

平成 29 年 10 月 24 日

骨格筋再生・修復の新たな分子メカニズム解明と治療応用 ーカテプシンK 抑制剤への期待ー

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松 健治）地域在宅医療学・老年科学の小笠原真雄（おがさわら しんゆう）大学院生、名古屋大学未来社会創造機構モビリティ部門人間・加齢特性グループの成 憲武（せい けんぶ）特任准教授、葛谷 雅文（くずや まさふみ）教授らの研究チームは、実験動物モデルを解析して、骨格筋再生・修復におけるカテプシンK（cathepsin K）^{※1}の役割およびその機序を明らかにしました。

カテプシンKは、リソソーム^{※2}でスカベンジャー^{※3}として働くシステイン・プロテアーゼ^{※4}のひとつであり、これまで心血管系において、カテプシンKが細胞増殖、線維化と組織リモデリングへ関与することが報告されていますが、骨格筋におけるカテプシンKの役割は、全く明らかになっていません。本研究では、骨格筋細胞アポトーシス^{※5}と炎症反応におけるカテプシンKの役割に着目し、ヘビ毒による骨格筋障害モデルを用いて機序解明を目指しました。

また、加齢による骨格筋疾患（サルコペニア^{※6}）は、骨格筋タンパクの合成と分解のアンバランスや筋肉修復機能低下などが生じることより発症すると考えられますが、その詳細に関して多くは不明です。サルコペニアには、骨格筋障害を伴っていることがしばしばあり、治療にはプロテアーゼ介入へのアプローチが必要です。そこで、研究チームは、カテプシンK遺伝子欠損あるいは選択的なカテプシンK阻害剤投与が、骨格筋障害モデルにおいて、骨格筋保護効果を果たすかを検討しました。その結果、カテプシンK活性の抑制が骨格筋アポトーシスならびに炎症を抑制することを介して、優れた治療効果を示すことを世界で初めて見出しました。

本研究結果により、カテプシンKを遺伝学的/薬理的に抑制することで、障害による再生・修復およびその機能低下の改善効果について、その仕組みが明らかになり、加齢に伴うサルコペニアなどの骨格筋疾患発症メカニズムの解明及び治療法の開発が進むものと期待します。

本研究成果は、「Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle」（米国時間 2017 年 10 月 23 日付の電子版）に掲載されました。

骨格筋再生・修復の新たな分子メカニズム解明と治療応用 ーカテプシンK 抑制剤への期待ー

ポイント

- 骨格筋再生・修復におけるカテプシンKの役割およびその機序に関して、ヘビ毒による筋肉障害モデルを用いて解明しました。
- 損傷された骨格筋細胞ならびに骨格筋組織におけるカテプシンK発現と活性増加（数十倍）、骨格筋アポトーシスと炎症反応の亢進、骨格筋リモデリング、線維化および運動機能低下が認められました。
- カテプシンK遺伝子欠損あるいは選択的な阻害薬（ONO-KK1-300-01）の投与は、骨格筋アポトーシスと炎症細胞浸潤、骨格筋リモデリング、線維化および運動機能低下を有意に改善させました。
- 本研究により、骨格筋障害を伴う骨格筋疾患（サルコペニアを含む）へのカテプシンKを標的とした新たな治療戦略の可能性が示されました。

