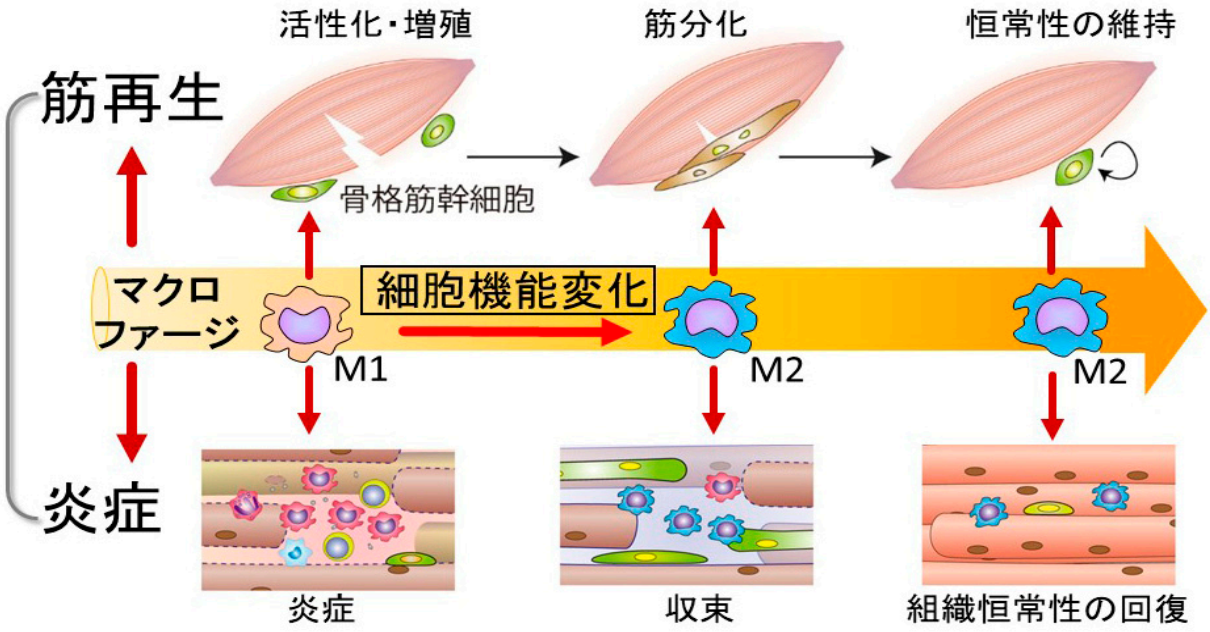
| 99　炎症と再生を協調して制御する分子メカニズムの解明 | 大石　由美子 |
|---|---|

**【目的】**サルコペニアは「加齢に伴う筋量の低下」と定義され、高齢者が生活の質を損なう主因となる。従ってサルコペニアの病態の解明と治療・予防法の開発は、高齢化を迎えた我が国における喫緊の課題である。外傷後に生じる 2 次性サルコペニアは、損傷と再生のインバランスを背景として発症する。筋肉が損傷を受けると、筋幹細胞を主体とした筋再生と炎症、組織修復とが同時に起こり、これら 3 つの機序が時空間的に連携し、協調して制御されることが筋恒常性の回復に必須である。本研究では、マクロファージが、筋衛星細胞や線維芽細胞と 1 細胞レベルで相互作用することによって、骨格筋の傷害によって生じた炎症と再生を協調し制御する分子機構を解明することを目的として実施した。

**【方法】**C57BL/6 マウス（雄、8 週齢）の前脛骨筋（tibialis anterior）に、ヘビ毒の成分であるカルジオトキシンを投与し、傷害を与えた。損傷前後の骨格筋を採取し、間質細胞を単離してフローサイトメトリー（FACS）で解析した後、シングルセルトランスクリプトーム解析を行った。

