

【総説】

## G-CSF による骨格筋再生

湯浅 慎介

慶應義塾大学医学部 循環器内科

### 要約

顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte-colony stimulating factor ; G-CSF) 受容体はマウス胎仔骨格筋前駆細胞や成体骨格筋再生過程に発現する。骨格筋損傷後に G-CSF 受容体は再生骨格筋細胞に発現し、G-CSF 投与により骨格筋再生が促進される。成体の骨格筋幹細胞である筋衛星細胞は通常は静止期にあるが筋損傷後には活性化し筋再生する。活性化衛星細胞において G-CSF 受容体は不均等に発現分布しており、G-CSF 添加や G-CSF 受容体欠損マウスの解析において、G-CSF は筋衛星細胞の長期維持に重要な役割を担っている。デュシェンヌ型筋ジストロフィーは、慢性筋傷害により病初期には筋衛星細胞の活性化により筋再生が起こるが、再生を繰り返した筋衛星細胞は徐々に老化・疲弊して筋再生が低下して病状が悪化する。筋ジストロフィーモデルマウスにおいて、長期 G-CSF 投与は長期の筋再生を促し治療効果を呈する。これらより G-CSF は筋衛星細胞に直接作用し筋損傷後の筋再生を調節している。

キーワード : Muscle, Satellite cell, G-CSF, Muscular dystrophy

### 1. はじめに

骨格筋細胞は全身の骨格に存在する筋肉を構成している細胞であり、筋肉の収縮や形態維持に関わっている。強い外傷や廃用症候群などの後天性筋傷害や筋ジストロフィーを始めとした先天性筋疾患などの筋疾患は数多くあるが、骨格筋にはある程度の再生能力があることから骨格筋再生療法開発の試みはあまり積極的にはなされてこなかった。しかしながら骨格筋再生能力も完全ではなく、これらの筋疾患は生活の質を著しく落とし、さらには呼吸筋傷害などから死に至ることもあり、現在では骨格筋再生療法の開発が望まれている。

成体においては筋線維の周囲に衛星細胞と呼ばれる骨格筋幹細胞があり、同細胞が筋損傷後の筋肉修復・再生を担っている。成体における骨格筋幹細胞から成熟骨格筋細胞への分化を制御する分子機序は胎仔正常発生時の骨格筋細胞分化・成熟に類似していることが広く知られている。すなわち成体における骨格筋細胞の再生現象を解明し再生療法を開発するためには、胎仔期の骨格筋細胞発生を紐解いていくことが重要である。骨格筋発生は

様々な転写因子群により、筋細胞の分化・成熟が時間空間的に精密に制御されている。胎生中期の体節において骨格筋幹細胞が同定されるようになり、それらは Pax3 や Pax7 を発現し、続いて bHLH 型転写因子群 MyoD、Myf5、MRF4、Myogenin が順次発現し筋肉細胞として分化・増殖・成熟し成体に存在する大きな筋肉を形成していく。このような様々な転写因子群が順次発現し下流の骨格筋特異的遺伝子群の発現を調節し、骨格筋の幹細胞から増殖が活発な筋芽細胞そして成熟筋細胞へと分化していく。骨格筋再生療法開発のためには、筋衛星細胞の維持機構、増殖機構、分化機構を正しく、そして深く理解していく必要がある。そこで胎生期の各分化段階にある骨格筋細胞に対して、どのような作用を有する物質が存在するかを発生学的見地から詳細に解析し、筋肉の増殖・分化促進因子の探索を行い、成体骨格筋再生へと応用していくことが可能であると考えられる。

### 2. G-CSF 受容体のマウス胎仔における発現

心筋細胞発生と骨格筋細胞発生において組織特異的に発現する様々な遺伝子、中でも分泌因子と受容体に着目しスクリーニングを行った結果、マウス初期胚において G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor : 顆粒球コロニー刺激因子) の受容体が発生中期胚の背側に存在する体節という組織で強く発現していることが判明した (1-3)。マウス胎仔胚における G-CSF 受容体の発現を Whole mount in situ hybridization 法により各種骨格筋

連絡先 : 湯浅慎介 〒160-8582  
東京都新宿区信濃町 35  
TEL : 03-3353-1211 (内線 62310)  
FAX : 03-3353-2502  
E-mail : yuasa@keio.jp

