

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09309

研究課題名（和文）筋損傷および老化に伴う骨格筋線維化の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of skeletal muscle fibrosis associated with muscle injury and aging

研究代表者

依田 昌樹（Yoda, Masaki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：30464994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：加齢および病態にともない、筋組織の線維化が生ずることが知られている。この反応は不可逆性のため線維化発症のメカニズムの解明、その後の予防および治療に関する知見を得ることは重要であると考えられる。今回、間葉系前駆細胞（FAPsもしくはMPCs）が筋損傷後および筋萎縮後のどのような動態を示すのかを細胞の組織学的な局在性解析、FACS解析、遺伝子発現解析により明らかにすることを目的とした。遺伝子発現解析の結果、Ptx3の発現が対象群と比較して有意に高いことが明らかとなった。今後、Ptx3を標的に線維化抑制の効果を動物実験により明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

筋組織変性の1つである筋線維化は不可逆的な反応なので、筋線維化の予防方法の確立は急務である。今回、損傷筋組織中の間葉系前駆細胞を標的細胞とし組織局在、筋組織中の細胞集団解析、遺伝子発現解析などを、筋損傷マウスモデル、廃用性筋萎縮マウスモデルを使用して進めた。さらに正常な筋生理学を把握するためには病態モデルと比較することは非常に重要である。本研究は筋肉組織の線維化に対して多方面のアプローチから病態解明および予防法の確立を目指したものである。本研究で得られた結果から筋肉組織の線維化に対する新規治療法への応用に向けた基礎的知見の提供が一部出来たと考えている。

研究成果の概要（英文）：Fibrosis of muscle tissue is known to occur with aging and pathological conditions. Since this reaction is irreversible, it is important to elucidate the mechanism of fibrosis onset and to gain knowledge regarding its subsequent prevention and treatment. In this study, we investigated the dynamics of mesenchymal progenitor cells (FAPs or MPCs) after muscle injury and atrophy by histological localization analysis, FACS analysis, and gene expression analysis. Gene expression analysis revealed that Ptx3 expression was significantly higher than in the target group. In the future, we plan to clarify the effect of Ptx3 targeting fibrosis inhibition by animal experiments.

研究分野：整形外科

キーワード：筋損傷 筋萎縮 間葉系前駆細胞 筋線維化 遺伝子発現解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

長高齢者社会を目前としている我が国にとって、加齢にともなう運動器疾患は大きな問題となっている。通常、骨格筋は高い再生能力を有する組織であり、健常な状態では損傷後は早期に筋再生が行なわれる。しかし、病的環境下や加齢によりその再生能力は低下する。また、サルコペニアや廃用性筋萎縮にともない脂肪浸潤、線維化を中心とした筋肉の変性が生じることも知られている。この筋変性は不可逆な現象と捉えられており、骨格筋の機能を著しく低下させる。しかしながら、筋変性に効果のある治療法は今のところはなく、リハビリテーションなどに頼っているのが現状である。

骨格筋組織には筋線維(筋細胞)、神経細胞、間質細胞などの他に2種類の幹・前駆細胞が存在している。1つは筋線維へ分化がコミットした筋衛星細胞であり、骨格筋組織が損傷を受けるとすばやく活性化し増殖・分化・融合することにより再生筋線維を形成する。もう1つは、近年筋組織中の間質中に存在し筋線維芽細胞および脂肪細胞へと分化する間葉系前駆細胞(fibro/adipogenic progenitors; FAPs)であり、FAPsは筋損傷や筋萎縮にともなう筋変性に大きな影響を与えていることが明らかになってきている。一度起きてしまった筋変性部位は筋線維に置き換わることはなく、筋組織としての機能低下を引き起こす。このように、筋変性に対して効果のある治療薬の開発が待たれるが、筋変性発症に関する分子機構に関する知見は乏しい。

2. 研究の目的

本研究の目的は、筋損傷および筋萎縮にともなう筋変性の中でも筋線維化に関する組織学的解析および遺伝子発現解析を中心に筋線維化の分子機構を明らかにし、臨床応用につながる分子標的を探索することである。

