

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03161

研究課題名(和文) 間葉系前駆細胞の老化を基軸とした炎症性筋疾患の新規病態進行機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of a novel pathogenic progression mechanism of inflammatory muscle disease based on the senescence of mesenchymal progenitor cells.

研究代表者

山内 啓太郎 (Yamanouchi, Keitaro)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：70272440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：筋ジストロフィーは進行性の筋力低下を伴う疾患で、特にデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)は重篤かつ致死性でありその治療法の開発が望まれている。DMDモデルのmdxマウスは軽症であるが、我々はヒトDMDの症状を忠実に再現するDMDラットを開発し、DMDラット骨格筋では細胞老化因子p16が発現し、老化細胞が病態進行に關与する可能性を示した。p16欠損による老化細胞出現阻止や老化細胞除去薬ABT263の投与により、DMDラットの筋力や体重減少が改善し、線維化や脂肪化が減少した。さらに、DMDラット舌筋はジストロフィン欠損に対する抵抗性を示し、筋線維の壊死や再生がほとんどみられないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性の遺伝性疾患であるデュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)の治療法としてはこれまで遺伝子治療、細胞移植治療の開発に主眼が置かれてきた。本研究成果により、これらに加えて老化細胞を標的とした新たな治療法開発の蓋然性が提示された。また、老化細胞を標的とした治療法開発はDMDにとどまらず、他の炎症性疾患へも敷衍できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Muscular dystrophy is a progressive muscle weakness disorder, with Duchenne muscular dystrophy (DMD) being particularly severe and fatal. Consequently, the development of effective treatments is of paramount importance. While the widely used DMD model, the mdx mouse, exhibits mild symptoms, we have developed a DMD rat model that faithfully reproduces the severe symptoms of human DMD. In the skeletal muscles of these DMD rats, we observed the expression of the cellular senescence marker p16, suggesting that senescent cells may play a role in disease progression. Inhibiting the emergence of senescent cells through p16 knockout or administering the senolytic drug ABT263 improved muscle strength and mitigated weight loss, fibrosis, and adipogenesis in DMD rats. Furthermore, we observed that the tongue muscles of DMD rats exhibited resistance to dystrophin deficiency, with minimal muscle fiber necrosis or regeneration.

研究分野：筋再生学

キーワード：筋再生 細胞老化 筋ジストロフィー 筋前駆細胞 間葉系前駆細胞 ラット

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは骨格筋線維の壊死・再生と持続的な炎症を主徴とし、進行性の筋力低下を認めるヒトの炎症性筋疾患である。中でも筋線維の強度維持に関わるジストロフィン欠損するデュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、筋力低下に起因する歩行障害や呼吸不全を伴い、最終的には若齢で死に至る極めて重篤な疾患である。DMD モデルとして広く利用されている mdx マウスは、ヒト DMD と同様にジストロフィン欠損するが、筋力低下はみられず、症状も軽度である。そのため、DMD の病態進行機序を個体レベルで探るうえでは必ずしも適切ではない。我々は、ジストロフィン欠損したラット（DMD ラット）の作出に世界で初めて成功した。DMD ラットは、加齢性に病態が進行し、体重減少や筋力低下、間質の線維化や脂肪化、持続的な炎症などヒト DMD の症状を忠実に反映した優れたモデルである。

細胞老化は、細胞が不可逆的に分裂を停止した状態で、細胞ががん化することを防ぐために備わった機構であるとされてきた。しかし最近では、炎症による酸化ストレスなど、細胞周囲の環境変化によって早期誘導されることが明らかとなっている。我々は、DMD ラット骨格筋において、生後 3 ヶ月で p16 をはじめとする細胞老化因子の発現がみられ、これが病態進行とともに増加すること、さらに SA-bGal 陽性の老化細胞が高率に出現していることを見いだした。p16 や SA-bGal の発現は主に間質に存在する間葉系前駆細胞にみられた。ヒト DMD 骨格筋でも加齢性に p16 の発現が観察されたことから、病態進行に伴い、老化細胞が蓄積していると考えられる。

