

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 26日現在

機関番号：87114
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22500497
 研究課題名（和文） 廃用による筋萎縮メカニズムの解明

研究課題名（英文） Mechanisms for the disuse muscle atrophy

研究代表者

植田 尊善（UETA TAKAYOSHI）
 独立行政法人労働者健康福祉機構総合せき損センター（研究部）・研究員
 研究者番号：00574138

研究成果の概要（和文）：

廃用による筋萎縮メカニズムの解明を行うため、マウス片側下肢強制外固定モデル、座骨神経切断モデル、脊髄損傷（胸髄完全切断）モデルを確立した。いずれのモデルに於いても組織学的検索では細胞核数の変化を伴わない急速な筋萎縮を認めた。これらのモデルに於ける経時的な発現遺伝子解析を行った結果、細胞周期制御因子やクロマチンリモデリングに関わる SWI/SNF ファミリーなどに早期からの変化が認められ、筋萎縮は受動的なイベントではなく、転写活性が劇的に変化する active な現象であることが示唆された。また、筋の再生時に於いてはクロマチンリモデリング因子 Chd2 の働きが重要であり、エピジェネティックな制御が必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To address the mechanisms underlying muscle atrophy, we produced three different mouse atrophy models by disuse and denervation. In these models, transcriptome analysis revealed that the drastic changes of chromatin remodeling factors and cell cycle regulators were observed at the acute phase, indicating that muscle atrophy is the active rather than passive cellular responses. In addition, epigenetic regulation of the satellite cell is essential for the muscle regeneration after injury and atrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、リハビリテーション科学・福祉工学

キーワード：筋萎縮、脊髄損傷、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景と目的

高齢者の生活の質や活動度を損ねている大きな原因の一つとして、廃用に伴う筋萎縮があげられる。しかし、筋萎縮のメカニズムは殆ど解明されておらず、治療研究規模や世間一般での認知度は骨粗鬆症と比較しても格段に低い。また、臨床の現場ではリハビリ

を含めた理学療法を行なう以外に方法は無く、治療期間も個人差が非常に大きい。一方で基礎研究分野に於いても、外傷後や廃用による筋萎縮・再生の分子レベルでのメカニズムは不明な点が多く、その研究対象の多くは筋ジストロフィーが中心である。そこで本研究に於いては、筋挫傷モデルや廃用性筋萎縮

モデルを用いて筋萎縮/筋再生の分子メカニズムを、筋幹細胞のエピジェネティクスの視点からの解析を行なうことで検討した。

エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御するゲノム構造等の化学的修飾の総称であるが、ヒト全ゲノムが解読されたポストゲノム時代の生命科学における最も重要な研究領域として注目を集めている。ヒトの体や細胞は実に多様性に富み個体差も大きい。ゲノム解読により見つかったわずか2万数千個のヒト遺伝子ではとてもこの多様性を説明することができないため、2万数千個の全ゲノムからの情報の取り出し方の違いが多様性を生み出すと考えられている。この『ゲノム情報の取り出し方』を研究する学問領域がエピジェネティクスであり、細胞分化メカニズムにも重要な働きを担うと考えられている。当初、細胞分化メカニズムの解析のためには、分化段階の細胞に発現している遺伝子群を同定することが重要であり、このなかに分化制御因子が含まれているとの予測のもとにスクリーニングが行われた。しかし、考えてみればいずれの解析も遺伝子としては「既に発現が終了した時点」での検索であるため、より決定的な分化制御因子の検索には遺伝子発現以前の状態、つまり『遺伝子発現起点的プログラム』を解明することが必要不可欠であることが明らかとなり、近年のエピジェネティクス解析が注目されるに状況至っている。なかでも、全長 2m にも及ぶといわれる DNA を、わずか 10um の核に凝集させているクロマチン構造の制御機構は、遺伝子発現調節イベントの中でもより上位に位置すると考えられている。通常、クロマチンはタイトに凝集しており DNA 配列へのアクセスは抑制されているが、細胞が分化する際には何らかのメカニズムによりマーキングされた特定の部位のみのクロマチン構造がほどかれ、その開放された部分に転写因子が結合することで分化関連遺伝子が発現し、タンパク質へと翻訳され、細胞が形態変化して特定の機能を持つというステップを経る。このクロマチンの開放には ATP によるエネルギーを必要とするため、我々は ATPase を有し筋組織に豊富に含有されるクロマチンリモデリング因子 Chd2 (Chromodomain helicase DNA-binding domain protein 2) に注目して研究を行なっている。

