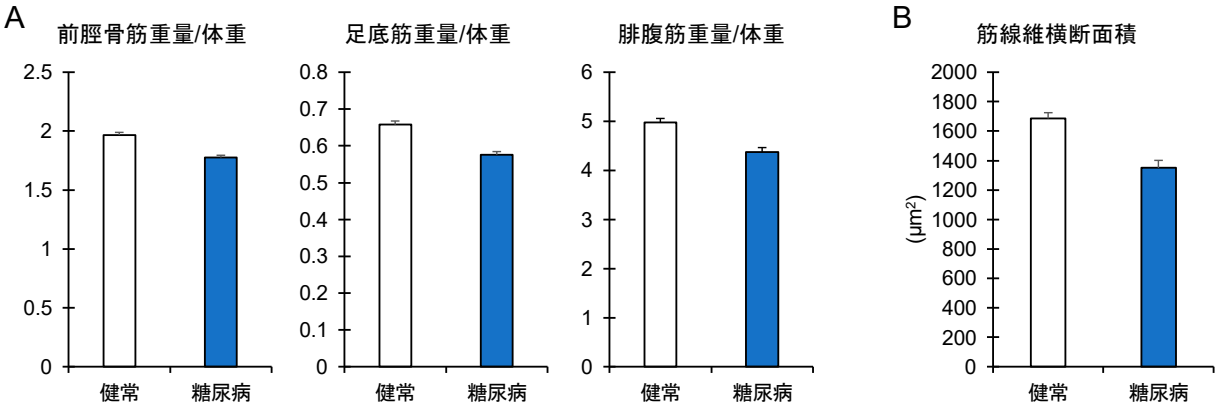
225　糖尿病性筋萎縮の克服を目指した新規分子基盤の解明	藤巻　慎

【目的】糖尿病は世界で最も罹患率が高い慢性疾患であり、その有病者数は爆発的に増加し続けている。糖尿病が筋萎縮を誘導することを示した論文は数多く報告されている一方で、その発生機序や治療法に関する知見は乏しいのが現状である。これまでの研究において、幹細胞機能を制御することが知られている Notch2 が成熟筋線維にも発現し、Notch シグナルが糖尿病性筋萎縮を誘導する可能性を見出した。そこで、筋線維における Notch2 の機能を明らかにし、糖尿病性筋萎縮の発生機序を解明することを目的とした。

【方法】筋線維特異的 *Notch2* 欠損マウス（N2-mKO）を作製し、ストレプトゾトシン（STZ）を投与することで糖尿病を誘導し、筋萎縮耐性を評価した。また、Notch の活性化に必要なγ-secretase の阻害剤である DAPT を投与したマウスでも同様の実験を行った。

【結果】N2-mKO マウスは定常状態で著明な表現系を示さなかった。STZ を投与して糖尿病を誘導し 14 日後に筋組織を回収したところ、野生型マウスで顕著な筋重量および筋線維横断面積の減少が確認された一方で、N2-mKO マウスはほとんど変化しなかった。このことから、*Notch2* を欠損させることで糖尿病による筋萎縮を抑制できる可能性が示唆された。また、γ-secretase 阻害剤である DAPT を投与したマウスにおいても、筋萎縮抵抗性が認められたことから、Notch2 によって誘導される筋萎縮は、γ-secretase の活性化によって生じる可能性が示唆された。以上より、本研究は糖尿病性筋萎縮を制御する分子基盤として Notch シグナルが関与することを突き止めた。今後は、Notch2 の上流および下流の制御因子を明らかにすることで、筋萎縮制御メカニズムの包括的な理解を目指す。

糖尿病による筋萎縮



225. 糖尿病性筋萎縮の克服を目指した新規分子基盤の解明

藤巻　慎

熊本大学 発生医学研究所 筋発生再生分野

Key words：糖尿病，筋萎縮，Notch シグナル

緒　言

糖尿病は世界で最も罹患率が高い慢性疾患であり、その有病者数は爆発的に増加し続けている。糖尿病は進行するとさまざまな合併症を引き起こすことが知られており、骨格筋の萎縮（糖尿病性筋萎縮）もその一つである。糖尿病性筋萎縮は中高年男性に多くみられ、加齢性筋減弱症（サルコペニア）を悪化させることから、身体活動量の低下や転倒の原因となり、寝たきりや死亡リスクの上昇につながる。すなわち、高齢化が進む現代社会において、糖尿病性筋萎縮症の治療法の確立は急務である。糖尿病が筋萎縮を誘導することを示した論文は数多く報告されている［1〜3］一方で、その発生機序や治療法に関する知見は乏しいのが現状である。そこで、本研究は糖尿病性筋萎縮の発生機序を明らかにし、治療標的を特定することを目的とした。

