

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11156

研究課題名（和文）筋損傷回復促進に有効な伸張刺激に対するリンパ管系の役割とそのメカニズムを探る

研究課題名（英文）An exploration of the role of lymphatic vessels and its mechanism in promoting the recovery of muscle damage following effective stretching stimulation

研究代表者

紀 瑞成（Ji, Rui-Cheng）

大分大学・福祉健康科学部・准教授

研究者番号：60305034

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）：本研究では、雄マウスを用いて足関節背屈筋群の伸張性収縮により筋損傷モデルを作製した。筋損傷の治癒過程における筋内リンパ管系の分布や組織学的及び分子生物学的変化とその役割を検討した。損傷4日後では、筋内毛細リンパ管の数・密度・面積が増加し、内皮細胞増殖因子VEGF-C/-Dとそれらの受容体VEGFR-3などのmRNA発現レベルが上昇した。マクロファージ関連因子TNF-、IL-1、Fizzl、Ym1などの増加を認めた。損傷7日後では、筋線維の再生に伴い、筋機能回復の傾向が見られた。これらの結果は、筋内リンパ管新生などの応答が筋損傷回復促進に重要な役割を果たしていることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ管系は、筋損傷後に集積される炎症性細胞などにより分解された筋線維のタンパク質や過剰な筋間質液の還流のために、可塑的な変化を引き起こすと考える。本研究では、筋損傷組織における筋内毛細リンパ管分布の変化、内皮細胞増殖因子VEGF-C/-Dや炎症性サイトカインなどを解析した結果から、筋内リンパ管系の応答が筋損傷の回復過程に密接な関係性を持っており、筋組織内の恒常性を維持する重要な機構であることを明らかにした。従って、筋内リンパ管内皮細胞の機能制御メカニズムを解明することにより、炎症性筋疾患に有効な治療薬の開発に繋がる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：A muscle injury model was created by lengthening contraction of the ankle dorsiflexor muscles in male C57BL/6J mice. The histological and biochemical changes of the injured tissues, especially intramuscular lymphatic vessels were investigated during the healing process. The number, density, and area fraction of lymphatic vessels increased in four days after injury compared to other groups, and the mRNA expression levels of VEGF-C/-D and their receptor VEGFR-3 increased. The macrophage-related inflammatory factors, e.g., TNF-, IL-1, Fizzl and Ym1 were also highly expressed. The muscle function represented by maximal ankle dorsiflexion torque in seven days after injury tended to recover as muscle fibers regenerated. These findings suggested that the intramuscular lymphatic responses like lymphangiogenesis may play an important role in promoting recovery from muscle injury.

研究分野：リハビリテーション科学・福祉工学 / 小区分59010:リハビリテーション科学関連

キーワード：筋損傷 リンパ管新生 内皮細胞増殖因子（VEGF-C/-D） 免疫組織化学 分子生物学 伸張刺激

1. 研究開始当初の背景

骨格筋の損傷は日常生活やスポーツにおける過度な負荷、特に遠心性筋収縮により筋線維の破壊が起こり、重症化すると筋断裂や筋剥離にいたることもある。この筋損傷は関節の可動域制限や筋力低下を引き起こし、その早期回復は理学療法にとって重要な課題である。我々の研究グループはマウス足関節に対して 0.1 mNm レベルトルクを制御し、可動範囲や運動速度をコントロールすることのできる小動物用運動装置を開発し (Ito et al., 2016)、再現性の高い損傷モデルを作製することが出来るようになった。また、筋損傷モデルに対して損傷 24 時間以内に行う軽い伸張刺激を与えると、損傷からの回復が促進されることを明らかにした (Mori et al., 2014; 2018)。しかし最も効果的な刺激方法はまだ確立されていない。一方、我々はこれまで様々な組織の様々な病態におけるリンパ管系の研究を行ってきた (Ji et al., 2010; 2014; 2018)。リンパ管系は、炎症細胞・炎症関連因子などの制御や、過剰な細胞間質液の還流に重要な役割を担っていることが、癌組織や創傷治癒の組織などで既にわかっており、骨格筋の損傷・再生過程においても重要な役割を担っていると考えられる (Ji 2012; 2018; 2022)。しかし、筋損傷時に起こる炎症と関わりが深い筋内リンパ管系の研究はほとんど無く、それに対する伸張刺激応答も不明である。そこで、まず筋損傷・再生時のリンパ管系の形態応答や役割、及びそのメカニズムを明らかにすることが必要である。その後、伸張刺激による回復促進時のリンパ管系の役割や、最も効果的な方法を明らかにすることが可能となる。

