

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K09807

研究課題名(和文) 骨格筋再生過程のバイオマーカーの確立とその臨床的有効性の検討

研究課題名(英文) Establishment of biomarkers for skeletal muscle regeneration process and examination of its clinical efficacy

研究代表者

村田 顕也 (Murata, Ken-ya)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90264853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋再生の促進は、筋疾患の治療や高齢者の廃用性筋萎縮を予防する観点からも重要である。これまで、私たちは、カルパインや、ウロキナーゼが骨格筋再生において重要な働きをなすことを報告してきた。本研究では、Transient receptor potential (TRP)チャンネルファミリーの一つであるTRPV1に注目した。TRPV1は、痛み刺激など感覚刺激の伝達に関係すると言われているが、今回筋芽細胞増殖作用を応用し、筋再生を予測するバイオマーカーの開発をめざした。さらに筋萎縮を予防するリハビリ訓練法を確立し、高齢化社会での問題となるサルコペニアの予防に寄与した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、Transient receptor potential (TRP)チャンネルファミリーの一つのTRPV1に注目し、各種筋疾患や筋損傷モデルマウスの生検筋を用いて病理学的、生化学的、分子生物学的に手法にてTRPV1のバイオマーカーとしての有用性を検討した。そして、筋萎縮モデルにTRPV1アゴニストを投与し、筋萎縮予防効果を検討した。骨格筋再生のバイオマーカーの探索は、筋疾患や廃用による筋萎縮を予防し、筋再生を促す治療法を確立することにある。

研究成果の概要(英文)：Promotion of skeletal muscle regeneration is important from the viewpoint of treating muscle diseases and preventing disuse muscle atrophy in the elderly. We have reported that calpain and urokinase play an important role in skeletal muscle regeneration. In this study, we focused on TRPV1, one of the transient receptor potential (TRP) channel families. TRPV1 is reported to be involved in the transmission of sensory stimuli, such as pain stimuli, and this time, by applying myoblast proliferation, we aimed to develop a biomarker that predicts muscle regeneration. Furthermore, we established a rehabilitation training method to prevent muscle atrophy and contributed to the prevention of sarcopenia, which is a problem in an aging society.

研究分野：臨床神経内科学

キーワード：骨格筋再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨格筋再生の促進は、筋疾患治療では筋障害の抑制とともに重要な課題である。炎症性筋疾患では、急性期には副腎皮質ステロイド剤が使用されるが、炎症終息後の筋再生に注目した治療法はいまだに確立されていない。これまで、筋ジストロフィーを対象に筋細胞増殖抑制サイトカインである Myostatin を抑制する臨床試験が計画されたが、良好な結果は得られなかった。そこで、筋萎縮予防の観点からも骨格筋再生の研究は急務である。

2. 研究の目的

申請者らは、これまでカルパインやウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーターが骨格筋再生の促進因子であることを世界にさきがけて解明してきた。また、筋成長阻害因子である Myostatin とその受容体である actvin receptor Type IIB の血清中動態が筋萎縮の病態把握に重要であることを証明した。本研究では、Transient receptor potential (TRP) チャンネルファミリーの一つである TRPV1 の筋芽細胞増殖作用に注目し、筋再生を予測するバイオマーカーの開発をめざした。さらに筋萎縮を予防するリハビリ訓練法を確立し、高齢化社会で問題となるサルコペニアの予防に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 筋疾患バンクでの検討

当科では詳細な臨床データと照合可能な約 500 症例の凍結生検筋・血清のバンクを保有している。このバンクを用い、各種ミオパチーの筋萎縮・筋力低下・治療介入の有無(ステロイド治療・リハビリテーション)などの臨床情報と、生検筋での TRPV1 やそのアゴニストであるカプサイシンの発現を病理学的・生化学的・分子生物学的手法で解析しその関連性を検討する。

(2) モデル動物での検討

Cardiotoxin (10 μ M) 投与による筋損傷モデルマウスを用い、損傷部の筋再生過程での TRPV1、カプサイシンの発現を病理学的・生化学的・分子生物学的手法にて経時的に検討する。

(3) Human Skeletal muscle myoblast を用いての検討

スライドチャンバーに 1well あたり、 3×10^3 個の筋芽細胞を培養しカプサイシンと TRPV1 化合物(DSP)を 1×10^{-5} から 1×10^{-8} M 投与して MyHC β 陽性細胞(筋管細胞数)を検討した。

4. 研究成果

(1) 筋疾患バンクでの検討

病理学的検討

炎症細胞浸潤、筋壊死・再生の評価と筋線維直径の計測による萎縮筋の経時的变化や遅筋と速筋の筋線維タイプの存在比率を検討した。再生筋のマーカーや抗 TRPV1 抗体を用い免疫染色を行い、発現パターンの経時的变化を検討した。

