

3. 炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生

湯浅慎介, 福田恵一

胎仔骨格筋発生時においてG-CSF受容体が筋芽細胞に一過性に発現し、同様に成体骨格筋再生における筋芽細胞においてもG-CSF受容体が発現することを見出した。G-CSFの筋肉発生・再生に対する役割は、*in vitro*および*in vivo*における筋芽細胞の増殖促進作用であった。筋損傷後には炎症細胞の浸潤が顕著に認められ、炎症細胞あるいは炎症そのものが筋再生に関与しているかは不明であった。G-CSFは炎症部位において血液細胞から多く分泌されるサイトカインであり、損傷部位に浸潤した炎症細胞から分泌される。炎症細胞が作り出すニッチにおけるG-CSFにより、筋傷害後の局所の骨格筋再生が促され、創傷治癒に至ると考えられる。

はじめに

骨格筋細胞は全身の骨格に存在する筋肉を構成している細胞である。強い外傷や廃用症候群などの後天性筋傷害疾患や筋ジストロフィーをはじめとした先天性筋疾患は数多くあるが、骨格筋に再生能力があることから骨格筋再生療法開発の試みはあまりなされてこなかった。しかしながら骨格筋再生も完全ではなく、これらの疾患は生活の質を著しく落とし、さらには呼吸筋傷害などから死に至ることもあり骨格筋再生療法の開発が望まれている。

成体においては筋線維の周囲に衛星細胞と呼ばれる

[キーワード&略語]

骨格筋, ニッチ, 炎症細胞, 再生

bHLH: basic-helix-loop-helix

(塩基性ヘリックスループヘリックス)

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)

骨格筋幹細胞があり、筋肉修復・再生を担っている。成体における骨格筋幹細胞から成熟骨格筋細胞への分化を制御する分子機序は胎仔正常発生時の骨格筋細胞分化・成熟に類似していることが広く知られている。すなわち成体における骨格筋細胞の再生現象を解明し新規再生療法を開発するためには、胎仔期の骨格筋細胞発生を紐解いていくことが重要である。骨格筋発生はさまざまな転写因子群により、筋細胞の分化・成熟が時間空間的に精密に制御されている。胎生中期の体節において骨格筋幹細胞が同定されるようになり、それらはPax3やPax7を発現し、続いてbHLH型転写因子群MyoD, Myf5, MRF4, Myogeninが順次発現し筋肉細胞として分化・増殖・成熟し成体に存在する大きな筋肉を形成していく。このようなさまざまな転写因子群が順次発現し下流の骨格筋特異的遺伝子群の発現を調節し、骨格筋の幹細胞から増殖が活発な筋芽細胞そして成熟筋細胞へと分化していく。成体の骨格筋再生においては、さまざまな炎症細胞の浸潤があり、ま

Muscle regeneration at the inflammatory cell niche

Shinsuke Yuasa¹⁾²⁾/Keiichi Fukuda¹⁾: Department of Cardiology, Keio University School of Medicine¹⁾/Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine²⁾ (慶應義塾大学医学部循環器内科¹⁾/慶應義塾大学医学部総合医科学研究センター²⁾)

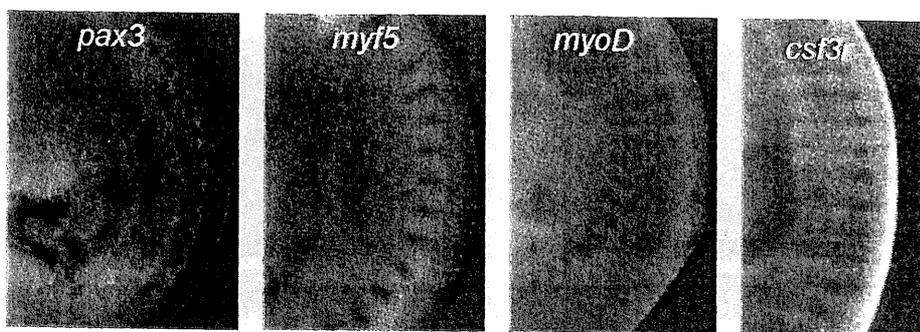


図1 マウス胎仔 (E9.5) を用いた whole mount *in situ* hybridization 法による骨格筋特異的遺伝子の発現パターン (巻頭カラー図7参照)

