

令和 4 年 10 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15410

研究課題名(和文) 筋肉障害発症・進展におけるGFXの役割とその治療に向けた基盤構築

研究課題名(英文) The role of GFX in muscle disorders and treating myopathy

研究代表者

五藤 大貴 (GOTO, HIROKI)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50770913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】当グループは、障害細胞由来成長因子(GFX)が血管平滑筋細胞増殖および損傷に応答した新生内膜形成を調節することを報告した。ここでは、GFXが骨格筋傷害モデルマウスにおいて骨格筋再生にどのように関与するかを検討した。

【方法・結果】Cardiotoxinをマウスの下肢筋に注射し、モデルマウスを作成。まず障害筋肉でGFXが増加することを確認した。GFX中和抗体投与群ではコントロール群と比較し、組織学的・生化学的に骨格筋再生において負の関与を示した。マウス組換えGFX投与群では相反する結果を確認した。

【結論】以上より、GFXは筋肉疾患治療のための新しい標的であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋では加齢、廃用、脱神経など様々な要因で障害が起こるとされ、障害後の骨格筋細胞のアポトーシスや筋衛星細胞の再生不全は、サルコペニアの発症・進展の要因の一つであると知られている。申請者グループが血管障害実験において見出したGFX(growth factor-X)が、骨格筋障害後の筋再生およびリモデリングへ関与していることを提唱し、本研究に置いてGFXが障害筋肉組織における骨格筋細胞再生に明らかに関与していることを証明した。本研究結果により、GFXが今後、サルコペニアや骨格筋再生治療の分子標的として臨床応用につなげ得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have reported that apoptotic cells-derived growth factor (called GFX) regulated vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation in response to injury. Cardiotoxin(CTX) was injected into the left gastrocnemius muscle of mice. We observed injured muscle had increased GFX gene and protein expressions. GFX blocking with its neutralizing antibody accelerated CTX related muscle changes in microstructure and performance. The amounts of proteins or mRNAs for p-Akt, p-mTOR and p-p38MAPK, Pax7, and MyoD and the numbers of CD34+/integrin-7+ MuSCs and proliferating cells in the muscles and bone-marrow were reduced by GFX depletion; and these changes were improved by the treatment with mouse recombinant GFX(r-GFX). Finally, we observed that r-GFX also ameliorated muscle changes in microstructure and performance. These findings suggest that apoptosis-driven expression of GFX is thus a novel target for the treatment of apoptosis-based muscle disorder.

研究分野：老年医学

キーワード：骨格筋再生 サルコペニア 骨格筋障害

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、最近血管壁に障害(内頸動脈の結紮ならびにカフ装着)を惹起することにより、中膜平滑筋細胞にアポトーシスが誘導され、それらアポトーシス誘導細胞において発現が亢進し、周囲に分泌され、組織修復(再生)に關与する増殖因子(GFX、特許出願準備中)の同定に成功した。この増殖因子のリコンビナントを作成したところ、リコンビナント GFX は平滑筋細胞の増殖を著しく亢進し、ERK、mTOR、GSK-3 のリン酸化を誘導したが、PDGF などの中和抗体では抑制されず、この GFX の受容体の同定にも成功した。この増殖因子を中和抗体で抑制するか、または in vivo で GFX の siRNA を障害血管で作用させると血管の障害後の組織修復(再生)が抑制されることを確かめた。

研究代表者は、このアポトーシスに伴い発現が亢進する GFX は血管に限らず、多くの組織でアポトーシス後におこる組織修復(再生)に關連しているのではないかと、この仮説を立て、まず骨格筋における組織修復(再生)、さらにはサルコペニアへの關与を明らかにすることを計画した。この計画を立てる上で、培養骨芽細胞 C₂C₁₂ においてアポトーシスを誘導することにより、GFX の発現亢進が起こることを確認している。

2. 研究の目的

研究代表者は血管壁に障害(アポトーシス)を誘導した際に、アポトーシス誘導細胞で強発現し、放出される paracrine 増殖因子(GFX)を見出し、GFX が障害後の組織修復(再生)に重要な役割を果たしていることを明らかにした(特許申請準備中・論文投稿中)。当該研究の目的は研究代表者が見出した GFX の骨格筋障害後の筋再生への役割を明らかにすることである。骨格筋では加齢、廃用、脱神経など様々な障害によりアポトーシスが誘導されることが知られる。老化などによりその再生能が低下すると、修復遅延、さらにはサルコペニアの要因となり得る。今回、研究代表者は GFX が骨格筋での組織修復に關与し、今後サルコペニアなどへの臨床応用につなげ得るチャレンジングな課題を検討する。

