

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：31302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350897

研究課題名(和文)免疫制御受容体による骨格筋制御の研究

研究課題名(英文) Study of skeletal muscle regeneration regulatory mechanisms by immunoregulatory receptors.

研究代表者

坂本 譲 (Sakamoto, Yuzuru)

東北学院大学・教養学部・准教授

研究者番号：30316434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨格筋損傷に伴う炎症反応および骨格筋の損傷修復・再生過程における免疫制御受容体を介した制御機構について検討するため、薬理的筋損傷モデルを用いて解析を行った。その結果、損傷筋の修復再生過程においてF4/80陽性細胞における活性化受容体シグナルがケモカインレセプターの発現および損傷部位への浸潤を制御するとともにF4/80陽性細胞のM1/M2分化を制御していることを見いだした。よって、骨格筋の損傷修復・再生過程への活性化免疫制御受容体の関与の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we considered the controlling mechanisms through the immunoregulatory receptors of an inflammatory response with skeletal muscle injury and regeneration process using cardiotoxin-induced skeletal muscle injury model. As a result, it was indicated that activation receptor signal molecules regulate the infiltration of F4/80 positive cells into the damaged area in lesion repair and regenerative process of the injured skeletal muscle. In addition, it was show that this activation signal regulates the gene expression of some chemokine receptors in F4/80 positive cells. Moreover, it was indicated that these activation receptor signal molecules also participate in M1/M2 differentiation of F4/80 positive cells. Therefore, a possibility suggested that activating immunoregulatory receptors are involved in the lesion repair and regenerative process of the injured skeletal muscle.

研究分野：スポーツ免疫学

キーワード：骨格筋 再生制御 炎症 免疫制御受容体 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

骨格筋は身体活動を行う際の主要な器官であり、運動や外傷などによる損傷に対しては速やかな修復再生が行われるが、加齢や先天性・後天性疾患等による修復再生不良により身体活動は制限され、また quality of life (QOL)の低下は著しい。よって骨格筋の制御機構を理解することは単に身体活動の維持だけでなく生涯にわたる QOL の維持に重要であると考えられる。

骨格筋の損傷修復・再生過程のメカニズムについては近年多くの知見が報告されてきており (Tidball JG, 2010) 骨格筋幹細胞である筋衛星細胞、炎症細胞である好中球や単球・マクロファージ、これら細胞から分泌されるサイトカインやケモカインなど多種の細胞や液性因子が筋損傷部位において統合的協調的に関与した事象であるが、その全容についてはいまだ不明な点が多い。

一方、アレルギーや自己免疫疾患、炎症応答などの免疫応答については、免疫グロブリン様受容体 (Paired immunoglobulin-like receptor: PIR) や Fc 受容体などのように活性化型および抑制型を免疫細胞上に同時に発現するペア型の免疫制御受容体の協働により制御されることがこれまでに報告されていることから、骨格筋においても損傷修復・再生過程や恒常性の維持は、骨格筋細胞、筋衛星細胞そして炎症細胞の相互作用とこれら細胞の活性化型および抑制型受容体や関連分子群を介したシグナルバランスにより精密に制御されている可能性が考えられる。

そこで免疫制御受容体の骨格筋損傷修復・再生過程への関与の可能性を検証するため、活性化型 (FcR γ 、DAP12) および抑制型 (PIR-B) の免疫制御受容体遺伝子欠損マウスを用いて蛇毒 Cardiotoxin (CTx) による薬理的な骨格筋損傷に対する修復・再生の予備検討を行ったところ、特に活性化型受容体欠損マウスにおいて骨格筋の損傷修復・再生過

程に異常を示す結果を得た。

2. 研究の目的

予備検討の結果をもとに、本研究はこれらの活性化型の免疫制御受容体 (FcR γ 、DAP12) に着目し、骨格筋損傷に伴う炎症応答及び骨格筋の損傷修復・再生過程における免疫制御受容体を介した制御機構について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は骨格筋損傷に伴う炎症応答及び骨格筋の損傷修復・再生過程における免疫制御受容体の機能及び制御機構について検討するため活性化型免疫受容体のアダプター分子であり細胞質領域に免疫受容体活性化チロシンモチーフ (ITAM) を有する FcR γ および DAP12 (DNAX-activating protein of 12 kD) の遺伝子欠損マウスを用いて以下の検討を行った。

- (1). 損傷筋の修復・再生過程への免疫制御受容体の直接的な関与を *in vivo* において検証するために FcR γ 欠損、DAP12欠損、FcR γ /DAP12二重欠損マウスを用いての薬理的筋損傷後の筋再生過程の検証。
- (2). 骨格筋細胞、筋衛星細胞、浸潤炎症細胞における受容体の遺伝子及びタンパク、液性因子の発現確認、また再生過程における分子機序の検証。
- (3). 骨格筋細胞、筋衛星細胞と浸潤衛星細胞との相互作用および相互作用における細胞活性化制御の分子機序の解析。

そしてこれらの検討結果より免疫制御受容体が関与する骨格筋細胞、筋衛星細胞、炎症細胞の制御機構と骨格筋の損傷修復・再生過程における制御機構について包括的に検証した。

4. 研究成果

- (1). 予備検討の結果より骨格筋再生に異常を

示した FcR γ 欠損マウス、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスの下腿三頭筋に蛇毒 Cardiotoxin (CTx) 投与による薬理的な急性の筋損傷を誘発し、損傷後の骨格筋修復・再生の状況を HE 染色および筋修復マーカーの免疫染色にて評価した。その結果、野生型マウスと比較して DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスで CTx による急性筋損傷後の筋再生に遅延が観察された。

(2). 観察された再生遅延の原因を検討するために、CTx による筋損傷後、損傷部位への浸潤細胞の観察をおこなったところ、再生遅延の見られた DAP12 欠損マウスおよび二重欠損マウスでは野生型と比較して損傷部位に局在するマクロファージ細胞数の経時変化に差異が観察された。また、それら細胞の M1/M2 マクロファージの極性に変化が見られた。さらに、筋衛星細胞の細胞数については損傷前には野生型と DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスでは差異は認められないが、筋損傷後、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスで筋衛星細胞の細胞数が顕著に減少していた。よって、筋損傷後のマクロファージの浸潤および筋衛星細胞数の変化がこの骨格筋再生遅延の原因となっている可能性が示唆された。

(3). これまでに観察された損傷筋の再生遅延の原因について検討するため、CTx による筋損傷後、損傷部位に局在する F4/80 陽性細胞に注目し FACS を用いて CTx 投与後の F4/80 陽性細胞の経時的観察を行った。その結果、損傷筋の再生遅延の見られた DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスでは、損傷筋に動員される F4/80 陽性細胞の細胞数のピークが野生型のそれと比較して遅延していた。また、F4/80 陽性細胞の M1/M2 極性については、FcR γ 欠損マウスでは M1/M2 細

胞の割合は共に野生型と同様の経時変化を示したのに対して、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスでは、M1、M2 どちらの細胞タイプも同時点での細胞数は約 1/2~1/3 程度であることが観察された。

(4). 筋損傷後の骨格筋における損傷修復・再生関連遺伝子の発現の変化を qPCR により検討した。その結果、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスにおける IL-6、IL-1 β 、TNF- α の遺伝子発現は、CTx 投与 1~3 日後では野生型での発現よりも低値を示しているが、CTx 投与 7~14 日後では野生型と比較して 5 倍程度高値を示しており、筋損傷後の修復遅延の状況と一致する結果であった。また、これらの結果から損傷筋の再生遅延の原因として F4/80 細胞の局在異常及び M1/M2 タイプへの分化・増殖異常の可能性が示唆され、骨格筋損傷に伴う炎症応答及び骨格筋の損傷修復・再生過程への活性化型免疫受容体、特に DAP12 を介した活性化シグナル関与の可能性が示唆される。

(5). これまでに CTx による薬理的筋損傷モデルを用いて骨格筋の損傷修復・再生過程への ITAM 含有アダプター分子 FcR γ および DAP12 の関与について検討を行ったところ、FcR γ 欠損マウス、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスにおいて損傷筋の再生遅延が観察された。そこで CTx による筋損傷後の損傷筋における炎症関連遺伝子の発現と損傷筋に浸潤する細胞の状況について観察したところ、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスでは炎症関連遺伝子の発現が損傷筋の修復再生過程の後期に発現上昇しており、野生型と比較して遺伝子発現が遅延している状態であった。さらに F4/80 陽性細胞の損傷部位への浸潤および M1/M2 極性にも差異が生じており、特に FcR γ /DAP12 二重欠損マウスにおいて F4/80

陽性細胞および M1 サブセット細胞数の顕著な減少が認められた。そこで、これまでの結果をもとに F4/80 陽性細胞の炎症応答や M1/M2 分化への FcR γ および DAP12 の関与の詳細について検討するため、野生型及び FcR γ 欠損マウス、DAP12 欠損マウス、FcR γ /DAP12 二重欠損マウス由来の骨髄細胞より培養マクロファージを誘導し、LPS 刺激後の炎症応答および M1/M2 関連遺伝子の発現を qPCR により検討した。その結果、DAP12 欠損マウスおよび FcR γ /DAP12 二重欠損マウスにおいて LPS 刺激後の炎症性サイトカイン (IL-6、IL-1 β 、TNF- α) および M1 マーカー (iNOS、IL-12) の遺伝子発現は野生型と比較して増加傾向を示し、M2 マーカー (Arg-1) の発現は野生型と比較して低下傾向を示した。またケモカインレセプター (CCR2、CCR7) の発現は安静時および LPS 刺激後に顕著な差異が観察された。

(6). これらの結果をまとめると、今回検討した損傷筋の再生遅延の原因としては、筋損傷後の F4/80 陽性細胞におけるケモカインレセプターの発現プロファイルの変化が損傷部位への浸潤遅延および局在異常を引き起こし、さらに浸潤細胞の過剰活性化および M1 タイプへの偏向が引き起こされることで損傷筋の修復・再生遅延を引き起こしている可能性が示唆される。よって、FcR γ や DAP12 を介した活性化シグナルが骨格筋の損傷修復再生過程で生じる細胞の炎症応答を制御し、その結果として適切な細胞応答が起こり損傷筋の修復再生へと繋がっていく可能性が示唆される。

(引用文献)

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):R1173-87.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計3件)

坂本 譲. 骨格筋修復における免疫制御受容体の役割. 第11回日本運動免疫学研究会 (2016.9.23) (岩手)

坂本 譲, 飛内章子, 遠藤章太, 高井俊行. 骨格筋制御機構への免疫制御受容体の関与. 第69回日本体力医学会(2014.9.19-21) (長崎)

坂本 譲. 非リンパ組織における免疫制御受容体の働き. 日本運動免疫学研究会スプリングセミナー2014 (2014.3.17-18) (岡山)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 譲 (SAKAMOTO, Yuzuru)
東北学院大学・教養学部・准教授
研究者番号: 30316434

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

飛内 章子 (TOBINAI, Akiko)
東北大学加齢医学研究所