

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461317

研究課題名(和文) 廃用性骨格筋萎縮におけるバイオマーカーの確立とその臨床的有用性の検討

研究課題名(英文) Establishment of biomarker and clinical analysis in disuse skeletal muscle atrophy

研究代表者

村田 顕也 (Ken-ya, Murata)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90264853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチーの生検筋の筋再生過程におけるMSTNとActR IIBの発現を病理学的に検討し、臨床的意義を解明した。マウスモデルの検討：CTX非投与の対照群では、MSTNとActR IIBは、Type 2の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。CTX筋損傷モデルでは、MSTNとActR IIBは、再生過程にある筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた。再生筋線維に占めるMSTN陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず42-49%であった。MSTNとActR共陽性の再生筋線維の割合が筋線維萎縮の予測に重要である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of myostatin (MSTN) and activating receptors IIB (ActR IIB) in muscle specimens from cardiotoxin injured mouse model and inflammatory myopathy. The immunoreactivity against MSTN and ActR IIB is observed in sarcolemma and cytoplasm of Type II atrophic muscle fibers. On the other hand, the immunoreactivity against MSTN and ActR IIB is observed in cytoplasm and internal nuclei of regenerating muscle fibers. The MSTN positive ration of regenerating muscle fibers 42-49% through whole regenerating process. Both MSTN and ActR IIB positive ration in muscle fibers are very important to predict muscle atrophy.

研究分野：臨床神経内科学

キーワード：筋再生

1. 研究開始当初の背景

Myostatin (MSTN)は、骨格筋に特異的に発現する TGFβ スーパーファミリーに属するサイトカインである。MSTN は、activin receptor IIB (ActR IIB)と結合後、Smad 依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し、筋線維萎縮を促すことが知られている。

2. 研究の目的

今回、私たちは、Cardiotoxin (CTX)による骨格筋損傷マウスモデルと炎症性ミオパチーの生検筋の筋再生過程における MSTN と ActR IIB の発現を病理学的に検討し、その臨床的意義を解明した。

3. 研究の方法

生後8-12週の C57BL/6 マウスの大腿内転筋群に CTX (10μM) を投与し、筋損傷マウスモデルを作製した。CTX 投与 1,2,3 週後に sacrifice し、損傷部の病理学的変化を、MSTN, ActRIIB, myosin-heavy chain slow (MHC-s), myosin-heavy chain developmental (MHC-d) 抗体を用い検討した。CTX の代わりに生食を投与したマウスを対照群とし同様の検討を行った。

炎症性ミオパチー (封入体筋炎、皮膚筋炎) の生検筋を用いて同様の病理学的検討を行った。

4. 研究成果

CTX 非投与群 : MSTN と ActR IIB は、Type 1 陰性の萎縮筋線維の筋細胞膜と筋細胞質に発現していた。(図 1)

CTX 投与群 : CTX 損傷後 1 週間目には、MSTN と ActR IIB の発現は軽度であったが(図 2)、CTX 損傷後 3 週間目には、MSTN と ActR IIB は、MHC-d 陽性の再生過程の筋線維の内在核と筋細胞質に発現していた (図 3, 4)。

