

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09636

研究課題名(和文)筋恒常性維持と筋変性のメカニズム解明

研究課題名(英文)Analysis of skeletal muscle homeostasis and muscle degeneration

研究代表者

堀内 圭輔(Horiuchi, Keisuke)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・整形外科学・准教授)

研究者番号：30327564

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)：骨格筋は極めて高い適応能力、再生能力を有する臓器である。しかしながら病的な環境ではその能力は低下し、筋萎縮のみならず、筋脂肪変性、線維化などが生じうる。その結果、骨格筋の機能が著しく阻害されるが、効果的な予防法、治療法は未だ確立していない。本研究の結果から、レチノイン酸受容体シグナルが骨格筋の脂肪変性の制御に関わり、そのシグナルの阻害にて、腱断裂・脱神経に伴って生じる脂肪変性を効率的に抑制しうることを明らかにした。また、老齢マウスも用いることで、骨格筋の脂肪変性が加齢とともに促進することを示した。これらの成果は、骨格筋変性予防の臨床応用につながる重要な知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢に伴う運動器の変性疾患として、従来、変形性関節症および骨粗鬆症が主な研究対象であったが、フレイルという疾患概念において骨格筋の重要性は論を俟たない。骨格筋は様々な原因で萎縮、変性を生じ、運動機能を著しく損なう。これらの病態は、高齢者の転倒・転落の一因となることから、臨床的にもその対応は重要である。しかしながら、その対応は物理療法や栄養指導にとどまっており、有効な治療法、予防法が確立されていない。今回の研究結果は、骨格筋の脂肪変性のメカニズムの一端を明らかにし、さらにその予防法までを示唆する内容であり、基礎的な側面だけでなく、臨床的にも重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Muscle fatty degeneration is a relatively common disorder characterized by the infiltration or replacement of muscle fibers with fat tissue in skeletal muscle. This condition is often found in patients with skeletal muscle denervation and myopathy. Clinically, fatty degeneration is considered an irreversible event, and it profoundly compromises the elasticity and tensile strength of skeletal muscle. Currently, there is no effective treatment to prevent or abate the progress of this condition. In this research project, we found that retinoic acid receptor signaling is critically involved in the development of fatty degeneration and that fatty degeneration can be suppressed by inhibiting this signaling. Additionally, by using aged mice as a model, we also found that aging renders skeletal muscle susceptible to fatty degeneration after muscle injury. These findings may serve as a basis for establishing a treatment and prophylaxis for muscle degenerative conditions.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨格筋 骨格筋脂肪変性 筋萎縮 筋衛星細胞 未分化間葉系細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

いわゆる“運動器不安定症”は、歩行・移動能力の低下のために転倒しやすくなり、日常生活での障害を伴う状態を指す。この原因疾患として、変形性関節症、脊椎変性疾患、脆弱性骨折などが挙げられるが、運動器不安定症の根源には骨粗鬆症と筋萎縮が大きく関与していると考えられる。骨粗鬆症に対しては、多くの基礎研究・臨床研究を経て、様々な薬剤が臨床の場で広く使用されるに至った。

一方、加齢に伴い骨密度と同様に骨格筋の萎縮が生じ、筋力が低下することが知られている。筋肉量は25歳以降、年0.5-1%年程度の割合で減少すると報告されており、80歳台までには青壮年期と比較して約40%低下するとされている。65歳以上が総人口の25%を超えるまで高齢化を迎えたわが国において、筋萎縮症は日常診療で高頻度に遭遇する病態であるのに関わらず、リハビリテーションやサプリメントといった補助的な治療介入を除いて、有効な治療法が存在しない状況である。また、加齢に伴う筋組織の異常は、筋萎縮、脊髄前角細胞の減少にともなう支配筋/前角細胞の運動単位の増加のほか、遅筋へのシフト、筋脂肪変性、筋線維化が生じることが知られているが、こうした筋の病態に対する病因解明は発展途上である。

