

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H04063

研究課題名(和文)筋再生システムの老化を若返らせる分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms that rejuvenate aged muscle regeneration system

研究代表者

上住 聡芳(Uezumi, Akiyoshi)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：60434594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋は本来、優れた再生能力を備えているが、老化によりその再生能は低下する。老化に伴う筋再生能低下の要因の一つに骨格筋の脂肪化が挙げられる。我々はこれまでに、脂肪化を生み出す元となる間葉系前駆細胞を同定し報告してきた。間葉系前駆細胞の制御機構を解析する中で、正常な筋再生時には、間葉系前駆細胞でレチノイン酸(RA)シグナルが活性化すること、RAシグナルは間葉系前駆細胞による脂肪化を顕著に抑制することを明らかにした。本研究では、間葉系前駆細胞におけるRAシグナルの機能的意義を明らかにし、老化による筋再生能力低下メカニズムの理解につなげることを目的とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨格筋は身体活動や運動を司り、健康的な生活を送る上で重要な組織である。現在、平均寿命と健康寿命の間には我が国では男女共に約10年の乖離が存在し、健康寿命の延伸は我が国を含めた先進各国に共通した重要課題となっている。本研究では、「なぜ老化によって筋再生能が低下するのか？」という問いの一端を明らかにしたが、この成果は、高齢者の健康増進、そして健康長寿社会の実現にとって極めて有益になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Skeletal muscle has an intrinsically remarkable regenerative capacity, but its regenerative capacity declines with age. One of the factors contributing to the age-related decline in muscle regenerative capacity is ectopic fat formation in skeletal muscle. We have previously identified and reported on mesenchymal progenitors that are responsible for ectopic fat formation. In the course of analysing the regulatory mechanisms of mesenchymal progenitors, we found that retinoic acid (RA) signalling is activated in mesenchymal progenitors during successful muscle regeneration and that RA signalling markedly inhibits adipogenesis of mesenchymal progenitors. The aim of the present study was to clarify the functional significance of RA signalling in mesenchymal progenitors and to understand the mechanisms by which aging impairs muscle regenerative capacity.

研究分野：健康科学

キーワード：骨格筋 老化 組織再生

1. 研究開始当初の背景

近年における医療の進歩および衛生環境の改善によって、ヒトの平均寿命は大幅に延伸された。日常生活に制限がない期間を表す健康寿命も平均寿命と共に伸びてはいるが、平均寿命と健康寿命の間には我が国では男女共に約 10 年の乖離が存在する。よって、健康寿命の延伸は我が国を含めた先進各国に共通した重要課題となっている。骨格筋は身体活動や運動を司り、健康的な生活を送る上で重要な組織である。近年の疫学研究により、骨格筋量の多い人は種々の疾病に対する罹患率が低下し、長寿であることが明らかとなっており (BMJ, 2009; Am J Med, 2014)、健康寿命の延伸には骨格筋の機能維持が必須と言える。骨格筋は収縮に伴う大きな物理的負荷にさらされること、また、皮膚の直下に位置し多臓器の保護も担っていること、などの理由から最も損傷を受けやすい組織の 1 つである。筋細胞 (筋線維) は終末分化した細胞で分裂能を持たないが、骨格筋組織は高い再生能を有している。この骨格筋の再生は筋衛星細胞と呼ばれる筋幹細胞が担っている。しかし、加齢に伴って筋再生能は低下することが知られている。老化による筋再生の不全や遅延は不活動期間を延長させ、高齢者のさらなる衰弱、ひいては寝たきりにつながる。よって、「なぜ老化によって筋再生能が低下するのか？」その謎を明らかにし、筋再生システムの老化を予防・改善することができれば、高齢者の健康増進、そして健康長寿社会の実現にとって極めて有益になる。

