研究テーマ

細胞内重金属キレート剤による炎症反応および酸化ストレス 抑制効果を利用した圧挫症候群の二次的合併症に対する新規 治療法の開発

研究代表者

施設名 : 九州大学 整形外科

氏 名 : 春田 陽平

研究テーマ:細胞内重金属キレート剤による炎症反応および酸化ストレス抑制効果を 利用した圧挫症候群の二次的合併症に対する新規治療法の開発

所属先:九州大学 整形外科

氏名:春田 陽平

<はじめに>

圧挫症候群は、患肢における長時間の虚血状態を契機に重篤な全身状態を来した状態であり、自然災害時には瓦礫の下で埋もれた被災者に見られることが多い¹⁾。筋肉の虚血後に圧迫解除されて再灌流障害が生じる特徴がある。急性期には毒性のある細胞内物質が全身の血流に流入することで急性腎障害、電解質異常、ショックなどの全身合併症を生じる。筋肉局所では、虚血再灌流現象により活性酸素が生じて好中球が活性化されると炎症反応が誘導されて筋損傷を悪化させる²⁾。

圧挫症候群急性期の治療方法は進歩しており、生存率改善につながっている一方、 慢性期の合併症への対応が必要であることが認知されてきた。初期治療で助かったと しても、多くの症例で損傷した筋組織に炎症が持続して線維性瘢痕を生じる³⁰。これ らの病理学的変化は、筋力低下や関節拘縮などの長期的な後遺症を引き起こし、患者 のQOLに大きな影響を与える⁴⁵⁵。

E挫症候群における損傷急性期から慢性線維症への進展に関するメカニズムは、ま だ十分に解明されていない。慢性炎症は、様々な筋損傷において広く研究されており、 組織の線維化と密接に関連している⁶⁷⁷⁸。例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー では、罹患筋における好中球エラスターゼ発現の異常亢進が線維化の一因となってい る。しかし、虚血再灌流後の炎症反応と圧挫症候群における線維化発症との間の特異 的な関連、特に内皮間葉転換(EndMT)などの機序による関連は、完全には解明され ていない⁹¹⁰。

EndMTは、様々な組織における線維化の重要なメカニズムとして言及されてきた⁹。 内皮細胞が間葉系表現型に移行するこの過程は、線維芽細胞や筋線維芽細胞の集団を 増加させることにより、線維化障害の進行に寄与する¹¹⁾。EndMTの役割は様々な病態 で研究されているが、圧挫症候群の筋線維化に対するEndMTの特異的な寄与は未解明 である。

我々の以前の研究では、圧挫症候群の急性期に亜鉛キレート剤(N,N,N',N'tetrakis-(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine; TPEN)を投与すると、再灌流後の患肢の好 中球浸潤が抑制され、それによって急性炎症反応が軽減され、生存率が改善すること を示した²⁰。しかし、この治療戦略が長期的な線維化と機能障害を軽減する可能性に ついては検討されていない。

本研究では、圧挫症候群の治療において、虚血再灌流に罹患した肢に関して亜鉛キ

レート剤投与が筋線維化に及ぼす影響を明らかにした。具体的には、好中球エラスタ ーゼとEndMTの役割に注目し、急性炎症から慢性線維症への進展の根底にあるメカニ ズムを調べた。さらに、TPENによる早期介入によって、この病理学的過程を変化さ せ、長期的な機能的転帰を改善できるかどうかを評価した。

これらの疑問に取り組むことで、圧挫症候群における筋線維化の病態に関する新た な知見を提供し、患肢の長期障害を予防するための新たな治療戦略を明らかにするこ とを目指している。この研究は、特に自然災害後のクラッシュ症候群患者の長期予後 を改善するために重要な意味を持つ可能性がある¹⁾¹²。

<方法>

動物

8週齢のオス、C57BL/6J野生型マウス(18~21g)を室温(23±2℃)、12時間の明暗 サイクルで飼育し、餌と水を自由に摂取できるようにした。動物の苦痛を最小限にし、 使用する動物の数を減らすために努めた。

圧挫症候群モデル

マウスをペントバルビタール(75mg/kg)の腹腔内注射で麻酔し、仰臥位とした。 幅 3 mm、厚さ 1 mmのゴム製止血帯を直径 10 mmのステンレス製パイプの周囲に装着し、止血帯の端部を以前に記載された方法に従って接着した。両側後肢を圧迫装置 に入れ、ステンレス製パイプを引き抜き、ゴム製止血帯を残すことで両後肢に圧挫状 態を作成した。ゴム製止血帯は、再現性のある虚血再灌流現象を誘発するため、圧迫 2時間後に細いはさみで切断した。

