

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 30日現在

機関番号：17102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658242
 研究課題名（和文） 筋肥大・再生における筋幹細胞とマクロファージのコミュニケーション
 研究課題名（英文） Molecular communication between myogenic stem cells and activated macrophages during muscle growth and regeneration
 研究代表者
 辰巳 隆一（TATSUMI RYUICHI）
 九州大学・大学院農学研究院・准教授
 研究者番号：40250493

研究成果の概要（和文）：

骨格筋の肥大・再生の際、炎症性マクロファージが筋損傷断片を貪食した後に、筋幹細胞（衛星細胞）が損傷部位へ移動し分化・融合する。本研究では、この時間差連動機構（分子コミュニケーション）を調べることを目的とし、炎症性マクロファージに遅れて浸潤する抗炎症性マクロファージが分泌する因子によって衛星細胞の走化性および分化・融合が調節されていることを明らかにした。成果は筋肥大・再生を促進する食肉生産技術の開発に資する他、筋医科学やスポーツ分野などに貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：

A variety of experimental approaches have revealed that acute muscle damage induces massive macrophage infiltration of the injury site, in which two polarized phenotypes, classically activated macrophages (also called proinflammatory phagocytotic macrophages, currently classified as M1) and alternatively activated macrophages (antiinflammatory macrophages or M2), have been well documented as distinct functional populations. The present study provided additional evidence that M2 macrophages may contribute to regenerative myogenesis by promoting myoblast migration (chemoattraction in a bell-shaped HGF-dose dependent manner) and differentiation (characterized by up-regulation of myogenin and myosin heavy chain expression), predominantly at 5-7 days after cardiotoxin/crush injury of mouse muscle. By understanding this spatiotemporal communication between M2s and myoblasts, we will be able to design new procedures that specifically target the regenerative strategy to ensure muscle growth and repair, contributing to the meat-animal production and human sports and health sciences aimed to enhance physical performance and medical therapies for age-related muscle atrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学（筋細胞分子生理学）

科研費の分科・細目：畜産学／獣医学・基礎獣医学／基礎畜産学

キーワード：骨格筋、筋幹細胞、マクロファージ、筋芽細胞、筋肥大・再生、細胞間コミュニケーション、肝細胞増殖因子 HGF、神経軸索成長ガイダンス因子 semaphorin 3A

1. 研究開始当初の背景

動物の成長や運動に伴う骨格筋の肥大・再生は、①筋肉の主体である筋細胞（細長い巨大な細胞なので“筋線維”と呼ばれる）の肥大・修復および筋線維型の決定、②筋線維に付着している運動神経のネットワーク（神経末端の筋線維への接着および神経軸索の空間配置）の再構築、③筋線維を取り巻く毛細血管の再配置、の3つの現象を基盤としている。①に関しては、筋線維に炎症反応が先ず起こることから、これに関与する免疫細胞がその後の筋線維の肥大・修復にも重要な役割を担っている可能性が考えられた。特に興味深い現象は、炎症性マクロファージ(M1)が筋損傷部位に誘引され損傷断片を食食した後に、増殖した衛星細胞が損傷部位へ集合し分化・融合することである(Bischoff 1994; Tidball & Villalta 2010)。この時間差運動機構により衛星細胞が食食されることなく効率的に筋線維を修復できると考えられるが、その機構は不明であった。また、筋肥大・再生の過程で、古典的炎症性マクロファージと代替的抗炎症性マクロファージ(M2)の2種の活性化マクロファージが浸潤することが知られていた。

2. 研究の目的

前述の時間差運動機構をブレイクスルーするため「衛星細胞とマクロファージの協調的コミュニケーション」を想起し、マクロファージが合成・分泌する因子により衛星細胞（活性化・増殖した筋芽細胞）の走化性や分化・融合活性が時系列的に制御されていると予想した。この作業仮説を検証するため、本研究では、1) 2種の活性化マクロファージが損傷筋に浸潤する時期、2) これらのマクロファージが合成・分泌する因子が筋芽細胞の走化性と分化活性に及ぼす影響を調べることを主な目的とした。研究成果は、筋肥大・再生を促進する食肉生産技術の創出に資する他、筋再生医科学・健康科学・スポーツ科学などにも貢献が期待された。