1. 背景

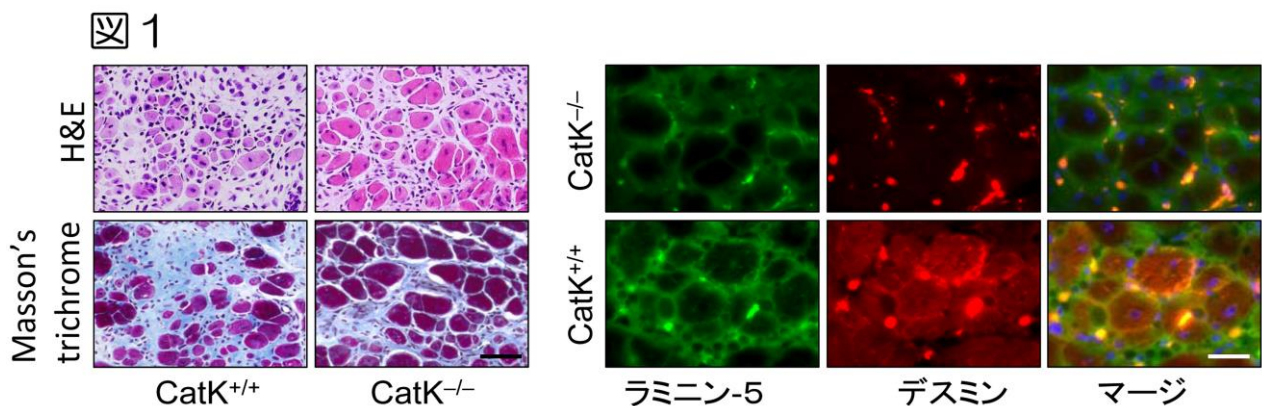
近年、高齢化社会が進むにつれて、サルコペニアやフレイルなどの骨格筋疾患による運動機能の低下と転倒によるADL（日常生活動作）の低下が問題視されています。そのため、高齢者の活動性を維持するためには骨格筋疾患の治療が重要です。さらに、骨格筋疾患には骨格筋障害を伴っていることが多く、治療には骨格筋障害へのアプローチが必要です。骨格筋リモデリングと再生の低下には、筋サテライト細胞^{※7}の機能不全、炎症性サイトカイン^{※8}の影響、そして、蛋白質分解システムの影響など様々な要因が関わっています。蛋白質分解システムの中では、従来より、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)^{※9}の関与が報告されていますが、MMPを阻害するだけでは骨格筋リモデリングと再生は不十分であり、他のシステイン・プロテアーゼであるカテプシン・ファミリーの関与が考えられています。

近年、本研究グループは、カテプシン・ファミリー中のカテプシンKが、動脈硬化病変で高発現を示し、プラーク破綻に関与することを明らかにしました。また、心筋におけるカテプシンの研究を行い、不全期心筋におけるカテプシンKの高発現や培養心筋細胞でのカテプシンKの細胞増殖への関与を明らかにしました。さらに、Notch1^{※10}活性化への関与および血管新生における役割も明らかにしました。最近、これらのカテプシンの細胞・分子レベルでの研究動向をまとめる中で、障害による筋肉リモデリングならびに再生におけるカテプシンKの関与について、全く検討がなされていないことが見いだされました。そこで、筋障害後の骨格筋細胞アポトーシスと炎症反応におけるカテプシンKの役割に着目し、ヘビ毒による骨格筋障害モデルを用いて解明を目指しました。

2. 研究成果

研究チームは、まず野生型マウスの片側下肢骨格筋にヘビ毒を注射し、骨格筋障害モデルを作成後、カテプシン・ファミリーの遺伝子発現レベルの変化を解析しました。その結果、非障害群骨格筋と比べて、障害骨格筋ではカテプシンKが数十倍にも増加することを発見しました。

