

機関番号：24701

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 年度 ～ 2010 年度

課題番号：20591028

研究課題名 (和文) 筋再生過程におけるウロキナーゼの関与の検討

研究課題名 (英文) A study for urokinase activating system during muscle regeneration

研究代表者

村田 顕也 (MURATA KENYA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90264853

研究成果の概要 (和文)：

多発筋炎・皮膚筋炎患者の生検筋を用い①ウロキナーゼ②uPAR③Plg-R の分布を免疫組織学的に検討した。その結果、ウロキナーゼや uPAR, Plg-R は再生過程にある筋線維の筋細胞膜・筋細胞質に発現しており plasminogen activation system が炎症性筋疾患の筋再生過程に関与していた。

今回の検討から、plasminogen activation system による筋再生治療への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We performed immunohistological study for the distribution of urokinase, urokinase-plasminogen receptor and plasminogen receptor using muscle biopsy specimens of polymyositis and dermatomyositis.

Urokinase, urokinase-plasminogen receptor and plasminogen receptor were expressed at the sarcolemma and cytoplasm of muscle fibers.

These observations suggest that plasminogen activating system play an important role of muscle fiber regeneration in inflammatory myopathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1, 500, 000	450, 000	1, 950, 000
2009 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
2010 年度	1, 000, 000	300, 000	1, 300, 000
年度			
年度			
総計	3, 500, 000	1, 050, 000	4, 550, 000

研究分野：神経内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：骨格筋再生・筋疾患・ウロキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

筋疾患の中には筋ジストロフィーの様に治療法が確立されていない疾患も多いが、炎症性筋疾患では急性期には、ステロイド剤が使用される。炎症が治まった後の筋力回復に

は、効率的な筋再生が必要である。

我々は新たな再生因子としてウロキナーゼ型プラスミノゲン activator(以下ウロキナーゼと略す)に注目した。近年、ウロキナーゼもカルパイン同様に、筋芽細胞の融

合や筋管細胞の分化に関与すると報告され、ウロキナーゼの筋再生への関与が注目されている。

2. 研究の目的

当該研究では蛇毒の一種のcardiotoxinの脱分極作用で筋障害を引き起こし、筋壊死・再生マウスを作製する。このマウスに濃度差を変えたウロキナーゼを腹腔内投与し、骨格筋の再生を促進させるのに最適なウロキナーゼ投与プロトコルを確立することを目的とする。

さらに、マウス骨格筋を免疫組織化学的にさらに生化学的に解析し、筋再生での各種筋骨格蛋白の関与を明らかにする。さらに、肢帯型筋ジストロフィー (LGMD) 2B 原因遺伝子である *dysferlin* 欠損マウスである *SJL/J* マウスにウロキナーゼを投与し、筋壊死・再生の関係を *in vivo* で明らかにする。

3. 研究の方法

筋壊死・再生モデルマウスにウロキナーゼを投与し、筋再生促進の程度を解析する。

1) ウロキナーゼ投与プロトコルの確立

予備実験から、10 μ Mのcardiotoxin投与により筋壊死・再生モデルの作製が可能である。そこで、このモデルマウスに6万、60万、600万単位のウロキナーゼを投与し、投与後2日、4日、7日、10日、20日後の骨格筋の変化を後述の免疫組織学的・生化学的・分子生物学的手法で解析し、ウロキナーゼ投与量と筋再生ステージとの関連を検討する。

2) 運動量の解析

骨格筋障害モデルマウスをウロキナーゼ投与群と非投与群に大別し、実験動物の行動変化 (運動量、運動負荷時の耐久力の検討) の分析を行う。行動分析はデジタル解

析し、定量的評価を行う。運動負荷終了後に採血を行い、血清クレアチンキナーゼなどの骨格筋逸脱酵素の継時的変化も検討し、運動量との関連を検討する。

3) 免疫組織学的検討

運動負荷実験終了後、下肢の近位筋と遠位筋、体幹筋から骨格筋を取り出し、組織化学染色を行う。ルーチンの組織化学染色に加え、赤筋と白筋の分別可能な ATPase 染色を施行する。ウロキナーゼ・uPAR・Plg-Rの免疫染色に加え、阻害物質であるプラスミノゲンインヒビターの発現を検討する。筋再生のマーカーとしては *myosin heavy chain developmental, neonatal, Desmin, neural cell adhesion molecule* を使用し、連続切片でウロキナーゼ・uPAR・Plg-R 発現を確認後多重染色を施行する。

