

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07423

研究課題名(和文)サルコペニアの新規分子機構の解明と治療戦略の創出

研究課題名(英文)Elucidation of novel molecular mechanism of sarcopenia

研究代表者

遠藤 仁(Endo, Jin)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：50398608

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)：加齢性骨格筋萎縮の予防は健康寿命の伸長のために重要です。我々は、従来、血圧調節分子として知られていたプロレニン受容体PRRが、老化と関連が深いWnt-カテニンシグナルやYAPシグナルを活性化することで加齢性骨格筋萎縮の病態形成に関与することを明らかにしました。PRR-Wntシグナルの活性化は、筋線維の早熟分化を誘導し、筋芽細胞の融合を阻害することで、結果的に筋線維、特に速筋線維の萎縮を起こします。PRR中和抗体、Wnt阻害薬、YAP阻害薬はそれぞれ筋萎縮を抑制する効果を示し、加齢性骨格筋萎縮の治療薬になる可能性を示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、高齢化を迎える日本において、元気に健康を維持したまま生活できる期間、いわゆる健康寿命は、平均寿命に比べ10年前後も短く、この予防および治療は現代医療の喫緊の課題といえます。健康寿命の低下に寄与する最も大きな因子の一つが、加齢性骨格筋萎縮によるADLの低下です。我々の研究で得られた成果から、加齢性骨格筋萎縮に関係する分子とシグナル経路(PRR-Wnt-YAPシグナル)を抑える薬剤が治療薬の可能性を持っていることが明らかになりました。従来、加齢による筋肉の減少は不可避な老化現象とみなされてきましたが、本研究の結果からも治療介入可能な病態・疾患の一つと考えられます。

研究成果の概要(英文)：Prevention of age-related skeletal muscle atrophy, so called sarcopenia, is important for extending healthy life expectancy. We revealed that the prorenin receptor PRR, which was conventionally known as a blood pressure regulator, was involved in the pathogenesis of sarcopenia by activating Wnt- β -catenin signaling, which are closely related to aging, and YAP signaling. Activation of the PRR-Wnt signaling axis induced premature differentiation of muscle cells to inhibit myoblast fusion, resulting in the atrophy of muscle fibers, especially fast fibers. PRR-neutralizing antibodies, Wnt inhibitors, and YAP inhibitors each exhibited the effect of restoring muscle atrophy, and showed the potential to be a therapeutic drug for sarcopenia.

研究分野：循環器内科学

キーワード：サルコペニア 老化 Wnt-カテニンシグナル プロレニン受容体 YAPシグナル 細胞融合 早熟分化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化を迎える日本において、元気に健康を維持したまま生活できる期間、いわゆる健康寿命は、平均寿命に比べ10年前後も短く、この予防および治療は現代医療の喫緊の課題といえる。健康寿命の低下に寄与する最も大きな因子の一つが、サルコペニアによるADLの低下である。従来、加齢による筋肉量の減少は不可避的な生理的老化現象として考えられてきたが、近年研究がすすむにつれて、病因とその分子機構を有する病態であり治療介入を要する疾患の一つととらえられるようになってきている。サルコペニアの主な原因として、意欲の低下や生活環境の変化による身体活動の減少があげられ、同時に加齢に伴う代謝や様々な液性因子の変化も重要である。また、メカニズムとして、筋蛋白の生合成と分解のバランスの破綻や筋修復能の低下、ミトコンドリア機能の低下、慢性炎症などの分子機構を介して筋肉量や筋力の低下をきたすと考えられている。しかし、その原因や分子機構についてはいまだ不明な点が多く、明確な標的に対する治療介入はできていない。

癌や発生と関連が深い Wnt/ カテニンシグナルは、老化に伴う骨格筋再生能や炎症に起因する老化に関与することが既に報告されており(Liu, Science, 2007; Brack, Science, 2007; Naito, Cell, 2012)、加齢性骨格筋萎縮と関連が深い。Wnt シグナルは様々な分子によって活性が制御されているが、近年、組織レニン-アンジオテンシン系(RAS)活性化の鍵分子の一つであるプロレニン受容体(PRR)が共役的に働き Wnt シグナルを活性化することが報告された(Cruciat, Science, 2010)。我々は、この PRR を介した Wnt シグナルの制御が加齢性骨格筋の病態形成と深く関与していると考え、研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、PRR-Wnt シグナルを介した新たなサルコペニアの分子機構を解明するとともに、これらのシグナル制御による治療手段の創出を目的としている。