亜鉛キレート剤の投与

亜 鉛 キ レ ー ト 剤 と し て TPEN (N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2ethanediamine)を用いた。TPEN (5mg/kg 体重)または対照薬(ジメチルスルホキシ ド; DMSO)を、既述のように再灌流後 3分で 0.1 mlの容量で腹腔内投与した²⁾。

組織学的検査

所定の時点でマウスを過剰麻酔により安楽死させ、4%パラホルムアルデヒドを含 むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液で経心臓的に灌流固定した。腓腹筋(圧迫部位 の遠位側)を採取し、4%パラホルムアルデヒドに 4℃で一晩後固定した後、パラフ ィン包埋、または 30%スクロースを用いた凍結保護して至適切断温度(OCT)で包 埋処理した。パラフィン包埋した組織を3µmの厚さで切開し、ヘマトキシリン・エオ ジン(HE)染色、およびコラーゲン可視化目的にピクロシリウスレッド染色を行った。 免疫蛍光染色には凍結切片を用いた。

免疫蛍光染色

凍結切片を 0.3%Triton X-100を含むPBS溶液で10分間透過処理し、5%正常ヤギ血 清で室温で1時間ブロックした後、一次抗体を 4℃で一晩インキュベートした。以下 の一次抗体を用いた:抗ラミニン抗体 (1:200; Sigma-Aldrich, セントルイス、ミズー リ州、米国)、抗好中球エラスターゼ抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology, ダラス、 テキサス州、米国)、抗PECAM-1抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology)、抗 α SMA抗 体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology)、および抗Notch1抗体 (1:200; Santa Cruz Biotechnology)。洗浄後、切片を適切な蛍光標識二次抗体と室温で1時間インキュベー トした。

エバンスブルー色素評価

筋透過性を評価するため、エバンスブルー色素 (EBD;80 μ g/g体重;Sigma-Aldrich) をPBSに溶解し、受傷後1、2、4週目に腹腔内注射した。注射後 3時間時点で麻酔下に PBSを用いて 5分間経心灌流し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。腓腹筋を採取 し、重量を測定し、50%トリクロロ酢酸0.5mL中で均質化した。細胞断片を 100%エ タノールで 1:1に希釈し、15,300×gで 10分間遠心した。上清を回収し、EnSightプレ ートリーダー(PerkinElmer, シェルトン, コネティカット州, 米国)を用いて 620 nmの 吸光度を測定し、EBD含量を定量した。

步行解析

受傷後4週目にフットプリント解析を行った。マウスの前足と後足にそれぞれ赤と 緑の染料を塗った。その後、狭い通路(長さ80cm×幅4cm)を歩くように訓練し、各 マウスについて少なくとも3回走行させて記録した。足跡は、歩幅、歩隔、足部の外 旋度、踵接地頻度について前述の方法³¹⁾で分析した。各走行の最初と最後の10cmは分 析から除外した。

足関節ROMの測定

角度計測器を用いて、受傷後4週間の足関節ROMを測定した。マウスを静かに拘束 し、最大足関節底屈・背屈角度を測定した。3回測定し、平均ROMを算出した。

統計分析

データは平均値±平均値の標準誤差(SEM)で示した。統計解析はGraphPad Prism ソフトウェアプログラム(GraphPad Software: version 9, ボストン, マサチューセッツ 州,米国)を使用して行った。2群間比較は、対応のないスチューデントの*t*検定を用 いて行った。統計学的有意差は p<0.05とした。 <結果>

慢性期における歩行機能の低下と筋線維化の進展

両側後肢にゴム製の止血帯を2時間装着し、その後再灌流を行うことで、圧挫症候 群マウスモデルを作成した。再灌流後4週間のフットプリント解析から、クラッシュ 群では非損傷群と比較して有意な歩行障害が認められた。クラッシュ群のマウスは非 損傷群と比較して、歩幅が短く(49.75±2.06 mm vs 64±3.37 mm)、後肢外旋角が大き く(36.75±6.99° vs 10±4.08°)、踵接地率が高かった(80%±16.33% vs 0±0%) (図1-A、1-B)。さらに、足関節可動域(ROM)は、非損傷群と比較して、クラッシ ュ群で有意に減少した(100°±10.8° vs 166.25°±4.79°、図1-C、1-D)。再灌流後 4週目のピクロシリウスレッド染色では、クラッシュ群において非損傷群より有意に 広い線維化領域が認められた(46.25%±2.21% vs 7.75%±2.21%、図1-E、1-F)。



