

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16650

研究課題名(和文)骨格筋の再生メカニズムにおけるMCTの役割解明

研究課題名(英文)The role of MCT in the regeneration mechanism of skeletal muscle

研究代表者

高山 義裕 (TAKAYAMA, Yoshihiro)

山梨大学・大学院総合研究部・臨床助教

研究者番号：20596994

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)：筋再生過程において初期には肥満細胞の集中が報告されており、関与が示唆される。本実験において、肥満細胞由来トリプターゼ(MCT)の刺激によりマウス筋芽細胞(C2C12)が濃度依存的に増殖した。また、ウマ血清下で筋分化させる系を使用し、MCTを投与した群はコントロールに比較して筋分化が促進される結果を得た。次に筋芽細胞(G8)を使用し、脂肪分化をみた。筋分化とは異なり、MCT投与により脂肪分化は抑制された。以上より、MCTは筋芽細胞において増殖、筋分化を促進し、脂肪分化を抑制させた。これらの結果は、MCTが筋細胞に対して保護的/促進的に働いている可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腰痛患者や腰椎変性疾患では体幹筋力に、萎縮と脂肪変性が認められることが多く報告され、腰痛メカニズムにおいて体幹筋の脂肪変性が注目されている。筋肉の再生・変性メカニズムにおいては筋衛星細胞(骨格筋幹細胞；筋芽細胞)が大きな役割を持つことが予想され、今回の実験を行った。その結果、肥満細胞由来トリプターゼ(MCT)が筋細胞に対して保護的/促進的に働いている可能性を示唆された。ターゲットとなる分子の創薬を行って新規治療を開発し人類の健康寿命の長期化に寄与できるものとする。

研究成果の概要(英文)：It is reported the gathering of mast cells has been reported in the early stage of the muscle regeneration process. In this experiment, the proliferation of mouse myoblast cell (C2C12) was increased in a concentration-dependent manner by stimulation with mast cell-derived tryptase (MCT). In addition, a group in which MCT was administered using a system for muscle differentiation under horse serum was obtained with the result that muscle differentiation was promoted as compared with the control. Next, myoblasts (G8) were used to observe fat differentiation. Unlike muscle differentiation, MCT administration suppressed adipose differentiation. As the results, MCT promoted proliferation and muscle differentiation in myoblasts and suppressed adipose differentiation. These results suggest that MCT may have a protective/promoting effect on muscle cells.

研究分野：骨格筋の再生メカニズム

キーワード：骨格筋 MCT PAR2 肥満細胞 脂肪分化

1. 研究開始当初の背景

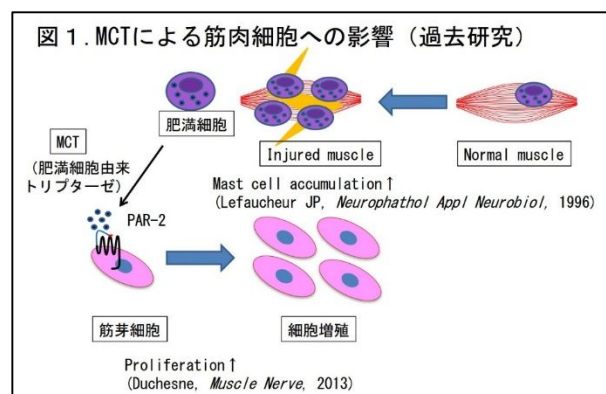
2016年厚生労働省国民生活基礎調査によると、腰痛の有訴率は男性1位(9.2%)、女性2位(11.6%)であり、通院者率は4位(4.1%)に上る。腰痛による運動器障害をもつ高齢者は、要介護となる危険性があり、ロコモティブシンドロームにおける重要な疾患に含まれ(日本整形外科学会：ロコモティブシンドローム診療ガイド2010)、腰痛による運動器障害を軽減し、健康格差を縮小して健康寿命を延伸することは喫緊の課題といえる。