3. 研究の方法

1) マウスモデル

筋損傷および廃用性筋萎縮モデルマウス作製には9週齢の野生型マウス(C57BL/6)を使用した。筋損傷は三種混合麻酔下で左足の前脛骨筋にカルジオトキシン(CTX)を筋注し誘導した。反対側の前脛骨筋にはPBSを筋注し、対照群とした。廃用性筋萎縮は吸引麻酔下でソフトワイヤーを巻き付けて下肢を固定することで惹起させた。実験に使用したサンプルは筋損傷モデルマウスではCTX投与後3日後および7日後に前脛骨筋を摘出した。また、廃用性筋萎縮モデルマウスでは処置後3日後および2週間後に前脛骨筋もしくは下肢筋肉組織を採取した。

2) 組織学的解析

凍結切片作製用包埋は採取した前脛骨筋を液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速に凍結して作製した。観察の目的により組織は組織横断面および縦断面が薄切できる方向に包埋した。凍結切片は10 μ mで作製し風乾後、2%パラホルムアルデヒドで固定を行い透過処理後に常法通り免疫染色を行った。作製した標本は蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡にて画像を取得し画像処理を行った。また、FAPsの局在をより明確にするために、Pdgfr陽性細胞において赤色蛍光を呈するレポーターマウスを作製して同様に実験に供した。

3) フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析を行うために、筋損傷モデルマウスからは前脛骨筋を廃用性筋萎縮モデルマウスからは下肢筋肉組織をサンプルとした。筋組織はハサミを用いて細片にした後、酵素処理にて単細胞に分散させた。FAPs表面マーカー(CD31-CD45-Pdgfr +Sca-1+)を染色後にフローサイトメーターで細胞頻度を求めた。さらに全単細胞数と細胞頻度によりFAPs陽性細胞数を算出した。FAPsの単離はセルソーターを用いて行った。

4) 遺伝子発現解析

採取した前脛骨筋はRNA抽出液中でビーズ破砕し、Total RNAの精製を行った。逆転写後、得られたcDNAを鋳型に定量的PCRを行い、組織中のRNA発現を評価した。

5) RNA-seq解析

筋損傷モデルマウスからは前脛骨筋を、一方で廃用性筋萎縮モデルマウスからは下肢筋肉を材料としFAPsをセルソーターにて単離した。単離した各実験群のFAPsからTotal RNAを抽出し、ライブラリー作製、シーケンス解析、遺伝子単位発現解析は受託解析にて行った。GOエンリッチメント解析は「Extracellular matrix」の項目で抽出データの解析を行った。

4. 研究成果

1) 筋損傷後の筋組織線維化関連分子の探索

今回、筋線維化機構の解明のために筋損傷モデルマウスを使用した理由は以下の仮説にもとづいたものである。

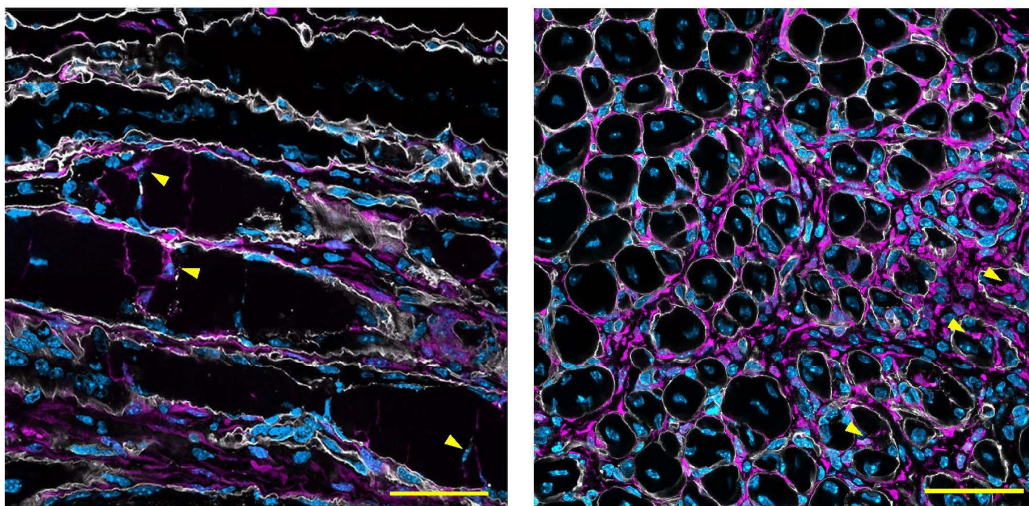
「筋再生には筋衛星細胞の速やかな増殖・分化・融合が起こることが必要であるが、そのための足場として細胞外基質の産生が亢進する可能性が高い」