2. 研究の目的

リンパ管系は、骨格筋の創傷治癒過程においても重要な役割を担っていると考えられている。近年、骨格筋疾患におけるリンパ管新生の関わりが注目されつつある。そこで、我々は、早期リハビリによる筋損傷の回復促進過程でのリンパ管系の応答、およびそれらの病態を制御する内皮細胞のシグナル伝達機構の解明に取り組んでいる。

本研究の目的は、いまだ不明な筋損傷からの回復における筋組織内リンパ管系の分布・機能との関係性を明らかにすることである。更に、筋損傷からの早期回復を促進する最適な伸張刺激方法を検討することである。筋損傷時に起こる炎症反応に関連の深いと考えられるリンパ管系に着眼した研究は、これまでに無い。具体的には、筋損傷・再生時のリンパ管系分布の変化やそれを制御するシグナル分子の変化を組織学的・分子生物学的に解明する。

変化したシグナル分子の促進や抑制により起こる現象を基に、筋の形態・機能的変化に伴うリンパ管系の役割を解明する。伸張刺激の方法や量と再生促進との関係を、明らかになったシグナル分子を基に解明する。

3. 研究の方法

実験には 10 週齢の雄マウス (C57BL/6J) を用いて、足関節背屈筋群の伸張性収縮により筋損傷モデルを作製し、損傷 2 日後、4 日後、7 日後の 3 群および未損傷の対照群を分けた。機能的評価として、最大足関節背屈トルクを測定した。前脛骨筋の組織標本を Cryostat にて凍結切片 (8~10 μm) を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を行い、筋線維数などを測定した。リンパ管内皮細胞マーカー (LYVE-1 抗体)、血管内皮細胞マーカー (CD31 抗体) を用いた二重免疫組織化学染色を実施し、毛細リンパ管および毛細血管の分布や数、構造などの変化を観察・検証した。各群の単位面積当たりの毛細リンパ管および毛細血管の数を

Image J を用いて定量解析した。また、リンパ管内皮細胞増殖因子、VEGF-C/-D 及びそれらの受容体 VEGFR-3、マクロファージ M1 及び M2 の識別マーカーや炎症性サイトカイン (CD11c、TNF- α 、CD206、IL-10 など) の定量評価のため、SuperScript™ VILO™ Master Mix を用いて cDNA を作成し、Fast SYBR™ Green Master Mix を用いて Real-Time PCR を行った。Student-t 検定及び Tukey 検定を用いて解析した。

4 . 研究成果

リンパ管系は、筋損傷後に炎症反応などにより分解された筋線維のタンパク質や過剰な組織液を回収するために、または筋組織の創傷治癒過程において重要な役割を担う可能性がある。そこで当研究グループでは、筋損傷組織の回復促進応答に関わるリンパ管系の形態・機能的変化とそのメカニズムの解明に取り組んでいる。

(1) 損傷筋モデルにおける組織形態学的変化と機能低下との関連性を力学的・分子生物学的に明らかにした。

本研究はマウス用運動装置を用いて、伸張性収縮により再現性の高い筋損傷モデルが作製できることを確認した。その結果、前脛骨筋の全筋線維数のうち約 17% の割合で筋線維が損傷し、損傷 2 日後及び 4 日後では、最大筋トルクが有意に低下した ($p < 0.01$)。また、筋線維の分解および間質液の増加などの病態はマクロファージの浸潤や炎症性サイトカインの定量的変化にほぼ関連していることが示唆された (図 1 A,B)。さらに、リンパ管新生が筋線維の回復過程に与える影響を明らかにするために、抗 Dystrophin、抗 Laminin 抗体を用いた免疫染色により筋線維の面積や数、その基底膜の状態などの評価を行った。損傷 7 日後では、再生筋線維の指標として多くの中心核筋線維が認められたとともに、筋機能回復の傾向が見られた。これらの結果は、本モデルを用いた筋損傷から回復促進のための理学療法の開発と検証に有用であると考えられる。

(2) 筋内リンパ管系の組織学的・分子生物学的応答が、損傷筋組織の治癒過程に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