3. 研究の方法

マウス(C57BL/6)四肢骨格筋に障害(アポトーシス)を誘導後、血管と同様に GFX が誘導され、組織再生に關連しているかどうかを明らかにし、さらに GFX のシグナル経路を解明することを計画した。

(1) 16 週齢の C57BL/6 の片側下肢腓腹筋に cardiotoxin (CTX) を 20 μ l (40 μ M CTX) を注射し、継時的に 0day, 3day, 7day, 14day に組織を摘出し、組織学的、生化学的に以下のように解析した(n=5 \times 4 群)。

固定、標本作成後、H&E 染色による筋細胞の修復ならびに炎症細胞の浸潤を評価。抗

ミオシン抗体(速筋用、遅筋用) デスミン抗体での骨格筋再生能評価、抗 PCNA 抗体による増殖細胞の同定ならびに抗 GFX 抗体、抗 GFX 受容体抗体を用い発現細胞を同定する; mRNA を抽出し RT-PCR により Pax7, MyoD, cyclinB1 を測定する; タンパク質解析(western blotting): ERK 1/2, mTOR, GSK-3, AKT のリン酸化などを検討する。

(2) GFX 中和抗体の組織再生への効果の検討
GFX の中和抗体(300 μ g/kg \cdot day)を CTX 投与日を 0day とし、投与後 0day, 3day, 7day, 10day に皮下注射し、組織修復への効果を検証した。

(3) リコンビナント GFX 投与による効果の検討
リコンビナント GFX [(rmGFX) 200 μ g/kg \cdot day] を CTX 投与後 0day, 3day, 7day, 10day に下肢骨格筋に筋肉注射し、組織修復への効果を検証した。

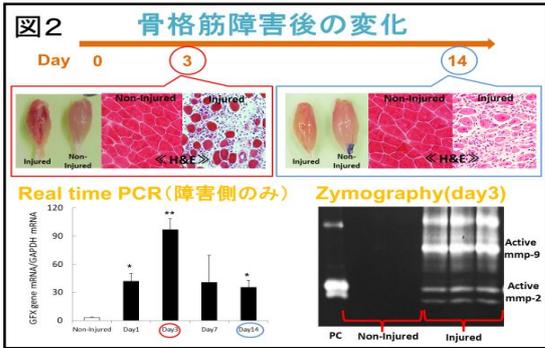
4. 研究成果

(1) 研究代表者は、骨格筋の障害(アポトーシス)後に GFX が誘導され、組織再生に關連していることを検証するため、骨格筋障害モデルマウスを作製することから始めた。野生型マウス(9 週齢雄, C57BL/6J)の片側下肢骨格筋に心臓毒[Cardiotoxin (CTX), 1.3mmol/kg \cdot day]を投与する方法で、骨格筋障害(アポトーシス)モデルを作成した。CTX 投与に關しては 40 μ M/100 μ l 群と 20 μ M/200 μ l 群の 2 群を作成し、HE 染色を用いてそれぞれの筋障害度を比較した。結果、20 μ M/200 μ l 群にて筋障害が安定して生じることが判明し、その後の実験では CTX 濃度 \cdot 投与量としては 20 μ M/200 μ l を用いた。

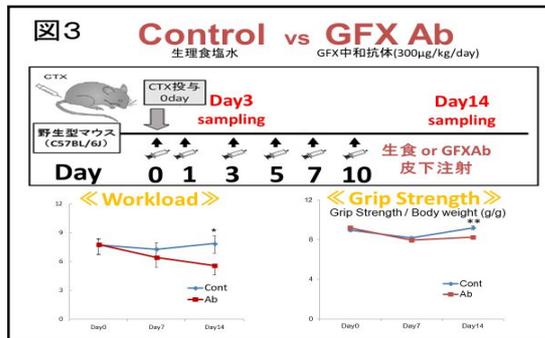
(2) CTX 投与した骨格筋障害モデルマウスと 0.9% 生食を投与したコントロール群を、トレッドミル運動能力テストおよび四肢握力測定にて比較した。トレッドミル運動能力テストでは走行時間、走行距離、傾斜角度より垂直方向への仕事量を測定した。結果、仕事量は障害後 3~14day における両群比較にて、CTX 投与群で有意差をもってより低下し、四肢握力検査では障害 7 \cdot 14day における両群比較にて、CTX 投与群で有意に低下した(図 1)。