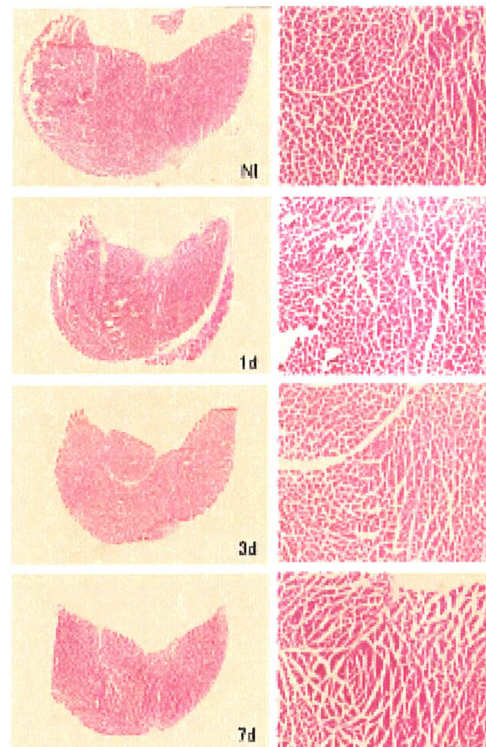
筋の萎縮に関しては、下肢強制外固定による廃用性萎縮モデルと、脊髄/挫骨神経離断による denervation モデルを作成した。萎縮誘導 24 時間後のサンプルを用いて全ての発現遺伝子を網羅的に同定・定量するトランスクリプトーム解析を行ない、精度の高い萎縮マーカー候補因子の同定を試みた。また、脊髄損傷患者の大腿周径、下腿周径を経時的に

測定し、どのタイミングでどの程度萎縮が進むのかを検討した。

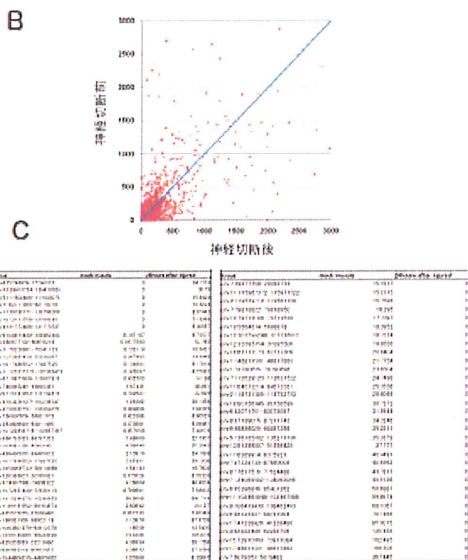
一方、筋の再生は筋幹細胞によりなされるが、生体内では筋細胞膜と基底膜の間に存在するサテライト細胞が幹細胞としての役割を果たすことが知られている。しかし、外傷後や萎縮後に自然経過として筋組織が再生する過程に於いて、実際にサテライト細胞がどのようにして筋組織を再生し、どのような因子が重要な働きをしているのかについて詳細は明らかにされていない。そこでまず我々は、成体筋組織における Chd2 の発現局在を免疫染色により解析し、次に株化された筋幹細胞である C2C12 細胞株を用いて筋分化における Chd2 の役割解明を行なった。Chd2 と協調して働く因子を同定するために、免疫沈降法により Chd2 タンパク質複合体を解析し、筋分化関連因子との関連を調べた。また、Chd2 の遺伝子結合部位を明らかにするために、クロマチン免疫沈降 ChIP を行なった。さらに、Chd2 の直接的な役割を調べるために、マイクロ RNA により機能阻害実験を行ない、*in vitro* ならびに損傷筋移植モデルでのノックダウン株の分化能を解析した。

