

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12699

研究課題名(和文) 骨格筋再生と増殖因子GFXに関する研究 - サルコペニア治療を目指して

研究課題名(英文) Skeletal muscle regeneration and Sarcopenia therapy: Focusing on the role of GFX

研究代表者

葛谷 雅文 (KUZUYA, Masafumi)

名古屋大学・未来社会創造機構・教授

研究者番号：10283441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、心臓毒の投与による骨格筋障害モデルにおいてアポトーシス細胞由来新規増殖因子(GFX：特許申請準備中)の遺伝子ならびにタンパク質発現亢進を明らかにした。GFX中和抗体投与による障害骨格筋機能や線維化悪化と骨格筋幹細胞数の著しい低下が認められた。一方、その組換えタンパク質投与による運動能と線維化の改善がみられた。これらの結果から、GFXが、サルコペニアおよびフレイルのような骨格筋障害に対する治療や予防のための新たな分子ターゲットになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have the first time observed that cardiotoxin-injury results an increase in new growth factor-x (GFX) gene and protein expression in the muscles. Neutralizing antibody against GFX impaired muscle function recovery and aggravated interstitial fibrosis and muscle stem cell homing into the muscle in response to cardiotoxin; these changes were mitigated by the mouse recombinant GFX intervention. These findings suggest that GFX might be new therapeutic target for the injury-related muscle disease like Sarcopenia and frailty.

研究分野：老年医学

キーワード：加齢 障害 骨格筋幹細胞 骨格筋リモデリング

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は、最近血管壁に障害(内頸動脈の結紮ならびにカフ装着)を惹起することにより、中膜平滑筋細胞にアポトーシスが誘導され、それらアポトーシス誘導細胞において発現が亢進し、周囲に分泌され、組織修復(再生)に關する増殖因子(GFX、特許出願準備中)の同定に成功した。この増殖因子のリコンビナントを作成したところ、リコンビナント GFX は平滑筋細胞の増殖を著しく亢進し、ERK、mTOR、GSK-3 のリン酸化を誘導したが、PDGF などの中和抗体では抑制されず、この GFX の受容体の同定にも成功した。この増殖因子を中和抗体で抑制するか、または *in vivo* で GFX の siRNA を障害血管で作用させると血管の障害後の組織修復(再生)が抑制されることを確かめた。

申請者は、このアポトーシスに伴い発現が亢進する GFX は血管に限らず、多くの組織でアポトーシス後におこる組織修復(再生)に關連しているのではないかと、との仮説を立て、まず骨格筋における組織修復(再生)さらにはサルコペニアへの関与を明らかにすることを計画した。この計画を立てる上で、培養骨芽細胞 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> においてアポトーシスを誘導することにより、GFX の発現亢進が起こることを確認している。

### 2. 研究の目的

我々は血管壁に障害(アポトーシス)を誘導した際に、アポトーシス誘導細胞で強発現し、放出される paracrine 増殖因子(GFX)を見出し、GFX が障害後の組織修復(再生)に重要な役割を果たしていることを明らかにした(特許申請準備中・論文投稿中)。当該研究の目的は我々が見出した GFX の骨格筋障害後の筋再生への役割を明らかにすることである。骨格筋では加齢、廃用、脱神経など様々な障害によりアポトーシスが誘導されることが知られる。老化などによりその再生能が低下すると、修復遅延、さらにはサルコペニアの要因となり得る。今回、我々は GFX が骨格筋での組織修復に關し、今後サルコペニアなどへの臨床応用につなげ得るチャレンジングな課題を検討する。

### 3. 研究の方法

マウス(C57BL/6)四肢骨格筋に障害(アポトーシス)を誘導後、血管と同様に GFX が誘導され、組織再生に關連しているかどうかを明らかにし、さらに GFX のシグナル経路を解明することを計画した。

A) 16 週齢の C57BL/6 の片側下肢腓腹筋に cardiotoxin (CTX) を 20 $\mu$ l (40 $\mu$ M CTX) を注射し、継時的に 0day, 3day, 7day, 14day に組織を摘出し、組織学的、生化学的に以下のように解析した(n=5 $\times$ 4 群)。

a) 固定、標本作成後、H&E 染色による筋細胞の修復ならびに炎症細胞の浸潤を評価。抗ミオシン抗体(速筋用、遅筋用)、デスミ

ン抗体での骨格筋評価、抗 PCNA 抗体による増殖細胞の同定、TUNAL 染色によるアポトーシス評価ならびに抗 GFX 抗体、抗 GFX 受容体抗体を用い発現細胞を同定する；b) mRNA を抽出し RT-PCR により GFX, GFX 受容体、Pax7, MyoD, myogenin, IGF-1, VEGF を測定する；c) タンパク質解析(western blotting)：ERK 1/2, mTOR, GSK-3 のリン酸化などを検討する。