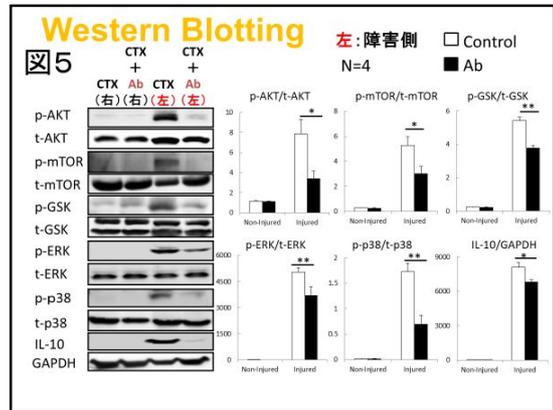
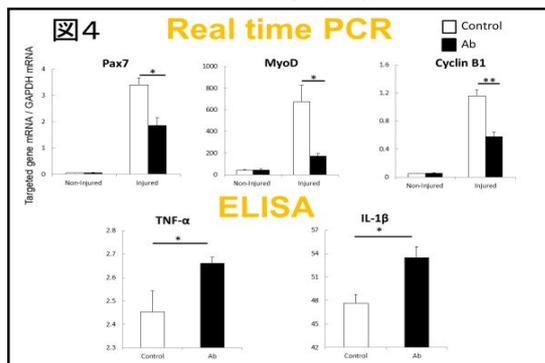
(3) CTX 投与後 1.3.7.14day の各サンプルを、定量 PCR 法にて GFX の mRNA 発現量を CTX 生食投与群と比較した。結果、1 日目のサンプルにてコントロールの 13 倍、3 日目のサンプルにてコントロールの 30 倍の GFX mRNA 発現を認めた (図 2)。その後 7 日目と 14 日目にかけて発現の減少が認められた。この結果から、骨格筋のリモデリングと再生において GFX が大きく関与している可能性が考えられた。



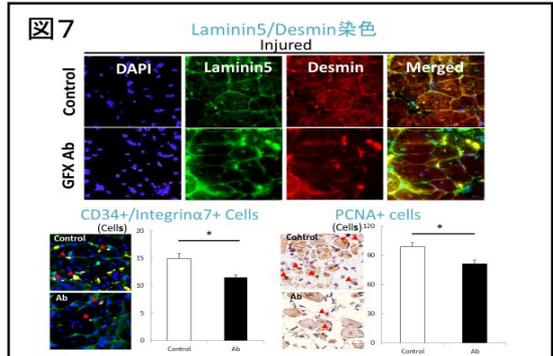
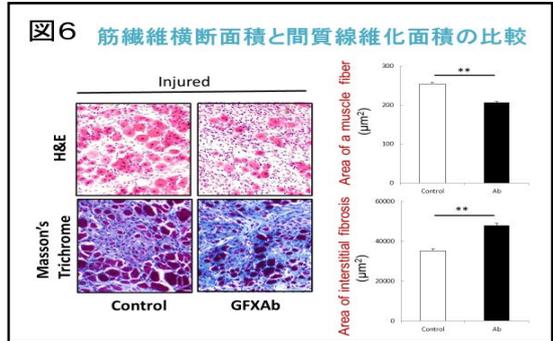
(4) GFX 中和抗体投与 (300 μ g/kg \cdot day; CTX 投与後 0, 1, 3, 5, 7, 10day) 後、計画書どおりにサンプリングと解析を行った。その結果、運動機能の変化は GFX 中和抗体投与群において回復の遅延が認められた (図 3)。



