

令和4年3月1日

熊本大学
科学技術振興機構 (JST)

不活動や糖尿病による筋萎縮のメカニズムを解明 ～血管の意外な機能と創薬への期待～

(ポイント)

- 不活動（運動不足，低活動，活動量低下）や糖尿病の状態では，血管からDII4^{*1}が放出され，筋線維のNotch2受容体^{*2}を活性化させることで筋量の減少（筋萎縮）が誘導されるメカニズムを発見しました。
- この「DII4－Notch2 軸」の働きを抑えると，不活動や糖尿病による筋萎縮を顕著に改善できること，さらに，過負荷による筋量の増大（筋肥大）を促進できることを見出しました。
- 本研究成果は，加齢や慢性疾患にともなうサルコペニア^{*3}やフレイル^{*4}に対する予防治療法の開発に貢献します。

(概要説明)

熊本大学発生医学研究所の藤巻慎助教，小野悠介准教授の研究グループは，同大学の生命資源研究・支援センター，国際先端医学研究機構，生命科学研究部及び長崎大学，京都府立大学，ミネソタ大学との共同研究により，骨格筋（筋肉）の萎縮に関する重要なメカニズムを発見しました。

我が国をはじめ世界的に急速な高齢化が進行しており，それにともない増加するサルコペニアやフレイルが社会問題となっています。この問題を解決し健康長寿社会を実現するためには，筋萎縮を抑え生涯にわたって筋量を維持することが重要です。しかし筋萎縮を引き起こす上流のメカニズムについてはほとんどわかっていませんでした。

筋組織は，多くの筋線維の束で構成され，個々の筋線維間には毛細血管がくまなく分布し酸素や栄養を供給しています。本研究では，毛細血管は輸送媒体としての機能に加え，筋萎縮を引き起こすカギを握っていることを見出しました。具体的な仕組みは，不活動あるいは糖尿病などの状態下では，毛細血管から DII4 が放出され，それが筋線維の Notch2 受容体を活性化することで筋萎縮が誘導されるというものです。この「DII4－Notch2 軸」の働きを減弱させると，不活動や糖尿病による筋萎縮を抑制できることに加え，過負荷による筋肥大を促進することがわかりました。「DII4－Notch2 軸」は筋萎縮を誘導するための重要な上流メカニズムとなり，サルコペニアやフレイルに対する有望な予防治療標的になると考えられます（概要図）。

本研究成果は、英国科学誌の「Nature Metabolism」に令和4年2月28日（英国現地時間）に掲載されます。

（説明）

[背景]

超高齢社会を迎えた我が国では、深刻な労働力不足と医療・介護費の増加が避けられません。そのため、平均寿命と健康寿命の差を埋め、より長く健康に活躍できる社会の基盤構築が急務の課題となっています。加齢にともなう筋量・筋力の低下であるサルコペニアの発症を予防するためには、定期的な運動や適切な栄養摂取が必要です。しかし、現代社会では身体活動量が激減し、さらに、筋量減少を加速する糖尿病も増加の一途を辿っています。サルコペニアは「筋力が劣り転倒骨折からの長期の入院生活（不活動）→不活動によるフレイルの発症・進行→抜け出せない介護生活」という負のスパイラルの入り口となります。高齢化は世界的にも進んでいることから、筋萎縮に関する論文数は近年急増しています。しかしながら、筋萎縮の予防治療法開発の標的となる上流の分子メカニズムについては、ほとんど明らかになっていません。

[研究の成果]

