

カテプシンD免疫染色による筋線維タイプの分類

永野克人 村松 憲

Classification of muscle fiber types using cathepsin D immunostaining

HISANO Katsuhito, MURAMATSU Ken

抄 録

本研究は、カテプシンDの免疫染色による筋線維タイプ分類の可否について検討を行った。

対象は、Wistar系雄性ラット10週齢を用い、無処置のヒラメ筋および長趾伸筋と筋萎縮を惹起させたヒラメ筋の連続横断切片を作製し、ミオシン重鎖タイプIおよびタイプIIの免疫染色により筋線維タイプを分類し、カテプシンDの免疫染色像との比較検討を行った。

カテプシンDの免疫染色所見は、タイプI筋線維で抗原抗体反応が陽性を示し、陽性反応が高い筋線維とやや低い筋線維が観察されたが、タイプII筋線維は陰性または陽性反応が低かった。また、萎縮筋では、ハイブリッド型筋線維が出現し、その筋線維は、カテプシンDの抗原抗体反応が低かった。

カテプシンDによる筋線維タイプの分類は、正常および萎縮筋にて筋線維タイプIとタイプIIを分類することは可能であり、タイプI筋線維の2種の染色性については、さらに分析が必要と考えられた。

キーワード：カテプシンD

筋線維タイプ

ハイブリッド型筋線維

骨格筋

アポトーシス

はじめに

オートファジー-リソソーム系は、エンドサイトーシスあるいはオートファゴソームによって、リソソームに運搬されたタンパク質を非特異的に分解する経路として知られている。また、リソソーム内には、システインプロテアーゼであるカテプシンB、C、L、V、セリンプロテアーゼであるカテプシンA、G、アスパラギン酸プロテアーゼであるカテプシンD、Eなど種々の分解酵素が含まれている。カテプシンDは、ほぼすべての動物細胞に幅広く分布し、細胞内では、可用性画分に存在するものと膜結合型として小胞体やエンドソームに存在するものがあることが明らかにされている¹⁾。

カテプシンDは、リソソーム内でタンパク質を非特異的作用により分解すると考えられていたが、カテプシンDノックアウトマウスは、生後2週までは正常に発達し、約3週で成長が止まり死に至ることが明らかになり、カテプシンDは、成長やホメオスタシスに必要なタンパク質を限定分解し、生存シグナルに関与することが報告された²⁾。また、カテプシンDは、アポトーシスシグナルであるBidのPhe24、Trp48およびPhe183を特異的に切断することによって、Baxを活性化し、ミトコンドリアからシトクロームcを遊離させ、アポトーシスを引き起こさせることが明らかにされた³⁾。さらに、Hela細胞での不活性型カテプシンDの過剰発現は、H₂O₂誘導細胞死を抑制し、また、カテプシンDのノックアウトマウスは、アポトーシスの抑制作用を消失させることが明らかにされた⁴⁾。それらの研究から、カテプシンDの機能は、非特異的な分解に作用するという従来の見方から一転し、生存および細胞死のシグナル伝達に特異的に関与すると推測されるようになった。

一方、骨格筋におけるカテプシンDの機能は、I帯に局在するコネクチンの分解に μ カルパインとともに関与し⁵⁾、また、H帯の隣接する線維とZ帯を分解する⁶⁾。また、カテプシンDは、pH 3付近で最大活性を示し、ミオシン、 α アクチニン、トロポミオシン、トロポニンTとIを分解することが明らかにされている⁷⁾。そして、電子顕微鏡による食肉の観察において、カテプシンDは、筋細胞膜下に強く観察されるが、その熟成中にリソソーム膜透過性が変化し、カテプシンDがリソソームから細胞質に放出され、筋原線維へ移行することが観察されるなど、骨格筋におけるカテプシンDの局在性および機能について、説明がすすめられている⁸⁾。しかし、筋線維タイプの相違によるカテプシンDの局在性や機能の違いについては、十分に明らかにされていない。

