

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03331

研究課題名（和文）1細胞解析による脂質代謝を介した骨格筋再生制御機構の解明

研究課題名（英文）Single cell analysis for tissue regeneration and lipid metabolism in skeletal muscle

研究代表者

小池 博之（Koike, Hiroyuki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：20821771

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マウス骨格筋損傷モデルにおけるシングルセルRNAシーケンスでマクロファージのサブタイプとそのシグナルを同定し、フローサイトメトリーでマクロファージサブタイプを分取して骨格筋幹細胞との相互作用を観察するという手法を用いた。これらの手法により、再生中の骨格筋組織に含まれるマクロファージは多様なサブタイプに分類可能であることを確認し、その中で一つのマクロファージサブタイプが増殖している骨格筋幹細胞と密接に相互作用していることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、サルコペニアと呼ばれる筋量の低下に関連する筋再生不全におけるマクロファージの役割とメカニズムを解明することである。筋再生は骨格筋幹細胞が活性化・増殖・分化するプロセスであり、その制御においてマクロファージが重要な細胞であることが知られている。しかし、マクロファージは多様なサブタイプに分けられ、その特性や相互作用は十分に理解されていない。本研究により明らかとなった、マクロファージサブタイプと骨格筋幹細胞の相互作用に関する知見は、サルコペニア予防・治療法開発に向けた筋再生不全の分子機構解明に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used single-cell RNA sequencing in a mouse model of skeletal muscle injury to identify macrophage subtypes and their signals, and flow cytometry to fractionate macrophage subtypes and observe their interactions with skeletal muscle stem cells. These techniques confirmed that macrophages in regenerating skeletal muscle tissue can be classified into a variety of subtypes, and suggested that one macrophage subtype among them interacts closely with proliferating skeletal muscle stem cells.

研究分野：再生医学、細胞生物学

キーワード：骨格筋 オルガノイド 再生 サルコペニア 幹細胞 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

老化に伴う疾患、特に骨格筋の量的および質的減少(サルコペニア)は、体力および身体機能低下を引き起こし、高齢者の生活の質を著しく損なう。このため、予防および治療法の開発は、高齢化が進む我が国において切迫した課題である。老化による疾患は、組織の恒常性維持機構の喪失に起因するとされており、細胞間の複雑な相互作用を解明することは、予防および治療法の開発に不可欠な知見となる。しかし、これらの相互作用は病態の進行と共に変化し、その解析は困難を極めている。また、多くの研究は遺伝子改変動物に依存しており、細胞・組織を解析可能な *in vitro* 評価系の確立が求められていた。

研究代表者は、シングルセル RNA シークエンス法を用いて、マウスの胎仔肝臓や膵臓の形成過程における上皮細胞と間葉系細胞の相互作用を解析し、WNT シグナリング経路の抑制分子が臓器形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。これらの知見を基に、ヒト iPS 細胞から肝臓-胆管-膵臓組織を連続的に生成することに成功した。これにより、幹細胞を起点とする多細胞群の機能制御には、時空間的な細胞間相互作用が重要であること、および骨格筋再生を含む恒常性維持機構や疾患発症のメカニズムにおいても同様の制御基盤が存在する可能性が示唆され、本課題設定に至った。

2. 研究の目的

本研究は、(1) 加齢マウスにおける筋再生を制御する分子基盤を解明、および (2) 骨格筋オルガノイドの構築を通じて、筋組織の恒常性破綻に関与する分子の同定を目指した。これらの目的を達成することで、組織の恒常性維持の破綻による制御異常を解析する評価系の確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) 加齢マウスにおけるシングルセル RNA シークエンス

本研究では、加齢マウス骨格筋組織を用いて、再生制御の破綻に焦点を当てた解析を行なった。2 年齢のマウス骨格筋組織に損傷を誘導し、フローサイトメーターで細胞を単離後、Chromium システムを用いてシングルセル RNA シークエンスを実施した。Seurat プログラムを用いて得られた遺伝子発現データを比較分析し、再生過程における細胞集団の動態を追跡した。さらに、リガンド-受容体ペア解析を行い、活性化しているシグナル経路を同定し、筋再生を制御する分子基盤を明らかにした。同定された分子の機能は、インヒビターおよびノックダウン実験によって検証した。

(2) 骨格筋オルガノイドの構築

骨格筋幹細胞とマクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスを用いて、骨格筋オルガノイドを創出し、三次元タイムラプスイメージングによる細胞動態の可視化を行なった。カルジオトキシンを添加することで *in vitro* での筋損傷-再生を誘導し、オルガノイドの再生中に各細胞種が示す挙動を明らかにした。

4. 研究成果

本研究では、筋再生時の細胞間相互作用の時空間的制御、および制御破綻時の相互作用の変化に焦点を当て解析を進めた。オルガノイド技術、ライブイメージングおよびシングルセル RNA シークエンスによる系譜解析技術を用いて、これらの相互作用を時空間的視点から解明を試みた。また、多細胞群から構成されるオルガノイドを創出し、異種細胞間の相互作用を解析することに成功した。

