

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08612

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

研究課題名(英文) Involvement of Parkin-mediated mitophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease-related sarcopenia

研究代表者

内海 裕文(Hirofumi, Utsumi)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00773855

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)：ParkinをKDした筋管は、CSE刺激でコントロールと比べ有意にROS増加、筋管萎縮、p62、TOMM20、MuRF-1上昇を認めたが、Parkinの過剰発現とMuRF-1のKDによりCSE刺激の影響は予防された。PKOマウス喫煙群の筋重量とミオシン重鎖の発現量はWTマウス喫煙群より顕著に減少しており、筋組織では4HNEとp62、Tomm20染色の有意な増強を認めた。

以上より、COPD合併サルコペニアでは、不十分なParkin介在性マイトファジーによるROS産生と、それに伴うMuRF-1活性化が筋萎縮を引き起こす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COPDの死亡リスク因子は身体活動性の低下であり、サルコペニアが関与しているが、サルコペニアの発症予防や治療薬はまだない状態である。COPD患者の骨格筋では活性酸素種(ROS)が増加し、ミトコンドリア障害が示唆されており、本研究では、COPD合併サルコペニアでは、不十分なParkin介在性マイトファジーによるROS産生と、それに伴うMuRF-1活性化が筋萎縮を引き起こす可能性が示唆された。本研究の成果が今後のCOPD合併サルコペニアの予防薬の開発に繋がる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Parkin-mediated mitophagy regulated myotube atrophy by modulating mitochondrial damage and mitochondrial ROS production. Increased mitochondrial ROS was responsible for myotube atrophy by activating Muscle Ring Finger 1 (MuRF-1)-mediated myosin heavy chain (MHC) degradation. Parkin-/- mice with prolonged CS exposure showed enhanced limb muscle atrophy with a 31.7% reduction in limb muscle weights and 2.3 times greater MuRF-1 expression compared to wild-type mice with concomitant accumulation of damaged mitochondria and oxidative modifications in 4HNE expression.

Taken together, COPD-related sarcopenia can be attributed to insufficient Parkin-mediated mitophagy and increased mitochondrial ROS causing enhanced muscle atrophy through MuRF-1 activation.

研究分野：肺癌、閉塞性肺疾患

キーワード：閉塞性肺疾患 サルコペニア

## 1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは筋重量と、筋力または身体能力の低下で定義される病態であり、COPD 患者の約 22% に合併すると言われている<sup>(1)</sup>。身体活動性の低下は、COPD の死亡リスク因子であり、サルコペニアが関与する<sup>(2)</sup>。COPD 関連サルコペニアの病態解明による治療法の開発は、予後の改善に寄与すると考えられるが詳細な機序は明らかでない。

COPD 患者の骨格筋では、ミトコンドリア由来の活性酸素種(ROS)の増加が報告されており、傷害ミトコンドリアの選択的除去機構であるマイトファジーの機能不全が示唆されている<sup>(3)</sup>。また、マイトファジーの主要な制御因子である *Parkin* のノックアウトマウスでは、骨格筋萎縮が報告されている<sup>(4)</sup>。我々は、喫煙刺激による気道上皮の細胞老化亢進には、マイトファジーの主要経路である Pink1-Parkin 系の機能不全が関与しており、*Parkin* の発現低下が COPD 病態形成に作用する可能性を報告しているが<sup>(5)</sup>、喫煙に関連したサルコペニアの病態形成とマイトファジーの関わりについては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

喫煙刺激により骨格筋内の *Parkin* の発現が低下することで、マイトファジーの機能低下とそれに伴う ROS の増加が骨格筋の萎縮に関与すると仮定した。そこで *Parkin* の COPD 関連サルコペニアの病態形成への関与を検討した。