3. 研究の方法

(1)筋損傷モデル：麻酔下で、8-10週齢のC57BL/6成熟雄マウスの後肢下腿部筋である前脛骨筋に蛇毒 cardiotoxin (CTX; 10 μ M 溶液)を注入し、筋損傷・再生を誘導した(chemical-injury モデル)。また、同ヒフク筋を鉗子で5秒間挟むことで物理的損傷および再生を誘導した(crush-injury モデル)。(2)損傷筋における活性化マクロファージの蛍光免疫染色：損傷筋から経時的(0, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 28日目)に作製した凍結切片を、抗CD11b/抗CD86抗体および抗CD11b/抗

CD206抗体(Novus Biologicals社製NB110-89474とNBP1-41275、およびAbD Serotec社製MCA2235)で二重蛍光免疫染色し、M1とM2の活性化マクロファージの浸潤を可視化した。細胞核はDAPIでカウンター染色した。また、ヘマトキシリン・エオジン(HE)で染色し、筋損傷・再生の進行をモニターした。

(3)活性化マクロファージの調製および培養上澄の回収：Souzaら(1988)の方法に従い、マウスの腹腔から常在型マクロファージを回収した後(CD11b陽性細胞の割合から算出した純度は95%以上)、10 μ g/mlリポポリサッカライド(LPS;Sigma-Aldrich社製L4391)および10 ng/mlインターロイキン-4(IL-4;Sigma-Aldrich社製I1020)を含む10%正常ウマ血清-DMEM(10% HS-DMEM, pH 7.2)でそれぞれ24時間培養し、M1とM2の活性化マクロファージを誘導した。CD86およびCD206の抗体で蛍光染色し、それぞれの陽性細胞数の割合(活性化誘導効率)が90%以上の標品を実験に用いた。PBSで十分に洗浄した後、引き続きDMEMで3時間培養し培養上澄を回収した。また、ディッシュ上に残った細胞からRNAを回収し、後述のリアルタイムPCRにより標的遺伝子の発現を定量解析した。

(4)筋芽細胞の走化性アッセイ：Taherら(2002)の方法を参考に、Corning社製のTranswell Plate Systemを用いて、活性化マクロファージ培養上澄(conditioned medium)の走化性活性を評価した。即ち、インサートカップには10% HS-DMEMに懸濁したマウス筋芽細胞株C2C12を播種し、下層プレートには活性化マクロファージから回収した培養上澄を配置した。12時間培養した後、ポリカーボネイト膜(ポアサイズは8 μ m)を通過し裏面に移動した細胞の割合を走化性の指標とした。これらの実験条件は、筋芽細胞の走化性因子として知られる肝細胞増殖因子(HGF)を用いて至適化した(Fig. 2参照;パネルBに示したように、膜の裏面に移動した筋芽細胞をヘマトキシリンで染色し細胞数を計測した後、細胞総数に対する割合を求めた)。

(5)筋芽細胞の分化アッセイ：筋芽細胞C2C12を10%牛胎仔血清-DMEM(10% FBS-DMEM, pH 7.2)で24時間培養した後、先の活性化マクロファージ培養上澄を用いて72時間分化培養した(培養上澄と正常ウマ血清を混合し分化誘導培地2% HS-DMEMとした)。分化マーカーであるmyogenin, 総ミオシン重鎖(MyHC), および胚性ミオシン重鎖(eMyHC)の発現変化を調べた。解析には β -actinを内部標準としたリアルタイムPCR(TaqMan Probe法)およびECL-western blottingを用いた。

4. 研究成果

本研究により、M1とM2の活性化マクロファ

ージが時系列的に損傷筋に浸潤し、筋芽細胞の移動・分化・融合を調節していることを示す実験結果を得ることができた。研究成果を6件の国内学会などで発表した。研究成果を2篇の科学雑誌に投稿すべく準備作業を進めている。概要は以下の通りである。