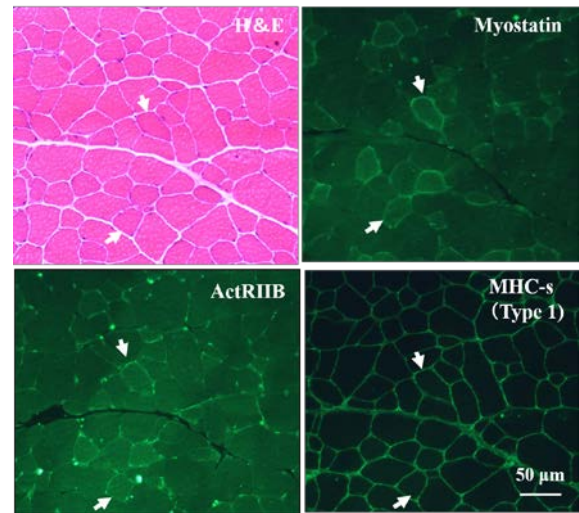


図 1. 正常対象の病理学的検討

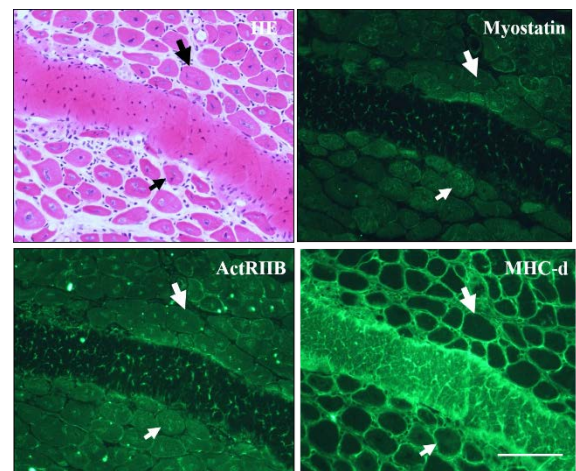


図 2 1week post CTX injury

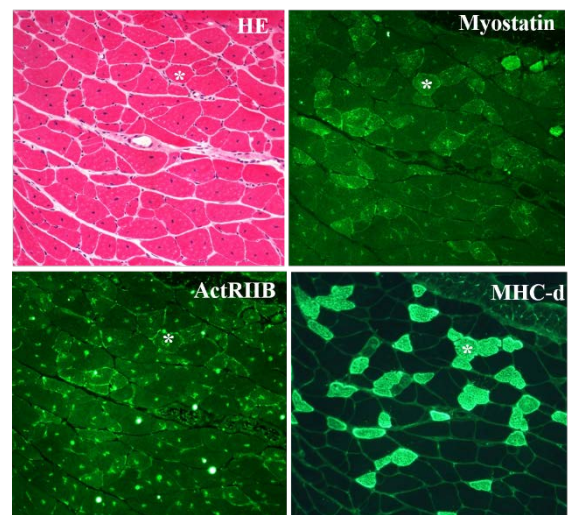


図 3 3week post CTX injury

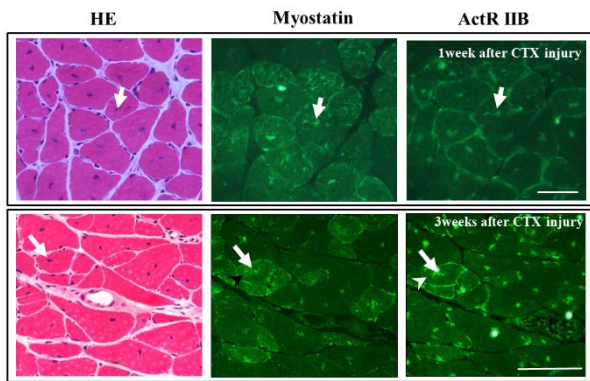


図4 Post CTX injury

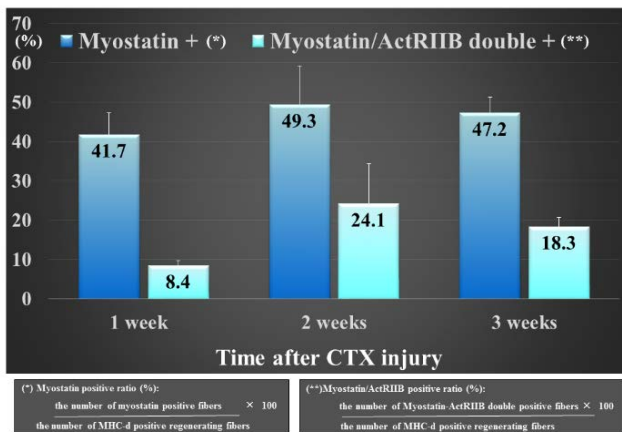


表1 Myostatin, Myostatin/ActRIIB 陽性線維の割合

再生筋線維に占める MSTN 陽性線維の割合は損傷後の時期を問わず 42-49%であった。また、ActR IIB 陽性筋線維は、常に MSTN 陽性を呈したが、再生筋線維に占める MSTN-ActR IIB 共陽性線維の割合は、損傷 1 週後は 8.4%、2 週後は 24.1%、3 週後は 18.3% と経時的に変化した (表 1)。