2. 研究成果

筋萎縮モデルとして強制外固定と挫骨神経切断、脊髄切断モデルの3種類を作成し、大腿周径の経時的な測定を行なったが、これらのモデルに於ける筋萎縮のスピードに有意な差は認められなかった。下図の如く筋萎縮はわずか1日で著明に進んでおり、非常にダイナミックな現象であることが推測された。

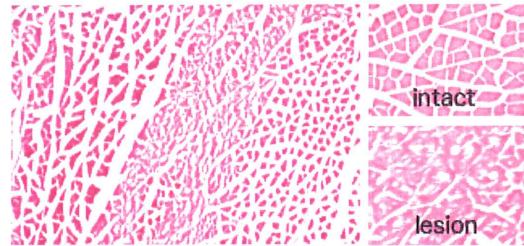


これらの劇的なイベントを解析するためには、萎縮前後で筋組織に発現している全遺伝子の種類と発現量を網羅的に解析できるハイスループット技術が有効であると考えた。そこで、次世代シーケンサーSolexaGA IIを用いて、筋萎縮前後でのトランスクリプトーム解析を行なった。これは、2000 万以上の mRNA 断片に対して全てシーケンサーで DNA 配列を読み取り、バイオインフォマティクスの手法で読まれた mRNA がどの遺伝子座のどの部分に対応するかを網羅的に解析できるツールである。その結果、従来筋萎縮のマーカーとなる遺伝子は Fbxo32 (別名 atrogen-1) と Trim63 (別名 muscle-specific E3 ubiquitin ligases MuRF1) が提唱されていたが、筋萎縮誘導後のトランスクリプトーム解析では Fbxo32 の発現が RPKM 値 (RPKM=1 は、1 個の細胞で 1 個の mRNA が発現していることを意味する) で萎縮前 0.086 が萎縮後 0.007、Trim63 に関しては 0.80 が 0 と有意な変動は認められなかった。全体としては劇的な発現変動が確認され、特に萎縮前に RPKM 値で数十~数百発現していた遺伝子が、萎縮後に 0 となっている遺伝子が 30 個以上確認された。また、逆に、萎縮前に発現がほとんど無かった遺伝子が、萎縮後に劇的に発現上昇したのも 40 個弱捉えられた(下図 B, C)。

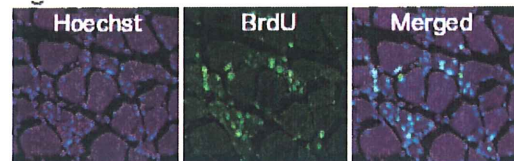


マイクロアレイ解析も同様の解析は可能であるが、発現は倍数比でしか表記できないため、このように完全に発現がゼロになる遺伝子や、もともとの発現がゼロであった遺伝子の変化を捉えることは不可能であり、絶対的定量が可能なトランスクリプトーム解析の強みを実感した。これらの遺伝子は筋萎縮の鋭敏な新規マーカーとして活用できる可能性があり、それらの筋萎縮に於ける役割解析と共に今後活用して行く予定である。

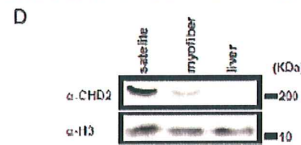
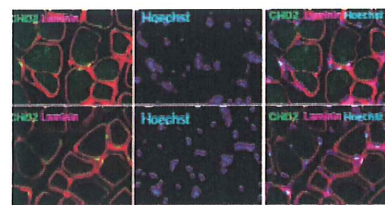
一方、筋の再生現象を解析するために、我々はコンピュータ制御下に定量的な圧挫損傷作成する筋外傷モデルを使用した。従来の Cardiotoxin などの chemical な筋損傷モデルと異なり、この圧挫損傷モデルに於いては図 1A に示す如く炎症反応や筋融解現象は殆ど見られず、損傷部と正常部の境界も明瞭で、実際の筋損傷の病態を正しく再現していた。



筋挫傷作成後、BrdU を 7 日間腹腔内投与して新規に合成された細胞をラベルした結果、下図の如く BrdU を取り込んだ筋細胞が多く観察され、細胞新生による再生機構が確認された。