すなわち、線維化が惹起される時と同じ分子機構が筋組織再生時に働いていると考えたためである。細胞外基質を産生している細胞はFAPs由来であることが報告されているため、FAPsのマーカー分子であるPdgfr のレポーターマウスを作製し最初に組織学的な検討を行った。筋損傷7日後の組織横断面の染色像から再生筋線維間の間質組織に多数のFAPs（もしくはFAPs由来の細胞）の像が観察された。さらに縦断面の組織像からも間質組織にFAPsが重層して存在していることが確認できた（Fig. 1）。またFACS解析の結果から、筋損傷3日後および7日後ともにFAPsの数が対象群と比較して有意に増加していることが明らかとなった（Fig. 2）。興味深いことに、損傷筋線維内にFAPsの存在が確認され、FAPsが炎症細胞（主にマクロファージ）を誘引して損傷筋線維の排除に関連している可能性が推察された。今後マクロファージの解析および、FAPsが産生しているサイトカイン、ケモカインの解析を進める予定である。前脛骨筋組織の遺伝子発現解析によって、これまで組織線維化に関する遺伝子群の発現がCTX投与群で有意に上昇していることが明らかとなった（Fig. 3）。しかしながら遺伝子発現がFAPs由来であるか、筋線維を含む他細胞由来のものが明らかではなかったため、FAPsをセルソーターで単離後、RNA-Seq解析を行った。GOエンリッチメント解析により「Extracellular matrix」の項目で抽出データ解析の結果、筋損傷3日後および7日後においてPtx3の発現が高いことが分かった（Fig. 4）。Ptx3は炎症および線維芽細胞の活性化に関係がある分子であることがわかっており、細胞外基質の分泌に深く関係しているとされている。また損傷初期（筋損傷3日後）では細胞外基質に関する遺伝子発現が高値であり、損傷7日後では細胞外基質に置換される分子が高いことが明らかとなった。今後は損傷初期で高発現しているPtx3を阻害することにより線維芽細胞の活性化を抑えるとともに線維化抑制のための標的分子として詳しい解析を行う予定である。

2) 廃用性筋萎縮による筋線維化分子の探索

今回、廃用性筋萎縮モデルのマウスから下肢筋肉組織中のFAPsのRNA-Seq解析を行った結果、筋拘縮3日後に線維化に関連したTnc, Cthrc1, Postn, Ccn4の発現が、14日後にはCthrc1, Ptx3, Lox, Tncの発現が高いことが示された（Fig. 5）。これらの結果は経時的に同じ分子発現の違いがあることを示している。また筋損傷と筋萎縮といった異なった病態において同じ分子（Ptx3）の発現上昇が見られたことは、筋線維化に関する共通の分子機構の存在が考えられる。今回の実験において得られた結果から、筋線維化を抑制もしくは予防できる分子を同定するための基礎的データを提示したと考えている。今後は動物実験を中心により深い分子機構の解明を目指すとともに臨床応用に向けて貢献できるような製剤の探索を今回得られた結果をもとに目指す意向である。

DAPI Pdgfra (RFP) Laminin



Bar: 50μm

Fig.1 筋損傷7日後の再生筋肉組織中のFAPsの局在
FAPsは間質組織中に多数観察された。また損傷筋線維中にもFAPsの存在が確認され損傷筋線維排除に関わっている可能性が示された（矢頭）。