図1

持続的な筋膜障害

筋ジストロフィーにおける筋線維症と関連する筋膜透過性¹³⁾¹⁴は、エバンスブルー 色素(EBD)の漏出を用いて評価された。組織学的評価では、再灌流後1週目に筋線維 領域で著明なEBD漏出が認められ、2週目には減少し、4週目には消失した(図2-A)。 吸光光度計を用いた定量分析でも、EBD漏出は1週間でピークに達し(4.11±0.25 ng/mg組織)、2週間で減少し(1.25±0.33 ng/mg組織)、4週間にはほぼ正常レベルに戻 った(0.3±0.07 ng/mg組織、図2-B)。



図2

好中球エラスターゼによる基底膜破壊

基底膜の重要な成分であるラミニン¹⁵は、非損傷群では基底膜に沿って観察された (図3-A、3-C)。しかし、ラミニンの発現は、受傷後1週間のクラッシュ群の筋組織で は顕著に消失していた(図3-D、3-F)。好中球エラスターゼが炎症時のラミニン分解 因子として同定されている¹⁶⁾ことから、破砕症候群後の筋組織におけるその発現を調 べた。非損傷群では検出可能な好中球エラスターゼは認められなかったが(図3-A、 3-B)、クラッシュ群の1週間後の筋組織からは有意な好中球エラスターゼ発現が認め られた(図3-D、3-E)。これらの所見は、好中球エラスターゼ活性と圧挫症候群後の ラミニン分解との直接的な関係を示唆しており、観察された筋膜透過性亢進を説明で きる可能性がある。



図3

Scale bar: 100, 25 µm

罹患筋組織におけるEndMT

近年、EndMTは線維化につながる膜透過性亢進の基礎となるメカニズムとして示唆 されている⁹。EndMTの間、内皮細胞は筋線維芽細胞の形質を獲得する一方で、内皮 特異的な遺伝子発現を失う¹¹⁾。EndMTは、内皮細胞が存在する筋肉組織を含むあらゆ る臓器で起こる¹⁰⁾。非損傷群では、PECAM-1陽性血管内皮細胞はNotch1や α -SMAを 発現していなかった。対照的に、クラッシュ群では血管内皮細胞にPECAM-1、Notch1、 α -SMAの共発現がみられた(図4)。この所見は、内皮細胞マーカーと間葉細胞マー カーが共発現し、筋線維芽細胞様の機能を示すという以前の観察と一致していた¹⁰¹⁷。





TPEN投与の効果

TPEN投与により、再灌流後1週間の間質スペースにおける好中球エラスターゼレベルは、対照薬投与群に比べ有意に低下した(1.78%±0.53% vs 15.25%±4.35%、図5-A、5-B)。さらに、TPENを投与すると、ラミニンの発現が増加し(10.5%±1.3% vs 1.33%±0.28%、図5-A、5-C)、筋線維へのEBDの漏出が減少した(1.25%±2.5% vs 48.75%±17.08%、図5-D、5-E)。

再灌流後 2 週間では、TPEN 群は対照薬投与群と比較して EndMT 細胞の有意な 減少を示した(5.5±2.08 細胞/mm² vs 30.25±3.86 細胞/mm²、図 6-A, 6-B)。4週 間後、TPEN群ではピクロシリウスレッド陽性面積が減少し(15.25%±1.71% vs 45% ±1.83%、図6-C、6-D)、筋再生を示す中心核を有する筋線維が増加した (177.5±22.17/mm² vs 0±0/mm²、図6-E~6-G)。





図6

TPEN投与による歩行機能の改善

TPEN群は、対照薬投与群と比較して歩行機能の改善を示した(図7-A)。この改善の特徴は、歩幅の増加(55.5±4.2mm vs 49.75±2.06mm)、後肢外旋の減少(12.5°±6.45° vs 36.75°±6.99°)、踵接地頻度の減少(10%±11.55% vs 80%±16.33%、図7-B)であった。TPEN群では、足関節のROMも有意に回復した(148.75°±8.54° vs 100°±10.8°、図7-C)。