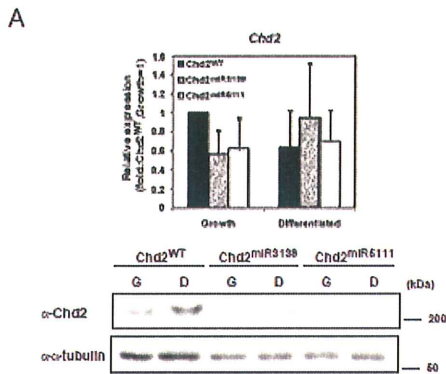


次に我々は、筋組織に於けるクロマチンリモデリング因子 Chd2 の局在を免疫染色により調べた結果、Chd2 は筋繊維分画ではなく、基底膜と筋細胞膜の間隙に存在するサテライト細胞に発現していることが明らかとなった(下図)。我々の開発したサテライト細胞核を選択的に回収する技術 4, 5 を用いて確認したが、やはり Chd2 はこの幹細胞分画に発現していることが確認できた(下図)。

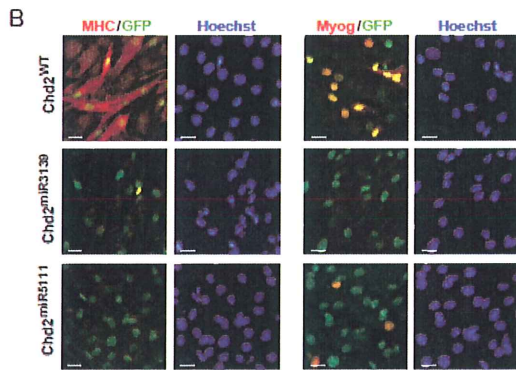


株化された筋幹細胞/前駆細胞 C2C12 のラインにおいても同様に Chd2 の発現を確認した。そこで、筋幹細胞における Chd2 の役割を調べるために、マイクロ RNA により Chd2 の発現阻害を行ない、2 種類のラインを確立した (Chd2miR3139, Chd2miR5111)。両者とも遺伝子レベルでは Chd2 の発現は抑制されていないが、タンパク質レベルでの翻訳抑制が

かかっていることをリアルタイム PCR と western blot にて確認している (下図 A)。



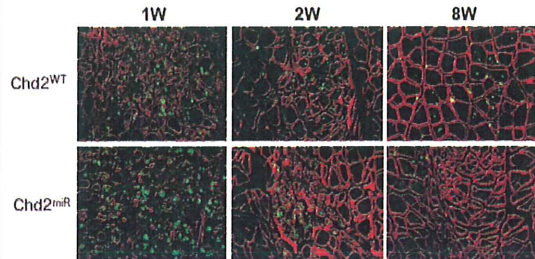
これらの C2C12 ラインを *in vitro* で分化誘導した結果、非常に興味深いことに Chd2 の発現を阻害したラインでは筋分化が著明に抑制されており、初期の筋発生マーカーの myogenin や筋細胞の特徴である myosin heavy chain (MHC) の発現が有意に抑制されていた (下図 B)。



実際にリアルタイム PCR でも、筋分化関連遺伝子 (Desmin, Ckm, Myh4, Myog) の発現は正常細胞株では分化後に著明に発現上昇が認められるが、Chd2 をノックダウンした細胞株では筋関連遺伝子発現が軒並み抑制されていることが分かった。この結果は、Chd2 が細胞増殖や細胞周期に依存しないメカニズムであることも、FACS ならびに cyclin 遺伝子の発現実験で確認している。そして実際に、Chd2 が Gapdh や Igh などのコントロール遺伝子の遺伝子座には存在していないが、筋分化関連遺伝子の遺伝子座には分化前後で結合していることを ChIP アッセイにより確認した。つまり、Chd2 は純粋に筋の分化現象に必須である結果が以上の実験により証明された。

これらの細胞が実際の損傷筋中に於いても分化能に差が認められるかを検討するため、細胞を GFP でラベルした後に腓腹筋挫傷を作

成したマウスに移植した (1x10⁵ 個、筋挫傷中心部に損傷直後に移植)。その結果、両者とも GFP 陽性細胞を損傷筋中に認め、生着していることは確認されたが、8 週間に渡りその後の分化過程を観察したところ、Chd2 をノックダウンしていない C2C12 細胞は徐々に正常筋組織へと分化して行くのに対し、Chd2miR 細胞では殆ど分化が認められず、未熟な筋組織のまま留まっていることが明らかとなった (下図)。