申請者の所属する研究室においては、長年腰痛の主原因の一つである椎間板変性の変性メカニズムに着目し、椎間板の変性には炎症性サイトカインによる血管新生と炎症性細胞の浸潤が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた(J Orthop Res. 2007、Arthritis Rheum 2008、J Orthop Res 2009、J Orthop Res 2012、J Orthop Res 2013)。他方、多くの研究者により椎間板、骨、椎間関節、神経の研究がされてきたにもかかわらず、未だに腰痛の85%は原因が特定できない(Deyo and Weinstein, N Engl J Med 2001)。

近年、腰痛患者や腰椎変性疾患では体幹筋力に、萎縮と脂肪変性が認められることが多く報告され、腰痛メカニズムにおいて体幹筋の脂肪変性が注目されている。これまでの既存研究では画像あるいは解剖・組織学的手法を用いた解析を行っているにすぎず、体幹筋力の低下が腰痛の原因であるのか、単なる結果に過ぎないのかは明らかではない。今後、腰痛患者における体幹筋の萎縮・脂肪変性の分子生物学的メカニズムの解析が期待される場所である。筋肉の再生・変性メカニズムにおいては筋衛星細胞(骨格筋幹細胞；筋芽細胞)が大きな役割を持つとされ、老化マウスにおける同細胞の減少が明らかになっている。このことが高齢者の筋再生能力の低下の一因と考えられているが、その活性化メカニズムは不明な点が多い。

若いマウスや筋ジストロフィーモデルマウスにおけるダメージを受けた筋肉では再生の初期に肥満細胞が集中しており、筋再生への関与が示唆されている(Lefaucheur JP, et al. Neurophathol Appl Neurobiol 1996)。

筋肉の再生は、局所の炎症性細胞から発現されるサイトカインやプロテアーゼ、成長因子によって複合的に行われており(Tidball, et al. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005)、中でも気管平滑筋に局在する肥満細胞由来トリプターゼ(Mast cell tryptase: MCT)が骨格筋に発現するプロテナーゼ活性型受容体の一つである



Proteinase-activated receptor-2(PAR-2)を介して、細胞の増殖に働くことが報告されている(Duchesne, et al. Muscle Nerve 2013)(図1)。

2. 研究の目的

我々の教室では、高齢化における腰痛の原因解明と新規治療法の開発をメインテーマとしている。成果として椎間板変性の変性メカニズムの一端を解明し報告してきた。近年、腰痛患者における体幹筋の萎縮と脂肪変性の進行が報告され(Danneels, et al. Eur Spine J,

2000; Kim H, Eur Spine J 2013)、特に多裂筋の脂肪変性が成人腰痛に関連しているとされる(Per K, BMC Med 2007)。また、体幹筋量が骨粗鬆症性椎体骨折への関連性も指摘され(Hosseini M Curr, Osteoporos Rep 2016)非常に注目されている。しかしながら、その分子生物学的メカニズムについては不明な点が多い。腰痛患者の椎間板においては MCT 発現が亢進しており(Freemont AJ, J Pathol 2002)、また肺や脳の炎症性病疾患の研究で、MCT は PAR-2 受容体を介し炎症性サイトカインを誘導する (Gan X, Inflammation 2012)。骨格筋にも PAR-2 受容体が存在することは知られている (Mackie EJ, Int J Biochem Cell Biol 2008)。しかしながら、実際に MCT を骨格筋に作用させその分化およびメカニズムを検討した報告はまだ少ない。

筋損傷マウスを用いた研究の多くは急性期のモデルを呈し、慢性期のモデルを呈する有効なモデルマウスの報告は少ない。マウスの四肢に対して鈍的に損傷を作成する方法、薬剤を注入する方法などが急性期のモデルマウスとして用いて作成される (Joe, et al. Nat Cell Biol 2010)。本研究では慢性期の筋損傷モデルについて、老齢マウスを用いて蛇毒 Cardiotoxin (CTX) を使用し行うこととする。本実験において肥満細胞の脱顆粒によって分泌される MCT による筋再生への影響を検討することが出来る。今後、vivo における筋力評価などを比較検討していくことで臨床における MCT の筋再生への効果を検討していくことができる可能性がある。そこで、若年マウスと老齢マウスを比較したときに筋芽細胞が著しく減少していることに注目し、1)この筋芽細胞の数を増加させること、2)成熟筋細胞へ分化させることにより老齢マウスの筋量増加させることを目的とした。

