

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32672

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08579

研究課題名(和文) COPD関連サルコペニアにおけるmicroRNAの関与について

研究課題名(英文) involvement of microRNA in the pathogenesis of COPD related sarcopenia

研究代表者

橋本 典生 (Hashimoto, Mitsuo)

日本体育大学・体育学部・教授

研究者番号：00771742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CSE刺激による萎縮筋管と収縮刺激後の筋管からのエクソソームは、それぞれ筋管を萎縮、肥大させる効果があることが示唆された。また、電気刺激による筋管収縮はParkinとMHCの両方の発現を誘導し、ParkinがMHCの発現に関与していることがParkinをノックダウンした実験で示唆された。本研究では、COPD患者の骨格筋からは健常者の筋とは異なるエクソソームが分泌され、細胞間コミュニケーションによりサルコペニアの病態形成に関与する可能性が示唆され、また、運動によるParkinの発現増強は、COPD合併サルコペニアを含めたサルコペニアに対する有望な治療戦略として期待される事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、COPD患者の骨格筋からは健常者の筋とは異なるエクソソームが分泌され、細胞間コミュニケーションによりサルコペニアの病態形成に関与する可能性が示唆され、また、運動によるParkinの発現増強は、COPD合併サルコペニアを含めたサルコペニアに対する有望な治療戦略として期待される事が示唆された。運動誘発のエクソソームの治療薬としての可能性が示唆され、今後のサルコペニア合併サルコペニア患者に対しての新たな治療薬の可能性を示唆した研究と考える。

研究成果の概要(英文)：Exosomes from CSE-stimulated atrophic myotubes and from myotubes after contraction stimulation were suggested to have the effect of atrophying and hypertrophying myotubes, respectively. In addition, myotube contraction by electrical stimulation induced the expression of both Parkin and MHC, suggesting that Parkin is involved in the expression of MHC in experiments in which Parkin was knocked down. The present study suggests that skeletal muscles of COPD patients secrete exosomes that differ from those of healthy subjects and may be involved in the pathogenesis of sarcopenia through intercellular communication. Parkin expression enhancement by exercise is expected to be a promising therapeutic strategy for sarcopenia, including COPD-associated sarcopenia.

研究分野：閉塞性肺疾患 サルコペニア

キーワード：閉塞性肺疾患 サルコペニア Parkin エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

COPD患者における死亡のもっとも重要な危険因子は、身体活動性の低下であることが報告されているが⁽¹⁾、その要因として筋肉量と筋力低下が起きた状態であるサルコペニアが注目されている。COPDでは身体活動性の低下に加え、慢性の喫煙刺激と関連した全身性炎症の四肢筋肉への影響のため、他の疾患と比べサルコペニアが起こりやすいと考えられている。実際、安定したCOPDの外来患者622人におけるサルコペニアの頻度は14.5%である。サルコペニアを合併したCOPD患者では身体活動性が低下していると報告され⁽²⁾⁽³⁾、重要な死亡危険因子となることが知られているがその早期診断や治療方法は十分検討されていない。

骨格筋は様々なマイオカインを分泌して、細胞間コミュニケーションを図っている。近年細胞外分泌小胞であるエクソソームも、運動負荷など様々刺激で骨格筋から分泌されると報告されている⁽⁴⁾、運動で得られる筋肉増強効果の少なくとも一部は、運動誘発エクソソームによる可能性があり、このエクソソーム投与がCOPD関連サルコペニアの治療法となる可能性も示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、COPD患者の骨格筋からは健常者の筋とは異なるエクソソームが分泌され、細胞間コミュニケーションによりサルコペニアの病態形成に関与する可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 萎縮筋管からのエクソソームの効果に関する実験

C2C12マウス筋芽細胞は、筋管への分化の際には、培地を分化誘導培地(2%ウマ血清およびペニシリン-ストレプトマイシン添加DMEM)に変更し培養を行った。

5日間の分化誘導で形成された筋管に3%CSE(たばこ抽出液)を1日間添加して萎縮を誘導した。その後、MediumをAdvanced DMEMに変更して2日間の培養を後に上清を回収し超遠心法でエクソソームを回収した。回収したエクソソームを5ug/mlの濃度で5日間の分化誘導で形成された筋管に添加して、2日後にウェスタンブロッティング用にタンパク質の回収と筋管の径計測(Confocal microscope)を行った。

(2) 筋管収縮方法と収縮後に放出されるエクソソームの効果に関する実験

筋管形成後、電気パルス発生器(SEN3301, 日本光電工業, 東京, 日本)を用いて10V, 1Hzの電気パルスを20msで1時間刺激した。筋管は収縮後2日間培養し上清はエクソソーム用に回収した。

回収したエクソソームを6ug/mlの濃度で5日間の分化誘導で形成された筋管に添加して、2日後にウェスタンブロッティング用にタンパク質の回収と筋管の径計測(Confocal microscope)を行った。

4. 研究成果

(1) 筋管細胞からのExosome放出の確認

10cm DishにてC2C12マウス筋芽細胞を5日間の分化誘導を起こして筋管形成を促した。形成された筋管のMediumをAdvanced DMEMに変更して2日間の培養後に上清を回収し超

遠心を行った所、タンパク濃度が200ug/mL程度（100uL中）のエクソソームが回収されることを確認した。

(2) CSEで筋萎縮を起こした筋管細胞からのエクソソームは筋萎縮を誘導した。

3% CSEを添加して萎縮を起こした筋管からのエクソソームを添加することで、CSEを添加しない筋管からのエクソソームを添加した筋管と比べて、筋管の径の萎縮（図1-1）とMHC（ミオシン重鎖）の発現低下（図1-2）が認められ、萎縮筋管からのエクソソームの筋萎縮効果が確認された。

(3) 筋収縮後の筋管から放出されたエクソソームにより筋管の肥大が誘導された。

1時間の収縮刺激後の筋管からのエクソソームを筋管に添加した結果、筋収縮しない筋管から回収したエクソソームを添加した筋管と比べて、筋管の径の肥大（図2-1）とMHCの発現増加（図2-2）が認められ、収縮刺激後の筋管からのエクソソームの筋肥大効果が確認された。

(4) 筋収縮はParkinの発現を促進しMHCを増加させる

運動することは筋の萎縮を防ぐ最も有効な方法である。喫煙暴露による筋萎縮への運動の予防的役割を検討するために、C2C12細胞の筋管を収縮させるシステムを用いた。その結果、収縮を行った筋管ではMHCとParkinの蛋白発現量が有意に増加した（図3-[A]）。さらに興味深いことに、Parkinをロックダウンすると収縮によるMHCの発現増加が明らかに抑制されていて、これ筋収縮を行うことでParkinを介したMuRF-1の制御機構がはたらかず、MHCの発現を誘導することが示唆された（図3-[B]）。CSE刺激による筋管収縮の影響を明らかにするため、1時間の筋管収縮を行った1日後にCSE刺激を2日間行った。注目すべきことに、筋管収縮を行うとParkinの発現は維持されたと同時に、CSEで誘導されるはずのMuRF-1の上昇とMHCの減少が抑制されていた（図3-[C]）。筋収縮によりParkinの発現を維持することは、マイトファジーを促進しCSE刺激によるMuRF-1の活性化を防ぐ可能性が示唆された。

【結論】

CSE刺激による萎縮筋管と収縮刺激後の筋管からのエクソソームは、それぞれ筋管を萎縮、肥大させる効果があることが示唆された。また、電気刺激による筋管収縮はParkinとMHCの両方の発現を誘導し、ParkinがMHCの発現に関与していることがParkinをロックダウンした実験で示唆された。

<引用文献>

- (1) Garcia-Rio F, Rojo B, Casitas R, et al. Chest 142:338-346, 2012
- (2) Jones SE, Maddocks M, Kon SS, et al. Thorax. 2015; 70:213-8
- (3) 日本呼吸器学会COPDガイドライン第5版作成委員会：COPD 診断と治療のためのガイドライン 2018、メディカルレビュー社、2018
- (4) Whitham M, Parker BL, Friedrichsen M et al. Cell Metabolism 27, 237-251, 2018

図1-1

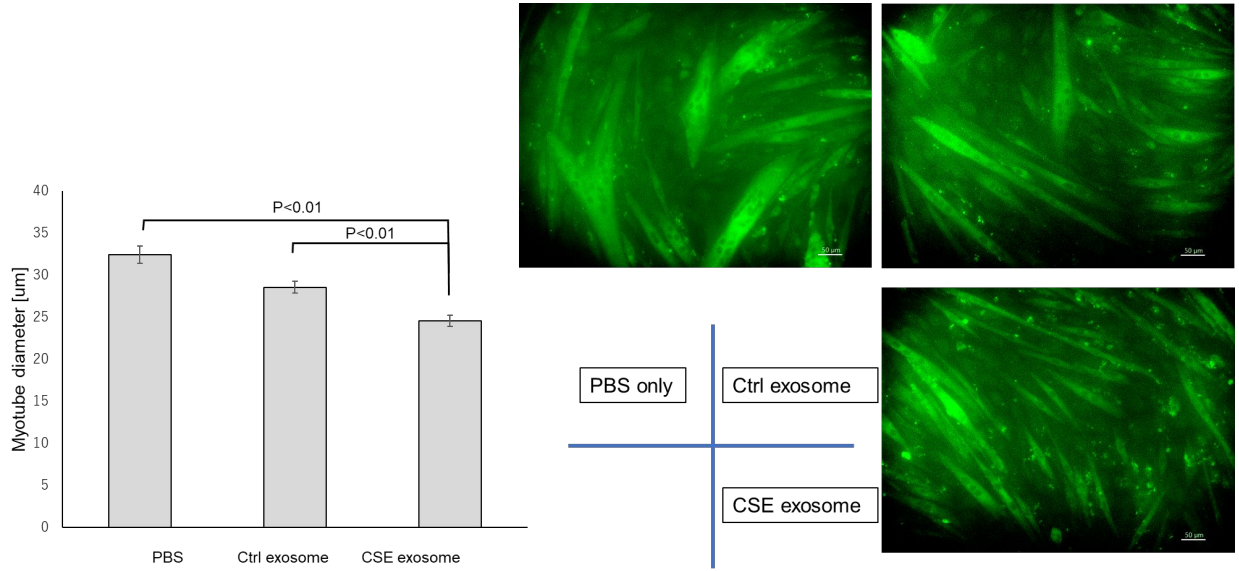


図1-2

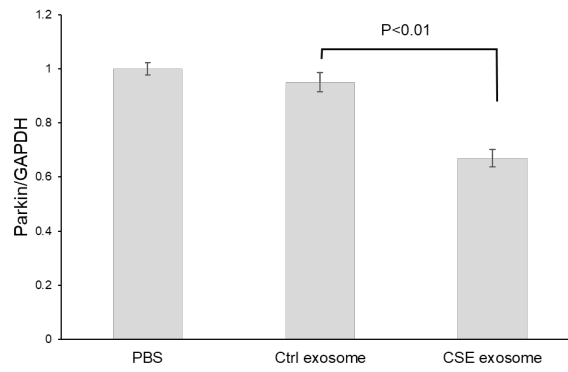