(1) 活性化マクロファージの浸潤時期：

CTX の注入による筋損傷とその後の再生過程を免疫組織化学的手法により調べたところ、M1 マクロファージは筋損傷後 1 日目 (day-1) で浸潤が認められ、day-3 にピークを迎えた後急速に減少することが観察された (Fig. 1 パネル B 参照)。これに対して、M2 マクロファージの浸潤は遅れて day-5 (細胞分化初期) でピークとなり、day-14 にはほぼ消失することがわかった (Fig. 1 パネル C 参照)。鉗子による圧迫損傷の場合も同様の結果が得られたことから、損傷筋においては、M1 の早期浸潤に遅れ M2 が浸潤することが明確になった。また、M2 の浸潤時期が細胞分化初期にあたることは、筋組織から単離した筋芽細胞の myogenin mRNA 発現の上昇から確認された。

2) 活性化マクロファージの合成・分泌因子による筋芽細胞の遊走と分化の制御：

M2 マクロファージを培養して得られた培養上澄を用いて筋芽細胞を培養すると、走化性が促進されることが分かった (Fig. 3)。即ち、培養上澄の希釈・濃縮倍率に対してベル型のレスポンスを示し、これは Fig. 2 に示した「筋芽細胞の走化性の HGF 濃度依存性 (5-10 ng/ml で効果が最大となるベル型曲線)」と一致した。また、培養上澄に肝細胞増殖因子 (HGF) の中和抗体 (R&D Systems 社製 AB-294-NA) を添加すると走化性が完全に阻害され、また、リアルタイム PCR 解析および培養上澄の western blotting により HGF のシグナルが明瞭に検出された。筋芽細胞の遊走因子として知られるトランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β 3 の発現は認められず、その中和抗体の添加も走化性には有意な効果はなかった。これらの結果より、M2 が合成・分泌する HGF によって筋芽細胞の走化性が制御されていることが明らかになった。一方、筋芽細胞の分化に対しても、M2 マクロファージの培養上澄は myogenin および MyHC の発現を有意に増加させたことから、M2 は細胞分化の調節に関与していることがわかった (Fig. 4)。M1 マクロファージの培養上澄には、これらの活性はいずれも認められなかった。更には、M2 マクロファージの培養上澄により、筋芽細胞における semaphorin 3A (神経軸索成長ガイダンス因子) の合成・分泌も HGF 依存的に増加することを示唆するデータを得た。

これらの実験結果により、M2 マクロファ-

ージは筋芽細胞の移動・分化・融合を促進し筋線維の肥大・再生に寄与していること、また、細胞分化初期に Sema3A 発現を促すことで運動神経末端の接着 (神経支配の回復) の制御にも能動的に関与していることが示唆された。従って、本研究により、活性化マクロファージと筋芽細胞の細胞間コミュニケーションの分子基盤の一部が明らかになった (Fig. 5 の制御モデルを参照)。