3. 研究の方法

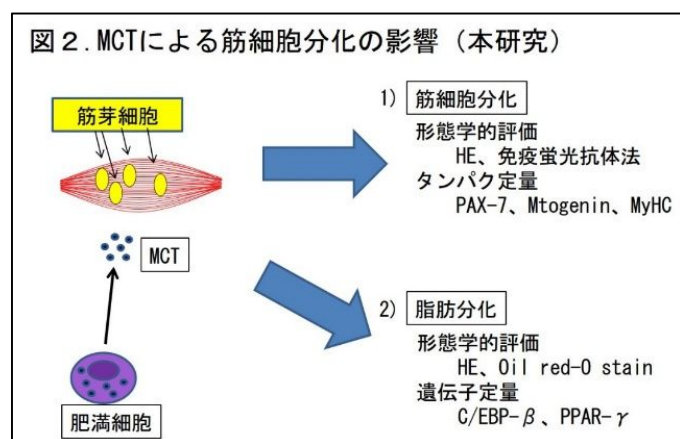
(1) MCT が筋芽細胞の骨格筋への分化に与える影響をみる

マウス筋芽細胞モデルである C2C12 または G8 細胞は休眠化した筋衛星細胞のモデルとして使用され、専用培地で分化を誘導できる。分化誘導条件下に、MCT もしくは PAR-2 agonist / antagonist を加えて、ウェスタン・ブロッティング法を用いて筋分化の促進/抑制の傾向をみる。

(2) MCT が筋芽細胞の脂肪化に与える影響をみる

筋芽細胞モデルである C2C12 または G8 細胞は、MDI 培地もしくは低酸素状態 (O₂ 1%) で培養することで脂肪細胞へと分化することが知られている。

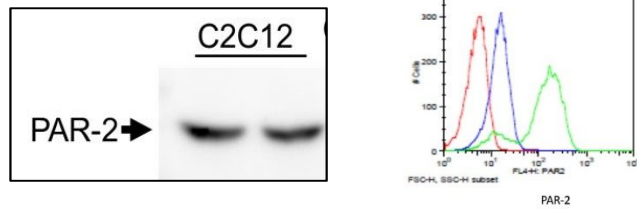
先行実験にて低酸素状態においてより脂肪分化を認めたため、低酸素状態において分化実験を行う。培養時に MCT もしくは PAR-2 agonist/antagonist を加えて、細胞組織染色法、RealTime-PCR 法、Oil-red 染色とその吸光度の定量評価を用いて脂肪分化促進/抑制の傾向をみる。



4. 研究成果

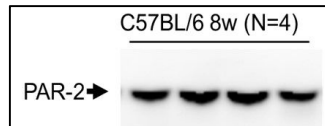
(1) 筋芽細胞 (C2C12) における PAR2 の発現の確認

左) WB 右) FACS



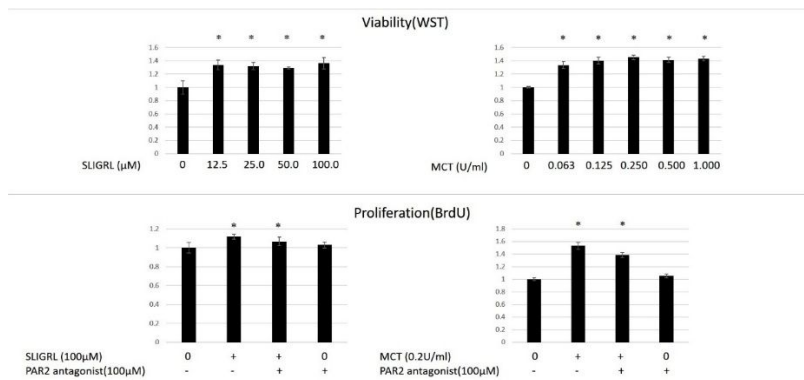
WB 法および FACS にて、筋芽細胞 (C2C12) における PAR2 の発現がみられた。