骨格筋は、ミオシン重鎖（以下、MHCと略）アイソフォームの相違により、MHC1、MHC2A、MHC2X/2DおよびMHC2Bの筋線維に分類することが電気泳動法や免疫組織染色法により可能である。また、ミオシンのATPase活性の相違により、筋線維をタイプI、IIAおよびIIBに分類することがミオシンATPase染色法にて可能であり、さらに、コハク酸脱水素酵素染色法や β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドテトラゾリウムリダクターゼ染色法などでは、筋線維をタイプIおよびIIに分類することが可能である⁹⁾。それらの染色法は、MHCアイソフォームの相違またはミトコンドリア酵素活性に基づき分類されており、カテプシンDの組織染色性による筋線維タイプの分類法は報告されていない。

そこで、本研究は、ラット骨格筋での筋線維タイプの相違によるカテプシンDの組織染色性およびアポトーシス筋での組織染色性を明らかにし、カテプシンDの免疫組織染色により、筋線維タイプを分類することが可能かを検討するために行った。

対象と方法

1. 飼育および筋試料作製

実験動物は、Wistar 系雄性ラット 10 週齢 5 匹（体重 313 ± 4 g）を使用した。実験飼育終了後、ペントバルビタールナトリウム溶液を腹腔内に投与（50 mg/kg）し、深麻酔下に腹部大静脈を切断した後、両側ヒラメ筋および長趾伸筋を摘出した。筋試料は、液体窒素で冷却したイソペンタン内にて急速凍結を行い、各種分析まで -80°C にて保管した。また、アポトーシス筋でのカテプシンDの組織学的な変化を観察するため、低温環境下（ 10°C ）にて、3 週間、ラットの後肢を懸垂した状態で飼育し、筋アポトーシスを誘導した。後肢懸垂ラットは、ケージ内を前肢で移動でき、飼料および水は自由に摂取させた。

2. 組織学的分析

筋凍結試料は、 -25°C のクリオスタット（MICROM, HM500-OM；カールツァイス社）内で連続凍結横断切片を作製した。

myofibrillar ATPase 染色は、Brooke ら¹⁰⁾の方法に従って行った。筋凍結試料から $10\ \mu\text{m}$ 厚の凍結横断切片を作製し、0.01 M PBS で洗浄後、pH 4.3、pH 4.4 および pH 4.5 の酢酸バルビタール溶液にて酸性前処理を行い、洗浄後、0.18 M 塩化カルシウム - 0.1 M バルビタールナトリウム溶液に浸漬、アデノシン三リン酸溶液（0.18 M 塩化カルシウム - 0.1 M バルビタールナトリウム - 0.2% アデノシン三リン酸）で反応させ、1% 塩化カルシウム溶液で洗浄、2% 硝酸コバルト溶液で反応させ、0.01 M バルビタールナトリウム溶液で洗浄、脱水、透徹しオイキット液で封入し光学顕微鏡にて観察した。

免疫蛍光染色は、 $10\ \mu\text{m}$ 厚の凍結横断切片をアセトンで固定し風乾、0.01 M PBS で洗浄後、1% 牛血清アルブミン（BSA）でブロッキング、抗カテプシンD抗体、抗 slow myosin 抗体（Sigma）、抗 fast myosin 抗体（Sigma）、抗活性化カスパー 3 抗体（Promega）を 4°C で 7 時間反応、洗浄後、Alexa Fluor 488 標識抗体および 546 標識抗体で 3 時間反応させ、蛍光退色防止液で封入し、共焦点レーザースキャン顕微鏡（LSM510; カールツァイス社）にて観察した。

TUNEL（terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labeling）染色は、 $10\ \mu\text{m}$ 厚の連続凍結横断切片をアセトンで固定し、DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System（Promega）を用いて、検出プロトコールに従って行った。

