

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861204

研究課題名(和文) 癒痕治癒に依存しない積極的筋損傷治療法の開発 -線維芽細胞阻害に着目して-

研究課題名(英文) Development of treatment for muscle injury without scar healing focused on inhibition of myofibroblasts

研究代表者

中川 周士(Nakagawa, Shuji)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30643382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：損傷を受けた筋線維は線維化によって癒痕治癒するため再断裂を起こしやすい。Heat shock protein 47 (HSP47) はコラーゲン生合成に特異的に作用する分子シャペロンである。本研究の目的は筋損傷動物モデルおよび筋芽細胞の線維化モデルを用いてHSP47の発現を解析することである。Wistarラットの腓腹筋内側頭を切離し損傷部位を組織学的に評価するとHSP47の発現が増加していた。ラット筋芽細胞株にTGF- β 1を添加するとHSP47, COL1A1, COL3A1の遺伝子発現が増加した。以上からHSP47は筋損傷において癒痕治癒を抑制する治療ターゲット分子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Damaged myofibers are susceptible to re-tearing due to scar healing by fibrosis. Heat shock protein 47 (HSP47) is a molecular chaperone that specifically acts on collagen biosynthesis. The purpose of this study was to analyze the expression of HSP 47 using muscle injury animal model and myoblast fibrosis model. We dissected the medial gastrocnemius muscle of Wistar rats and evaluated this site histologically where the expression of HSP 47 increased. TGF- β 1 increased the gene expression of HSP47, COL1A1, COL3A1 on the rat myoblast cell line. Thus, HSP47 could be a therapeutic target that inhibits scar healing in muscle injury.

研究分野：スポーツ医学

キーワード：筋損傷 HSP47 線維化疾患 筋線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

筋損傷(肉離れ)は頻度の高いスポーツ外傷である。損傷を受けた筋線維は線維化によって癒痕治癒するため再断裂を起こしやすい。また疼痛の残存や筋力の低下などの後遺症を生ずることが多い。損傷を受けた筋線維では、筋管細胞への分化能を持つ筋衛星細胞が筋芽細胞へと分化するが、何らかのメカニズムで筋線維芽細胞による主にIおよびIII型コラーゲン産生が生じ癒痕形成によって修復反応を終える。このことから、筋線維芽細胞によるコラーゲン産生を抑制することができれば癒痕治癒を回避し質の高い筋線維の再生による治癒が期待できる。

Heat shock protein 47 (HSP47)は小胞体に局在するストレス応答性に産生されるコラーゲン生合成に特異的に作用する分子シャペロンである。慢性腎不全における糸球体の硬化や間質性肺炎などのコラーゲンの蓄積を特徴とする線維化疾患では、HSP47の発現が誘導されていることが分かっている。尿細管線維化症の動物モデルにおいて small interfering RNA (siRNA)を用いてHSP47の発現を特異的に抑制すると、糸球体間質の線維化が抑制されたと報告された。このことから、HSP47の発現は損傷を受けた筋線維の癒痕治癒に影響を与えている可能性がある。

Transforming growth factor-1 (TGF-1)は間質性肺炎などの線維化疾患において組織の収縮に働く筋線維芽細胞で発現が上昇していることが分かっている。このことから筋損傷における癒痕治癒においても筋線維芽細胞でTGF-1の発現が上昇していることが予想される。TGF-1がHSP47の発現に与える影響を調べることで、HSP47の癒痕治癒に対する役割を解明できると考えた。

2. 研究の目的

- (1) 筋損傷モデル動物を作成し筋修復部位を組織学的に解析すること
- (2) ラットの筋芽細胞株を用いて筋芽細胞の線維化モデルを確立し、HSP47の発現を解析すること

3. 研究の方法

- (1) 筋損傷モデルラットの作成
8週齢の雄Wistarラットに吸入麻酔を行い、腓腹筋内側頭を全切離した。
- (2) 筋損傷部位の組織学的解析
筋損傷群および無処置群に分けた。筋損傷群では、左腓腹筋内側頭を全切離し、day 4, 11, 22でsacrificeした。腓腹筋を摘出しホルマリン固定、パラフィン包埋の後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソン・トリクローム(MT)染色、HSP47に対する免疫組織化学染色を行った。
- (3) ラット筋芽細胞の線維化モデルを用いたHSP47遺伝子発現の解析
ラット筋芽細胞(L6)にtransforming

growth factor-1 (TGF-1)を添加し、24, 48, 72時間後に細胞を回収し total RNAを抽出、逆転写によりcDNAを作成しHSP47, COL1A1, COL3A1の遺伝子発現をreal-time RT-PCRで解析した。