B) GFX 中和抗体の組織再生への効果の検討

GFX の中和抗体(300 $\mu$ g/kg $\cdot$ day)を CTX 投与日を 0day とし、投与後 0day, 3day, 7day, 10day に皮下注射し、組織修復への効果を検証した。

C) リコンビナント GFX 投与による効果の検討

リコンビナント GFX [(rmGFX) 200 $\mu$ g/kg $\cdot$ day] を CTX 投与後 0day, 3day, 7day, 10day に下肢骨格筋に筋肉注射し、組織修復への効果を検証した。

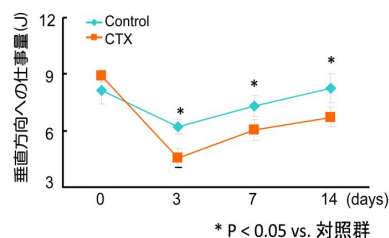
### 4. 研究成果

(1) 申請者は、骨格筋の障害(アポトーシス)後に GFX が誘導され、組織再生に關連していることを検証するため、骨格筋障害モデルマウスを作製することから始めた。野生型マウス(9 週齢雄、C57BL/6J)の片側下肢骨格筋に心臓毒[Cardiotoxin (CTX), 1.3mmol/kg $\cdot$ day]を投与する方法で、骨格筋障害(アポトーシス)モデルを作成した。CTX 投与に關しては 40 $\mu$ M/100 $\mu$ l 群と 20 $\mu$ M/200 $\mu$ l 群の 2 群を作成し、HE 染色を用いてそれぞれの筋障害度を比較した。結果、20 $\mu$ M/200 $\mu$ l 群にて筋障害が安定して生じることが判明し、その後の実験では CTX 濃度・投与量としては 20 $\mu$ M/200 $\mu$ l を用いた。

(2) CTX 投与した骨格筋障害モデルマウスと 0.9% 生食を投与したコントロール群を、トレッドミル運動能力テストおよび四肢握力測定にて比較した。トレッドミル運動能力テストでは走行時間、走行距離、傾斜角度より垂直方向への仕事量を測定した。結果、仕事量は障害後 3~14day における両群比較にて、CTX 投与群で有意差をもってより低下した(図 1)。

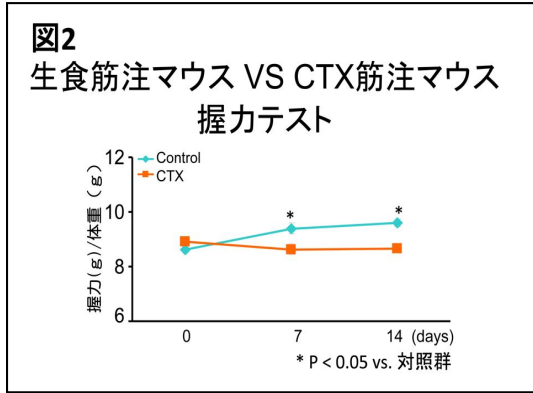
図 1

生食筋注マウス VS CTX筋注マウス  
トレッドミル運動能力テスト

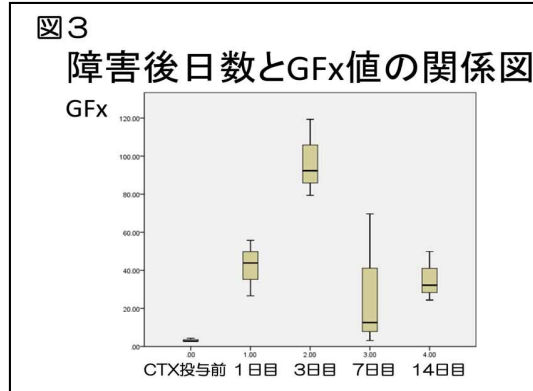


四肢握力検査では障害 7・14day における両群比較にて、CTX 投与群で有意に低下した

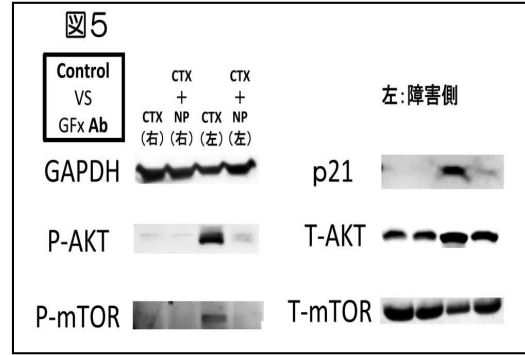
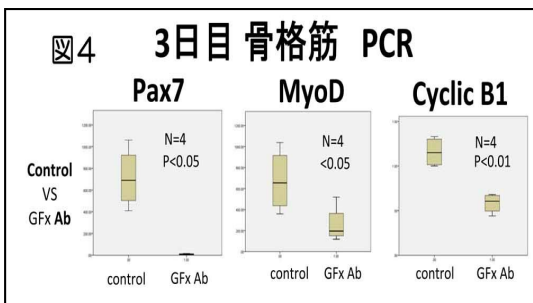
( 図 2 )