リンパ管系は損傷筋組織の炎症制御や病態からの回復といった重要な役割を担っていると考えられる。損傷筋組織を用いてリンパ管内皮細胞の特異的マーカー LYVE-1、Podoplanin 免疫染色を行った。筋損傷 2 日後では、筋組織への炎症性細胞の浸潤に伴い、対照群に比べてリンパ管面積の増加傾向が認められた ($P < 0.05$)。しかし、毛細リンパ管の総数、筋線維あたりのリンパ管数の変化や、リンパ管新生の指標として内皮細胞増殖因子 VEGF-C と VEGF-D の mRNA 発現レベルの増加が観察されなかった。損傷 4 日後では、毛細リンパ管の数・密度・面積が他の群に比べて増加し (図 1 C,D)、VEGF-C/-D とそれらの受容体 VEGFR-3 などの mRNA 発現レベルも上昇した。同時に、マクロファージの浸潤や炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 発現量の上昇傾向が認められた ($P < 0.01$)。損傷 7 日後では、血管内皮細胞マーカー CD31 を加え免疫染色により、損傷筋組織内毛細血管の数が増加する傾向が認められた ($P < 0.05$)。これらの結果は、筋損傷による炎症反応に伴う筋内リンパ管の応答が、毛細血管の形態学的変化や筋機能・構造の回復よりも比較的早期に起こることを示唆した。また、リンパ管系は、筋損傷後に集積される炎症性細胞などにより分解された筋線維のタンパク質や過剰な筋間質液の還流のために、可塑的な変化を引き起こすと考えた。

(3) マクロファージ関連因子の動態変化と筋内リンパ管系の制御との関連は損傷筋組織の治癒過程において不可欠な要素であった。

損傷筋組織の炎症反応の進行に伴い、リンパ管内皮細胞増殖因子などの発現は損傷筋の

組織液や代謝産物などの回収にตอบสนองしたと考えられる。それに加えて、筋損傷組織におけるマクロファージの分極化(M1/M2)の制御機構に関するメカニズムを明らかにするために、マクロファージ特異的抗体(CD206、F4/80)を用いて免疫組織染色を行った。さらに、マクロファージの共通マーカー(Common macrophage markers、F4/80、CD11c)、M1炎症性関連因子(IL-1 β 、IL-6、INF- γ 、iNOS、TNF- α 、MCP-1、TLR-4)及びM2抗炎症性関連因子(CD163、CD206、IL-4、IL-10、TGF- β 、Fizzl、Ym1)のmRNA発現レベルの変化をRT-PCRで解析した(図2A,B)。その結果、筋損傷4日後では、INF- γ を除くほとんどのM1及びM2関連因子が対照群より高値であった(Day 4 vs Con、 $p < 0.01$)。一部の因子(IL-6、iNOS、TNF- α 、F4/80、MCP-1、TLR-4、TGF- β 、Ym1)が2日後より高く発現した(Day 4 vs Day 2、 $p < 0.05$ or $p < 0.01$)。筋損傷7日後では、一部の因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1、TLR-4、IL-4、IL-10、TGF- β 、Fizzl、Ym1)の発現量が4日後より明らかに低下した(Day 7 vs Day 4、 $p < 0.05$ or $p < 0.01$)。なお、筋損傷7日後では、CD11cの発現レベルが損傷2日後および対照群($p < 0.05$ or $p < 0.01$)より高値であったが、損傷4日後との差が認められなかった。

総合的に、共通マーカーであるCD11cとF4/80発現量の差が認められなかった。M1関連因子については、筋損傷2日後では、MCP-1がIL-1 β およびiNOSより高値であった($p < 0.05$)。筋損傷4日後では、TNF- α 発現レベルがIL-1 β とiNOSより高かった($p < 0.05$ or $p < 0.01$)。また、IL-6の発現レベルがiNOSより高値であった($p < 0.05$)。筋損傷7日後では、各群の有意差がなかった。M2関連因子については、筋損傷2日後では、CD206発現量がIL-4、TGF- β 、Fizzlより有意に増加した($p < 0.01$)。筋損傷4日後では、IL-10の発現レベルがFizzlとIL-4より有意な高値が認められた($p < 0.05$ or $p < 0.01$)。筋損傷7日後では、CD163発現量がCD206($p < 0.05$)、IL-4、IL-10、TGF- β 、Fizzl、Ym1($p < 0.01$)より高値であった。本研究では、マクロファージ関連因子の動態変化が内皮細胞増殖因子の発現、リンパ管新生や中心核筋線維の増殖分化などに深く関わり、損傷組織の回復過程に重要な役割を果たすことが示唆された。