Notchシグナル^{*5}は、リガンド^{*6}を発現する細胞が受容体を発現する細胞に接触することで活性化される、進化的によく保存された細胞間接触シグナルの1つです。哺乳類ではNotch受容体は4種類（Notch1～4）、リガンドは5種類（Jag1, Jag2, Dll1, Dll3, Dll4）存在します。本研究グループは過去に骨格筋の組織幹細胞であるサテライト細胞^{*7}におけるNotch2の機能解明に取り組みました（Fujimaki et al., Stem Cells 2018）。その後の解析により、Notch2はサテライト細胞のみならず、分化成熟した筋線維にも発現していることがわかりました。筋線維に発現するNotch2の機能を明らかにするために筋線維特異的に活性型Notch2をマウスに強制発現させたところ、筋萎縮が認められました。逆に、筋線維特異的にNotch2を欠損させたマウスを解析したところ、不活動や糖尿病にともなう筋萎縮が顕著に抑制されることを観察しました（図1）。

次に、筋萎縮の上流メカニズムとして、筋線維のNotch2を活性化させるリガンドの同定に取り組みました。5種類のNotchリガンド組換えタンパク質を培養皿にそれぞれ固相化し、マウス骨格筋から単離した単一筋線維をその上に撒いて、培養上でNotchリガンドと筋線維を接触させました。その結果、Dll4と接触した筋線維のみがNotch2の活性化を介して萎縮を呈することがわかりました。

先行研究より、筋組織内でDll4を発現する細胞種は、毛細血管を構成する内皮細胞のみであることが報告されています。本研究グループはそれに加えて、シングル核RNAシーケンス解析^{*8}や免疫組織化学解析により、筋萎縮が生じる条件下では、内皮細胞のDll4発現レベルが増加することを確認しました（図2）。Notchシグナルはリガンドを発現する細胞と受容体を発現する細胞の細胞間接触が重要です。しかし、電子顕微鏡下では内皮細胞と筋線維が直接的に接触する様子は観察できませんでした。そこで免疫電子顕微鏡解析によりDll4の局在を調べたところ、Dll4は内皮細胞と筋線維の間質に存在

していることを見出しました。この観察像から、筋萎縮が誘導される状況において内皮細胞はDil4を放出することで、細胞間接触を介さずに遠隔から筋線維のNotch2を活性化させるのではないかと仮説を立てました。

この仮説を検証するために、マウスの初代培養内皮細胞と単一筋線維の非接触型共培養モデルを新たに確立しました。そのモデルを用いて、内皮細胞はDil4を放出し、細胞間の接触なしに筋線維のNotch2を活性化させ、筋萎縮を誘導することを証明しました。この機序はヒト培養細胞においても確認できました。なお、放出されたDil4は細胞外小胞 (EVs) ^{※9}には含まれておらず、可溶性画分にのみ検出されました。

最後に、Dil4が筋萎縮の上流メカニズムとして創薬標的になりうるのかを検証するために、Dil4阻害による筋萎縮抑制効果をマウス個体レベルで評価しました。その結果、内皮細胞特異的にDil4を減少させた遺伝子改変マウス、Dil4阻害剤またはDil4中和抗体を投与したマウスは、不活動や糖尿病による筋萎縮を効果的に予防することがわかりました (図3)。興味深いことに、Dil4の阻害は筋萎縮を抑制するのみならず、筋力トレーニングを模倣した過負荷刺激モデルによる筋肥大を促進しました。以上の所見から、Dil4は筋萎縮を促進し、筋肥大を抑制することから、Dil4の阻害は創薬標的として有望であることが示唆されました。

