

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K19711

研究課題名（和文）失禁予防の基盤となる骨盤周囲筋に特異的な筋再生制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Specific Muscle Regeneration Control Mechanisms in Pelvic Floor Muscles for Incontinence Prevention

研究代表者

吉岡 潔志 (Yoshioka, Kiyoshi)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：10857262

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）：本研究では、排泄制御に深く関与する骨盤底筋の筋萎縮と筋再生の特徴を、四肢筋と比較し明らかにすることを目的とした。去勢術後のマウスを用いた実験では、骨盤底筋の萎縮が四肢筋と比べて顕著であることが示された。さらに、筋組織幹細胞であるサテライト細胞の異所性移植実験では、骨盤底筋由来の細胞はメス及び去勢術を行ったホストの筋で小さな再生筋線維しか形成できなかった。これらの結果により、筋再生医療において由来する筋肉の特性を考慮する必要があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで骨格筋の萎縮や再生は、身体内の筋を一様なものとして研究がなされていた。よって、骨格筋の萎縮・肥大・筋再生制御に関する知見は、四肢筋を対象とした研究によって明らかにされてきている。しかし、骨盤底筋は性ホルモンの影響を強く受けて発生しており、本研究においても、四肢筋とはことなる制御を受け、筋量を保っていること、また、筋再生においても性ホルモンの影響を大きく受けるということが明らかとなった。これらの成果は、排泄機能を制御する骨盤底筋の機能維持や効率的な筋再生方法の開発にとって重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate and compare the characteristics of muscle atrophy and muscle regeneration in the pelvic floor muscles, which are deeply involved in excretory control, with the limb muscles. Using mice subjected to castration, the experiment revealed that the atrophy of the pelvic floor muscles was significantly more pronounced compared to the limb muscles. Additionally, in the heterotopic transplantation experiment of satellite cells, which are muscle tissue stem cells, cells derived from the pelvic floor muscles were only able to form small regenerating muscle fibers in the female and castrated host muscles. These results indicate the importance of considering the characteristics of the source muscle in muscle regeneration therapy.

研究分野：リハビリテーション

キーワード：筋再生 骨盤底筋 異所移植

## 1. 研究開始当初の背景

排泄制御機能の維持は生活の質(QOL, quality of life)の維持にとって重要である。排泄制御には、主に骨盤底筋と呼ばれる、骨盤腔内に存在する筋群が関与している。効果的なりハビリテーション介入の確立のためには対象となる筋の特性について理解する必要があるが、筋の生理学的知見の多くは四肢筋を対象とした研究により得られたものである。近年、身体内の筋は均質ではなく、身体部位という単位で異なる特性を持つことが明らかにされつつある。例えば、遺伝性筋疾患の病態発現部位は、疾患ごとに影響を大きく受ける部位と、影響をほとんど受けない部位とがある、ということが知られている。我々はこれまでに、発生起源となる細胞集団が大きく異なる、頭部筋と四肢筋の筋再生制御の違いについて調べたところ、Hoxa10 が健全な四肢筋再生には重要である一方で、同一マウス個体内の筋であっても頭部筋の再生には関与しないということを実証した。(Yoshioka, et al. Sci. Adv. 2021)<sup>1</sup>

しかし、骨盤底筋の特性については不明な点が多い。男性の排尿障害と深い関わりを持つ前立腺は、アンドロゲンの刺激を受け肥大することから、前立腺がんに対して、睾丸摘出や、薬剤を用いたアンドロゲン除去療法(ADT; Androgen deprivation therapy)が選択される。ところが、マウスのアンドロゲンシグナル低下モデルにおいて、直腸を取り囲む様に存在する球海綿体筋及び肛門挙筋(いずれも骨盤底筋の一つ)は、四肢筋と比べ劇的に萎縮することが知られている。また、ADT を選択した前立腺がん患者においても、肛門挙筋の萎縮は報告されており、骨盤底筋の筋機能の維持回復のための効果的な介入を確立するためには、骨盤底筋の特性を、明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、睾丸摘出によるアンドロゲン低下モデルマウスを用い、排泄制御に関与する筋の萎縮や、筋再生に対する影響を調べることである。