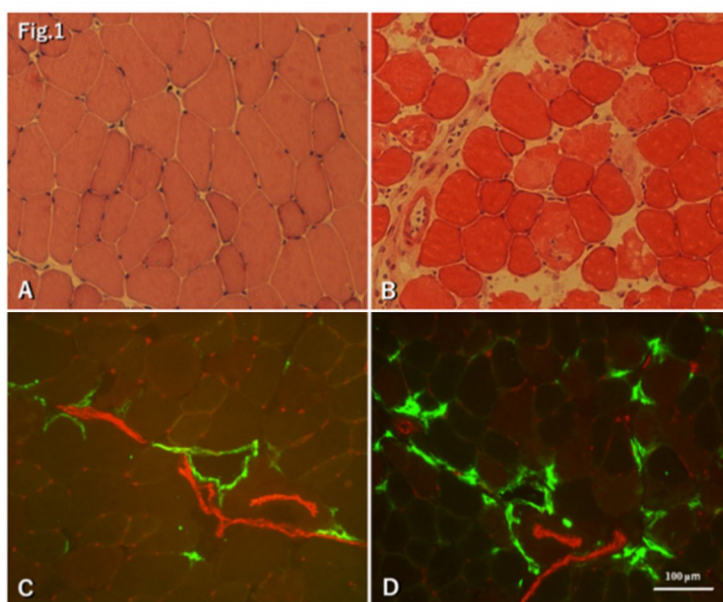


Fig.1 Histological images of the tibialis anterior muscle stained with HE (A, B), and LYVE-1 (green) and CD31 (red) double immunostaining (C, D). Two days after injury, enlarged interstitial space between inflammatory myofibers and inflammatory cells were observed (B) compared with the normal control (A). Expansion and increased number of lymphatic vessels were shown in two days after injury (C) and 4 days after injury (D) separately.

今後は、本研究結果を基にさらに筋損傷病態の解明が必要であると考えられる。損傷筋組織における筋線維再生の動態、筋形成制御遺伝子をDystrophin、Pax 7、M-cadherin、MyoD、Myogeninなどの分子マーカーを用いて検証する。VEGF-C/VEGFR-3系とマクロファージの活性制御に着目して、特にVEGFR-3チロシンキナーゼの選択的阻害剤の投与やM2マクロファージの除去によるリンパ管新生、骨格筋の再生に対する影響を明らかにする。運動

療法による損傷筋組織内リンパ管新生などに及ぼす影響を解明し、最適な運動療法を模索する。従って、損傷筋組織におけるリンパ管の機能制御に関わるメカニズムが解明することにより、炎症性筋疾患に有効な治療薬の開発に寄与できると期待される。

