

令和 4 年 2 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15414

研究課題名（和文）フレイルおよびサルコペニア予防のための骨格筋リモデリングと再生機構解明

研究課題名（英文）Mechanism of skeletal muscle remodeling and regeneration for the prevention of frailty and sarcopenia

研究代表者

井上 愛子（Inoue, Aiko）

名古屋大学・未来社会創造機構（医）・招へい教員

研究者番号：10805245

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）：高齢期の骨格筋は障害を伴っていることが多く（サルコペニア、フレイルなど）、治療には骨格筋再生へのアプローチが必要である。細胞の分化・増殖、及びアポトーシスにおいて重要な役割を果たし、老化に伴いそのシグナル伝達の不活化が起こることが報告されているNotchシグナルとその活性化に関与するカテプシンKに着目し、サルコペニア形成、骨格筋のリモデリングや再生への関与を検討した。カテプシンKは、サルコペニアを代表とする骨格筋障害に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カテプシンKが、カヘキシアモデルマウスの骨格筋の萎縮と機能障害にも関与している可能性が示唆されたことにより、今後は高齢者のQOLやADLの低下予防や、フレイルなどの改善のための新たな分子標的になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Skeletal muscle in the elderly is often accompanied with damage (e.g., sarcopenia, frailty, etc.), and the approach to the skeletal muscle regeneration is necessary for the treatment. Notch-1 signaling, which plays an important role in cell differentiation, proliferation, and apoptosis, is reported to be inactivated during aging. Cathepsin K has been reported to activate Notch1. In this study, we have investigated the mechanism of sarcopenia, specially focused on cathepsin K-mediated Notch1 signaling activation. We found that cathepsin K is involved in skeletal muscle disorders such as sarcopenia.

研究分野：老年医学

キーワード：骨格筋 再生 リモデリング 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

サルコペニアは、高齢者の日常生活動作の制限、転倒骨折、フレイルなどと密接に関連し、医療のみならず介護予防の観点からも対応が求められているが、その病態はいまだ不明な部分が多い。

研究代表者らは、老化促進マウス (**Senescence-Accelerated Mouse Plone 10, SAMP10**) を用い、**SAMP10** における運動トレーニング (**ET**) の効果及びその機序に関する検討を行い、**ET** による加齢に伴う筋肉機能及び構造変化 (サルコペニア) の改善効果についてその仕組みを明らかにした (*Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2017)。

さらに、若齢 **SAMP10** に野生型のマウスの骨髄移植を実施することにより、骨格筋の筋機能の改善と筋萎縮の抑制効果が認められ、加齢による筋再生および骨格筋機能不全を回復させることを明らかにし、サルコペニアに対する骨髄細胞治療の有用性と予防効果を明らかにした。

一方、研究代表者らは、システイン・プロテアーゼであるカテプシンファミリーの中でも、特カテプシン **K (Cat-K)** とカテプシン **S (Cat-S)** に着目し、心血管病発症進展におけるそれらの役割解明の研究の過程で、カテプシン **K** が **Notch1** の活性化 (プロセッシング) に関与していることを発見し、**Notch1** 活性化及び下流の **Hes1-Hey1/2** 発現と **VEGF/R1-PI3K/Akt** シグナル経路の活性化を介して血管新生に関与することを報告した (*Nat Commun* 2014)。

Notch シグナルは骨格筋の発生、細胞の分化・増殖、及びアポトーシスにおいて重要な役割を果たし、老化に伴いそのシグナル伝達の不活性化が起こることが報告されている。また、加齢に伴う骨格筋幹細胞 (衛星細胞) 活性の低下に **Notch signal** の低下が指摘された (*Science* 2003)。

これらの先行研究を踏まえて、カテプシン **K** は骨格筋において **Notch1** の活性化を介して、骨格筋細胞アポトーシス、増殖ならびに分化に関与するのでは、との仮説を立て、その仮説を検証するために以下の実験を行った。

2. 研究の目的

Notch シグナルは骨格筋の発生、細胞の分化・増殖、及びアポトーシスにおいて重要な役割を果たし、老化に伴いそのシグナル伝達の不活性化が起こることが報告されている。しかし、サルコペニアへの **CatK-Notch** シグナルの関与については明らかにされていない。

研究代表者らは、予備実験にて加齢に伴うカテプシン **K** 変化と **Notch1** 活性化低下の関連性を虚血筋肉で見出しており、ヘビ毒を用いた下肢骨格筋障害モデルにおいてもカテプシン **K** が強発現することを確認している。

