

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 27 日現在

機関番号：35311
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010 ～ 2012
 課題番号：22700704
 研究課題名（和文） 骨格筋由来の Gas6 は損傷筋におけるマクロファージのスイッチングを制御するか？
 研究課題名（英文） Effect of Skeletal Muscle-Driven Growth-Arrest Specific gene 6 on Phenotype Switching of Macrophages in Injured-Muscle in mice
 研究代表者
 椎葉 大輔（DAISUKE SHIVA）
 倉敷芸術科学大学・生命科学部／講師
 研究者番号：20515233

研究成果の概要（和文）：本研究では、損傷骨格筋における Gas6 発現とマクロファージ機能調節作用について検討した。その結果、カルディオトキシン誘発性損傷筋において、Gas6 発現亢進すること、Gas6 刺激によりマクロファージフェノタイプのスイッチングに影響することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study examined that the Gas6 expression and regulation of macrophages functions by Gas6 in injured-skeletal muscle. In the results, it observed that injured-skeletal muscle by Cardiotoxin-induction was increased Gas6 expression compared with control muscle. In addition, it observed that Gas6 stimulation regulate macrophages phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：運動免疫学

科研費の分科・細目：応用健康科学・スポーツ免疫学

キーワード：Gas6, マクロファージ, 骨格筋

1. 研究開始当初の背景

損傷した骨格筋の修復過程では、マクロファージによる免疫応答が必須である。骨格筋に常在するマクロファージは少数であるため、応答は損傷部位に浸潤した単球由来のマクロファージが主導する。損傷初期（損傷～48 時間）では炎症性マクロファージ（M1 細胞）による炎症反応と貪食が観察される。その後、中後期（～14 日）に抗炎症性マクロファージ（M2 細胞）がサテライト細胞を活性化させる。マクロファージは M1 細胞から M2 細胞へその表現型（フェノタイプ）をス

スイッチングすることで、双方の役割を担っていると考えられる。M1 細胞から M2 細胞へのスイッチングには、IL-4 や IL-10 などのサイトカインとともに死細胞（アポトーシス細胞）の貪食が重要であるとの指摘がある。先行研究では、in vitro 実験において IL-4 単独添加よりも IL-4 と死細胞を共添加した方が、M2 細胞へのスイッチングが亢進すると報告されている。このことから、死細胞の貪食に伴って、何らかのシグナルが M1 細胞内へ伝達されることで、M2 細胞へのスイッチングを促進していると考えられる。

Gas6 (Growth arrest-specific gene 6) は死細胞膜上のフォスファチジルセリン (PS) と、マクロファージ上の Gas6 受容体をブリッジすることで死細胞、特にアポトーシス細胞の貪食を亢進する作用を持つ貪食亢進因子である。興味深いことに、Gas6 の作用はこのブリッジだけではなく、Gas6 自身が受容体と結合することで炎症性サイトカイン産生パターンを変化させることが報告されている。このことから、死細胞を貪食することによって起こる M1 細胞から M2 細胞へのスイッチングに、Gas6 によるマクロファージへの作用が関与している可能性が考えられる。しかしながら骨格筋、特に損傷筋におけるマクロファージ機能調節因子としての Gas6 の働きについて検討した報告は見られない。

また Gas6 は細胞増殖停止時に特異的に発現するとして同定された遺伝子であることから、骨格筋組織修復時に増殖および分化するサテライト細胞において発現する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、損傷骨格筋の修復過程におけるマクロファージのフェノタイプスイッチングの制御について、骨格筋由来 Gas6 の関与を検討することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) サテライト細胞モデル株 C2C12 細胞における Gas6 産生およびその役割の検討

