

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

安原(西澤) 苑

専攻分野：整形外科学

コース：

指導教授：別府 諸兄

主論文の題目：

Regeneration of Injured Skeletal Muscle in Heat Shock
Transcription Factor 1-Null Mice

(熱ショック転写因子1欠損マウスの損傷骨格筋の再生)

共著者：

Sono Nishizawa, Tomoyuki Koya, Yoshitaka Ohno, Ayumi Goto,
Akihiro Ikuta, Miho Suzuki, Tomotaka Ohira, Tatsuro Egawa, Akira
Nakai, Takao Sugiura, Yoshinobu Ohira, Toshitada Yoshioka, Moroe
Beppu, Katsumasa Goto

緒言

損傷骨格筋の再生過程は壊死期と再生期に大別される。まず損傷細胞の壊死と炎症反応が起こり、その後筋衛星細胞が活性化、増殖し、損傷筋細胞に置換することで再生する。損傷により骨格筋細胞内で heat shock proteins(HSPs)の発現が誘導される。HSPs は heat shock transcription factor 1(HSF1)を転写因子とするストレス応答により発現が誘導される。しかし筋の再生における HSF1 を介したストレス応答の生理学的意義は不明である。

壊死期では炎症性サイトカイン発現が誘導され、炎症反応が増強される。interleukin(IL)-6 や IL-1 β 、そして腫瘍壊死因子 tumor necrosis factor(TNF)は筋形成の促進と抑制という相反する 2 つの作用を持つ。しかし、これらの相互関係は不明である。

そこで本研究では、損傷骨格筋の壊死再生における HSF1 および

HSF1 を介したストレス応答の生理学的意義を検討した。

方法・対象

本研究では、HSF1 欠損および野生型(ICR)マウスを用いた。マウスの左ヒラメ筋にカルディオトキシン(CTX)を筋注し、壊死-再生サイクルを惹起させ(CTX 群)、右ヒラメ筋には生理食塩水(PS)を筋注し、対照群とした。筋注後 2 および 4 週で両ヒラメ筋を摘出し、相対的筋湿重量および筋蛋白量、ならびに HE 染色による組織学的評価を行った。また HSF および HSPs 発現量、ATF3 および IL-6、IL-18、TNF 発現量を western blotting と real-time RT-PCR から、筋衛星細胞数を Pax7 陽性細胞から検討した。本研究は、豊橋創造大学実験動物委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施された。統計はサンプリング時期毎に 2 元配置分散分析とその後の多重比較(Turkey-Kramer 法)を行った。

結果

野生型マウスでは、CTX および PS の筋注による筋湿重量と筋蛋白量に有意差はなかった。HSF1 欠損マウスでは、筋湿重量は対照群に比べて CTX 群で低い傾向にあったが、有意差はなかった。しかし HSF1 欠損マウスにおいて、CTX 群の筋蛋白量の有意な低下が 2 週(73%)および 4 週(91%)で認められた($p<0.05$)。組織学的評価では、CTX 筋注 2 週後に炎症細胞の浸潤と中心核線維が両タイプのヒラメ筋で観察された。CTX 筋注 4 週後、HSF1 欠損マウスでは依然炎症細胞の浸潤が認められたが、野生型マウスでは認められなかった。CTX 筋注 2 週後、両タイプの筋線維断面積は対照群に比べて有意に低値を示し($p<0.05$)、その後増加する傾向を示した。野生型マウスでは CTX 筋注 4 週後では対照群間に有意差は認めなかったが、HSF1 欠損マウスの筋線維断面積は対照群に比べて依然有意に低値を示し($p<0.05$)、再生の遅延を認めた。両タイプのマウスにおいて CTX 筋注 2 週後に Pax7 陽性細胞数の有意な増加が認められ($p<0.05$)、野生型マウスでは CTX 筋注 4 週後に対照群に比べて有意に高値を示した($p<0.05$)。しかし、HSF1 欠損マウスでは両群間に有意差は認められなかった。

野生型マウスでは、CTX 筋注後に HSF1 mRNA 発現の有意な増加が認められた($p<0.05$)。HSF1 欠損は、ヒラメ筋における HSC70 mRNA、HSP72 mRNA および HSPs 蛋白(HSP25、HSC70、HSP72、HSP90 α)の発現を抑制した($p<0.05$)。両マウス共に、CTX 筋注 2 週後に HSP47(mRNA および蛋白)の発現増加と HSP72 蛋白発現の低下が観察された($p<0.05$)。CTX 筋注 4 週後では、HSP72 蛋白発現増加が両タイプのマウスで認められた($p<0.05$)。HSF1 欠損マウスでは、HSP25

および HSP90 α の mRNA 発現増加が CTX 筋注 2 週後に確認された ($p<0.05$)が、野生型マウスでは観察されなかった。CTX 筋注による IL-6 および TNF mRNA の発現増加が、HSF1 欠損マウスにおいてのみ観察された。逆に、HSF1 欠損マウスでは CTX 筋注による ATF3 発現増加の抑制が、CTX 筋注 4 週後に認められた。

考察

HSPs の発現増加は損傷骨格筋の再生を促進させ、HSP70 の欠損は損傷骨格筋の再生を障害するとの報告がある。本研究では、HSF1 欠損によってヒラメ筋における HSP25、HSC70、HSP72 および HSP90 α の発現レベルの低下が観察された。従って、HSF1 欠損は HSPs の発現を抑制することで、損傷骨格筋の再生を遅延させる可能性が示唆された。

Pax7 陽性細胞数は CTX 筋注後に増加する。本研究でも両マウスにおいて CTX 筋注 2 週後に Pax7 陽性細胞数は増加したが、HSF1 欠損マウスではこの増加は早期に抑制された。このことから、HSF1 は筋損傷に伴う筋衛星細胞の増殖制御に関与していることが示唆された。

IL-6、TNF、IL-1 β は筋細胞の分化を抑制することが報告されている。一方、HSF1 は ATF3 の活性化を介して IL-6 産生を抑制することも報告されている。本研究では、HSF1 欠損により IL-6 および TNF 発現量は増加し、ATF3 発現量は抑制された。従って HSF1 欠損は炎症性サイトカインを増加させることで、損傷骨格筋の再生遅延をもたらすことが示唆された。

骨格筋の HSPs は、HSF1 を転写因子とするストレス応答によって発現誘導される。本研究では HSF1 欠損マウスでも HSPs の発現誘導が認められた。骨格筋における HSP 発現調節には、このストレス応答以外にも未知の調整システムが存在することが合わせて示唆された。

結論

HSF1 欠損は損傷筋の再生を遅延させ、骨格筋損傷に伴う筋衛星細胞数の増加を早期に抑制した。さらに、HSF1 欠損は炎症性サイトカインの発現を増加させた。従って、HSF1 または HSF1 依存性のストレス反応は、損傷骨格筋の再生において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。