<考察>

本研究は、圧挫症候群における筋組織線維化の病態を解明し、慢性期の筋線維化を 緩和する急性期の亜鉛キレート剤投与の有効性を示した。その結果、圧挫症候群にお ける筋線維化は、血管内皮細胞のEndMTを介した筋線維芽細胞の増殖が主な原因であ ることが明らかになった。さらに、急性期に亜鉛キレート剤TPENを投与すると好中 球エラスターゼの発現が抑制され、その後のEndMTの進行が抑制され、慢性期の筋組 織の線維化が抑制されることを示した。

圧挫症候群は、地震などの自然災害の結果として発症することが多く、死亡率は 48%に達する¹⁾。これまでの研究では、主に急性期における救命方法の開発に焦点が 当てられており、災害現場において効率的で利便性の高い治療法の選択肢となる可能 性がある¹²⁾。一方で、圧挫症候群の慢性期における合併症や患肢の運動能力の低下を 最小限に抑える治療法の必要性が高まっている。慢性期の圧挫症候群モデルを解析し た結果、筋線維症により再灌流部位の関節ROMが減少し、歩行機能が障害されること が示された(図1)。

線維化は組織治癒の際の適応反応であるが、細胞外マトリックスが過剰に蓄積する と、正常な組織構造の破壊や臓器不全につながる。慢性炎症、感染、虚血、低酸素は、 細胞微小環境における線維化の重要な因子である³⁾¹⁸⁾。線維芽細胞は線維化病変に集積し、細胞外マトリックスを産生するが、現在も線維芽細胞の誘導因子やシグナル伝 達経路の解明が進められている¹⁹⁾。

我々の研究では、圧挫症候群における筋線維化の根底にある重要なメカニズムとし てEndMTを同定した。EndMTは胚発生において重要な役割を果たしており、悪性疾患、 血管疾患、炎症性疾患、線維性疾患など、遺伝的に決定されたさまざまなヒトの後天 的疾患の病因に関与している⁹。EndMTは心臓や腎臓の組織で観察されてきたが²⁰⁰²¹、 圧挫症候群モデルでその関与を証明したのは我々の研究が初めてである(図4)。 EndMTの最初の段階は、血管内皮細胞や筋線維に隣接する基底膜の破壊である²²⁰²³。 これまでの研究で、基底膜の破壊はその構成成分の一つであるラミニンの溶解から始 まることが示されている²⁴⁰²⁵⁰²⁶⁾。しかしながら、基底膜破壊の原因となる因子は完全に は解明されていない²²⁰。我々の研究では、ラミニンを溶解することが知られている好 中球エラスターゼに注目し、筋肉組織におけるラミニンとの関連におけるその分布を 調べた。その結果、好中球エラスターゼレベルは再灌流後1週間で上昇し、ラミニン の溶解と一致していた(図3)。これらの所見は、好中球エラスターゼがEndMT中のラ ミニン溶解に重要な役割を果たしていることを示唆した。

EndMTは通常炎症反応の後に起こり²⁵⁾²⁶⁾、炎症で誘発されるEndMTのメディエータ ーや転写因子が同定されている²⁷⁾。しかし、虚血再灌流障害後の炎症反応の持続時間 と、EndMTを介した筋線維化の時期との関係については、これまで十分に検討されて こなかった¹⁰⁾。EBDの漏出から明らかなように²⁸⁾、本研究は、再灌流後1、2、4週間に おいて、筋膜透過性亢進を伴う炎症の長期化を報告した初めての研究である。我々は、 EBDの筋線維への漏出が再灌流後2週間も持続していることを観察し、筋膜透過性が 持続的に亢進していることを示した(図2)。さらに、再灌流後2週目にNotch1シグナ ルを介してEndMTが起こっていることが示された(図4)。この時期は炎症反応が落ち 着き始める時期である(図2)。

好中球の遊走を制御するために亜鉛キレート剤(TPEN)投与を用いた治療戦略を 確立した我々の以前の研究²⁾を発展させ、本研究では、急性期のTPEN投与が圧挫症候 群の慢性期における筋線維症の進行を予防できることを実証した。圧挫症候群の自然 経過では、筋膜崩壊の改善(再灌流から4週間後)と同期して、筋線維再生の証拠(核 の集中化)が観察された(図2-A)。このことは、筋膜不安定性が持続すると、再生所 見を伴わない筋線維化が誘導され²⁹⁾、筋膜状態の改善が筋線維再生を促進することを 示すこれまでの報告³⁰⁾と一致している。