4. 研究成果

- (1) 8週齢の雄Wistarラットの腓腹筋内側頭を切離し組織学的解析を行った。HE染色で筋線維の連続性が途絶し癒痕組織による修復反応が見られた。マッソン・トリクローム染色により修復部位に一致して染色性が上昇していたことから、コラーゲン産生が亢進していることが明らかとなった。このことは筋損傷モデル動物として妥当であることを示していると考えた(図1上, 中段)。
- (2) 上記の筋損傷モデルラットを用いて同一個体に対してHSP47に対する特異的な抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。筋損傷部位を経時的に観察すると1週以降からマッソン・トリクローム染色の染色性が上昇していた。これに先立って筋損傷から短時間でHSP47の染色性が上昇していた。このことは、HSP47はストレス応答蛋白として損傷早期から発現が亢進すること、コラーゲン産生による組織修復において上流で癒痕形成を促進している可能性を示している。また損傷後3週間でも発現していたことから、組織修復において発現が持続していることを示している(図1中, 下段)。

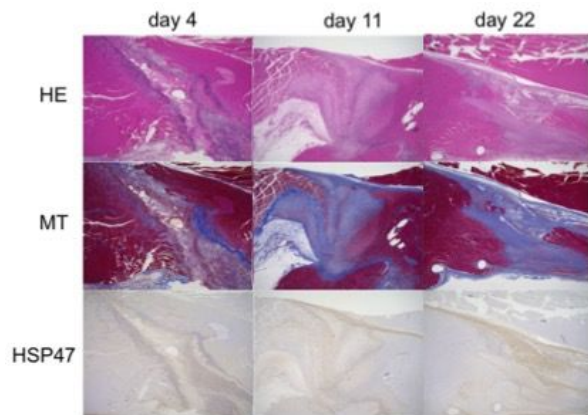


図1. 筋損傷部位の組織学的解析

- (3) 動物モデルにおいてHSP47がコラーゲン産生による癒痕形成に関与していることが示されたことから、筋芽細胞を用いてHSP47の機能を解析することとした。ラットの筋芽細胞にTGF-1を添加すると24, 48, 72時間後でHSP47, COL1A1, COL3A1の遺伝子発現が上昇していた。これは、筋芽細胞にTGF-1が作用することにより、筋線維芽細胞へと分化し収縮能を持つ癒痕組織に特異的なコラーゲンの産生が促進される可能性を示している(図2)。筋線維芽細胞に特異的な分

