiapoptotic properties. *J Biol Chem*, **276**, 4588-4596 (2001).
 - 43) Huang W, Cash N, Wen L, Szatmary P, Mukherjee R, Armstrong J, Chvanov M, Tepikin AV, Murphy MP, Sutton R, Criddle DN: Effects of the mitochondria-targeted antioxidant mitoquinone in murine acute pancreatitis. *Mediators Inflamm*, **2015**, 901780 (2015).
 - 44) Sacks B, Onal H, Martorana R, Sehgal A, Harvey A, Wastella C, Ahmad H, Ross E, Pjetergjoka A, Prasad S, Barsotti R, Young LH, Chen Q: Mitochondrial targeted antioxidants, mitoquinone and SKQ1, not vitamin C, mitigate doxorubicin-induced damage in H9c2 myoblast: pretreatment vs. co-treatment. *BMC Pharmacol Toxicol*, **22**, 49 (2021).
 - 45) Smith RA, Murphy MP: Animal and human studies with the mitochondria-targeted antioxidant MitoQ. *Ann N Y Acad Sci*, **1201**, 96-103 (2010).
 - 46) Kitagawa H, Ohbuchi K, Munekage M, Fujisawa K, Kawanishi Y, Namikawa T, Kushida H, Matsumoto T, Shimobori C, Nishi A, Sadakane C, Watanabe J, Yamamoto M, Hanazaki K: Data on metabolic profiling of healthy human subjects' plasma before and after administration

- of the Japanese Kampo medicine maoto. *Data Brief*, **22**, 359-364 (2019).
- 47) Takeo E, Sasano R, Shimma S, Bamba T, Fukusaki E: Solid-phase analytical derivatization for gas-chromatography-mass-spectrometry-based metabolomics. *J Biosci Bioeng*, **124**, 700-706 (2017).
 - 48) Chong J, Soufan O, Li C, Caraus I, Li S, Bourque G, Wishart DS, Xia J: MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res*, **46**, W486-W494 (2018).
 - 49) Huang CY, Yang YC, Chen TC, Chen JR, Chen YJ, Wu MH, Jan YT, Chang CL, Lee J: Muscle loss during primary debulking surgery and chemotherapy predicts poor survival in advanced-stage ovarian cancer. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **11**, 534-546 (2020).
 - 50) Miyata H, Sugimura K, Motoori M, Fujiwara Y, Omori T, Yanagimoto Y, Ohue M, Yasui M, Miyoshi N, Tomokuni A, Akita H, Kobayashi S, Takahashi H, Yano M: Clinical Assessment of Sarcopenia and Changes in Body Composition During Neoadjuvant Chemotherapy for Esophageal Cancer. *Anticancer Res*, **37**, 3053-3059 (2017).
 - 51) Jang J, Lee H, Song J, Bae T, Park M, Kwon YV, Lee D, Yoon Y: Paeonia lactiflora extract suppresses cisplatin-induced muscle wasting via downregulation of muscle-specific ubiquitin E3 ligases, NF-kappaB signaling, and cytokine levels. *J Ethnopharmacol*, **266**, 113403 (2021).
 - 52) Zhang H, Chi M, Chen L, Sun X, Wan L, Yang Q, Guo C: Linalool Prevents Cisplatin Induced Muscle Atrophy by Regulating IGF-1/Akt/FoxO Pathway. *Front Pharmacol*, **11**, 598166 (2020).
 - 53) Hojman P, Fjelbye J, Zerahn B, Christensen JF, Dethlefsen C, Lonkvist CK, Brandt C, Gissel H, Pedersen BK, Gehl J: Voluntary exercise prevents cisplatin-induced muscle wasting during chemotherapy in mice. *PLoS One*, **9**, e109030 (2014).
 - 54) Tintignac LA, Lagirand J, Batonnet S, Sirri V, Leibovitch MP, Leibovitch SA: Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase. *J Biol Chem*, **280**, 2847-2856 (2005).