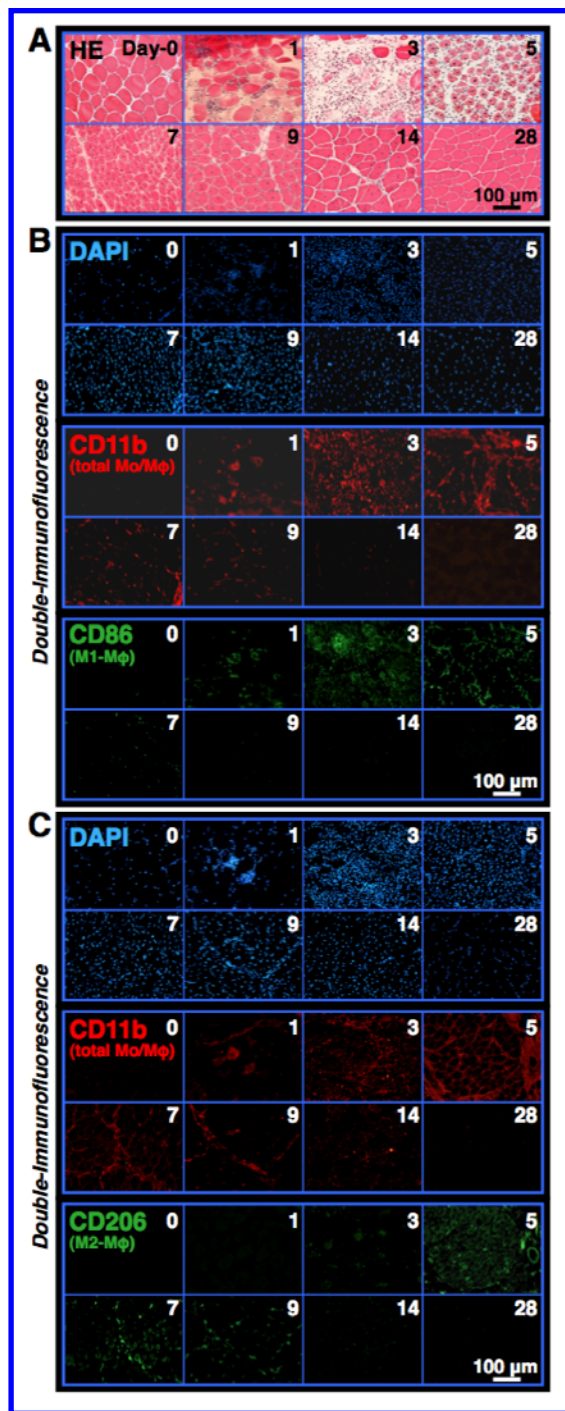


Fig. 1 筋損傷・再生に伴う活性化マクロファージ (M1, M2) の浸潤

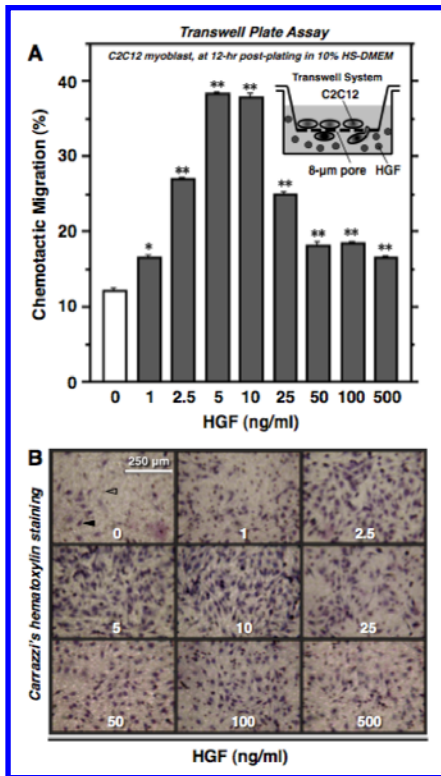


Fig. 2 HGFによる筋芽細胞の遊走性 (実験条件の至適化) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 白色バー)

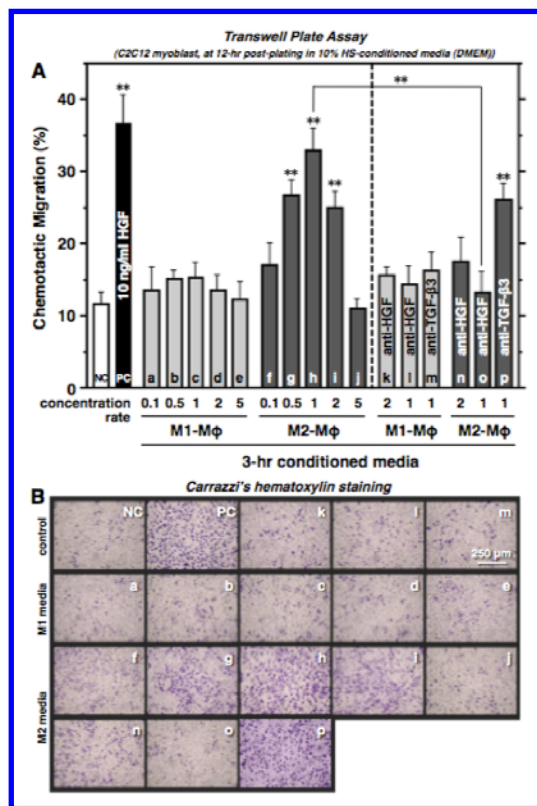


Fig. 3 活性化マクロファージの培養上澄による筋芽細胞の遊走性とHGF依存性 (** $p < 0.01$ vs. 白色バー-NC)