抗 ARS 抗体陽性筋炎や抗 HMGR 抗体陽性筋炎の検討では、下の図に示すように TRPV1 は、MHC-N 陽性 NCAM 陰性の萎縮筋線維の筋細胞質と細胞膜が陽性を示した。このことが

ら、TRPV1は、再生過程の筋線維に発現していることが明らかになった。

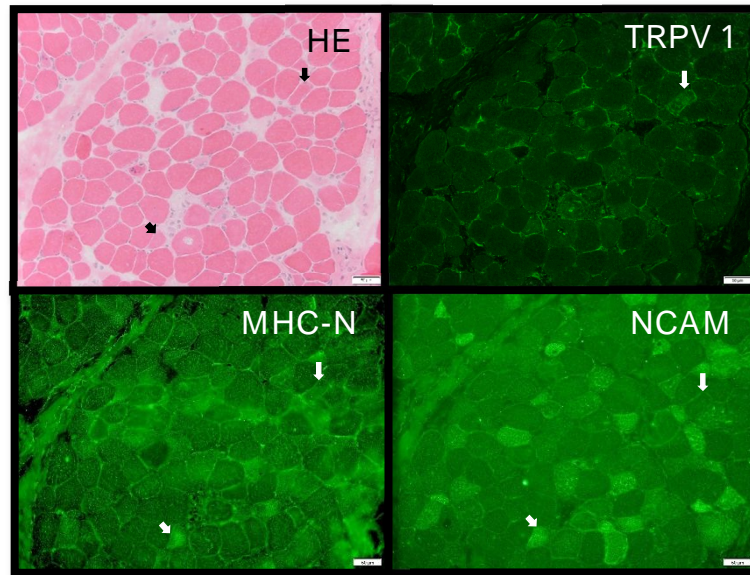


図1 抗ARS抗体陽性筋炎の病理学的検討

(2) モデル動物での検討

Cardiotoxin (10 μ M)投与による筋損傷モデルマウスを用い、損傷部の筋再生過程でのTRPV1の発現を病理学的手法にて経時的に検討した。

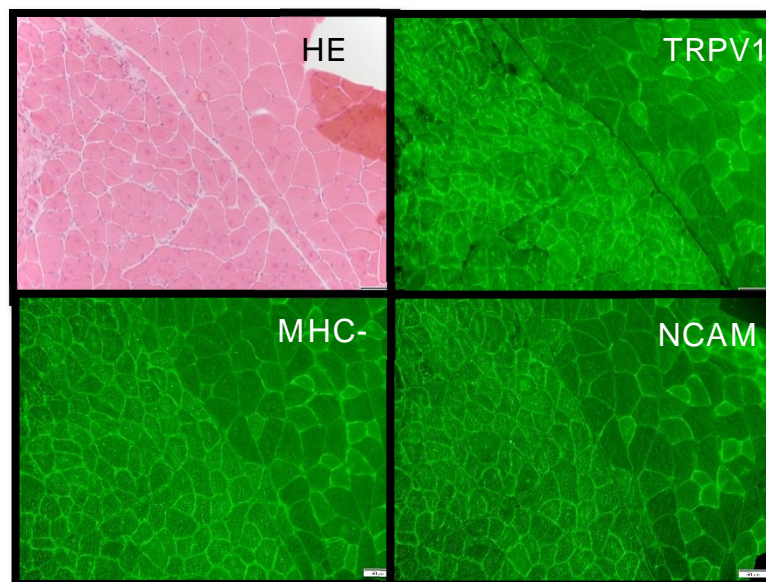


図2 CTX処理3週間目の病理学的検討

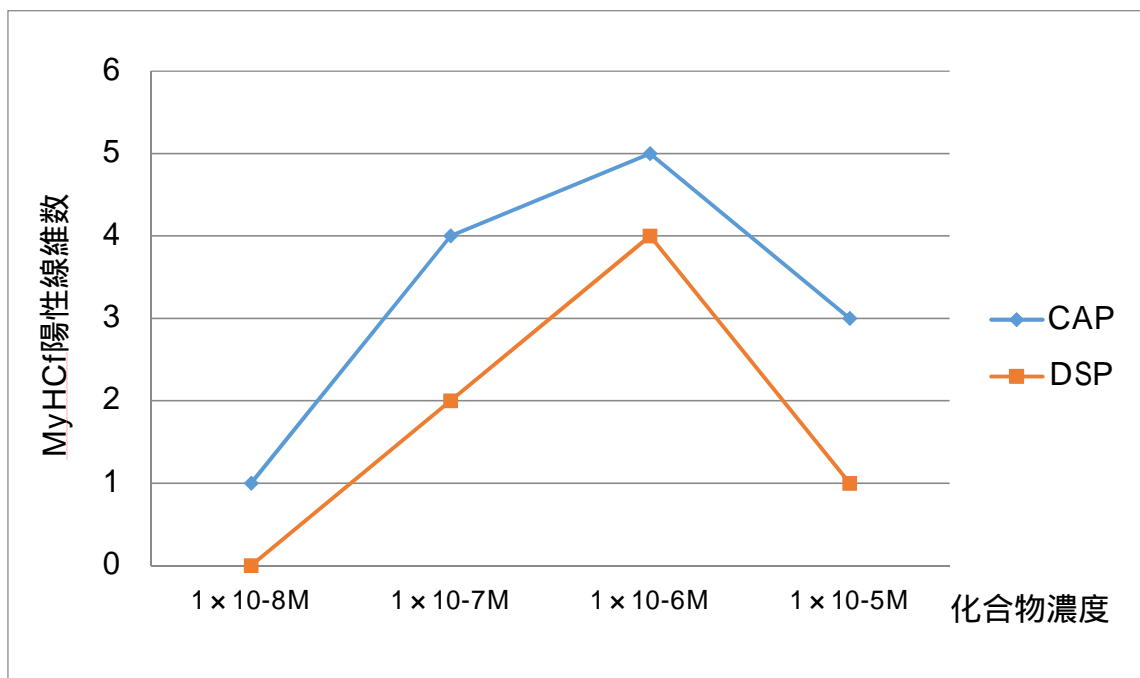
生検筋の場合と同様にTRPV1は、MHCN、NCAM陽性の筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。また、CTX処理からの時間の変化により、内在核陽性細胞数のうちTRPV1陽性となる細胞比率は変化する。すなわち、筋細胞におけるTRPV1の発現は筋の壊死・再生の段階の違いにより異なっていた。(表1)

		内在核予製細胞数	TRPV1 陽性細胞数	TRPV1 陽性/内在核陽 (%)
1週後			-	-
2週後		88	17	19.3
3週後		26	11	42.3

表1 CTX 処理後の再生筋における TRPV1 陽性の割合

(3) Human Skeletal muscle myoblast を用いての検討

CAP(カプサイシン) DSP (TRPV1 化合物)とも投与濃度が $1 \times 10^{-6}M$ の濃度で1チャンバーあたりの筋管細胞の数が最も多かった。筋管細胞数は筋再生因子であるカプサイシンに比べ TRPV1 が少なかった。TRPV1 もカプサイシン同様に筋再生に関与することが証明された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mukai A, Minami H, Isomoto H, Hamamoto H, Ihara E, Maeda Y, Higuchi O, Okanishi T, Kokudo Y, Deguchi K, Sasaki F, Ueki T, Murata KY, Yoshida T, Kinjo M, Ogawa Y, Ido A, Matsuo H, Nakao K, Nakane S	4. 巻 53
2. 論文標題 Anti-ganglionic AChR antibodies in Japanese patients with motility disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 1227-1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-018-1477-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shima T, Yamamoto Y, Kanazawa N, Murata KY, Ito H, Kondo T, Yuan J, Hashiguchi A, Takashima H, Furukawa F	4. 巻 45
2. 論文標題 Repeated hyperhidrosis and chilblain-like swelling with ulceration of the fingers and toes in hereditary sensory and autonomic neuropathy type II	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e308-e309,