## 3. 研究の方法

睾丸摘出を用いたアンドロゲン低下モデルマウスの作成

3ヶ月齢の雄マウス(C57BL/6J)を用いた。麻酔下にて睾丸摘出術を施す Cast 群と、偽手術を施す Sham 群に無作為に分けた。術傷は縫合系にて閉創した。本研究は所属施設動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号; A30-098, 1703161367-25)

### 筋線維単離

長趾伸筋と尿道括約筋の筋線維を単離した。長趾伸筋の筋線維へ過度な張力がかからないよう後肢から取り出した。尿道括約筋は、尿道を輪状に取り囲む様に存在しており、尿道を 5 mm カットし尿道ごと取り出した。採取したそれぞれの筋を、0.2 %の Type I collagenase (Worthington)を含む DMEM (Gibco)1.5 ml に浸し、37 °C でインキュベートした。インキュベート中、10 分ごとに転倒混和し溶液を浸透させた。長趾伸筋は 90 分、尿道括約筋は 150 分インキュベートし、筋線維がほぐれたのを目視で確認した。ほぐれた筋線維を移し DMEM 中に浮遊させ BSA コートしたパスツールピペットで単離された筋繊維を回収した。回収した浮遊筋線維は DMEM で希釈した 2% PFA (Nacalai tesque)にて固定した。

尿道括約筋には様々な定義があり、大きくは、尿道を括約する平滑筋である内尿道括約筋と、横紋筋である外尿道括約筋とに分けられる。平滑筋は単核の細胞、横紋筋は多核の細胞なので、筋線維を形成する尿道括約筋は全て外尿道括約筋である。尿道の括約に関与する横紋筋はさらに、骨盤底筋群(PFM, Pelvic floor muscle)からなる横紋筋の一部として尿道を括約する横紋筋、および尿道壁自体を形成する横紋筋(PUS, Peri-urethral sphincter)に分けられる。本研究で筋線維直径を測定したのは、尿道壁を構成する PUS である。

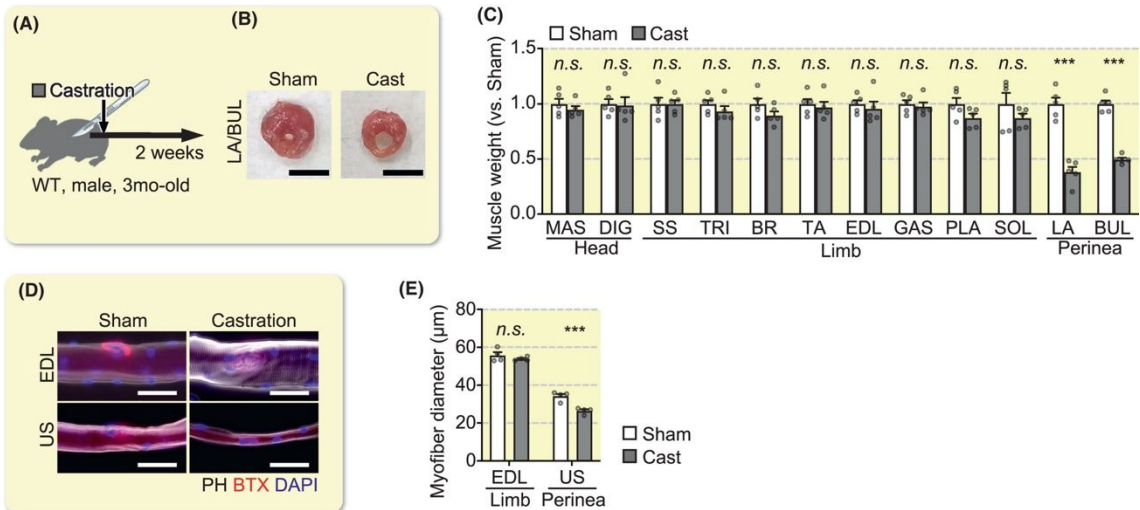
### 細胞移植実験

細胞移植のため、ホストマウスとして mdx マウスを使用した。Mdx マウスはオス、去勢術を行ったオス、メスをを用いた。麻酔下にて後肢に局所的に 18 Gy の 線照射を行い、内因性の衛星細胞を除去した。その後、Cardiotoxin を前脛骨筋に注入し、Pax7-YFP ノックインマウスの後肢筋(TA, EDL, GAS, PLA, SOL)または骨盤筋(LA, BUL)から FACS Aria II フローサイトメーター(BD Immunocytometry Systems, CA)を使用して分離された  $1 \times 10^4$  個の YFP+衛星細胞を mdx マウスの TA 筋に移植した。