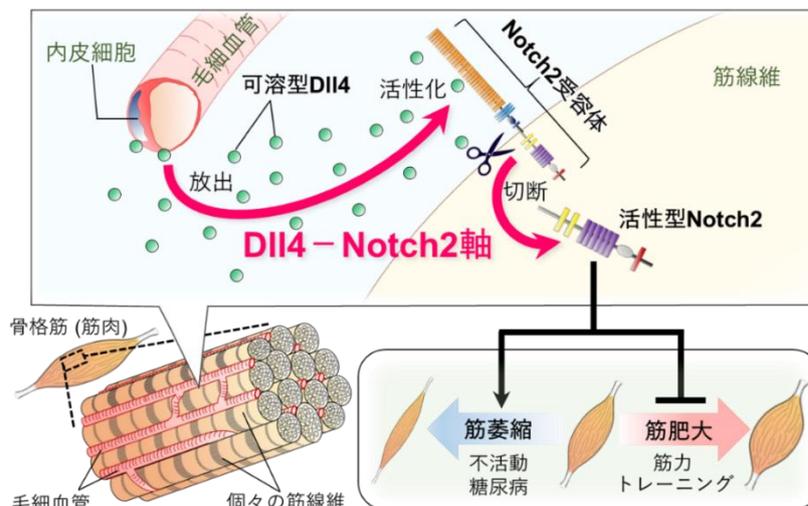
本研究では、筋線維に発現するNotch2受容体が血管から放出されるDil4によって活性化される「Dil4-Notch2軸」を見出し、この軸が不活動と糖尿病という異なる要因により誘発される筋萎縮の共通した上流メカニズムになることを明らかにしました。

[展開]

筋萎縮に対する予防治療薬の開発において「Dil4-Notch2軸」は魅力的な標的になると考えられます。たとえば、転倒骨折から入院したケースでは、Dil4-Notch2軸の働きを減弱させることで、寝たきりによる筋萎縮を予防し、リハビリ期間にも効果的な筋量の回復を望むことができるかもしれません。特に、糖尿病を患っている場合は、より治療効果を楽しむ可能性が高まります。サルコペニアやフレイルに対してもDil4-Notch2軸が創薬標的になりうるのか、今後検証していきます (図4)。

本研究から、血管は末梢組織に酸素や栄養を運ぶ単なる輸送媒体ではなく、筋量を直接制御するというこれまで全く知られていなかった機能を有することが明らかになりました。血管は全身の組織・臓器にくまなく分布することから、内皮細胞が放出するDil4は、筋萎縮の上流メカニズムに留まらず、さまざまな組織・臓器の疾患発症に広く関与している可能性もあります。

[図]



概要図．筋萎縮の上流メカニズムとしてDll4-Notch2軸を同定．血管内皮細胞から放出される可溶性のDll4は筋線維の細胞膜に発現するNotch2受容体を活性化する．「Dll4-Notch2軸」は，筋萎縮を誘導し，筋肥大を抑制する．