① 生検筋

s-IBM: MSTN と ActRIIB は、MHC-d 陽性の再生筋線維で発現していたが Rimmed-vacuole を有する筋線維では発現していなかった (図 5)。MHC-d 陰性の高度に萎縮した筋線維でも MSTN と ActRIIB は共陽性を示した (図 6)。

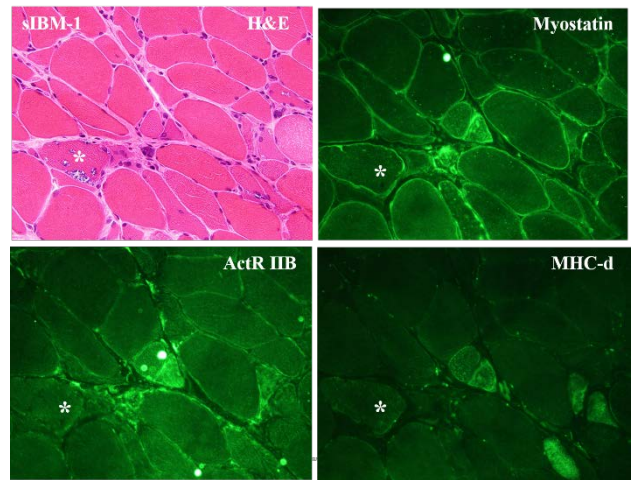


図5 s-IBM

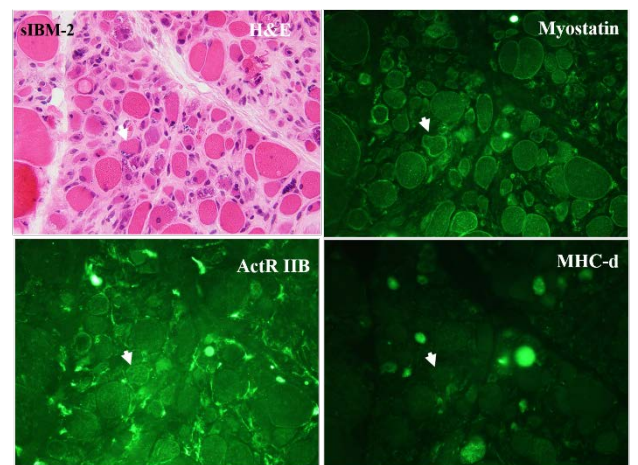


図6 s-IBM (高度萎縮部分)

皮膚筋炎: perifascicular atrophy を来した筋線維のうち、MHC-d 陰性の萎縮筋線維において MSTN と ActRIIB は共陽性を示した (図 7)

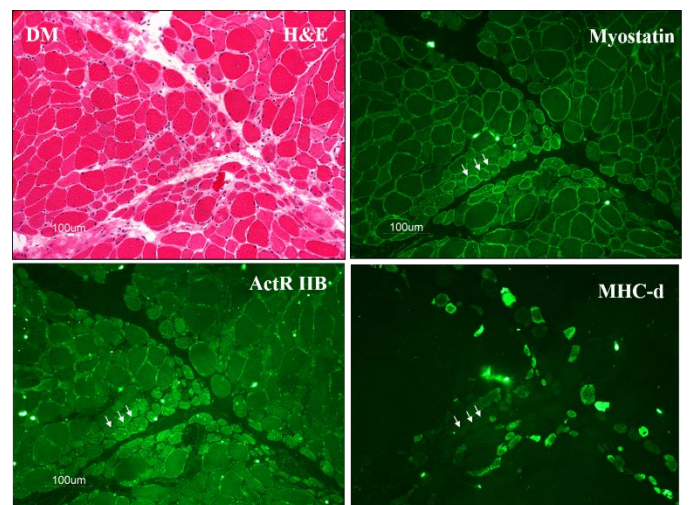


図7 皮膚筋炎

【考察】

Myostatin (MSTN)は、骨格筋に特異的に発現する TGFβ スーパーファミリーに属するサイトカインで、activin receptor IIB(ActR IIB)と結合後、Smad 依存性/非依存性経路を活性化し、筋分化や筋肥大を誘導する遺伝子群の発現を抑制し筋萎縮を促す (図 8)。