細胞マーカーの発現と比較したところ、骨格筋幹細胞の上位のマーカーである pax3 とは発現部位が一致しないが、骨格筋幹細胞から分化直後の筋芽細胞などで発現する myf5 や myoD の発現部位と類似していることが判明した (4)。さらに詳細な発現部位を免疫染色により検討したところ、体節の中でも Pax3、Pax7 を発現する骨格筋として最も未分化な集団ではなく、それらのすぐ内側の細胞集団である MyoD を発現し始める僅かに分化し始めた未分化骨格筋細胞特異的に G-CSF 受容体が強く発現していることが分かった。G-CSF 受容体の発現時期と部位から、G-CSF は骨格筋の最上位の幹細胞からわずかに分化した細胞において、分化や増殖などの機能に強く関与している可能性が示唆された。

### 3. G-CSF は筋芽細胞の増殖因子である

G-CSF は白血球の増加作用や造血幹細胞の末梢への動員作用などの血球系への強い作用が知られているサイトカインであるが、骨格筋に対する作用は全く不明であった。そこで *in vitro* において、骨格筋細胞に対して G-CSF がどのような作用があるかを検討することとした。マウス筋芽細胞の細胞株として知られている C2C12 細胞は通常血清濃度の状況下であれば増殖を続け未分化状態を維持するが、低血清濃度の状況では成熟骨格筋細胞へと分化することが知られている。C2C12 細胞を低血清状態で培養すると、培養初期の未分化筋芽細胞において G-CSF 受容体が発現しており、培養後期に成熟骨格筋細胞へと分化した際には G-CSF 受容体の発現が消失することが確認された。さらに G-CSF を培養液中に添加することにより、G-CSF 濃度依存性に未分化筋芽細胞の増殖が強く促されることが判明した。一方で培養液中に G-CSF 受容体の中和抗体を添加し G-CSF シグナルをブロックすると C2C12 細胞の増殖は抑制され、筋芽細胞の増殖に G-CSF は必須な因子であることが判明した。さらに C2C12 細胞の培養液中に G-CSF を添加すると、STAT3、AKT、ERK、JNK、p38 などのサイトカイン受容体の下流にあることが知られている細胞内シグナルが顕著に活性化されることが判明した。すなわち G-CSF は筋芽細胞特異的に細胞内シグナルを活性化することができることを意味している。これらのことから G-CSF は筋芽細胞の直接的な強い増殖因子であることが判明した。

### 4. G-CSF 受容体は成体骨格筋再生時の筋芽細胞に発現している

さらに胎生期と同様に G-CSF 受容体の成体における発現の有無を検証することとした。胎生期での観察から G-CSF 受容体は成熟骨格筋細胞や最上流の骨格筋幹細胞では発現しておらず、骨格筋幹細胞が分化し始めて増殖能を保持している筋芽細胞で発現が認められることが予想された。成体における筋肉細胞の再生能力は保たれているが、安静状態では筋肉の再生は起こってはず、静止期の骨格筋幹細胞：筋衛星細胞が少数いるのみで筋芽細胞もほとんど認められない。しかしながら様々な原因

で筋肉が傷害された後には、速やかに筋衛星細胞が活性化され、分化・増殖し始め筋芽細胞を経て成熟骨格筋細胞となる。

成体での骨格筋再生現象を検討するために骨格筋傷害モデルを作製することとした。コブラ蛇毒に由来するカルジオトキシンは骨格筋細胞を選択的に傷害する物質であり、筋肉傷害に関する基礎的研究でよく用いられている。カルジオトキシンを筋肉内注射することによりマウス成獣骨格筋傷害モデルを作製し、G-CSF 受容体の発現を観察した結果、再生途中の骨格筋細胞 (筋芽細胞) に特異的に G-CSF 受容体が強く発現していることが判明した。胎仔期での観察と同様に成熟骨格筋細胞では G-CSF 受容体は観察されなかった。これらより G-CSF 受容体は成体筋再生時の筋芽細胞に特異的に発現し、G-CSF が骨格筋再生に強く関与している可能性が示唆された。

