

令和元年5月14日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16430

研究課題名(和文)筋疾患に対する運動が筋機能を悪化させる理由を間葉系前駆細胞の2面性から解明する

研究課題名(英文)The role of muscle mesenchymal progenitors in exercise; double-edged sword of mesenchymal progenitors in muscular disease.

研究代表者

齋藤 悠城 (Saito, Yuki)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：40758702

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：特発性炎症性ミオパチーは筋力低下と炎症、線維化を特徴とする自己免疫疾患である。ミオパチーに対する治療は経口ステロイド薬が主体であるが、近年、運動療法が有効な治療の一つとして注目されている。しかし、運動療法の効果はすべての対象に有効なわけではなく、炎症を助長したり線維化を悪化させるリスクも有している。このような、運動によるポジティブな治療効果とネガティブな効果がなぜ生じるのか、そのメカニズムは不明である。本研究ではミオパチーモデルマウスを用いて、1) 運動刺激に対するFAPsの表現型を変化を分子生物学的手法を用いて明らかにし、運動による再生および炎症・線維化メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性的な炎症を伴う骨格筋疾患は、著明な筋力低下のため、日常生活を著しく困難とさせる。障害された筋機能を回復させるため、運動療法は最も有効な治療法の一つであるが、過剰な運動は炎症を助長したり筋機能を悪化させるリスクも有している。本研究では、慢性慢性的な炎症を伴う骨格筋障害を呈する動物モデルを使用し、なぜ、運動による筋再生メカニズムと炎症を助長させるメカニズムを解明した。本研究成果は慢性的な炎症を伴う骨格筋疾患に対する有効で、安全な運動療法を処方するための、基礎的データとなりうる。

研究成果の概要(英文)：Exercise-induced damage triggers muscle regeneration by activating satellite cells, fibro-adipogenic progenitors (FAPs), and immune cells. FAPs facilitated by exercise play roles for muscle remodeling. On the other hand, in the pathological conditions such as chronic inflammatory myopathy (CIM), exercise-induced damage rather exacerbates the inflammation and fibrosis in the muscle. Although it is considered that FAPs are key regulator for muscle inflammation and fibrosis, the cellular mechanisms are not completely understood. Here we aimed to demonstrate the mechanism for different roles of exercise-induced damage between normal and CIM by focusing on cell senescence in FAPs. We found that both of sufficient senescence and up-regulation of p38 MAPK, a pro-apoptotic signal, might be necessary for exercise-induced muscle regeneration. On the other hand, insufficient senescence and up-regulation of NF- κ B, a anti-apoptotic signal might cause exercise-induced inflammation and fibrosis.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：骨格筋 再生 線維化 運動 間葉系細胞 細胞老化

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

特発性炎症性ミオパチーは筋力低下と炎症、線維化を特徴とする自己免疫疾患である。ミオパチーの病態メカニズムはいまだ不明な点が多いが、自己免疫反応が関与していることが強く示唆されている。ミオパチーに対する治療は経口ステロイド薬や免疫抑制剤が主体であるが、近年、運動療法が有効な治療の一つとして注目されている。しかし、運動療法の効果はすべての対象に有効なわけではなく、運動療法の量や頻度が過剰になった場合、炎症を助長したり線維化を悪化させるリスクも有している。このような、運動によるポジティブな治療効果とネガティブな効果がなぜ生じるのか、そのメカニズムは不明である。