 - 55) Jogo M, Shiraishi S, Tamura TA: Identification of MAFbx as a myogenin-engaged F-box protein in SCF ubiquitin ligase. *FEBS Lett*, **583**, 2715-2719 (2009).
 - 56) Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, Leibovitch MP, Batonnet-Pichon S, Tintignac LA, Segura CT, Leibovitch SA: The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *EMBO J*, **27**, 1266-1276 (2008).

- 57) Clarke BA, Drujan D, Willis MS, Murphy LO, Corpina RA, Burova E, Rakhilin SV, Stitt TN, Patterson C, Latres E, Glass DJ: The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab*, **6**, 376-385 (2007).
- 58) Cohen S, Brault JJ, Gygi SP, Glass DJ, Valenzuela DM, Gartner C, Latres E, Goldberg AL: During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation. *J Cell Biol*, **185**, 1083-1095 (2009).
- 59) Kedar V, McDonough H, Arya R, Li HH, Rockman HA, Patterson C: Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 18135-18140 (2004).
- 60) Centner T, Yano J, Kimura E, McElhinny AS, Pelin K, Witt CC, Bang ML, Trombitas K, Granzier H, Gregorio CC, Sorimachi H, Labeit S: Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. *J Mol Biol*, **306**, 717-726 (2001).
- 61) Fanzani A, Zanolà A, Rovetta F, Rossi S, Aleo MF: Cisplatin triggers atrophy of skeletal C2C12 myotubes via impairment of Akt signalling pathway and subsequent increment activity of proteasome and autophagy systems. *Toxicol Appl Pharmacol*, **250**, 312-321 (2011).
- 62) Gottlieb E, Vousden KH: p53 regulation of metabolic pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a001040 (2010).
- 63) Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH: TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis. *Cell*, **126**, 107-120 (2006).
- 64) Schmid T, Zhou J, Kohl R, Brune B: p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J*, **380**, 289-295 (2004).
- 65) Sermeus A, Michiels C: Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell Death Dis*, **2**, e164 (2011).
- 66) Choi YM, Kim HK, Shim W, Anwar MA, Kwon JW, Kwon HK, Kim HJ, Jeong H, Kim HM, Hwang D, Kim HS, Choi S: Mechanism of Cisplatin-Induced Cytotoxicity Is Correlated to Impaired Metabolism Due to Mitochondrial ROS Generation. *PLoS One*, **10**, e0135083 (2015).
- 67) Yuan Y, Wang H, Wu Y, Zhang B, Wang N, Mao H, Xing C: P53 Contributes to Cisplatin Induced Renal Oxidative Damage via Regulating P66shc and MnSOD. *Cell Physiol Biochem*, **37**, 1240-1256 (2015).

- 68) Dzamitika S, Salerno M, Pereira-Maia E, Le Moyec L, Garnier-Suillerot A: Preferential energy- and potential-dependent accumulation of cisplatin-gutathione complexes in human cancer cell lines (GLC4 and K562): A likely role of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, **38**, 11-21 (2006).
- 69) Mukhopadhyay P, Horvath B, Zsengeller Z, Zielonka J, Tanchian G, Holovac E, Kechrid M, Patel V, Stillman IE, Parikh SM, Joseph J, Kalyanaraman B, Pacher P: Mitochondrial-targeted antioxidants represent a promising approach for prevention of cisplatin-induced nephropathy. *Free Radic Biol Med*, **52**, 497-506 (2012).
- 70) Nishiyama K, Numaga-Tomita T, Fujimoto Y, Tanaka T, Toyama C, Nishimura A, Yamashita T, Matsunaga N, Koyanagi S, Azuma YT, Ibuki Y, Uchida K, Ohdo S, Nishida M: Ibudilast attenuates doxorubicin-induced cytotoxicity by suppressing formation of TRPC3 channel and NADPH oxidase 2 protein complexes. *Br J Pharmacol*, **176**, 3723-3738 (2019).
