

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19641

研究課題名（和文）臓器連関による筋萎縮発症機序の解明とその応用

研究課題名（英文）Inter-organ regulation of skeletal muscle atrophy

研究代表者

藤巻 慎（Fujimaki, Shin）

熊本大学・発生医学研究所・助教

研究者番号：10795678

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は筋萎縮の引き金となる上流メカニズムを解明することを目的に実施した。その結果、不活動や糖尿病といった状態下において、毛細血管を構成する血管内皮細胞からNotchリガンドであるDII4が放出され、筋線維に発現するNotch2を活性化させることで筋萎縮を誘導する「血管DII4-筋Notch2シグナル軸」を発見した。遺伝子改変マウス、中和抗体、低分子化合物などを用いて、このシグナル軸を阻害することで、不活動や糖尿病による筋萎縮を抑制できることに加え、過負荷刺激にともなう筋肥大応答を増強させることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで通説となっていた「Notch = 幹細胞」という考え方を打破し、成熟した筋線維におけるNotchシグナルの機能を明らかにしたことで、Notchの研究に新たな展開を生む新規性の高い知見である。また本研究成果は、血管が酸素や栄養素を末梢に運ぶ単なる輸送担体ではなく、直接的に筋量調節を行う機能を有していることを示しており、骨格筋研究のさらなる発展に寄与するものである。本成果をさらに深めることで、各種筋萎縮症に対する治療法開発や創薬応用を実現したいと強く考える。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify the upstream mechanism initiating muscle atrophy, and discovered "the vascular DII4-muscular Notch2 axis": vascular endothelial cells release the soluble form of DII4, which activates muscular Notch2, leading to muscle atrophy. Blocking this axis by genetic models, neutralizing antibodies, and low-molecular weight compounds prevents disuse- or diabetes-induced muscle atrophy and promotes overloading-induced muscle hypertrophy.

研究分野：骨格筋生物学

キーワード：筋萎縮 血管内皮細胞 DII4-Notch2軸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

未曾有の超高齢社会に突入している我が国において、サルコペニアに伴う運動機能低下が多くの要介護者を生み、社会問題となっている。また、サルコペニアと重複して起こる廃用性筋萎縮や糖尿病性筋萎縮は、さらなる身体活動量の低下や転倒の原因となり、寝たきりや死亡リスクの上昇につながる。実際に、骨格筋量は健康寿命の長さと強い正相関を示すことも報告されている (Ruiz et al., *BMJ*, 2012)。したがって、介護予防の観点から、筋萎縮の予防・治療法の確立は急務であり、骨格筋量を制御する分子基盤の解明は重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究で着目した Notch シグナルは、ショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に広く保存された分子シグナルであり、関連する学術論文は 25,000 報を数える。そのほとんどが種々の幹細胞の機能制御に関するものであり、Notch シグナルは幹細胞機能を制御する分子基盤、すなわち、「Notch = 幹細胞」という考え方が通説になっていた。骨格筋の研究分野においても、Notch は骨格筋幹細胞のみに発現し、最終分化した筋線維には発現しないと考えられてきた。しかしながら、予備検討において、成熟筋線維に Notch2 が発現すること、さらに、Notch2 の恒常活性化によって顕著な筋萎縮が誘導されることを発見した。そこで、本研究は成熟筋線維における Notch シグナルの機能を明らかにすることで、筋萎縮発症機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、筋線維特異的に Notch2 を欠損させたマウス (Mlc1f-Cre;Notch2-floxed, N2-mKO) や Notch シグナル阻害剤 (低分子化合物や中和抗体) を用いることで、成熟筋線維における Notch シグナルの機能を解析するとともに、免疫電子顕微鏡観察や共培養システムを用いて Notch シグナルを活性化させる上流メカニズムを検討した。