骨格筋の間質に存在する Fibro-adipogenic Progenitor(FAPs)は platelet-derived growth factor receptor- α で同定可能な間葉系前駆細胞であり、骨格筋の恒常性の維持や再生に非常に重要な役割を担う細胞である。一方、慢性炎症状態における FAPs はその表現型が変わっており、線維芽細胞や脂肪細胞に分化しやすく、骨格筋の異所性組織形成の原因ともなる細胞である(FAPsの異常化)。また、FAPs は運動刺激によって活性化することが知られており、活性化された FAPs は筋再生に関わるタンパクや遺伝子の発現を亢進させる。ミオパチーに対する運動刺激も同様に FAPs を活性化せると予測されるが、異常化した FAPs が活性化した場合、それが筋再生に働くのか、炎症や線維化を悪化させる方向に進むのかは不明である。我々は運動による筋再生または炎症と線維化促進効果は FAPs の表現型に依存していると仮説を立て、研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的はミオパチーモデルマウスを用いて、1) 運動刺激に対する FAPs の表現型を変化を分子生物学的手法を用いて明らかにし、運動による再生および炎症・線維化メカニズムを解明すること、2) FAPs の表現型を制御してミオパチーに有効な治療法を同定することである。

3. 研究の方法

8 週齢の Balb/c マウス(メス)に粗精製した Balb/c 由来ミオシンと完全フロイトアジュバントをリンパ節付近に免疫し慢性筋炎モデル(Chronic inflammatory myopathy: CIM)を作成した。免疫後 5 週の時点で運動介入(17m/min, -20 度傾斜, 30 分)を実施し、24 時間後に腓腹筋を採取した。遺伝子発現解析のため、FAPs は Lineage 陰性 $\alpha 7$ -integrin 陰性 PDGFR α 陽性の細胞を単離した。単離後の FAPs にて遺伝子発現解析を実施した。タンパク発現解析のため、フローサイトメトリーを用いて、Lineage 陰性 $\alpha 7$ -integrin 陰性 PDGFR α 陽性分画の細胞における NF- κ B および p38 MAPK などの炎症、線維化関連の因子を計測した。Ctrlrol(Ctrl)群、Ctrlrol に運動介入をした Ctrlrol-Exercise(Ctrl-Ex)群、CIM 群、CIM に運動介入をした EAM-Exercise(CIM-Ex)群、さらに CIM に AMPK 活性化薬 AICAR を投与した CIM-AICAR 群、CIM-AICAR に運動介入をした CIM-EX-AICAR 群で比較検討した(図 1A および図 2A)。

4. 研究成果

1) 正常マウスに対する運動刺激は FAPs の細胞周期阻害因子の発現を亢進させるが、慢性筋炎マウスでは抑制された

片側腓腹筋あたりの FAPs 細胞数は Ctrl 群(mean, 0.37×10^5 cells; 95% CI, 0.24 – 0.50)と比較して CIM 群(mean, 2.02×10^5 cells; 95% CI, 1.58 – 2.46)で有意に増加した ($P < 0.001$)(図 1B)。Ctrl 群では Ex 介入によって FAPs 細胞数は有意に増加したが(mean, 0.70×10^5 cells; 95% CI, 0.56 – 0.84; $P = 0.02$)、CIM 群では Ex