骨格筋組織は、巨大な多角細胞である筋線維のほか、血管細胞、神経細胞および複数の幹細胞によって構成される。筋線維は極めて適応能力の高い組織であり、力学的負荷にตอบสนองし、筋線維自体を肥大化させる能力が備わっている。また同時に、高い再生能力も有し、筋損傷後、筋特異的な幹細胞である筋衛星細胞の増殖・分化を経て、筋線維が速やかに再構成されることが知られている。しかしながら、老化、筋損傷、筋炎など、病的な状況下ではその機能が損なわれ、筋組織内の線維化や脂肪変性などが生じる。こうした線維化や脂肪変性といった病態は不可逆的な現象と考えられており、再び筋線維で置換されることはない。このため、骨格筋の可塑性は低下し、さらにこれが筋萎縮を引き起こすことにより、骨格筋としての機能が著しく損なわれる。このことから、筋組織の線維化や脂肪変性の予防治療法の確立は、運動器機能維持の上で重要な課題であると考えられるが、その病態は以前不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、筋の線維化・脂肪変性のメカニズムを解明し、これらの病態に関わる遺伝子標的を同定することで、臨床応用に向けた基礎的な知見を得る事である。

3. 研究の方法

骨格筋内の脂肪組織の起源細胞と考えられる fibro-adipose progenitors (以下 FAP 細胞) は、9週野生型雄マウス (C57BL/6) の骨格筋より採取した。切除した骨格筋に酵素処理を施し、シングルセルにした細胞浮遊液から、FAP 細胞 (PDGFRα⁺/CD31⁻/CD45⁻) をフローサイトメトリー法にて単離した。単離した FAP 細胞はマトリゲルでコーティングしたプレートに播種し、維持培養液 (DMEM, 20% ウシ血清, 2.5 ng/mL ヒト FGF), および脂肪分化培養液 (DMEM, 10% ウシ血清, 0.5mM isobutylmethylxanthine, 1mM デキサメタゾン, 10 mg/mL インスリン) にて培養した。また、レチノイン酸受容体アゴニストとして、アダパレン (6-(3-[1-adamantyl]-4-methoxyphenyl)-2-naphthoic acid), および CD437 (6-(3-[1-adamantyl]-4-hydroxyphenyl)-2-naphthalene carboxylic acid) を実験に応じて添加した。In vitro の脂肪分化は、脂肪分化マーカーとして広く利用されている *Pparg*, *Cebpa*, *Klf5* 遺伝子の定量的 PCR, 培養細胞のオイルレッド染色にて評価した。線維化は、*Coll1a1*, *Col3a1* 遺伝子の定量的 PCR にて評価した。

In vivo の骨格筋脂肪変性モデルとして、申請者の研究グループが確立したマウスモデルを利用した。このマウスモデルでは、肩甲上神経の切離、肩関節腱板の全周の切断、上腕骨骨頭の切除を施すことで、4-6週後の後に骨格筋内に脂肪変性が生じる事を明らかにしている¹。骨格筋 (棘上筋) の脂肪変性は、上記の遺伝子の定量的 PCR, および脂肪細胞のマーカーであるペルルピンに対する免疫染色にて評価した。線維化は *Coll1a1*, *Col3a1* 遺伝子の定量的 PCR, およびファンギゾン染色にて評価した。

骨格筋脂肪変性に対する加齢の作用の検討では、通常の若齢マウス (12週齢) の他、老齢マウス (50-60週齢) のマウスを利用した。これらのマウスに対し、上記の骨格筋脂肪変性モデルの処置を施し、経時的に脂肪変性の度合いを比較検討した。

¹Shirasawa, H., et al. Inhibition of PDGFR signaling prevents muscular fatty infiltration after rotator cuff tear in mice. Scientific reports 7, 41552 (2017).