また、二重染色は、一染目の二次抗体を反応させた後または TUNEL 染色を行った後、

常法に従い 0.01 M PBS で洗浄し、1% BSA でブロッキング、二染色の一次抗体を反応させ、洗浄後、二次抗体にて標識した。

3. 筋線維横断面積の計測

筋線維横断面積は、画像解析ソフト NIH Image (Ver. 1.59) を用いて計測し横断面積を算出した。測定値は、平均値 ± 標準偏差で示した。

尚、本実験は、広島大学動物実験施設動物飼育ガイドラインに沿って飼育され、また、広島大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した。

結果

1. 筋線維横断面積と筋線維タイプ構成比

ヒラメ筋の ATPase 染色では、濃染するタイプ I 筋線維が多数を占め、一方、淡染されるタイプ II A 筋線維および中間色に染色されるタイプ II B 筋線維は、それぞれ散在性に観察された (図 1 a)。

ヒラメ筋筋線維タイプ構成比は、タイプ I 筋線維が 90.2%、タイプ II 筋線維は 9.8% だった (図 1 b)。

ヒラメ筋タイプ I 筋線維横断面積は、 $2633.7 \pm 543.8 \mu\text{m}^2$ 、タイプ II 筋線維横断面積は、

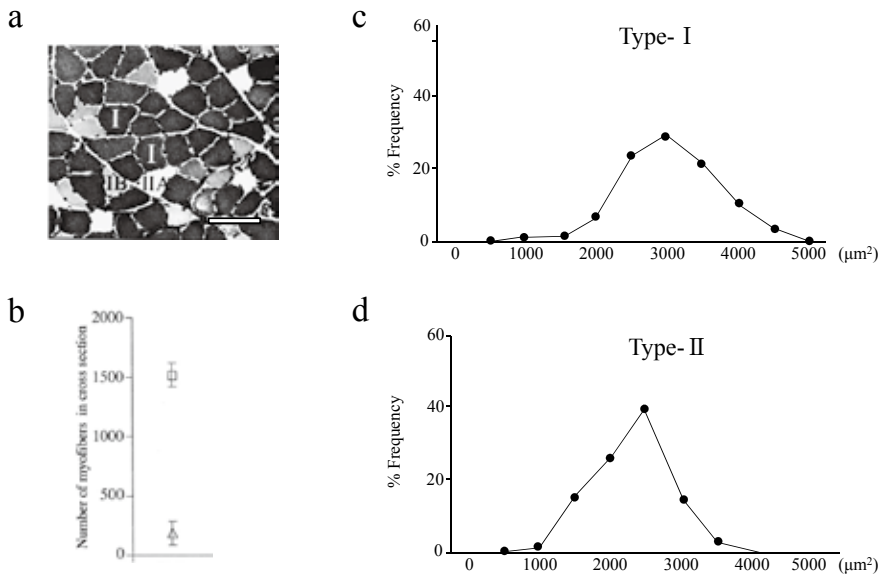


図 1. ヒラメ筋筋線維横断面積 (c, d) および筋線維タイプ構成比 (b)
Myofibrillar ATPase 染色 (a, pH 4.6), □: Type I, △: Type II, Bar: mean ± SD, Scale bar: 100 μm

2230.8 ± 488.5 μm² だった (図 1 c、d)。

2. 無処置ラットの筋線維におけるカテプシンD染色所見

抗カテプシンD抗体によるヒラメ筋の免疫組織染色は、蛍光強度の高い筋線維が多数を占め、それよりやや蛍光強度が低い筋線維と蛍光強度が認められない筋線維が少数存在し、主に蛍光強度が相違する3種類の筋線維が観察された (図 2 a)。一方、長趾伸筋での抗カテプシンD抗体による免疫染色は、蛍光強度の低い筋線維が多数を占め、蛍光強度の高い筋線維が少数存在し、蛍光強度差が明らかに相違する2種類の筋線維が観察された (図 2 e)。

抗 slow myosin 抗体によるヒラメ筋の免疫染色は、蛍光強度の高い筋線維が多数を占め、それよりやや蛍光強度が低い筋線維と蛍光強度が認められない筋線維が少数存在し、主に蛍光強度が相違する3種類の筋線維が観察された (図 2 b)。一方、長趾伸筋での抗 slow myosin 抗体の免疫染色では、蛍光強度が認められない筋線維が多数を占め、蛍光強度の高い筋線維が少数観察された (図 2 f)。

