

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07356

研究課題名(和文) 筋肉障害及び修復におけるデスミンリン酸化の生理的・病態的意義の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the physiological and pathological significance of desmin phosphorylation in muscle damage and repair

研究代表者

山川 大史 (Yamakawa, Daishi)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20631097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：筋特異的中間径フィラメントタンパク質であるデスミンのリン酸化不全マウスは、野生型マウスと比べ、骨格筋障害後の筋再生が遅延する。本研究では、障害初期の筋組織解析から、デスミンリン酸化不全マウスでは、有意に筋線維サイズが小さく、細胞核数も少なかったため、筋芽細胞の増殖あるいは融合の遅延が考えられた。マウス筋肉からの筋芽細胞の初代培養を行い、上記仮説を検討したが、増殖や融合には変化は見られなかった。一方で、デスミンリン酸化不全マウス由来筋芽細胞では、デスミンタンパク質の凝集が観察され、フィラメントとしての安定性の消失が判明した。さらに血液解析では、血中トリグリセリド値の上昇が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中間径フィラメントタンパク質のリン酸化は、細胞分裂時に適切にフィラメントを脱重合し、細胞分裂を完了させるために必須の生体現象である。そのため、中間径フィラメントのリン酸化不全は、細胞分裂障害を引き起こし、早期老化症状の病態形成に寄与することが分かってきた。筋特異的中間径フィラメントタンパク質であるデスミンはヒトにおいてもリン酸化部位の変異が見つかっており、これを元に生じる筋疾患をデスミノパチーと呼ぶ。しかし、筋組織は他細胞と異なり、細胞融合を伴う特別な組織であるため、本研究におけるデスミンリン酸化の生理的意義解明は、このような筋疾患の病態解明及び治療法開発の一助となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：A muscle-specific intermediate filament protein, desmin phosphorylation-deficient mice have delayed muscle regeneration after skeletal muscle injury compared with wild-type mice. In this study, muscle tissue analysis at the early stage of injury revealed that desmin phosphorylation-deficient mice had significantly smaller muscle fiber sizes and fewer cell nuclei, suggesting delays in myoblast proliferation or fusion. Primary cultures of myoblasts from mouse muscle were performed to test the above hypothesis, but no change in proliferation or fusion was observed. On the other hand, desmin protein aggregation was observed in mouse-derived myoblasts derived from desmin phosphorylation-deficient mice, indicating a loss of filament stability. Furthermore, blood analysis confirmed an increase in serum triglyceride levels.

研究分野：病態生理学

キーワード：中間径フィラメント 骨格筋 デスミン リン酸化 筋再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞骨格の一つである中間径フィラメントが細胞分裂時にリン酸化し脱重合することは、細胞分裂に必要不可欠である。研究代表者の所属する研究グループでは、間葉系細胞に特異的に発現する中間径フィラメントタンパク質であるビメンチンのリン酸化不全が細胞分裂障害をきたし、多核細胞や染色体の異数体細胞を高発現させ、遺伝子改変マウスによる個体レベルでは早期老化現象(白内障、創傷治癒の遅延など)を誘発することを明らかにしてきた。しかし、細胞融合により多核となる筋線維は、中間径フィラメントリン酸化の機能についてほとんど分かっていなかった。研究代表者は筋特異的の中間径フィラメントタンパク質であるデスミンに着目し、これまでにデスミンのリン酸化不全マウスを作製し、組織学的解析を実施してきた。過去の報告からデスミン欠損マウスは、心筋の表現型が強く観察され、心筋断裂による炎症の誘発、そして線維化が見られ、心不全をきたして、突然死を引き起こすことが知られていた。しかし、研究代表者が新規に作製したデスミンリン酸化不全マウスは心筋の線維化は見られず、野生型マウスと同等の生存期間を有した。一方で、組織学的には心筋においてデスミンタンパク質の減少などが見られることから、デスミン欠損マウスを比較対象に、デスミンリン酸化の生理的意義を明らかにしていく必要性が出てきた。ヒトにおいても、デスミンリン酸化部位の変異が確認されており、デスミンのリン酸化の生理的意義を明らかにする本研究の推進によって、デスミンリン酸化に関連する筋障害の病態形成機構の解明に貢献できると考えた。

2. 研究の目的

デスミンのリン酸化不全マウスを利用し、これまでに明らかになっていなかった筋組織の中間径フィラメントリン酸化の生理的意義を明確にすることが本研究の目的である。特に、事前研究結果から、骨格筋組織の病態形成に大きく関与することが示唆されたため、マウス骨格筋の筋障害モデルを用いた組織障害及び再生機構への関与を詳細な組織学的解析から研究を進め、骨格筋再生過程におけるデスミンリン酸化の重要性を明確にする。