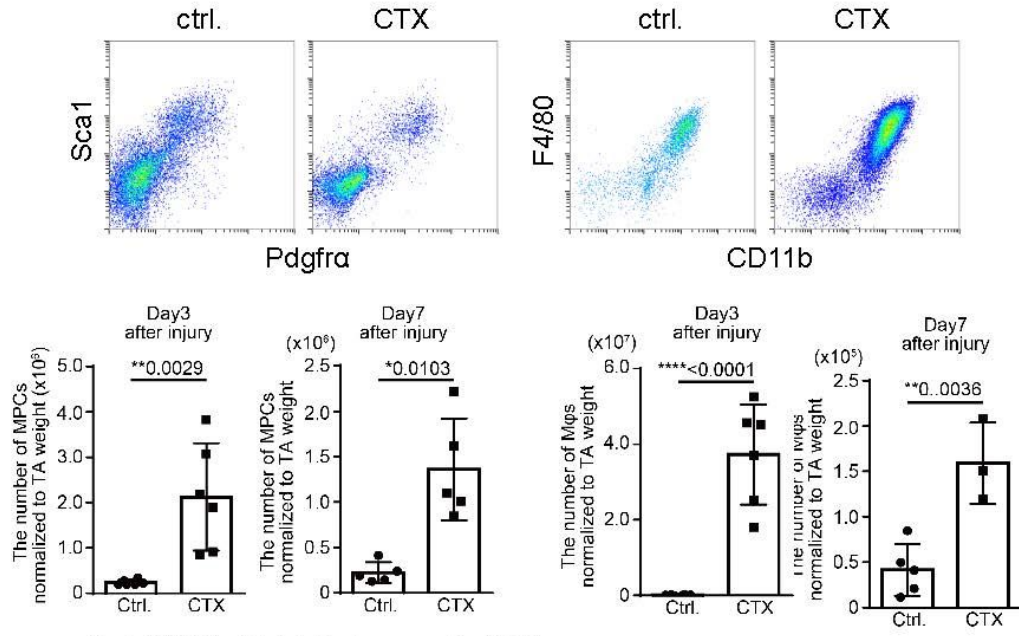


Fig. 2 筋損傷後のFAPsおよびマクロファージの細胞数
筋損傷3日後および7日後において対照群と比較してFAPsの数は有意に増加していた。マクロファージについても筋損傷直後から増加が観察され、筋損傷後7日後でも有意に対照群と比較して増加していた。