- 71) Younis NN, Elsherbiny NM, Shaheen MA, Elseweidy MM: Modulation of NADPH oxidase and Nrf2/HO-1 pathway by vanillin in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *J Pharm Pharmacol*, **72**, 1546-1555 (2020).
- 72) Meng XM, Ren GL, Gao L, Yang Q, Li HD, Wu WF, Huang C, Zhang L, Lv XW, Li J: NADPH oxidase 4 promotes cisplatin-induced acute kidney injury via ROS-mediated programmed cell death and inflammation. *Lab Invest*, **98**, 63-78 (2018).
- 73) Ferreira LF, Laitano O: Regulation of NADPH oxidases in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, **98**, 18-28 (2016).
- 74) Gimenez-Cassina A, Danial NN: Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. *Trends Endocrinol Metab*, **26**, 165-175 (2015).
- 75) Chong SJ, Low IC, Pervaiz S: Mitochondrial ROS and involvement of Bcl-2 as a mitochondrial ROS regulator. *Mitochondrion*, **19 Pt A**, 39-48 (2014).
- 76) Sakai H, Kimura M, Tsukimura Y, Yabe S, Isa Y, Kai Y, Sato F, Kon R, Ikarashi N, Narita M, Chiba Y, Kamei J: Dexamethasone exacerbates cisplatin-induced muscle atrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **46**, 19-28 (2019).
- 77) Zhang H, Chi M, Chen L, Sun X, Wan L, Yang Q, Guo C: Daidzein alleviates cisplatin-induced muscle atrophy by regulating Glut4/AMPK/FoxO pathway. *Phytother Res*, **35**, 4363-4376 (2021).
- 78) Lutzner N, Kalbacher H, Krones-Herzig A, Rosl F: FOXO3 is a glucocorticoid receptor target

- and regulates LKB1 and its own expression based on cellular AMP levels via a positive autoregulatory loop. *PLoS One*, **7**, e42166 (2012).
- 79) Essaghir A, Dif N, Marbehant CY, Coffey PJ, Demoulin JB: The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J Biol Chem*, **284**, 10334-10342 (2009).
 - 80) Sanchez AMJ, Candau R, Bernardi H: AMP-activated protein kinase stabilizes FOXO3 in primary myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, **499**, 493-498 (2018).
 - 81) Storz P: Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, **14**, 593-605 (2011).
 - 82) Kim J, Ishihara N, Lee TR: A DAF-16/FoxO3a-dependent longevity signal is initiated by antioxidants. *Biofactors*, **40**, 247-257 (2014).
 - 83) Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A: The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*, **282**, 30107-30119 (2007).
 - 84) McClung JM, Judge AR, Powers SK, Yan Z: p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, C542-549 (2010).
 - 85) Krawiec BJ, Nystrom GJ, Frost RA, Jefferson LS, Lang CH: AMP-activated protein kinase agonists increase mRNA content of the muscle-specific ubiquitin ligases MAFbx and MuRF1 in C2C12 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **292**, E1555-1567 (2007).
 - 86) Reilly C, Mitchell T, Chacko BK, Benavides G, Murphy MP, Darley-Usmar V: Mitochondrially targeted compounds and their impact on cellular bioenergetics. *Redox Biol*, **1**, 86-93 (2013).
 - 87) Fink BD, Herlein JA, Yorek MA, Fenner AM, Kerns RJ, Sivitz WI: Bioenergetic effects of mitochondrial-targeted coenzyme Q analogs in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **342**, 709-719 (2012).
 - 88) Armstrong JA, Cash NJ, Morton JC, Tepikin AV, Sutton R, Criddle DN: Mitochondrial Targeting of Antioxidants Alters Pancreatic Acinar Cell Bioenergetics and Determines Cell Fate. *Int J Mol Sci*, **20**, (2019).