4) 生化学的検討

ウロキナーゼ活性の測定としては、各ステージの筋肉を用いwestern blottingを行い、ウロキナーゼ・uPAR・Plg-Rの蛋白量を測定する。

5) 分子生物学的検討

ウロキナーゼの動態を検討するため、生検筋からRNAを取り出しRt-PCR法でメッセンジャーレベルを解析する。解析にはリアルタイムPCR法を用い、内部コントロールと比較し、内因性のウロキナーゼ・uPAR・Plg-Rの継時変化を検討する。

II) 筋ジストロフィーモデルマウスでの検討

Duchenne型筋ジストロフィーマウスのモデルであるMdxマウスや、*Dysferlin*遺伝子異

常モデルであるSJL/Jマウスはいずれも骨格筋の構成蛋白異常により筋障害が進行する。さらに筋壊死が高度に進行し、筋再生が不十分なため筋萎縮が進行し、運動障害が出現する。これらのマウスにウロキナーゼを投与し適切な投与時期や投与量が検討できれば、筋ジストロフィーでの使用が可能となり、これらの副次的な筋障害が回避され、筋再生が増進するものと推測される。

ウロキナーゼ投与による骨格筋再生へ関与の検討 (培養筋)

①ウロキナーゼ阻害因子の検討

予備実験から、筋芽細胞の融合にウロキナーゼが必要なことは判明している。ウロキナーゼ投与量とuPAR・Plg-Rの発現および筋芽、筋管細胞形成の関連を検討する。さらにプラスミノゲンインヒビターを投与し、培養筋細胞阻害因子の程度を検討する。

②免疫組織学的検討

培養細胞を用いウロキナーゼの免疫染色に加え、uPAR・Plg-Rの発現を検討する。筋再生のマーカーとしてはmyosin heavy chain developmental ,neonatal, Desmin, neural cell adhesion moleculeを使用する。

③ 分子生物学的検討

ウロキナーゼ・uPAR・Plg-Rの動態を検討するため、培養筋からRNAを取り出しRt-PCR法でメッセンジャーレベルを解析する。解析にはリアルタイムPCR法を用い、内部コントロールとの比較やuPAR・Plg-Rの継時変化を検討する。

筋壊死・再生マウスモデルでのウロキナーゼの作用が確立され次第、以下の実験に取り込

む予定である。

①ウロキナーゼ・uPAR・Plg-Rアウトマウスを用いた検討

ノックアウトマウスでは、純粹にウロキナーゼの作用が検討できる。そこで、ウロキナーゼやプラスミノゲンノックアウトマウスにcardiotoxinを投与し筋壊死を誘発させノックアウトマウスにウロキナーゼを全身投与しその効果を検討する。

② ウロキナーゼ徐放剤の開発

これまで、ウロキナーゼの臨床応用上の問題として、投与法が注射に限られることがあげられる。経皮的な徐放剤の開発は、これらの欠点を補う。

4. 研究成果

ウロキナーゼはプラスミノゲンをプラスミンに変換するが、プラスミンの最も知られている作用は血栓融解であり、ウロキナーゼは脳梗塞患者に広く用いられている。プラスミノゲンは遊離状態でもウロキナーゼの作用を受けるが、プラスミノゲン受容体(Plg-R)と結合したプラスミノゲンは受容体に結合したままプラスミンに変換され、この、Plg-Rと結合したプラスミンはプラスミンインヒビターの作用を受けず、プラスミン活性が長期間維持される。また、ウロキナーゼそのものもウロキナーゼ受容体(uPAR)に結合し、標的細胞への作用が促進される。このようなplasminogen activation systemは血栓融解以外にも組織修復にも関与し、近年では、①筋芽細胞の融合にPlg-Rが必要なこと②プラスミノゲンノックアウトマウスでは筋再生が遅延することが報告されている。そこ

で我々は、多発筋炎・皮膚筋炎患者の生検筋を用い①ウロキナーゼ②uPAR③Plg-Rの分布を免疫組織学的に検討した。その結果、ウロキナーゼやuPAR,Plg-Rは再生過程にある筋線維の筋細胞膜・筋細胞質に発現しており plasminogen activation systemが炎症性筋疾患の筋再生過程に関与する可能性が示唆された(図1)。