損傷した骨格筋の修復には、サテライト細胞の適切な増殖/分化/融合が必須である。また、細胞増殖停止時に特異的に発現する遺伝子である Gas6 が、サテライト細胞の増殖後分化時に発現する可能性が考えられた。そこで、サテライト細胞株である C2C12 細胞を用いて、分化過程における Gas6 および Gas6 受容体である Tyro3、Axl 発現について検討した。さらに、Gas6 中和タンパク質 (Gas6 受容体細胞外ドメイン) および Gas6 siRNA を用いて、Gas6 阻害が C2C12 細胞の分化に及ぼす影響について、検討した。

(2) マウスマクロファージ細胞株を用いた検討

M1 および M2 では、サイトカイン産生パターンが異なることが知られている。そこでマウスマクロファージ細胞株 RAW264 細胞を用いて、リコンビナント Gas6 刺激の有無による LPS 刺激性サイトカイン産生の変化について検討した。

(3) マウス薬理的骨格筋損傷モデルを用いた検討

損傷した骨格筋の修復過程における Gas6 の発現とその役割を評価するため、ヘビ毒の一種であるカルディオトキシン (CTX) を用いた薬理的筋損傷モデルを用いて、検討した。C57BL/6J マウスの前脛骨筋に CTX を投与し、筋損傷を誘発した。CTX 投与後、経時的に損傷筋を摘出し、Gas6 発現を測定した。また、損傷筋に対し Gas6 siRNA および Gas6 中和タンパク質 (Axl 細胞外ドメイン; Axl/Fc) を投与して Gas6 の働きを阻害する方法により、Gas6 の役割について評価した。

4. 研究成果

(1) C2C12 細胞における Gas6 発現とその役割の検討

分化誘導した C2C12 細胞では、分化の進行とともに Gas6 発現が増強した (図 1)。

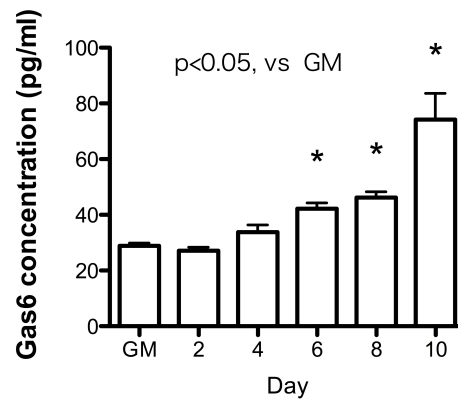


図1. 培養上清中Gas6濃度

一方で、Gas6 受容体である Tyro3 および Axl の発現は分化誘導 2 日目に増強され、8 日目をピークとして低下していく傾向が観察された (図 2)。