老化による筋再生の不全は骨格筋の脂肪化を伴う。筋の脂肪化は加齢と共に亢進することが知られており (Nutr Health Aging, 2010)、筋の脂肪化の程度と筋機能は逆相関する (Gerontology, 2009)。さらに、脂肪化はトレーニング抵抗性の原因にもなる (J Nutr Health Aging, 2013)。このように、脂肪化は骨格筋にネガティブな影響を及ぼすが、筋の脂肪化の機序は長らく不明であった。しかし我々は、筋間質に存在し PDGFR α を特異的に発現する間葉系前駆細胞を発見し、本細胞が脂肪化の起源となることを世界で初めて明らかにした (Nat Cell Biol, 2010)。その後、ヒト間葉系前駆細胞の単離・培養技術を確立し (Methods Mol Biol, 2016; Stem Cell Reports, 2016)、本細胞を用いた薬剤スクリーニングによって間葉系前駆細胞による脂肪化を抑制する候補薬を複数同定した (Am J Pathol, 2017)。その中で、最も強力に脂肪化を抑制した薬剤がレチノイン酸 (RA) であった。さらに興味深いことに、若齢マウスでは間葉系前駆細胞が特異的に RA を合成できることを見出している。つまり、若齢筋では間葉系前駆細胞が RA を産生することにより自らの表現型を制御し筋再生プロセスが円滑に進むと考えられる。そこで、本研究では、筋再生過程で間葉系前駆細胞において活性化する RA シグナルの機能的意義を明らかにすることで、老化による筋再生能力低下のメカニズムの理解につなげる。

2. 研究の目的

本研究では、筋再生における間葉系前駆細胞での RA シグナルの機能的意義を明らかにすることを目的とする。具体的には、1) 間葉系前駆細胞での RA シグナル経路の分子機構、2) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの生理的役割、3) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流メカニズム、について研究し、筋再生システムの老化メカニズムの理解につなげる。

3. 研究の方法

1) 間葉系前駆細胞での RA シグナル経路の分子機構

RA が間葉系前駆細胞の病的表現型である脂肪化を抑制することを見出している。RA は核内受容体である RA 受容体 (RAR) に結合し標的遺伝子の発現を活性化することで機能するが、RAR には 3 つのタイプ (α , β , γ) が存在する。間葉系前駆細胞による脂肪化の抑制が、どのタイプの受容体によって仲介されているのかを、各受容体の選択的作動薬によって明らかにする。すなわち、間葉系前駆細胞の脂肪分化時に各種 RAR 作動薬を作用させ、脂肪分化が効率よく抑制される作動薬を明らかにすることで、間葉系前駆細胞の表現型制御に重要となる RAR のタイプを決定する。

2) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの生理的役割

筋再生過程で間葉系前駆細胞において活性化する RA シグナルの機能的意義を明らかにする目的で、間葉系前駆細胞特異的な Cre driver マウス (Pdgfra-CreER) と Cre 依存的に dominant negative RAR が発現し RA シグナルが阻害される R26^{RAR403} マウスを交配し、間葉系前駆細胞特異的に RA シグナルが阻害されるマウス (Pdgfra-CreER/R26^{RAR403}) を作製する。作製された Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスを用いて、筋再生実験を実施し、その再生過程を精査することで、間葉系前駆細胞における RA シグナルが筋再生に及ぼす機能的意義を明らかにする。

3) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流メカニズム

Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスを利用して、間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流メカニズムを調べる。Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス由来の間葉系前駆細胞とコントロールマウス由来の間葉系前駆細胞を RNA-seq によって比較解析する。Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス由来間葉系

前駆細胞では、RA シグナルが阻害されているため、この比較解析によって、間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流で制御を受ける遺伝子が明らかにできる。絞り込まれた遺伝子群をバイオインフォマティクスを用いて解析し、その生物学的意義を明らかにする。