## 4. 研究成果

### (1) アンドロゲン低下により骨盤底筋群は顕著な筋萎縮を呈する

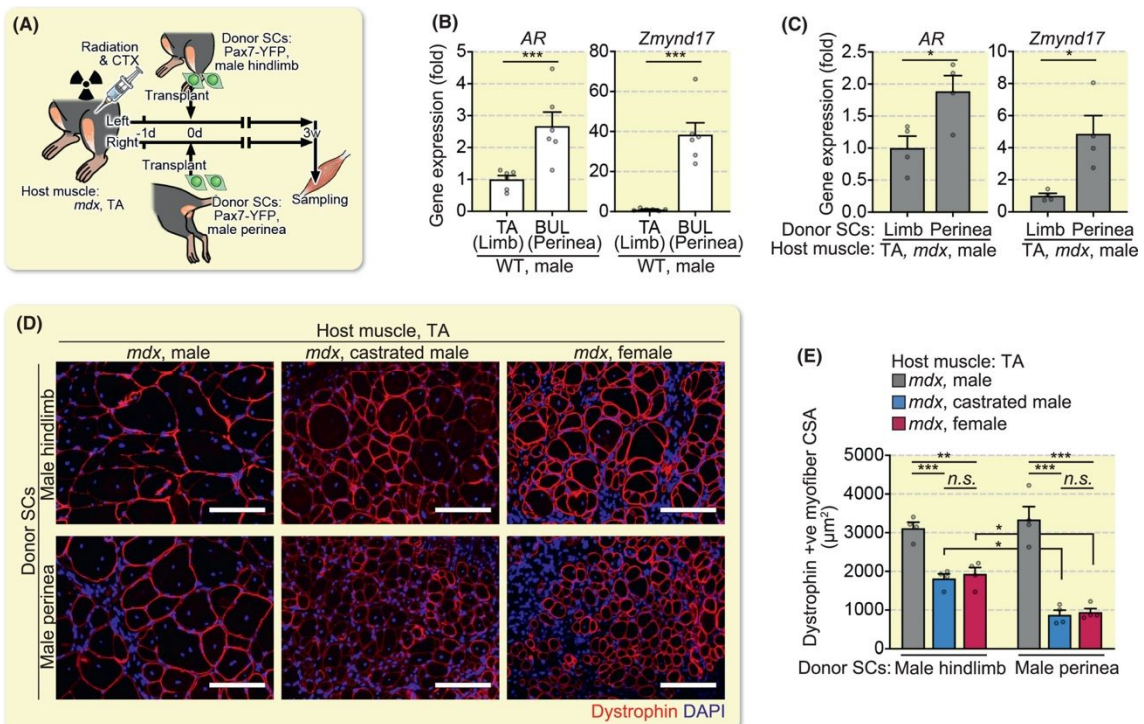
去勢によるアンドロゲン低下モデルマウス、及び偽手術を施したマウスの骨格筋重量を、術後 2 週間後に比較したところ、これまでに報告されているように、肛門挙筋、球海綿体筋において劇的な筋萎縮が観察された。その一方で、四肢筋の筋重量には影響がみられなかった。肛門挙筋や球海綿体筋と同様に、骨盤腔内に存在している尿道括約筋の筋萎縮をしらべるため、尿道壁から筋繊維を単離し直径を測定したところ、こちらも去勢による筋萎縮がみられた。これらの結果は、排泄制御に関与する骨盤底筋が四肢筋とは異なる制御によって筋量を保っていることを示す。