た再生骨格筋と非傷害正常骨格筋細胞が混在しており、詳細な解析が困難である。そこで骨格筋再生療法の開発のためには、胎生期の各分化段階にある骨格筋細胞に対して、どのような作用を有する物質が存在するかを発生学的見地から詳細に解析し、筋肉の増殖・分化促進因子の探索を行い、成体骨格筋再生へと応用していく必要があると考えた。

1 G-CSF 受容体のマウス胎仔における発現

骨格筋細胞と心筋細胞発生分化において特異的に発現するさまざまな遺伝子、中でも分泌因子と受容体に着目しスクリーニングを行った結果、マウス初期胚においてG-CSF (granulocyte-colony stimulating factor: 顆粒球コロニー刺激因子) の受容体が体節で強く発現していることが判明した^{1)~3)}。マウス胎仔胚におけるG-CSF受容体の発現を whole mount *in situ* hybridization 法により各種骨格筋マーカーの発現を比較したところ、骨格筋幹細胞のマーカーである pax3 とは発現部位が一致しないが、骨格筋幹細胞から分化直後の筋芽細胞などで発現する myf5 や myoD の発現部位と類似していることが判明した (図1: E9.5 マウス胎仔の whole mount *in situ* hybridization)。さらに詳細な発現部位を免疫染色により検討したところ、体節の中でも Pax3, Pax7 を発現する骨格筋として最も未分化な集団ではなく、それらのすぐ内側の細胞集団である MyoD を発現し始める筋芽細胞に特異的にG-CSF受容体が強く発現していることがわかった (図2: E10.5 マウス胎仔の切片を用いた免疫染色)。G-CSF受容体の発現時期と部位から、G-CSFは骨格

筋の幹細胞から分化直後の筋芽細胞において分化や増殖などの機能に強く関与している可能性が強く示唆された。

2 G-CSF は筋芽細胞の増殖因子である

G-CSFは白血球の増加作用や造血幹細胞の末梢への動員作用などの血球系への強い作用が知られているサイトカインであるが、骨格筋に対する作用は不明である。そこで *in vitro* において、骨格筋細胞に対してG-CSFがどのような作用があるかを検討することとした。マウス筋芽細胞の細胞株として知られているC2C12細胞は通常血清濃度の状況であれば増殖を続け未分化状態を維持するが、低血清濃度の状況では成熟骨格筋細胞へと分化することが知られている。C2C12細胞を低血清状態で培養すると、培養初期の未分化筋芽細胞においてG-CSF受容体が発現しており、培養後期に成熟骨格筋細胞へと分化した際にはG-CSF受容体の発現が消失することが確認された。さらにG-CSFを培養液中に添加することにより、G-CSF濃度依存性に未分化筋芽細胞の増殖が強く促されることが判明した。一方で培養液中にG-CSF受容体の中和抗体を添加しG-CSFシグナルをブロックするとC2C12細胞の増殖は抑制され、筋芽細胞の増殖にG-CSFは必須な因子であることが判明した。G-CSFは血球系細胞においてG-CSF受容体に結合し、さまざまな細胞内シグナルに刺激を伝えることが判明している。C2C12細胞の培養液中にG-CSFを添加すると、STAT3, AKT, ERK, JNK, p38などのサイトカイン受容体の下流にあると知られている細胞内シグナルが顕著に活性化されること

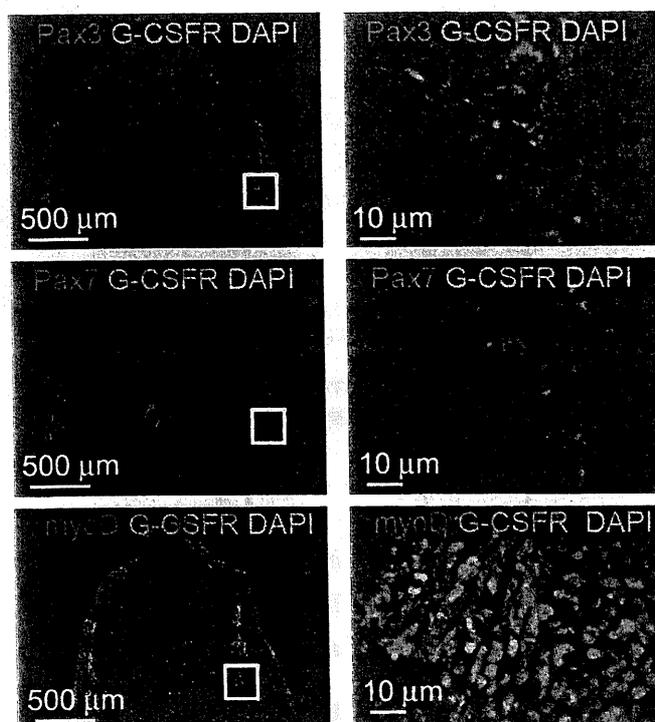


図2 マウス胎仔 (E10.5) 切片を用いた免疫染色法による骨格筋特異的遺伝子の発現パターン (巻頭カラー図8参照)