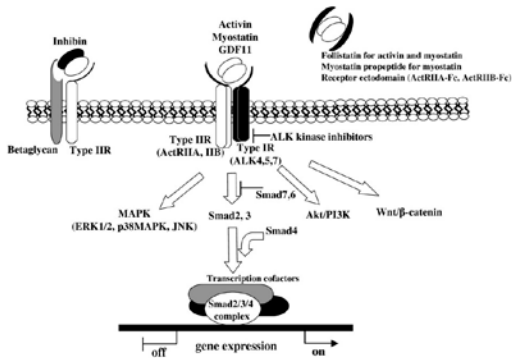


図 8 Myostatin と ActRIIB の作用機序

(Tsuchida et.al Cell Communication and signaling 2009,7)

MSTN は、Type 2 線維に発現するとの既報告はあるが、その受容体である ActRIIB の局在についての報告はなされていない。今回の CTX の筋損傷モデルから、筋再生時の MSTN と ActRIIB の発現パターンは、経時的に変化し、MSTN と ActRIIB は必ずしも同一の筋線維に発現するとは限らず、double-positive 線維の割合が経時的に変化することが判明した。

また、生検筋の検討から、MHC-d 陽性再生筋線維は、MSTN 陽性と陰性群に大別され、MSTN 陽性群は更に ActR IIB 陽性と陰性群に大別された。一方、MHC-d 陰性線維は、筋萎縮を免れた MSTN 陽性・ActR IIB 陰性 Type 1 線維と MSTN 陽性・ActR IIB 陽性筋線維に大別できた。この MSTN ActR IIB double positive 線維は、皮膚筋炎の perifascicular atrophy や sIBM の高度の萎縮した筋線維で発現していた。(図 9)

以上のことから、筋傷害後、再生過程にある筋線維でまず、MSTN が発現し、その後 ActR IIB が発現した筋線維が最終的に萎縮に陥ることが推測された。

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-----------|-------|-----|------------------|-----------------------------------|
| Myostatin | - | + | + | +~± |
| ActR IIB | - | -/+ | - | + |
| MHC-d | + | + | - | - |
| | 再生筋線維 | | 萎縮を免れた Type 1筋線維 | 高度な萎縮筋線維 (perifascicular atrophy) |

図 9 Myostatin およびその関連蛋白の発現パターン

結論

MSTN と ActR IIB は筋線維萎縮に関係しているが再生過程の筋線維における両者の発現は必ずしも一致していない。筋萎縮の進行の予測には共陽性再生筋線維の割合を検討することが重要である。

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 11 件)

1. Shima T, Yamamoto Y, Kanazawa N, Murata KY, Ito H, Kondo T, Yuan J, Hashiguchi A, Takashima H, Furukawa F. : Repeated hyperhidrosis and chilblain-like swelling with ulceration of the fingers and toes in hereditary sensory and autonomic neuropathy type II. J Dermatol. 2018 Apr 27
2. Mukaino A, Minami H, Isomoto H, Hamamoto H, Ihara E, Maeda Y, Higuchi O, Okanishi T, Kokudo Y, Deguchi K, Sasaki F, Ueki T, Murata KY, Yoshida T, Kinjo M, Ogawa Y, Ido A, Matsuo H, Nakao K, Nakane S. Anti-ganglionic AChR antibodies in Japanese patients with motility disorders. J Gastroenterol. 2018 May 15. doi: 10.1007/s00535-018-1477-8. [Epub ahead of print]