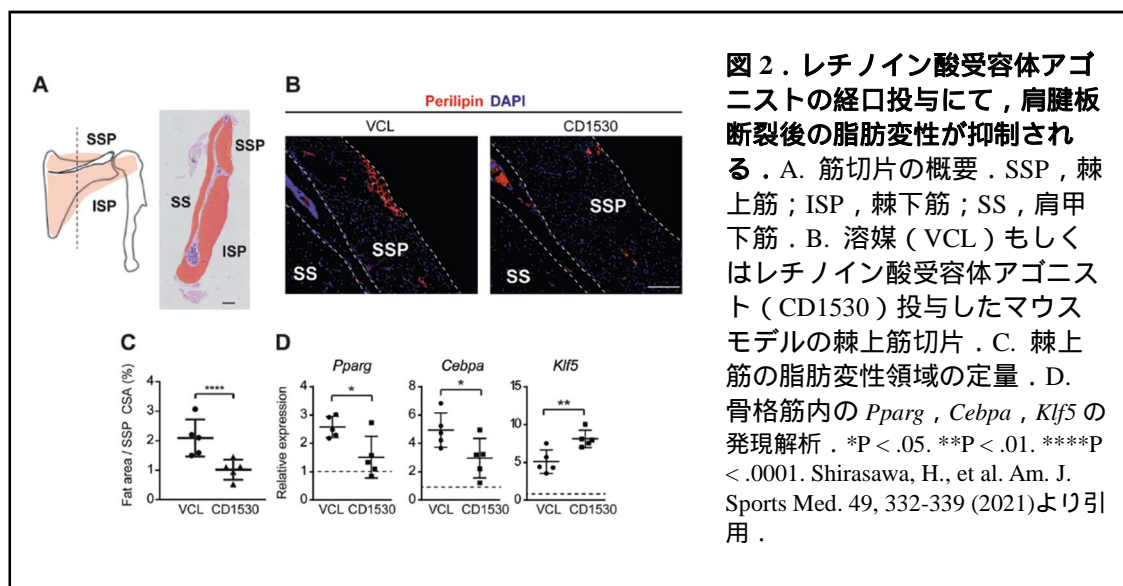
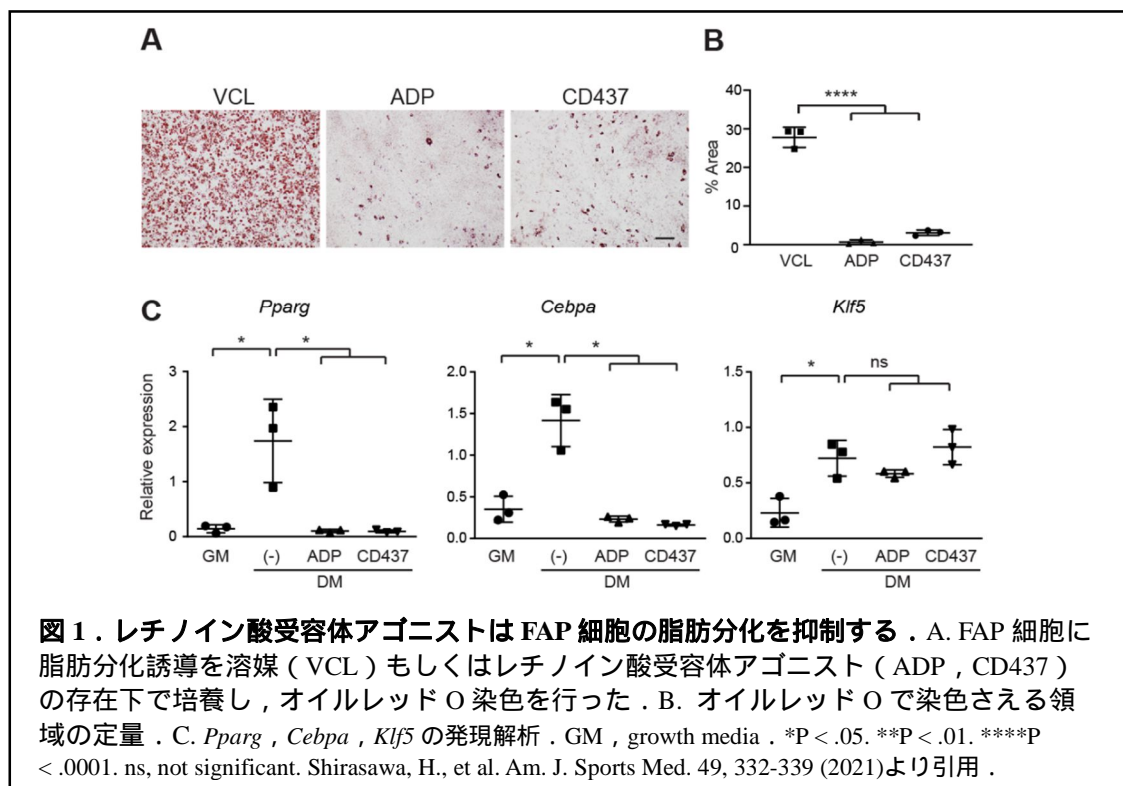
4. 研究成果