以上の結果から、筋再生には筋幹細胞であるサテライト細胞からの分化が必須であり、この分化メカニズムにはクロマチンリモデリング因子である Chd2 が必須であることが示唆された。Chd2 含めたクロマチンリモデリング因子の異常は転写発現制御異常に直結するため、これらの因子と多くの病態との関連解析が広く進められている。例えば、Chd7 の突然変異は CHARGE 症候群という、虹彩欠損 (Coloboma of iris)、心疾患 (Heart disease)、後鼻孔閉鎖 (Atresia choanae)、成長障害・精神発達障害 (Retarded growth and mental development)、性器低形成 (Genital hypoplasia)、耳介変形・難聴 (Ear anomalies and deafness) を合併する稀な疾患の原因とされている。また、皮膚筋炎の患者の一部は Chd3/Chd4 に対する自己抗体産生が上昇しており、易腫瘍性のリスクが高いとされている。しかし、Chd2 に関してはその機能は殆ど解明されていない。しかし、過去に我々が作成した Chd2 遺伝子改変マウスでは胎生致死であり、ヘテロマウスでは成長障害、腎機能障害、貧血、リンパ腫、心疾患、筋発達障害が確認されている。実際に造血幹細胞においては Chd2 がその分化能に重要であり、ヘテロマウスで見られた貧血やリンパ腫は造血幹細胞の分化異常から生じたものと推測されている。本研究のデータも筋幹細胞の分化に Chd2 が必須であることを示しており、細胞分化とエピジェネティックな制御が不可分であることが強調された。

一方筋萎縮に関しても、そのメカニズム解明が積極的になされている。我々のデータからも、筋萎縮が単なる受動的なイベントではなく、転写活性が劇的に変化する active な現象であることは明らかである。実際には筋量を維持するためには蛋白合成と変性のバランスが重要といわれ、実際に筋萎縮時の細