驚くべきことに、TPENの投与は、筋膜の破壊がすでに改善した再灌流後2週間という早い時期に筋線維の再生を促進した(図6-E~6-G)。その結果、TPENの投与により 関節ROMと歩行機能の改善において有意な治療効果を示した(図7)。関節ROMの増加 につながる線維化の軽減が観察されたことは、この治療戦略の有効性をさらに裏付け ている。 我々の知見は、圧挫症候群の自然経過において1週間以上にわたる好中球エラスタ ーゼの発現亢進が、筋肉の基底膜成分の溶解を引き起こし、その結果、EndMTと筋線 維化の促進をもたらすことを示唆している。急性期にTPENを投与すると好中球エラ スターゼの発現が抑制されるため、EndMTの進行が抑制され、慢性期の筋線維化が緩 和される。

<結論>

本研究では、圧挫症候群における筋線維化の病態について新たな理解を提供し、亜 鉛キレート剤投与を用いた有望な治療アプローチを提示する。これらの研究課題に取 り組むことで、圧挫症候群の治療法を改善するだけでなく、様々な線維化性筋疾患に 対する新しい治療法の開発に貢献できるかもしれない。

<参考文献>

1. Usuda D, Shimozawa S, Takami H, Kako Y, Sakamoto T, Shimazaki J, Inoue J, Nakayama S, Koido Y, Oba J. Crush syndrome: a review for prehospital providers and emergency clinicians. J Transl Med. 2023 21(1):1-10.

2. Haruta Y, Kobayakawa K, Saiwai H, Hata K, Tamaru T, Iura H, Ono G, Kitade K, Kijima K, Iida K, Kawaguchi K, Matsumoto Y, Kubota K, Maeda T, Konno D, Okada S, Nakashima Y. Zinc chelator treatment in crush syndrome model mice attenuates ischemia-reperfusion-induced muscle injury due to suppressing of neutrophil infiltration. Sci Rep. 2022 12(1):1-12.

3. Ghaly A, Marsh DR. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. Int J Exp Pathol. 2010 91(3):244-255.

4. Matsuoka T, Yoshioka T, Tanaka H, Ninomiya N, Oda J, Sugimoto H, Yokota J. Long-term physical outcome of patients who suffered crush syndrome after the 1995 hanshin-awaji earthquake: prognostic indicators in retrospect. J Trauma. 2002 52(1):33-39.

5. Shaw AD, Sjolin SU, Mcqueen MM. Lesson of the Week: Crush syndrome following unconsciousness: Need for urgent orthopaedic referral. Bmj. 1994 309(6958):857.

6. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. Am J Physiol – Regul Integr Comp Physiol. 2010 298(5).

7. Kharraz Y, Guerra J, Pessina P, Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Understanding the process of fibrosis in duchenne muscular dystrophy. Biomed Res Int. 2014 :965631.

8. Serrano AL, Muñoz-Cánoves P. Regulation and dysregulation of fibrosis in skeletal muscle. Exp Cell Res. 2010 316(18):3050-3058.

9. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Endothelial to mesenchymal transition: Role in physiology and in the pathogenesis of human diseases. Physiol Rev. 2019 99(2):1281-1324.

10. Iavarone F, Guardiola O, Scagliola A, Andolfi G, Esposito F, Serrano A, Perdiguero E, Brunelli S, Muñoz-Cánoves P, Minchiotti G. Cripto shapes macrophage plasticity and restricts EndMT in injured and diseased skeletal muscle. EMBO Rep. 2020 21(4):1-17.

11. Nicolosi PA, Tombetti E, Giovenzana A, Donè E, Pulcinelli E, Meneveri R, Tirone M, Maugeri N, Rovere-Querini P, Manfredi AA, Brunelli S. Macrophages Guard Endothelial Lineage by Hindering Endothelial-to-Mesenchymal Transition: Implications for the Pathogenesis of Systemic Sclerosis. J Immunol. 2019 203(1):247-258.

12. Li N, Wang X, Wang P, Fan H, Hou S, Gong Y. Emerging medical therapies in crush syndrome-progress report from basic sciences and potential future avenues. Ren Fail. 2020 42(1):656-666.

13. Heydemann A, Huber JM, Demonbreun A, Hadhazy M, McNally EM. Genetic background influences muscular dystrophy. Neuromuscul Disord. 2005 15(9-10):601-609.

14. Heydemann A, Ceco E, Lim JE, Hadhazy M, Ryder P, Moran JL, Beier DR, Palmer AA, McNally EM. Latent TGF- β -binding protein 4 modifies muscular dystrophy in mice. J Clin Invest. 2009 119(12):3703-3712.

15. Gautam J, Miner JH, Yao Y, Sciences B. injury. 2020 10(6):705-718.

16. Heck LW, Blackburn WD, Irwin MH, Abrahamson DR. Degradation of basement membrane laminin by human neutrophil elastase and cathepsin G. Am J Pathol. 1990 136(6):1267-1274.

17. Manetti M, Romano E, Rosa I, Guiducci S, Bellando-Randone S, De Paulis A, Ibba-Manneschi L, Matucci-Cerinic M. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis. Ann Rheum Dis. 2017 76(5):924-934.

18. Valle-Tenney R, Rebolledo D, Acuña MJ, Brandan E. HIF-hypoxia signaling in skeletal muscle physiology and fibrosis. J Cell Commun Signal. 2020 14(2):147-158.

19. Antar SA, Ashour NA, Marawan ME, Al-Karmalawy AA. Fibrosis: Types, Effects, Markers, Mechanisms for Disease Progression, and Its Relation with Oxidative Stress, Immunity, and Inflammation. Int J Mol Sci. 2023 24(4).

20. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. Nat Med. 2007 13(8):952-961.

21. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. J Am Soc Nephrol. 2008 19(12):2282-2287.

22. Horejs CM. Basement membrane fragments in the context of the epithelial-tomesenchymal transition. Eur J Cell Biol. 2016 95(11):427-440. 23. Zhou L, Gao R, Hong H, Li X, Yang J, Shen W, Wang Z, Yang J. Emodin inhibiting neutrophil elastase-induced epithelial-mesenchymal transition through Notch1 signalling in alveolar epithelial cells. J Cell Mol Med. 2020 24(20):11998-12007.

24. Nakaya Y, Sukowati EW, Wu Y, Sheng G. RhoA and microtubule dynamics control cell-basement membrane interaction in EMT during gastrulation. Nat Cell Biol. 2008 10(7):765-775.

25. Yoshimatsu Y, Watabe T. Emerging roles of inflammation-mediated endothelialmesenchymal transition in health and disease. Inflamm Regen. 2022 42(1).

26. Sánchez-Duffhues G, García de Vinuesa A, van de Pol V, Geerts ME, de Vries MR, Janson SGT, van Dam H, Lindeman JH, Goumans MJ, ten Dijke P. Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2. J Pathol. 2019 247(3):333-346.

27. Cho JG, Lee A, Chang W, Lee MS, Kim J. Endothelial to mesenchymal transition represents a key link in the interaction between inflammation and endothelial dysfunction. Front Immunol. 2018 9(FEB):3-5.

28. Movila A, Kajiya M, Wisitrasameewong W, Stashenko P, Vardar-Sengul S, Hernandez M, Thomas Temple H, Kawai T. Intravital endoscopic technology for real-time monitoring of inflammation caused in experimental periodontitis. J Immunol Methods. 2018 457(February):26-29.

29. Boyer JG, Huo J, Han S, Havens JR, Prasad V, Lin BL, Kass DA, Song T, Sadayappan S, Khairallah RJ, Ward CW, Molkentin JD. Depletion of skeletal muscle satellite cells attenuates pathology in muscular dystrophy. Nat Commun. 2022 13(1):2940.

30. Wang X, Jia Y, Zhao J, Lesner NP, Menezes CJ, Shelton SD, Venigalla SSK, Xu J, Cai C, Mishra P. A mitofusin $2/\text{HIF1}\alpha$ axis sets a maturation checkpoint in regenerating skeletal muscle. J Clin Invest. 2022 132(23):e161638.

31. Gonzalez R, Glaser J, Liu MT, Lane TE, Keirstead HS. Reducing inflammation decreases secondary degeneration and functional deficit after spinal cord injury. Exp Neurol. 2003 184(1):456-463.