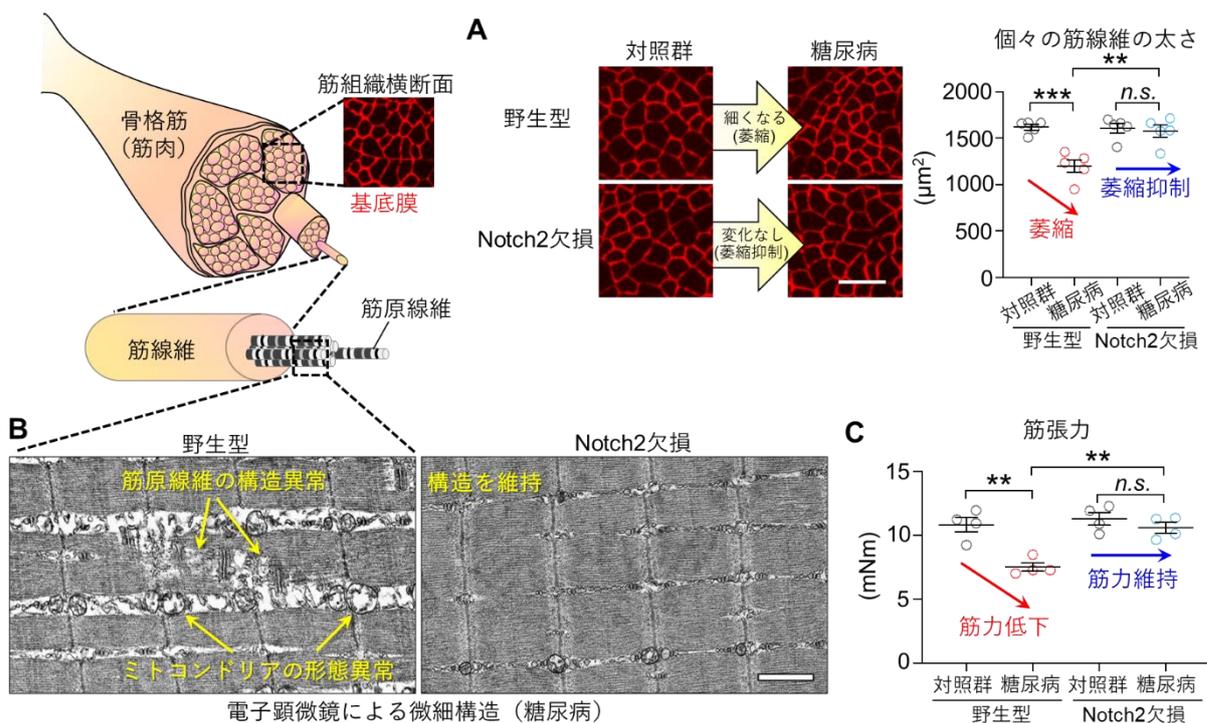


図 1. Notch2は糖尿病による筋萎縮誘導に必須である．野生型マウスと比較し，筋線維特異的Notch2欠損マウスはストレプトゾチン投与による糖尿病性筋萎縮に対して抵抗性を示す．(A) 前脛骨筋組織（横断面）の免疫染色像と筋線維横断面積の定量（筋線維を取り囲む基底膜を赤蛍光で染色し個々の筋線維の太さを可視化）．(B) 糖尿病マウス筋組織の電子顕微鏡像：野生型マウスでは構造異常がみられるが，Notch2欠損マウスでは観察されな

い（矢印：筋ミトコンドリアの形態異常および筋原線維の構造異常）。

(C) 前脛骨筋の筋張力：糖尿病により野生型マウスの筋張力は低下するが Notch2欠損マウスでは変化しない。スケールバー：100 μm (A), 1 μm (B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

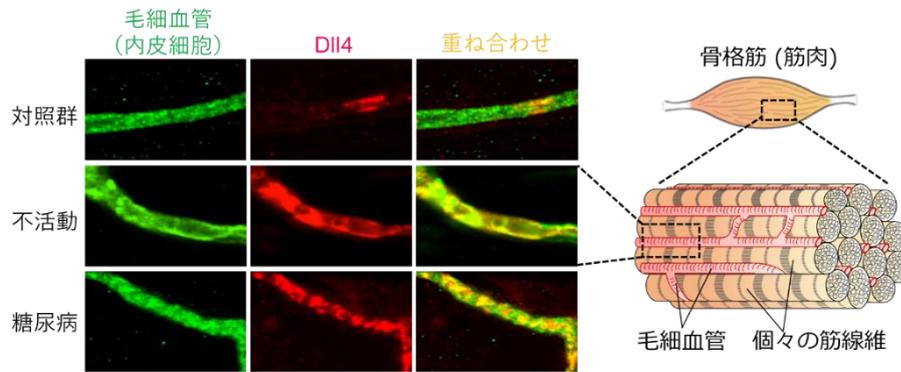


図 2. 筋組織（縦断面）における Dll4 の免疫染色像。不活動や糖尿病などの筋萎縮誘導条件下に毛細血管を構成する内皮細胞（緑）は Dll4（赤）を発現増加させる。スケールバー：20 μm 。