### 5. G-CSF は骨格筋傷害後の再生を強く促す

G-CSF 受容体が筋芽細胞で発現しており、*in vitro* で筋芽細胞の増殖を強く促すことより、成体骨格筋再生時においても筋芽細胞を増殖させ再生を促進することが予想された。古くから知られていることだが成体における骨格筋の再生は個々の筋肉細胞を病理学的に観察することにより可能である。すなわち傷害を受けていない正常成熟骨格筋細胞は大型で辺縁に存在する核を有する。また再生骨格筋は、再生途中では小型円形であり、その核は中心に存在する。また再生骨格筋が成熟し大型の細胞になった後も核は中心に存在し、始めから傷害を受けていない骨格筋細胞との区別が病理学的に可能である。カルジオトキシンを筋肉内に投与し骨格筋傷害モデルを作成し、G-CSF を投与することで筋再生における G-CSF の効果を検討することとした。その結果、G-CSF 投与により、傷害部位において中心核を有する再生骨格筋細胞が顕著に増え、筋肉径が大きくなり、そして筋力が回復することが判明した。また G-CSF が骨格筋再生において必須な因子であるかを検討するために、G-CSF のシグナルが完全に欠損する G-CSF 受容体欠損マウスを用いて同様の解析を行った。その結果、G-CSF 受容体欠損マウスにおいては筋傷害後の骨格筋再生が大きく障害されることも判明した。すなわち骨格筋傷害後の再生において G-CSF が再生を強く促すと同時に、筋再生において必須な因子であることが判明した。

### 6. G-CSF は筋衛星細胞の不均等分裂に作用する

カルジオトキシンによる短期筋傷害モデルにおいて、再生筋芽細胞に G-CSF 受容体が一過性に発現し、G-CSF 投与により筋再生および筋力の回復を確認した。同研究において観察した再生筋芽細胞は、筋肉の幹細胞の最上流の幹細胞ではなく、筋衛星細胞の維持・増殖・分化における G-CSF の役割を理解するためには筋衛星細胞を直接観察する必要があると考えられた。筋衛星細胞は数が少なく組織切片における組織学的な詳細な観察は難しく、筋線維培養を行い観察した。ex vivo にお

る筋線維培養は、in vivoにおける骨格筋傷害後の筋衛星細胞の挙動を反映することが知られている。すなわち in vivoにおける筋衛星細胞は通常状態では静止期にあるが、筋傷害後に活性化され分裂・分化していく。ex vivoにおける筋線維培養においても、培養直後から筋衛星細胞は活性化し in vivoにおける再生の過程をたどる。野生型マウスの筋線維を単離し0時間と6時間において、筋衛星細胞のマーカである Pax7 と G-CSF 受容体の発現を観察すると、静止期（0時間）にある筋衛星細胞には G-CSF 受容体は発現していないが、活性化直後から G-CSF 受容体が発現し始めることが確認された（5）。さらに詳細に観察を進めると G-CSF 受容体の発現は、一部の活性化した筋衛星細胞においては細胞の片側に偏在し、不均等に分布していることが観察された。活性化した筋衛星細胞は分裂し、一部は静止期の筋衛星細胞に戻り、一部はさらに分化していくことが知られている。筋傷害後早期の並列した筋衛星細胞は Doubling cell と呼ばれ、筋衛星細胞の分裂直後の細胞であることが知られている。これらの一部の細胞には、片側の細胞にのみ G-CSF 受容体が発現し、さらに筋衛星細胞の分化マーカである MyoD の発現細胞と共局在し、静止期に戻る細胞には発現しないことが判明した。これらのことより、静止期にある筋衛星細胞が活性化されると G-CSF 受容体を発現し細胞内に不均等に分布し、同細胞が分裂した際に G-CSF 受容体を発現している細胞は分化が進み、G-CSF 受容体が発現していない細胞が再度静止期に戻ることが示唆された（図1）。G-CSF が筋衛星細胞の population に影響を与えるかを確認するために ex vivo 筋線維培養において G-CSF を添加すると、静止期（Pax7+, MyoD-）、分化細胞（Pax7-, MyoD+）共に増加させることが判明した。さらに G-CSF 受容体欠損マウス（Csfr -/-）の ex vivo 筋線維培養においては静止期（Pax7+, MyoD-）、分化細胞（Pax7-, MyoD+）共に減少することが観察された。これらのことより、G-CSF は G-CSF 受容体を介して各分化段階の筋衛星細胞

