

主論文の要旨

**Cathepsin K activity controls  
cardiotoxin-induced skeletal muscle repair in mice**

マウスにおいてカテプシン K 活性は、  
カルジオトキシンによる障害骨格筋の修復を制御する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
発育・加齢医学講座 地域在宅医療学・老年科学分野

(指導：葛谷 雅文 教授)

小笠原 真雄

## 【緒言】

近年、高齢者の増加に伴い、骨格筋筋肉量の低下ならびに機能低下に関連するサルコペニアが注目されるに至っている。骨格筋機能低下は高齢者の活動量の低下ならびに転倒・骨折などにつながり、要介護のリスクとして極めて重要である。サルコペニアの要因としては、筋衛星細胞の機能不全や炎症性サイトカインの影響、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る可能性がある。以前より、我々はリソソームでスカベンジャーとして働くシステイン・プロテアーゼであるカテプシン、特にカテプシンK(CatK)の役割に注目しており、これまでに心血管においてアポトーシスやリモデリングの抑制に関与していることを報告した。しかしながら、いまだ世界的にも骨格筋におけるCatKの役割、特に障害、再生における役割は明らかでない。そこで今回、我々はcardiotoxin(CTX)による骨格筋障害モデルマウスを作成し、CatKが骨格筋障害ならびに再生に対してどのような役割、影響を及ぼしているかを検討した。

## 【方法】

### マウス

本研究では、9週齢前後の雄のCatK遺伝子欠損マウス(CatK<sup>-/-</sup>)あるいは野生型マウス(C57BL/6J、CatK<sup>+/+</sup>)を用いた(22-24g)。すべての実験動物は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱い規定に則って実施した。

### 骨格筋障害モデルの作成

マウスの左下肢骨格筋にCTX(20 μM/200 μl)を筋肉注射し、注射後3日目、14日目に両側の下肢骨格筋を採取し、組織学的、生化学的解析を実施した。またそれぞれのタイムコースに合わせて握力とトレッドミル検査での運動量(走行時間、走行距離、仕事量)の測定を実施した。CatKの影響を検討するために、一つ目にCatK<sup>+/+</sup>マウスとCatK<sup>-/-</sup>マウスを比較し、二つ目にCatK<sup>+/+</sup>マウスを用いて選択的CatK阻害剤投与群(ONO-KK1-300-01、低用量群：6mg/kg/day、高用量群：60mg/kg/day)と非投与群を比較した。選択的CaK阻害剤の投与は、CTXの注射2日前からサンプリング当日まで連日、ゾンデを用いて経管的投与を行った。

### 免疫組織化学分析

骨格筋障害後3日目、14日目の下肢骨格筋の新鮮凍結組織より4μmの薄切切片を作成し、下記染色を実施した後、解析を行った。

#### 3日目の組織学的評価

- ・アポトーシス細胞の評価：TUNEL染色
- ・マクロファージや炎症細胞浸潤の評価：CD68免疫染色、CD45免疫染色

#### 14日目の組織学的評価

- ・骨格筋細胞の再生の評価：Desmin/Laminin5二重蛍光免疫染色

- ・骨格筋細胞断面積測定：ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色
- ・骨格筋細胞間の間質の線維化評価：Masson's Trichrome 染色

#### 遺伝子ならびにタンパク質発現の評価

骨格筋障害後3日目の両側の下肢骨格筋を採取し、mRNAを抽出し、RT-PCR法を用いてターゲット遺伝子発現を定量評価した。内在性コントロールとしてGAPDHを用いて補正を行った。また下肢骨格筋のタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを実施した。さらにMMP-9、MMP-2のゼラチナーゼ活性を検出するためにゼラチン・ザイモグラフィを実施した。

#### 細胞実験

C2C12筋芽細胞を筋細胞へ分化させた後、CTXを添加し、選択的CatK阻害剤の前処置の有無にてTUNEL染色によるアポトーシスの比較とウェスタンブロッティングによるターゲットタンパク質の発現を比較し、選択的CatK阻害剤の効果を検討した。