化マーカーを解析することにより、線維化の細胞モデルとして妥当であることが示されると考える。

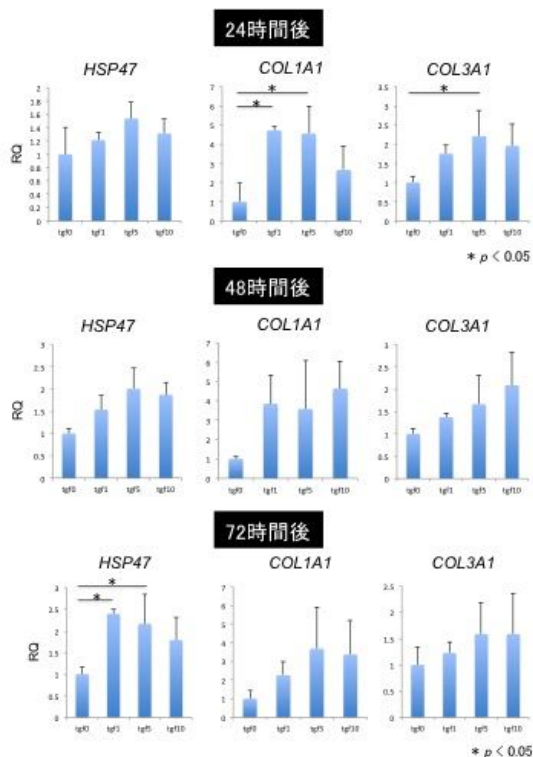


図 2. TGF- 1 による遺伝子発現の変化

以上から、HSP47 は筋損傷における癒傷修復を抑制するターゲット分子として有力であることを示した。今後は HSP47 の抑制によりどのように表現系が変化するか細胞レベル、動物レベルでの検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ichimaru Shohei, Nakagawa Shuji, Arai Yuji, Kishida Tsunao, Shin-Ya Masaharu, Honjo Kuniaki, Tsuchida Shinji, Inoue Hiroaki, Fujiwara Hiroyoshi, Shimomura Seiji, Mazda Osam, Kubo Toshikazu, Hypoxia Potentiates Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid in Rat Articular Cartilage, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, vol 17, 2016, E1013.

Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Tsunao Kishida, Ryu Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Shinji Tsuchida, Tomohiro Matsuki, Keiichiro Ueshima, Hiroyoshi Fujiwara, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Hydrostatic pressure influences HIF-2 alpha expression in chondrocytes, International Journal of Molecular Sciences, 査読有, vol.16, 2015, p1043-1050

Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Kenji A. Takahashi, Tsunao Kishida, Ryu

Terauchi, Kuniaki Honjo, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Kazuya Ikoma, Keiichiro Ueshima, Tomohiro Matsuki, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, HIF-1 -induced HSP70 regulates anabolic responses in articular chondrocytes under hypoxic conditions, Journal of Orthopaedic Research, 査読有, vol.32, 2014, p975-980

〔学会発表〕(計 7 件)

Seiji Shimomura, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Shohei Ichimaru, Yuta Fujii, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Analysis of the Expression of Connexin 43 in Synovial Tissue of Patients with Arthritis, 63th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2017.3.20-22, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA) Shohei Ichimaru, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Kuniaki Honjo, Seiji Shimomura, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The Anabolic Effects of Exogenous Hyaluronic Acid on Articular Cartilage Under Hypoxia, 63th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2017.3.20-22, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)

Seiji Shimomura, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Shohei Ichimaru, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Analysis of the expression of connexin 43 in synovial tissue of patients with arthritis, 19th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2016.3.31-4.3, RAI Convention Center (Amsterdam, Netherlands)

Shohei Ichimaru, Shuji Nakagawa, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Hiroaki Inoue, Seiji Shimomura, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Pharmacological effects of exogenous hyaluronan in articular cartilage under hypoxia 19th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2016.3.31-4.3, RAI Convention Center (Amsterdam, Netherlands)

Shohei Ichimaru, Shinji Tsuchida, Yuji Arai, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Tomohiro Matsuki, Kuniaki Honjo, Keiichiro Ueshima, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, The anabolic effects of HIF-1 -induced HSP70 in rabbit articular chondrocyte under hypoxic conditions, 61st Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2015.3.28-31, MGM Grand Hotel (Las

Vegas, NV, USA)
Kuniaki Honjo, Yuji Arai, Shinji Tsuchida, Shuji Nakagawa, Hiroaki Inoue, Masazumi Saito, Shohei Ichimaru, Seiji Shimomura, Atsuo Inoue, Ryu Terauchi, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, HSP70 induced by HIF-1 regulates anabolic responses in chondrocytes under hypoxic conditions, 18th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2015.4.30-5.3, Washington State Convension Center(Seattle, WA, USA)
Hiroaki Inoue, Yuji Arai, Ryu Terauchi, Shuji Nakagawa, Masazumi Saito, Shinji Tsuchida, Tomohiro Matsuki, Shohei Ichimaru, Osam Mazda, Toshikazu Kubo, Effect of inflammation stress on the hypertrophic differentiation related gene expression in cultured chondrocytes, 17th World Congress of the Osteoarthritis Research Society International, 2014.4.24-27, The Center of New Industrial and Technologies (Paris, France)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 周士 (NAKAGAWA SHUJI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：30643382

(2)研究協力者

森原 徹 (MORIHARA TORU)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90336735

井上 裕章 (INOUE HIROAKI)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号：60457968