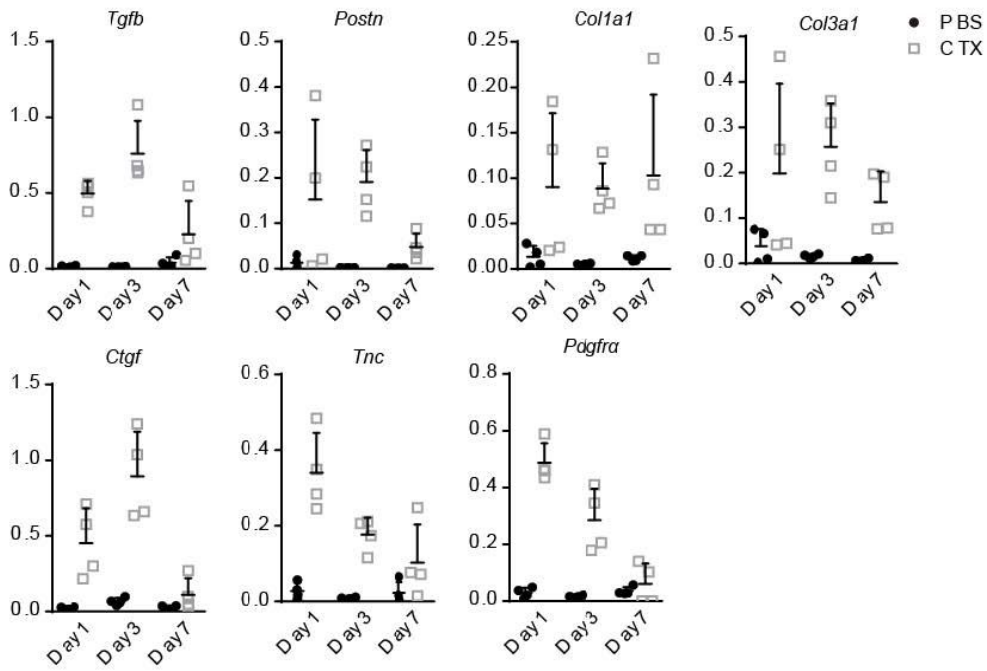


Fig. 3 筋損傷後の筋組織中の遺伝子の変動
これまで言われている線維化に関わる分子が損傷直後から有意に上昇していることが明らかとなった。

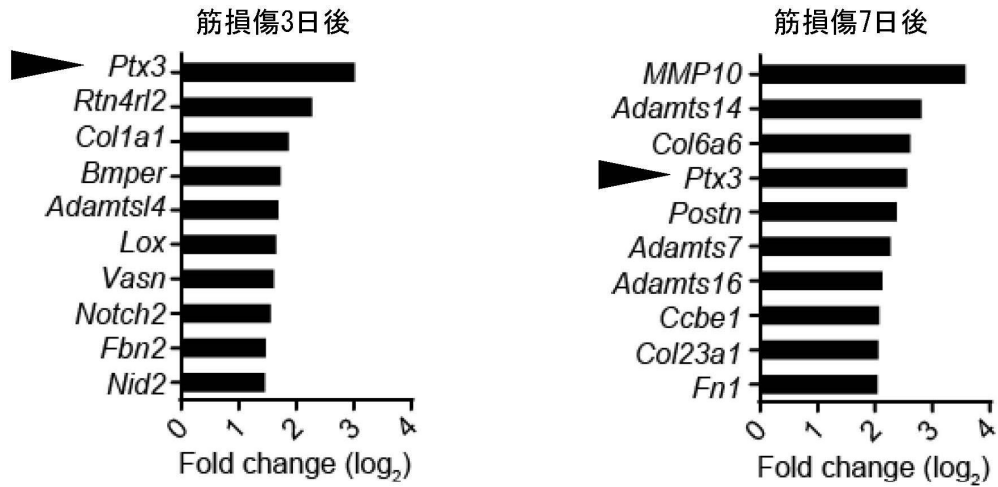


Fig. 4 筋損傷3日後および7日後のFAPsにおける遺伝子発現
筋損傷3日および7日後において線維化に関連が関与している可能性の高いPtx3の発現が高いことが明らかとなった。

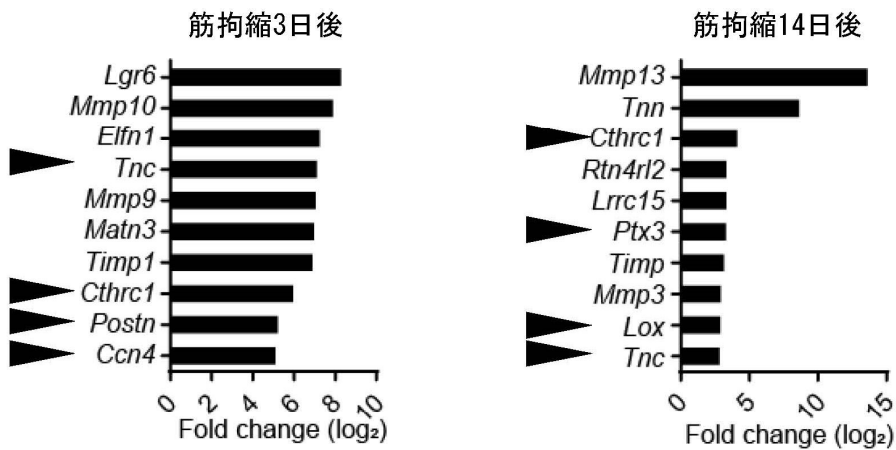


Fig. 5 廃用性筋萎縮モデルにおける拘縮3日後および14日後のFAPsにおける遺伝子発現
筋拘縮においても線維化に関連している分子の発現上昇が観察された。

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 1件）

1. 著者名 Yoshiyuki Takahashi, Masaki Yoda, Osahiko Tsuji, Keisuke Horiuchi, Kota Watanabe, Masaya Nakamura	4. 巻 14
2. 論文標題 IL-33-ST2 signaling in fibro-adipogenic progenitors alleviates immobilization-induced muscle atrophy in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Skeletal Muscle	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13395-024-00338-2	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 Yuhei Takada, Noboru Matsumura, Hideyuki Shirasawa, Masaki Yoda, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Keisuke Horiuchi	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	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshiyuki Takahashi, Masaki Yoda, Osahiko Tsuji, Keisuke Horiuchi, Kota Watanabe, Masaya Nakamura
2. 発表標題 The IL-33-ST2 Signaling in Fibro-adipogenic Progenitors Attenuates Immobilization-induced Muscle Atrophy
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋慶行, 依田昌樹, 辻収彦, 堀内圭輔, 渡辺航太, 中村雅也
2. 発表標題 廃用性筋萎縮における骨格筋間葉系前駆細胞の機能解析
3. 学会等名 日本筋学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 依田昌樹, 高橋慶行, 東門田誠一, 今村美佳, 辻収彦, 中村雅也
2. 発表標題 筋損傷後の筋再生における間葉系前駆細胞の役割
3. 学会等名 日本骨代謝学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋慶行, 依田昌樹, 辻収彦, 堀内圭輔, 渡辺航太, 中村雅也
2. 発表標題 廃用性筋萎縮における骨格筋間葉系前駆細胞の機能解析
3. 学会等名 日本整形外科学会
4. 発表年 2022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

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