老化細胞は一般に細胞老化随伴分泌現象（Senescence-Associated Secretory Phenotype : SASP）とよばれる形質変化をおこす。我々は、老化間葉系前駆細胞が分泌する因子が、筋前駆細胞である筋衛星細胞（筋芽細胞）同士との融合による筋線維の再生をほぼ完全に阻害することを報告している。従って、DMD ラット骨格筋にみられる老化間葉系前駆細胞の蓄積は筋再生の持続的抑制を生じることで、病態悪化に関わると考えられる。

2. 研究の目的

以上を背景として、本研究では老化細胞の蓄積が DMD の病態進行にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) p16 欠損 DMD ラットの表現型解析

p16 欠損ラットを CRISPR/Cas 法を用いて作製し、DMD ラットと交配させることで p16 欠損 DMD ラットを得た。得られた p16 欠損 DMD ラットの体重や筋力を経時的に測定し、DMD ラットや野生型ラットと比較した。採取した骨格筋から切片を作製し、通常の HE 染色に加え、マッソントリクローム染色により線維化の程度を、ペリリピンに対する免疫染色により脂肪化の程度を、胎子型ミオシン重鎖に対する免疫染色により筋再生の程度をそれぞれ定量的に解析した。骨格筋から採取した単核の細胞に対する Pax7 や MyoD の染色を行い

筋前駆細胞数を定量的に解析した。SASP 因子の遺伝子発現は骨格筋から抽出した RNA を用いて半定量的 RT-PCR を行うことで解析した。

(2) DMD ラットへの老化細胞除去薬 ABT263 の投与

ABT263 および溶媒を 7 日間連続経口投与し、2 週間の休薬期間をおいたのち、さらに 7 日間投与した。その後の解析については (1) と同様である。

(3) ヒト骨格筋試料における遺伝子発現

健常者 10 名、DMD 患者 35 名分の骨格筋試料を、国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの西野一三博士、小笠原真志博士より分与を受け遺伝子発現解析に供した。ヒト試料の利用にあたっては国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センターの倫理委員会の承認 (A2019-031) および東京大学大学院農学生命科学研究科のヒトを対象とする研究倫理審査委員会の承認 (19-322) をそれぞれ受けた。

(4) DMD ラットの舌筋の解析

野生型ラットおよび DMD ラットより舌と下肢筋を採取し、組織学的解析や遺伝子発現解析を行った。

4 . 研究成果

(1) 老化細胞の出現阻止や除去は DMD ラットの病態を改善する

p16 欠損により、DMD ラットの体重増加がみられ筋力の回復も観察された。また、病態末期に観察される線維化や脂肪化の程度は減少し、同時に再生筋線維数も増加していた。再生筋線維数の増加には筋前駆細胞の増加が伴っていた。興味深いことに DMD ラット骨格筋で生じている SASP 因子の発現増加のうち、TGF- β 1 や CTGF、MMP2 については p16 欠損により大きく減少した。以上の結果は、細胞老化が DMD ラットの病態形成に深く関与しており、老化細胞の出現阻害が病態を軽減させるという当初の予想に合致したものであった。

そこで別のアプローチとして、老化細胞除去薬である ABT263 を DMD ラットに 2 週間経口投与した。その結果、体重減少や筋力低下が阻止された。この結果も、老化細胞の存在が DMD ラットの病態悪化に深く関与することを支持するものであった。

DMD ラット骨格筋にみられる老化細胞の出現という現象がヒト DMD 骨格筋でも同様であるかについて検証した。その結果、ヒト骨格筋サンプル (健常者 10 名、DMD 患者 35 名) において細胞老化因子 p14、p16、p21 の発現は DMD 患者でのみ観察された。

以上の結果から、ヒト DMD において細胞老化は有効な治療標的となる可能性が強く示された。

(2) DMD ラット舌はヒト DMD と同様に巨舌を呈するがジストロフィン欠損に抵抗性である

DMD ラットの舌は野生型ラットに比べて大きく、巨舌であることがわかった。さらに組織学的な解析を行ったところ、驚くべきことに DMD 舌筋ではジストロフィン欠損にもかかわらず

わず筋線維の壊死や再生がほとんどみられなかった。また、細胞老化もおこっておらず、筋前駆細胞数も野生型ラットと同様に維持されていた。この結果は、舌筋にはジストロフィンの欠損に対する抵抗性を示す未知の機序が存在することを示すものである。