の維持・増殖作用を有することが示唆された

## 7. G-CSF による筋ジストロフィー治療

G-CSF の ex vivo における筋衛星細胞の支持作用が確認され、in vivo における長期の骨格筋増殖作用が期待された。そこで、長期に渡り骨格筋再生療法が望まれる筋ジストロフィーの治療方法への応用を検討することとした。筋ジストロフィーモデルは筋肉細胞が慢性的に損傷を受け、筋衛星細胞が徐々に老化・疲弊することにより発症するとされている。筋ジストロフィーの中で最も多いデュシェンヌ型筋ジストロフィーは細胞骨格タンパクであるジストロフィンの変異により発症する。ジストロフィンに変異がある mdx マウスは、筋変性と再生の顕著な時期は3～5週齢に限定的に認められることが知られている。同時期には筋変性に続いて、多数の再生筋細胞（小型・円形・中心核細胞）が認められるが、変性と再生の顕著な時期は同時期に限定的であり、その後の筋力や生命予後にはほとんど影響がない。骨格筋再生における G-CSF の役割を明らかにするために、G-CSF 受容体欠損マウスと mdx マウスを交配して作製した G-CSF 受容体欠損 mdx マウスを用いて検討した。当初は G-CSF 受容体ホモ欠損 mdx マウスを作製して再生能の低下を確認する予定であったが、G-CSF 受容体ヘテロ欠損 mdx マウスにおいても著明な再生細胞の減少が認められた。さらに mdx マウスや G-CSF 受容体欠損マウス（ホモ、ヘテロともに）の生存率は野生型と同様であるが、G-CSF 受容体ヘテロ欠損（csfr +/-）mdx マウスは生後5週齢にかけて半数以上が死に至ることが確認された。すなわち G-CSF シグナルが半分程度に低下すると、mdx マウスは死に至ることが分かり、G-CSF は筋ジストロフィーにおける骨格筋幹細胞の維持に必須な因子であるとわかる。

mdx マウスは筋変性或生命予後などの表現形が軽微であり、ヒト筋ジストロフィーに近いモデルを用いて解析を進めた。ユートロフィンはジストロフィンの相同遺

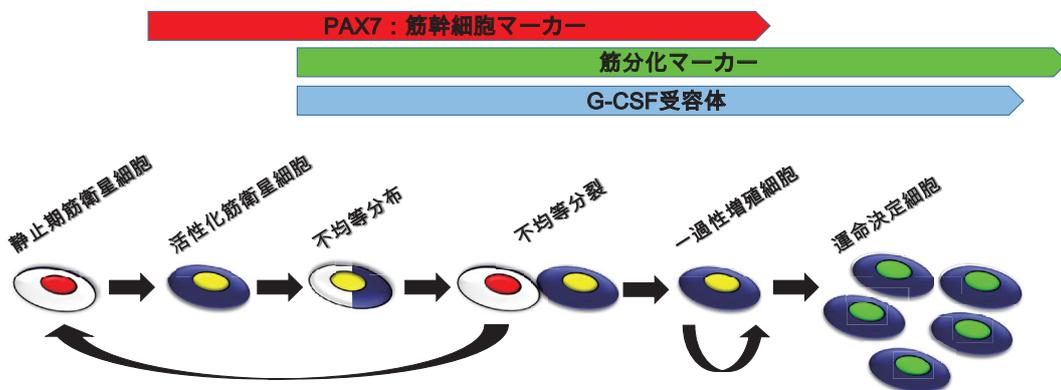


図1. 筋衛星細胞における G-CSF 受容体の発現

G-CSF 受容体は静止期筋衛星細胞には発現しておらず、活性化筋衛星細胞に発現し始める。その後、幹細胞である筋衛星細胞は自己の維持のために再び静止期筋衛星細胞を作り出す。その過程でタンパクの細胞内における不均等分布とその後起こる不均等分裂が重要である。G-CSF 受容体は不均等分布し、不均等に分裂後に保持される。