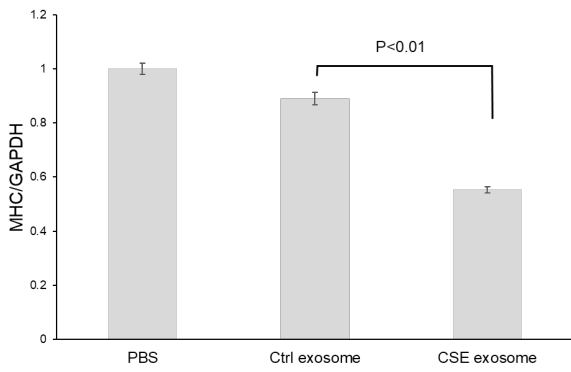
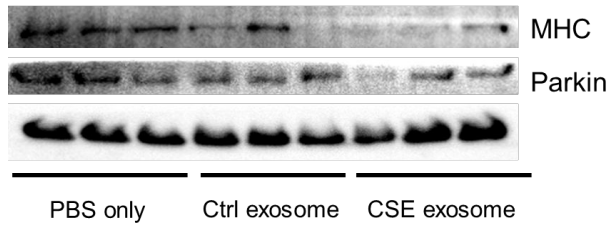
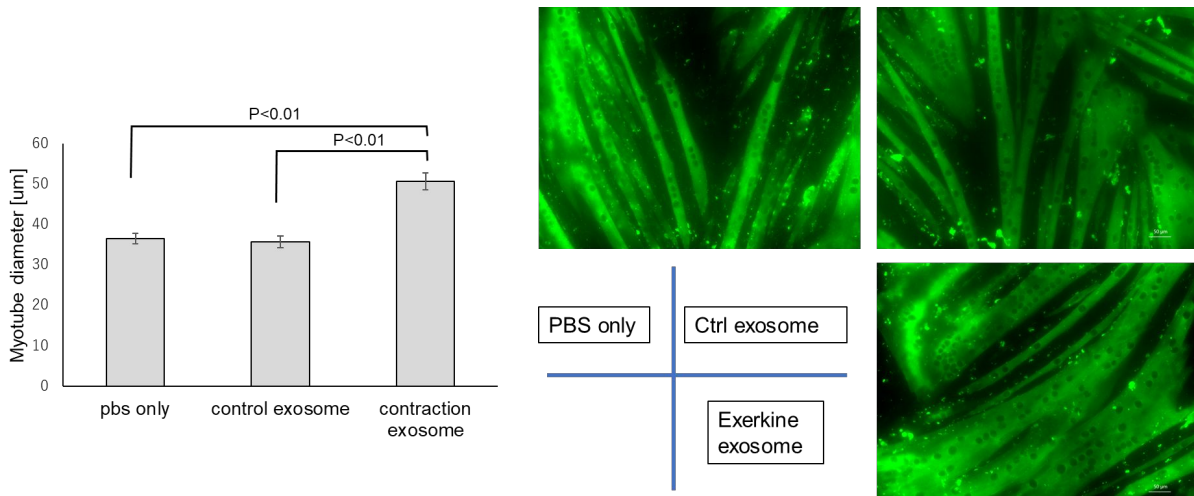