(3) その他

DMD ラットへの骨格筋移植系の確立

DMD ではほぼ全身の骨格筋が侵されることから、DMD 骨格筋から産生された SASP 因子は血流を介して全身性に作用するものと考えられる。そこでこの仮説を検証するための前段階として正常ラット由来の骨格筋（長趾伸筋）を他個体のラットへと移植し、移植筋の壊死・再生を観察する系を確立した。現在までに DMD ラットへ移植した筋では著しい再生遅延が生じることが確認されている。

DMD ラット骨格筋線維における p16 の発現

DMD ラット骨格筋では筋線維にも p16 が発現していることを見出した。p16 は細胞周期を停止する作用をもつ因子であるが、これがそもそも細胞分裂能をもたない筋線維に発現している意義については不明である。そこでその意義について探るためのモデルとして全身性に筋線維特異的に p16 を発現するトランスジェニックラットの作製に着手した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yamanouchi K, Nakamura K, Takeuchi S, Hosoyama T, Matsuwaki T, Nishihara M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Suppression of MyoD induces spontaneous adipogenesis in skeletal muscle progenitor cell culture.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anim Sci J	6. 最初と最後の頁 e13573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13573.	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 Teramoto N, Ikeda M, Sugihara H, Shiga T, Matsuwaki T, Nishihara M, Uchida K, Yamanouchi K.	4. 巻 83
2. 論文標題 Loss of p16/lnk4a drives high frequency of rhabdomyosarcoma in a rat model of Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Med Sci	6. 最初と最後の頁 1416-1424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1292/jvms.21-0243.	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 Fujikura Y, Sugihara H, Hatakeyama M, Oishi K, Yamanouchi K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Ketogenic diet with medium-chain triglycerides restores skeletal muscle function and pathology in a rat model of Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e21861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202100629R.	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 Sugihara H, Kimura K, Yamanouchi K, Teramoto N, Okano T, Daimon M, Morita H, Takenaka K, Shiga T, Tanihata J, Aoki Y, Inoue-Nagamura T, Yotsuyanagi H, Komuro I.	4. 巻 61
2. 論文標題 Age-dependent echocardiographic and pathologic findings in a rat model with Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9 genome editing.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 1279-1284
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.20-372.	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 Teramoto N, Sugihara H, Yamanouchi K, Nakamura K, Kimura K, Okano T, Shiga T, Shirakawa T, Matsuo M, Nagata T, Daimon M, Matsuwaki T, Nishihara M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Pathological evaluation of rats carrying in-frame mutations in the dystrophin gene: A new model of Becker muscular dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dis Model Mech	6. 最初と最後の頁 dmm044701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.044701	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 Sugihara H, Teramoto N, Nakamura K, Shiga T, Shirakawa T, Matsuo M, Ogasawara M, Nishino I, Matsuwaki T, Nishihara M, Yamanouchi K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cellular senescence-mediated exacerbation of Duchenne muscular dystrophy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 16385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73315-6.	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山内啓太郎、中村克行、竹内志帆、Linh-Chi DAM、池田優成、松脇貴志、西原真杉
2. 発表標題 MyoD欠損ラットは新生子致死を呈する(Unexpected perinatal death of MyoD-deficient rats)
3. 学会等名 第128回 日本畜産学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田優成、松脇貴志、西原真杉、山内啓太郎
2. 発表標題 細胞老化因子p16発現が筋前駆細胞の分化・融合に与える影響
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口陸、竹内志帆、中村克行、Akbot Kurmangaliyeva、松脇貴志、西原真杉、山内啓太郎
2. 発表標題 再生骨格筋の血管新生におけるCSPG4の役割の解明 (Role of CSPG4 on angiogenesis during muscle regeneration)
3. 学会等名 第164回 日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉原英俊、寺本奈保美、中村克行、松脇貴志、西原真杉、山内啓太郎
2. 発表標題 細胞老化の抑制はデュシェンヌ型筋ジストロフィーの病態を軽減する
3. 学会等名 第6回 日本筋学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 山内啓太郎
2. 発表標題 細胞老化は炎症性筋疾患の治療標的となりうる
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会シンポジウム「細胞・組織・個体老化と再生医療」 (招待講演)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 杉原英俊、寺本奈保美、中村克行、松脇貴志、西原真杉、山内啓太郎
2. 発表標題 細胞老化によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー病態悪化機構の解明
3. 学会等名 第163回 日本獣医学会
4. 発表年 2020年～2021年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------