#### 統計解析

データは平均±標準偏差として表した。2群間の比較はt検定を用い、3群及びそれ以上の比較には、One-way ANOVA(Tukey post hoc tests)法で、SPSSソフトウェアバージョン17.0(SPSS社、Chicago, IL)を用いて統計解析を行った。P値<0.05を有意差ありと判断した。

#### **【結果】**

まずCatK<sup>+/+</sup>マウスの片側下肢骨格筋にCTXの注射による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たところ、非障害骨格筋と比べて障害骨格筋のCatKが数十倍に増加していることを確認した(Fig.1)。次に、CatK<sup>+/+</sup>マウスとCatK<sup>-/-</sup>マウスの片側下肢骨格筋障害モデルを作成し、経時的(3日目、14日目)に運動機能を測定後、両側の下肢骨格筋を採取し、生化学ならびに組織学的検討を行った。まず、障害後3日目においてアポトーシスと炎症反応に着目し解析を行った結果、CatK<sup>-/-</sup>マウスにおいてアポトーシス関連因子(caspase-3、cleaved caspase-8、BAX/Bcl-2比)の低下ならびにTUNEL陽性細胞の有意な低下を認めた(Fig.2)。また炎症促進因子であるTLR-2、TLR-4、MCP-1、TNF- $\alpha$ の発現の低下ならびにCD68陽性細胞(炎症性マクロファージ)ならびにCD45陽性細胞(白血球)の有意な浸潤低下を認めた(Fig.3)。さらに、主に炎症性細胞から分泌されるMMP-2ならびにMMP-9の発現と活性の低下も認めた(Fig.4)。障害後14日目においてCatK<sup>-/-</sup>マウスではCatK<sup>+/+</sup>マウスに比較して、骨格筋線維断面積、間質の線維化が減少し、DesminとLaminin-5タンパク質の発現の改善を認め(Fig.5)、また握力やトレッドミル検査では運動機能の有意な改善を認めた(Fig.6)。

次に、CatK<sup>+/+</sup>マウスに選択的 CatK 阻害剤を投与（低用量群：6mg/kg/day、高用量群：60mg/kg/day）し、対照群、低用量群、高用量群の 3 群で比較検討を行った。障害後 3 日目において非投与群と比較して、CatK 阻害剤では用量依存性に障害筋肉における上記のアポトーシス関連因子のタンパク発現レベルや TUNEL 陽性細胞数ならびに TLR-2、TLR-4、MCP-1、TNF- $\alpha$  の発現、炎症性細胞の浸潤の低下を認めた(Fig.7、8)。障害後 14 日目において、骨格筋線維断面積、間質の線維化と Desmin、Laminin-5 タンパク質の発現も用量依存的に改善効果を示した(Fig.9)。さらに CatK 阻害剤の使用による障害骨格筋の運動量の改善も認めた(Fig.10)。

最後に C2C12 筋芽細胞を筋細胞へ分化させ、CTX を添加したところ、CatK の上昇と TUNEL 陽性細胞の増加を確認した。CTX 添加前に CatK 阻害剤の前処置を加えたところ、アポトーシス関連因子である caspase-3 と BAX のタンパク発現レベルの低下とともに、TUNEL 染色陽性の分化した骨格筋細胞のアポトーシスの著明な低下を認めた(Fig.11)。

#### 【考察】

本研究から、CatKはCTXによる骨格筋障害により著しく発現が増強し、アポトーシスや炎症を介して、骨格筋リモデリング、運動機能に負の影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの結果よりCatKは、今後様々な骨格筋障害の治療・予防における新たな分子標的治療のターゲットになり得ると考えられた。今後加齢に伴う、また悪液質に伴うサルコペニアの病態にCatKが如何に関わっているか、またCatKの阻害により、サルコペニアが予防、または治療できるかなどにつき、検討が必要であると思われる。

#### 【結論】

CTXによる障害骨格筋においてCatK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、また運動機能を改善することが証明された。