よって本研究の目的は、これまで明らかにされていない骨格筋におけるカテプシン **K** の発現変化およびカテプシン **K** を媒介する **Notch1** の新たな活性化経路を明らかにし、骨格筋のリモデリングや再生への効果を解明することである。

3. 研究の方法

骨格筋細胞におけるカテプシン **K** を媒介する **Notch 1** の新たな活性化経路を明らかにするため、以下の実験を実施した。

(1) カテプシン **K** を介する **Notch** の活性化と骨格筋細胞分化・増殖やアポトーシスとの関連性の検討

9 週齢の野生型マウス (、**C57BL/6J**) ならびにカテプシン **K** 遺伝子欠損マウス (**CatK-KO**) の片側下肢骨格筋に心臓毒 (**Cardiotoxin (CTX)**, 10 μ M/0.2ml) を投与し、下肢筋肉障害モデルを作成し、骨格筋障害後の骨格筋の再生を誘導した。**CTX** 投与前、投与 3 日後、7 日後、14 日後に血清を分離するとともに、下肢骨格筋を採取し、**C57BL/6J** と **CatK-KO** のカテプシン **K** の発現と活性の変化、カテプシン **K** を媒介とする **Notch1** の活性変化を検討した。

と同様に下肢筋肉障害モデルを作成し、障害筋肉におけるアポトーシス、線維化、骨格筋細胞増殖ならびに活性型衛星細胞の定量を実施した。

下肢筋肉障害モデルを作成し、以下の **A)** 組織学的検討、**B)** 生化学的検討を実施した。

A) **H&E** 染色による再生骨格筋の評価、筋原性マーカー (デスミン) と基底膜物質 (ラミニン) の蛍光染色による新生骨格筋線維の評価、増殖細胞核抗原 (**PCNA**) に対する抗体染色による骨格筋再生の評価、**TUNEL** 法ならびに細胞増殖マーカー抗体による骨格筋細胞のアポトーシスと増殖の評価、**CD68**、**CD45**、**CD4/8** 抗体染色による炎症性細胞浸潤やリンパ細胞浸潤の評価、活性型サテライト細胞 (**CD29+/Sca1-/CD31-/CD45-**) の定量

B) **Western blotting** 法; **Notch1**、**cleaved Notch1**、**jagged-1**、**Hes1**、**Hey1**、**Hey2**、**Akt** および **ERK1/2**、**mTOR**、**Fox0-1**、**Fox-3** のリン酸化、**IRS-1** の発現、アポトーシス関連蛋白質である **Bcl-XL** などの発現

(2) 下肢筋肉障害モデルにおける非選択的カテプシン阻害物質投与の骨格筋再生におけるカテプシン K の役割及びその機序に及ぼす影響の検討

9 週齢の C57BL/6J に対して、選択的カテプシン K 阻害剤(1mg/kg D00087420)を CTX 投与の 2 日前から計 16 日間、腹腔内に投与する。前述のプロトコールと同様に血清と下肢骨格筋を採取し、カテプシン K の発現と活性の変化、カテプシン K を媒介とする Notch1 の活性変化を検討した。同時に障害筋肉におけるアポトーシス、線維化、骨格筋細胞増殖ならびに活性型衛星細胞の定量を実施した。

(3) カヘキシアモデルを用いた骨格筋再生におけるカテプシン K の役割の検討

6 週齢の野生型マウスにマウス肺癌細胞株 (Lewis lung carcinoma; LLC, 1×10^6 個) を背部皮下に移植し、28 日後にサンプリングするカヘキシアモデルを作成し、下肢筋肉の評価および運動機能評価を実施した。

と同様に、カテプシン K 遺伝子欠損マウス(CatK-KO)に LLC を移植したカヘキシアモデルを作成し、組織学的に検討を実施した。

4. 研究成果

(1) カテプシン K を介する Notch の活性化と骨格筋細胞分化・増殖やアポトーシスとの関連性について

9-12 週齢の C57BL/6J マウスならびに CatK-KO マウスの片側下肢骨格筋に CTX を投与し、骨格筋障害を誘導した下肢障害モデルを作製し、CTX 投与前、投与 3 日後、14 日後にマウスの筋機能 (握力、トレッドミル走行時間) の測定を行ったところ、投与 3 日後、14 日後において CatK-KO マウスで有意な四肢握力の改善を認めた。さらに下肢骨格筋を採取し組織学的な解析を行ったところ、投与後 3 日目の組織学的解析の結果、CatK-KO マウスにおいて浸潤マクロファージ (CD68⁺細胞) や炎症細胞浸潤 (CD45⁺細胞) が有意に低下していた。障害後骨格筋でのカテプシン K 発現と Notch1 活性化の亢進と反し、単球走化性蛋白質 1(MCP-1) や トール様受容体 (TLR)-2/-4 発現上昇による炎症性マクロファージの浸潤、細胞死関連蛋白 (caspase-3、cleaved caspase-8、the ratio of the BAX to the Bcl-2) の負の変化による骨格筋細胞のアポトーシスとともに、骨格筋修復・再生低下を認めた。

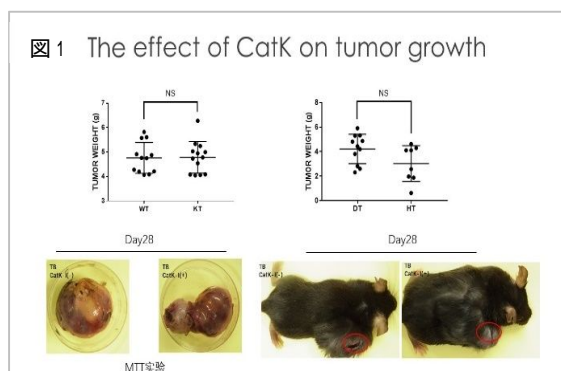
(2) 下肢筋肉障害モデルにおける非選択的カテプシン阻害物質投与の骨格筋再生におけるカテプシン K の役割及びその機序に及ぼす影響について

選択的カテプシン K 阻害剤を用いた場合においても、CTX 投与後 3 日目の骨格筋の組織学的評価で、容量依存的に前述の CatK-KO マウスで認められたのと同様に、浸潤マクロファージの有意な低下と及び炎症細胞浸潤の低下が認められた。

(3) カヘキシアモデルを用いた骨格筋再生におけるカテプシン K の役割の検討について

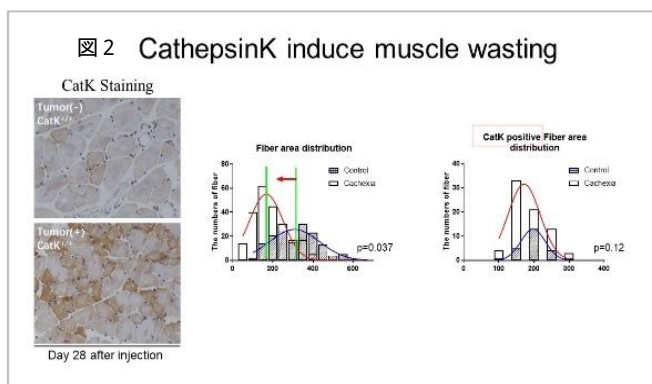
カテプシン K により Notch の活性化を介して筋肉再生が促進されるという仮説に基づき障害後の骨格筋におけるカテプシン K の発現変化およびカテプシン K を媒介する Notch1 の新たな活性化経路の解明のための検証を行ってきた。しかしカテプシン K は筋肉障害後に高発現し、炎症を惹起することにより筋肉の障害を増強し、再生を遅延させることが明らかになった。そこで、現在、癌や臓器不全を抱える患者の死亡や QOL の低下に強く関わり臨床的にも問題となっている癌悪液質 (カヘキシア) に着目し、カヘキシアによる骨格筋萎縮と、カテプシン K との関係を検討することとした。

C57BL/6J または CatK-KO マウスの背部皮下に LLC を移植したカヘキシアモデルを作成し、下肢筋肉の評価ならびに筋機能の評価を行った。移植 28 日目にサンプリングした腫瘍組織重量は、両群で有意差を認めなかった (図 1)。

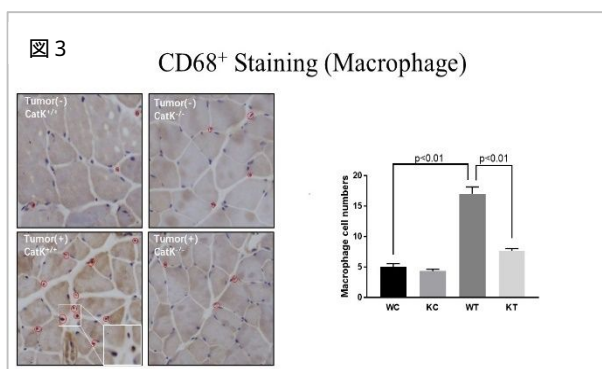


移植後 14 日目ごろより 28 日目のサンプリングまでの体重減少と、下肢骨格筋 (腓腹筋) の筋

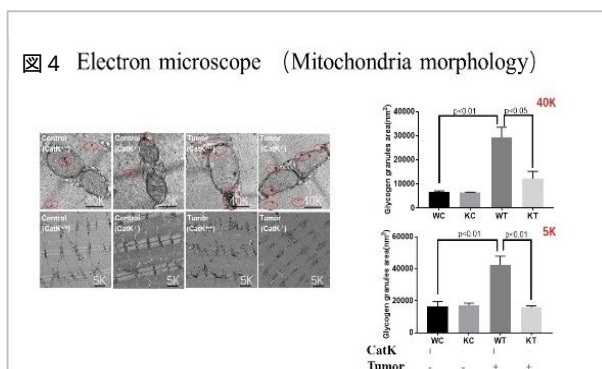
重量および筋線維サイズの有意な減少（図2）と握力の有意な低下を認めた。



また、同様に **CatK-KO** マウスにカヘキシアモデルを作製し **C57BL/6J** と比較検討を行った。骨格筋の炎症性細胞浸潤やリンパ細胞浸潤の評価ならびに電子顕微鏡を用いミトコンドリアの形態比較を行ったところ、**C57BL/6J** マウスと比較し、カヘキシアモデルマウスにおいて浸潤マクロファージ (**CD68⁺**細胞)の増加が認められ、特に **C57BL/6J** のカヘキシアモデルマウスで有意な増加を認めた（図3）。



また、サルコペニアはミトコンドリア機能不全によるインスリン抵抗性などの代謝異常の惹起が、骨格筋の量的・質的な異常を来すと考えられていることから本研究でもミトコンドリアの形態評価を行ったところ、**C57BL/6J** のカヘキシアモデルマウスでグリコーゲン顆粒の有意な増加を認めた（図4）。



(4)まとめ

がんや慢性臓器不全などの消耗性疾患が原因となり、複合的な代謝異常により骨格筋量の減少や筋力低下および体重減少を引き起こす悪液質（カヘキシア）は、サルコペニアを根幹とする病態である。さらにフレイルはサルコペニアから悪液質まで幅広い病態を含む概念とされている。本研究により、カテプシン **K** が、カヘキシアモデルマウスにおいても骨格筋の萎縮と機能障害にも関与している可能性が示された。今後、フレイルによる骨格筋障害を伴う病態の予防や治に対する分子標的として、カテプシン **K** が重要な役割を果たすと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue A, Kuzuya M, Cheng X.	4. 巻 9
2. 論文標題 フレイル・サルコペニアとバイオマーカー[Aging-related frailty and sarcopenia. Frailty - Sarcopenia and biomarker.]	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CLINICAL CALCIUM	6. 最初と最後の頁 1191-1200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ogasawara S, Cheng XW, Inoue A, Hu L, Piao L, Yu C, Goto H, Xu W, Zhao G, Lei Y, Yang G, Kimura K, Umegaki H, Shi GP, Kuzuya M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cathepsin K activity controls cardiotoxin-induced skeletal muscle repair in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cachexia Sarcopenia Muscle.	6. 最初と最後の頁 160-175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.12248.	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 -

1. 著者名 Meng X, Huang Z, Inoue A, Wang H, Wan Y, Yue X, Xu S, Jin X, Shi GP, Kuzuya M, Cheng XW.	4. 巻 -
2. 論文標題 Cathepsin K activity controls cachexia-induced muscle atrophy via the modulation of IRS1 ubiquitination.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cachexia Sarcopenia Muscle.	6. 最初と最後の頁 in print
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcsm.12919.	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上愛子
2. 発表標題 運動トレーニングによる加齢性骨格筋機能低下および再生不全改善機序：脂肪由来アディポネクチンの役割に関して
3. 学会等名 第53回日本動脈硬化学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上愛子、孟祥坤、朴麗梅、成憲武、葛谷雅文
2. 発表標題 Deficiency of Cysteinyl Cathepsin K Suppresses the Development of Experimental Intimal Hyperplasia in Response to Chronic Stress
3. 学会等名 第30回日本老年医学会東海地方会
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
研究協力者	孟 祥坤 (Meng Xiangkun)	名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生 (13901)	
連携研究者	成 憲武 (Cheng Xian Wu) (30378228)	名古屋大学・大学院医学系研究科・特任教授 (13901)	

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