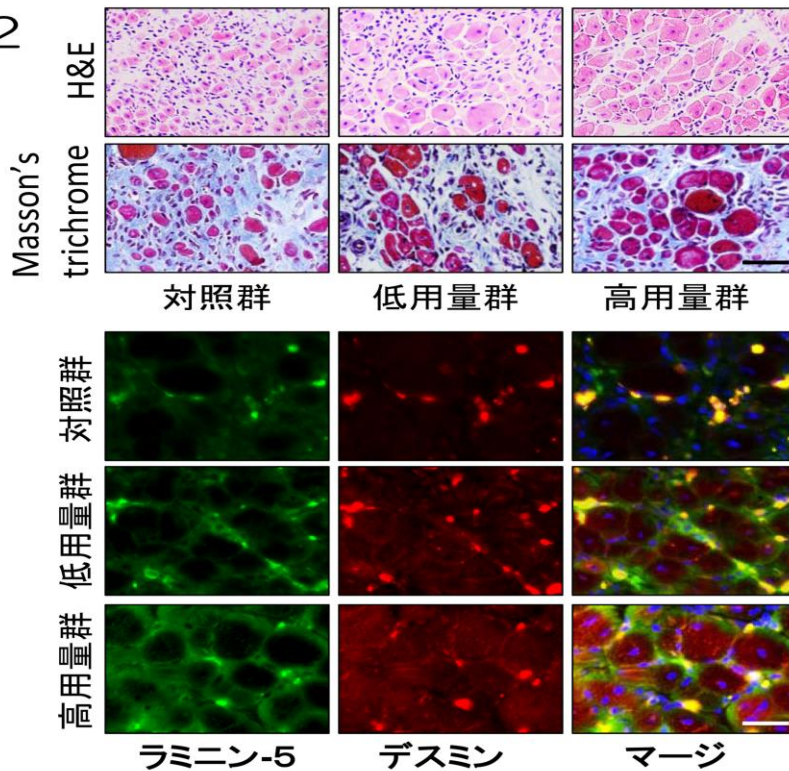
次に、野生型マウスとカテプシンK遺伝子欠損マウスそれぞれに片側下肢骨格筋障害モデルを作成し、経時的（3日目と14日目）に運動能測定後、骨格筋を採集し、生化学ならびに組織学的検討を行いました。障害後3日目におけるアポトーシスと炎症反応に着目し、解析を行ったところ、カテプシンK遺伝子欠損マウスにおいてアポトーシス因子（活性型カスパーゼ-3^{*11}/プロカスパーゼ-3比、活性型カスパーゼ-8^{*11}とBAX^{*12}/Bcl-2^{*13}比）低下によるタネル^{*14}陽性細胞の有意な低下が認められました。また、炎症促進因子である単球走化性タンパク質-1（MCP-1）^{*15}、Toll様受容体-2（TLR-2）^{*16}、Toll様受容体4（TLR-4）^{*16}と腫瘍壊死因子- α （TNF- α ）^{*17}の発現低下による炎症性マクロファージ（CD68陽性細胞）^{*18}や白血球細胞（CD45陽性細胞）浸潤が有意に低下しました。さらに、主に炎症性細胞から分泌されるとするマトリックスメタロプロテアーゼ-2（Matrix metalloproteinase：MMP-2）ならびにMMP-9^{*19}発現と活性の低下も認められました。障害後14日目、カテプシンK遺伝子欠損マウスにおいて骨格筋線維断面積、間質の線維化とラミニン-5（Laminin-5）/デスミン（Desmin）^{*20}タンパク質発現（図1参照：左；H/E染色、Masson Trichrome染色^{*21}、右；Laminin5/Desmin蛍光2重染色）の改善が認められるとともに、握力やトレッドミル下の運動機能の有意な保持が示されました。



野生型 (CatK^{+/+}) と CatK 遺伝子欠損 (CatK^{-/-}) マウスへヒビ毒を注射した障害骨格筋の比較
 左上；ヘマトキシリン/エオシン (H/E) 染色；
 左下；マッソントリクローム (Masson's Trichrome) 染色；
 右；ラミニン-5/デスミン蛍光2重蛍光染色

次に、野生型マウスに選択的カテプシンK阻害剤（ONO-KK1-300-1）を投与（低用量群：6mg/kg/day；高用量群：60mg/kg/day）し、比較検討を行いました。投与3日目、非投与群と比較し、障害筋肉における上記のアポトーシス因子レベル、炎症性サイトカイン、TLR-2/-4、骨格筋細胞アポトーシスならびに炎症性細胞浸潤の用量依存的な改善が認められました。投与14日目には、骨格筋線断面積、間質線維化とLaminin / Desminタンパク質発現も容量依存的な改善効果が示されました（図2参照：左；H/E染色、Masson Trichrome染色、右；Laminin5/Desmin蛍光2重染色）。さらに、障害骨格筋の運動量保持も確認することができました。