4. 研究成果

(1) Notch2 欠損による筋萎縮抵抗性の獲得

N2-mKO マウスは野生型マウスと同等に成長し、定常状態において Phenotype の変化がないことを確認した。そこで、尾部懸垂による廃用性筋萎縮モデルとストレプトゾトシンの腹腔内投与による糖尿病性筋萎縮モデルを用いて筋萎縮を誘導したところ、野生型マウス (WT) では筋量および筋線維横断面積の顕著な低下が見られた一方で、N2-mKO ではほとんど筋萎縮が観察されなかった。また、RNA-Seq による遺伝子発現解析の結果、WT の筋組織では筋萎縮に伴って多くの遺伝子が発現変動するのに対し、N2-mKO の筋組織では発現変動する遺伝子が顕著に少なかった。qPCR によって筋萎縮関連遺伝子の発現を定量したところ、WT では尾部懸垂および糖尿病によって発現増加する一方で、N2-mKO では変化しなかった。以上の結果から、Notch2 を欠損することで筋萎縮に対する抵抗性を獲得することが明らかとなった。

(2) Dll4-Notch2 軸によって筋萎縮が誘導される

筋線維の Notch2 を活性化させるメカニズムを明らかにするために、Notch2 のリガンドの特定を試みた。筋組織に発現する 4 種類の Notch リガンド (Dll1, Dll4, Jag1, Jag2) の組換えタンパク質を培養プレートに固相化し、その上で筋組織から単離した単一筋線維を培養したところ、Dll4 の上で培養した筋線維だけが顕著な萎縮を呈した。そこで、N2-mKO マウスから単離した筋線維を Dll4 上で培養したところ、Notch2 を欠損した筋線維は萎縮を起こさなかったことから、Dll4 が Notch2 のリガンドとして機能し、筋萎縮を誘導することが示唆された。

(3) 血管内皮細胞由来の可溶型 Dll4 は筋萎縮を誘導する

Notch2 のリガンドである Dll4 が筋組織内のどの細胞種に由来するかを明らかにするため、単一核 RNA-Seq 解析を行った結果、筋組織における Dll4 の発現が毛細血管を構成する血管内皮細胞に限定されることがわかった。続いて、免疫電子顕微鏡によって Dll4 が血管内皮細胞から放出されているような像が観察されたため、筋組織由来血管内皮細胞の培養上清における Dll4 タンパク質を定量したところ、培養液中に可溶型で放出されていることを確認した。この血管内皮細胞と単離筋線維を Transwell システムによって共培養したところ、筋萎縮が誘導され、それは Dll4-Notch2 軸の阻害によって抑制されることが明らかになった。

(4) Dll4 阻害による筋萎縮抑制

中和抗体を用いて可溶型 Dll4 の機能を阻害することで、筋萎縮が抑制できるかどうかを明らかにするため、廃用性筋萎縮や糖尿病性筋萎縮を誘導した野生型マウスに Dll4 中和抗体を投与し、コントロール抗体を投与したマウスと比較した。その結果、いずれの筋萎縮モデルにおいても、Dll4 中和抗体の投与によって筋重量および筋線維横断面積の低下が抑制されることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究の成果として「血管 Dll4-筋 Notch2 軸」という新たな筋量調節機構を発見した (図 1)。これまで末梢組織に酸素や栄養を運ぶ輸送単位として考えられてきた血管が、骨格筋量を直接的に制御するという新たな機能を担っていることを示した本研究は、血管生物学や骨格筋生物学の学術分野の発展に大きく寄与するものである。また、この「血管 Dll4-筋 Notch2 シグナル軸」は筋萎縮の上流メカニズムとなり、サルコペニアやフレイル克服に向けた魅力的な治療標的になると考えられる。

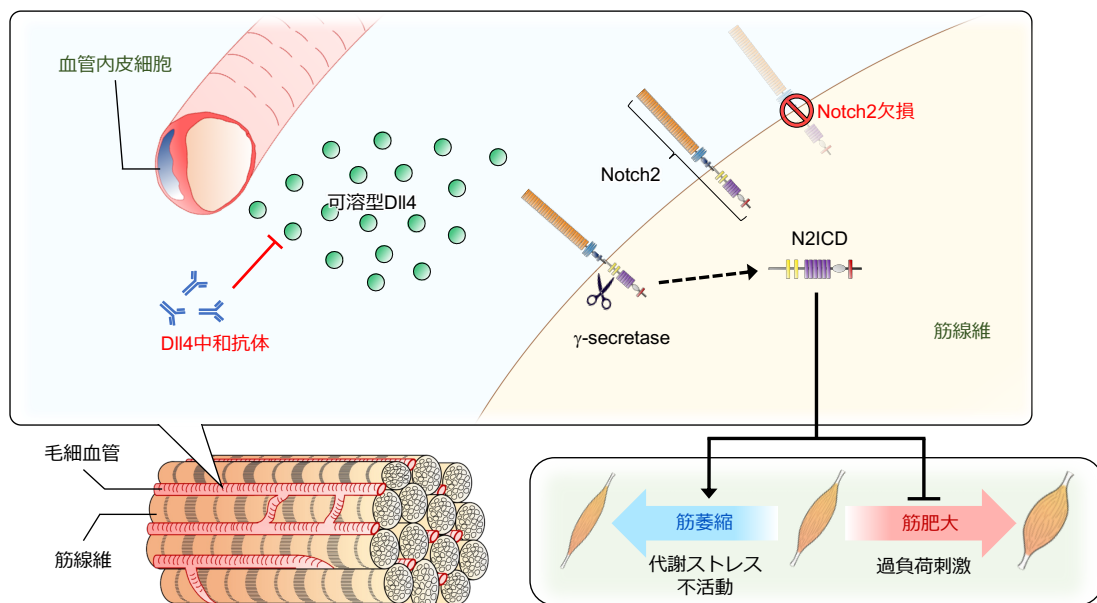


図 1 血管 Dll4-筋 Notch2 軸による筋量調節機構

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujimaki Shin, Matsumoto Tomohiro, Muramatsu Masashi, Nagahisa Hiroshi, Horii Naoki, Seko Daiki, Masuda Shinya, Wang Xuerui, Asakura Yoko, Takahashi Yukie, Miyamoto Yuta, Usuki Shingo, Yasunaga Kei-ichiro, Kamei Yasutomi, Nishinakamura Ryuichi, Minami Takashi, Fukuda Takaichi, Asakura Atsushi, Ono Yusuke	4. 巻 4
2. 論文標題 The endothelial Dll4-muscular Notch2 axis regulates skeletal muscle mass	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Metabolism	6. 最初と最後の頁 180 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42255-022-00533-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 組織内細胞連関による筋量調節
3. 学会等名 第7回日本血管生物医学若手研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin Fujimaki
2. 発表標題 Endothelial - muscular axis regulates skeletal muscle mass
3. 学会等名 The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 組織内細胞連関による筋可塑性制御
3. 学会等名 第8回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤巻慎、小野悠介
2. 発表標題 血管-筋線維連関による筋量調節
3. 学会等名 第30回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin Fujimaki, Naoki Horii, Atsushi Asakura, Yusuke Ono
2. 発表標題 Vascular endothelial cells regulate skeletal muscle atrophy and hypertrophy
3. 学会等名 Myology & MitoNICE 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shin Fujimaki
2. 発表標題 Vascular-muscular axis regulates muscle plasticity
3. 学会等名 1st King 's-Kumamoto (KK) Joint Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻慎、小野悠介
2. 発表標題 血管内皮細胞由来因子による筋量調節機構
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 血管-筋線維軸による新たな筋量調節機構
3. 学会等名 第2回つくばマッスル研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻慎、堀居直希、高橋雪枝、宮本雄太、白杵慎吾、安永桂一郎、亀井康富、西中村隆一、南敬、福田孝一、朝倉淳、小野悠介
2. 発表標題 血管D114-筋Notch2軸を標的とした筋萎縮治療法の開発
3. 学会等名 第9回サルコペニアフレイル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 サルコペニア・フレイル克服を見据えた新規筋量調節機構
3. 学会等名 第43回基礎老化学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤巻慎
2. 発表標題 血管-筋線維軸による筋可塑性制御機構
3. 学会等名 第11回AAA（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shin Fujimaki, Ortuste Quiroga Huascar Pedro, Naoki Horii, Kodai Nakamura, Shoma Iritani, Kota Sawada, Yoko Mikumo, Yusuke Ono
2. 発表標題 D114-Notch2軸による筋可塑性制御機構
3. 学会等名 第9回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 筋萎縮症治療剤	発明者 藤巻慎、小野悠介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-56481	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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