細胞数をモニターした研究では、筋萎縮時の筋細胞数自体に変化は見られず、萎縮は細胞数が保たれたまま個々の細胞タンパク量の減少によるものであることが明らかとなった。そのメカニズムは非常に複雑であり、近年ようやくその一端が解明されつつある。最近、筋分化に重要な因子である myogenin を欠損させたマウスでは、denervation による筋萎縮が抑制されており、myogenin は筋分化にも筋萎縮にも働く二面性を有しているという報告がなされた。最終的にはこの pathway も代表的な萎縮マーカーである Trim63 や Fbxo32 に収束することが明らかとなっているが、この報告に於いても Trim63 や Fbxo32 の発現を確認しているのは deervation を作成して 7 日後である。しかし、我々のデータを見ても明らかのように、筋萎縮のイベントは我々の想像以上に急速な現象であり、すでに萎縮後 24 時間で著明なボリュームの減少を認める。大腿周径の測定にても、萎縮後 1 日で既に 10% 近く減少していた。この、移植後 24 時間に焦点を当ててトランスクリプトーム解析を行なった結果、上述の Trim63 や Fbxo32 は殆ど発現に変化が無く、これらの因子以上に劇的に変化する遺伝子が数十個同定された。筋分化と同様、エピジェネティックな現象の解析は発現遺伝子の上流を捉えることが可能であるため、今後この研究で同定された複数の候補因子について、萎縮・再生誘導能やより遅い時期での発現解析を行ない、萎縮ならびに筋再生メカニズムの全容解明に迫りたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Hayashi T, Ueta T, Kubo M, Maeda T, Shiba K. Subarachnoid-subarachnoid bypass: a new surgical technique for posttraumatic syringomyelia. J Neurosurg Spine. 2013, 18(4):382-7.
- ② Taira T, Ueta T, Katayama Y, Kimizuka M, Nemoto A, Mizusawa H, Liu M, Koito M, Hiro Y, Tanabe H. Rate of Complications Among the Recipients of Intrathecal Baclofen Pump in Japan: A Multicenter Study. Neuromodulation. 2012, in press.
- ③ Yugué I, Okada S, Ueta T, Maeda T, Mori E, Kawano O, Takao T, Sakai H, Masuda M, Hayashi T, Morishita Y, Shiba K. Analysis of the risk factors for tracheostomy in traumatic cervical spinal cord injury. Spine. 2012, 37(26):E1633-8.
- ④ Maeda T, Ueta T, Mori E, Yugué I, Kawano O, Takao T, Sakai H, Okada S, Shiba K. Soft-tissue damage and segmental instability in adult patients with cervical spinal cord injury without major bone injury. Spine. 2012, 37(25):E1560-6.
- ⑤ Hayashi T, Maeda T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Comparison of the amounts of canal encroachment between semisitting and supine position of computed tomography-myelography for vertebral fractures of the elderly involving the posterior vertebral wall. Spine. 2012, 37(19):E1203-8.
- ⑥ Yukawa Y, Kato F, Suda K, Yamagata M, Ueta T. Age-related changes in osseous anatomy, alignment, and range of motion of the cervical spine. Part I: Radiographic data from over 1,200 asymptomatic subjects. Eur Spine J. 2012, 21(8):1492-8.
- ⑦ Kato F, Yukawa Y, Suda K, Yamagata M, Ueta T. Normal morphology, age-related changes and abnormal findings of the cervical spine. Part II: Magnetic resonance imaging of over 1,200 asymptomatic subjects. Eur Spine J. 2012, 21(8):1499-507.
- ⑧ Mori E, Okada S, Ueta T, Itaru Y, Maeda T, Kawano O, Shiba K. Spinous process-splitting open pedicle screw fusion provides favorable results in patients with low back discomfort and pain compared to conventional open pedicle screw fixation over 1 year after surgery. Eur Spine J. 2012, 21(4):745-53.
- ⑨ Hayashi T, Shirasawa K, Maeda T, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Solitary epidural amyloidoma of C2-4 without osteolysis of the spine in a multiple myeloma patient. J Orthop Sci. 2012, 17(3):319-22.
- ⑩ Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K, Okano H, Iwamoto Y, Okada S. Direct isolation and RNA-Seq reveal environment-dependent properties of engrafted neural stem/progenitor cells. Nat Commun. 3:1140-, 2012
- ⑪ Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J, Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H, Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H, Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN, Ohkawa Y. Chd2 interacts with H3.3 to

determine myogenic cell fate. EMBO J. 31:2994-3007, 2012

- ⑫ Takao T, Morishita Y, Okada S, Maeda T, Katoh F, Ueta T, Mori E, Yague I, Kawano O, Shiba K. Clinical relationship between cervical spinal canal stenosis and traumatic cervical spinal cord injury without major fracture or dislocation. Eur Spine J. 2013, In press.
- ⑬ Yugué I, Aono K, Shiba K, Ueta T, Maeda T, Mori E, Kawano O. Analysis of the risk factors for severity of neurologic status in 216 patients with thoracolumbar and lumbar burst fractures. Spine. 2011, 36(19):1563-9.
- ⑭ Kawano O, Ueta T, Shiba K, Iwamoto Y. Outcome of decompression surgery for cervical spinal cord injury without bone and disc injury in patients with spinal cord compression: a multicenter prospective study. Spinal Cord. 2010, 48(7):548-53.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 植田 尊善、脊椎脊髄損傷の臨床 -救急室から社会復帰、車椅子スポーツまでの実績-、第 326 回九州大学整形外科 Monthly Orthopaedic Conference、平成 22 年 5 月 17 日、アクロス福岡国際会議場
- ② 植田 尊善、脊椎脊髄損傷の臨床 (本邦の疫学調査を中心)、第 46 回日本脊髄障害医学会、平成 23 年 11 月 19 日、関西国際会議場
- ③ 植田 尊善、脊髄損傷の臨床、第 49 回日本リハビリテーション医学会、平成 24 年 6 月 1 日、福岡国際会議場

[その他]

ホームページ等

<http://www.sekisonh.rofuku.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 尊善 (UETA TAKAYOSHI)

独立行政法人労働者健康福祉機構総合せき損センター (研究部) ・研究員

研究者番号 : 00574138

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

大川 恭行 (OHKAWA YASUYUKI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号 : 80448430

岡田 誠司 (OKADA SEIJI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号 : 30448435