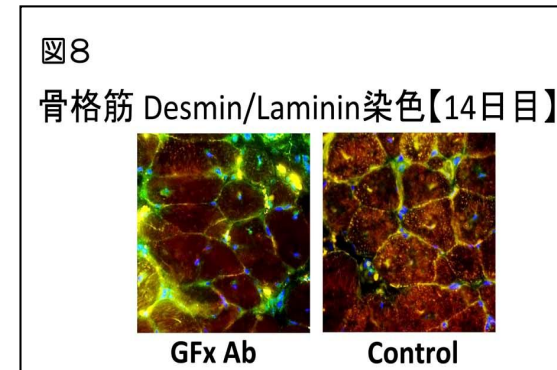
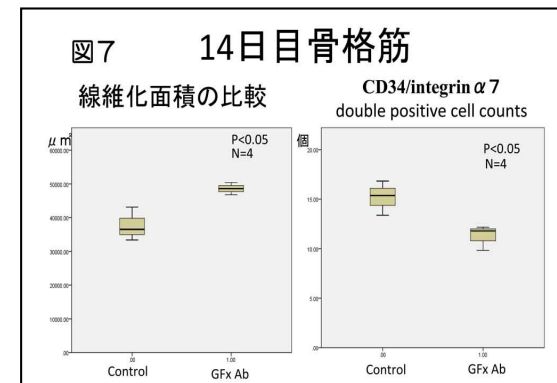
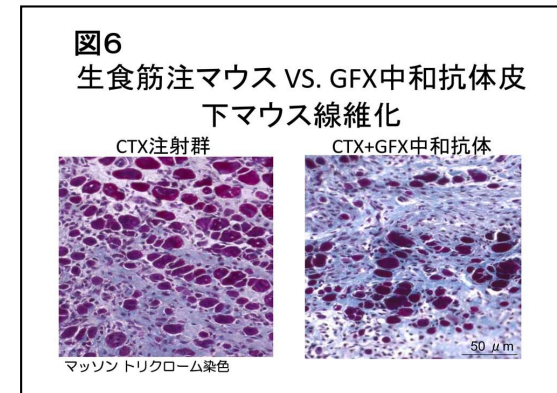
( 3 ) CTX 投与後 1.3.7.14day の各サンプルを、定量 PCR 法にて GFX の mRNA 発現量を CTX 生食投与群と比較した。結果、1 日目のサンプルにてコントロールの 13 倍、3 日目のサンプルにてコントロールの 30 倍の GFX mRNA 発現を認めた ( 図 3 )。その後 7 日目と 14 日目にかけて発現の減少が認められた。この結果から、骨格筋のリモデリングと再生において GFX が大きく関与している可能性が考えられた。



( 4 ) GFX 中和抗体投与 ( 300 $\mu$ g/kg · day; CTX 投与後 0, 3, 5, 7, 10day ) 後、計画書どおりにサンプリングと解析を行った。その結果、中和抗体投与 3 日目の定量 PCR 解析において、生食投与群に比較して、GFX 中和抗体投与による骨格筋分化の指標である Pax7 や MyoD および増殖の指標である cyclinB1 の著明な mRNA 発現の抑制が観察された ( 図 4 )。また、Western Blotting 法では GFX 中和抗体投与群において AKT と GSK のリン酸化の誘導抑制が確認された ( 図 5 )。