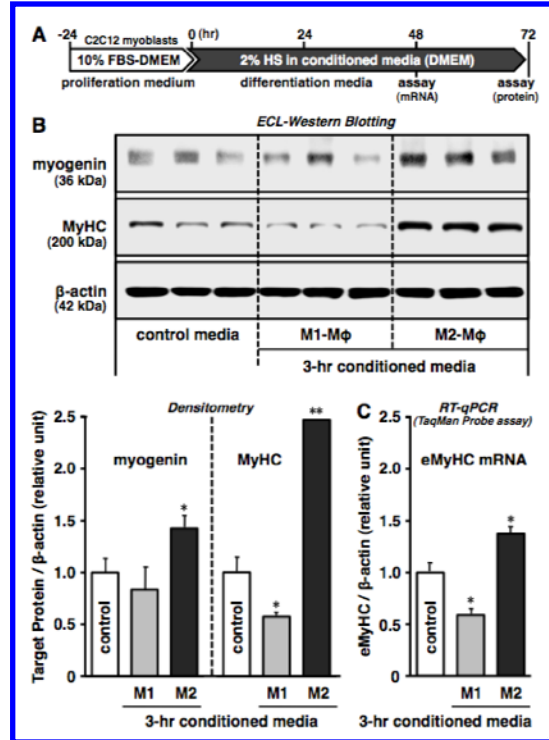


Fig. 4 活性化マクロファージの培養上澄による筋芽細胞の分化制御 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 白色バー)

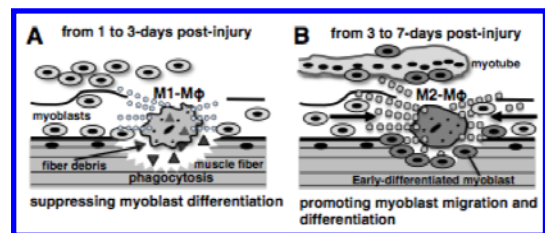


Fig. 5 筋肥大・再生における活性化マクロファージと筋芽細胞のコミュニケーションモデル

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)

[学会発表] (計 6件)

招待講演 4件

① 辰巳隆一

筋肥大・再生における筋幹細胞・運動神経末端・マクロファージのクロストークダイナミクス (仮題), 平成25年度日本栄養・食糧学会北海道支部会シンポジウム「組織の機能を支える細胞間クロストーク」(2013年10月26日に講演予定, 北海道大学大学院農学研究院, 北海道札幌市)

- ② 辰巳隆一
筋幹細胞による筋再生制御ダイナミクス，
第245回川崎医学会講演会（2012年12月12日，川崎医科大学図書館小講堂，倉敷市）
- ③ 辰巳隆一
筋幹細胞・運動神経軸索・活性化マクロファージのクロストーク，北大食肉科学セミナー「骨格筋における異種細胞間コミュニケーションに関する研究展開」（2012年5月11日，北海道大学大学院農学研究院，北海道札幌市）
- ④ 辰巳隆一
筋肥大・再生における筋幹細胞・運動神経末端・マクロファージのコミュニケーションに関する研究展開，農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所セミナー（2012年 3月 1日，畜産草地研究所，茨城県つくば市）

国内学会 2件

- ① 坂口昇平・生野淳一・水野谷航・中村真子・辰巳隆一・池内義秀
活性化マクロファージは筋芽細胞の遊走性の調節に関与する，第116回日本畜産学会大会（2013年 3月27-30日，安田女子大学，広島市），口頭発表（畜産物利用）
- ② 生野淳一・坂口昇平・佐藤祐介・水野谷航・中村真子・辰巳隆一・池内義秀
活性化マクロファージは骨格筋再生に関与する，第114回日本畜産学会大会（2011年8月26-27日，北里大学獣医学部十和田キャンパス），口頭発表（優秀発表賞応募演題）

[その他]

ホームページ等

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K000315/research.html> および

http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/muscle_and_meat/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰巳 隆一 (TATSUMI RYUICHI)
九州大学・大学院農学研究院・准教授
研究者番号：40250493

(2) 研究分担者

水野谷 航 (MIZUNOYA WATARU)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号：20404056

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

JUDY E. ANDERSON

加国マニトバ大学・理学部・教授