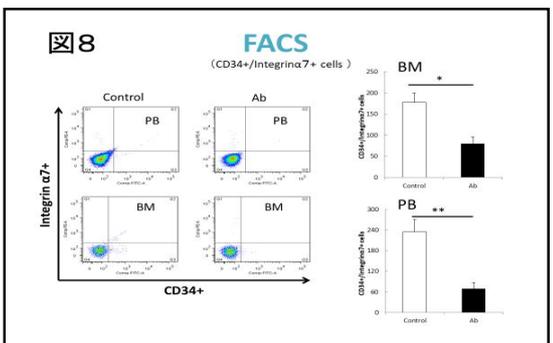
また、中和抗体投与と 3 日目の定量 PCR 解析において、生食投与群と比較して、GFX 中和抗体投与による骨格筋分化の指標である Pax7 や MyoD および増殖の指標である cyclinB1 の著明な mRNA 発現の抑制が観察され、血清を利用した ELISA では炎症の指標となる TNF- α , IL-1 の発現亢進が認められた (図 4)。また、Western Blotting 法では GFX 中和抗体投与群において AKT, GSK などのリン酸化の誘導抑制が確認された (図 5)。



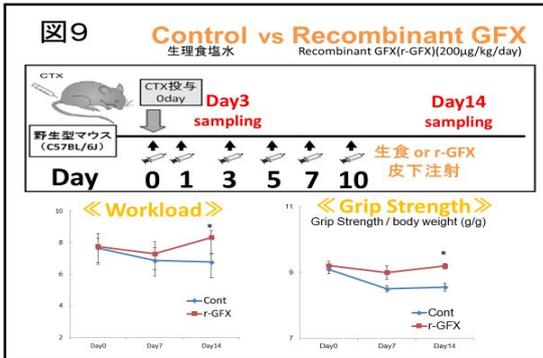
(5) 14 日目の組織学的解析において、GFX 中和抗体投与による再生骨格筋の減少と間質の線維化面積の増加 (図 6) ならびに骨格筋幹細胞 (CD34/integrin α 7) 数、PCNA 陽性細胞数とラミニン・デスミン発現の著しい低下を認めた (図 7)。



(6) 14 日目の骨髄ならびに末梢血を利用した FACS 解析では、双方ともに中和抗体投与群において対象細胞数の発現低下が認められた (図 8)。



(7) リコンビナント GFX (r-GFX) 投与 (200 μ g/kg \cdot day; CTX 投与後 0, 1, 3, 5, 7, 10day) 後、計画書どおりにサンプリングと解析を行った。その結果、運動機能の変化は rmGFX 投与群において回復の改善が認められた (図9)。



(8) r-GFX 投与実験においても GFX 中和抗体投与実験と同様に各種実験を行い、それぞれの結果で GFX 中和抗体の結果と相反する結果が得られた (図10-15)。

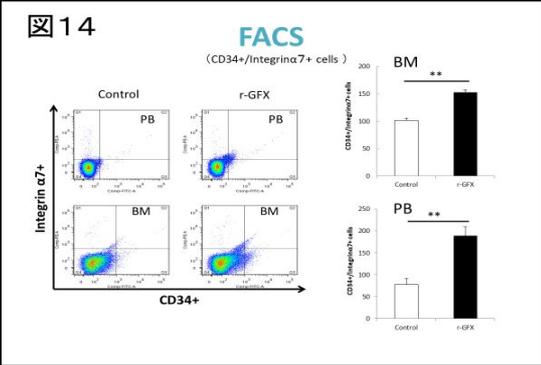
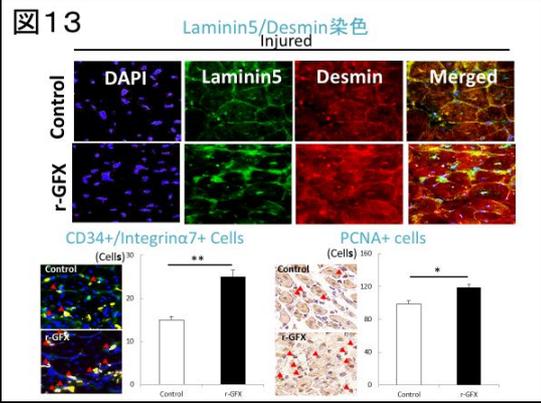
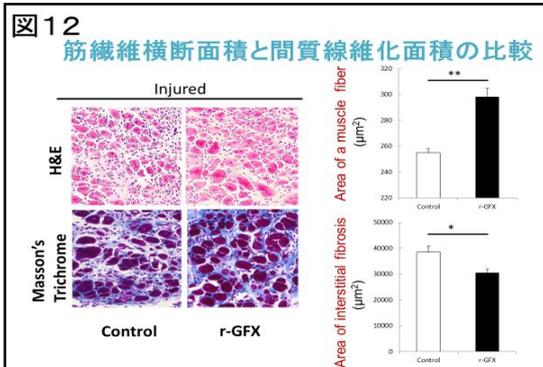
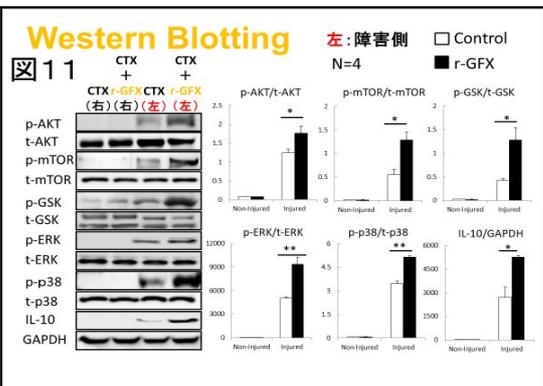
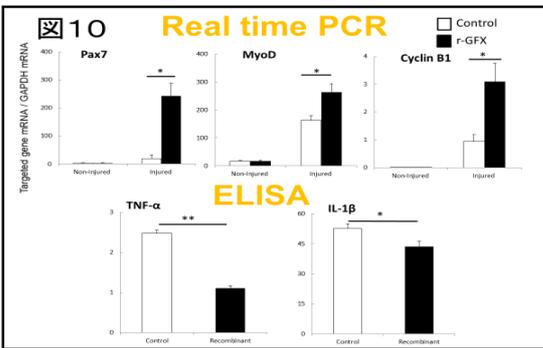


