

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09213

研究課題名(和文) マウスモデルを用いた筋変性のメカニズム解明とMRIによる筋再生バイオマーカー探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of muscle degeneration using a mouse model and search for biomarkers of muscle regeneration using MRI

研究代表者

辻 収彦 (Tsuji, Osahiko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任准教授

研究者番号：70424166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肩関節腱板損傷・変性モデル(腱板構成筋の切離、脱神経、骨頭切除)を行い、筋脂肪変性を効率的に再現するモデルを作成した。更には、より臨床に近いマウス肩関節腱板損傷モデルを、脱神経・骨頭切除を行わず腱板損傷のみで作成し、老齢(50週齢以上)のマウスを用いることで再現性をもって作成することに成功した。その結果、更に腱板構成筋の中で肩甲下筋の著明な変性と脂肪変性を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小動物マウスで安定した腱板損傷作成に成功し、その筋変性の病態の詳細な解析を行った。腱板構成筋(棘上筋、棘下筋、肩甲下筋)の中で、棘下筋に有意な重量減少並びに脂肪変性が認められた。一方で、線維化については各筋間で差は無かった。また、マウス下肢筋を用いた拡散MRI撮像条件を検討し、小動物を用いた筋変性解析の基盤を構築できた。

研究成果の概要(英文)：We created a mouse rotator cuff injury/degeneration model (rotator cuff component muscle dissection, denervation, and osteotomy) that efficiently recapitulates muscle fatty degeneration. Furthermore, a more clinically relevant mouse rotator cuff injury model was created using only rotator cuff injury without denervation or osteotomy, and was successfully reproduced using old (>50-week-old) mice. As a result, we further confirmed marked degeneration and fatty degeneration of the subscapularis muscle among the rotator cuff component muscles.

研究分野：整形外科

キーワード：筋変性 腱板損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動器組織の中でも骨格筋は高い再生能力を有する組織であるが、加齢や病的環境下ではその能力が低下し、筋変性(脂肪浸潤、線維化、萎縮)が生じることが知られている。また重度の損傷・長期間経過後の線維化や脂肪変性は手術加療抵抗性であることも知られている。こうした筋の変性は不可逆的な現象と考えられており、骨格筋の機能を著しく低下させる。これは特に、加齢性変化による筋萎縮の進行した高齢者や、高い運動能力を要求されるアスリートにおいて重要な問題となる。例えば実臨床においては、脊椎術後の脊柱後方筋萎縮による難治性の軸性疼痛や、縫合不可能な陳旧性肩腱板損傷などの問題にしばしば直面する。これらの病態に共通している予後規定因子は、筋脂肪変性と線維化の度合いである。更には本邦での急速な高齢化社会の進展に伴い、サルコペニア・フレイルに関連する運動器疾患は慢性痛の原因となり、脂肪変性と線維化の予防並びに改善のためにはその分子メカニズムの解明は非常に重要であると考えられる。東京都健康長寿医療センター上住らの先行研究では、筋再生には骨格筋の基底膜に存在する筋衛星細胞(CD56+)が幹細胞としての役割を担っており、CD56陽性細胞は脂肪分化を来さないことが知られている。一方筋肉内には筋衛星細胞と異なる系譜の間葉系前駆細胞が間質に存在し、この間葉系前駆細胞はPDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) 陽性であり、筋肉の脂肪変性・線維化に関わっていることが報告されている[Uezumi A, J Cell Sci 2011]。申請者らはこれまでに、先行研究としてマウス肩関節腱板損傷・変性モデルを作成し肩関節の腱板構成筋の切離と脱神経、骨頭の切除を組み合わせることで、効率的に筋脂肪変性・線維化が生じることを高い再現性を持って確認してきた[Shirasawa H, Sci Rep 2017]。更には、筋線維間質に存在する間葉系前駆細胞のマーカであるPDGFRプロモータ下に赤色蛍光蛋白tomatoを発現する遺伝子改変マウス(PDGFR⁺-tomato Tgマウス)を用いることで、上述の上住らの報告から筋脂肪変性・線維化に関わるとされる間葉系前駆細胞が、申請者らのモデルにおいても腱板切離後にtomato陽性細胞が浸潤し脂肪へ脂肪変性・線維化と密接に関わっていることを明らかとし、PDGFRシグナルを抑制するimatinib投与によりtomato陽性細胞の間質内への遊走が抑えられることも示した。

このように確かにPDGFR陽性細胞が筋脂肪変性に関与していることが確認できている。しかし、本研究で用いたモデルは脱神経と骨頭を切除して筋脂肪変性と線維化を再現し作成できるモデルであるが、非常に極端な動物モデルで有り実臨床の病態とは大きく異なっているが問題となる。

2. 研究の目的

実臨床において筋損傷・萎縮の程度は様々である。軽度の所謂肉離れ(筋部分損傷)であれば安静・保存加療により筋線維の自然治癒力ともいえる再生能により改善できるが、例えば中～重度の肩腱板損傷となると手術加療を要し、また陳旧化した場合は極度の線維化・脂肪変性を呈する症例では手術による腱板修復を行っても予後不良であることをしばしば経験する。また脊椎疾患でも頸椎術後の頸椎後方伸筋群萎縮による軸性疼痛は未だ解決できていない、患者のQOLに関わる大きな問題として現前している。腱板損傷に関しては、これまでの申請者らの研究室で継続して行ってきたマウス肩関節腱板損傷・変性モデルにより再現性を持って筋脂肪変性・線維化モデルを作成可能となり、またPDGFR⁺-tomato Tgマウスを用いて間葉系幹細胞と線維化・脂肪変性の機序について病態解明の研究を進めてきたが、実臨床において最も必要とされるのは「どのような状態の筋・腱板損傷であれば手術で治し得るのか」ということが予測可能なバイオマーカーである。適切な治療介入時期を見極めることで、手術で治療・改善可能な症例に対しては外科的介入を、手術を行っても予後不良な状態に対しては外科的治療の限界であり、再生医療の観点から新たな介入方法の探索を行う必要があると考えている。