抗 fast myosin 抗体によるヒラメ筋の免疫染色は、蛍光強度の認められない筋線維が多数を占め、蛍光強度が高い筋線維が少数存在し、主に蛍光強度が相違する2種類の筋線維が観察された (図 2 c)。一方、長趾伸筋での抗 fast myosin 抗体の免疫染色は、蛍光強度が高い筋線維が多数を占め、蛍光強度の低い筋線維が少数存在し、主に蛍光強度が相違する2種類の筋線維が観察された (図 2 g)。

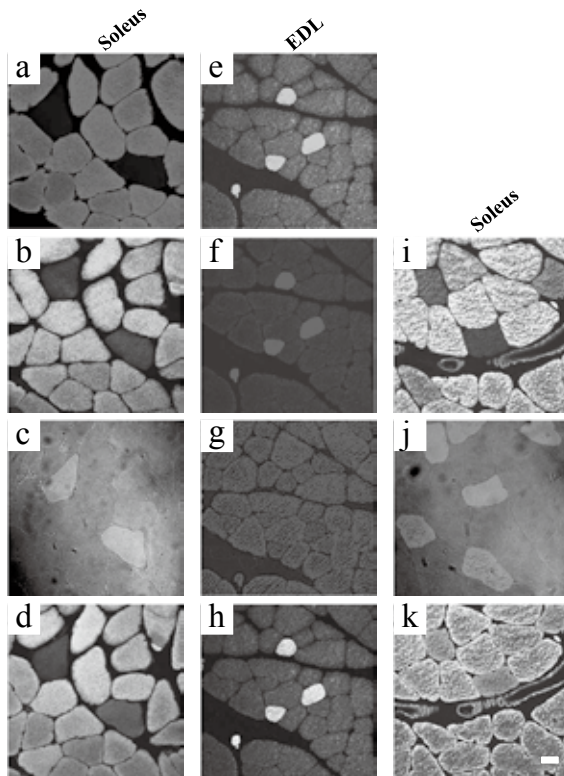


図2. ヒラメ筋 (Soleus) および長趾伸筋 (EDL) のカテプシンD、MHC タイプ I 及びタイプ II の組織像

- a: 抗カテプシンD抗体
 - b: 抗 slow myosin 抗体
 - c: 抗 fast myosin 抗体
 - d: 抗カテプシンDと抗 slow myosin 抗体
 - e: 抗カテプシンD抗体
 - f: 抗 slow myosin 抗体
 - g: 抗 fast myosin 抗体
 - h: 抗カテプシンDと抗 slow myosin 抗体
 - i: 抗カテプシンDと抗 slow myosin 抗体
 - j: 抗 fast myosin 抗体
 - k: 抗カテプシンDと抗 fast myosin 抗体
- Scale bar: 20 μm

ヒラメ筋での抗カテプシンD抗体と抗 slow myosin 抗体の二重染色像は、抗カテプシンD抗体陽性筋線維が、抗 slow myosin 抗体にも陽性を示し、抗 slow myosin 抗体陽性筋線維の蛍光強度に一致した蛍光強度を示した (図 2 d)。

長趾伸筋の抗カテプシンD抗体と抗 slow myosin 抗体の二重染色像は、抗カテプシンD抗体陽性筋線維が、抗 slow myosin 抗体に対しても陽性を示した (図 2 h)。

ヒラメ筋での抗カテプシンD抗体陽性筋線維は、抗 fast myosin 抗体で陰性を示したが、抗 slow myosin 抗体と fast myosin 抗体ともに陽性を示した筋線維は、抗カテプシンD抗体に低い陽性反応を示した (図 2 i, j, k)。

3. アポトーシス筋での抗カテプシンD抗体の染色所見

3週間、低温環境下で後肢懸垂を行い、筋アポトーシスを誘導し、ヒラメ筋の連続横断切片を観察した結果、TUNEL 陽性筋核が存在する抗カスパー3抗体陽性筋線維が観察された (図 3 a - d)。