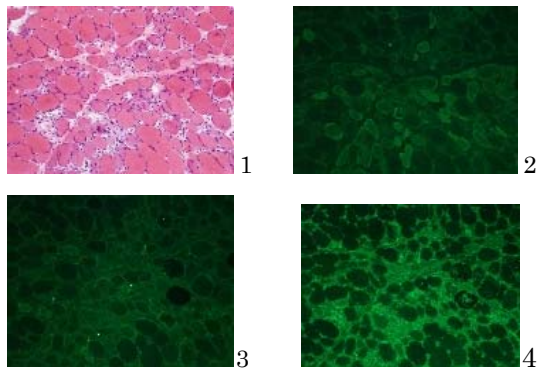


図1 1:HE 2.PLG-R 3.uPAR 4.Urokinase

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Polyneuritis cranialis caused by varicella zoster virus in the absence of rash. Murata K-Y, Miwa H, Kondo T. Neurology; 74 :85-6. 2010 (査読あり)
2. A dysphagia study in patients with inclusion body myositis. Murata K, Kouda K, Miwa H, Kondo T: Neuromuscular Disorders. 20: 631-632, 2010 (査読あり)
3. 紀伊半島南部地域における筋萎縮性側索硬化症—和歌山県内多発地域における最近の発症率の推移と臨床像の変化. 紀平 為子, 吉田 宗平, 村田顕也. Brain and nerve 62, 72-80, 2010 (査読あり)
4. パーキンソン病患者の脊柱起立筋の臨床病理学的検討. 村田顕也, 三輪英人, 近藤智善. 脳21. 13: 347-347, 2010
5. 脊髄腫瘍と鑑別を要したアトピー性脊髄炎の1例 寺下浩平, 南出晃人, 吉田宗人, 村田顕也, 近藤智善. 臨床整形外科. 45: 665-669, 2010 (査読あり)
6. Analysis of the plasminogen activating system during muscle fiber regeneration in cardiotoxin injured muscle fibers. Murata K, Miwa H, Kondo T; Neurology 72. A 20-20, 2009 (査読あり)
7. Paraspinal muscle changes in parkinson' s disease patients with scoliosis. Murata K-Y, Kajimoto Y, Miwa H, Kondo T: Mov Disord 24 S203-203, 2009 (査読あり)
8. Cardiotoxin 損傷モデルマウスの筋再生過程における plasminogen activating system の検討. 村田顕也, 三輪英人, 近藤智善. 神経治療学 26: 337-337. 2009 (査読あり)
9. 筋萎縮性側索硬化症患者における経皮内視鏡的胃瘻造設術の検討. 村田顕也, 三輪英人, 近藤智善. The Japanese Journal of Rehabilitation Medicine. 46. S264-264, 2009 (査読あり)
10. Analysis of the plasminogen activating system during muscle fiber regeneration in inflammatory myopathy. Murata K, Kodama R, Miwa H, Kondo T: Neurology 70. A 304-304, 2008 (査読あり)
11. 脊髄小脳変性症の摂食・嚥下機能と訓練方法 (脊髄小脳変性症のリハビリテーション). 牧野 直弘, 田島 文博, 村田 顕也:. Monthly book medical rehabilitation 93, 31-36, 2008

12. 封入体筋炎の嚙下障害の検討. 村田 顕也,
後藤 正樹: The Japanese Journal of
Rehabilitation Medicine . 45, S165-165,
2008 (査読あり)
13. 炎症性筋疾患の筋再生過程における
plasminogen activating system の検討.
村田顕也, 三輪英人, 近藤智善. 神経治
療学. 25 .302-302, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. 村田顕也: Cardiotoxin 損傷モデルマウ
スの筋再生課程における palasminoge
activating system の検討 第 27 回日
本神経治療学会総会 熊本 2009 6/11
-12
2. Murata K, Kajimoto Y, Miwa H, Kondo
T:Paraspinal muscle changes in Parkinson's
disease patients with scoliosis MDS 13th
International congress, Paris, June 7-11,2009
3. 村田顕也: 炎症性筋疾患における
palasminogen activating system の検討
第 50 回日本神経学会総会 仙台 2009
5/20-22
4. Murata K, Miwa H, Kondo T: Analysis of
plasminogen activating system during
muscle regeneration in cardiotoxin-injured
muscle fibers. American Academy of
Neurology 61st Annual meeting, Seattle, 2
5, April 2009.
5. Murata K, Kodama R, Miwa H, Kondo T:
Analysis of plasminogen activating system
during muscle regeneration in inflammatory
myopathy. American Academy of Neurology
60th Annual meeting, Chicago, 12-19, April
2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 顕也 (MURATA KENYA)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号：90264853

(2) 研究分担者

檜皮谷 泰寛 (HIWATANI YASUHIRO)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：40404542

三輪 英人 (MIWA HIDETO)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50231626

近藤 智善 (KONDO TOMOYOSHI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：50103891

梶本 賀義 (KAJIMOTO YOSHINORI)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20398457

児玉 理恵子 (KODAMA RIEKO)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：20336887

(3) 連携研究者

なし