3. 研究の方法

骨格筋損傷マウスモデルにおける筋障害度及び筋修復能の評価

野生型マウス(C57BL6J)、デスミンリン酸化不全マウス、ビメンチンリン酸化不全マウスを使用し、骨格筋障害を誘導した。骨格筋障害誘導には、50%グリセロールをマウス前脛骨筋に注射する筋障害モデルに加え、1.2%BaCl₂投与モデルについても検討し、表現型の共通性を評価した。コントロールとしては、反対足に生理食塩水を同量注射した。骨格筋障害後、0、3、5、7、10、14、21、28日に前脛骨筋を回収し、組織学的解析に使用した。解析の指標としては、ヘマトキシリン・エオジン染色より、修復および再生の経時的変化の評価を行った。また、詳細な細胞特異的な変化を観察するために、細胞及び細胞小器官を識別できる各種特異的のマーカー抗体を用いて標識し、蛍光免疫染色にて組織学的評価を行った。

筋幹細胞の増殖及び成熟筋線維への分化能力の評価

組織学的変化を細胞レベルで明らかにするため、下肢骨格筋を回収し、ディスペーゼ II 及びコラゲナーゼタイプ II を用いた酵素処理、その後フィルター処理によって細胞を単一細胞レベルに分離し、筋幹細胞・筋芽細胞の培養を実施した。本細胞を用い、細胞増殖、コロニー形成試験を実施し、細胞増殖への影響を確認した。また、分化誘導培地添加により、細胞融合及び筋線維分化誘導を実施した。幹細胞性には、筋幹細胞特異的のマーカーである Pax7 を指標とし、さらに中間径フィラメントはビメンチンを指標とした。成熟した筋線維では中間径フィラメントであるデスミンが陽性となることを指標とし、分化過程はビメンチンからデスミンへの転換割合で評価を行った。また、Myogenin や MyoD、MYH3 など筋増殖性や筋分化度を知ることができる特異的のマーカーの指標も評価した。

筋細胞の分裂異常と早期老化現象の組織学的評価

筋細胞の細胞分裂異常の確認をするために、組織レベル及び細胞レベルにおいて、細胞核の状態を評価した。組織レベルではデスミン陽性組織における細胞核を評価した。また、筋線維断裂や線維化などの病態形成の出現有無を確認した。線維化は、ビメンチン陽性細胞及び alpha-SMA 陽性細胞の陽性細胞を評価した。

血液学的検査による栄養代謝機能への影響評価

5ヶ月齢の野生型及びデスミンリン酸化不全マウスの心臓より採血を実施し、血清を分離後、マイナス 80 度冷凍庫にて保管した。血液検査のため、オリエンタル酵母工業株式会社に血液学的検査を外注した。

4. 研究成果

骨格筋損傷マウスモデルにおける筋障害度及び筋修復能の評価

50%グリセロール障害誘導モデルでは、野生型マウスに比べ、デスミンリン酸化不全マウスの骨格筋組織障害後の再生が顕著に遅延することが分かった。当研究グループの過去の研究から、ピメンチンリン酸化不全マウスは細胞分裂障害による早期老化現象が出現することから、デスミンリン酸化不全マウスでも、細胞分裂障害が原因で再生能力が低下している可能性が示唆された。また、同時に解析に使用していたピメンチンリン酸化不全マウスでも、骨格筋障害後の軽度の筋再生遅延が見られた。しかし、骨格筋障害後の筋組織では血球や線維芽細胞など、多くの細胞がピメンチン陽性細胞であることが判明し、筋再生遅延の原因追及は困難となるため、ピメンチンリン酸化不全による筋細胞の直接の影響を知るためには、筋幹細胞・筋芽細胞の培養系で検討する必要があることを明らかにできた。

骨格筋障害後、壊死組織に筋幹細胞および筋芽細胞の増殖が見られる。これら細胞の増殖性を評価するため、障害後5日目の組織について、増殖筋特異的マーカーとしてMYH3を使用し、組織学的評価を行った。デスミンリン酸化不全マウスの再生筋の筋線維径は、野生型マウスのものに比べて明らかに小さかった。また、一つの筋線維に含まれる核数もデスミンリン酸化不全マウスでは有意に少なかった。このことから、筋芽細胞の増殖あるいは、筋細胞の融合の能力がデスミンリン酸化不全マウスでは低下していることが推測された。

デスミン欠損マウスはミトコンドリア形態の異常が過去に報告されている。これを参考に、デスミンリン酸化不全マウスにおけるミトコンドリアへの影響を組織学的に評価した。ミトコンドリアの識別のため、シトクロームC及びTOMM20に対する抗体で標識した。しかし、形態学的異常や数の変化は観察されなかった。そのため、デスミン欠損とは異なるメカニズムで骨格筋障害後の表現型が誘発されていることが示唆された。