**【結果】**損傷前には、筋間質に存在するマクロファージの多くが Ly6C low/negative、F4/80 陽性の集団として同定された。ところが、損傷 3 日目には、従来報告されている Ly6C の発現レベルによる指標では説明できない、未知のマクロファージサブタイプが複数存在することが明らかとなった。これまでの研究から、マクロファージの遊走には、Ccl2 サイトカインを通したシグナルが重要であることが知られている。そこで、損傷後の筋間質に存在するマクロファージが、Ccl2 のレセプターである Ccr2 を発現するかどうかを解析したところ、予想に反し、Ccr2 を発現するのは Ly6Chigh の炎症性単球を主体とした集団に限局され、損傷部位に集積するマクロファージの多くは Ccr2 を発現していなかった。Ccr2 を発現しない細胞集団には、Ki67 など細胞増殖の指標となる遺伝子群の発現が高い細胞集団も存在した。

マクロファージは傷害によって生じた炎症と再生を主導する



# 99. 炎症と再生を協調して制御する分子メカニズムの解明

大石　由美子

日本医科大学 医学部 生化学・分子生物学（代謝・栄養学）

Key words：マクロファージ，筋再生，脂肪酸

## 緒　言

サルコペニアは「加齢に伴う筋量の低下」と定義され、高齢者が生活の質を損なう主因となる。従ってサルコペニアの病態の解明と治療・予防法の開発は、高齢化を迎えた我が国における喫緊の課題である。

外傷後に生じる 2 次性サルコペニアは、損傷と再生のインバランスを背景として発症する。筋肉が損傷を受けると、筋幹細胞を主体とした筋再生と炎症、組織修復とが同時に起こり、これら 3 つの機序が時空間的に連携し、協調して制御されることが筋恒常性の回復に必須である。ところが、筋損傷後の組織修復において、炎症の収束と再生を協調して実行する細胞間連携とその制御機構は明らかではない。

マクロファージは、自然免疫応答を司るのみならず、筋損傷後の修復や組織恒常性の保持にも必須である。定常状態の骨格筋には M2 型の組織マクロファージが常駐している。筋損傷が生じると、マクロファージは M1 型に活性化され、炎症をすすめるとともに筋幹細胞を活性化し、筋分化を促す。損傷から 4〜5 日が経過すると、マクロファージは M2 型に変化し、炎症を収束し筋線維の成熟を促して組織恒常性を回復させる。つまり、マクロファージは M1 型から M2 型へと機能を変えながら、筋損傷後の組織炎症の収束と筋再生を協調して制御すると考えられる［1，2］。しかし、損傷部位で見られるマクロファージの経時的な変化が、単細胞単位で M1 型から M2 型への機能変化として生じるのか、特異的な細胞集団の増殖や、血中から損傷部位への動員によるかは解明されておらず、その制御機構も不明である。

そこで本研究では、シングルセルレベルでのトランスクリプトーム解析を用い、定常時および筋損傷後の再生におけるマクロファージと筋幹細胞の経時的な機能変化を一細胞単位で観察する。骨格筋を舞台に、マクロファージと筋幹細胞が単細胞レベルでの相互作用を介して、炎症と再生を協調して制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的として実施した。

## 方　法

### 1.　カルジオトキシンによる筋損傷ー再生モデルの作製と評価

C57BL/6 マウス（雄、8 週齢）の前脛骨筋（tibialis anterior）に、ヘビ毒の成分であるカルジオトキシンを投与し、傷害を与えた。損傷前後の骨格筋を採取し、間質細胞を単離してフローサイトメトリー（FACS）で解析した後、シングルセルトランスクリプトーム解析に供した。

### 2. シングルセルトランスクリプトーム解析

シングルセルトランスクリプトーム解析には、10×Genomics 社のクロミウムコントローラーを用いた。シークエンスは Illumina 社の Hi-seq 1500 を用いて行った。解析には、10×Genomics 社が提供するソフトウェアを用いた。