3. 研究の方法

実際の腱板損傷症例の病態を反映したモデルを作成するため、先行研究[Andrew R, Journal of Shoulder and Elbow Surgery 2018]に倣い腱板構成筋の付着部での切離と、再接着予防のための断端切除を行なったマウス(腱板損傷モデル)を作成した。また、より組織容積の大きい下肢を用いた解析のため、極端な脂肪変性を呈する坐骨神経切断モデルも作成した。これらを用いてMRI撮像を試みた。

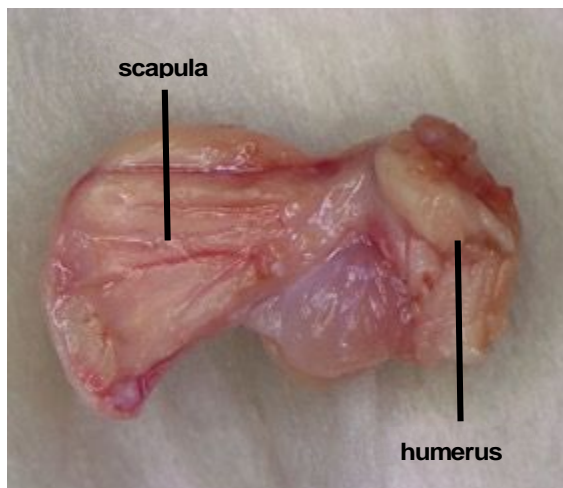
4. 研究成果

マウス肩関節腱板損傷・変性モデル(腱板構成筋の切離、脱神経、骨頭切除)を行い、筋脂肪変性を効率的に再現するモデルを作成し、更により臨床に近いマウス肩関節腱板損傷モデルを、脱神経・骨頭切除を行わず腱板損傷のみで作成し、老齢(50週齢以上)のマウスを用いることで再現性をもって作成することに成功した(図1)。その結果、更に腱板構成筋の中で肩甲下筋の著明な変性、筋重量低下と脂肪変性を確認した(図2,3)。

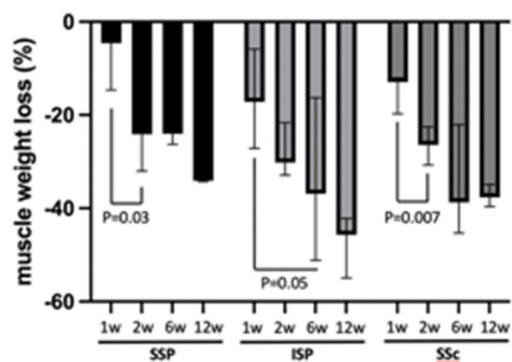
これらの肩関節腱板損傷モデルマウスのMRI撮像を試みたが、筋線維が微細なため腱板構成筋での有意な解析結果を得ることは困難であった。当施設でのマウス管理施設の管理工事・クリーンナップによる一時マウス管理中止の影響、及びCOVID-19再流行に伴う他施設への頻回な出入

りが忌避されたことにより、特に MRI 撮像に関する研究計画の進捗が遅れているが、マウス下肢を ex vivo にて撮像する MRI シークエンス条件検討を行い、坐骨神経切断モデルを用いた解析が令和 5 年度末現在進行中である。

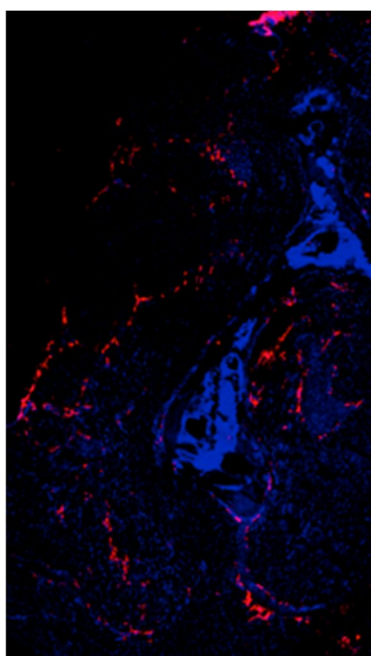
(図 1) 腱板損傷モデル後のマクロ図



(図 2) 腱板損傷後の棘上筋、棘下筋、肩甲下筋の経時的重量低下



(図 3) 腱板損傷後の脂肪変性像



DAPI/Perilipin

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀬戸貴之、辻収彦、松村昇、中村匠、前田康介、高橋慶行、依田昌樹、堀内圭輔、中村雅也
2. 発表標題 腱板断裂における腱板構成筋変性機序の評価
3. 学会等名 第37回日本整形外科学科基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋慶行、依田昌樹、辻収彦、堀内圭輔、渡辺航太、中村雅也
2. 発表標題 廃用性筋萎縮における骨格筋間葉系前駆細胞の機能解析
3. 学会等名 第37回日本整形外科学科基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋慶行、依田昌樹、辻収彦、堀内圭輔、渡辺航太、中村雅也
2. 発表標題 廃用性筋萎縮における骨格筋間葉系前駆細胞の機能解析
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会
4. 発表年 2022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	畑 純一 (Hata Junichi) (00568868)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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	依田 昌樹 (Yoda Masaki) (30464994)	慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教 (32612)	
研究分担者	藤吉 兼浩 (Fujiyoshi Kanehiro) (80365303)	独立行政法人国立病院機構村山医療センター（臨床研究部）・整形外科・医長 (82660)	

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