(1)レチノイン酸受容体アゴニストによる骨格筋脂肪変性の抑制: これまで脂肪前駆細胞様細胞株を利用した in vitro の実験系にてレチノイン酸受容体シグナルが脂肪分化を負に制御することが報告されていたが、骨格筋内の脂肪組織の起源細胞である FAP 細胞の脂肪分化に対するレチノイン酸受容体シグナルの関与は従来報告がなかった。本研究では、マウスから単離した FAP 細胞も、脂肪前駆細胞様細胞株と同様に、脂肪分化がレチノイン酸受容体シグナルによって制御

されることを遺伝子発現および細胞染色にて明らかにした(図1)。さらに、マウス骨格筋脂肪変性モデルを利用し、レチノイン酸受容体アゴニストの経口投与および筋肉内注射にて、脂肪変性が効率的に抑制しうることを示した(図2)。

また、骨格筋の線維化に対するレチノイン酸受容体アゴニストの効果も併せて検討した。In vitroにてFAP細胞を脂肪分化誘導させると、線維化のマーカーである*Colla1*, *Col3a1*の発現が低下されるが、レチノイン酸受容体アゴニストにて脂肪分化を抑制させると、これらの線維化マーカーの発現は分化誘導前と同程度に戻ることが明らかとなった。この結果は、マウス骨格筋脂肪変性モデルを用いた検討でも同様の結果であり、レチノイン酸受容体アゴニストにて脂肪分化を抑制させた状態だと、骨格筋内の*Colla1*, *Col3a1*が定常状態と同程度になることが観察された。一方、骨格筋組織をファンギゾン染色にて線維化の程度を組織学的に評価したところ、レチノイン酸受容体アゴニストの投与でも、対照群と比較して明らかな線維組織の蓄積は認められなかった。このことから、FAP細胞を脂肪分化誘導した際に、レチノイン酸受容体シグナルが活性化されると、*Colla1*, *Col3a1*の発現は定常状態に戻るが、骨格筋の線維化を生じることが無いと考えられた。

これらの研究結果は従来論文報告がなく、新規性の高い研究結果である。また本研究結果では、レチノイン酸受容体シグナルが、ヒト骨格筋脂肪変性の標的分子になる得ることを示した点において、臨床的な価値があると考えられる。



(2)加齢によって骨格筋内の脂肪変性が亢進する：老齢マウスを用いた実験では、骨格筋脂肪変性モデルを施した老齢マウスでは、若齢マウスと比較し、骨格筋脂肪変性の程度が亢進することが明らかとなった(図3)。その分子機序の詳細は明らかではないが、老齢マウスでは定常状態にて、骨格筋内の脂肪分化関連遺伝子の発現が上昇していることが確認された。従来、マウスを用いた骨格筋脂肪変性モデルでは若年齢のマウスが使用されるのが慣習であったが、ヒトにおいて骨格筋脂肪変性は高齢者に発生することを鑑みると、老齢マウスを利用することが、骨格筋脂肪変性の病態を理解する上で重要であると考えられる。本研究結果は、骨格筋脂肪変性における老化の関与を改めて示した点において重要な知見を提示したといえる。

