



Title	骨格筋の再生過程を制御する浸潤マクロファージの役割
Author(s)	瀬川, 将司
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47227
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 瀬 川 将 司

博士の専攻分野の名称 博 士 (薬 学)

学 位 記 番 号 第 2 1 1 0 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

薬学研究科応用医療薬科学専攻

学 位 論 文 名 骨格筋の再生過程を制御する浸潤マクロファージの役割

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 山 元 弘

(副査)

教 授 八 木 清 仁 教 授 前 田 正 知 教 授 土 井 健 史

論 文 内 容 の 要 旨

生体を形づくる骨格筋は高度な再生能力を保持した臓器であり、その巧みな修復機構により生体の恒常性を維持している。骨格筋が傷害を受けると、それと共に炎症性細胞の浸潤が観察される。そこでまず始めに傷害筋組織から単核細胞を調製し、フローサイトメーターで解析した。その結果、顆粒球は傷害後 1 日目で浸潤がピークになり、傷害後 3 日目には、その浸潤はほとんど消失していることが分かった。一方、マクロファージは顆粒球と入れ替わるように浸潤し、そのピークは再生過程の中期に見られ、その後も、再生過程を通じて組織内に存在していることが確認できた。さらに、筋再生に必須である筋衛星細胞は傷害後 3 日目、つまりマクロファージが数多く存在する時期に増殖のピークが観察された。以上のように骨格筋の再生は秩序だった細胞応答の組み合わせによって成り立っていることが分かった。現在、筋再生が円滑に進むための重要な役割を担っている細胞として傷害筋組織に浸潤するマクロファージに注目が集まっている。そこで今回、骨格筋の再生過程におけるマクロファージの役割を解析するため、傷害筋組織内でマクロファージの浸潤が抑制されるモデルマウスの作製を試みた。ここで注目した分子はマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 受容体である。M-CSF はマクロファージや単球の分化・増殖に関わるサイトカインであり、その分子シグナルはチロシンキナーゼ型受容体である M-CSF 受容体を介して細胞内に伝えられる。そこで、この受容体に結合して、その機能を阻害する抗 M-CSF 受容体抗体 (AFS98 抗体) をマウスに投与し、その傷害筋組織をフローサイトメーターにより経時的に解析した。その結果、顆粒球は再生過程を通じてコントロール群と同じ浸潤パターンを示し、マクロファージはコントロール群で浸潤のピークが見られる傷害後 3～7 日目において、その浸潤が 80～90%抑制されていることが分かった。以上のように AFS98 抗体を投与することで、筋再生の中期に浸潤するマクロファージのみを抑制することに成功し、これによりマクロファージの存在しない環境下での筋再生過程を観察することが可能になった。組織化学的解析により、傷害後 4 日目の筋組織においてコントロール群では中心核を持つ再生途中の筋線維が観察されるのに対して、抗体投与群ではそのような再生筋線維を観察することができず筋再生が起っていないことが分かった。さらにフローサイトメーターを用いた経時的解析により、抗体投与群の再生筋組織内では筋衛星細胞の増殖と融合過程に遅れが見られた。またマッソントリクローム染色により、抗体投与群の筋組織内には膠原線維が広範囲にわたって存在していることも分かり、筋線維の周囲に存在する隙間には 1 型コラーゲンが過剰に蓄積することが分かった。さらにリアルタイム RT-PCR 法による解析により、抗体投与群の傷害後 7 日目の筋組織内で 1 型コラーゲン mRNA の顕著な発現増強が確認できた。また、抗体投与群の傷害筋組織内で TGF- β 3 mRNA