これまで様々な PRR の組織特異的ノックアウトマウスによる表現型解析が行われてきた。しかし、PRR は液胞型プロトンポンプ(V-ATPase)複合体の構成蛋白の一つでもあり、ノックアウトは V-ATPase 機能喪失からライソソームの酸性化障害による過酸化物の異常蓄積をきたし、重篤な細胞機能障害を示し、PRR が有する他の生理機能について解析が困難であった。よって本研究では、PRR のサルコペニア発症における意義を解明するために、機能獲得モデルの作出を行なった。興味深いことに、PRR トランスジェニック(Tg)マウスは、サルコペニアの特徴を非常によく反映した骨格筋萎縮を呈した。元来、サルコペニアとRASとの関連は指摘されていたが、PRR Tg マウスにおいては局所RASの活性化は一切確認されず、唯一 Wnt シグナルの活性化だけが PRR を強制発現させた影響として骨格筋に認められた。このユニークなサルコペニア動物モデル PRR Tg マウスを組織学的および分子生物学的に解析することで、サルコペニアの新規の病態分子メカニズムを解明し、新たな治療法の創出を目指す。

3. 研究の方法

CAG プロモーター下で PRR 遺伝子を発現させた PRR Tg マウスを作成し、全身(特に骨格筋、心筋、肝臓、腎臓)に十分な蛋白レベルでの発現上昇を確認した。PRR Tg マウスは通常環境下で飼育すると、一年以内にほぼすべての個体が死滅するため、12週令のマウスを実験に用いた。野生型の加齢マウスは、100週令の個体を用いた。骨格筋の組織学的解析を中心に PRR Tg マウスの表現型を調べた。骨格筋の再生能を評価するため、カルジオトキシンによる筋傷害モデルを作成した。In vitro については C2C12 筋芽細胞株を用いた筋管形成実験を行なった。PRR Tg マウスおよび加齢マウスのサルコペニアの分子機構を明らかにするとともに有効な治療手段の探索のために、Wnt 阻害薬 DKK1、PRR 中和抗体、YAP 阻害薬 Verteporphin をマウスに投与し、骨格筋の組織学的変化を評価した。

4. 研究成果

老化に伴い骨格筋では人でもマウスでもプロレニン受容体(PRR)の発現が上昇する。PRR を全身に高発現させた PRR Tg マウスの解析を行なったところ、骨格筋、特に速筋に強い萎縮を認め、炎症・線維化・老化マーカーがそれぞれ上昇しており、サルコペニアの表現型を呈していた。AAV により骨格筋選択的に PRR を発現したところ筋肉が萎縮し、骨格筋の PRR 発現が直接萎縮を誘導していることが確認できた。本マウスの骨格筋(速筋)では予想通り、Wnt/ カテニンシグナルが活性化しており、Wnt シグナル阻害薬 DKK1 の投与で筋萎縮が改善したため、PRR Tg マウスの骨格筋萎縮に Wnt シグナルが関与していることが分かった。このようなサルコペニアの特徴を須らく包含する動物モデルは稀有で、本疾患の病態解明に大変有用なモデルと考えられる。

筋萎縮と関連が深い蛋白生合成系および分解系の機構を解析した。PRR Tg マウスの萎縮した骨格筋では、合成系の mTOR は活性化しており、分解系の UPS は抑制されていることから、筋萎縮の代償反応が起きていると考えられた。オートファジーについては p62 の上昇と LC3 conversion の障害がみられ、オートファジーの過程が進まない機能障害を呈していることが確認された。

老化した骨格筋は再生能が低下していることが知られているため、カルジオトキシンを用いた細胞壊死後の筋再生過程を観察したところ、PRR Tg マウスではすみやかに再生筋細胞が出現し

増殖したが、細胞融合が遅滞し、筋線維の成熟・肥厚が不十分であった。Wnt 活性化は筋細胞の早熟を促すことが知られているが、事実、PRR Tg マウスにおいても myogenin 等の分化マーカーが再生早期に高率に発現しており、細胞融合の障害に影響していることが示唆された。筋障害後 30 日前後では、速筋線維も少なからず散見されるが、90 日では障害前と同様の速筋線維優位の筋萎縮を呈していた。以上から、PRR Tg マウスでは細胞融合の障害による筋再生不良が起きており、筋萎縮の機序の一つと考えられた。

次に我々は、C2C12 筋芽細胞の培養実験系を用いて、分化誘導による筋管形成能の評価を行なった。レトロウイルスベクターで PRR の安定発現細胞株を作成し、分化誘導を行なったところ、コントロールと比較し筋管形成は著しく低下したが、Wnt 阻害薬 DKK1 の投与により有意に回復した。培養細胞においても PRR の高発現は、Wnt- カテニンシグナルを活性化し、myogenin の高発現を誘導し早熟分化を起こし、老化マーカーの上昇や TUNEL 陽性の死細胞の上昇を促した。

in vivo で Wnt 受容体と PRR の結合を阻害する中和抗体の投与を行なったところ、PRR Tg マウスにおいて活性化していた Wnt シグナルは抑制され、老化や線維化のマーカーの改善とともに、萎縮骨格筋の肥厚も確認された。筋傷害後の再生過程も検証したところ、PRR Tg マウスに中和抗体を投与した群においては細胞融合が良好に進み、再生筋線維の肥厚が改善した。加齢野生型マウスに中和抗体を投与したところ、非傷害下では筋線維の肥厚は確認できなかったが、カルジオトキシン投与下では中和抗体による筋再生の改善が確認された。

Wnt シグナルと協調的に作用する YAP シグナルについても、老化マウスと PRR Tg マウスそれぞれの速筋で強く活性化していた。YAP シグナル経路がサルコペニア発症に寄与しているか明らかにするため、YAP 阻害薬 verteporphin の投与を行なったところ、PRR 安定発現 C2C12 筋細胞株において筋管形成能が改善し、PRR Tg マウスでは筋線維の肥厚が確認された。Wnt および YAP の阻害薬を用いることで、PRR の活性化に基づくサルコペニア機構においては Wnt シグナルの下流に YAP が位置していることが明らかとなった。

本研究の今後の展望としては、PRR-Wnt-YAP 経路を阻害する手段を実臨床への応用が可能な方法に修正する必要がある。本研究では阻害薬の単回投与（筋肉局所注射）であったため、効果が持続可能な AAV などのベクターを用いた shRNA での発現抑制を促す手法を開発したいと考えている。そのような長期の有効性が確保できれば、PRR Tg マウスや加齢マウスに投与し寿命の延長がみられるか評価する。

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 Yoshida Naohiro, Endo Jin, Kinouchi Kenichiro, Kitakata Hiroki, Moriyama Hidenori, Kataoka Masaharu, Yamamoto Tsunehisa, Shirakawa Kohsuke, Morimoto Satoshi, Nishiyama Akira, Hashiguchi Akihiro, Higuchi Itsuro, Fukuda Keiichi, Ichihara Atsuhiko, Sano Motoaki	4. 巻 18
2. 論文標題 (Pro)renin receptor accelerates development of sarcopenia via activation of Wnt/YAP signaling axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Aging Cell	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) 10.1111/accel.12991	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Jin Endo
2. 発表標題 (Pro) renin receptor promotes development of sarcopenia via activation of Wnt-YAP signaling pathway
3. 学会等名 BCVR
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jin Endo
2. 発表標題 Elucidation of novel molecular mechanism of sarcopenia via (pro)renin receptor-Wnt/YAP signaling pathway
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤 仁
2. 発表標題 プロレニン受容体による加齢性骨格筋萎縮の新規分子機構
3. 学会等名 日本抗加齢医学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------