抗カテプシンD抗体陽性筋線維は、抗 slow myosin 抗体に陽性を示したが、蛍光強度の高い抗カテプシンD抗体陽性筋線維は、蛍光強度の低い抗 slow myosin 抗体陽性筋線維と一致する傾向が観察された (図 3 e, f, h)。

また、蛍光強度が高い抗 slow myosin 抗体陽性筋線維は、抗 fast myosin 抗体に陽性を示し、

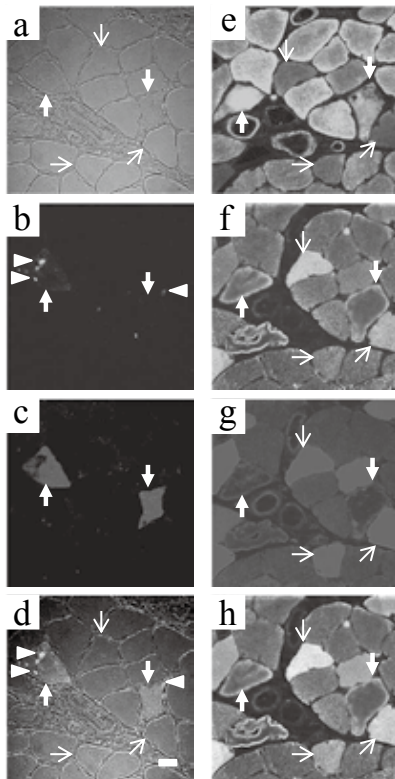


図 3. アポトーシス筋におけるカテプシンDタイプ I およびタイプ II 筋線維の組織像 (ヒラメ筋)

- a: 明視野像
- b: TUNEL 標識
- c: 抗活性型カスパー 3 抗体
- d: 抗カスパー 3 抗体と TUNEL 標識
- e: 抗カテプシン D 抗体
- f: 抗 slow myosin 抗体
- g: 抗 fast myosin 抗体
- h: 抗カテプシン D と抗 slow myosin 抗体
- 矢印 (太): 抗カスパー 3 抗体陽性筋線維
- 矢印 (細): ハイブリッド型筋線維
- 矢尻: TUNEL 陽性核
- Scale bar: 20 μ m

MHCタイプIとタイプIIが混在するハイブリッド型筋線維の性質を示した(図3f, g)。さらに、それらのハイブリッド型筋線維は、抗カテプシンD抗体に対する陽性反応が低かった(図3e)。

TUNEL 標識および抗カスベース3抗体の陽性筋線維は、抗カテプシンD抗体と抗slow myosin抗体で陽性を示したが、抗fast myosin抗体には陰性を示し、また、ハイブリッド型筋線維は、TUNEL 標識および抗カスベース3抗体の陽性は観察されなかった(図3d-h)。

考察

非後肢懸垂ラットのヒラメ筋タイプI筋線維では、カテプシンDの蛍光強度が、主に3つの強度として観察されたが、それらの蛍光強度の違いは、抗カテプシンD抗原抗体反応数の違いを表していると考えられる。そして、カテプシンDの抗原抗体反応が、タイプI筋線維では2種類の蛍光強度で観察され、他方、タイプII筋線維に蛍光強度が観察されなかったのは、カテプシンD量が、筋線維タイプにより相違したためと考えられ、タイプI筋線維と比較し、タイプII筋線維では、カテプシンD量が少なかったことが示唆される。Uchiyamaら¹¹⁾は、カテプシン群の含有量が、各臓器により異なることを報告しており、それは、細胞種の違いにより、各カテプシン量に違いがあると考えられる。従って、本研究で観察された筋線維タイプの違いによるカテプシンD量の相違は、筋細胞の種類により異なるといえることが示唆される。

また、骨格筋には、MHC1、2A、2X/2Dおよび2Bの4種類の筋線維タイプがあるが¹²⁾、タイプI筋線維は、抗カテプシンD抗体で蛍光強度が高い筋線維とやや低い筋線維の2種類で観察されたことから、タイプI筋線維は、カテプシンD量の違いにより、さらに2種類に分類できる可能性がある。

さらに、アポトーシスを発現している筋では、抗カテプシンD抗体の抗原抗体反応は、タイプII筋線維とハイブリッド型筋線維で陽性反応が低かったが、タイプI筋線維とアポトーシス筋線維では陽性を示した。このことは、正常筋のタイプI筋線維が、カテプシンD量の多さによって特定できるだけでなく、アポトーシスが惹起されている状態でも、タイプI筋線維を推定できる可能性を示唆するものであり、他の筋疾患でもタイプIとタイプII筋線維を識別できる可能性がある。

筋線維のMHCアイソフォームは、筋の発達とともにMHC2B → MHC2X/D → MHC2A → MHC1へと変化し、また、変性筋では、その進行とともに上記とは逆にMHC1からMHC2Bへの過程をたどることが報告されており¹³⁾、本研究で観察されたハイブリッド型筋線維は、MHC1とMHC2Aとの混在型であると推定される。ハイブリッド型筋線維は、タイプII筋線維と同様に抗カテプシン抗体の抗原抗体反応が低かったことから、カテプシンD量により、タイプII筋線維との区別はできないが、タイプI筋線維との識別

は容易に可能と考えられる。

以上のことから、カテプシンDによる筋線維タイプの分類は、タイプIとタイプII筋線維およびハイブリッド型筋線維を区別することが正常筋および萎縮筋で可能なことが示唆される。

カテプシン群の量は、タンパク質代謝回転率が高い組織ほど高レベルで存在することが明らかにされており¹⁴⁾、また、ヒラメ筋は、長趾伸筋と比較し、筋核、リボソームおよび総RNA量が高いことが報告されている¹⁵⁾。それらのことから、カテプシンDが、タイプII筋線維と比し、タイプI筋線維に明確に観察されたのは、タイプI筋線維が、高酸化能および高タンパク質代謝回転である性質を有することが一因と考えられる。

タイプI筋線維とタイプII筋線維は、MHCアイソフォームおよびタンパク質代謝回転が相違する以外に、ミトコンドリア数、シトクロームc量およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド活性が異なることが明らかにしている¹⁶⁾。また、高酸化能の筋線維は、低酸化能の筋線維と比し、カテプシン活性が高いことが報告されており¹⁷⁾、カテプシンDの蛍光強度がタイプI筋線維で高かったのは、タイプI筋線維が、高いエネルギー代謝能を有することやカテプシン活性が高いという性質も一因と考えられる。

筋線維タイプの分類は、主に組織染色法と電気泳動法により行われているが、カテプシンDのようなタンパク質分解酵素を指標とする分類法はなく、また、本研究では、カテプシンDの染色性により、タイプI筋線維は、主に2つの蛍光強度で識別されたが、タイプI筋線維を2種類に分類する方法は、ミオシンATPase染色法と複数の抗体を使用しての免疫染色法があるのみで非常に限られている。今後、さらに、カテプシンDの局在性や機能を解析することにより、筋線維タイプ分類法としての有用性が明らかになると考えられる。

引用文献

- 1) Diment S, Leech MS, Stahl PD. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* 263 (14) : 6901-6907, 1988.
- 2) Saftig P, Hetman M, Schmahl W, Weber K, Heine L, Mossmann H, Köster A, Hess B, Evers M, von Figura K, Peters . Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 14 (15) : 3599-3608, 1995.
- 3) Appelqvist H, Johansson AC, Linderöth E, Johansson U, Antonsson B, Steinfeld R, Kägedal K, Ollinger K. Lysosome-mediated apoptosis is associated with cathepsin D-specific processing of bid at Phe24, Trp48, and Phe183. *Ann Clin Lab Sci* 42 (3) : 231-242, 2012.
- 4) Hah YS, Noh HS, Ha JH, Ahn JS, Hahm JR, Cho HY, Kim DR. Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells. *Cancer Lett* 323 (2) : 208-214, 2012.
- 5) Kim K, Homma Y, Ikeuchi Y, Suzuki A. Cleavage of connectin by calpain and cathepsin D. *Biosci*