図2

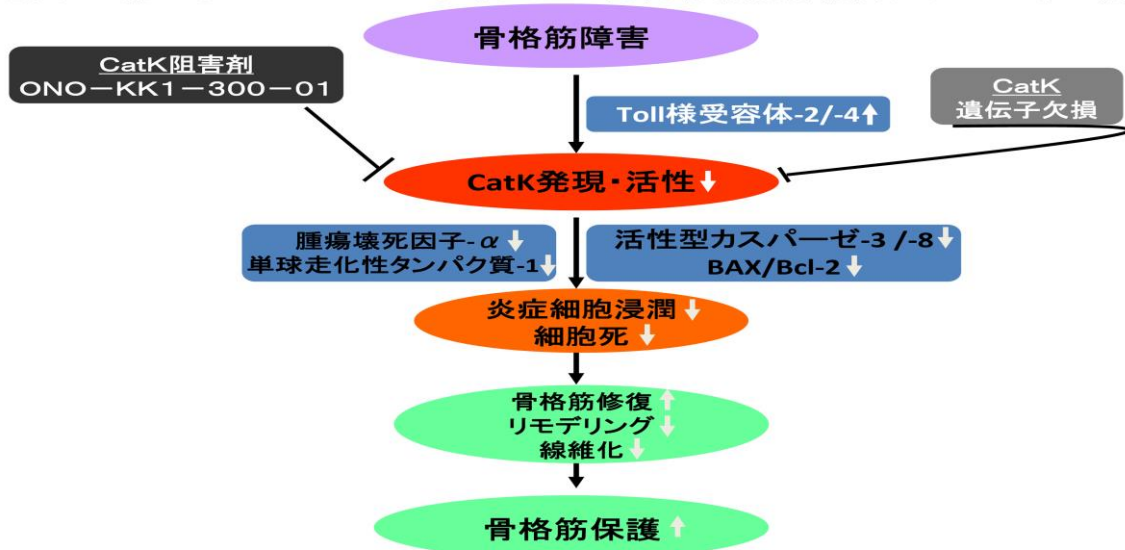


野生型マウスにおける選択的CatK阻害剤投与と非投与群の比較検討
上; H / E染色とマッソントリクローム染色、下; ラミニン5 / デスミン蛍光2重染色

最後に、筋芽細胞を骨格筋細胞へ分化させた後、ヘビ毒を添加したところ、カテプシンKの上昇と TUNEL 染色にて細胞死の増加を認めました。また、カテプシンK阻害剤の前処置によりカスパーゼ-3 と BAX 発現レベルの低下とともに、成熟した骨格筋細胞のアポトーシスが著明に低下しました。

図3

遺伝的/薬理的カテプシンK阻害による障害骨格筋保護作用およびその機序



小笠原真雄、成憲武、葛谷雅文. JCSM 2017

遺伝子/薬理的カテプシンK阻害による障害骨格筋保護作用及びその機序 (※ CatK : カテプシンK)

今回の研究により、カテプシンK活性を調整することが、炎症および細胞死の低下を介して骨格筋のリモデリングや線維化を抑制することができるものと考えられました(図3)。そのため、今後、カテプシンKの調節が骨格筋疾患の治療のための新たな治療戦略になる可能性が示唆されました。

3. 今後の展開

本研究結果により、骨格筋再生・修復においてカテプシンK活性を調整することによって、炎症およびアポトーシスの抑制を介して、骨格筋リモデリングや線維化を抑制することができ、また、運動機能を保持することができるものと考えられます。そのため、高度な炎症やアポトーシスを伴う骨格筋障害を有する骨格筋疾患(サルコペニアやフレイル)への新たな治療戦略として、カテプシンKを新たな標的とした治療の開発が進むものと期待されます。その研究成果を臨床実践にフィードバックし、高齢化現代社会における健康寿命延長に貢献いたします。

4. 用語説明

※1 カテプシンK (cathepsin K)

カテプシンKは、破骨細胞から分泌されるシステイン・プロテアーゼで、骨再吸収時に活性化され、骨のコラーゲンマトリックスの分解に関与すると知られていた。しかし、最近では、破骨細胞以外の心血管細胞や炎症からも分泌され、多くの組織リモデリングに関与していることが明らかになった。