先行研究によって、1 型糖尿病疾患下の骨格筋で Notch リガンドである Delta1 や Jagged1 が発現増加することが報告されていることから［4，5］、糖尿病性筋萎縮を制御する分子基盤として Notch シグナルに着目した。Notch シグナルは種々の組織幹細胞の維持に必須な役割を担っており［6］、骨格筋における Notch の発現は幹細胞に限定されると考えられてきた。しかしながら、これまでの研究で幹細胞が最終分化した成熟筋線維で Notch2 が発現することを見出し、その発現が 1 型糖尿病疾患下において増加することを明らかにした。また、糖尿病性高血糖を模倣した高グルコース培地で筋管細胞を長期間培養したところ、Notch2 を阻害した筋管細胞はほとんど萎縮がみられなかった。これらの知見より、糖尿病疾患下の骨格筋において、Notch シグナルの活性化が筋萎縮を誘導すると仮説を立て、検証した。

方　法

1. 実験動物

筋線維における Notch シグナルの機能を明らかにするために 2 種類の実験動物を用いた（①、②）。①筋線維特異的 Notch2 欠損マウスを *Mlc1f*$^{Cre/+}$マウス［7］と *Notch2*$^{flox/flox}$ マウス［8］との交配により作出した。②野生型マウスに Notch シグナルの活性を阻害する DAPT（TCI、10 mg/kg B.W.）を 2 日おきに腹腔内投与した。糖尿病は、膵臓ランゲルハンス島 β 細胞を破壊するストレプトゾトシン（STZ）を 200 mg/kg B.W. 腹腔内投与することで誘導し、投与 3 日後に血糖値が 300 mg/dL を超えていることで糖尿病発症を確認した。また、対照群には STZ の溶媒であるクエン酸バッファー（pH 4.5）を等量投与した。投与 2 週間後にサンプリングを行った。なお、本実験は熊本大学組換え生物等第二種使用等安全委員会及び動物実験委員会の承認を得て実施した。

2. 免疫組織化学染色

筋線維横断面積を測定するために、採取した前脛骨筋を液体窒素にて急速凍結し、クライオスタット（Leica）によって横断切片（厚さ：10 μm）を作製した。切片は、4%パラホルムアルデヒドで固定した後、0.3% TritonX-100、5% normal goat serum/PBS に浸して室温で 30 分間インキュベートして透過処理及びブロッキングした。抗 Laminin α2（Santa Cruz、1：600）抗体を用いてインキュベート（4℃、一晩）した後、抗 Rat IgG-Alexa546

抗体（Thermo Fisher）を用いて染色し、蛍光顕微鏡（オリンパス）で撮影した。得られた画像データに対し Fiji ソフトウェアを用いることで、筋線維横断免疫を定量した。

結　果

1. 定常状態において筋線維特異的 *Notch2* 欠損マウスは表現系を示さない

定常状態における Notch2 欠損の影響を検討するために、10 週齢のマウスを用いて評価を行った。まず、筋線維特異的 *Notch2* 欠損マウス（N2-mKO）の筋線維内における *Notch2* の発現量は野生型マウス（WT）と比較して、顕著に低値を示したことから、遺伝子組換えが問題なく起こっていることを確認した。定常状態におけるマウスの体重および下腿後面筋（腓腹筋、足底筋、ヒラメ筋）の重量を定量したところ、N2-mKO と WT の間に差はなかった。したがって、成熟筋線維における *Notch2* の欠損は、マウスの発育および成熟後の定常状態に影響しないことが明らかとなった。

2. 筋線維特異的 Notch2 欠損マウスは糖尿病性筋萎縮耐性を呈する

糖尿病性筋萎縮に対する *Notch2* 欠損の影響を検討するために、N2-mKO および WT マウスに対してストレプトゾトシンを投与して、糖尿病を誘導し、14 日後に筋組織を回収した。対照群（Vehicle）との比較解析の結果、WT マウスで顕著な筋重量の減少が確認された一方で（図 1A）、N2-mKO マウスはほとんど変化しなかった（data not shown）。また、免疫染色によって筋線維横断面積を定量したところ、WT マウスで顕著な減少が観察されたのに対し（図 1B）、N2-mKO は変化がなかった（data not shown）。これらのことから *Notch2* を欠損させることで糖尿病による筋萎縮を抑制できる可能性が示唆された。