図1 CSE刺激による萎縮筋管からのエクソソームの筋萎縮効果



☒2-1

☒2-2

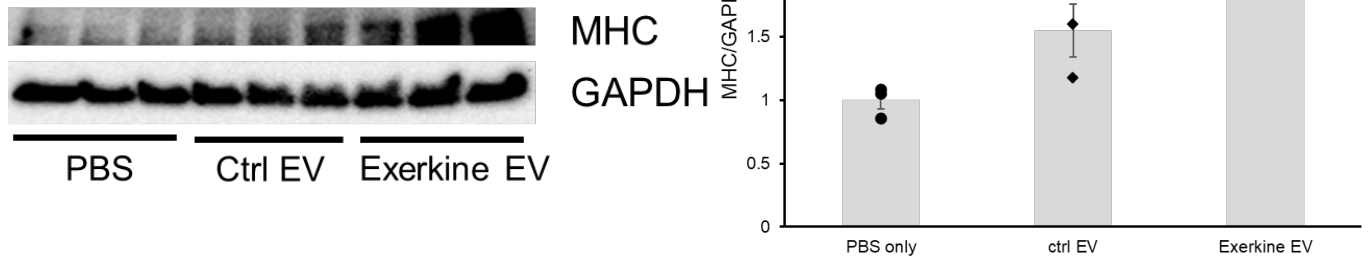


図2. 筋収縮後の筋管からのエクソソームによる筋肥大効果

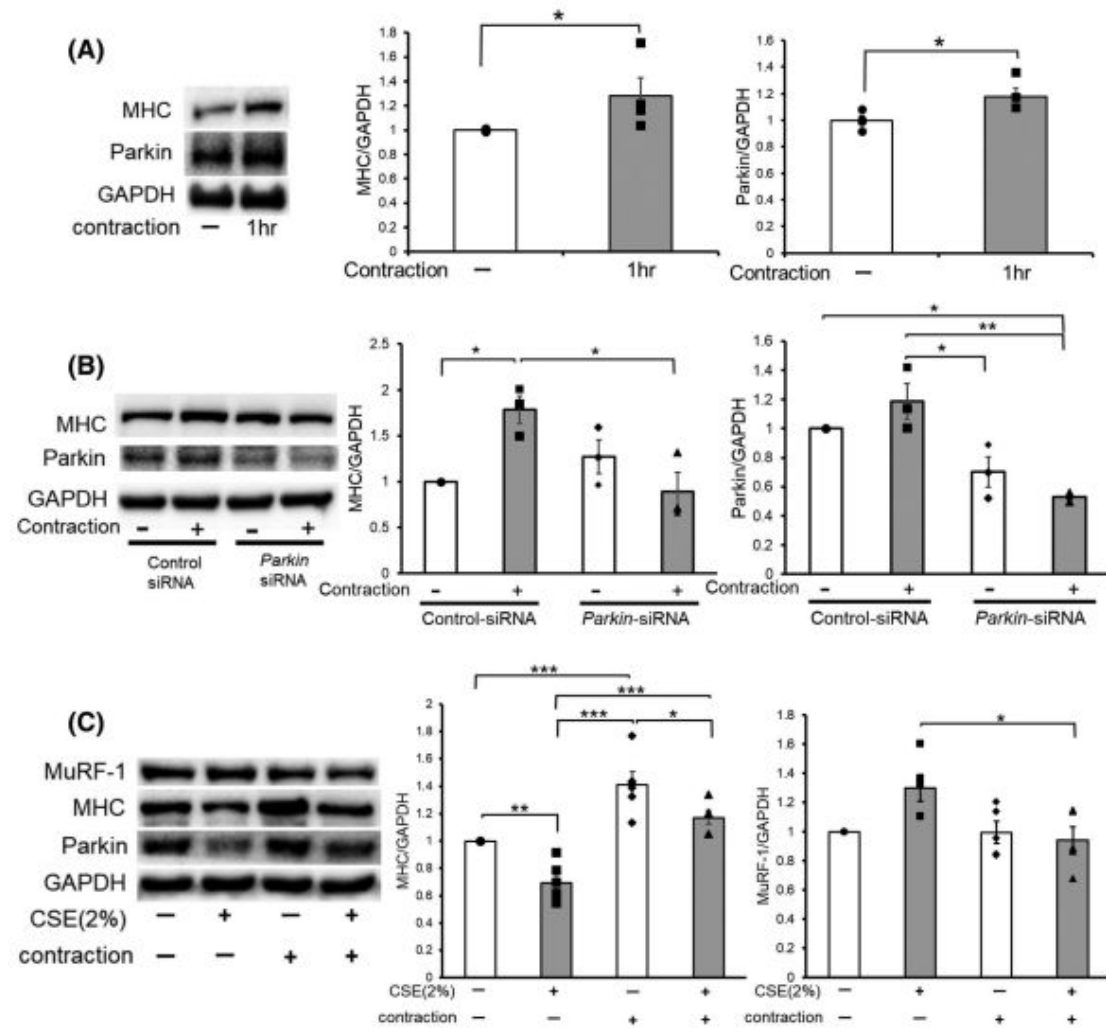


図3 筋管を収縮させることでParkinの発現量は増加し、筋管の肥大を引き起こし、タバコ抽出液による萎縮性変化を抑制した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Akihiko, Hashimoto Mitsuo, Tanihata Jun et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of Parkin mediated mitophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease related sarcopenia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.12988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本典生
2. 発表標題 慢性閉塞性肺疾患（COPD）合併サルコペニア発症における Parkin の関与
3. 学会等名 第7回 日本サルコペニア・フレイル学会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Akihiko Ito
2. 発表標題 Involvement of Parkin-mediated mitophagy in COPD-related sarcopenia pathogenesis
3. 学会等名 EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL 56 2020年9月（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷端 淳 (Tanihata Jun) (00508426)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒屋 潤 (Araya Jun) (90468679)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関