4. 研究成果

1) 間葉系前駆細胞での RA シグナル経路の分子機構

間葉系前駆細胞の脂肪化抑制を担う RAR のタイプを決定するために、各種 RAR 作動薬の間葉系前駆細胞の脂肪分化に対する抑制効果を調べた。間葉系前駆細胞を単離・培養し、脂肪分化を誘導すると同時に各種 RAR 作動薬を作用させた。脂肪分化によって形成される脂肪滴を Bodipy によって蛍光染色し、染色強度をハイスループットイメージングによって解析することで、脂肪分化の度合いを定量した。その結果、RAR α の作動薬によって効率的に脂肪分化が抑制された。RAR β の作動薬には、今回用いた作動薬の濃度範囲においては、脂肪分化抑制効果は見られなかった。RAR γ の作動薬は脂肪分化抑制効果を示したが、ポジティブコントロールである RA と比較して、抑制効果を発揮するには、1 オーダー以上濃い濃度が必要であった。本実験において、選択的作動薬を用いているが、高濃度においてはオフターゲット効果を否定できないため、RAR γ が脂肪分化抑制効果を担うとは結論できないと考える。一方で、RAR α の作動薬の中には、RA と比較して、2~3 オーダー低濃度で強力に脂肪分化抑制効果を発揮するものもあった。以上から、RA シグナルによる間葉系前駆細胞の病的表現型（脂肪化）の制御は、RAR α を介して発揮されると結論付けた。

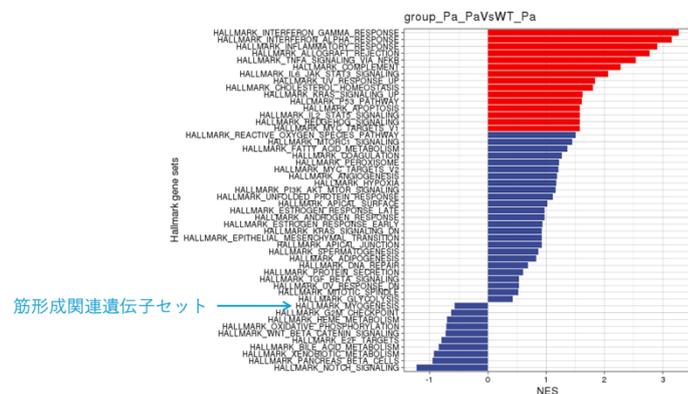
2) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの生理的役割

間葉系前駆細胞特異的な Cre driver マウス (Pdgfra-CreER) と Cre 依存的に dominant negative RAR が発現し RA シグナルが阻害される R26^{RAR403} マウスを交配し、間葉系前駆細胞特異的に RA シグナルが阻害されるマウス (Pdgfra-CreER/R26^{RAR403}) を作製した。Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスにタモキシフェンを投与することで間葉系前駆細胞において RA シグナルを阻害後、骨格筋を損傷することで筋再生を誘導した。その結果、コントロールマウスでは十分に筋が再生してくる損傷 14 日後においても、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスでは再生が不十分であり、筋再生不全が認められた。Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスの筋再生過程を精査した結果、骨格筋の幹細胞である筋衛星細胞の数が減少していた。以上のことから、間葉系前駆細胞における RA シグナルは効率的な筋再生に必要であることが明らかになった。間葉系前駆細胞で RA シグナルが活性化することで、病的表現型である脂肪化を抑制すると同時に、筋衛星細胞による筋再生をサポートする性質が付与されると考えられた。

3) 間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流メカニズム

2) の研究によって、間葉系前駆細胞において RA シグナルが活性化することにより、間葉系前駆細胞に筋衛星細胞による筋再生をサポートする性質が付与されると考えられた。そこで、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスを利用して、間葉系前駆細胞における RA シグナルの下流メカニズムを調べた。筋再生過程の Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス、および、コントロールマウスから間葉系前駆細胞を単離し、RNA-seq によって比較解析を行なった。主成分分析 (PCA) の結果、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス由来間葉系前駆細胞の群は、コントロールマウス由来間葉系前駆細胞の群から大きく離れて表示され、RA シグナルの阻害によって間葉系前駆細胞の遺伝子発現は大きく影響を受けることが明らかになった。コントロールマウスと比較して、Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス由来の間葉系前駆細胞で発現上昇、および、発現減少した遺伝子群について、Gene Set Enrichment Analysis