## 結　果

### 1. 筋損傷後 3 日目にマクロファージ集結はピークとなる

従来の報告では、定常状態の骨格筋には M2 型の組織マクロファージが常駐し、筋損傷が生じると、マクロファージは Ly6C 陽性の炎症性単球が多数浸潤し、組織マクロファージが活性化され、炎症をすすめるとともに筋幹細胞を活性化し、筋分化を促すと考えられている。実際に、カルジオトキシンを用いて C57BL/6 マウスの前頚骨筋を損傷すると、好中球や単球、マクロファージをはじめとした免疫細胞の浸潤が認められた。免疫染色法を用いて、マクロファージ（F4/80）および内皮細胞（CD31）の分布を評価したところ、マクロファージ浸潤のピークは損傷後 3 日目であった。

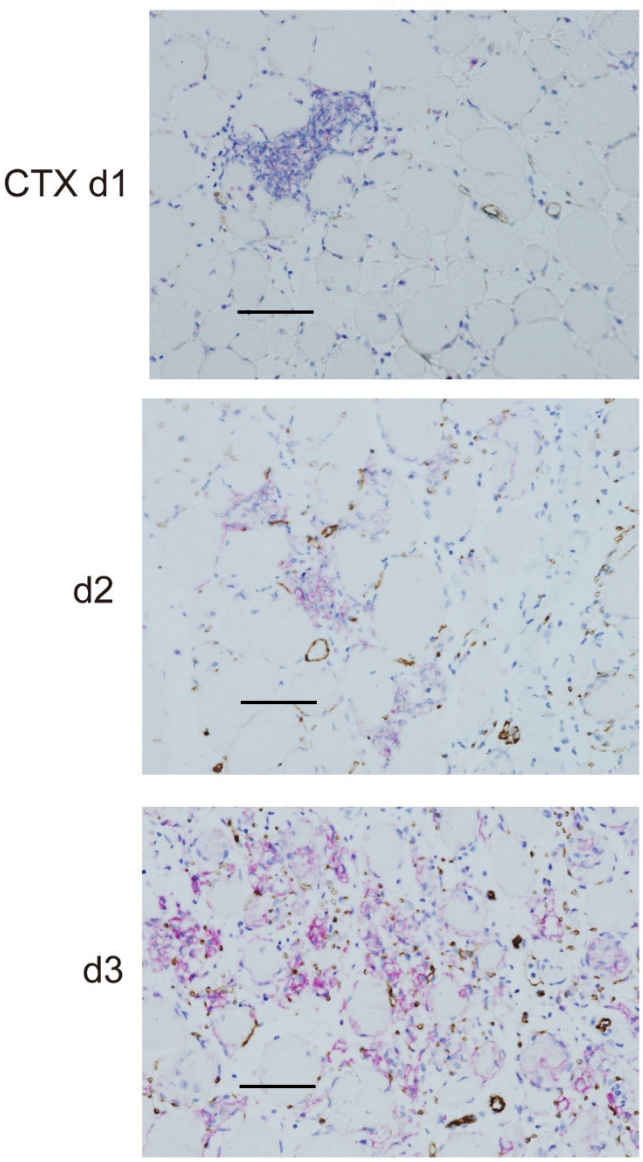



図 1. 損傷後 1～3 日目の筋組織におけるマクロファージ（F4/80）および内皮細胞（CD31）の分布
スケールバー：50 μm。

**2. 損傷後 3 日目の筋間質には、未知のマクロファージサブタイプが複数存在した**

1 細胞間の相互作用を明らかにする目的で、損傷前および損傷後 3 日目の筋組織間質における、シングルセルレベルでのトランスクリプトーム解析を行った。

UMAP 解析の結果、筋間質を構成する細胞群は、単球・マクロファージ、好中球、NK 細胞、樹状細胞を主体とした免疫細胞群、線維芽細胞や脂肪細胞への分化能をもつと考えられる細胞群、神経系細胞、内皮細胞、ペリサイト、筋衛星細胞や筋線維への分化途上の細胞群にきれいに分けることができた。損傷前に比べ、損傷後 3 日目には、間質細胞における、単球・マクロファージの割合が大幅に増加し、逆に内皮細胞が占める割合が低下した。損傷前には、筋間質に存在するマクロファージの多くが Ly6C low/negative、F4/80 陽性の集団として同定された。ところが、損傷 3 日目には、従来報告されている Ly6C の発現レベルによる指標では説明できない、未知のマクロファージサブタイプが複数存在することが明らかとなった。図 2 に示すように、単球・マクロファージの集団をさらに詳しく解析すると、Ly6C 発現の高い inflammatory monocyte の他に、CD206 陽性で、古典的には M2 マクロファージと考えられている集団、増殖能の高い集団、Ly6C 発現の低い集団に分けることができた。Ly6C 発現の低い細胞群は、脂肪酸結合蛋白質 FABP4、5 の発現の多寡でさらに 2 群に分けることができた。これまでの研究から、マクロファージの遊走には、Ccl2 サイトカインを通したシグナルが重要であることが知られている。そこで、損傷後の筋間質に存在するマクロファージが、Ccl2 のレセプターである Ccr2 を発現するかどうかを解析したところ、予想に反し、Ccr2 を発現するのは Ly6Chigh の炎症性単球を主体とした集団に限局され、損傷部位に集積するマクロファージの多くは Ccr2 を発現していなかった。Ccr2 を発現しない細胞集団には、Ki67 など細胞増殖の指標となる遺伝子群の発現が高い細胞集団もあった。このことから、筋損傷後の再生を主導するマクロファージの多くは、毛細血管から組織へ遊走してきたものではなく局所で増殖したものである可能性が高いことが明らかになった。