## 3. 研究の方法

C2C12 細胞由来の筋管を用い *Parkin* ノックダウン(PKD)と過剰発現(PHA)を行い、タバコ抽出液(CSE)による筋管の ROS 産生、筋径、ミオシン重鎖(MHC)蛋白発現量、ミトコンドリア形態への影響を評価した。6 ヶ月間喫煙曝露した野生型(WT)と *Parkin* ノックアウト(PKO)マウスの腓腹筋で組織評価と Western blot (WB)、電子顕微鏡(EM)解析を行った。大腿骨頸部骨折で人工骨頭置換術を行った患者の大殿筋をコントロール、サルコペニア単独、COPD 関連サルコペニアに分類し同様の解析を行った。統計解析は ANOVA and Bonferroni correction を用いた。平均値(±SEM)を表示し  $P < 0.05$  を統計学的有意差とした。

## 4. 研究成果

### (1) CSE は、ミトコンドリア ROS を産生し、筋管萎縮を起こす。

筋管に 2% CSE を添加することで ROS の産生の増加と筋管の萎縮が見られた(図 1-1)。また、CSE による筋管萎縮は、ミトコンドリア ROS 特異的抗酸化剤 (Mito-TEMPO)の添加により抑制されることを示した(図 1-2)。

### (2) *Parkin* は CSE 刺激によるミトコンドリア ROS 産生と筋管萎縮を抑制している。

*Parkin* を KD した筋管は、CSE 刺激でコントロールと比べ有意に筋管萎縮、TOMM20、MuRF-1 上昇を認めたが(図 2-1)、*Parkin* の過剰発現により CSE 刺激の影響は予防された(図 2-2)。

### (3) 長期喫煙曝露で *Parkin* ノックアウトマウスはより強くサルコペニアの表現型を示した。

長期喫煙曝露で *Parkin* ノックアウトマウスでは、腓腹筋の重量と筋力、筋管径のより著しい低下がみられた(図 3)。

### (4) 長期喫煙曝露は、筋肉内の障害ミトコンドリアの蓄積、酸化ストレスの増強、そして MuRF-1 活性による筋萎縮を誘導した

WT マウス喫煙群では筋肉量の有意な減少を認め、*Parkin* とミオシン重鎖の発現量も低下した。PKO マウス喫煙群の筋重量とミオシン重鎖の発現量はより顕著に減少しており、筋組織では 4HNE と Tomm20 染色の有意

な増強、そして MuRF=1 の発現増強を認めた (図 4-1 と図 4-2)。

【結論】

COPD 合併サルコペニアでは、喫煙刺激による Parkin 発現低下が Parkin 介在性ミトファジーの低下を引き起こし、ミトコンドリア ROS の産生増強とそれに伴う MuRF-1 活性が骨格筋の萎縮を引き起こす事が示唆された

【参考文献】

1. Garcia-Rio F, Rojo B, Casitas R, et al.:Prognostic value of the objective measurement of daily physical activity in patients with COPD. Chest 142:338-346, 2012
2. Benz E, et al. Eur Respir Rev.2019;28:1-13
3. Puente-Maestu L, Perez-parra J, Godoy R et al.: Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. Eur Respir J 2009;33 1045-1052
4. Peker N, et al. Am J Physiol Cell Physiol 315:C164-C185, 2018
5. Ito S, Araya J, Kurita Y, et al: PARK2-mediated mitophagy is involved in regulation of HBEC senescence in COPD pathogenesis. Autophagy. 11(3):547-59, 2015.

図 1-1 DCFHDC による ROS 測定と CSE 添加時の筋管径の側的

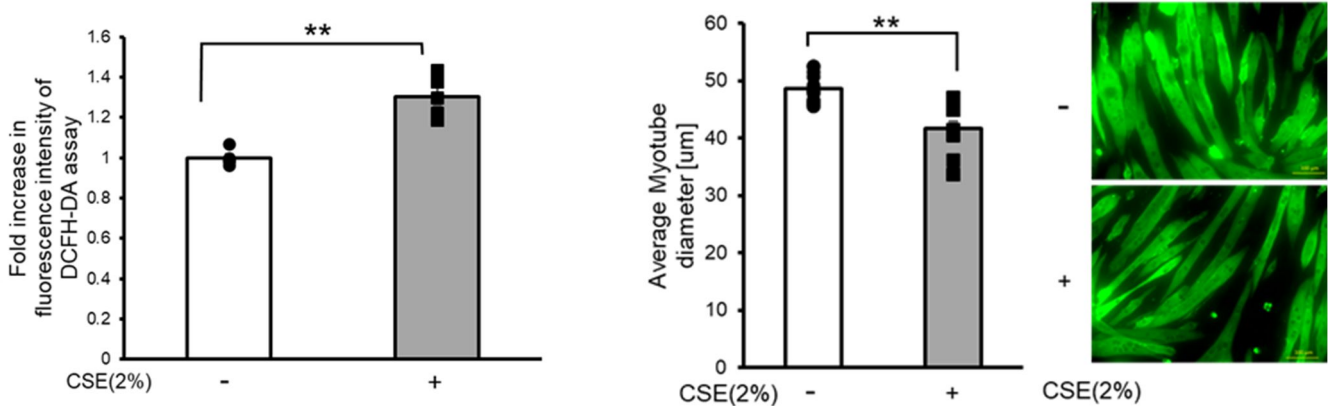


図 1-2 DMSO と Mito-TEMPO 添加時の MHC 及び Parkin の WB 評価

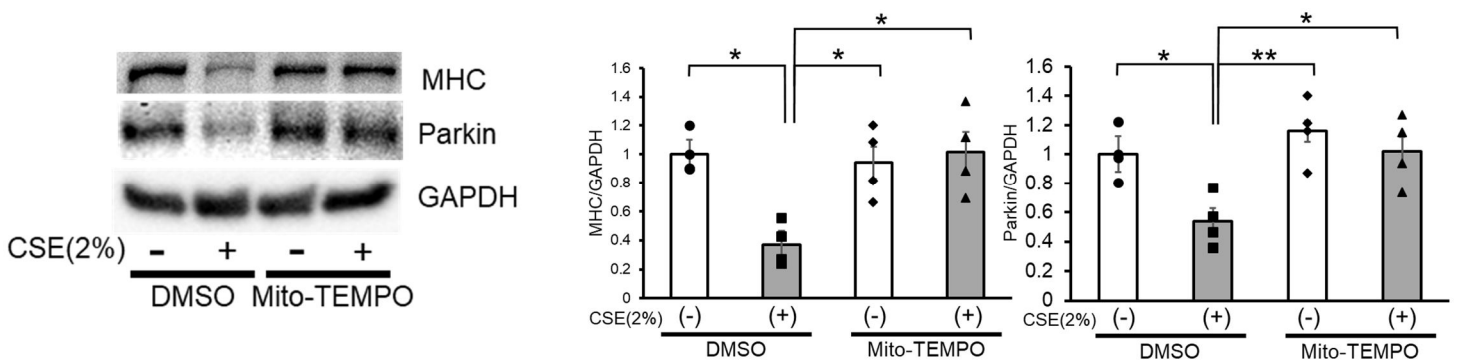


図 2-1 Parkin ノックダウン時の筋管の MHC、TOMM20、MuRF=1 の WB 評価

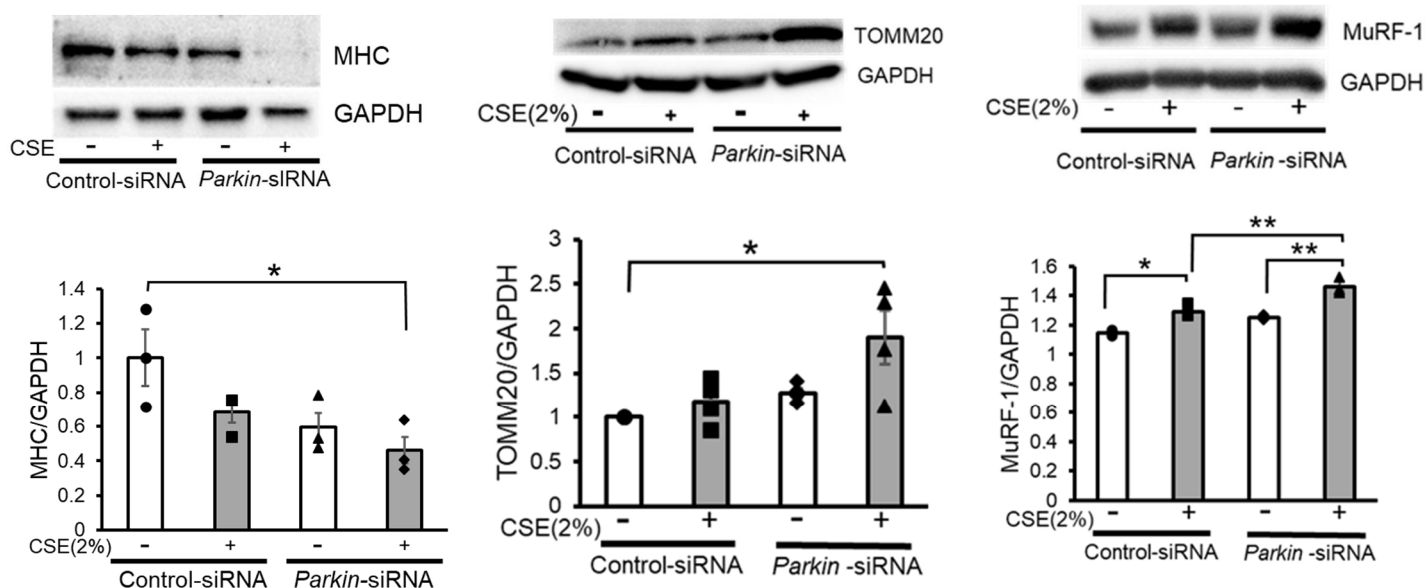


図 2-2 Parkin 過剰発現時の筋管の MHC、TOMM20、MuRF=1 の WB 評価

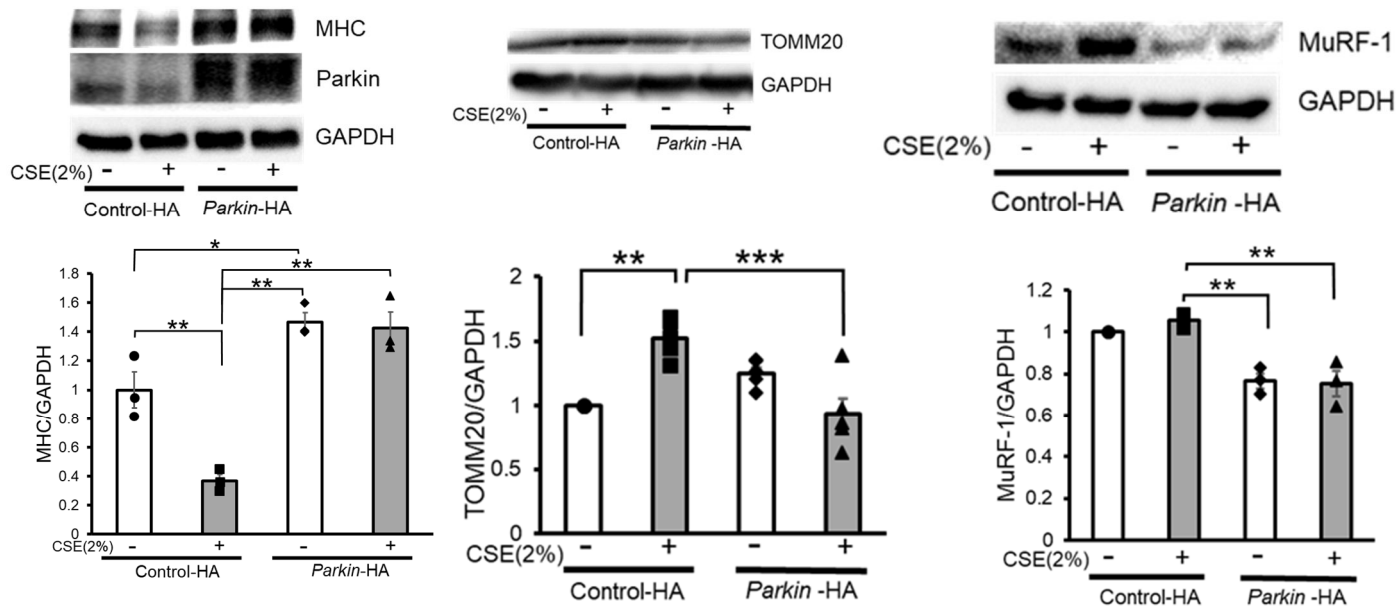


図 3. 長期喫煙暴露で Parkin ノックアウトの腓腹筋の重量と筋力、筋径の評価

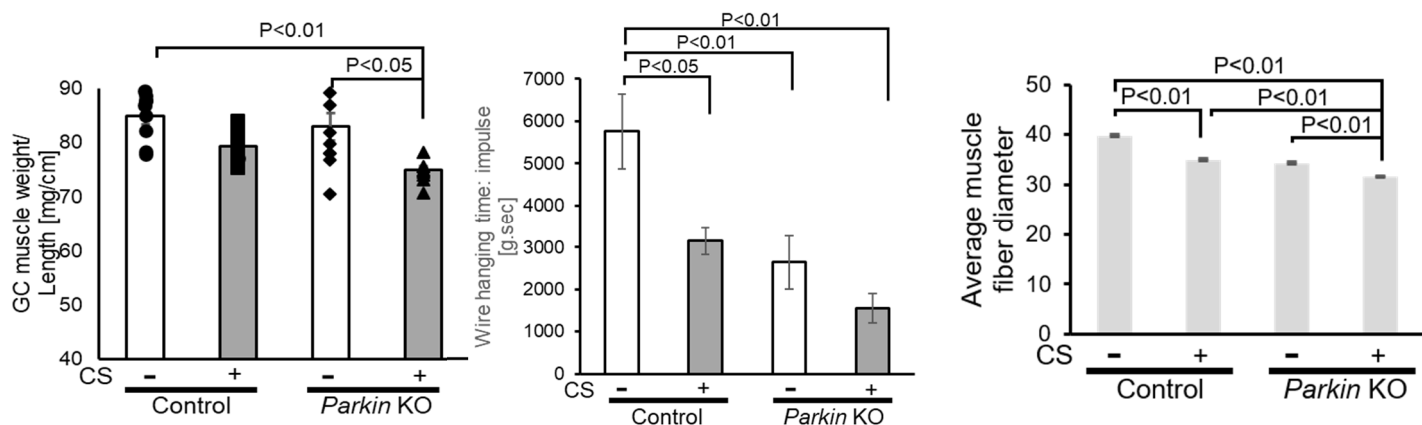


図 4-1. Parkin ノックアウトマウスにおける喫煙暴露での MHC と MuRF-1 の発現評価

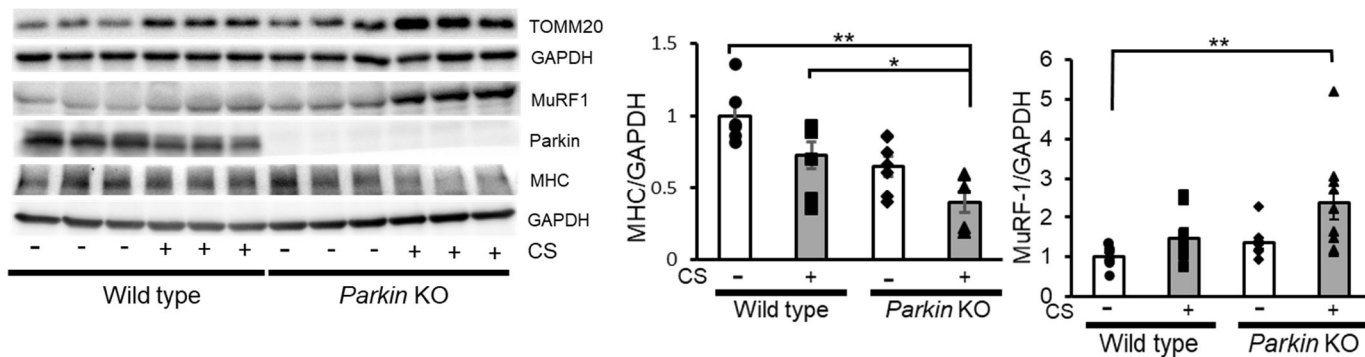