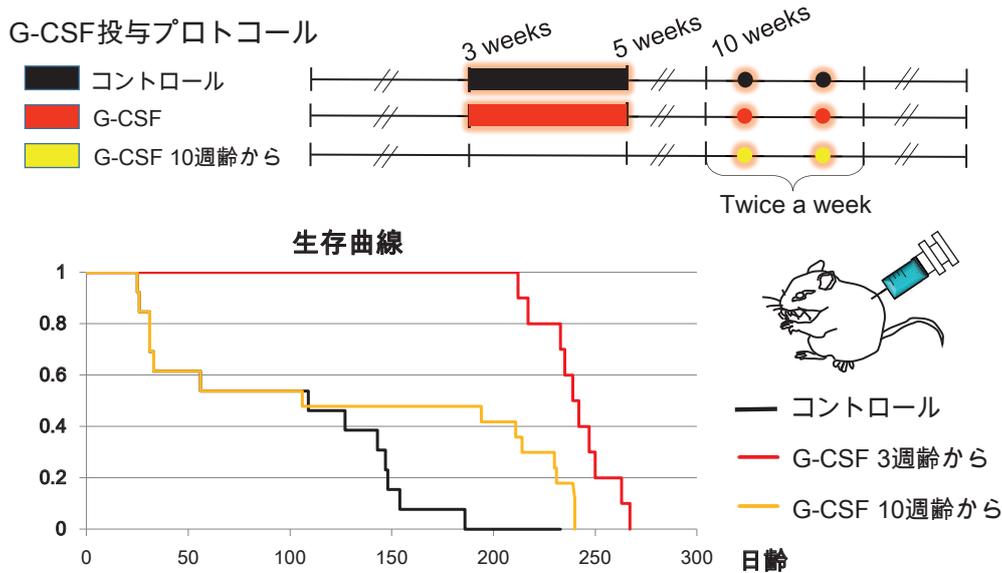


図1. 重症筋ジストロフィーモデルマウスへのG-CSF投与

重症筋ジストロフィーモデルマウスは、平均生存期間は約100日である。同マウスへ3週齢からG-CSF投与、もしくは病状が進行した10週齢から投与し、生存期間を計測した。その結果、3週齢から投与しても、10週齢から投与しても、顕著な生存期間延長効果が認められた。

伝子として知られており、両遺伝子の欠損マウスはヒトと同様に重症筋ジストロフィーモデルになる。ジストロフィン、ユートロフィンの二重欠損マウスは筋傷害に対して筋肉の幹細胞が老化し再生能が低下し、6ヶ月齢で全ての個体が死に至る。ここにG-CSF（2回/週）を腹腔内投与することにより、組織学的にも筋肉の再生が認められるが、その生命予後が明らかに改善することが確認された（図2）。これらより、mdxマウスおよびジストロフィン、ユートロフィン二重欠損マウスにおいてG-CSFは長期の強い筋再生効果を示し、筋衛星細胞を長期にわたり維持する効果が示唆された。

#### おわりに

本研究から成体骨格筋におけるG-CSFを用いた再生療法の開発に至る可能性が示唆された。本研究においては、カルジオトキシンや遺伝学的に筋損傷を来す筋傷害モデルを対象にG-CSFの再生作用を見たものである。ヒト筋ジストロフィーをはじめとした、治療法が無く緊急性の高い疾患が数多くあり、それらの疾患を対象にG-CSFの治療効果を検討していく必要がある。またG-CSFは長年、血液疾患などで臨床応用されているものであるため、安全性に関しては担保されており、より早期の臨床応用が期待できる。

#### 参考文献

1. Yuasa S, Itabashi Y, Koshimizu U et al. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2005;23:607-611.
2. Yuasa S, Onizuka T, Shimoji K et al. Zc1 Is an Essential Transcription Factor for Cardiac Morphogenesis. *Circ Res* 2010;106:1083-1091.
3. Shimoji K, Yuasa S, Onizuka T et al. G-CSF Promotes the Proliferation of Developing Cardiomyocytes In Vivo and in Derivation from ESCs and iPSCs. *Cell Stem Cell* 2010;6:227-237.
4. Hara M, Yuasa S, Shimoji K et al. G-CSF influences mouse skeletal muscle development and regeneration by stimulating myoblast proliferation. *The Journal of Experimental Medicine* 2011;208:715-727.
5. Hayashiji N, Yuasa S, Miyagoe-Suzuki Y et al. G-CSF supports long-term muscle regeneration in mouse models of muscular dystrophy. *Nat Commun* 2015;6.

## Skeletal muscle regeneration by G-CSF

Shinsuke Yuasa M.D, Ph.D.

Assistant Professor

Department of Cardiology

Keio University School of Medicine

### Abstract

Granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSFR) is highly expressed in somite of murine embryos and regenerating adult muscle after injury. G-CSF administration promotes skeletal muscle regeneration in murine skeletal muscle injury models. G-CSFR is asymmetrically expressed in activated satellite cells and G-CSF is critically involved in the maintenance of long-term satellite cell population. G-CSF administration significantly improved the long-term survival of murine model of muscular dystrophy.

**Keywords** : Muscle, Satellite cell, G-CSF, Muscular dystrophy