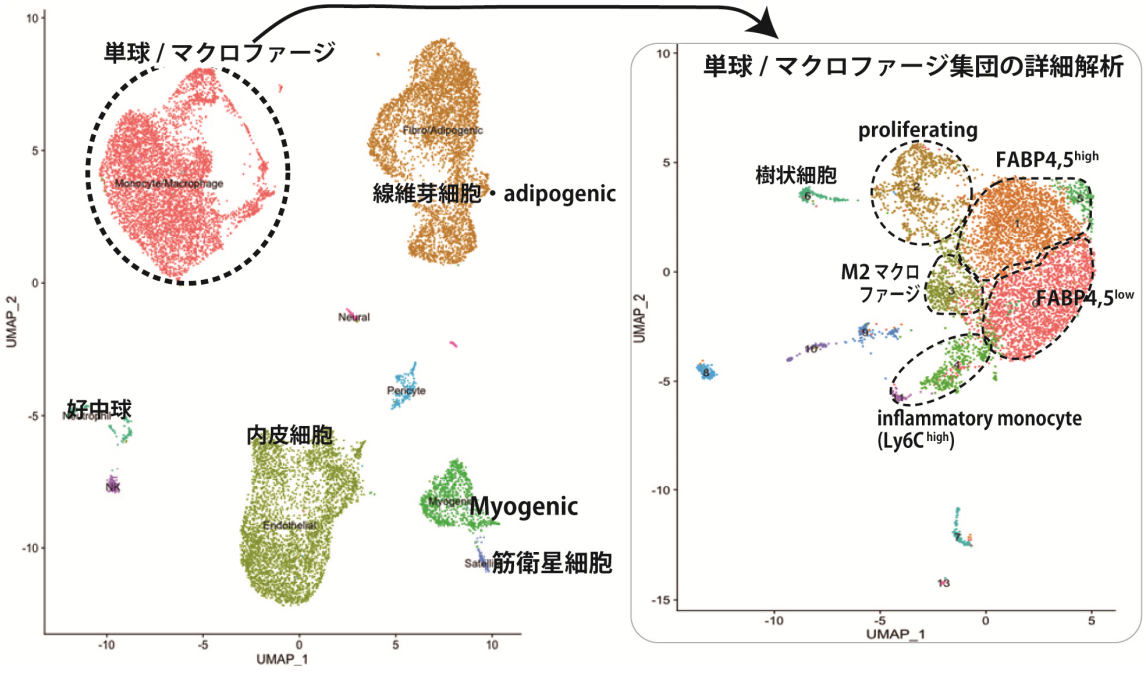



図 2. 骨格筋間質のシングルセルトランスクリプトーム解析（損傷前、損傷後 3 日目）

### 3. マクロファージや線維芽細胞は、リガンドを合成し分泌することによって、それらに対するレセプターを発現する筋衛星細胞と相互作用する

シングルセルトランスクリプトーム解析で得られた遺伝子発現プロファイルをもとに、リガンドーレセプターペア解析を行い、1 細胞間の相互作用を解析した。その結果、マクロファージや線維芽細胞が、それぞれリガンドを発現する一方、そのリガンドに対するレセプターを筋衛星細胞が発現するという組み合わせが複数あることを見出した。

この結果を *in vitro* で検証する実験を行った。まず、見出されたリガンド A を初代培養筋衛星細胞に投与したところ、筋衛星細胞の増殖が促進された。同様に、マクロファージの培養液（conditioned media）を初代培養筋衛星細胞に添加した場合にも、増殖が促進された。このことから、マクロファージや線維芽細胞は、リガンドを産生・分泌し、それらのリガンドを筋衛星細胞が受け取ることによって情報を交わす可能性が示唆された。現在、当該リガンドを欠損するマクロファージを作製し、さらに検証を進めている。

## 考　察

今回の検討から、筋損傷後の再生の過程で、マクロファージは実に多彩な機能を示し、その多様性が拡大することを見出した。私は、従来の *in vitro* での研究成果から、マクロファージは、炎症応答の過程で機能的に変化すること、その細胞自律的な機能変化は、細胞代謝や細胞時計と密接に連携し、転写とエピゲノムによって制御されることをこれまでに見出した［3，4］。骨格筋損傷後の過程で観察された細胞機能の多様性は、何によってもたらされるのか、そのメカニズムを今後明らかにしてゆきたい。

また、今回の解析から、筋衛星細胞は、リガンドの授受を介してマクロファージや線維芽細胞と相互作用する可能性を見出した。経時的にマクロファージや線維芽細胞によって産生されるリガンドの種類や量が変化することによって、筋衛星細胞の活性化や分化、増殖、成熟が調節されている可能性がある。これらの細胞間相互作用ネットワークが、筋損傷後の組織修復と筋再生を主導するメカニズムを、今後解明してゆきたい。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、千葉大学医学研究院長寿医学の真鍋一郎教授（次世代シークエンス）、ならびに、日本医科大学生化学分子生物学（代謝・栄養学）の小池博之助教（シングルセル解析）との共同研究として実施しました。

助成金を賜りました上原記念生命科学財団に、深く感謝申しあげます。

## 文　献

1） Oishi Y*. and Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration.Int Immunol. 30:511-528, 2018. doi.org/10.1093/intimm/dxy054

2） Oishi Y*. and Manabe I. Kruppel-like factors in metabolic homeostasis and cardiometabolic diseases. Front cardiovasc med. 2018. doi: 10:3389/fcvm.2018.00069

3） Oishi Y*, Spann, NJ, Link VM, Muse ED, Strid T, Edillor C, Kolar MJ, Matsuzaka T, Hayakawa S, Tao J, Kaikkonen M, Carlin A, Lam MT, Manabe I, Shimano H, Saghatelian A and Glass CK. SREBP1 contributes to resolution of pro-inflammatory TLR4 signaling by reprogramming fatty acid metabolism. Cell Metab, 25:412-427, 2017 doi: 10.1016/j.cmet.2016.11.009.

4） Oishi Y*, Hayashi S, Isagawa T, Oshima M, Iwama A, Shimba S, Okamura H and Manabe I. Bmal1 regulates inflammatory responses in macrophages by modulating enhancer RNA transcription. Sci Rep 7:7086, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-07100-3