 - 89) Patkova J, Andel M, Trnka J: Palmitate-induced cell death and mitochondrial respiratory

- dysfunction in myoblasts are not prevented by mitochondria-targeted antioxidants. *Cell Physiol Biochem*, **33**, 1439-1451 (2014).
- 90) Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC: Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, **9**, 1799-1805 (1994).
 - 91) Qu D, Jiang M, Huang D, Zhang H, Feng L, Chen Y, Zhu X, Wang S, Han J: Synergistic Effects of The Enhancements to Mitochondrial ROS, p53 Activation and Apoptosis Generated by Aspartame and Potassium Sorbate in HepG2 Cells. *Molecules*, **24**, (2019).
 - 92) Beyfuss K, Hood DA: A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle. *Redox Rep*, **23**, 100-117 (2018).
 - 93) Yang H, Xie Y, Yang D, Ren D: Oxidative stress-induced apoptosis in granulosa cells involves JNK, p53 and Puma. *Oncotarget*, **8**, 25310-25322 (2017).
 - 94) Komarov PG, Komarova EA, Kondratov RV, Christov-Tselkov K, Coon JS, Chernov MV, Gudkov AV: A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science*, **285**, 1733-1737 (1999).
 - 95) Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, Harrell JM, Kwok RP, Ljungman M, Pratt WB: Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem*, **279**, 30195-30201 (2004).
 - 96) Gudkov AV, Komarova EA: Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, **331**, 726-736 (2005).
 - 97) Almeida A, Sanchez-Moran I, Rodriguez C: Mitochondrial-nuclear p53 trafficking controls neuronal susceptibility in stroke. *IUBMB Life*, **73**, 582-591 (2021).
 - 98) Schiaffino S: Muscle fiber type diversity revealed by anti-myosin heavy chain antibodies. *FEBS J*, **285**, 3688-3694 (2018).
 - 99) Molchadsky A, Rivlin N, Brosh R, Rotter V, Sarig R: p53 is balancing development, differentiation and de-differentiation to assure cancer prevention. *Carcinogenesis*, **31**, 1501-1508 (2010).
 - 100) Schwarzkopf M, Coletti D, Sassoon D, Marazzi G: Muscle cachexia is regulated by a p53-PW1/Peg3-dependent pathway. *Genes Dev*, **20**, 3440-3452 (2006).

- 101) Porrello A, Cerone MA, Coen S, Gurtner A, Fontemaggi G, Cimino L, Piaggio G, Sacchi A, Soddu S: p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb. *J Cell Biol*, **151**, 1295-1304 (2000).
- 102) Tamir Y, Bengal E: p53 protein is activated during muscle differentiation and participates with MyoD in the transcription of muscle creatine kinase gene. *Oncogene*, **17**, 347-356 (1998).
- 103) Vousden KH, Ryan KM: p53 and metabolism. *Nat Rev Cancer*, **9**, 691-700 (2009).
- 104) Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Bhatt K, Shah B, Thornton CA: Skeletal muscle gene expression profiles in 20-29 year old and 65-71 year old women. *Exp Gerontol*, **39**, 369-377 (2004).
- 105) Edwards MG, Anderson RM, Yuan M, Kendzierski CM, Weindruch R, Prolla TA: Gene expression profiling of aging reveals activation of a p53-mediated transcriptional program. *BMC Genomics*, **8**, 80 (2007).
- 106) Rodier F, Campisi J, Bhaumik D: Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucleic Acids Res*, **35**, 7475-7484 (2007).
- 107) Wang L, Sheng Y, Xu W, Sun M, Lv S, Yu J, Wang X, Ding G, Duan Y: Mechanism of thyroid hormone signaling in skeletal muscle of aging mice. *Endocrine*, **72**, 132-139 (2021).