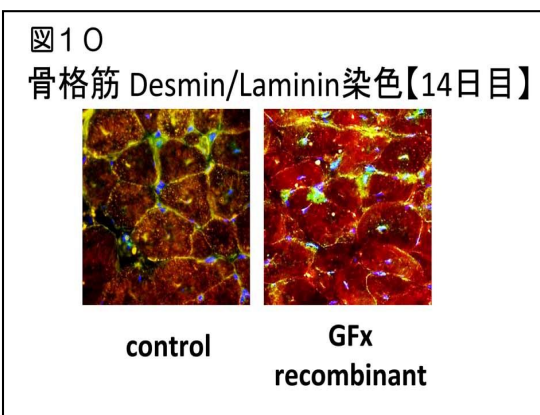
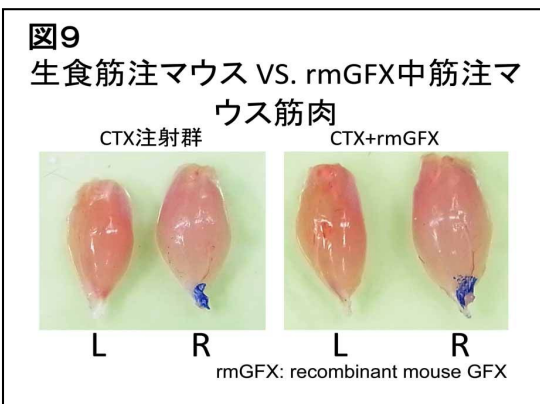


( 5 ) 14 日目の組織学的解析において、GFX 中和抗体投与による再生骨格筋の減少と間質の線維化面積の増加 ( 図 6、 7 ) ならびに骨格筋幹細胞 ( CD34/integrin $\alpha$ 7 ) 数 ( 図 6、 7 ) とラミニン・デスミン発現 ( 図 8 ) の著しい低下を認めた。



( 6 ) 図 4 は、CTX 投与対照群と CTX+リコンビナント GFX ( rmGFX ) 投与群のサンプリング後筋肉塊の写真である。明らかに

rmGFX を投与した筋肉で肥大が認められた ( 図 9 )。ラミニンとデスミン障の二重染色結果からも ( 図 10 )、rmGFX の治療による害後筋肉再生が亢進したことを示している。



( 7 ) rmGFX 投与群は生食投与群と比較し、CTX 投与7日目において、トレッドミル運動能力テストの仕事量および四肢握力の改善が認められた。

以上の結果より、我々がこの研究を開始する動機となった仮説、GFX は障害後の筋肉再生に明らかに参与していることを証明することができた。当初の予定は当科促進マウス SAMP10 も使用して rmGFX を投与する計画であったが、野生型マウスに使用するマウスを変更し、CTX を投与した。老化させた SAMP10 マウスは脆弱であり、CTX の毒性に耐性がない可能性があると考えたためである。それ以外の計画はほぼ達成できたと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕( 計 1 件 )

Inoue A, Cheng XW, Huang Z, Hu L, Kikuchi R, Jiang H, Piao L, Sasaki T, Itakura K, Wu H, Zhao G, Lei Y, Yang G, Zhu E, Li X, Sato K, Koike T, Kuzuya M. Exercise Restores Muscle Stem Cell Mobilization and Regenerative Capacity and Muscle Metabolic Alterations via Adiponectin/AdipoR1 Activation in SAMP10 mice. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and*

*Muscle.* 査読有, 2016. DOI: 10.1002/jcsm.12166. [Epub ahead of print]

〔学会発表〕( 計 3 件 )

成 憲武、井上愛子、胡麗娜、朴麗梅、葛谷雅文 . SAMP10 マウスにおける運動と若齢マウス骨髄移植併用による加齢による筋萎縮の防止. 第 3 回日本サルコペニアフレイル研究会. 2016 年 11 月 6 日. 名古屋ガスビル(愛知県名古屋市).

Cheng XW, Inoue A, Hu L, Inoue A, Piao L, Kuzuya M. Prevention of Muscle Wasting with Aging in SAMP10 Mice by a Combination of Exercise and Intrabone Young Bone Marrow Injection. *The 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia.* Nov. 5, 2016. 名古屋ガスビル(愛知県名古屋市).

Inoue A, Cheng XW, Hu L, Inoue A, Piao L, Kuzuya M. Exercise Restores Muscle Stem Cell Mobilization and Regenerative Capacity and Muscle Metabolic Alterations via Adiponectin/AdipoR1 Activation in SAMP10 mice. *The 2nd Asian Conference for Frailty and Sarcopenia.* Nov. 5, 2016. 名古屋ガスビル(愛知県名古屋市).

〔産業財産権〕

出願状況 ( 計 0 件 ) 現在出願準備中

〔その他〕

名古屋大学ホームページ研究成果情報  
[http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload\\_images/20161213\\_med.pdf](http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20161213_med.pdf)  
日本の研究.com  
<https://research-er.jp/articles/view/53466>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

葛谷 雅文 ( KUZUYA, Masafumi )  
名古屋大学・未来社会創造機構・教授  
研究者番号 : 10283441

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

井上 愛子 ( INOUE, Aiko )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生

木村 薫 ( KIMURA, Kaoru )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・客員研究者

五藤 大貴 ( GOTO, Hiroki )  
名古屋大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号 : 50770913