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14336	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hosokawa M, Murata K, Horonishi M, Koh J, Nishioka K, Nakao N, Ito H	4. 巻 392
2. 論文標題 Superficial siderosis associated with duplicated dura mater detected by CISS reverse MRI	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of neurological science	6. 最初と最後の頁 38-43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jns.2018.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li F, Ayaki T, Sakiho Ueda, Nagai H, Murata K, and Takahashi R	4. 巻 6
2. 論文標題 Nivolumab causes focal muscular inflammation without electrophysiological or muscle magnetic resonance imaging findings	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurology and clinical neuroscience	6. 最初と最後の頁 112-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ncn3.12193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shima T, Yamamoto Y, Kanazawa N, Murata KY, Ito H, Kondo T, Yuan J, Hashiguchi A, Takashima H, Furukawa F	4. 巻 0
2. 論文標題 Repeated hyperhidrosis and chilblain-like swelling with ulceration of the fingers and toes in hereditary sensory and autonomic neuropathy type II.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14336	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊東 秀文 (Ito Hidefumi) (20250061)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	
研究分担者	檜皮谷 泰寛 (Hiwatani Yasuhiro) (40405452)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	
研究分担者	森 めぐみ (Mori Megumi) (60590437)	和歌山県立医科大学・その他部局等・助教 (24701)	
研究分担者	廣西 昌也 (Hironishi Masaya) (80316116)	和歌山県立医科大学・医学部・教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------