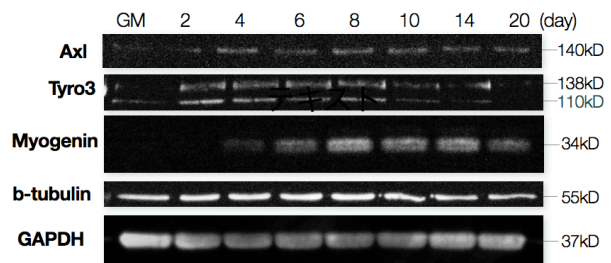


図2 C2C12細胞におけるTyro3Axl発現

また分化 C2C12 細胞培養液中に対し、Axl 細胞外ドメインを添加したところ、アポトーシ

スに關与する Caspase-3 の開裂が觀察された (図 3)。

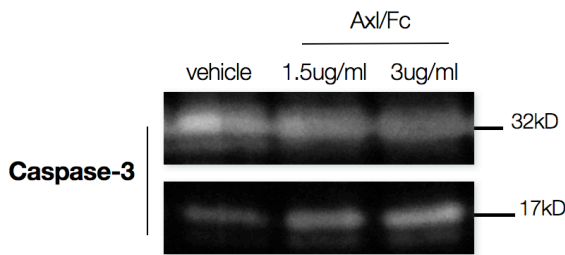


図3 分化誘導C2C12細胞に対するAxl/Fcの影響

さらに Gas6 siRNA 処理した C2C12 細胞では、LPS 刺激性の MCP-1 産生が亢進した。

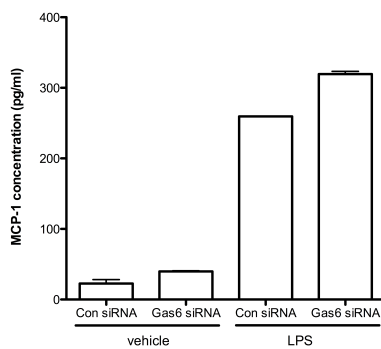


図4 分化C2C12細胞に対するGas6 siRNAによるLPS反応性の変化

以上の結果は、増殖を停止させ分化している C2C12 細胞が Gas6 を発現すること、発現した Gas6 はオートクリン作用により C2C12 細胞自身の生存、炎症に対する負の調節に寄与していることを示唆するものであった。

(2) Gas6 刺激によるマクロファージにおける LPS 反応性の変化

Gas6 刺激の有無が LPS 反応性に与える影響について検討した結果、Gas6 刺激群では無刺激群と比べ、細胞内 iNOS 発現が抑制される傾向が觀察された (図 5)。

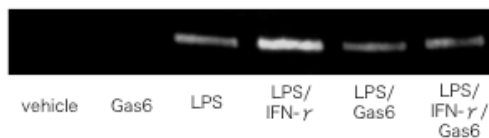


図5 Gas6刺激によるLPS刺激性細胞内iNOS発現の変化

一方、IL-10 発現は、Gas6 刺激により有意に

亢進した (図 6)。

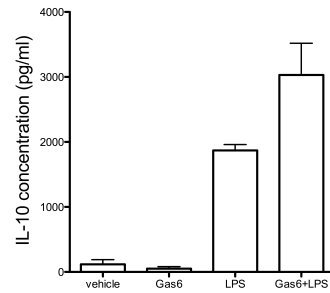


図6 Gas6刺激によるLPS刺激性IL-10産生の変化

iNOS は M1、IL-10 は M2 とそれぞれのマーカーとして知られていることから、この結果は Gas6 刺激がマクロファージのフェノタイプスイッチングに影響する可能性を示唆するものであった。

(3) CTX 筋損傷による Gas6 発現

CTX 投与による損傷筋を評価した結果、損傷筋において Gas6 発現が有意に亢進する結果が觀察された。Gas6 発現の亢進は、損傷後 3 日目および 5 日目に特に顕著であった。また、この発現は筋損傷後 10 日目には損傷前の水準に収束した。

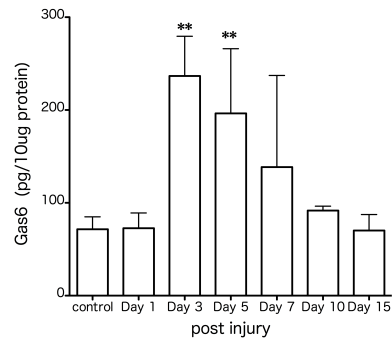


図7 CTX処置による前脛骨筋Gas6タンパク濃度の経時的变化 (**; p<0.01)

(4) CTX 筋損傷に対する Gas6 阻害の影響

CTX 損傷筋に対する Axl/Fc 投与による Gas6 阻害により、筋組織内の TUNEL 陽性細胞 (アポトーシス細胞) 数が増加する傾向が觀察された (図 8)。