筋幹細胞の増殖及び成熟筋線維への分化能力の評価

野生型マウス及びデスミンリン酸化不全マウスの下肢筋肉を回収し、酵素処理、フィルター処理を介して分離した単一細胞をプレーティングし、筋幹細胞及び筋芽細胞を培養した。まず増殖能力の評価を行った。細胞増殖、コロニー形成のどちらの評価においても、両マウス由来細胞間での差は見られなかった。そこで次に、分化誘導試験を実施した。筋幹細胞及び筋芽細胞は中間径フィラメントタンパク質としてピメンチンを発現しており、分化とともにデスミンへと変換される。これを蛍光免疫染色にて評価した。しかし、この段階の分化に関しても変化は見られなかった。さらに分化誘導を進めると今度は、筋細胞の融合が生じ、筋管細胞が形成される。これを評価した。筋管細胞の量に関しては、両細胞間で、変化は見られなかったが、筋管細胞内のデスミンタンパク質の局在に変化がみられた。野生型マウス由来細胞では、細胞質広範にデスミンが局在していたが、デスミンリン酸化不全マウス由来細胞では、デスミンタンパク質の凝集が見られ、細胞質内に斑点状に局在していた(図)。このことから、デスミンのリン酸化はフィラメントとしての安定性に関与し、リン酸化不全によって、不安定な状態を誘導していることが推測された。

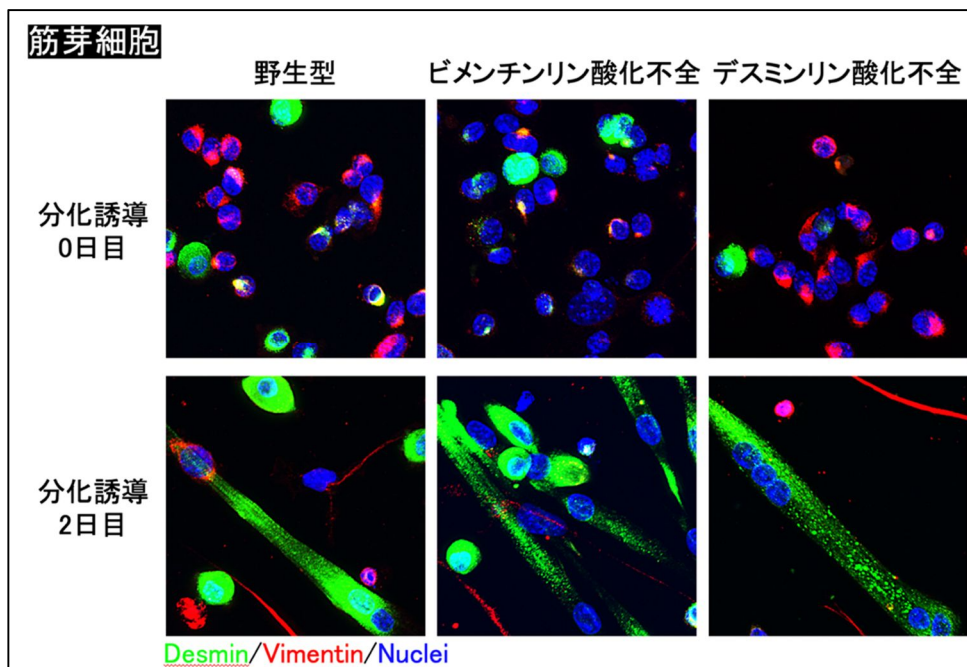


図.筋芽細胞の分化誘導におけるデスミンフィラメントの凝集

筋細胞の分裂異常と早期老化現象の組織学的評価

骨格筋障害後組織で、障害前組織も含め、筋線維に含まれる細胞核の形態や数の変化について検討した。細胞核については、上述の組織解析のように、障害後早期の再生筋において、デスミンリン酸化不全マウスでは、筋線維サイズが小さく、核数が少ないことが分かった。一方で、細胞分裂過程におけるフィラメントの脱重合の異常でフィラメントの切断が完了せずに残存するフィラメントのような構造物を持つ異常な細胞、異常な核の形態などは観察できていない。目視での検出は困難な部分もあることから、今後はソフトウェアなどの利用を考慮し、適切な評価系の構築が重要と考えられる。また、本研究期間では実施できなかった FISH 解析なども今後の検討課題である。

次にビメンチンリン酸化不全マウスで見られた早期老化現象の有無を確認した。しかし、デスミンリン酸化不全マウスでは、骨格筋の萎縮やマウスの個体サイズ・重量などに老化現象と結びつく変化は観察されなかった。一方で、上述したような筋線維の再生が遅延するという組織学的知見は、老化現象とも結びつく可能性は残されている。また、筋障害後 21、28 日目といった後期ステージの解析が不十分であるので、線維化の亢進や炎症細胞の増加などが見られるかどうかは今後の評価の検討課題である。