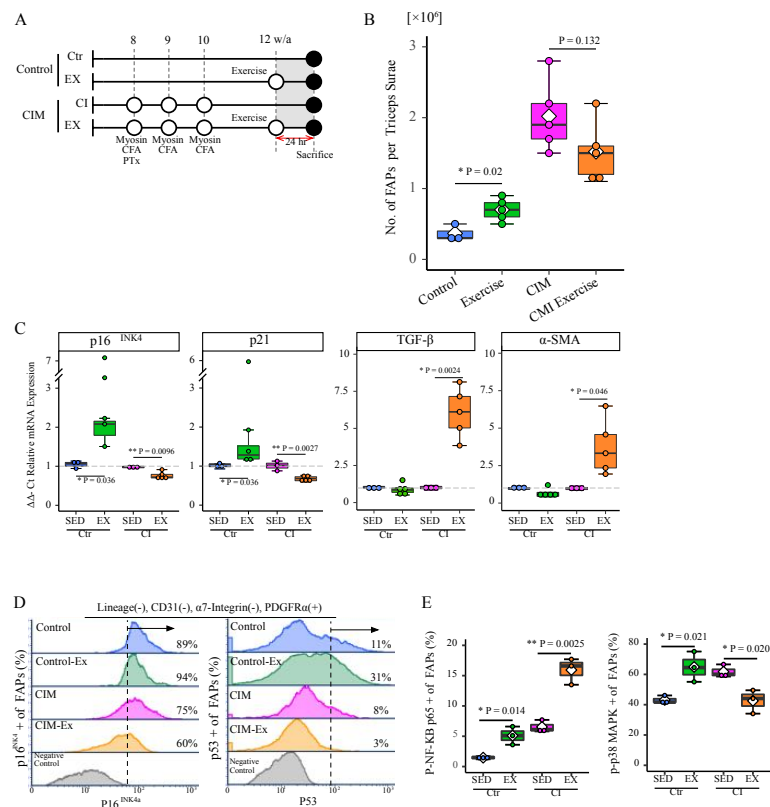


図1. 運動刺激によって正常マウスFAPsの細胞周期阻害因子の発現が亢進する

介入で細胞数に有意差はなかった(mean, 1.52×10^5 cells; 95% CI, 1.90 – 1.14; $P = 0.132$) (図 1B)。FAPs の遺伝子発現解析の結果、Ctrl-Ex 群では細胞周期阻害遺伝子の発現量増加を認めたが($P < 0.05$)、CIM-Ex 群では減少($P < 0.05$)、もしくは変化しなかった(図 1C)。さらに、CIM-Ex 群では線維化関連遺伝子の発現が増加した($P < 0.05$) (図 1C)。また、Ctrl 群の FAPs では Ex 介入によって細胞周期阻害タンパクを発現する細胞数の割合の増加を認めた($P < 0.05$)一方で、CIM-Ex では低下した($P < 0.05$) (図 1D)。Ctrl 群の FAPs では Ex 介入によって NF-kB および p38 MAPK を発現する細胞数の割合の増加を認めた($P < 0.05$)、CIM-Ex では NF-kB を発現する細胞数の割合が増加し、p38 MAPK を発現する細胞数の割合が低下した($P < 0.05$) (図 1D)。

2) 慢性筋炎マウス FAPs の細胞周期阻害因子の発現を亢進させることで運動介入による筋再生効果を引き出した

Ctrl 群の FAPs では Ex 介入によって細胞周期阻害因子を発現する細胞数の割合の増加を認めた一方で、CIM-Ex では低下したことから、細胞周期阻害因子の発現亢進が、運動刺激による筋再生に重要であると考えた。そこで、AICAR を CIM マウスに投与し、細胞周期阻害因子発現の亢進が CIM の筋再生を促すかどうか検討した(図 2 A)。CIM-Ex では筋機能および筋再生・肥大が認められなかったが、CIM-Ex-AICAR では著明な筋機能の改善および筋再生・肥大が認められた($P < 0.05$) (図 2B)。

CIM-Ex-AICAR では FAPs における細胞周期阻害因子発現が更新していることを確認した。(図 2C-D)。さらに、炎症/再生に関連する遺伝子発現を解析したところ、CIM-Ex-AICAR における FAPs の表現型は Ctrl 群や Ctrl-Ex 群と類似した表現型へと変化していることが明らかになった(図 2C-D)。

以上のことから、運動介入による FAPs の細胞周期阻害因子発現亢進が、筋再生を促すために重要な因子である可能性を示した。

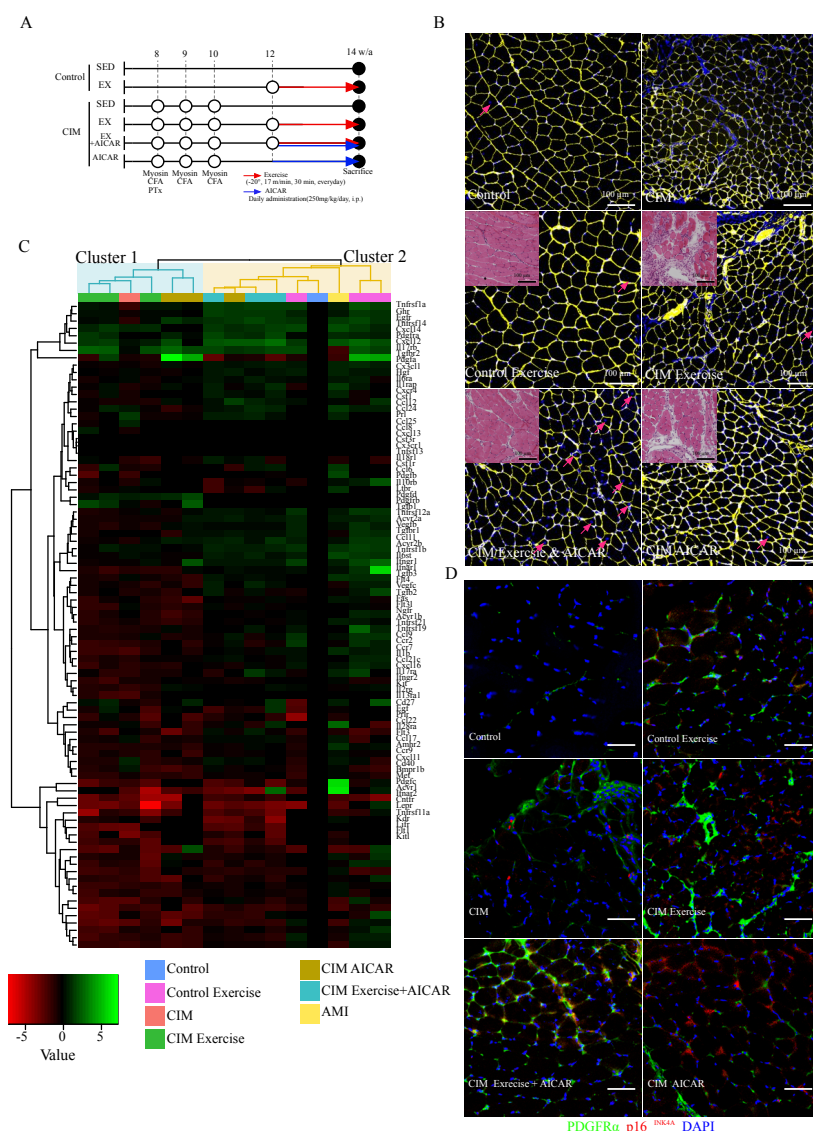


図 2. AICAR と運動との組み合わせが FAPs の表現型を変化させて筋再生を促す

5. 主な発表論文等
(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Takako S. Chikenji, Yuki Saito, Naoto Konari, Masako Nakano, Yuka Mizue, Miho Otani, Mineko Fujimiya, p16INK4A-expressing mesenchymal stromal cells restore the senescence-clearance-regeneration sequence that is impaired in chronic muscle inflammation, EBioMedicine, 2019. (In press).

[学会発表] (計 3 件)

1. 齋藤悠城, 千見寺貴子, 松村崇史, 水江由佳, 藤宮峯子. 多発性筋炎モデルマウスにおける骨格筋間葉系前駆細胞の異常性と運動刺激が与える影響. 日本理学療法学会大会, 5 月, 東京, 2017.

2. Yuki Saito, Takako Chikenji, Yuka Mizue, Mineko Fujimiya. Exercise-Induced Muscle Inflammatory and Fibrosis in Choronic Myopathy is Caused by Insufficient Senescence of the Fibro-Adipogenic Progenitors, Keystone Symposia, Aging and Mechanisms of Aging-Related disease (E2), Yokohama, May, 2017.

3. Takako Chikenji, Yuki Saito, Yuka Mizue, Mineko Fujimiya. Mesenchymal stromal cells stimulated by human placental extraction plays beneficial roles on reduction of chronic inflammation in multiple myositis, Keystone Symposia, Aging and Mechanisms of Aging-Related disease (E2), Yokohama, May, 2017.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

研究協力者氏名：千見寺 貴子

ローマ字氏名：Chikenji Takako

研究協力者氏名：藤宮 峯子

ローマ字氏名：Fujimiya Mineko

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。