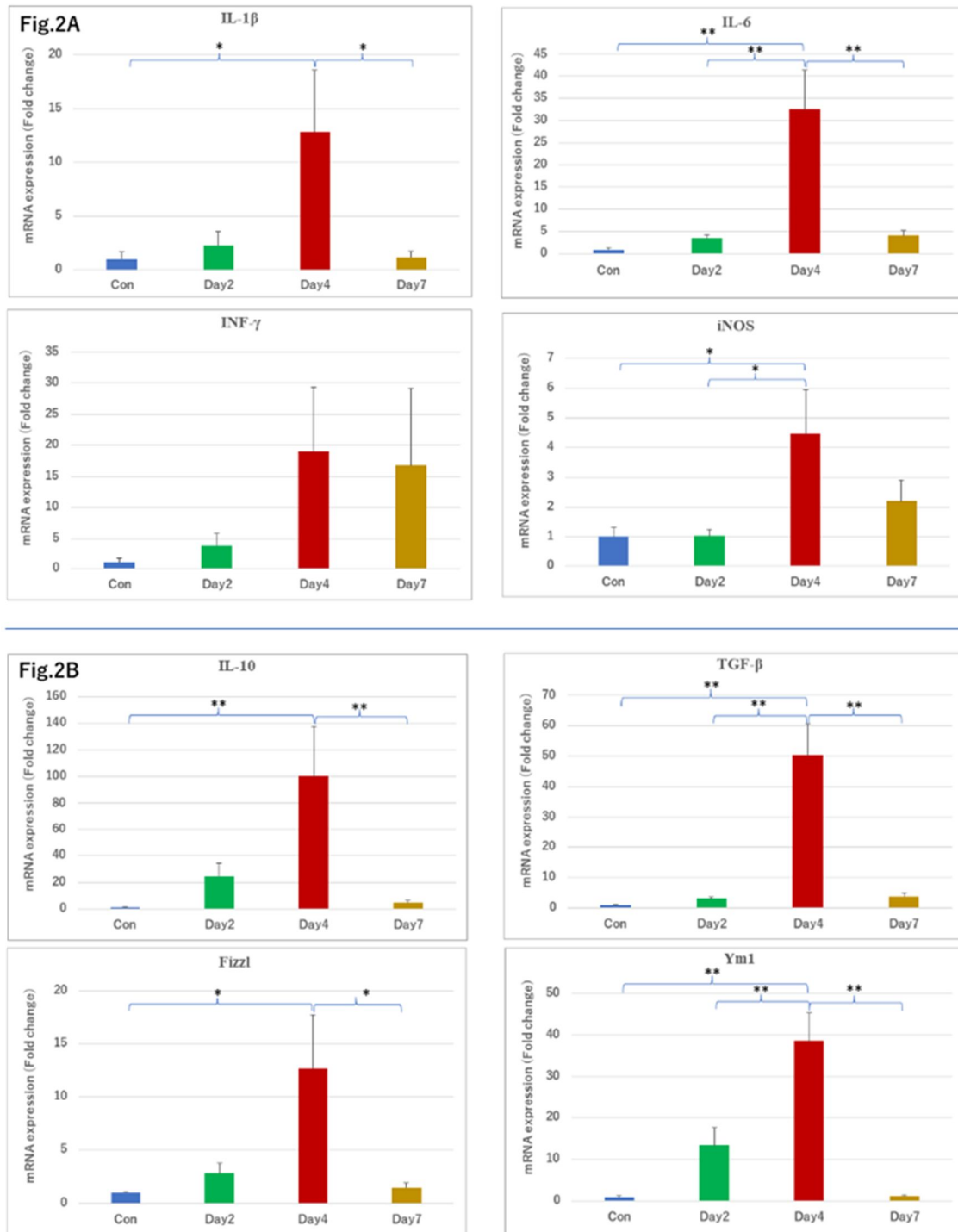


Fig.2 The relative fold change of mRNA expression of some relating factors of M1 (A) and M2 (B) macrophages in 2 days, 4 days, and 7 days after muscle injury. Con: control group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kawashima T, Ji RC, Itoh Y, Agata N, Sasai N, Murakami T, Sokabe M, Hamada F, Kawakami K.	4. 巻 64 (5)
2. 論文標題 Morphological and biochemical changes of lymphatic vessels in the soleus muscle of mice after hindlimb unloading	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Muscle Nerve	6. 最初と最後の頁 620-628
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mus.27402	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 Onishi Y., Zarogoulidis P., Ji R-C, Onishi M., Kubota N., Eshita Y.	4. 巻 29(6)
2. 論文標題 Consideration with " Intratumoral gene therapy versus intravenous gene therapy for distant metastasis control with DDMC non-viral vector-p53 "	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 313-315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41434-021-00298-y	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 Ji RC	4. 巻 27(5)
2. 論文標題 The role of lymphangiogenesis in cardiovascular diseases and heart transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heart Fail Rev.	6. 最初と最後の頁 1837-1856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10741-021-10188-5	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 -
1. 著者名 Yoshioka K, Sasai N, Kurogi Y, Hayakawa K, Itoh Y, Agata N, Murakami T, Inoue-Miyazu M, Sokabe M, Kawakami K	4. 巻 533(3)
2. 論文標題 Cessation of electrically-induced muscle contraction activates autophagy in cultured myotubes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 410-416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.09.009	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀 瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷後のリンパ管応答・コ・メディカル形態機能学会
3. 学会等名 第19回学術集会・総会（鹿児島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀 瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷後のリンパ管の分布・形態変化-伸長性収縮による筋損傷モデルマウスを用いて
3. 学会等名 日本解剖学会第77回九州支部学術集会（大分）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島隆史、田村悠磨、紀 瑞成、縣信秀、伊東佑太、濱田文彦、河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮時に生じるマウスヒラメ筋内リンパ管の分布応答
3. 学会等名 日本解剖学会第77回九州支部学術集会（大分）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀 瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 マウス骨格筋損傷からの回復過程におけるリンパ管の変化
3. 学会等名 第26回 日本基礎理学療法学会学術大会（札幌）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島隆史、紀 瑞成、縣 信秀、伊東佑太、笹井宣昌、清島大資、濱田文彦、河上敬介
2. 発表標題 廃用性筋萎縮時の骨格筋内リンパ管数の変化とリンパ管新生因子の関係
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀 瑞成、縣 信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 筋損傷初期において、筋内リンパ管は拡張する
3. 学会等名 第25回日本基礎理学療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村悠磨、川島隆史、紀 瑞成、縣信秀、伊東佑太、河上敬介
2. 発表標題 骨格筋損傷初期における筋内リンパ管の変化
3. 学会等名 第44回日本リンパ学会総会
4. 発表年 2020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	河上 敬介 (Kawakami Keisuke) (60195047)	大分大学・福祉健康科学部・教授 (17501)	

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
---------	---------