の発現が顕著に増加していることも分かった。さらに CTGF (connective tissue growth factor) mRNA に関しては、調べた全ての時間においてコントロール群よりも発現が増加していることが明らかとなった。このように筋組織内で CTGF が持続的に発現していることは、TGF- β の細胞内シグナルが持続的に増強されていることを意味しており、これによって細胞外マトリックスの過剰な産生が起こったと考えられる。また、筋衛星細胞を用いた増殖アッセイの結果、TGF- β 3 により増殖が抑えられることが分かり、さらに融合過程に対しても強い抑制効果があることが分かった。一方、TGF- β 1、2 に関しては、融合過程にわずかな抑制効果が見られるものの、増殖に対してはほとんど影響を与えなかった。このことは AFS98 投与マウスの傷害筋組織で観察された筋形成不全の一因が TGF- β 3 にあることを示唆する。次に AFS98 抗体投与群の筋組織で線維化を引き起こした細胞の同定を試みた。傷害筋組織における線維芽細胞の動態を解析するため CD90 (Thy-1) に注目し、この Thy-1 を指標にすることで筋再生過程における線維芽細胞の経時的な変化を解析することに成功した。Thy-1 陽性細胞は傷害後 3 日目に増殖のピークをむかえ、その後、筋再生が進むとともにその数が減少することが明らかとなった。この結果は Thy-1 陽性細胞も筋再生過程に参加する細胞であることを示唆している。しかし、マクロファージの浸潤が抑制された傷害筋組織で細胞数が増加していることから、線維芽細胞が線維化の発症に深く関わっていることが示された。また、傷害筋組織から分取した Thy-1 陽性細胞は TGF- β により増殖の促進や 1 型コラーゲン mRNA の発現の誘導がみられた。さらに線維芽細胞が筋線維芽細胞 (myofibroblast) に分化することで発現する α -SMA の発現も増強したことから、線維芽細胞の集団であることが証明できた。そこで最後に、線維化が生じた筋組織内において、この Thy-1 陽性細胞が TGF- β や CTGF、および 1 型コラーゲンを高発現しているかについて調べた。その結果、傷害後 7 日目の筋組織から分取した Thy-1 陽性細胞において TGF- β 3、CTGF、1 型コラーゲン mRNA の発現量が増加していることが示された。以上のことから、線維化の原因となるサイトカインや細胞外マトリックスを産生する細胞は、この Thy-1 陽性細胞であることが明らかとなった。本研究により、骨格筋の再生過程にはマクロファージの浸潤が必須であることが示され、また、骨格筋に存在する線維芽細胞が筋再生に参加している可能性を見いだすことができた。さらに、マクロファージが存在しない環境下では、線維芽細胞の遺伝子発現機構に異常がおこり、組織内で線維化が誘導されることから、マクロファージは筋衛星細胞の機能調節だけではなく、線維芽細胞の動態をも制御しているという新たな概念が示された。

論文審査の結果の要旨

骨格筋は高度な再生能力を保持した臓器であり、その巧みな修復機構により骨格筋の恒常性を維持している。またその修復機構は複雑なプロセスの順序だった組み合わせにより成り立っている。骨格筋が傷害を受けると筋線維の膜が破壊され、その結果筋線維の壊死・変性が生じる。その直後から炎症性細胞の筋組織内への浸潤が見られ、続いて筋衛星細胞の増殖が起こり、それらが互いに融合して筋管を形成し、さらに成熟して新しい筋線維が再構築される。こうした一連のプロセスで、マクロファージの機能に着目し、マクロファージ減少マウスモデルを用いて種々の解析を進め、以下のことを明らかにした。

1. M-CSF 受容体に特異的な抗体を投与することでマクロファージ減少マウスモデルを作成し、このマウスモデルで骨格筋の再生を調べたところ、筋線維の再生不全を認めた。
2. またマクロファージの浸潤が抑制された傷害筋組織内では、細胞外マトリックスの過剰な蓄積による線維化を見出した。
3. 線維化に関わる分子群の役割を調べるために、TGF- β 、および CTGF mRNA の発現量を定量し、TGF- β 3 と CTGF の発現が上昇していることを明らかにした。
4. 過剰に産生された TGF- β 3 は筋衛星細胞に作用し、増殖の遅延や融合不全を生じさせることがわかった。
5. これら分子を産生する細胞群の同定を試み、CD90 陽性の骨格筋内線維芽細胞を検出した。

以上本研究は、骨格筋再生の細胞性機構の中で、マクロファージの重要性と、マクロファージ不在下では CD90 陽性の線維芽細胞が筋再生の異常を引き起こす原因であることを突き止めた。筋ジストロフィーなど遺伝性筋疾患の進行阻止に向けた新しい手法を提供した重要な研究であり、薬学博士の学位を授与するにふさわしいものとする。