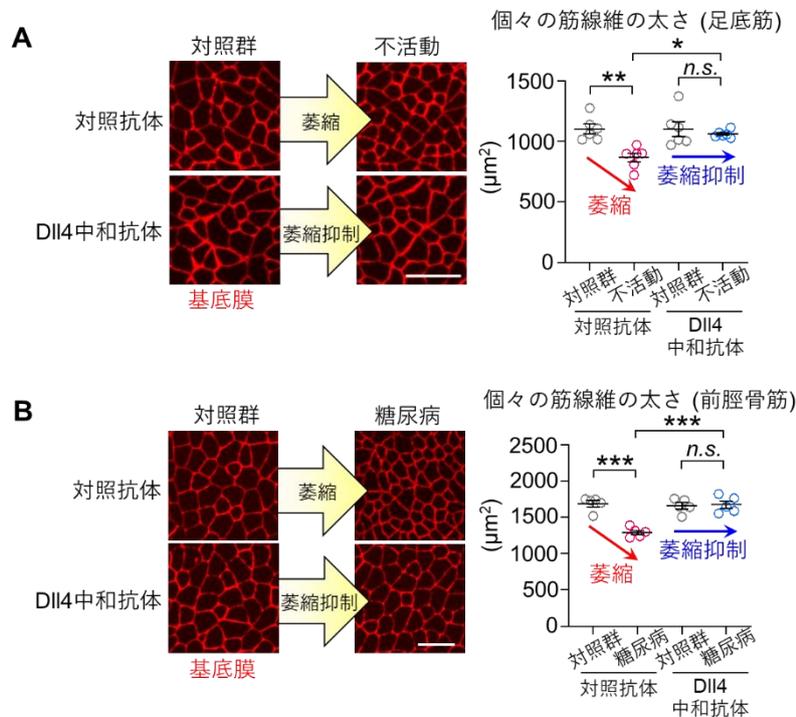


図 3. Dll4 中和抗体投与による筋萎縮予防効果の検証。マウスへの Dll4 中和抗体投与により Dll4 の働きを減弱させると、不活動性筋萎縮 (A) および糖尿病性筋萎縮 (B) を抑制できる。スケールバー：100 μm (A,B). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

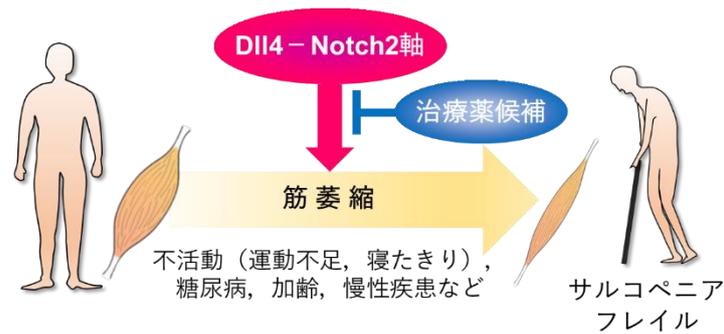


図 4. 展望：DII4－Notch2軸を標的にしたサルコペニア・フレイルの予防治療戦略

[特記事項]

本研究は，国立研究開発法人 科学技術振興機構 創発的研究支援事業「骨格筋維持システムの解明と健康長寿戦略の創出 (JST, JPMJFR205C)」，国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム (JP19bm0704036)，独立行政法人 日本学術振興会 科学研究費助成事業 (25882024, 15H05368, 18H03193, 20K21763, 20K19641, 20J01669)，武田科学振興財団，上原記念生命科学財団，内藤記念科学振興財団の助成を受けて実施されました。

[用語解説]