- Biotechnol Biochem 59 (5) : 896-899, 1995.
- 6) Matsukura U, Matsumoto T, Tashiro Y, Okitani A, Kato H. Morphological changes in myofibrils and glycerinated muscle fibers on treatment with cathepsins D and L. *Int J Biochem* 16 (9) : 957-962, 1984.
 - 7) Matsumoto T, Okitani A, Kitamura Y, Kato H. Mode of degradation of myofibrillar proteins by rabbit muscle cathepsin D. *Biochim Biophys Acta* 755 (1) : 76-80, 1983.
 - 8) Kubo T, Gerelt B, Han GD, Sugiyama T, Nishiumi T, Suzuki A. Changes in immunoelectron microscopic localization of cathepsin D in muscle induced by conditioning or high-pressure treatment. *Meat Sci* 61 (4) : 415-418, 2002.
 - 9) Schiaffino S, Reggiani C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiol Rev* 91 (4) : 1447-1531, 2011.
 - 10) Brooke MH, Kaiser KK. Muscle fiber types how many and what kind? *Arch Neurol* 23 (4) : 369-379, 1970.
 - 11) Uchiyama Y, Waguri S, Sato N, Watanabe T, Ishido K, Kominami E. Cell and tissue distribution of lysosomal cysteine proteinases, cathepsins B, H, and L, and their biological roles. *Acta Histochem Cytochem* 27 (4) : 287-308, 1994.
 - 12) Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J Physiol* 437 : 655-672, 1991.
 - 13) Termin A, Pette D. Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *Eur J Biochem* 204 (2) : 569-573, 1992.
 - 14) Bechet D, Tassa A, Taillandier D, Combaret L, Attaix D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (10) : 2098-2114, 2005.
 - 15) Habets PE, Franco D, Ruijter JM, Sargeant AJ, Pereira JA, Moorman AF. RNA content differs in slow and fast muscle fibers : implications for interpretation of changes in muscle gene expression. *J Histochem Cytochem* 47 (8) : 995-1004, 1999.
 - 16) Picard M, Hepple RT, Burelle Y. Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers : tailoring the organelle for optimal function. *Am J Physiol Cell Physiol* 302 (4) : C629-641, 2012.
 - 17) Kominami E, Tsukahara T, Bando Y, Katunuma N. Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. *Distribution of cathepsins B and H in rat tissues and peripheral blood cells. J Biochem* 98 (1) : 87-93, 1985.

Abstract

Muscle fibers are generally classified into two main types, type I and type II, according to their myosin types or mitochondrial enzymes. No methods have been reported that use specific lysosomal proteolytic enzymes to classify muscle fibers. This study examined whether immunostaining with lysosomal enzyme cathepsin D could be used to identify muscle fiber types.

The soleus and extensor digitorum longus muscles of normal and hindlimb unloaded rats were used. Transverse serial sections of each muscle were stained with slow myosin, fast myosin, and cathepsin D immunostaining. The muscle fibers were classified into type I or type II using the myosin staining, then compared to the staining patterns observed with cathepsin D immunostaining.

In the muscles of both normal and hindlimb unloaded rats with cathepsin D immunostaining, type I fibers showed moderate or strong fluorescence, whereas type II fibers showed weak fluorescence. On the other hand, hybrid fibers which were clearly observed in the hindlimb unloaded rats with slow and fast myosin staining showed only weak fluorescence with cathepsin D immunostaining.

These results suggest that cathepsin D immunostaining can be used to classify muscle fibers into type I or type II. Further studies are needed, however, to determine the possibility of using cathepsin D to sub-classify type I fibers.

Key words : Cathepsin D

Skeletal muscle

Muscle fiber type

Hybrid fiber

Apoptosis