- 108) Fox DK, Ebert SM, Bongers KS, Dyle MC, Bullard SA, Dierdorff JM, Kunkel SD, Adams CM: p53 and ATF4 mediate distinct and additive pathways to skeletal muscle atrophy during limb immobilization. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **307**, E245-261 (2014).
- 109) Machida S, Booth FW: Changes in signalling molecule levels in 10-day hindlimb immobilized rat muscles. *Acta Physiol Scand*, **183**, 171-179 (2005).
- 110) Siu PM, Alway SE: Id2 and p53 participate in apoptosis during unloading-induced muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, C1058-1073 (2005).
- 111) Memme JM, Oliveira AN, Hood DA: p53 regulates skeletal muscle mitophagy and mitochondrial quality control following denervation-induced muscle disuse. *J Biol Chem*, **298**, 101540 (2022).
- 112) Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Park SH, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA: p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, **415**, 45-53 (2002).

- 113) Ebert SM, Dierdorff JM, Meyerholz DK, Bullard SA, Al-Zougbi A, DeLau AD, Tomcheck KC, Skopec ZP, Marcotte GR, Bodine SC, Adams CM: An investigation of p53 in skeletal muscle aging. *J Appl Physiol* (1985), **127**, 1075-1084 (2019).
- 114) Beyfuss K, Erlich AT, Triolo M, Hood DA: The Role of p53 in Determining Mitochondrial Adaptations to Endurance Training in Skeletal Muscle. *Sci Rep*, **8**, 14710 (2018).
- 115) Pronsato L, Milanesi L: Effect of testosterone on the regulation of p53 and p66Shc during oxidative stress damage in C2C12 cells. *Steroids*, **106**, 41-54 (2016).
- 116) Matsuzawa A, Ichijo H: Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim Biophys Acta*, **1780**, 1325-1336 (2008).
- 117) Ghosh J, Das J, Manna P, Sil PC: The protective role of arjunolic acid against doxorubicin induced intracellular ROS dependent JNK-p38 and p53-mediated cardiac apoptosis. *Biomaterials*, **32**, 4857-4866 (2011).
- 118) Girven M, Dugdale HF, Owens DJ, Hughes DC, Stewart CE, Sharples AP: l-glutamine Improves Skeletal Muscle Cell Differentiation and Prevents Myotube Atrophy After Cytokine (TNF-alpha) Stress Via Reduced p38 MAPK Signal Transduction. *J Cell Physiol*, **231**, 2720-2732 (2016).
- 119) Liu X, Chua CC, Gao J, Chen Z, Landy CL, Hamdy R, Chua BH: Pifithrin-alpha protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **286**, H933-939 (2004).
- 120) Zhang M, Liu W, Ding D, Salvi R: Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience*, **120**, 191-205 (2003).
- 121) Strom E, Sathe S, Komarov PG, Chernova OB, Pavlovska I, Shyshynova I, Bosykh DA, Burdelya LG, Macklis RM, Skaliter R, Komarova EA, Gudkov AV: Small-molecule inhibitor of p53 binding to mitochondria protects mice from gamma radiation. *Nat Chem Biol*, **2**, 474-479 (2006).
- 122) Zhu J, Singh M, Selivanova G, Peugeot S: Pifithrin-alpha alters p53 post-translational modifications pattern and differentially inhibits p53 target genes. *Sci Rep*, **10**, 1049 (2020).
- 123) Sohn D, Graupner V, Neise D, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Janicke RU: Pifithrin-alpha protects against DNA damage-induced apoptosis downstream of mitochondria independent of p53. *Cell Death Differ*, **16**, 869-878 (2009).

- 124) Komarova EA, Neznanov N, Komarov PG, Chernov MV, Wang K, Gudkov AV: p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J Biol Chem*, **278**, 15465-15468 (2003).
- 125) Hoagland MS, Hoagland EM, Swanson HI: The p53 inhibitor pifithrin-alpha is a potent agonist of the aryl hydrocarbon receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, **314**, 603-610 (2005).
- 126) DeGroot DE, Hayashi A, Denison MS: Lack of ligand-selective binding of the aryl hydrocarbon receptor to putative DNA binding sites regulating expression of Bax and paraoxonase 1 genes. *Arch Biochem Biophys*, **541**, 13-20 (2014).
- 127) Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, Laine J, Sakai T, Korsmeyer SJ, Casper RF, Sherr DH, Tilly JL: Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet*, **28**, 355-360 (2001).
- 128) Liu XY, Chen SL, Zhang WX: [Clinical study of strengthening pi and nourishing shen therapy combined with Western medicine on patients with glucocorticoid resistant myasthenia gravis]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, **30**, 271-274 (2010).
- 129) Zhu M, Liu Z, Gao M, Zhang Y, Li Y, Ling S, Zhang P, Zhao C, Jiang L, Liu Y, Li Q, Li D, Hu S, Li Y: The effect of Bu Zhong Yi Qi decoction on simulated weightlessness-induced muscle atrophy and its mechanisms. *Mol Med Rep*, **16**, 5165-5174 (2017).
- 130) Yae S, Takahashi F, Yae T, Yamaguchi T, Tsukada R, Koike K, Minakata K, Murakami A, Nurwidya F, Kato M, Tamada M, Yoshikawa M, Kobayashi H, Seyama K, Takahashi K: Hochuekkito (TJ-41), a Kampo Formula, Ameliorates Cachexia Induced by Colon 26 Adenocarcinoma in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, **2012**, 976926 (2012).
- 131) Cai M, Yang EJ: Hochu-Ekki-To Improves Motor Function in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Animal Model. *Nutrients*, **11**, (2019).
- 132) Dimauro I, Antonioni A, Mercatelli N, Grazioli E, Fantini C, Barone R, Macaluso F, Di Felice V, Caporossi D: The early response of alphaB-crystallin to a single bout of aerobic exercise in mouse skeletal muscles depends upon fiber oxidative features. *Redox Biol*, **24**, 101183 (2019).
- 133) Leduc-Gaudet JP, Hussain SNA, Barreiro E, Gouspillou G: Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Skeletal Muscle Health and Aging. *Int J Mol Sci*, **22**, (2021).
- 134) Derbre F, Gomez-Cabrera MC, Nascimento AL, Sanchis-Gomar F, Martinez-Bello VE,

- Tresguerres JA, Fuentes T, Gratas-Delamarche A, Monsalve M, Vina J: Age associated low mitochondrial biogenesis may be explained by lack of response of PGC-1alpha to exercise training. *Age (Dordr)*, **34**, 669-679 (2012).
- 135) Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, Springer J: The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **2**, 143-151 (2011).
 - 136) Sakai H, Asami M, Naito H, Kitora S, Suzuki Y, Miyauchi Y, Tachinooka R, Yoshida S, Kon R, Ikarashi N, Chiba Y, Kamei J: Exogenous insulin-like growth factor 1 attenuates cisplatin-induced muscle atrophy in mice. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, **12**, 1570-1581 (2021).
 - 137) Zierath JR, Hawley JA: Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. *PLoS Biol*, **2**, e348 (2004).
 - 138) Ekmark M, Rana ZA, Stewart G, Hardie DG, Gundersen K: De-phosphorylation of MyoD is linking nerve-evoked activity to fast myosin heavy chain expression in rodent adult skeletal muscle. *J Physiol*, **584**, 637-650 (2007).
 - 139) Hughes SM, Taylor JM, Tapscott SJ, Gurley CM, Carter WJ, Peterson CA: Selective accumulation of MyoD and myogenin mRNAs in fast and slow adult skeletal muscle is controlled by innervation and hormones. *Development*, **118**, 1137-1147 (1993).
 - 140) Hughes SM, Koishi K, Rudnicki M, Maggs AM: MyoD protein is differentially accumulated in fast and slow skeletal muscle fibres and required for normal fibre type balance in rodents. *Mech Dev*, **61**, 151-163 (1997).
 - 141) Ilha J, do Espirito-Santo CC, de Freitas GR: mTOR Signaling Pathway and Protein Synthesis: From Training to Aging and Muscle Autophagy. *Adv Exp Med Biol*, **1088**, 139-151 (2018).
 - 142) Mirzoev TM: Skeletal Muscle Recovery from Disuse Atrophy: Protein Turnover Signaling and Strategies for Accelerating Muscle Regrowth. *Int J Mol Sci*, **21**, (2020).
 - 143) Theilen NT, Jeremic N, Weber GJ, Tyagi SC: Exercise preconditioning diminishes skeletal muscle atrophy after hindlimb suspension in mice. *J Appl Physiol (1985)*, **125**, 999-1010 (2018).
 - 144) Liu Q, Chen L, Liang X, Cao Y, Zhu X, Wang S, Li J, Gao J, Xiao J: Exercise attenuates angiotensin-induced muscle atrophy by targeting PPARgamma/miR-29b. *J Sport Health Sci*, (2021).
 - 145) Bai CH, Alizargar J, Peng CY, Wu JP: Combination of exercise training and resveratrol

- attenuates obese sarcopenia in skeletal muscle atrophy. *Chin J Physiol*, **63**, 101-112 (2020).
- 146) Tatsumi K, Shinozuka N, Nakayama K, Sekiya N, Kuriyama T, Fukuchi Y: Hochuekkito improves systemic inflammation and nutritional status in elderly patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Am Geriatr Soc*, **57**, 169-170 (2009).
 - 147) Jeong JS, Ryu BH, Kim JS, Park JW, Choi WC, Yoon SW: Bojungikki-tang for cancer-related fatigue: a pilot randomized clinical trial. *Integr Cancer Ther*, **9**, 331-338 (2010).
 - 148) Takanashi K, Dan K, Kanzaki S, Hasegawa H, Watanabe K, Ogawa K: Hochuekkito, a Japanese Herbal Medicine, Restores Metabolic Homeostasis between Mitochondrial and Glycolytic Pathways Impaired by Influenza A Virus Infection. *Pharmacology*, **99**, 240-249 (2017).
 - 149) Nahata M, Fujitsuka N, Sekine H, Shimobori C, Ohbuchi K, Iizuka S, Mogami S, Ohnishi S, Takeda H: Decline in Liver Mitochondria Metabolic Function Is Restored by Hochuekkito Through Sirtuin 1 in Aged Mice With Malnutrition. *Front Physiol*, **13**, 848960 (2022).

謝辞

本論文をまとめるにあたり、多大なるご指導、ご高配を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 薬理学研究室 南雅文教授に深く感謝の意を表し、厚く御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、有益なご指導、ご高見を賜りました北海道大学 武田宏司名誉教授に深く感謝の意を表し、心より御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、的確なご助言、ご激励を賜りました北海道大学 大学院薬学研究院 分子細胞医薬学研究室 大西俊介教授、講師 大久保直登博士に深謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、貴重なご助言とご支援を頂くとともに学位取得に向けてご激励を頂きました株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所長 池田孔己博士、漢方研究三部長 常田洋平博士、基礎研究グループ長 藤塚直樹博士、国際開発部長 服部智久博士に心より深く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、懇切丁寧な実験指導と多大なご支援を頂きました株式会社ツムラ ツムラ漢方研究所 漢方研究一部 基礎研究グループ長 最上祥子博士、関根瞳氏に心から感謝致します。また、終始多大なご協力と温かいご支援を頂きました漢方研究三部および漢方研究一部の皆様をはじめ、ツムラ漢方研究所の皆様にも深く感謝致します。