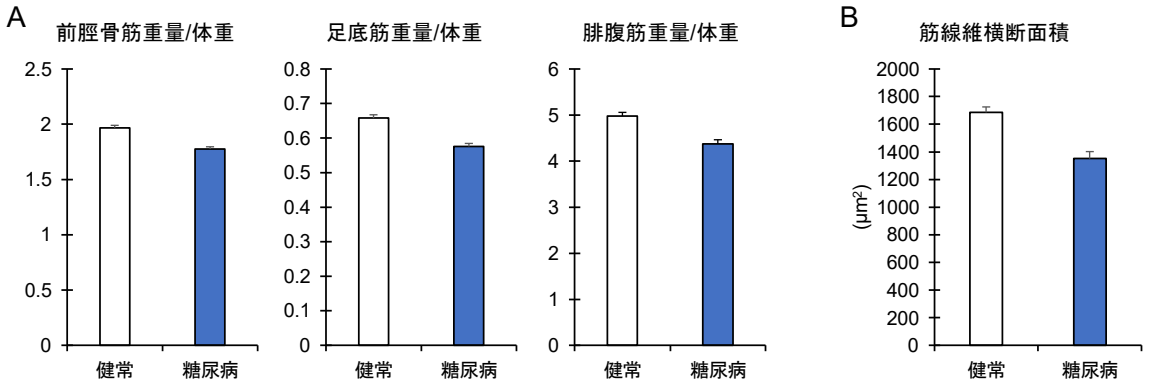


図 1. 糖尿病による筋萎縮

A）各群における前脛骨筋・足底筋・腓腹筋の重量（筋重量を体重で除した値）の平均値を示す。

B）各群における前脛骨筋の筋線維横断面積の平均値を示す（白色：健常、青色：糖尿病）。

Bars are means＋SE、**P＜0.01。

3. Notch 活性阻害剤によって糖尿病性筋萎縮が軽減する

薬剤投与による Notch シグナルの抑制が糖尿病性筋萎縮を抑制できるかどうかを検証した。Notch シグナルにおいて、Notch 受容体の細胞外ドメインにリガンドが結合すると、γ-secretase によって Notch 受容体の細胞内ドメインが切り出され、それが核内に移行することで標的遺伝子が転写される［9］。すなわち、γ-secretase の機能を阻害することで Notch シグナルの活性化を抑制することができる。そこで、γ-secretase 阻害剤である DAPT を投与した野生型マウスに対して糖尿病を誘導した。対照群（Vehicle）との比較解析の結果、溶媒投与群（Cont）で顕著な筋重量の減少が認められた一方で、DAPT 投与群（DAPT）ではほとんど変化しなかった（data not shown）。したがって、Notch2 によって誘導される筋萎縮は、γ-secretase の活性化によって生じることが示唆された。

考　察

本実験によって、Notch2 を基軸とする Notch シグナルによって筋萎縮を誘導されることが明らかとなった。定常状態において *Notch2* 欠損マウスが表現系を示さなかったことから（図 1）、筋線維内の Notch シグナルは外的な刺激によって活性化する可能性が考えられる。そこで今後は、筋線維に発現する Notch2 の活性化に必要なリガンドの種類や発現部位を明らかにする。また、Notch の下流因子を特定するとともに、他の筋萎縮（廃用性筋萎縮やがんカヘキシア、サルコペニアなど）における Notch の寄与を検討することで、筋萎縮が生じる包括的なメカニズムの解明を目指す。

文　献

1) Sexton WL. Skeletal muscle vascular transport capacity in diabetic rats. Diabetes. 1994 Feb;43(2):225-31. PMID: 8288047 DOI: 10.2337/diab.43.2.225.

2) Andersen H, Gadeberg PC, Brock B, Jakobsen J. Muscular atrophy in diabetic neuropathy: a stereological magnetic resonance imaging study. Diabetologia. 1997 Sep;40(9):1062-9. PMID: 9300243 DOI: 10.1007/s001250050788.

3) Fujimaki S, Wakabayashi T, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Treadmill Running Induces Satellite Cell Activation in Diabetic Mice. Biochem Biophys Rep. 2016 Jul 28;8:6-13. PMID: 28955935 DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.07.004.

4) D'Sauza DM, Zhou S, Rebalka IA, MacDonald B, Moradi J, Krause MP, Al-Sajee D, Punthakee Z, Tarnopolsky MA, Hawke TJ. Decreased Satellite Cell Number and Function in Humans and Mice With Type 1 Diabetes Is the Result of Altered Notch Signaling. Diabetes. 2016 Oct;65(10):3053-61. PMID: 27335233 DOI: 10.2337/db15-1577.

5) Yoon CH, Choi YE, Cha YR, Koh SJ, Choi JI, Kim TW, Woo SJ, Park YB, Chae IH, Kim HS. Diabetes-Induced Jagged1 Overexpression in Endothelial Cells Causes Retinal Capillary Regression in a Murine Model of Diabetes Mellitus: Insights Into Diabetic Retinopathy. Circulation. 2016 Jul 19;134(3):233-47. PMID: 27407072 DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.014411.

6) Fujimaki S, Seko D, Kitajima Y, Yoshioka K, Tsuchiya Y, Masuda S, Ono Y. Notch1 and Notch2 Coordinately Regulate Stem Cell Function in the Quiescent and Activated States of Muscle Satellite Cells. Stem Cells. 2018 Feb;36(2):278-285. PMID: 29139178 DOI: 10.1002/stem.2743.

7) Bothe GW, Haspel JA, Smith CL, Wiener HH, Burden SJ. Selective expression of Cre recombinase in skeletal muscle fibers. Genesis. 2000 Feb;26(2):165-6. PMID: 10686620.

8) McCright B, Lozier J, Gridley T. Generation of new Notch2 mutant alleles. Genesis. 2006 Jan;44(1):29-33. PMID: 16397869 DOI: 10.1002/gene.20181.

9) Fujimaki S, Machida M, Hidaka R, Asashima M, Takemasa T, Kuwabara T. Intrinsic ability of adult stem cell in skeletal muscle: an effective and replenishable resource to the establishment of pluripotent stem cells. Stem Cells Int. 2013;2013:420164. PMID: 23818907 DOI: 10.1155/2013/420164.