去勢によるアンドロゲン低下モデルの部位特異的な筋肉への影響 (A) 前立腺摘出手術(Cast)を行い、2週間後に筋サンプルを採取した。(B) LA および BUL の筋肉組織の代表的な画像。(C) 手術後2週間後の筋肉重量比率 (sham vs. cast) (各5匹のマウス、 $n = 5$ )。(D) EDL および US から分離された筋線維の代表的な画像。(E) 個別の筋線維の直径 (各4匹のマウス、1匹あたり30筋線維を測定した。 $n = 4$ )。スケールバー =  $50 \mu\text{m}$ 。エラーバーはSEMを示す。\* $P < .05$ 、\*\* $P < .01$ 、\*\*\* $P < .001$ 。MAS、咬筋; DIG、顎二腹筋; SS、棘上筋; TRI、上腕三頭筋; BR、腕橈骨筋; TA、前脛骨筋; EDL、長指伸筋; GAS、腓腹筋; PLA、足底筋; SOL、ヒラメ筋; LA、肛門拳筋; BUL、球海綿体筋; US、尿道括約筋 (Yoshioka, et al. *Acta physiol.* 2020 を引用<sup>2</sup>)

(2) 異所移植を行った骨盤底筋由来の筋サテライト細胞の筋再生能はアンドロゲン低下の影響を大きく受ける

筋再生能を担う筋サテライト細胞の特性を明らかにするため、異所移植をおこなった。移植から3週間後、骨盤底筋由来の筋サテライト細胞を移植した前脛骨筋は、骨盤底筋の遺伝子発現 (*AR*, *Zmynd17* の高発現) を引き継いだ。また、骨盤底筋由来サテライト細胞を、オス・去勢したオス・メスに移植したところ、去勢したオスとメスの宿主筋では、ごく小さな筋しか形成することができず、筋サテライト細胞由来部位の形質を強く引き継ぐことが明らかとなった。これらの結果は、ホストの状態を考慮した適切な移植幹細胞の選出が、効率的な細胞移植による筋再生に重要であることを示唆するものである。



異所移植を行った骨盤底筋由来筋衛星細胞の筋再生能。(A) 移植の模式図。TA (ホスト: *mdx* マウス) にガンマ線を照射し、CTX注射により事前に筋損傷を起こした。四肢筋または骨盤底筋 (ドナー: Pax7-YFP マウス) 由来の筋衛星細胞を各種ホストマウスのTAに移植した。(B) TA

および BUL の遺伝子発現の qPCR 解析 (各 6 匹のマウス、n = 6)。 (C) 移植先ホスト TA の遺伝子発現の qPCR 解析 (各 4 匹のマウス、n = 4)。 (D) 筋横断面の免疫組織化学的な代表的な画像。スケールバー = 100  $\mu$ m。 (E) ジストロフィン陽性筋線維のうち、横断面積上位 50 本の平均 CSA (各 4 匹のマウス、n = 4)。エラーバーは SEM を示す。 \*P < .05、\*\*P < .01、\*\*\*P < .001。 BUL、球海綿体筋; TA、前脛骨筋。(Yoshioka, et al. *Acta physiol.* 2020 を引用<sup>2</sup>)

## 引用文献

- 1 Yoshioka, K. *et al.* Hoxa10 mediates positional memory to govern stem cell function in adult skeletal muscle. *bioRxiv*, 2020.2007.2016.207654, doi:10.1101/2020.07.16.207654 (2020).
- 2 Yoshioka, K., Kitajima, Y., Seko, D., Tsuchiya, Y. & Ono, Y. The body region specificity in murine models of muscle regeneration and atrophy. *Acta Physiol (Oxf)*, e13553, doi:10.1111/apha.13553 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshioka Kiyoshi, Kitajima Yasuo, Seko Daiki, Tsuchiya Yoshifumi, Ono Yusuke	4. 巻 231
2. 論文標題 The body region specificity in murine models of muscle regeneration and atrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Physiologica	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/apha.13553	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 Yoshioka Kiyoshi, Kitajima Yasuo, Okazaki Narihiro, Chiba Ko, Yonekura Akihiko, Ono Yusuke	4. 巻 8
2. 論文標題 A Modified Pre-plating Method for High-Yield and High-Purity Muscle Stem Cell Isolation From Human/Mouse Skeletal Muscle Tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.00793	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
---------------------------	-----------------------	----

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