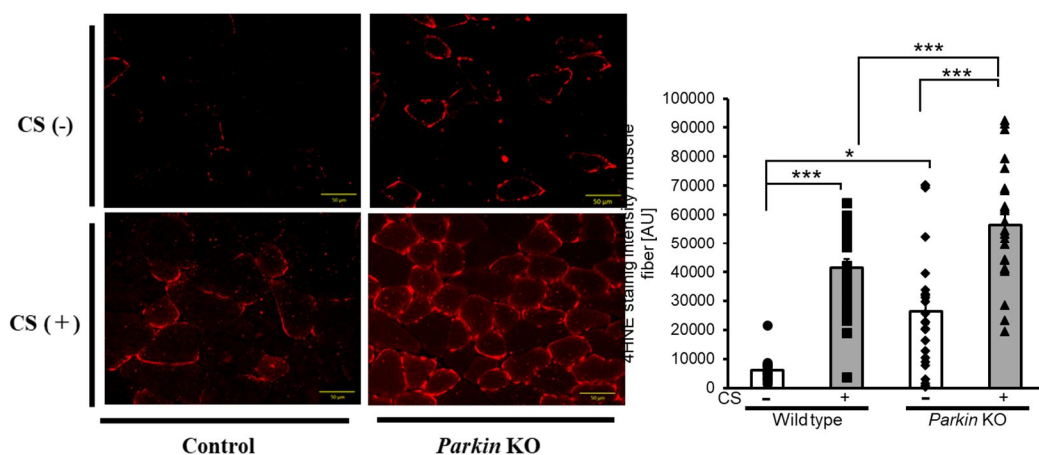
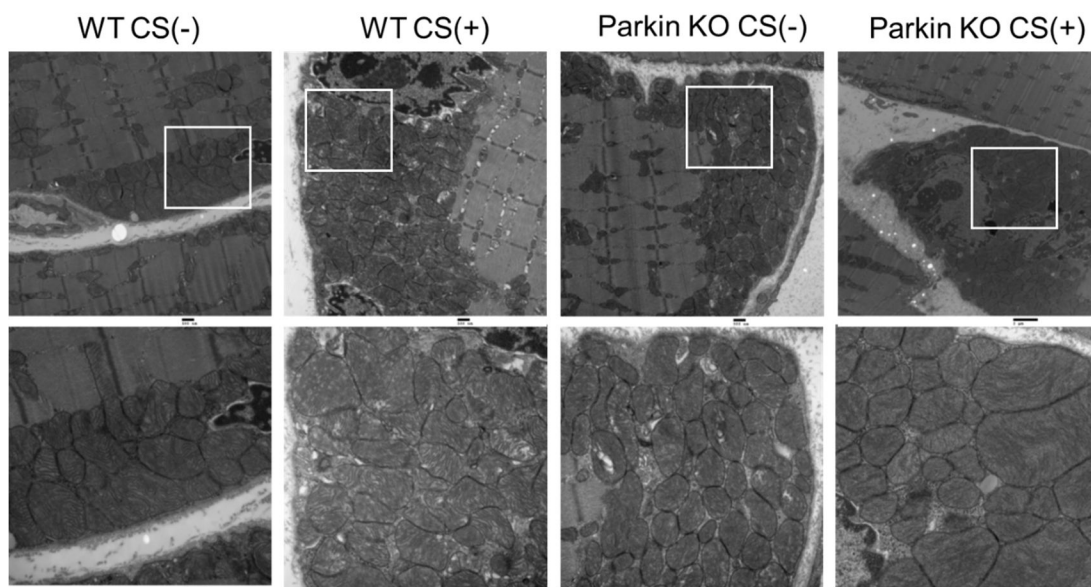


図 4-2. Parkin ノックアウトマウスにおける喫煙暴露での障害ミトコンドリアと酸化ストレスの発現評価 (4 HNE の評価)



(障害ミトコンドリアの電子顕微鏡評価)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 2020年

1. 発表者名 伊藤晶彦
2. 発表標題 Role of Parkin in the pathogenesis of COPD-related sarcopenia
3. 学会等名 ERS（国際学会）
4. 発表年 2019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・助教   (32651)	
研究分担者	橋本 典生  (Hashimoto Mitsuo)  (00771742)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教   (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