WB



また、WB 法にて、マウス (C57BL/6) の筋肉にも PAR2 の発現がみられた。

(2) PAR2 agonist (SLIGRL) と MCT が細胞増殖に与える影響

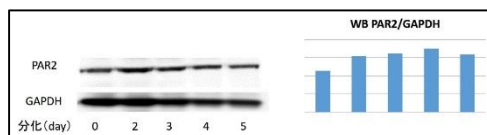


PAR2 antagonist (SLIGRL) と MCT とともに C2C12 細胞の細胞増殖を促進した。

また、この増殖の効果は PAR2 antagonist によって減弱した

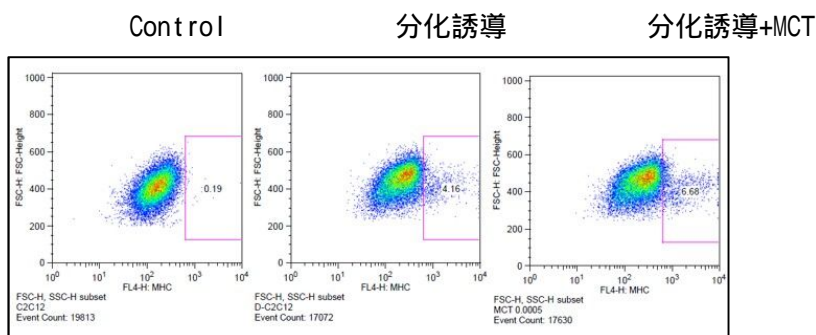
(3) C2C12 細胞の筋分化における MCT の関与

WB



分化誘導前の方が PAR-2 の発現が少ない傾向であった

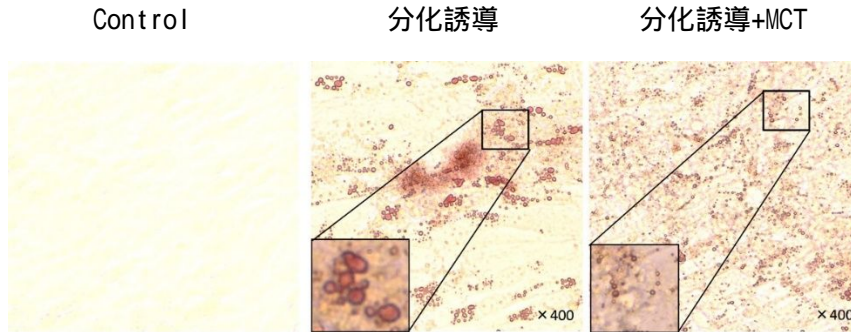
Intracellular FACS



分化誘導培地に MCT を添加することによって Myosin heavy chain の発現が増加した

(4) 筋芽細胞 (G8) の脂肪分化における MCT の関与

Oil red O stain



分化誘導培地に MCT を添加することによって Oil red の発現が減少した

結果をまとめると

- (1) MCT の受容体である PAR2 は筋芽細胞にもマウスの筋肉も発現している
- (2) MCT は筋芽細胞の増殖を促進させる
- (3) この増殖は PAR2 を介するものである
- (4) MCT は筋芽細胞の筋分化を促進する傾向がある
- (5) MCT は筋芽細胞の脂肪分化を抑制する傾向がある

これらの結果は、MCT が筋細胞に対し、保護的、筋分化へ促進的に働くことを示しており、筋炎症において筋の修復に寄与する可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshihiro Takayama, Takashi Ando, Jiro Ichikawa, Hiroataka Haro	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of Thrombin-Induced MCP-1 and MMP-3 Production Via PAR1 Expression in Murine Intervertebral Discs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-29669-z	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高山義裕, 安藤隆, 市川二郎, 波呂浩孝
2. 発表標題 Thrombin誘導性炎症による椎間板変性の検討
3. 学会等名 第92回日本整形外科学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高山義裕, 安藤隆, 市川二郎, 波呂浩孝
2. 発表標題 マウス椎間板におけるthrombin/PAR1 シグナルによるMCP-1発現およびマクロファージ遊走能の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiro Takayama, Takashi Ando, Jiro Ichikawa, Hiroataka Haro
2. 発表標題 Thrombin Induces PAR1-Dependent MCP-1 Expression and Macrophage Migration in Mouse Intervertebral Disc
3. 学会等名 Spine Across the Sea 2018
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----