(GSEA) を行い、どのような遺伝子セットが変動したかを調べた。その結果、発現減少した遺伝子群に、筋形成関連遺伝子が高度に濃縮されていることが明らかとなり、その中に Igf1 遺伝子が含まれていた (右図)。RA シグナルが阻害された Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウス由来間葉系前駆細胞で発現減少するので、これら遺伝子は通常は RA シグナルによって発現が促進される遺伝子と言える。また、Igf1 は筋衛星細胞の増殖、分化を促進する因子として知られていることから、2) で見られた Pdgfra-CreER/R26^{RAR403} マウスの筋再生不全や筋衛星細胞数の低下に、Igf1 の発現低下が寄与していると考えられる。以上を総合すると、間葉系前駆細胞で活性化する RA シグナルは Igf1 を含む筋形成関連遺伝子の発現を誘導し、筋衛星細胞による筋再生をサポートする良性的表現型へと間葉系前駆細胞を制御していると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nawaz Allah, Bilal Muhammad, Fujisaka Shiho, Kado Tomonobu, Aslam Muhammad Rahil, Ahmed Saeed, Okabe Keisuke, Igarashi Yoshiko, Watanabe Yoshiyuki, Kuwano Takahide, Tsuneyama Koichi, Nishimura Ayumi, Nishida Yasuhiro, Yamamoto Seiji, Sasahara Masakiyo, Imura Johji, Mori Hisashi, Uezumi Akiyoshi et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Depletion of CD206+ M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 7058-7058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-34191-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kurosawa Tamaki, Ikemoto-Uezumi Madoka, Kaneshige Akihiro, Fukada So-ichiro, Uezumi Akiyoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Whole-mount immunofluorescence staining of mesenchymal progenitors in murine plantaris muscle	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101593 ~ 101593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101593	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshimoto Y, Ikemoto-Uezumi M, Hitachi K, Fukada SI, Uezumi A	4. 巻 8:267
2. 論文標題 Methods for Accurate Assessment of Myofiber Maturity During Skeletal Muscle Regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.00267	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Zhou H, Kurosawa T, Yoshimoto Y, Nakatani M, Hitachi K, Yamaguchi H, Wakatsuki S, Araki T, Morita M, Yamada H, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Hino J, Fukada SI, Tsuchida K	4. 巻 131(1)
2. 論文標題 Mesenchymal Bmp3b expression maintains skeletal muscle integrity and decreases in age-related sarcopenia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Invest	6. 最初と最後の頁 e139617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI139617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa T, Goto M, Kaji N, Aikiyo S, Mihara T, Ikemoto-Uezumi M, Toyoda M, Kanazawa N, Nakazawa T, Hori M, Uezumi A	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Liver fibrosis-induced muscle atrophy is mediated by elevated levels of circulating TNF	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-03353-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Akiyoshi Uezumi
2. 発表標題 Mechanisms coupling muscle regeneration and resolution of inflammation
3. 学会等名 12th Japanese-French Workshop “New insights in personalized medicine for neuromuscular diseases: From Basic to Applied Myology” (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Uezumi A
2. 発表標題 Mechanism of fate decision of mesenchymal progenitors in muscle regeneration and degeneration
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上住聡芳
2. 発表標題 骨格筋老化における間質の間葉系前駆細胞の役割
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Uezumi A, Ikemoto-Uezumi M, Kurosawa T, Fukada S, Kasai T, Ohno K, Tsuchida K
2. 発表標題 Retinoic acid signaling regulates fate of mesenchymal progenitors during muscle regeneration and pathogenesis.
3. 学会等名 Frontiers in Myogenesis Meeting “ Skeletal muscle: development, regeneration and disease ” (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上住聡芳、上住円、深田宗一朗、土田邦博
2. 発表標題 筋内の異所性脂肪形成を制御するメカニズム
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	上住 円 (池本円)	九州大学・生体防御医学研究所・助教	
	(Uezumi Madoka)		
	(70435866)	(17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
フランス	Institut Pasteur		