- * 1. DII4 (Delta-like ligand 4)：膜貫通タンパク質で Notch 受容体を活性化するリガンドの 1 つ。主に血管内皮細胞に発現する。
- * 2. Notch2 受容体：Notch 受容体の 1 つ。隣接した細胞間の接触シグナルに関与し細胞の分化や増殖などの運命決定を制御する。
- * 3. サルコペニア：加齢にともなう筋量・筋力の低下。
- * 4. フレイル：身体の予備機能が低下し健康障害を招きやすい状態。サルコペニアが進行するとフレイルが加速される。
- * 5. Notch シグナル：Notch 受容体の細胞外ドメインにリガンドが結合すると，Notch 細胞内ドメインが γ セクレターゼにより切断され，核内で RBP-J と結合することで標的遺伝子を活性化させる。Notch シグナルは組織幹細胞の増殖や分化などの運命決定を制御する。
- * 6. リガンド：受容体の特定部位に結合し，生理活性を担う物質。
- * 7. サテライト細胞：増殖，分化，融合することで多核の筋線維を生み出

す。骨格筋の成長，肥大，再生に必須の役割を担う筋組織幹細胞。

* 8. シングル核 RNA シークエンス解析：単一の核から網羅的に遺伝子発現解析を行う手法。

* 9. 細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs)：大きさや産生機構の違いによって，エクソソーム，マイクロベシクル，アポトーシス小胞に大きく分類される。小胞内部にさまざまなタンパク質や核酸などを含んでおり，細胞間の情報伝達に機能する。

[参考文献]

Fujimaki S, Seko D, Kitajima Y, Yoshioka K, Tsuchiya Y, Masuda S, Ono Y. Notch1 and Notch2 coordinately regulate muscle stem cell function in the quiescent and activated state. *Stem Cells*. 2018 Feb;36(2):278-285.

(論文情報)

論文名：The endothelial Dll4–muscular Notch2 axis regulates skeletal muscle mass

著者：Shin Fujimaki^{1,2}, Tomohiro Matsumoto¹, Masashi Muramatsu³, Hiroshi Nagahisa¹, Naoki Horii¹, Daiki Seko^{1,2}, Shinya Masuda², Xuerui Wang⁴, Yoko Asakura⁴, Yukie Takahashi⁵, Yuta Miyamoto⁶, Shingo Usuki⁷, Kei-ichiro Yasunaga⁷, Yasutomi Kamei⁸, Ryuichi Nishinakamura⁹, Takashi Minami³, Takaichi Fukuda⁶, Atsushi Asakura⁵, Yusuke Ono^{1,2,10*}

所属：

- 1) 熊本大学発生医学研究所 筋発生再生分野
 - 2) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
 - 3) 熊本大学生命資源研究支援センター 分子血管制御分野
 - 4) ミネソタ大学医学部
 - 5) 熊本大学国際先端医学研究機構
 - 6) 熊本大学大学院生命科学研究部 形態構築学分野
 - 7) 熊本大学発生医学研究所 リエゾンラボ研究推進施設
 - 8) 京都府立大学大学院生命環境科学研究科 分子栄養学研究室
 - 9) 熊本大学発生医学研究所 腎臓発生分野
 - 10) 熊本大学健康長寿代謝制御研究センター
- * 責任著者

掲載誌：Nature Metabolism

DOI：doi.org/10.1038/s42255-022-00533-9

URL：https://doi.org/10.1038/s42255-022-00533-9

【本発表資料のお問い合わせ先】

熊本大学発生医学研究所

筋発生再生分野

准教授 小野 悠介

〒860-0811 熊本市中央区本荘 2-2-1

TEL : 096-373-6601

E-mail : ono-y[at]kumamoto-u.ac.jp

**【JST 創発的研究支援事業に関する
お問い合わせ先】**

科学技術振興機構

戦略研究推進部創発的研究支援事業
推進室

浅野 佳那

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

K's 五番町

TEL : 03-5214-7276

E-mail : souhatsu-inquiry[at]jst.go.jp

【報道に関するお問い合わせ先】

熊本大学総務部総務課広報戦略室

〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2 丁目
39 番 1 号

TEL : 096-342-3269

E-mail : sos-koho[at]jimukumamoto-
u.ac.jp

科学技術振興機構広報課

〒102-8666 東京都千代田区四番町 5
番地 3

TEL : 03-5214-8404

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp