

令和 4 年 6 月 29 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22733

研究課題名(和文) Role of CD38 and NAD⁺ metabolism in macrophages during recovery of muscle after injury in aged mice研究課題名(英文) Role of CD38 and NAD⁺ metabolism in macrophages during recovery of muscle after injury in aged mice

研究代表者

NAWAZ ALLAH (Nawaz, Allah)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：80881482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD38はNAD⁺を分解する酵素であり、その発現量は老化によって増加する。また老化に伴うNAD⁺量の減少は骨格筋におけるサテライト細胞の筋芽細胞への分化を阻害することによって骨格筋修復を抑制する。そこで、本研究ではCD38の阻害がNAD⁺量の維持を介して骨格筋修復過程を改善すると仮定し研究を行った。

CD38の阻害剤はC2C12におけるNAD量を増加させ、筋芽細胞への分化を促進することを見出した。また、CD38の遺伝子欠損は老化マウスにおける骨格筋修復過程の低下を改善した。以上の結果から、CD38の阻害はNAD量の増加を介して骨格筋修復に有効であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Clinical importance of inhibition of CD38 may serve as best therapeutic tool for patients suffering from muscle wasting disorder and age-related muscle disorders. Metabolic reprogramming in immune cells or muscle stem cells could open a new field to boost the regenerative process.

研究成果の概要(英文)：CD38 is NAD⁺ consuming enzyme that degrade NAD⁺ and its expression decreases with aging. CD38 is reported to contribute to the aging-related sterile inflammation and impairs systemic insulin sensitivity in aged mice. In addition, aging-induced decline in NAD⁺ impair skeletal muscle regeneration by inhibiting muscle stem/satellite cells differentiation into myoblast and myofibers. Therefore, we hypothesized that that inhibition of CD38 would improve the skeletal muscle repair process through maintenance of NAD⁺ levels. In this study, we found that administration of 78c (CD38 inhibitor) enhances NAD⁺ levels in C2C12 myoblast and also improve differentiation of myoblasts. Further, deletion of CD38 in aged mice enhances muscle stem/satellite cells differentiation and promotes myogenesis. Taken together, we show that inhibition of CD38 improves muscle stem cell functions and ameliorates aging-related decline in muscle recovery/regeneration.

研究分野：Pharmacology

キーワード：Stem cell Immune cells Myogenesis Pharmacology

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

Muscle regeneration is a complex process and requires coordination of various cells including muscle stem/satellite cells, fibro-adipogenic progenitors (FAPs), endothelial cells, and immune cells. Immune cells (macrophages) indeed play a critical role in the muscle recovery process after injury. Macrophages are critical for regenerative process. Macrophage-derived NAMPT and glutamine are reported to interact with satellite cells and boost muscle recovery process. NAD⁺ is a key molecule regulating energy metabolism in mitochondria, and age-related loss of NAD⁺ also delayed the recovery of muscle after injury.

CD38 is an enzyme to degrade NAD⁺ and its increased expression during aging results in reduction of NAD⁺ levels. Conversely, CD38 knockout mice manifests increased NAD⁺ levels. How pharmacological or genetic blockage of CD38 affects muscle stem/satellite cells and muscle regeneration in aged mice remains unknown. Thus, I hypothesized that inhibition of CD38 in M1 macrophages are important to maintain NAD⁺ levels and energy metabolism in mitochondria. In this study, I tried to elucidate the role of CD38-positive macrophages and NAD⁺ metabolism in muscle regeneration process in aged CD38 knockout mice and metabolomics analysis.

2 . 研究の目的

To elucidate the role of CD38 and NAD⁺ metabolism in macrophages during recovery of muscle after injury in aged mice

3 . 研究の方法

In vitro and ex vivo analysis; C2C12 and primary cells were treated with 78c (CD38 inhibitor) to see its effects on differentiation of myoblast. Next, I utilized in vivo mice model to further explore role of CD38 in the regulation of muscle regeneration. Young and old CD38 KO mice were subsequently injected with cardiotoxin (CTX) to introduce the muscle injury. After CTX injection, muscles were harvested and histological analysis was performed.

4 . 研究成果

Our initial results showed that CD38 was exclusively expressed on macrophages and its expression was significantly induced by LPS administration to the bone marrow-derived macrophages. We found that NAD⁺ is required for C2C12 myoblast differentiation. CD38 is reported to degrade NAD⁺ and this reduction in NAD⁺ might affect myoblast differentiation. We treated C2C12 myoblast with 78c and found that 78c treatment significantly enhanced NAD⁺ levels in myoblast and it enhanced differentiation of myoblast into myofibers. Similarly, pharmacological inhibition of CD38 significantly enhanced NAD⁺ levels in primary myoblast and also induced differentiation of myoblast into myofibers. Gene expression analysis further confirmed significant upregulation in the expression of myogenesis-related marker genes in the 78c-treated primary myoblast. Immunofluorescence analysis further revealed significant increase in the number of MyoD⁺ cells in 78c-treated primary myoblast.

Next, I utilized CD38 KO mice and analyzed effects of genetic deletion of CD38 in cardiotoxin-induced muscle injury. Consistent with previous reports, CD38 KO manifests higher levels of NAD⁺ in both injured and healthy muscle. Next, we examined how deletion of CD38 affects the recovery process and found that genetic deletion of CD38 had minimal or no effects on myogenesis and muscle regeneration in young mice. While significant improvement in muscle regeneration was observed in aged mice (as confirmed by RT-PCR and histological analysis). We found an increased number of regenerating myofibers in the muscle of aged CD38 KO compared with their littermate control mice. Gene expression analysis revealed an upregulated expression of myogenesis-related genes including *MyoD*, and *MyoG* in the muscle of aged mice (7-day post injury).

Aging-induced decline in NAD⁺ is reported to contribute to delayed muscle regeneration. Previous reports show that aging disrupts secretion of *Wisp1* from fibro-adipogenic progenitors (FAPs) and results in impaired muscle regeneration. Interestingly, we found upregulated expression of *Wisp1* in muscle of aged CD38 KO mice, suggesting that genetic blockage of CD38 may improve functions of FAPs to secrete *Wisp1*, thereby boosting satellite cell functions and muscle regeneration. Furthermore, we found that deletion of CD38 significantly reduces fibrosis of muscle in aged mice. Our study showed that aging-induced decline in muscle regeneration can

be restored by blockage of CD38. Taken together, we show that aging-related decline in muscle stem cell functions and muscle regeneration can be rescued through inhibition of CD38.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Watanabe Yoshiyuki, Fujisaka Shiho, Ikeda Kazutaka, Ishikawa Masaki, Yamada Takahiro, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Kuwano Takahide, Nishimura Ayumi, Bilal Muhammad, Liu Jianhui, Yagi Kunimasa, Hase Koji, Tobe Kazuyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Gut microbiota, determined by dietary nutrients, drive modification of the plasma lipid profile and insulin resistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102445 ~ 102445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102445	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 該当する

1. 著者名 Kuwano Takahide, Izumi Hironori, Aslam Muhammad Rahil, Igarashi Yoshiko, Bilal Muhammad, Nishimura Ayumi, Watanabe Yoshiyuki, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Ikuta Koichi, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Fujisaka Shiho, Yagi Kunimasa, Mori Hisashi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Generation and characterization of a Meflin-CreERT2 transgenic line for lineage tracing in white adipose tissue	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0248267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0248267	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 該当する

1. 著者名 Okabe Keisuke, Nawaz Allah, Nishida Yasuhiro, Yaku Keisuke, Usui Isao, Tobe Kazuyuki, Nakagawa Takashi	4. 巻 8
2. 論文標題 NAD+ Metabolism Regulates Preadipocyte Differentiation by Enhancing -Ketoglutarate-Mediated Histone H3K9 Demethylation at the PPAR Promoter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 586179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.586179	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 該当する

1. 著者名 Ono Yosuke, Yoshino Osamu, Hiraoka Takehiro, Sato Erina, Fukui Yamato, Ushijima Akemi, Nawaz Allah, Hirota Yasushi, Wada Shinichiro, Tobe Kazuyuki, Nakashima Akitoshi, Osuga Yutaka, Saito Shigeru	4. 巻 11
2. 論文標題 CD206+ M2-Like Macrophages Are Essential for Successful Implantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 557184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.557184	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 該当する

1. 著者名 Ono Yosuke, Yoshino Osamu, Hiraoka Takehiro, Sato Erina, Furue Akiko, Nawaz Allah, Hatta Hideki, Fukushi Yoshiyuki, Wada Shinichiro, Tobe Kazuyuki, Hirota Yasushi, Osuga Yutaka, Unno Nobuya, Saito Shigeru	4. 巻 11
2. 論文標題 CD206+ macrophage is an accelerator of endometriotic-like lesion via promoting angiogenesis in the endometriosis mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79578-3	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 該当する

1. 著者名 Alam Mir Waqas, Islam Bhat Shahidul, Al Qahtani Hassan S., Aamir Muhammad, Amin Muhammad Nasir, Farhan Mohd, Aldabal Sara, Khan Muhammad Shuaib, Jeelani Ishtiaq, Nawaz Allah, Souayah Basma	4. 巻 14
2. 論文標題 Recent Progress, Challenges, and Trends in Polymer-Based Sensors: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 2164 ~ 2164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym14112164	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 Alam Mir Waqas, Najeed Jawayria, Naeem Sumaira, Usman Sheikh Muhammad, Nahvi Insha, Alismail Fai, Abuzir Alaaedeen, Farhan Mohd, Nawaz Allah	4. 巻 11
2. 論文標題 Electrochemical Methodologies for Investigating the Antioxidant Potential of Plant and Fruit Extracts: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11061205	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 Nawaz Allah, Nishida Yasuhiro, Takikawa Akiko, Fujisaka Shiho, Kado Tomonobu, Aminuddin Aminuddin, Bilal Muhammad, Jeelani Ishtiaq, Aslam Muhammad Rahil, Nishimura A, Kuwano T, Watanabe Y, Igarashi Yoshiko, Okabe Keisuke, Ahmed Saeed, Manzoor Azhar, Usui Isao, Yagi Kunimasa, Nakagawa Takashi, Tobe Kazuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Astaxanthin, a Marine Carotenoid, Maintains the Tolerance and Integrity of Adipose Tissue and Contributes to Its Healthy Functions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 4374 ~ 4374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu13124374	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 Nishida Yasuhiro, Nawaz Allah, Hecht Karen, Tobe Kazuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Astaxanthin as a Novel Mitochondrial Regulator: A New Aspect of Carotenoids, beyond Antioxidants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 107 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu14010107	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 Bilal Muhammad, Nawaz Allah, Kado Tomonobu, Aslam Muhammad Rahil, Igarashi Yoshiko, Nishimura Ayumi, Watanabe Yoshiyuki, Kuwano Takahide, Liu Jianhui, Miwa Hiroyuki, Era Takumi, Ikuta Koichi, Imura Johji, Yagi Kunimasa, Nakagawa Takashi, Fujisaka Shiho, Tobe Kazuyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Fate of adipocyte progenitors during adipogenesis in mice fed a high-fat diet	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101328 ~ 101328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101328	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 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Nawaz A, Nakagawa T, Tobe K.
2. 発表標題 Depletion of CD206 M2-like macrophages induces adipocyte progenitors proliferation and promotes insulin sensitivity
3. 学会等名 2020年度富山大学杉谷地区第2回基礎・C-CAM・臨床研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nawaz A, Nishida Y, Nakagawa T, Tobe K.
2. 発表標題 Astaxanthin ameliorate insulin resistance in skeletal muscle of obese mice via activation of the AMPK pathway.
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Carotenoids (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nawaz A, Nishida Y, Kado T, Bilal M, Okabe K, Watanabe Y, Nishimura A, Igarashi I, Kuwano T, Liu J, Yagi K, Fujisaka S, Nakagawa T, Tobe K.
2. 発表標題 Physiological role of M2-macrophages in adipose tissue and muscle.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nawaz A, Kado T, Bilal M, Okabe K, Watanabe Y, Aslam MR, Nishimura A, Igarashi Y, Kuwano T, Liu J, Yagi K, Fujisaka S, Nakagawa T, Tobe K.
2. 発表標題 Regulatory mechanisms between macrophages and Fibro-adipogenic progenitors during muscle recovery.
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nawaz A, Kado T, Bilal M, Okabe K, Watanabe Y, Aslam MR, Nishimura A, Igarashi Y, Kuwano T, Liu J, Yagi K, Fujisaka S, Nakagawa T, Tobe K.
2. 発表標題 Depletion of CD206 M2-like macrophages ameliorates insulin resistance.
3. 学会等名 第41回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nawaz A, Nakagawa T, Tobe K
2. 発表標題 Role of adipose tissue-resident macrophages in the regulation of adipocyte and fibro-adipogenic progenitors.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nawaz A, Nakagawa T, Tobe K
2. 発表標題 Role of adipose tissue-resident macrophages in the regulation of adipocyte and fibro-adipogenic progenitors
3. 学会等名 第42回日本肥満学会・第38回日本肥満症治療学会
4. 発表年 2022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