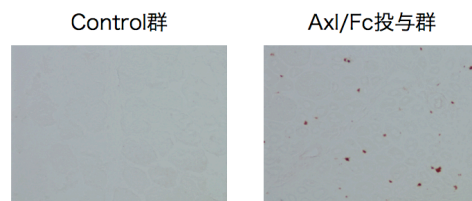


図8 損傷骨格筋に対するAxl/Fc投与の影響

さらに Gas6 siRNA 投与により、CD206 (M2 マーカー) 陽性細胞数が、減少する傾向が観察された。

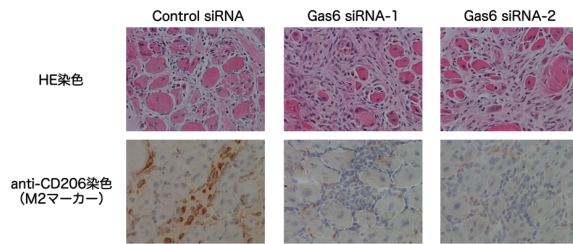


図9 損傷骨格筋に対するGas6 siRNAの影響

これらの結果は、損傷筋内で Gas6 の働きを阻害すると、アポトーシス細胞の食食が抑制され、さらに M1 から M2 へのスイッチングが阻害される可能性を示唆するものであった。

以上の結果から、損傷骨格筋で発現する Gas6 がマクロファージフェノタイプスイッチを制御することで骨格筋修復に貢献している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

(1) 加藤孝基、川西範明、高橋将記、椎葉大輔、大塚喜彦、今泉厚、鈴木克彦. クルクミン投与がカルディオトキシン誘導性筋損傷における炎症反応、酸化ストレスおよび炎症細胞浸潤に及ぼす影響、スポーツ科学研究、査読あり、9、29-40、2012

[学会発表] (計 7 件)

(1) 椎葉大輔、鈴木克彦、川上雅之. 損傷骨格筋における Gas6 発現の検討. 第 65 回日本体力医学会大会、2010 年 9 月 16-18 日、千葉

(2) 椎葉大輔、川西範明、高橋将記、鈴木克彦、川上雅之. カルディオトキシン誘導性損傷骨格筋における Gas6 発現に及ぼす RB6-8C5 抗体投与の影響. 第 66 回日本体力医学会大会中四国地方会、2010 年 11 月 20 日-21 日、徳島

(3) 椎葉大輔、川西範明、矢野博己、鈴木克彦、川上雅之. Gas6 前刺激がマウスマクロファージ表現型に及ぼす影響. 第 66 回日本体力医学会大会、2011 年 9 月 16 日-18 日、

山口

(4) 椎葉大輔、小塩隆之、田中翔、石塚圭佑、佐伯望、古本佳代、古川敏紀、矢野博己、川西範明、鈴木克彦、川上雅之. C2C12 細胞における Gas6 発現の検討. 第 68 回日本体力医学会大会中四国地方会、2011 年 11 月 12 日-13 日、島根

(5) 椎葉大輔、小塩隆之、田中翔、石塚圭佑、佐伯望、安達裕、古川敏紀、古本佳代、鈴木克彦、川上雅之. C2C12 細胞における Gas6 受容体発現の検討. 第 69 回日本体力医学会大会中四国地方会、2012 年 5 月 19 日-20 日、高知

(6) 椎葉大輔、川西範明、古本佳代、前田憲孝、古川敏紀、鈴木克彦、川上雅之. C2C12 細胞の分化過程における Gas6 認識について. 第 67 回日本体力医学会大会、2012 年 9 月 14 日-16 日、岐阜

(7) 椎葉大輔、川西範明、古川敏紀、古本佳代、前田憲孝、鈴木克彦、川上雅之. 分化 C2C12 細胞における Gas6 のオートクリン作用の検討. 第 70 回日本体力医学会大会中四国地方会、2012 年 11 月 24 日-25 日

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椎葉 大輔 (DAISUKE SHIVA)

倉敷芸術科学大学・生命科学部／講師

研究者番号：20515233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

矢野 博己 (Hiromi Yano)

川崎医療福祉大学・医療技術学部・准教授

研究者番号：20248272

鈴木 克彦 (Katsuhiko Suzuki)

早稲田大学・スポーツ科学学術院・准教授

研究者番号：80344597