※2 リソソーム (lysosome)

リソソームは、真核生物が持つ細胞小器官の一つである。生体膜につつまれた構造体で細胞内消化の場である。内部に加水分解酵素を持ち、エンドサイトーシスやオートファジーによって膜内に取り込まれた生体高分子はここで加水分解される。分解された物体のうち有用なものは細胞質に吸収される。

※3 スカベンジャー (scavenger)

スカベンジャーとは、体内の不要物質や毒性物質を処理する器官・細胞・物質などを指す。

※4 システイン・プロテアーゼ (cysteine protease)

システイン・プロテアーゼは、触媒部位において、システインのチオール基を求核基として用いるタンパク質分解酵素である。

※5 アポトーシス (apoptosis)

アポトーシス、アポプトーシスは、多細胞生物の体を構成する細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされる管理・調節された細胞の自殺、すなわち、プログラムされた細胞死(狭義には、その中のカスパーゼに依存する型)のこと。

※6 サルコペニア

進行性、漸新世の骨格筋量および骨格筋力の低下を特徴とする症候群。原因としては加齢に伴う筋肉減少症をはじめとし、低栄養状態、寝たきりなどの活動性の低下、心不全や腎不全などの臓器障害、炎症疾患や悪性腫瘍などがあげられる。

※7 筋サテライト細胞 (muscle satellite cells)

サテライト細胞は、筋の細胞膜間に存在する未分化の幹細胞のこと。通常、サテライト細胞は休止状態だが、筋肉が激しく使われ損傷した時に活性化され、細胞周期に入り、分裂、分化し、既存の筋細胞に融合して筋肉を肥大させる。

※8 炎症性サイトカイン (inflammatory cytokine)

炎症の病態形成に関与しているサイトカインを炎症性サイトカインと呼ぶ。これらの多くは単球/マクロファージ系の細胞によって産生されるが、繊維芽細胞、血管内皮細胞などの組織間質を構成する細胞や、炎症の過程において浸潤する好中球からも産生される。感染など炎症が起こったとき、好中球などの炎症細胞浸潤が起こる。

※9 マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase)

MMP は、タンパク分解酵素の一群であり、コラーゲンやプロテオグリカン、エラスチンなどから成る細胞外マトリックスを分解し、様々な炎症性疾患の組織破壊に関与していることが分かっている。ただ細胞外マトリックスの分解だけではなく、サイトカインなどの生理活性ペプチドの活性化など様々な生理現象にも関与している。

※10 Notch1

Notch-1 は 300kDa の type I 膜貫通型糖タンパク質で translocation-associated notch protein (TAN-1) としても知られている。おもに、血管申請で重要な役割を果たしていると報告されている。

※11 カスパーゼ-3 (Caspase-3) とカスパーゼ-8 (Caspase-8)

カスパーゼとは、細胞に死 (アポトーシス) を起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群のシステイン・プロテアーゼである。それぞれのカスパーゼは、種々の刺激や上流のカスパーゼにより活性化し、アポトーシスを誘導していく。カスパーゼ-8 はアポトーシス経路の上流に位置し、アポトーシスの誘導に関与しており、カスパーゼ-3 はアポトーシス経路の下流に位置し、アポトーシスの実行そのものに関与している。

※12 Bcl-2 結合 X タンパク (bcl-2-associated X protein : BAX)

BAX は抗アポトーシスタンパクである Bcl-2 のパートナーとして同定されたタンパク質であり、ミトコンドリアのアポトーシス経路において外膜透過性を亢進させることによりアポトーシスを誘導する。

※13 Bcl-2 (b-cell leukemia/lymphoma 2 protein : Bcl-2)

Bcl-2 タンパク質の主要機能は、ミトコンドリアにおけるアポトーシスの制御である。アポトーシスを引き起こす刺激はミトコンドリアの膜透過性を亢進させ、ミトコンドリアの内膜と外膜の間に局在するアポトーシス誘導タンパク質を細胞外へと流出させるが、Bcl-2 タンパク質は主にミトコンドリアの膜透過性を制御し、これらのアポトーシス誘導タンパク質の細胞質への流出を抑制する。