血液学的検査による栄養代謝機能への影響評価

骨格筋は、運動・姿勢の維持に重要なだけでなく、栄養代謝の観点からも重要な器官である。デスミンリン酸化不全マウスは野生型マウスに比べ、体重が増加することがあったが、個体差もある。そこで、栄養代謝への影響の基礎的知見を明らかにするため、血液検査を実施した。検体としては、野生型マウスとデスミンリン酸化不全マウスの 8、12、20 週齢の血液を採取した。本研究期間には、20 週齢の血清について検査を実施し、デスミンリン酸化不全マウスでは中性脂肪の値が有意に高くなっていることを明らかにできた。一方、心筋障害との関連を示す CK 値及び電解質関連は野生型マウスとほとんど変化が見られなかった。この結果から、今後は脂質代謝に注目した研究を進めていく必要がある。一方で、組織学的解析から、4 週齢以降、心臓のデスマンタンパク質の発現量低下が見られることから、骨格筋と合わせて、心筋の影響も同時に研究対象として考慮する必要性が考えられる。

以上より、今後は、間質や炎症性細胞の増減、細胞周期解析や死細胞解析など、まだ検討すべき課題に取り組むとともに、筋線維タイプの構成割合が変化することによって、栄養代謝能が変化している可能性も視野に入れた研究を実施していく。

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 6件）

1. 著者名 Yamakawa D, Tsuboi J, Kasahara K, Matsuda C, Nishimura Y, Kodama T, Katayama N, Watanabe M, Inagaki M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cilia-Mediated Insulin/Akt and ST2/JNK Signaling Pathways Regulate the Recovery of Muscle Injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Adv Sci (Weinh).	6. 最初と最後の頁 e2202632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202202632.	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 Nishimura Yuhei, Yamakawa Daishi, Shiromizu Takashi, Inagaki Masaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Aurora A and AKT Kinase Signaling Associated with Primary Cilia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3602 ~ 3602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123602	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 Nishimura Yuhei, Yamakawa Daishi, Uchida Katsunori, Shiromizu Takashi, Watanabe Masatoshi, Inagaki Masaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Primary cilia and lipid raft dynamics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Open Biology	6. 最初と最後の頁 210130 ~ 210130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1098/rsob.210130	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 Jia Weizhen, Kong Lingyu, Kidoya Hiroyasu, Naito Hisamichi, Muramatsu Fumitaka, Hayashi Yumiko, Hsieh Han-Yun, Yamakawa Daishi, Hsu Daniel K., Liu Fu-Tong, Takakura Nobuyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2118 ~ 2118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22346-2	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 Shiromizu Takashi, Yuge Mizuki, Kasahara Kousuke, Yamakawa Daishi, Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa, Inagaki Masaki, Nishimura Yuhei	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting E3 Ubiquitin Ligases and Deubiquitinases in Ciliopathy and Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5962 ~ 5962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21175962	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 Yamakawa Daishi, Katoh Daisuke, Kasahara Kousuke, Shiromizu Takashi, Matsuyama Makoto, Matsuda Chise, Maeno Yumi, Watanabe Masatoshi, Nishimura Yuhei, Inagaki Masaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Primary cilia-dependent lipid raft/caveolin dynamics regulate adipogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108817 ~ 108817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108817	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7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 西村 有平、山川 大史、白水 崇、稲垣 昌樹
2. 発表標題 一次線毛は脂質ラフトの動態制御を介して脂肪細胞分化に関与する
3. 学会等名 第51回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白水 崇、山川 大史、稲垣 昌樹、西村 有平
2. 発表標題 ゼブラフィッシュヒレ再生における一次線毛の役割
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西村 有平、山川 大史、白水 崇、渡邊 昌俊、稲垣 昌樹
2. 発表標題 組織修復における一次繊毛制御因子トリコプレインの新たな役割
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamakawa D, Tsuboi J, Kasahara K, Matsuda C, Nishimura Y, Kodama T, Katayama N, Watanabe M, Inagaki M.
2. 発表標題 Primary cilia regulate the recovery of muscle injury through insulin/Akt and ST2/JNK signaling pathways
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia Conference Cilia & Centrosomes (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠原広介、山川大史、稲垣昌樹
2. 発表標題 ユビキチン修飾系による一次線毛動態制御と疾患治療
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山川大史、笠原広介、渡邊昌俊、稲垣昌樹
2. 発表標題 一次線毛形成制御による肥満・脂肪肝の抑制
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣昌樹、笠原広介、山川大史、松田知世、渡邊昌俊
2. 発表標題 一次線毛と細胞増殖・分化・がん化
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	稲垣 昌樹 (Inagaki Masaki) (30183007)	三重大学・医学系研究科・客員教授 (14101)	

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