が判明した。すなわち G-CSF は筋芽細胞特異的に細胞内シグナルを活性化することができることを意味している。これらのことから G-CSF は筋芽細胞の直接的な強い増殖因子であることが判明した。

③ G-CSF 受容体は成体骨格筋再生時の筋芽細胞に発現している

さらに胎生期と同様に G-CSF 受容体の成体における発現の有無を検証することとした。胎生期での観察から G-CSF 受容体は成熟骨格筋細胞や最上流の骨格筋幹細胞では発現していず、骨格筋幹細胞が分化し始めて増殖能を保持している筋芽細胞でのみ発現が認められることが予想された。成体における筋肉細胞の再生能力は保たれているが、安静状態では筋肉の再生は起こっていない。静止期の骨格筋幹細胞が少数いるのみで筋芽細胞もほとんど認められない。しかしながらさまざまな原因で筋肉が傷害された後には、速やかに筋肉細胞の幹細胞である筋衛星細胞が分化・増殖し始め筋芽細胞を経て成熟骨格筋細胞へとなる。成体での骨格筋再生現象を検討するために骨格筋傷害モデルを作製することとした。コブラ蛇毒に由来するカルジオトキ

シンは骨格筋細胞を選択的に傷害する物質であり、筋肉傷害・再生に関する基礎研究でよく用いられている。カルジオトキシンを筋肉内注射することによりマウス成獣骨格筋傷害モデルを作製し (図3)、G-CSF 受容体の発現を観察した結果、再生途中の骨格筋細胞 (筋芽細胞) に特異的に G-CSF 受容体が強く発現していることが判明した (図4)。胎仔期での観察と同様に成熟骨格筋細胞では G-CSF 受容体は観察されなかった。また G-CSF 受容体の発現日は傷害後3日から7日の間に限局しており、筋傷害後の再生が活発な期間に限られていた。これより G-CSF 受容体は成体筋再生時の筋芽細胞に特異的に発現し、G-CSF が骨格筋再生に強く関与している可能性が示唆された。

④ G-CSF は骨格筋傷害後の再生を強く促す

G-CSF 受容体が筋芽細胞で発現しており、*in vitro* で筋芽細胞の増殖を強く促すことより、成体骨格筋再生時においても筋芽細胞を増殖させ再生を促進することが予想された。古くから知られていることだが、成体における骨格筋の再生は個々の筋肉細胞を観察することにより可能である。すなわち傷害を受けていない

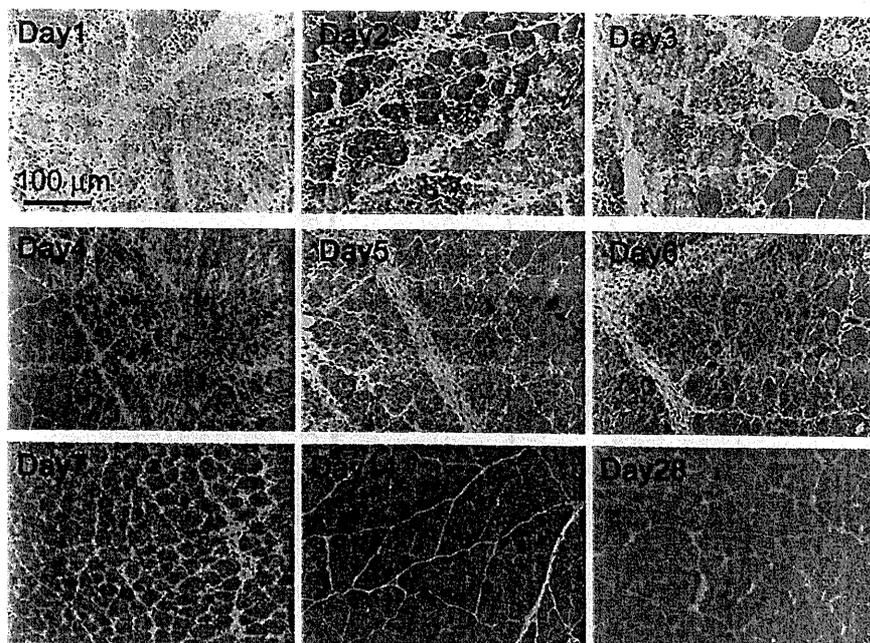


図3 カルジオトキシン投与後の下肢筋肉の変性と再生現象の経時的变化 (H & E 染色)
(巻頭カラー図9 参照)

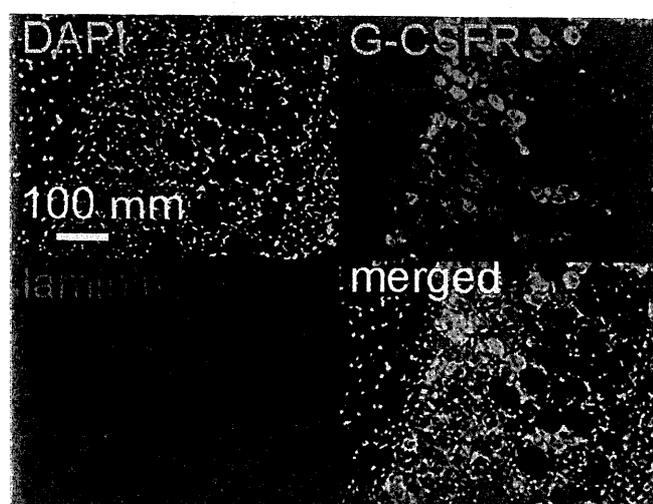


図4 カルジオトキシン投与5日後の下肢筋肉の再生骨格筋におけるG-CSFRの発現を
免疫染色により確認 (巻頭カラー図10 参照)

正常成熟骨格筋細胞は大型の細胞で辺縁に存在する核を有する。また再生骨格筋は、再生途中では小型で円形の細胞であり、その核は中心に存在する。また再生骨格筋が成熟し大型の細胞になった後も核は中心に存在し、はじめから傷害を受けていない骨格筋細胞との区別が可能である(図3)。カルジオトキシンを筋肉内に投与し骨格筋傷害モデルを作製し、G-CSFを投与することで筋再生におけるG-CSFの効果を検討すること

とした。その結果、G-CSF投与により、傷害部位において中心核を有する再生骨格筋細胞が顕著に増え(図5)、筋肉径が大きくなり、そして筋力が回復することが判明した。またG-CSFが骨格筋再生において必要な因子であるかを検討するために、G-CSFのシグナルが完全に欠損するG-CSF受容体欠損マウスを用いて同様の解析を行った。G-CSF受容体欠損マウスにおいては筋傷害後の骨格筋再生が大きく障害されることも判明

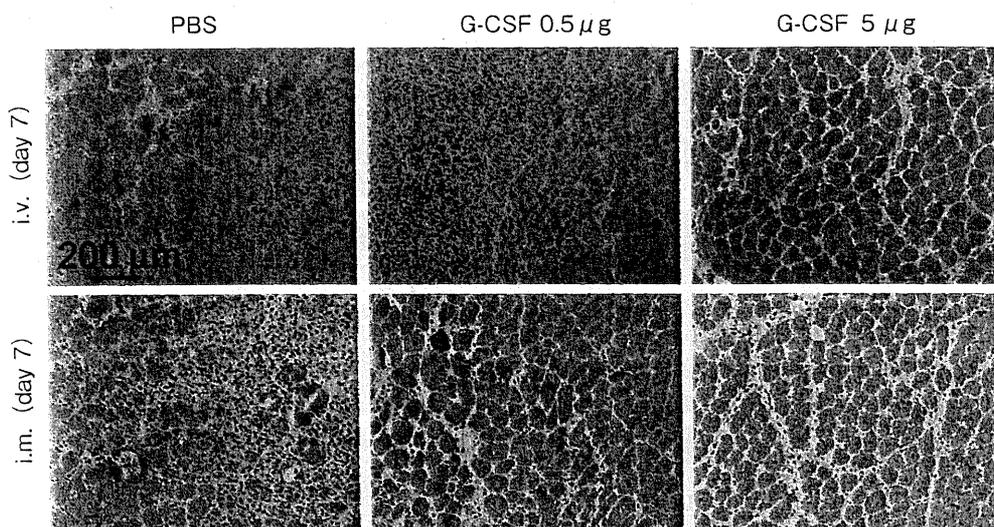


図5 カルジオトキシンによる骨格筋傷害後に、G-CSFを静脈投与(i.v.)と筋肉内投与(i.m.)することによる筋再生現象の組織学的観察(H & E染色)(巻頭カラー図11参照)

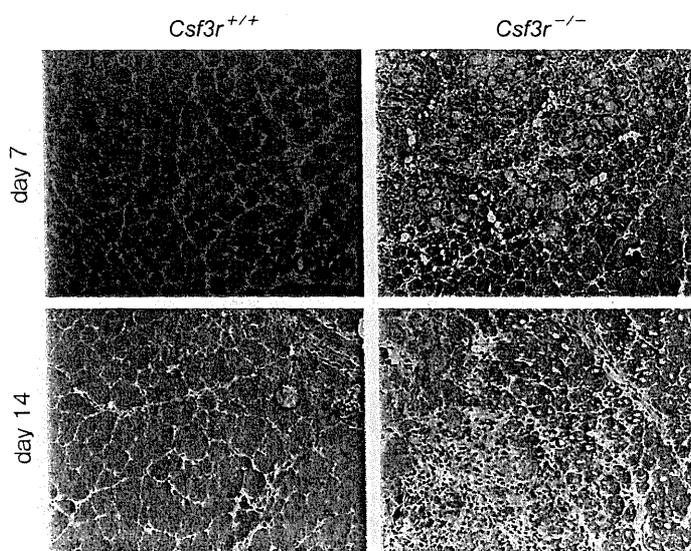


図6 G-CSFRノックアウトマウス(*csf3r*^{-/-})とコントロールにおけるカルジオトキシンによる骨格筋傷害後の再生現象の差異(巻頭カラー図12参照)

した(図6)。すなわち骨格筋傷害後の再生においてG-CSFが再生を強く促すと同時に、筋再生において必須な因子であることが判明した。

5 炎症細胞が作り出すニッチと筋肉再生

では骨格筋傷害後の再生筋芽細胞に発現しているG-CSF受容体に対するリガンドとしてのG-CSFはどこに由来するのであろうか？筋傷害後には筋線維膜の崩壊、筋細胞の壊死・変性が順次起こる。壊死筋肉細

胞から放出されるさまざまな物質により、炎症細胞を動員・活性化し、また活性化された炎症細胞からサイトカインが分泌されて相互反応が起こる。好中球が最初に傷害部位に到達し、続いてマクロファージが集積し変性筋線維を貪食する。また筋衛星細胞とマクロファージが相互作用し白血球遊走や炎症を増強させ、単球やマクロファージが筋衛星細胞の増殖や分化を促すことが知られている。さまざまな白血球はG-CSFを産生することが知られており、漠然と白血球を増やし

炎症を助長しているのではないかと考えられてきた。しかしながら筋傷害後の壊死筋線維の周辺に集族する炎症性白血球は炎症の惹起という機能の他に、直接的に筋芽細胞の増殖を経て筋再生を促している可能性が強く示唆される。すなわち筋傷害後に炎症性白血球が作り出す微小環境（ニッチ）において分泌されているG-CSFを筋芽細胞がG-CSF受容体を経て受け止めることにより、筋再生が促されていると考えられる。さらにこの作用を増強させるためにG-CSFを投与することにより、強い骨格筋再生の増強作用があることが判明した。

おわりに

本研究から、成体骨格筋における局所の炎症細胞が作り出すニッチによる組織の再生調節がなされていることが示唆された。同様にさまざまな臓器においても、局所の炎症細胞が作り出すニッチと組織再生が強く関与していることが想定される。骨格筋において

は局所でG-CSFが再生促進作用を有することを見出したが、各々の臓器における個々の炎症・再生に関する現象を明らかにし、それらをコントロールすることにより、炎症と再生という問題点を包括的に解決する方法が全身のあらゆる臓器で開発されていくと思われる。

文献

- 1) Yuasa, S. et al. : Nat. Biotech., 23 : 607-611, 2005
- 2) Yuasa, S. et al. : Circ. Res., 106 : 1083-1091, 2010
- 3) Shimoji, K. et al. : Cell Stem Cell, 6 : 227-237, 2010
- 4) Hara, M. et al. : J. Exp. Med., 208 : 715-727, 2011

<筆頭著者プロフィール>

湯浅慎介：1999年、慶應義塾大学医学部卒業。2005年、慶應義塾大学大学院医学研究科博士課程修了。慶應義塾大学医学部循環器内科助教を経て、'08年より慶應義塾大学医学部循環器内科／総合医科学研究センター特別研究講師となる。幹細胞医学の理解を深め、臨床応用のための基盤的な研究を進めていきたいと考えている。

