

Figure 4. Both intrinsic and extrinsic G-CSF augment skeletal muscle regeneration. (a) Effect of i.v. or i.m. administration of G-CSF on cardiotoxin-induced skeletal muscle injury. Hematoxylin and eosin staining of injured rectus femoris 7 d after cardiotoxin injection. (b) Numbers of regenerating myocytes that have centrally located nuclei. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris at 7 d after cardiotoxin injection. (c) Diameter of the regenerated rectus femoris at 7 d after cardiotoxin injection. (d) Handgrip strength on day 3–7 after cardiotoxin injury. (e) Role of the intrinsic G-CSF signal in skeletal muscle regeneration. Hematoxylin and eosin staining of an injured rectus femoris on day 7 is shown. (f) Numbers of regenerating myocytes that have centrally located nuclei. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris at 7 d after cardiotoxin injection. (g) The diameter of the injured rectus femoris is shown with or without the anti-G-CSF neutralizing antibody (Ab) at 7 d after cardiotoxin injection. (h) Quantitative analysis of the areas of the skeletal myocyte sections. CTX, cardiotoxin. (b–d and f–h) Error bars present mean \pm SD (*, $P < 0.05$). Results in a–h are from eight independent experiments.

G-CSF to the *csf3r*^{-/-} mice. If G-CSF functions through other receptors, the addition of G-CSF should still improve the skeletal muscle regeneration of *csf3r*^{-/-} mice. Exogenous G-CSF administration didn't improve skeletal muscle regeneration (Fig. 5 f). The numbers of regenerating myocytes in

the regenerating skeletal muscles were measured. G-CSF administration significantly increased the numbers of regenerating myocytes in the *csf3r*^{+/+} mice but not in the *csf3r*^{-/-} mice (Fig. 5 g). Functional recovery was assessed by measuring hand-grip strength after cardiotoxin injection into forearm muscles.

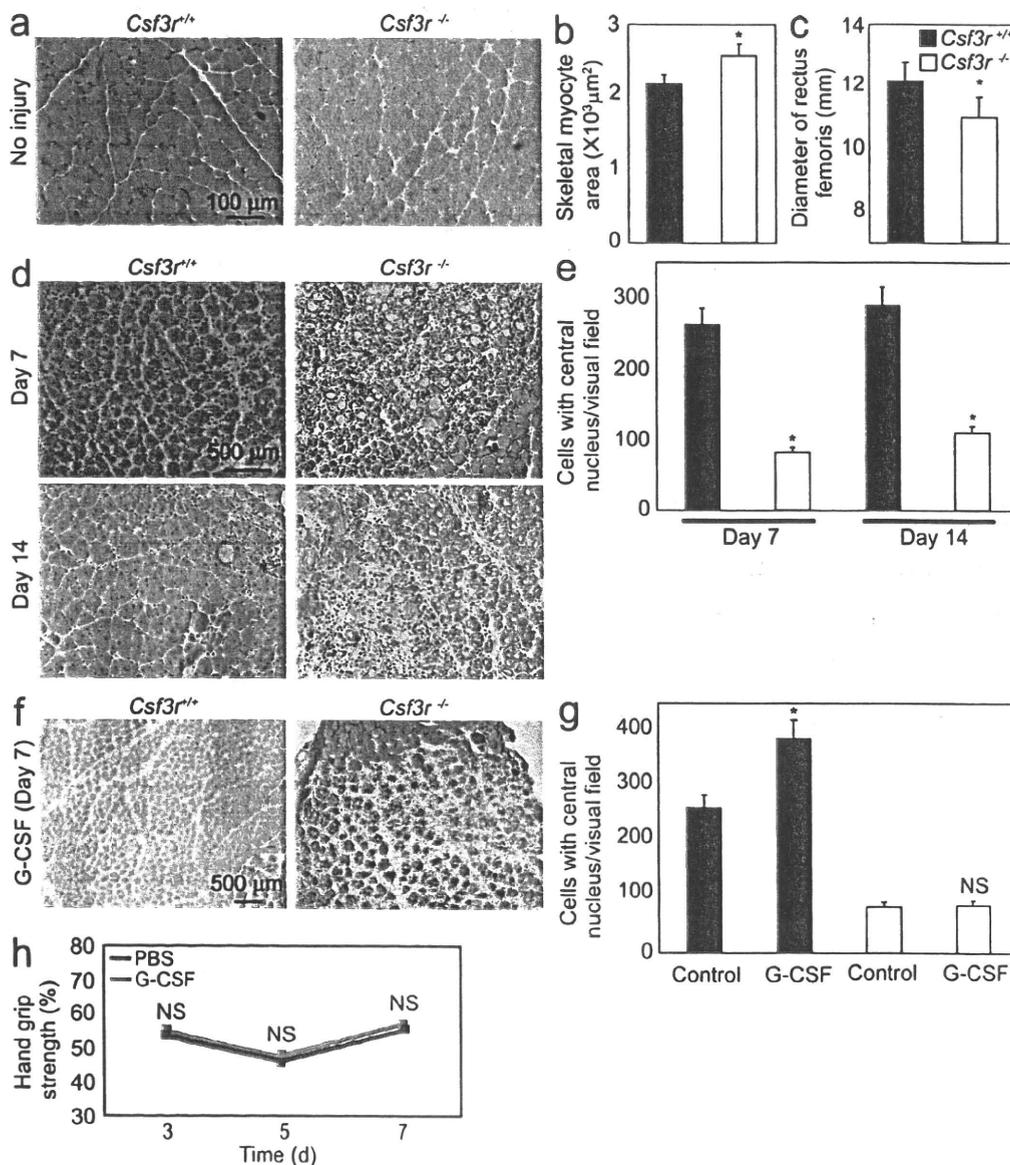


Figure 5. The *csf3r*^{-/-} mouse shows impaired skeletal muscle development and regeneration. (a) Hematoxylin and eosin staining of the rectus femoris of a wild-type mouse and a *csf3r*^{-/-} mouse. (b) Quantitative analysis of the areas of the skeletal myocyte sections in the wild-type and *csf3r*^{-/-} mice. (c) The diameter of the rectus femoris is shown. (d) Hematoxylin and eosin staining of the cardiotoxin-injured skeletal muscles of the wild-type and *csf3r*^{-/-} mice at 7 and 14 d after injury. (e) Numbers of regenerating myocytes that have centrally located nuclei on days 7 and 14 after injury in the regenerating skeletal muscles of the wild-type and *csf3r*^{-/-} mice. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris. (f) Effects of extrinsic G-CSF administration on cardiotoxin-induced muscle injury in the wild-type and *csf3r*^{-/-} mice. Hematoxylin and eosin staining of injured skeletal muscle on day 7 after cardiotoxin injection is shown. (g) Effect of extrinsic G-CSF administration on cardiotoxin-induced skeletal myocyte injury, as assessed by the numbers of regenerating myocytes. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris at 14 d after cardiotoxin injection. (b, c, e, and g) Error bars present mean \pm SD (*, $P < 0.05$). (h) Handgrip strengths of cardiotoxin-injected *csf3r*^{-/-} mice with or without G-CSF treatment. Results in a-h are from eight independent experiments.

G-CSF administration didn't confer functional recovery on day 5 or 7 after injury (Fig. 5 h). To elucidate precise myoblast function, we also examined the proliferation ability of *csf3r*^{-/-} myoblasts in vitro. The *csf3r*^{-/-} myoblasts showed significant decreased proliferation ability (Fig. S1 c). However, the expression of myocyte differentiation marker was not altered, which indicates that myocyte differentiation ability was not impaired in *csf3r*^{-/-} myoblasts (Fig. S1 d).

G-CSFR-expressing BM cells do not recover skeletal muscle regeneration in the *csf3r*^{-/-} mouse

To clarify the involvement of hematopoietic cells or BM cells in the impairment of skeletal muscle regeneration, we transplanted the BM cells from *csf3r*^{+/+} mice, which constitutively expressed GFP, to the *csf3r*^{-/-} mice (Fig. 6 a) 60 d before cardiotoxin-induced injury. In all the mice, the BM cells stably engrafted, and chimerism was >80%, as assessed by FACS (Fig. S3 a). After cardiotoxin injection into forearm muscles, the *csf3r*^{-/-} mice that were transplanted with BM cells from *csf3r*^{+/+} mice didn't show any improvement in gross morphology, the number of central cells, and handgrip strength after G-CSF treatment (Fig. 6, b–d). Moreover, the diameter of rectus femoris in these mice wasn't improved by G-CSF treatment after cardiotoxin injection into the rectus femoris muscles (Fig. 6 e). These mice showed no significant improvement in the regeneration by G-CSF treatment, and myocyte area was not altered by G-CSF treatment either (Fig. S3 b).

Next, we performed the BM transplantation experiment in reverse; the BM cells from *csf3r*^{-/-} mice were transplanted into *csf3r*^{+/+} mice. In these mice, skeletal muscle injury was generated, and regeneration was induced with G-CSF (Fig. 6 f). G-CSF treatment markedly improved gross morphology, the number of central cells, and handgrip strength after cardiotoxin injection into forearm muscles (Fig. 6, g–i) and increased the diameter of the rectus femoris after cardiotoxin injection into the rectus femoris muscles (Fig. 6 j). These mice showed more regeneration, and mean myocyte area was decreased by G-CSF treatment (Fig. S3 c). These results indicate that G-CSF promotion of skeletal muscle regeneration is a direct effect on skeletal muscle and isn't mediated by BM cells.

DISCUSSION

This study demonstrates that G-CSF and G-CSFR play pivotal roles in skeletal myocyte development and regeneration. Interestingly, this mechanism about G-CSF and G-CSFR is conserved between embryonic skeletal myocyte development and adult skeletal myocyte regeneration. G-CSFR is transiently but strongly expressed in myoblasts during development. The total mass of skeletal muscle is lower in *csf3r*^{-/-} mice than in *csf3r*^{+/+} mice, which means that G-CSF and G-CSFR signaling are essential for proper skeletal muscle development. G-CSFR is also expressed in the regenerating adult myocyte. G-CSF stimulates these G-CSFR-expressing myoblasts and promotes skeletal muscle regeneration after injury. The *csf3r*^{-/-} mice showed drastic impairment of skeletal

muscle regeneration, which suggests that G-CSF is critical for skeletal muscle regeneration.

During development, early muscle progenitor cells are characterized by Pax3 and Pax7 expression. Pax3 and Pax7 cooperatively specify the muscle progenitor pool because in mice deficient for both Pax3 and Pax7, all muscle progenitor cells are absent (Kassar-Duchossoy et al., 2005; Relaix et al., 2005). Once specified, muscle progenitor cells either proliferate or exit the cell cycle to undergo terminal differentiation. The latter process requires the activation of MRFs (Sabourin and Rudnicki, 2000). G-CSFR was expressed in cells that expressed MRFs but not in early muscle progenitor cells. Therefore, we speculate that rather than inducing early progenitor cells to increase the skeletal muscle stem cell pool, G-CSF causes late progenitor cells to adopt muscle mass requirement. In adult skeletal muscle, myogenic progenitor cells, which are characterized by the expression of MyoD, Myf5, or MRF4, and myoblasts, which are characterized by MyoD and Myf5 expression, are known as transient-amplifying cells (Weintraub, 1993; Shi and Garry, 2006; Kuang and Rudnicki, 2008; Biressi and Rando, 2010). We found that in the adult stage, G-CSFR was expressed in myoblasts, and G-CSF increased myocyte proliferation.

G-CSF is a hematopoietic cytokine that recruits hematopoietic cells (Cotler-Fox et al., 2003). The contribution of BM cells to muscle regeneration has been documented (Ferrari et al., 1998; Gussoni et al., 1999; LaBarge and Blau, 2002). To exclude the possibility that hematopoietic cells and BM mesenchymal stem cells affect skeletal muscle regeneration in response to G-CSF, we transferred wild-type BM cells to *csf3r*^{-/-} mice. In these mice, the skeletal myocytes didn't express G-CSFR, whereas the BM cells expressed G-CSFR. If BM cells contributed to skeletal muscle regeneration, these mice would show normal or improved regeneration abilities. However, they didn't show skeletal muscle regeneration in response to G-CSF. This finding is consistent with a report that stromal progenitor cells are mobilized by vascular endothelial growth factor but not by G-CSF (Pitchford et al., 2009). We assume that the contribution of BM cells to G-CSF-mediated skeletal muscle regeneration is negligible.

Skeletal muscle regeneration is a complex process that remains to be fully understood. After muscle injury, disruption of the myofiber plasma membrane initiates an influx of extracellular calcium, leading to calcium-dependent proteolysis, which results in necrosis and degeneration of the myofibers. Several signals released from the degenerating myocytes attract and activate inflammatory cells, which secrete cytokines. Neutrophils are the first inflammatory cells to reach the injured myofibers, followed by macrophages, which phagocytose the degenerating muscle fibers (Chargé and Rudnicki, 2004). Satellite cells and macrophages interact to amplify chemotaxis and enhance inflammation. Monocytes and macrophages may support satellite cell survival by cell-cell contacts and the release of soluble factors (Chazaud et al., 2003). In addition, monocyte and macrophage infiltration leads to increased satellite cell proliferation and differentiation (Lescaudron et al., 1999).

Based on our results, we speculate that macrophages are not only important for the resolution of necrosis but also involved in the induction of muscle regeneration. These leukocytes secrete G-CSF in the presence of appropriate stimuli

(Hareng and Hartung, 2002). Although previous studies showed that G-CSF seems to have some positive effects on skeletal muscle regeneration, it's not clear how G-CSF affects skeletal muscle regeneration, and especially the involvement

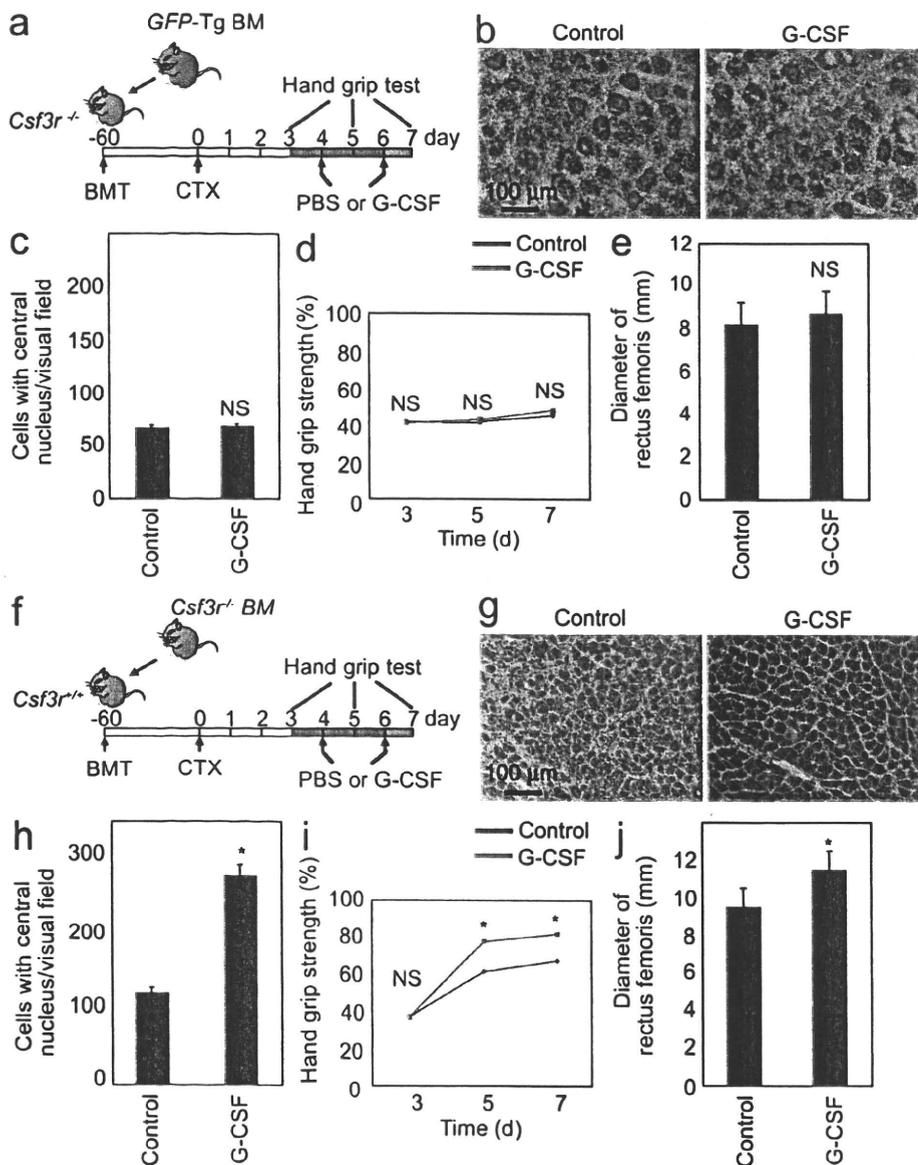


Figure 6. Effect of transplanted G-CSF-expressing BM cells on skeletal muscle regeneration. (a) Experimental model of BM transplantation 1. BM cells were isolated from GFP-transgenic (Tg) mice and transplanted into the *csf3r*^{-/-} mice. Cardiotoxin was injected into the rectus femoris, and G-CSF was administered on days 4 and 6. (b–e) Effects of G-CSF on skeletal muscle regeneration of *csf3r*^{-/-} mice subjected to cardiotoxin-induced skeletal myocyte injury and transplanted with wild-type BM (from GFP-transgenic mice). (b) Hematoxylin and eosin staining of the cardiotoxin-injured skeletal muscles at 7 d after injury. (c) Effect of extrinsic G-CSF administration on cardiotoxin-induced skeletal myocyte injury, as assessed by the numbers of regenerating myocytes. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris at 14 d after cardiotoxin injection. (d and e) Effects of G-CSF on the handgrip strength (d) and rectus femoris diameter at 14 d (e) are negligible. (f) Experimental model of BM transplantation 2. BM cells were isolated from *csf3r*^{-/-} mice and transplanted into the wild-type (*csf3r*^{+/+}) mice. (g) Hematoxylin and eosin staining of the cardiotoxin-injured skeletal muscles at 7 d after injury. (h) Effect of extrinsic G-CSF administration on cardiotoxin-induced skeletal myocyte injury, as assessed by the numbers of regenerating myocytes. 20 visual fields per individual mice were observed in the rectus femoris at 14 d after cardiotoxin injection. (i and j) Effects of G-CSF on the handgrip strength (i) and rectus femoris diameter at 14 d (j). (c, e, and h–j) Error bars present mean ± SD (*, $P < 0.05$). Results in b–e and g–j are from eight independent experiments.

of G-CSFR is not well understood (Stratos et al., 2007; Naito et al., 2009). We proved that BM-derived cells were not directly involved in skeletal muscle regeneration by G-CSF; however, BM-derived cells expressing G-CSF ligand can stimulate skeletal muscle proliferation through myoblast-specific expression of G-CSFR. This study demonstrates for the first time that the factors involved in the inflammatory process switch on the process of skeletal muscle regeneration.

Clinically, G-CSF is used to treat patients with neutropenia resulting from immunosuppressive chemotherapy, severe congenital neutropenia, life-threatening infections, and stem cell harvesting (Hammond et al., 1989; Molineux et al., 1990; Welte et al., 1996). Interestingly, myalgia is one of the main side effects of G-CSF administration in humans (Taylor et al., 1989). We may speculate that innate skeletal muscle regenerates itself to some extent to adapt the physiological turn over, that G-CSF injection stimulates small population of these skeletal myoblasts, and that the burst of skeletal myocyte proliferation gives rise to myalgia. The safety and side effects of G-CSF have been studied in several clinical settings (Anderlini and Champlin, 2008). Therefore, a clinical trial of G-CSF for human skeletal muscle injury may be warranted. The results of this study underline the importance of G-CSF in skeletal muscle development and regeneration and strengthen the case for using G-CSF as a skeletal muscle regeneration therapy.

MATERIALS AND METHODS

Whole-mount in situ hybridization. Mouse embryos were removed from wild-type Institute of Cancer Research pregnant mice on E10.5. Whole-mount in situ hybridization was performed as described previously (Yuasa et al., 2005). The full-length cDNAs for mouse *c-met*, *pax3*, *myoD*, and *myf4* (available from GenBank/EMBL/DDBJ under accession numbers NM_008591, NM_001159520, NM_010866, and NM_008657 [listed as *myf6*], respectively) were provided by M.E. Buckingham (Pasteur Institute, Paris, France). The full-length cDNA for mouse *csf3r* (GenBank accession number NM_007782) was provided by S. Nagata (Osaka University, Suita, Osaka, Japan; Fukunaga et al., 1990). The probes were generated using T3 or T7 RNA polymerase.

Animals. The *myf5* *nlacZ* mice were a gift from S. Tajbakhsh (Pasteur Institute; Tajbakhsh et al., 1996). The *csf3r*^{-/-} mice were a gift from D.C. Link (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO; Richards et al., 2003). All the experimental procedures and protocols were approved by the Animal Care and Use Committee of Keio University and conformed to the National Institutes of Health Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals.

Immunofluorescence. Mouse embryos on E8.5, E9.5, E10.5, and E11.5 were fixed in 4% paraformaldehyde for 3 h and embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura) for frozen sectioning. The samples were incubated with Triton X-100 for 5 min at room temperature, washed, and incubated with the following primary antibodies: anti-G-CSFR (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-Pax3 (1:200; American Type Culture Collection), anti-Pax7 (1:50; R&D Systems), anti-MyoD (1:50; Dako), antimyogenin (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), antidesmin (Dako), anti-G-CSF (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti- α -actinin (1:1,000; Sigma-Aldrich), and anti-GAPDH (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc.). After overnight incubation, bound antibodies were visualized with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 or 546 (Invitrogen). Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). For BrdU staining, a BrdU labeling kit (Roche) was used. After antigen

retrieval using HistoVT One (L6F9587; Nacalai Tesque) and blocking, BrdU staining was performed as described in the manufacturer's protocol.

Myoblast culturing. C2C12 mouse myoblasts (American Type Culture Collection) were cultured in DME/10% FBS (Invitrogen). The medium was replaced with DME/2% horse serum (Invitrogen) to induce differentiation. Recombinant mouse G-CSF (R&D Systems) was added on the indicated days. Inhibition of G-CSF signaling was analyzed by administering an anti-G-CSFR neutralizing antibody (R&D Systems).

Western blotting. C2C12 cells were treated with G-CSF Cell extracts were prepared at 0, 5, 10, 15, 30, 45, and 60 min after G-CSF stimulation. Protein lysates were resolved by SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane, followed by immunoblotting with anti-phospho-STAT3, anti-phospho-AKT, anti-phospho-ERK, anti-phospho-JNK, and anti-phospho-p38MAPK antibodies (all from Cell Signaling Technology) and horseradish peroxidase-conjugated anti IgG, followed by development with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent reagent (Thermo Fisher Scientific). The same membrane was retrieved and reblotted with anti-STAT3, anti-AKT, anti-ERK, anti-JNK, and anti-p38MAPK antibodies (all from Cell Signaling Technology), respectively.

Luciferase analysis. C2C12 cells plated in DME were transfected with Lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The APRE luciferase plasmid was provided by A. Yoshimura (Keio University, Shinjuku, Tokyo, Japan) and used at a dosage of 100 ng. The administered dosages of G-CSF were 37.5, 125.0, and 375.0 pg/ml. CMV-*Renilla* luciferase was used as an internal control to normalize for variations in transfection efficiency. All of the proteins were expressed at similar levels, as confirmed by Western blotting.

Skeletal muscle injury model. 10 μ M cardiotoxin (*Naja mossaibica mossaibica*; Sigma-Aldrich) diluted in 100 μ l PBS was injected into the rectus femoris muscles of BL6/J mice using a 27-gauge needle and a 1-ml syringe. The needle was inserted deep into the rectus femoris longitudinally to the knee. Cardiotoxin was injected along the length of the muscle. The mice in the control group were injected with 100 μ l PBS. Mice (treated and control groups) were sacrificed at various time points after cardiotoxin injection, and blood samples (1.0–1.5 ml from each mouse) were collected in heparin-rinsed syringes.

Handgrip strength testing. 10 μ M cardiotoxin (Sigma-Aldrich) diluted in 100 μ l PBS was injected into forearm muscles of BL6/J mice. Five training sessions were performed during which the animals were held, facing the bar of the grip strength meter (Muromachi Kikai), while the forearm was gently restrained by the experimenter. When the unrestrained forepaw is brought into contact with the bar of the grip strength meter, the animal grasps the bar, after which the animal is gently pulled away from the device. The grip strength meter measures the maximal force applied before the animal released the bar.

BM transplantation. BM cells were harvested from 8-wk-old enhanced GFP (EGFP)-transgenic mice. After irradiation with a single dose of 9.0 Gy, the unfractionated EGFP⁺ BM cells (1×10^6 cells) were injected via the tail vein, as described previously (Kawada et al., 2006). To assess chimerism, peripheral blood cells were collected from the recipient mice 60 d after BM transplantation, and the frequency of EGFP⁺ cells in the population of peripheral nucleated blood cells was determined in a FACS sorter (BD) after hemolysis was induced with ammonium chloride to eliminate erythrocytes.

Statistical analysis. The data were analyzed using the StatView J-4.5 software (SAS Institute, Inc.). Values are reported as means \pm SD. Comparisons among groups were performed by one-way analysis of variance. Scheffe's F test was used to determine the level of significance. The probability level accepted for significance was $P < 0.05$.

Online supplemental material. Fig. S1 shows the effect of G-CSF on myoblast differentiation in C2C12 cells and myoblasts harvested from *csf3r*^{+/+} and wild-type mice. Fig. S2 shows histological analysis of cardiotoxin-injured skeletal muscle from day 1 to 28. Fig. S3 shows the chimerism of hematopoietic cells before and after BM cell transplantation and quantitative analysis of the areas of the skeletal myocyte sections in the *csf3r*^{-/-} and *csf3r*^{+/+} mice with BM transplantation. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20101059/DC1>.

This study was supported in part by research grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan and by the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Science of the National Institute of Biomedical Innovation.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 26 May 2010

Accepted: 11 February 2011

REFERENCES

- Aarts, L.H.J., O. Roovers, A.C. Ward, and I.P. Touw. 2004. Receptor activation and 2 distinct COOH-terminal motifs control G-CSF receptor distribution and internalization kinetics. *Blood*. 103:571–579. doi:10.1182/blood-2003-07-2250
- Adams, G.R., F. Haddad, and K.M. Baldwin. 1999. Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles. *J. Appl. Physiol.* 87:1705–1712.
- Anderlini, P., and R.E. Champlin. 2008. Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood*. 111:1767–1772. doi:10.1182/blood-2007-07-097543
- Armand, A.-S., C. Pariset, I. Laziz, T. Launay, F. Fiore, B. Della Gaspera, D. Birbaum, F. Charbonnier, and C. Chanoine. 2005. FGF6 regulates muscle differentiation through a calcineurin-dependent pathway in regenerating soleus of adult mice. *J. Cell. Physiol.* 204:297–308. doi:10.1002/jcp.20302
- Avalos, B.R. 1996. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 88:761–777.
- Biressi, S., and T.A. Rando. 2010. Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:845–854. doi:10.1016/j.semcdb.2010.09.003
- Blau, H.M., C.-P. Chiu, and C. Webster. 1983. Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell*. 32:1171–1180. doi:10.1016/0092-8674(83)90300-8
- Bober, E., G.E. Lyons, T. Braun, G. Cossu, M. Buckingham, and H.H. Arnold. 1991. The muscle regulatory gene, Myf-6, has a biphasic pattern of expression during early mouse development. *J. Cell Biol.* 113:1255–1265. doi:10.1083/jcb.113.6.1255
- Bober, E., T. Franz, H.H. Arnold, P. Gruss, and P. Tremblay. 1994. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. *Development*. 120:603–612.
- Buckingham, M., and D. Montarras. 2008. Skeletal muscle stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:330–336. doi:10.1016/j.gde.2008.06.005
- Chargé, S.B.P., and M.A. Rudnicki. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 84:209–238. doi:10.1152/physrev.00019.2003
- Chazaud, B., C. Sonnet, P. Lafuste, G. Bassez, A.-C. Rimaniol, F. Poron, F.-J. Authier, P.A. Dreyfus, and R.K. Gherardi. 2003. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. *J. Cell Biol.* 163:1133–1143. doi:10.1083/jcb.200212046
- Clever, J.L., Y. Sakai, R.A. Wang, and D.B. Schneider. 2010. Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298:C1087–C1099. doi:10.1152/ajpcell.00388.2009
- Cottler-Fox, M.H., T. Lapidot, I. Petit, O. Kollet, J.F. DiPersio, D. Link, and S. Devine. 2003. Stem cell mobilization. *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)*. 419–437.
- Demetri, G.D., and J.D. Griffin. 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 78:2791–2808.
- Ferrari, G., G. Cusella-De Angelis, M. Coletta, E. Paolucci, A. Stornaiuolo, G. Cossu, and F. Mavilio. 1998. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 279:1528–1530. doi:10.1126/science.279.5356.1528
- Fukunaga, R., Y. Seto, S. Mizushima, and S. Nagata. 1990. Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:8702–8706. doi:10.1073/pnas.87.22.8702
- Gussoni, E., Y. Soneoka, C.D. Strickland, E.A. Buzney, M.K. Khan, A.F. Flint, L.M. Kunkel, and R.C. Mulligan. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 401:390–394.
- Hammond, W.P. IV, T.H. Price, L.M. Souza, and D.C. Dale. 1989. Treatment of cyclic neutropenia with granulocyte colony-stimulating factor. *N. Engl. J. Med.* 320:1306–1311. doi:10.1056/NEJM198905183202003
- Harada, M., Y. Qin, H. Takano, T. Minamino, Y. Zou, H. Toko, M. Ohtsuka, K. Matsuura, M. Sano, J. Nishi, et al. 2005. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat. Med.* 11:305–311. doi:10.1038/nm1199
- Hareng, L., and T. Hartung. 2002. Induction and regulation of endogenous granulocyte colony-stimulating factor formation. *Biol. Chem.* 383:1501–1517. doi:10.1515/BC.2002.172
- Hosaka, Y., T. Yokota, Y. Miyagoe-Suzuki, K. Yuasa, M. Imamura, R. Matsuda, T. Ikemoto, S. Kameya, and S.i. Takeda. 2002. α 1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J. Cell Biol.* 158:1097–1107. doi:10.1083/jcb.200204076
- Jostes, B., C. Walther, and P. Gruss. 1990. The murine paired box gene, Pax7, is expressed specifically during the development of the nervous and muscular system. *Mech. Dev.* 33:27–37. doi:10.1016/0925-4773(90)90132-6
- Kassar-Duchossoy, L., E. Giaccone, B. Gayraud-Morel, A. Jory, D. Gomès, and S. Tajbakhsh. 2005. Pax3/Pax7 mark a novel population of primitive myogenic cells during development. *Genes Dev.* 19:1426–1431. doi:10.1101/gad.345505
- Kawada, H., S. Takizawa, T. Takanashi, Y. Morita, J. Fujita, K. Fukuda, S. Takagi, H. Okano, K. Ando, and T. Hotta. 2006. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation*. 113:701–710. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.563668
- Kuang, S., and M.A. Rudnicki. 2008. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol. Med.* 14:82–91. doi:10.1016/j.molmed.2007.12.004
- LaBarge, M.A., and H.M. Blau. 2002. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*. 111:589–601. doi:10.1016/S0092-8674(02)01078-4
- Le Grand, F., and M.A. Rudnicki. 2007. Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:628–633. doi:10.1016/j.ceb.2007.09.012
- Lescaudron, L., E. Peltékian, J. Fontaine-Pérus, D. Paultin, M. Zampieri, L. Garcia, and E. Parrish. 1999. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul. Disord.* 9:72–80. doi:10.1016/S0960-8966(98)00111-4
- Megency, L.A., R.L.S. Perry, J.E. LeCouter, and M.A. Rudnicki. 1996. bFGF and LIF signaling activates STAT3 in proliferating myoblasts. *Dev. Genet.* 19:139–145. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)19:2<139::AID-DVG5>3.0.CO;2-A
- Messina, G., and G. Cossu. 2009. The origin of embryonic and fetal myoblasts: a role of Pax3 and Pax7. *Genes Dev.* 23:902–905. doi:10.1101/gad.1797009
- Metcalf, D. 2008. Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111:485–491. doi:10.1182/blood-2007-03-079681
- Molineux, G., Z. Pojda, I.N. Hampson, B.I. Lord, and T.M. Dexter. 1990. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 76:2153–2158.

- Naito, T., K. Goto, S. Morioka, Y. Matsuba, T. Akema, T. Sugiura, Y. Ohira, M. Beppu, and T. Yoshioka. 2009. Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3 α signals. *Eur. J. Appl. Physiol.* 105:643–651. doi:10.1007/s00421-008-0946-9
- Philippou, A., A. Halapas, M. Maniaki, and M. Koutsilieris. 2007. Type I insulin-like growth factor receptor signaling in skeletal muscle regeneration and hypertrophy. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* 7:208–218.
- Pitchford, S.C., R.C. Furze, C.P. Jones, A.M. Wengner, and S.M. Rankin. 2009. Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow. *Cell Stem Cell.* 4:62–72. doi:10.1016/j.stem.2008.10.017
- Rantanen, J., T. Hurme, R. Lukka, J. Heino, and H. Kalimo. 1995. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab. Invest.* 72:341–347.
- Relaix, F., D. Rocancourt, A. Mansouri, and M. Buckingham. 2005. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature.* 435:948–953. doi:10.1038/nature03594
- Rhodes, S.J., and S.F. Konieczny. 1989. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev.* 3:2050–2061. doi:10.1101/gad.3.12b.2050
- Richards, M.K., F. Liu, H. Iwasaki, K. Akashi, and D.C. Link. 2003. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood.* 102:3562–3568. doi:10.1182/blood-2003-02-0593
- Sabourin, L.A., and M.A. Rudnicki. 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin. Genet.* 57:16–25. doi:10.1034/j.1399-0004.2000.570103.x
- Sakuma, K., K. Watanabe, M. Sano, I. Uramoto, and T. Totsuka. 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. *Biochim. Biophys. Acta.* 1497:77–88. doi:10.1016/S0167-4889(00)00044-6
- Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardí, and P. Muñoz-Cánoves. 2008. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 7:33–44. doi:10.1016/j.cmet.2007.11.011
- Shi, X., and D.J. Garry. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes Dev.* 20:1692–1708. doi:10.1101/gad.1419406
- Shimoji, K., S. Yuasa, T. Onizuka, F. Hattori, T. Tanaka, M. Hara, Y. Ohno, H. Chen, T. Egasgira, T. Seki, et al. 2010. G-CSF promotes the proliferation of developing cardiomyocytes in vivo and in derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell.* 6:227–237. doi:10.1016/j.stem.2010.01.002
- Solomon, A.M., and P.M.G. Bouloux. 2006. Modifying muscle mass – the endocrine perspective. *J. Endocrinol.* 191:349–360. doi:10.1677/joe.1.06837
- Stratos, I., R. Rotter, C. Eipel, T. Mittlmeier, and B. Vollmar. 2007. Granulocyte-colony stimulating factor enhances muscle proliferation and strength following skeletal muscle injury in rats. *J. Appl. Physiol.* 103:1857–1863. doi:10.1152/jappphysiol.00066.2007
- Tajbakhsh, S., D. Rocancourt, and M. Buckingham. 1996. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non-myogenic fates in myf-5 null mice. *Nature.* 384:266–270. doi:10.1038/384266a0
- Tapscott, S.J., R.L. Davis, M.J. Thayer, P.F. Cheng, H. Weintraub, and A.B. Lassar. 1988. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science.* 242:405–411. doi:10.1126/science.3175662
- Taylor, K.M., S. Jagannath, G. Spitzer, J.A. Spinolo, S.L. Tucker, B. Fogel, F.F. Cabanillas, F.B. Hagemeister, and L.M. Souza. 1989. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor hastens granulocyte recovery after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation in Hodgkin's disease. *J. Clin. Oncol.* 7:1791–1799.
- Venters, S.J., S. Thorsteinsdóttir, and M.J. Duxson. 1999. Early development of the myotome in the mouse. *Dev. Dyn.* 216:219–232. doi:10.1002/(SICI)1097-0177(199911)216:3<219::AID-DVDY1>3.0.CO;2-J
- Weintraub, H. 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell.* 75:1241–1244. doi:10.1016/0092-8674(93)90610-3
- Welte, K., J. Gabrielove, M.H. Bronchud, E. Platzer, and G. Morstyn. 1996. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood.* 88:1907–1929.
- Yan, Z., S. Choi, X. Liu, M. Zhang, J.J. Schageman, S.Y. Lee, R. Hart, L. Lin, F.A. Thurmond, and R.S. Williams. 2003. Highly coordinated gene regulation in mouse skeletal muscle regeneration. *J. Biol. Chem.* 278:8826–8836. doi:10.1074/jbc.M209879200
- Yang, X.M., K. Vogan, P. Gros, and M. Park. 1996. Expression of the met receptor tyrosine kinase in muscle progenitor cells in somites and limbs is absent in Splotch mice. *Development.* 122:2163–2171.
- Yuasa, S., Y. Itabashi, U. Koshimizu, T. Tanaka, K. Sugimura, M. Kinoshita, F. Hattori, S. Fukami, T. Shimazaki, S. Ogawa, et al. 2005. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 23:607–611. doi:10.1038/nbt1093
- Yuasa, S., T. Onizuka, K. Shimoji, Y. Ohno, T. Kageyama, S.H. Yoon, T. Egashira, T. Seki, H. Hashimoto, T. Nishiyama, et al. 2010. Zac1 is an essential transcription factor for cardiac morphogenesis. *Circ. Res.* 106:1083–1091. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.214130
- Zaruba, M.M., H.D. Theiss, M. Vallaster, U. Mehl, S. Brunner, R. David, R. Fischer, L. Krieg, E. Hirsch, B. Huber, et al. 2009. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell.* 4:313–323. doi:10.1016/j.stem.2009.02.013

心不全における 交感神経の分化転換

▶ Cholinergic transdifferentiation of cardiac sympathetic nerves in heart failure

金澤英明, 福田恵一 (慶應義塾大学医学部循環器内科)

心不全の治療戦略において重要なのは、病態解明の進歩である。心不全の原因疾患は、高血圧、心臓弁膜症、虚血性心疾患、心筋症など多岐にわたり、その病態生理も複雑であるが、心臓には豊富な交感神経支配があり、心不全の病態に心臓交感神経の関与がきわめて重要であることは、これまでの研究、臨床で明らかとなっている^{1,2)}。心不全では持続的な交感神経活性の亢進に伴って、心筋組織中のNE(ノルエピネフリン)含有量は減少し枯渇する³⁾とされているが、その詳細なメカニズムや意義については未解決な部分も多い。

一方、心不全時の心筋細胞において胎児型運送因子が発現することが知られているが、われわれは心不全病態下の心臓交感神経においても、幼若化と称される胎児型運送因子の発現が起こること⁴⁾、さらには心臓から分泌されるサイトカインを介して、心臓交感神経の分化転換が生じることが明らかになってきた⁵⁾。これらの現象は、心不全における心臓交感神経異常の病態解明の一環を担うものと考えられ、心不全の新たな治療の種となる可能性がある。本稿では、心不全における心臓交感神経異常に関する最新の知見と心不全の病態との関連について解説する。

心臓自律神経の解剖、機能

心臓には自律神経である交感神経、副交感神経、さらに感覚神経の分布があり、さまざまな生理的反応に対する作用を司っている。心臓交感神経の中枢は延髄に存在し、そこから神経線維は背髄の中間外脚核を経て、交感神経幹の神経節(上頸神経節、星状神経節、上胸部神経節)で節後神経に乗り換えて心臓に達する。心臓に到達した交感神経は、冠動脈に沿って心表面を走行し、その後、心筋内に分布すると

されている。一方、副交感神経は、延髄にある迷走神経背脚核を中枢として神経線維を出し、心房中隔、左房後壁に分布する心臓神経節を経て神経を乗り換え、交感神経とは反対に心筋の内側を走行し、心筋内に分布するとされている(図1)^{7,8)}。

交感神経終末では、チロシンからカテコラミン合成酵素であるTH (tyrosine hydroxylase) やDBH (dopamine β hydroxylase) の作用によってドパミンを経てNE(ノルエピネフリン)が合成され、貯蔵顆粒に蓄えられる。上位か

らの刺激により開口分沁(exocytosis)が起こり、シナプス間隙にNEが放出される。このNEが心筋細胞表面のβアドレナリン受容体に結合することで陽性変力・変時作用の効果が発現する。しかし、放出されたNEの95%は交感神経終末に再び取り込まれ(uptake1)、再利用されることとなる。また、遊離したNEは交感神経終末に存在するα受容体を介してネガティブフィードバックによりNEの放出抑制に働く(図2)⁹⁾。

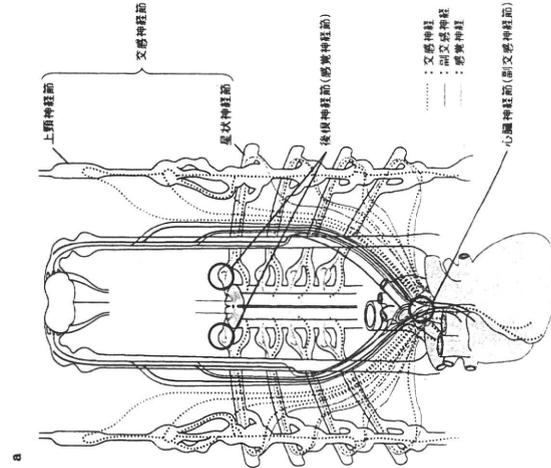


図1 心臓自律神経の解剖
a: 心臓の神経支配(図7より)
b: 左室の神経支配(図8より)

心不全における交感神経異常とその原因

心不全では、持続的な交感神経活動の亢進が認められる。これは破綻していく循環動態を維持するための重要な一因である。さらなる心筋障害、心臓能低下をまねき、電気生理学的には致死性不整脈の源となり、最終的には心不全の進展を助長する予後不良の因子である^{3,10}。

これまで、心不全における心臓交感神経の異常は、交感神経終末におけるspilloverの亢進、uptake1の障害により、心筋組織中のNE含有量の低下、MIBGの欠損像としてとらえられてきた¹¹。しかし、NEの前駆体であるドーパミン、および代謝産物であるTHの発現増加はなく、逆にその発現が低下し、交感神経のdenervation(脱

もの、逆にその機能は低下の方向を示し、TH、DBH活性は低下し、NE含有量、NE再吸収量は減少した。さらにこれらの交感神経において、幼若期のマーカーであるPSA-NCAM (highly polysialylated neural cell adhesion molecule)の発現を確認した。以上の結果から、心不全における心臓交感神経は幼若化(脱分化現象)を惹起することが明らかとなった⁹。

心不全における交感神経の幼若化

心不全病態下では、心筋細胞においてβ型ミオシン重鎖、骨格筋型α-アクチンなどの胎児型遺伝子が発現していることが広く知られている。

われわれは、ラットにモノクローナル抗体を投与し肺高血圧を惹起することに より右室肥大・右心不全モデルを作製した。その右室心筋では神経成長因子(NGF)の発現が亢進し、心臓交感神経が過剰分布(hyperinnervation)した

転換(switching)する現象が報告された¹³。この現象はneurotransmitter switching, またはcholinergic differentiationとよばれるようになった。さらに、1989年、この分化誘導する物質が白血球抑制因子(leukemia inhibitory factor; LIF)であることが同定された¹⁴。

その後、この受容体の分子的解明から、この因子がIL-6とよばれるサイトカインの一種と同じファミリーに属するものであることを明らかにされた。その他、IL-6ファミリーであるCNTF (gliary neurotrophic factor), OSM (oncostatin M), CT-1 (cardiotrophin-1)に加え、ニューロトロフィンファミリーであるBDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3)と いった液性因子はLIF同様に対交感神経に分化誘導するcholinergic differentiation factor (コリン作動性分化因子)といわれおり、標的臓器からの逆行性シグナルとして、軸索伸張、神経の生存、死、シナプス形成だけでなく、神経伝達物質の機能決定にも影響していると考えられている¹⁵。

心不全における交感神経の分化転換

これまで、cholinergic differentiationは*in vitro*で確認されてきた現象であるが、最近、われわれは心不全における心臓交感神経異常に関する新しいメカニズムを明らかにした⁶。

LIFを過発現させたマウスを作製し、生体内でのLIFによる心臓交感神経のコリン作動性神経への分化転換(cholinergic differentiation)が誘発されるかを検討した。その結果、心臓交感神経終末および末梢神経節において、カテコラミン作動性マーカーの発現低下とコリン作動性マーカーの発現亢進を認めた。以上の結果から、生体内においてもLIFがcholinergic differentiationにおける重要な因子であることが確認された。

さらに、DBH-Creマウスとgp130-floxマウスを交配し、交感神経特異的にgp130受容体をノックアウトしたマウス(gp130-conditional knock out; gp130-CKO)を作製した。このマウスを用いて低酸素曝露肺高血圧モデルを作製した。対照マウス肺高血圧モデルの心臓交感神経系ではcholinergic differentiationが確認されたが、gp130-CKOマウスでは、この現象が抑制された。この結果から、cholinergic differentiationは、gp130受容体を介した現象であることが強く示唆された。

また、肺高血圧モデルの生存曲線において、gp130-CKOマウスの予後が対照マウスに比較して悪化する結果であった。このことから、gp130受容体を介したcholinergic differentiationは、生体保護的に作用している可能性が考えられた。

最後に、心不全患者の肺動脈の心臓交感神経系においてもコリン作動性神経への分化転換(cholinergic differentiation)が惹起されていることが確認された。

まず、Dahl食塩感受性ラットを用いて心不全モデルを作製し、心臓交感神経の特異的マーカーであるTHに対する免疫染色を行った。その結果、左室のTH陽性神経線維は減少し、左室心筋神経中のNE含有量もコントロール群と比較して有意に低下していた。しかし、副交感神経マーカーであるCHT (choline transporter) に対する免疫染色を施行したところ、左室心筋の交感神経線維内にCHT陽性神経線維を多数認めた。さらに、その一部は交感神経マーカーであるTHと副交感神経マーカーであるCHTの両方の染色性を有している神経線維の存在が確認された(図3a)。

次に、この現象が交感神経終末のみならず、交感神経節でも生じているかどうかを確認するために、心不全ラットの末梢神経節の免疫染色を行った。その結果、交感神経節の免疫染色が副交感神経マーカーであるChAT (choline acetyltransferase)陽性の神経細胞体を多数認めた(図3b)。

ところで、近年、心不全の病態にさまざまなサイトカインが関与していることが明らかとなっている。その中でもLIFやCT-1の発現が、心不全の心筋で有意に上昇していることはよく知られている^{16,17}。

そこで、不全心筋から分泌されたLIFが神経機能に及ぼす変化の有無を調べる可能性について検討した。まず、αMHC(alpha-myosin heavy chain)-CreマウスとLIF-floxマウスを交配することによって、心筋特異的に

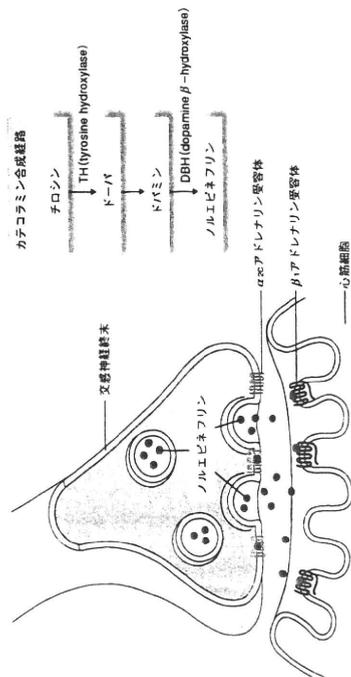


図2 交感神経終末の模式図とカテコラミン合成経路(文献9より)

● 総説

循環器系疾患の遺伝子学

*¹ 慶應義塾大学医学部 臨床検査医学 専任講師

*² 慶應義塾大学医学部 循環器内科 教授

村田光繁*¹ 福田恵一*²

要旨

1980年代後半から、分子遺伝学的手法の進歩に伴い多くの遺伝性疾患の原因遺伝子の同定が行われ、さらに1990年代後半からのヒトゲノム研究は加速的に疾患発症における遺伝子異常の関与を明らかにしてきた。循環器系における遺伝性疾患として心筋症や致死性不整脈などが詳細に検討され、多数の変異遺伝子が同定され、その種類や変異部位によって表現型や予後に違いがあることが明らかとなった。また昨今では、これらの遺伝情報に基づいた日常診療が行われるようになり、将来テーラーメイド医療に発展することが期待されている。

はじめに

一般に、ヒトの疾患は遺伝要因と環境要因により発症し、その組み合わせや割合により発症年齢や重症度などの表現型が決まると考えられている。つまり、単一遺伝子が疾患の遺伝要因の大半を決定し、その病態生理と密接に関係している単一遺伝子疾患と、環境要因や相互作用するさまざまな遺伝子多型が複合的に影響して発症する多因子疾患に大別される。前者の頻度は高くなく、染色体領域の多型を用いた連鎖解析により遺伝子異常が同定され、循環器領域では心筋症や家族

キーワード：単一遺伝性疾患，心筋症，致死性不整脈，再生医療，
テーラーメイド医療

性致死性不整脈などがこれにあたる。一方、後者は高血圧や虚血性心疾患などで頻度は高いが、個々の遺伝要因が疾患の病態やリスクに及ぼす影響は高くなく、しかも複数存在するため、その同定は容易ではない。また、ある集団での出現頻度が高い遺伝子変異がこれらの疾患の発症に関与するとは限らず、出現頻度が低いものの疾患発症リスクが高い変異も発見されることがあるため (common disease rare variant hypothesis), 多因子疾患の感受性遺伝子同定には、質・量ともに優れた大規模集団を対象とした多面的なアプローチが必要である。本稿では、前者の単一遺伝子疾患について、これまで明らかになっている原因遺伝子と病態との関連を中心に概説する。

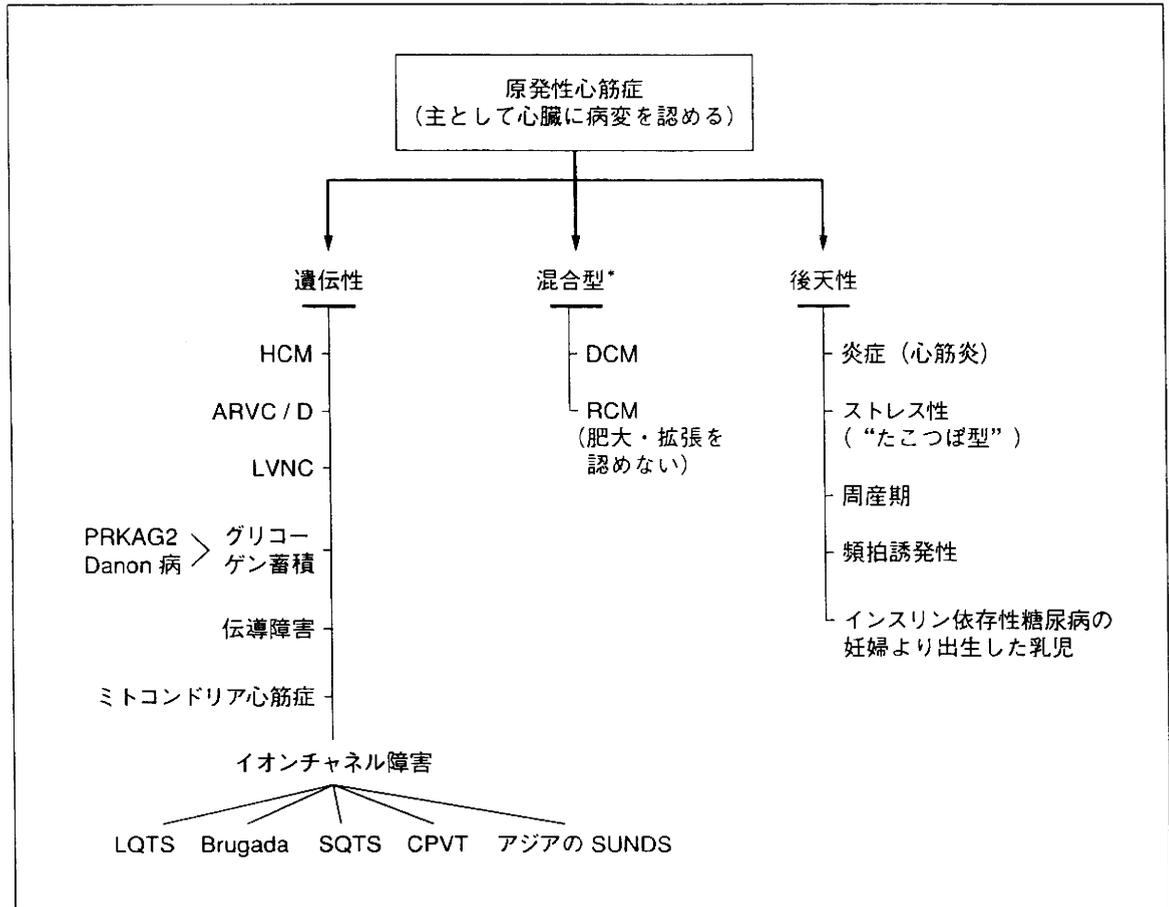
心 筋 症

心筋症は心筋の器質的あるいは機能的異常に基づく心疾患の総称である。最近の分子遺伝学の発展により、心筋症の原因遺伝子が次々と同定され新たな疾患概念が解明されたのに伴い、2006年に新たな定義と分類が提唱された¹⁾。この分類では、「心筋症は心筋の機械的・電気的機能不全を伴うさまざまな心疾患」と定義されており、病変が心臓に限局している原発性 (primary) と全身疾患の心病変である二次性 (secondary) に分類される (図1)。原発性心筋症はさらに、遺伝性 (genetic)、混合性 (mixed)、後天性 (acquired) に分類されている。本分類では、従来心筋症の枠に含まれていなかったイオンチャネル病や心臓伝導障害なども電気的機能不全に該当するため心筋症と分類されており、遺伝性心疾患の大部分が心筋症に分類されることになる。しかし、これらの疾患はすでに遺伝性不整脈疾患としての概念が確立されているため、本稿では別に概説する。

1. 肥大型心筋症 (HCM)

HCMの半数が常染色体優性遺伝形式に従う家族歴を認めることから、連鎖解析や候補遺伝子アプローチが行われ、多くの原因遺伝子が同定されている²⁾。当初心筋 β ミオシン重鎖、トロポニンTや α トロポミオシンなどのサルコメアタンパク遺伝子に変異を認めたことから、HCMの心肥大はサルコメア収縮力低下を代償するために生じたものと考えられた³⁾。しかし、その後の関連遺伝子検索により、サルコメ

図1 原発性心筋症（临床上問題となる疾患経過が心筋に限定される、または主に含まれる疾患）
（文献¹より引用改変）



遺伝性と非遺伝性病因により分類した。

*：主に非遺伝性疾患名で、遺伝子に起因する家族性疾患は症例のごく少数においてのみ報告されている。

HCM：肥大型心筋症，ARVC/D：不整脈源性右室心筋症 / 異形成症，LVNC：左室心筋緻密化障害，

LQTS：QT 延長症候群，SQTS：QT 短縮症候群，CPVT：カテコラミン誘発性多形性心室頻拍，

SUNDS：夜間突然死症候群，DCM：拡張型心筋症，RCM：拘束型心筋症

ア収縮をむしろ抑制するトロポニン I やサルコメアに直接関係しない
タイチン (TTN)²⁾ や Tcap³⁾ などのタンパクに変異が同定されたこと
から、変異による収縮力低下は必ずしも 1 次的な現象ではなく、スト
レッチ張力の増加が細胞内 Ca 感受性を亢進することによる拡張機能
障害が、HCM の病態の主体であることが提唱されている。

表 1 に原発性心筋症原因遺伝子を示したように²⁾、多くの病因変異
が同定されているが、変異遺伝子の種類や同一遺伝子であっても変異
部位によって病態や予後に差異があることが明らかとなってきた。心

表1 原発性心筋症原因遺伝子の多様性 (文献²より引用改変)

心筋症病型	遺伝形式	原因遺伝子シンボル	コードタンパク
HCM / DCM / RCM / LVNC	AD	<i>MYH7</i>	cardiac β -myosin heavy chain
HCM / DCM / RCM / LVNC	AD	<i>TNNT2</i>	cardiac troponin T
HCM / DCM	AD	<i>TPM1</i>	α -tropomyosin
HCM / DCM	AD	<i>MYBPC3</i>	cardiac myosin binding protein-C
HCM	AD	<i>MYL3</i>	ventricular myosin essential light chain
HCM	AD	<i>MYL2</i>	ventricular myosin regulatory light chain
HCM / DCM / RCM	AD	<i>TNNI3</i>	cardiac troponin I
HCM / DCM / LVNC	AD	<i>ACTC</i>	cardiac α -actin
HCM / DCM	AD	<i>TTN</i>	titin, connectin
HCM / DCM	AD	<i>TNNC1</i>	cardiac troponin C
HCM	AD	<i>MYH6</i>	cardiac α -myosin heavy chain
HCM / DCM	AD	<i>CSRP3</i>	muscle LIM protein, MLP
HCM	AD	<i>CAV3</i>	caveolin-3
HCM / DCM	AD	<i>TCAP</i>	titin-cap, Tcap, telethonin
HCM / DCM	AD	<i>VCL</i>	metavinculin
HCM	AD	<i>JPH-2</i>	junctionophilin-2
HCM	AD	<i>OBSCN</i>	obscurin
HCM	AD	<i>MYOZ2</i>	myozenin, calstactin-1
HCM / DCM	AD	<i>ANKRD1</i>	CARP
DCM / RCM	AD	<i>DES</i>	desmin
DCM / LVNC	AD	<i>LMNA</i>	lamin A / C
DCM	AD	<i>SAGD</i>	δ -sarcoglycan
DCM	AD	<i>ACTN2</i>	α -actinin-2
DCM / LVNC	AD	<i>LDB3</i>	cypher, ZASP, oracle
DCM / HCM	AD	<i>PLB</i>	phospholamban
DCM	AD	<i>ABCC9</i>	K _{ATP} channel
DCM	AD	<i>SCN5A</i>	cardiac Na channel
DCM / HCM	AD	<i>CRYAB</i>	α B crystallin
DCM	AD	<i>PSEN1</i>	presenilin-1
DCM	AD	<i>PSEN2</i>	presenilin-2
DCM	AD	<i>FHL2</i>	four and half LIM protein-2, FHL2
DCM	AD	<i>LMNA4</i>	laminin α 4
DCM	AD	<i>ILK</i>	integrin-linked kinase
DCM	AD	<i>MYPN</i>	myopalladin
DCM	AD	<i>CHRM2</i>	acetylcholine receptor
DCM	XR	<i>DMD</i>	dystrophin
DCM	XR	<i>EMD</i>	emerin
LVNC / DCM	XR	<i>TAZ</i>	tafazzin, G4.5
DCM	XR	<i>FKTN</i>	fukutin
ARVC / DCM	AR	<i>DSP</i>	desmoplakin
ARVC / DCM	AR, AD	<i>JUP</i>	plakoglobin
ARVC	AD	<i>PKP2</i>	plakophilin-2
ARVC	AD	<i>TGFB3</i>	TFG β 3
ARVC	AD	<i>RYR2</i>	ryanodine receptor 2
ARVC	AD	<i>DSG3</i>	desmoglein 3
LVNC	AD	<i>DTNA</i>	α -dystrobrevin

AD:常染色体優性, XR:伴性劣性(X連鎖性), AR:常染色体劣性

その他の略語:巻末の「今号の略語」参照

筋肥大の表現型は心筋トロポニンT遺伝子変異例のほうが β ミオシン重鎖遺伝子変異より軽度であるが、心臓突然死はトロポニンT遺伝子変異例のほうが不良である。

蓄積病はHCM類似の心肥大病態を呈するが、病理学的、臨床的にもHCMとは全く異なる疾患単位である。一般に、Pompe病、Danon病およびFabry病などの蓄積病では心筋以外の臓器が同時に侵されることが多いが、それらの一部は他臓器症状がほとんどなく、心筋障害が前面に出ることがある。それらは、心Fabry病、一部のDanon病、アデノシン5'-リン酸(AMP)活性化タンパクキナーゼ変異症などであり、特にAMP活性化タンパクキナーゼ変異症は、ウォルフ・パーキンソン・ホワイト(WPW)症候群を伴うHCM多発家系の原因として、連鎖解析で原因遺伝子が同定された。蓄積病のほとんどは当該酵素の活性低下および欠損に起因するため劣性遺伝形式をとるが、AMP活性化タンパクキナーゼ変異症は酵素活性が上昇したことによるものであり、優性遺伝形式をとる。

2. 拡張型心筋症(DCM)

DCM患者の20~35%に家族歴を認めるが、遺伝形式は家系ごとに異なる。多くは常染色体優性遺伝であるが、常染色体劣性遺伝、伴性劣性遺伝や母性遺伝形式をとるものもある⁹⁾。このうち、常染色体優性遺伝形式の家系を対象にした連鎖解析と候補遺伝子アプローチが行われ、これまでジストロフィン(DMD)、ラミンA/C(LMNA)、デスミン(DES)、 δ -サルコグリカン(SAGD)、心筋アクチン(ACTC)、メタビンキュリン(VCL)、TTN、ホスホランパン(PLB)、KATPチャンネル(ABCC9)、サイファー(LDB3)、 α -Bクリスタリン(CRYAB)、心筋Naチャンネル(SCN5A)、CSR3、TCAP、LIMタンパク(FHL2)、ラミニン α 4(LMNA4)、ミオパラジン(MYPN)、RNA結合モチーフタンパク20(RBM20)などの変異が、DCMの病因と成りうることが報告された。これらの遺伝子群をみると、DCMではHCM同様にさまざまな遺伝子異常により同一の病態を来しうること(病因の不均一性)、また同一遺伝子異常の変異部位により異なる病態を呈しうること(病態の不均一性)が分かる。DCMの原因遺伝子として当初発見されたものの多くが細胞骨格の整合性維持にか

かわるものであったことから、DCM の病態の主体は収縮力伝達機構の異常による細胞骨格病であると考えられていた。しかしながら、HCM と同様にさまざまな原因遺伝子が同定され、特にサルコメアタンパク異常も発見されたことから、HCM と DCM を原因遺伝子から区別することは困難である。

3. 不整脈源性右室心筋症 (ARVC)

ARVC は、右室優位の心拡大と心機能低下、右室起源の重症心室性不整脈を特徴とし、病理学的に右室自由壁における脂肪浸潤と心筋細胞の脱落ならびに線維化を認める心筋疾患である。家族歴を持つ症例は 30～50% と報告されているが、臨床症状や理学的所見が非特異的な所見にとどまることもあり、正確な数字は定かではない。本疾患の遺伝的多様性は顕著で、常染色体優性遺伝の原因遺伝子座として、14q24 (ARVC1)、1q42-q43 (ARVC2)、14q12-q22 (ARVC3)、2q32.1-q32.3 (ARVC4)、3q23 (ARVC5)、10q12-p14 (ARVC6)、10q22.3 (ARVC7)、6p24 (ARVC8)、12p11 (ARVC9)、18q12.1-q12.2 (ARVC10)、18q12.1 (ARVC11) が、常染色体劣性遺伝するものとして 17q21 が報告されている。このうち、原因遺伝子が同定されているものとして、ARVC1 はトランスフォーミング増殖因子 (TGF) β 3⁷⁾、ARVC2 はリアノジン受容体 (RyR2)⁸⁾、ARVC8 はデスモプラキン (DSP)⁹⁾、ARVC9 はプラコフィリン (PKP2)¹⁰⁾、ARVC10 はデスモグレイン 2 (DSG2)¹¹⁾、ARVC11 はデスコリン 2 (DSC2)¹²⁾ などがある。ARVC1 は、TGF β 3 活性が亢進する結果、心筋の線維化や脂肪変性が促進されることや細胞間接着因子の発現調節機構の障害が関与している可能性が示唆されている。デスモソーム関連遺伝子変異では、心筋細胞どうしの正常な結合が失われ、心筋の構造が脆弱化しさまざまな障害を引き起すと考えられている。ARVC の病変が右室優位である理由は明らかではないが、左室にも病変を有する症例が 75% という報告もあり、DCM と鑑別が困難な場合がある。本疾患は進行性の疾患であり、突然死の原因として重要であり、突然死の予防には植込み型除細動器が有効である。

致死性遺伝性不整脈

致死性遺伝性不整脈疾患は、心筋イオンチャネル、細胞膜タンパク、および受容体などをコードする遺伝子変異により機能障害を来し、致死性不整脈を発症して心臓突然死を来す疾患群であり、イオンチャネル病と言われている。家族性 QT 延長症候群 (LQTS) の原因遺伝子が同定されたのを皮切りに、Brugada 症候群、QT 短縮症候群 (SQTS)、カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT)、家族性心房細動 (AF)、先天性洞不全症候群などの原因遺伝子が明らかとなってきた。しかし、遺伝子変異が同定される割合は決して高くなく、今後のさらなる詳細な解析が期待される。

1. QT 延長症候群 (LQTS)

日常診療で最も頻繁に遭遇する遺伝性不整脈疾患である。心電図上における QT 間隔延長を特徴とする症候群であるが、表現型 (心電図所見) の発現には個人差があり、罹患者系員の約 25 ~ 50 % の QT 間隔は正常または境界域である。LQTS は活動電位の再分極過程の異常で、内向き電流である Na 電流や Ca 電流の増加および外向き電流である K 電流の減少による QT 間隔延長によって早期後脱分極をトリガーとして多形性心室頻拍 (torsade de pointes : TdP) を発症し、失神や突然死を来す。先天性 LQTS の遺伝形式としては、難聴を伴い常染色体劣性遺伝である Jervell and Lange-Nielsen 症候群と、難聴を伴わない常染色体優性遺伝である Romano-Ward 症候群の 2 つに分類される (表 2)。前者はまれで (先天性 LQTS の 1 % 以下) ほとんどが後者である。Romano-Ward 症候群は原因遺伝子の種類により現在 12 のサブタイプに分類されており、中でも LQT1, LQT2, LQT3 で全体の 90 % 以上を占める。これら LQT1 ~ 3 は、特に詳細に検討されており、サブタイプごとの患者指導や治療法が確立されており、サブタイプ分類が臨床上重要である。安静時の心電図波形、発作の状況やエピネフリンによる負荷検査により、ある程度遺伝子型を推測できるとされるが、境界領域や紛らわしい所見の場合は表現型だけで遺伝子型を断定するのは困難であり、遺伝子解析による確定診断が必要である。

表2 遺伝性不整脈原因遺伝子

サブタイプ	発症率 (一部遺伝子型中の率)	遺伝子	タンパク	タンパク機能	イオン電流
QT 延長症候群					
Romano-Ward 症候群					
1	42 ~ 54 %	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	α -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
2	35 ~ 45 %	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	α -subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 減少
3	1.7 ~ 8 %	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	α -subunit Na^+ channel	I_{NaL} 増加
4	<1 %	<i>ANK2</i>	ankyrin-B	adaptor protein	—
5	<1 %	<i>KCNE1</i>	minK	β -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
6	<1 %	<i>KCNE2</i>	MiRP1	β -subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 減少
7	Rare	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	α -subunit I_{K1} channel	I_{K1} 減少
8	Rare	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	α -subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca, L}$ 増加
9	Rare (1.9 % in one study)	<i>CAV3</i>	caveolin-3	component of caveolae (co-localizes with Nav1.5 at sarcolemma)	I_{NaL} 増加
10	<0.1 %	<i>SCN4B</i>	$\beta 4$	β -subunit Na^+ channel	I_{NaL} 増加
11	Rare (2 % in one study)	<i>AKAP9</i>	Yotiao	mediates I_{Ks} channel phosphorylation	I_{Ks} 増加 (β -アドレナリン刺激中)
12	Rare (2 % in one study)	<i>SNTA1</i>	$\alpha 1$ -syntrophin	regulates Na^+ channel function	I_{NaL} 増加
Jervell and Lange-Nielsen 症候群					
1	<1 %	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	α -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
2	<1 %	<i>KCNE1</i>	minK	β -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 減少
QT 短縮症候群					
1	Three families	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	α -subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 増加
2	Two case reports	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	α -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 増加
3	One family (two members)	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	α -subunit I_{K1} channel	I_{K1} 増加
Brugada 症候群					
1	10 ~ 30 %	<i>SCN5A</i>	Nav1.5	Na^+ channel (I_{Na})	I_{Na} 減少
2	Rare (one family)	<i>GPD1-L</i>	GPD1-L	regulates intracellular Nav1.5 trafficking	I_{Na} 減少
3	<8.5 %	<i>CACNA1C</i>	Cav1.2	α -subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca, L}$ 減少
4	<8.5 %	<i>CACNB2</i>	Cav β 2	β -subunit Ca^{2+} channel	$I_{Ca, L}$ 減少
5	<1 %	<i>SCN1B</i>	$\beta 1$	β -subunit Na^+ channel	I_{Na} 減少
6	<1 %	<i>KCNE3</i>	MiRP2	β -subunit $I_{to, fast}$ channel	$I_{to, fast}$ 増加
カテコラミン誘発性多形性心室頻拍					
1	60 ~ 70 %	<i>RYR2</i>		ryanodine 受容体	SR Ca^{2+} 放出
2	Rare (7 % in one study)	<i>CASQ2</i>		calsequestrin	SR Ca^{2+} 放出
家族性心房細動					
2	One family	<i>KCNQ1</i>	Kv7.1	α -subunit I_{Ks} channel	I_{Ks} 増加
4	Two families	<i>KCNE2</i>	MiRP1	β -subunit I_{Kr} channel (may modulate I_{Ks} channel)	I_{Ks} 増加
6	One family	<i>KCNJ2</i>	Kir2.1	α -subunit I_{K1} channel	I_{K1} 増加
7	One family	<i>KCNH2</i>	Kv11.1	α -subunit I_{Kr} channel	I_{Kr} 増加
8	One family	<i>GJA5</i>	connexin40		
9	Three families	<i>KCNA5</i>	Kv1.5	α -subunit I_{Kur} channel	I_{Kur} 増加

当初 LQTS は、活動電位再分極を担うイオンチャネル機能の異常でありこれらのチャネル遺伝子の異常が原因であると考えられたが、LQT4 のようにチャネル、トランスポーターや受容体などの膜タンパクを細胞膜に裏打ちするアンキリンBの遺伝子異常により膜タンパクの局在が障害され、2次的にチャネル機能が障害されることが示された。このように、チャネル遺伝子そのものに異常がない場合は従来の方法では変異遺伝子同定は困難であり、原因遺伝子同定率が高くない原因の1つと考えられる。

また、原因となる遺伝子変異が明らかな家系内でも、家族構成員の表現型や臨床病態は異なり、浸透率が低い場合がある。つまり、発端者は通常重症な表現型を呈することが多いが、同一家系内で同じ変異を有していながら、全く異常所見を呈さない非浸透患者が存在する(不完全浸透)。これらの同一家系内での不完全浸透には、年齢、性別、交感神経緊張などの環境因子に加えて、遺伝子多型の有無が修飾因子として関与する可能性がある。Na チャネル α サブユニットをコードする SCN5A の遺伝子多型である H558R は白人の約 30% に認められるが、LQT3 原因遺伝子である SCN5A のミスセンス変異 M1766L のチャネルトラフィック異常を正常化することが報告されている¹³⁾。

2. Brugada 症候群

Brugada 症候群は、特発性心室細動 (VF) のうち、12 誘導心電図の V1 から V2 の右側胸部誘導における特徴的な ST 上昇を呈する症候群である。VF の初回発作の平均年齢は 40 ~ 50 歳であり、男性に多く日本を含めたアジア地域に多いのが特徴である。我が国で古くから知られている“ポックリ病”の一部と考えられている。Brugada 症候群では、心室筋活動電位の第 1 相 (脱分極直後の一過性再分極) に流れる内向き電流の減少および外向き電流の増加によって活動電位プラトー電位 (Phase 2) の過分極が生じ、右室流出路の心外膜側で第 1 相を形成する一過性外向き電流が強く発現するために、心電図の右側胸部誘導 ST 上昇を呈する。また、心外膜での Phase 2 出現時期が遅延し、Phase 0 とは独立した活動電位を生じることによって (Phase 2 reentry)、極端に短い連結期の期外収縮が生じ VF を発症

する。Brugada 症候群は、原因遺伝子の種類により 6 つのサブタイプに分類されている。1998 年に Chen らが Brugada 症候群に SCN5A の loss of function 変異 (BS1) を発見した後¹⁴⁾、しばらく新たな原因遺伝子は同定されなかったが、2007 年に glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like (GPD1-L) 遺伝子変異 (BS2)¹⁵⁾ が、2008 年に Na チャネル β サブユニット遺伝子変異 (BS5)¹⁶⁾ の loss of function 変異が発見された。同時期に、QT 短縮を合併する家系で心筋 L 型 Ca チャネル $\alpha 1$ 変異 (BS3) および $\beta 2b$ サブユニット遺伝子変異 (BS4) の loss of function 変異¹⁷⁾ および KCNE3 変異による一過性外向き K チャネル (Ito) の gain of function 変異 (BS6)¹⁸⁾ が相次いで報告された。しかし、本症候群の遺伝子異常が発見される率は約 20% であり、さらに未知の遺伝子異常やその他の環境因子の関与が推測されている。

3. QT 短縮症候群 (SQTS)

心電図上 QT 間隔短縮 ($QTc < 360$ ms) を特徴とし VF を来す疾患である。活動電位再分極時の外向き電流増大と内向き電流減少により生じると考えられている。これまで、 I_{Kr} 、 I_{Ks} 、 I_{K1} 電流をコードする K チャネル遺伝子 KCNH2、KCNQ1、および KCNJ2 の gain of function 変異が同定されている¹⁹⁾。

4. カテコラミン誘発性多形性心室頻拍 (CPVT)

CPVT は、心臓に器質的異常を伴わず 10 歳前後で発症し、ストレスや運動によって誘発される多形性心室頻拍、2 方向性心室頻拍を特徴とする疾患である。また、30 歳までの死亡率が 30 ~ 35% と言われており、予後不良の遺伝性疾患である²⁰⁾。1999 年、Kontula らは常染色体性優性遺伝形式を示す 2 家系を報告し、2001 年、Priori らは 1q42-q43 に存在する心臓リアノジン受容体遺伝子 (RyR2) の変異が関与していることを明らかにした。さらに、同年 Lahat らは、常染色体劣性遺伝形式を示す CPVT 家系において calsequestrin 2 遺伝子変異を報告した。いずれも、心筋細胞内の筋小胞体からの Ca^{2+} リークを引き起し、遅延後脱分極を介して致死的不整脈を発症する。

5. 家族性心房細動 (AF)

AF は通常高齢者に発症し、多くは器質的心疾患や甲状腺機能異常