今後は、これらの知見をもとに、老化に伴う FAP 細胞の細胞生物学的変化を解明するとともに、レチノイン酸受容体シグナル以外の分子標的の同定を試みる計画である。

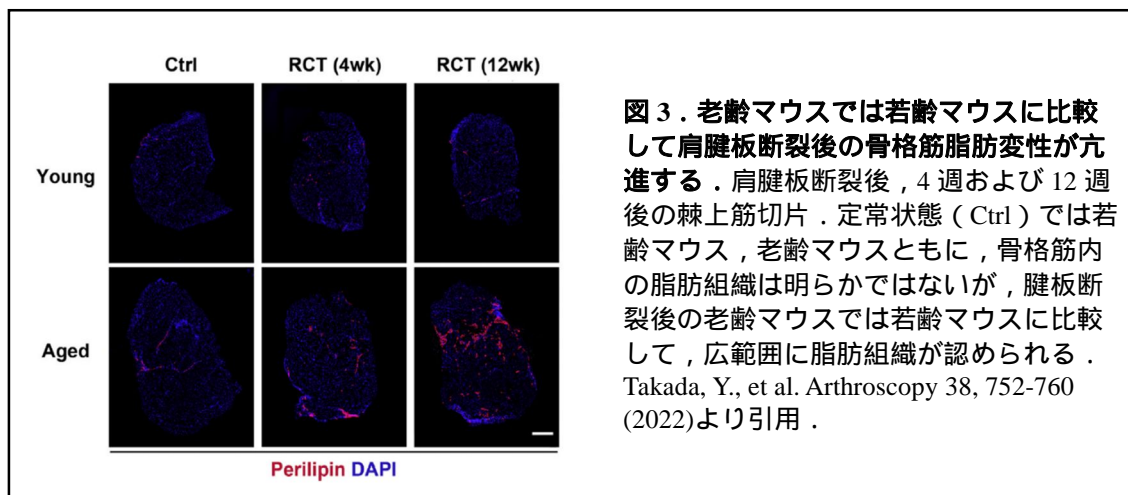


図3. 老齢マウスでは若齢マウスに比較して肩腱板断裂後の骨格筋脂肪変性が亢進する。肩腱板断裂後、4週および12週後の棘上筋切片。定常状態(Ctrl)では若齢マウス、老齢マウスともに、骨格筋内の脂肪組織は明らかではないが、腱板断裂後の老齢マウスでは若齢マウスに比較して、広範囲に脂肪組織が認められる。Takada, Y., et al. Arthroscopy 38, 752-760 (2022)より引用。

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 0件）

1. 著者名 Takada Yuhei, Matsumura Noboru, Shirasawa Hideyuki, Yoda Masaki, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Horiuchi Keisuke	4. 巻 38
2. 論文標題 Aging Aggravates the Progression of Muscle Degeneration After Rotator Cuff Tears in Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery	6. 最初と最後の頁 752～760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.arthro.2021.09.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shirasawa Hideyuki, Matsumura Noboru, Yoda Masaki, Okubo Kazumasa, Shimoda Masayuki, Uezumi Akiyoshi, Matsumoto Morio, Nakamura Masaya, Horiuchi Keisuke	4. 巻 49
2. 論文標題 Retinoic Acid Receptor Agonists Suppress Muscle Fatty Infiltration in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 332～339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0363546520984122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高田裕平, 松村昇, 白澤英之, 瀬戸貴之, 辻阪亮介, 中村匠, 堀内圭輔
2. 発表標題 腱板断裂後の筋内脂肪浸潤には加齢と時間経過が必要である
3. 学会等名 第47日本肩関節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀内圭輔
2. 発表標題 ADAM10-Notchシグナル制御による筋再生促進および筋再生の画像評価
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村昇, 白澤英之, 大木聡, 松本守雄, 中村雅也, 堀内圭輔
2. 発表標題 Retinoic acid receptor agonists suppress fatty infiltration in a mouse model of rotator cuff tear
3. 学会等名 American Shoulder and Elbow Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高田裕平, 松村昇, 白澤英之, 瀬戸貴之, 堀内圭輔
2. 発表標題 高齢マウスを用いた腱板断裂後脂肪浸潤モデルの作成とその評価
3. 学会等名 第46回 日本肩関節学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀内圭輔, 湯浅和樹, 依田昌樹, 伊藤良樹, 石井康行, 千葉一裕, 中村雅也
2. 発表標題 p38 MAPキナーゼシグナルを標的とした筋萎縮症に対する新たな治療法の探索
3. 学会等名 第92回 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019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
研究協力者	松村 昇 (Matsumura Noboru)	慶應義塾大学・医学部・講師 (32612)	

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
研究協力者	依田 昌樹 (Yoda Masaki)	慶應義塾大学・医学部・助教 (32612)	
研究協力者	白澤 英之 (Shirasawa Hideyuki)	慶應義塾大学・医学部・助教 (32612)	
研究協力者	高田 裕平 (Takada Yuhei)	慶應義塾大学・医学部・助教 (32612)	

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