3. Koh J, Sakata M, Murata K, Ito H:
Quantitative reference value of dopamine transporter single-photon emission computed tomography in healthy Japanese elderlies. *Neurology and Clinical neuroscience*: in press
 4. Tanina H, Nishimura Y, Tsuboi H, Sakata T, Nakamura T, Murata KY, Arakawa H, Umezu Y, Tajima F. : Fatigue-related differences in erector spinae between prepubertal children and young adults using surface electromyographic power spectral analysis. *J Back Musculoskelet Rehabil.* 2016 May 20.
 5. Murata K*, Nakatani K, Yamanegi M, Nakanishi I, Ito H: Anti-U3 ribonucleoprotein antibody-positive inflammatory myopathy: a case report. *Journal of Medical Case Reports* 10: 169. doi: 10.1186/s13256-016-0941-4, 2016
 6. Nakane S, Higuchi O, Koga M, Kanda T, Murata K, Suzuki T, Kurono H, Kunimoto M, Kaida K, Mukaino A, Sakai W, Maede Y and Matsuo H: Clinical features of autoimmune autonomic ganglionopathy and the detection of subunit-specific autoantibodies to the ganglionic acetylcholine receptor in Japanese patients. *PLos one* 10:e0118312. doi: 10.1371/journal.pone.0118312, 2015
 7. Watanabe Y, Suzuki S*, Nishimura H, Murata K, Kurashige T, Ikawa M, Asahi M, Konishi H, Mitsuma S, Kawabata S, Suzuki N, Nishino I : Statins and myotoxic effects associated with anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase autoantibodies: an observational study in Japan. *Medicine* 94:e416, 2015
 8. Murata K*, Maeba A, Yamanegi M, Nakanishi I, Ito H: Methotrexate myelopathy after intrathecal chemotherapy: a case report: *Journal of Medical Case Reports* 9: 135. doi: 10.1186/s13256-015-0597-5, 2015
 9. Nakamura M, Hachiya N, Murata K, Nakanishi I, Kondo T, Yasutake A, Miyamoto KI, Ser PH, Omi S, Furusawa H, Watanabe C, Usuki F, Sakamoto M.: Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. *Environ Int* 68:25-32, 2014
 10. Murata K, Sugie H, Nishino I, Kondo T, Ito H: A primigravida with very-long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Muscle Nerve* 49:295-296, 2014
 11. 村田顕也, 伊東秀文 : 封入体筋炎の病態と原因. *Brain and Nerve* 66, 1385-1394, 2014
- [学会発表] (計 3 件)
1. 村田顕也 : 骨格筋再生過程における plasminogen activating systemの作用機序. 第53回日本リハビリテーション医学会学術集会シンポジウム 京都 2016/6/11
 2. 村田顕也 : 封入体筋炎って何? 第57回日本神経学会学術大会市民公開講座. 神戸 2016/5/21
 3. Murata K, Ito H: Analysis of Myostatin and related proteins in a cardiotoxin injury muscle atrophy models, American Academy of Neurology 66th Annual Meeting, Philadelphia, April 26-May 5, 2014

〔図書〕(計 2 件)

1. 村田顕也 : 筋・神経筋接合部. 神経内科専門医試験問題 解答と解説, 日本神経学会編: 南江堂, 東京, 2017
2. 村田顕也, 伊東秀文: 7. 運動ニューロン疾患 (筋萎縮性側索硬化症/脊髄性筋萎縮症). わかりやすい内科学 第4版, 井村裕夫編, 624-630, 文光堂, 東京, 2014

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 : 種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

村田 顕也 (Kenya Murata)
和歌山県立医科大学 医学部 (教授)
研究者番号 : 90264853

(2)研究分担者

伊東 秀文 (Hidefumi Ito)
和歌山県立医科大学 医学部 (教授)
研究者番号 : 20250061

西村 行秀 (Yukihide Nishimura)
岩手医科大学 医学部 (教授)
研究者番号 : 20464117

高 真守 (Jinsoo Koh)
和歌山県立医科大学 医学部 (助教)
研究者番号 : 20554629

檜皮谷 泰寛 (Yasuhiro Hiwatani)
和歌山県立医科大学医学部
(博士研究員)
研究者番号 : 40405452

廣西 昌也 (Masaya Hironishi)
和歌山県立医科大学 医学部 (教授)
研究者番号 : 80316116

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし