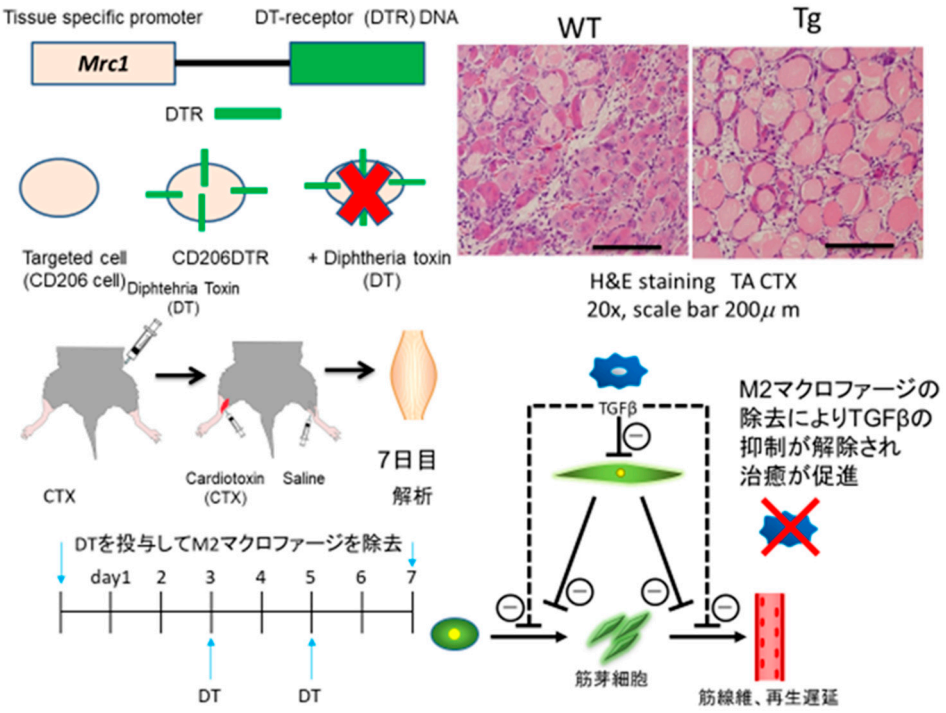
217　高齢者の骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発	戸邉　一之

【目的】超高齢化社会を迎えた現代において、サルコペニア保有者数が増加しており骨格筋の量および質を維持するための有効な手段を講じることは緊急性の高い課題である。本研究では、糖尿病での骨格筋損傷からの回復遅延の分子機構を解明し、M2 マクロファージ（MΦ）に着目した骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発を目指す。骨格筋損傷後の筋再生において、炎症とその後に起こる創傷治癒機転に重要な役割を果たすのが MΦである。骨格筋損傷後の筋再生において、初期は炎症性の M1 MΦが増加するが続いて抗炎症性あるいは修復を促進する M2 MΦが増加をして修復に寄与するというのがこれまでの定説である。私どもが注目したのは「骨格筋に在住する M2 MΦ」である。骨格筋損傷後に M2 MΦを除去し回復への影響を検討した。

【方法】M2 MΦを任意のタイミングで除去可能な遺伝子改変マウス CD206DTR マウスを用いて、cardiotoxin を前脛骨筋に投与し骨格筋損傷を誘導した。損傷後、3 日目、5 日目に、M2 MΦを除去し損傷からの回復に与える影響を検討した。次に高脂肪食・糖尿病モデルマウス、加齢マウスで同様の実験を行なった。

【結果】M2 MΦの除去により骨格筋損傷からの回復が促進された。肥満糖尿病モデルマウス、高齢マウスにおいてはともに骨格筋損傷からの回復が遅れているが、M2 MΦの除去により部分的ではあるが回復は促進された。

M2 マクロファージの除去により骨格筋損傷からの回復が促進



217. 高齢者の骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発

戸邉　一之

富山大学 医学部 第一内科

Key words：M2 マクロファージ，骨格筋損傷，間葉系幹細胞，サルコペニア

緒　言

超高齢化社会を迎えた現代において、サルコペニア保有者数が増加しており骨格筋の量および質を維持するための有効な手段を講じることは緊急性の高い課題である［1］。本研究では、糖尿病での骨格筋損傷からの回復遅延の分子機構を解明し、M2 マクロファージ（MΦ）に着目した骨格筋損傷からの回復を促進する治療法の開発を目指す。

骨格筋損傷後の筋再生において、炎症とその後に起こる創傷治癒機転に重要な役割を果たすのがMΦである。骨格筋損傷後の筋再生において、初期には炎症性のM1MΦが増加するが続いて抗炎症性あるいは修復を促進するM2MΦが増加をして修復に寄与するというのがこれまでの定説である。私どもが注目したのは「骨格筋に在住するM2MΦ」である。

これまで、私どもは、「M2 MΦを任意のタイミングで除去可能な遺伝子改変マウス CD206DTR」を独自に開発し、肥満2型糖尿病モデルにおいてM2MΦの除去の効果を検討した。驚いたことに、M2MΦを除去したところ、予想とは逆に脂肪組織の炎症が改善し糖尿病が改善した。M2 MΦの除去により、前駆脂肪細胞が増殖を開始し、成熟脂肪細胞への分化が亢進しインスリン感受性が改善するという知見を得た。この知見から、「CD206 陽性M2MΦが、TGFβを介して、前駆脂肪細胞の増殖を抑制するNiche（保管庫）としての役割を持つこと」を明らかにした［2，3］。

この知見にヒントを得て、骨格筋においても、「修復を促進する」と考えられてきたM2 MΦが間葉系幹細胞の性質を持つ Fibro/adipogenic progenitors（FAP）を制御しているのではないかと考えた。本研究では、骨格筋損傷をきたしたマウスより CD206 陽性M2 MΦを除去し、損傷回復への影響を検討する。さらに、肥満や老化における CD206 陽性M2MΦの除去の効果を確認する。

方　法

1．骨格筋損傷後の回復過程の病理所見の時間経過

Cardiotoxin で骨格筋（前脛骨筋）の損傷をきたし、その回復過程を組織所見で観察する。

2．M2MΦの除去により骨格筋損傷から回復が促進するかの検討

任意のタイミングでM2MΦを除去可能なCD206DTRマウスにおいて、cardiotoxinにより前脛骨筋を損傷し、day3、day5にM2MΦを除去し回復への効果を調べる（図1）。筋芽細胞に発現するMyf5、MyoD、Myogeninなどの遺伝子発現解析や免疫染色を行い、治癒の回復を確認する。フローサイトメトリーで間葉系幹細胞様のFAP、筋前駆細胞（MP）を分離し、遺伝子発現を検討する。特に、FAPにおいて分化促進因子が分泌されていないかについて検討を行う。

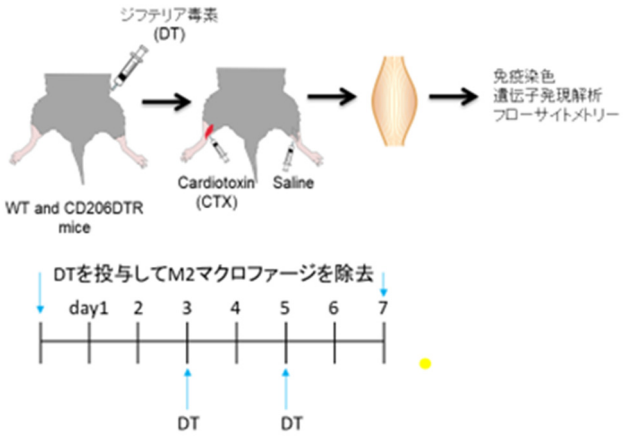


図 1. ジフテリア毒素を投与し、M2 MΦを除去する方法

3. 糖尿病における M2MΦの除去効果

高脂肪食負荷し肥満・糖尿病を誘導した CD206DTR マウスにおいて、骨格筋損傷後に、M2 MΦを除去しその効果を検討する。ブレリミナリーなデータでは肥満・糖尿病では損傷からの回復が遅延するが、M2 MΦの除去により一部は改善した（図 2）。2 と同様に、遺伝子発現、免疫染色、フローサイトメトリーで解析を行う。

4. 加齢マウスでの検討

CD206DTR マウス（若齢および加齢マウス（56 週齢））において、M2 MΦを除去し、加齢マウスにおいても損傷治癒が促進されるかについて検討する分子機構を解明する。

1）加齢で回復が遅延する分子機構を解明する。加齢マウスで実験を行い、骨格筋損傷後の TGFβシグナルの亢進がないかを確認する。次に、加齢マウスで M2 MΦの除去を行い、TGFβシグナルの低下を、遺伝子発現、免疫染色、フローサイトメトリーで FAP と MP の分離をして TGFβシグナル下流の遺伝子発現の低下を確認する。

2）高齢の M2 MΦ特異的 TGFβ1 欠損マウスで損傷治癒からの回復を検討する。

5. M2 MΦを除去可能なモノクローナル抗体の作製と骨格筋損傷からの回復促進効果の是非の検証

CD206 抗原蛋白質を哺乳類の細胞にて作製し、CD206 遺伝子欠損マウスに投与し、このマウスから ISAAC（immunospot array assay on a chip）法にてモノクローナル抗体を作製する。得られた抗体の中から骨格筋損傷後 day2～day5 の間に M2 MΦを除去可能なクローンを選択する。

結　果

1. 骨格筋損傷からの回復のタイムコース

まず、骨格筋損傷後の回復過程についてタイムコース実験を行なった。前骨格筋に cardiotoxin を投与すると、投与後 1～4 日は急速な炎症が惹起された。4 日後から炎症は徐々に軽快し回復が始まった。7 日後に損傷部位はほぼ再生した筋線維に置き換わった。7 日後には石灰化した筋線維がみられた。10～14 日後には、ほぼ回復が完了し、21 日後には完全に回復した。

2. M2 MΦの除去で予想とは逆に骨格筋損傷からの回復が促進されることが判明

M2 MΦを任意のタイミングで除去可能な CD206DTR マウスの前脛骨筋を cardiotoxin で損傷後、day3、day5 にジフテリア毒素を投与して M2 MΦを除去したところ、予想とは逆に骨格筋損傷からの回復が促進された（図 2）。また、間葉系幹細胞様の FAP からは、Ccl7、DPP4、Fmod などの分泌因子の発現が亢進していた。M2 MΦを除去した群では筋再生に関する転写因子である *MyoD*、*MyoG* の発現が上昇していた（図 3）。

3. 高脂肪食下での損傷回復は遅延するが、M2 MΦの除去により回復が部分的に回復する

高脂肪食による肥満糖尿病マウスにおいては、骨格筋損傷後の回復が遅延した。次に、M2 MΦを除去したところ、高脂肪食 CD206DTR マウスでは、通常食 CD206DTR マウスほどの回復には至らないものの損傷回復が促進された（図 2)。野生型に比べて、筋芽細胞に発現する *Myf5*、*MyoD*、*Myogenin* などの遺伝子発現が低下していた。肥満・糖尿病状態ではM2 MΦを除去したマウスでは、部分的な回復を示した。*Myf5*、*MyoD*、*Myogenin* などの遺伝子発現も部分的な回復にとどまった。

4. 加齢マウスでの検討

10 週齢、56 週齢の CD206DTR マウスで cardiotoxin により骨格筋損傷を誘導し、day3、day5 でジフテリア毒素を投与し、回復を検討した。加齢により回復は遅延した。M2 MΦ除去の効果は十分には見られなかった。

5. M2 MΦを除去可能なモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体はすでに ELISA 法で確認された抗体を 10 クローン（内、3 クローンはフローサイトメトリーで確認済み）得ている。現在、CDC 活性、ADCC 活性を調べているところである。

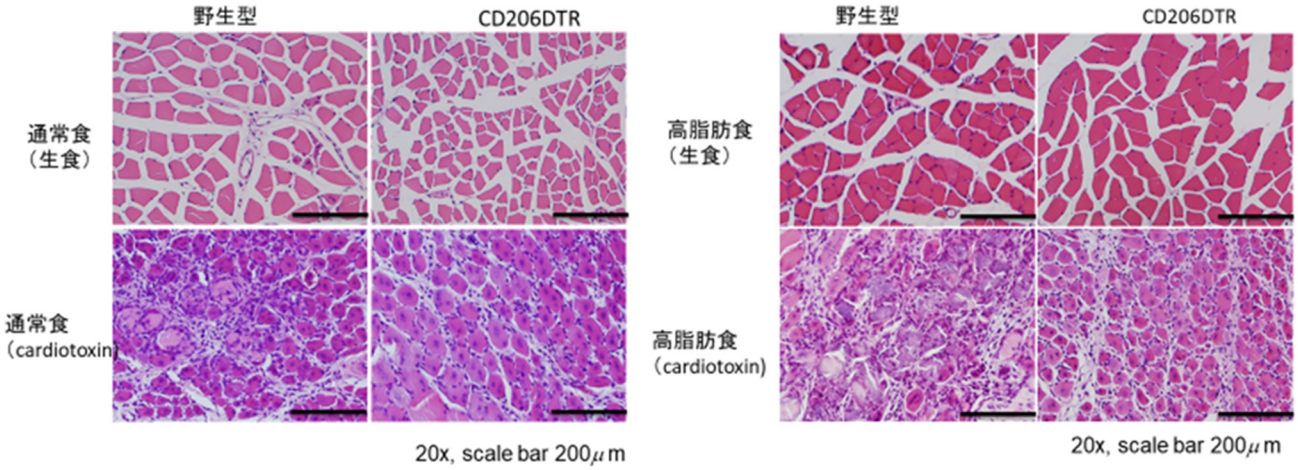


図 2. 骨格筋損傷からの回復における M2 MΦの役割

M2 MΦの除去により骨格筋損傷からの回復が促進される。高脂肪食負荷マウスでは回復が遅れるが M2 MΦの除去により少なくとも一部は回復が早まる。

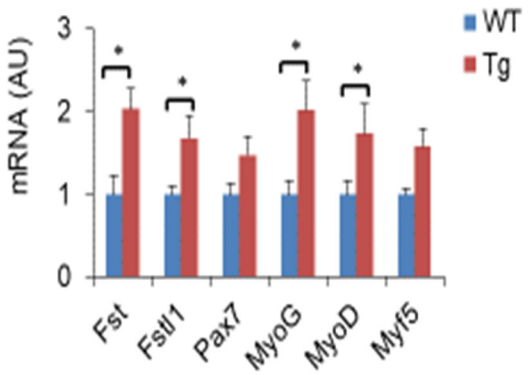


図 3. M2 MΦの除去により筋線維の分化に関係する転写因子の発現が亢進する

M2 MΦの除去により、TGFβシグナルを阻害する遺伝子（*Fst*、*Fstl1*）や骨格筋の分化に関連する転写因子の発現が増加した。

考　察

これまでM2ＭΦは、炎症性M1ＭΦに続いて出現しIL-10などを介して炎症を抑え修復を促進させる作用があると報告されてきた。したがって、M2ＭΦの除去は、修復を遅らせるものと考えられてきた。本研究結果は、予想とは逆に、骨格筋損傷後に、炎症性M1 ＭΦに続いて出現するM2 ＭΦの除去は、骨格筋内間葉系幹細胞であるFAPからのFst、Fstl1などのTGFβシグナルを抑制する分子の発現上昇を介して、筋芽細胞の分化を促進する機能があることを示す。糖尿病患者や高齢者において、M2ＭΦの除去により、骨格筋損傷からの回復が促進される可能性があり、今後、有力な治療法の一つとなることが期待される（図4）。

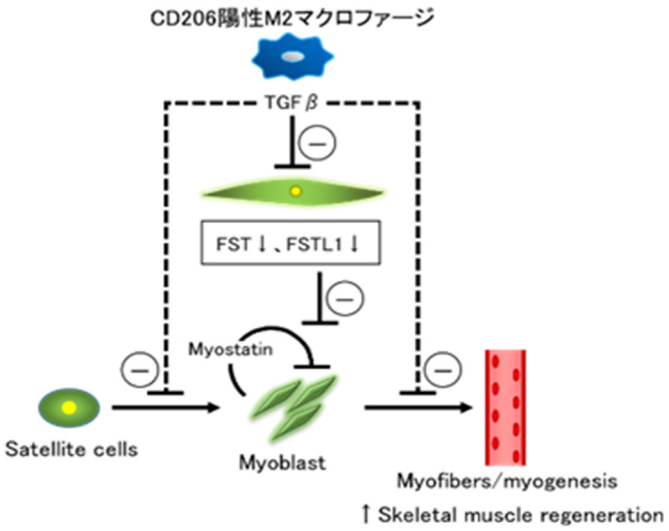


図4.　M2ＭΦの除去が、損傷からの回復を促進させる分子機構
M2 ＭΦを除去するとTGBβシグナルが低下しFAPが活性化し、FSTの上昇によりマイオスタチンが抑制され骨格筋の再生過程が促進される。

文　献

1）　Nishida Y., Nawaz A., Kado T., Takikawa A., Igarashi Y., Onogi Y., Wada T., Sasaoka T., Yamamoto S., Sasahara M., Imura J., Tokuyama K., Usui I., Nakagawa T., Fujisaka S., Kunimasa Y., Tobe K.: Astaxanthin stimulates mitochondrial biogenesis in insulin resistant muscle via activation of AMPK pathway. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2020 Feb;11(1):241-258. doi: 10.1002/jcsm.12530. Epub 2020 Jan 31.

2）　Nawaz A, Aminuddin A, Kado T, Takikawa A, Yamamoto S, Tsuneyama K, Igarashi Y, Ikutani M, Nishida Y, Nagai Y, Takatsu K, Imura J, Sasahara M, Okazaki Y, Ueki K, Okamura T, Tokuyama K, Ando A, Matsumoto M, Mori H, Nakagawa T, Kobayashi N, Saeki K, Usui I, Fujisaka S, Tobe K. : CD206+ M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors. Nat Commun. 2017 Aug 18;8(1):286. doi: 10.1038/s41467-017-00231-1.

3）　Igarashi Y, Nawaz A, Kado T, Bilal M, Kuwano T, Yamamoto S, Sasahara M, Jiuxiang X, Inujima A, Koizumi K, Imura J, Shibahara N, Usui I, Fujisaka S, Tobe K. :Partial depletion of CD206-positive M2-like macrophages induces proliferation of beige progenitors and enhances browning after cold stimulation. Sci Rep.2018 Oct 1;8(1):14567. doi: 10.1038/s41598-018-32803-6.