図15 結果のまとめ

検査	GFX Ab	r-GFX
仕事量・四肢握力	↓	↑
筋繊維細胞横断面積	↓	↑
間質線維化面積	↑	↓
骨格筋リモデリング	↓	↑
骨格筋CD34 ⁺ /Integrin- α 7 ⁺ 細胞数	↓	↑
骨格筋PCNA陽性細胞数	↓	↑
PCR (Pax7, MyoD, cyclinB1)	↓	↑
Western Blotting	↓	↑
ELISA (TNF- α , IL-1 β)	↑	↓
FACS (骨髄・末梢血CD34 ⁺ /Integrin- α 7 ⁺ 細胞数)	↓	↑

これらの結果は、r-GFX 投与による障害後筋肉再生が亢進したことを示している。

以上の結果より、研究代表者がこの研究を開始する動機となった仮説、GFX は障害後の筋肉再生に明らかに関与していることを証明することができた。当初の予定はこれらの実験に加え、骨髄移植モデルマウスを使用した実験も計画していたが、骨格筋障害モデルマウスの作成に難渋したことや、実験途中で当初使用していた CTX が入手困難となったことで実験の進行が大幅に遅延し、今回の報告には間に合わなかった。しかし、ここに提示した実験結果は今後の骨格筋再生において大変価値あるものになりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Goto H, Inoue A, Piao L, Hu L, Huang Z, Meng X, Suzuki Y, Umegaki H, Kuzuya M, Cheng XW. Proliferin-1 Ameliorates Cardiotoxin-Related Skeletal Muscle Repair in Mice. *Stem Cells Int.* 2021:9202990. doi:10.1155/2021/9202990. eCollection 2021.

〔学会発表〕(計1件)

五藤大貴、成憲武、井上愛子、小笠原真雄、葛谷雅文. Cardiotoxin による骨格筋障害後の修復・再生における GFX の役割に関して. 第4回日本サルコペニアフレイル学会. 2017年10月14-15日.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)現在出願準備中

〔その他〕

名古屋大学ホームページ研究成果情報
http://www.nagoya-u.ac.jp/about-nu/public-relations/researchinfo/upload_images/20161213_med.pdf
日本の研究.com
<https://research-er.jp/articles/view/53466>

6. 研究組織

(1)研究代表者

五藤 大貴 (HIROKI, GOTO)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 50770913

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者

井上 愛子 (INOUE, Aiko)
名古屋大学・未来社会創造機構・特任助教

木村 薫 (KIMURA, Kaoru)
名古屋大学・大学院医学系研究科・客員研究者