※14 タネル (TdT-mediated dUTP nick end labeling : TUNEL) 染色

細胞アポトーシスの過程で生じる断片化した DNA を検出する蛍光染色法。

※15 単球走化性タンパク質-1 (monocyte chemoattractant protein-1 : MCP-1)

MCP-1 は、単球の走化性因子であり、単球に対する作用は走化性の亢進ばかりでなく、ライソゾーム酵素や活性酸素の放出亢進、抗腫瘍活性の増強、IL-1 および IL-6 の産生誘導など、単球活性化因子としての役割も持っている。これまでの研究成果から MCP-1 は各種炎症性疾患において単球および T 細胞の組織浸潤に関与すると考えられている。

※16 Toll 様受容-2 と-4 (toll like receptor-2/-4 : TLR-2/-4)

Toll 様受容体は、動物の細胞表面にある受容体タンパク質であり、種々の病原体を感知して自然免疫を作動させる機能をもつ。TLR は哺乳動物では 10 から 15 種類確認されており、そのうちの 2 つが TLR-2 と TLR-4 であり、活性化された TLR はインターフェロン (INF) - α 、INF- β またはインターロイキン (IL)-1、IL-6 などサイトカインを誘導することで炎症を引き起こす。

※17 腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α)

TNF- α はサイトカインの 1 種であり、主にマクロファージにより産生される。生理活性として細胞接着分子の発現やアポトーシスの誘導、炎症メディエーター (IL-1、IL-6、プロスタグランジン E2 など) や形質細胞による抗体産生の亢進を行うことにより感染防御や抗腫瘍作用に関与するが、過剰な発現は生体に異常な炎症性疾患の発症を招くことがある。

※18 炎症性マクロファージ

動物の組織内に分布する大型のアメーバ細胞。生体内に浸潤した細菌などの異物を捕らえて細胞内で消化する、炎症物質を産生し組織炎症を惹起する、それらの異物に抵抗するための免疫情報をリンパ球に伝えるなど多彩な機能を有する細胞。別名 : 大食い細胞、貪食細胞。

※19 マトリックスメタロプロテアーゼ-2/-9 (matrix metalloproteinase-2/-9 : MMP-2-9)

MMP はタンパク分解酵素の一群であり、コラーゲンやプロテオグリカン、エラスチンなどから成る細胞外マトリックスを分解し、様々な炎症性疾患の組織破壊に関与していることが分かっている。ただ細胞外マトリックスの分解だけではなく、サイトカインなどの生理活性ペプチドの活性化など様々な生理現象にも関与している。MMP-2 や MMP-9 は浸潤した

炎症細胞や好中球、マクロファージより産生される。

※20 ラミニン (laminin) およびデスミン (desmin)

Laminin は細胞外マトリックスの基底膜を構成する巨大なタンパク質であり、Desmin は動物の筋肉組織中に見られる、細胞骨格を構成するタンパク質の1種である。

※21 Masson Trichrome 染色

マッソントリクローム染色は、膠原線維を選択的に染めることで、アザン染色と同じ目的である膠原線維と筋線維を染め分ける特徴をもつ。

5. 本研究について

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号 15H04801、15H04802、15K15270 と 26-D-Dk21）の支援を受けて行われました。

6. 発表雑誌

Shinyu Ogasawara, Xian Wu Cheng, Aiko Inoue, Lina Hu, Limei Piao, Chenglin Yu, Hiroki Goto, Wenhui Xu, Guangxian Zhao, Yanna Lei, Guang Yang, Kaoru Kimura, Hiroyuki Umegaki, Guo-Ping Shi, Masafumi Kuzuya.

Cathepsin K Activity Controls Cardiotoxin-Induced Skeletal Muscle Repair in Mice.

Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle (2017年10月23日付の電子版に掲載)

DOI:10.1002/jcsm.12248

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Journal_of_C_20171024en.pdf