具体的な研究成果としては、以下が得られた。まず、マウスを用いた解析では、骨格筋幹細胞の増殖制御を介して骨格筋再生を担う新規なマクロファージ亜集団(mac_1)を特定した。また、mac_1 が産生する骨格筋再生制御因子の一つとして Hgf を特定した(図1)。また、mac_1 や Hgf

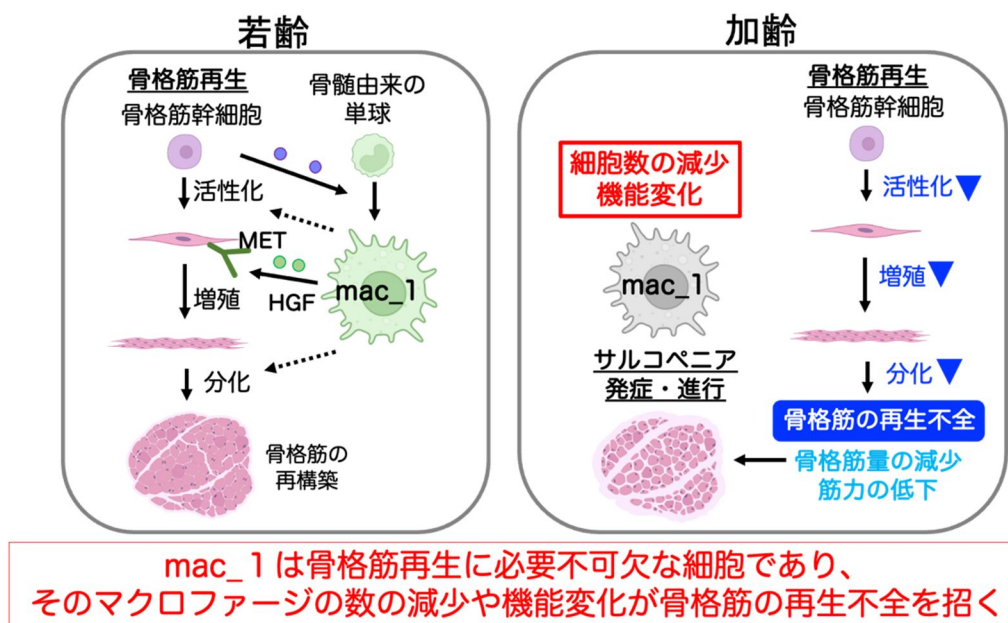


図1. 新規マクロファージ Mac1 を介した骨格筋再生機構

が骨格筋再生に必須であることを遺伝子改変マウスや阻害剤実験で示した。

本研究成果は、骨格筋再生の分子機構の解明や治療法の開発に貢献すると考えられる。マウスの解析では mac_1 や Hgf 作用を解明することが達成できた。これにより、骨格筋幹細胞と間質細胞による「炎症-再生」メカニズムの理解が深まり、サルコペニアの病態理解に寄与した。さらに、本研究で用いた多細胞からなるオルガノイドの解析手法は、炎症を通じた組織修復機構の破綻に起因する疾患の発症メカニズム解明への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

| | |
|---|------------------|
| 1. 著者名 Koike Hiroyuki, Manabe Ichiro, Oishi Yumiko | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Mechanisms of cooperative cell-cell interactions in skeletal muscle regeneration | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration | 6. 最初と最後の頁 48 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00234-6 | 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 Hayakawa Sumio, Tamura Atsushi, Nikiforov Nikita, Koike Hiroyuki, Kudo Fujimi, Cheng Yinglan, Miyazaki Takuro, Kubekina Marina, Kirichenko Tatiana V., Orekhov Alexander N., Yui Nobuhiko, Manabe Ichiro, Oishi Yumiko | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Activated cholesterol metabolism is integral for innate macrophage responses by amplifying Myd88 signaling | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 JCI Insight | 6. 最初と最後の頁 e138539 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.138539 | 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 小池 博之, 大石 由美子 | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 骨格筋萎縮に対するビタミンA誘導体の機能評価 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 実験医学 | 6. 最初と最後の頁 1027-1031 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Liu Lin, Koike Hiroyuki, Ono Takehito, Hayashi Shinichiro, Kudo Fujimi, Kaneda Atsushi, Kagechika Hiroyuki, Manabe Ichiro, Nakashima Tomoki, Oishi Yumiko | 4. 巻 118 |
| 2. 論文標題 Identification of a KLF5-dependent program and drug development for skeletal muscle atrophy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 e2102895118 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2102895118 | 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 Yuzawa Ryo, Koike Hiroyuki, Manabe Ichiro, Oishi Yumiko | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 VDR regulates simulated microgravity-induced atrophy in C2C12 myotubes | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1377 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-05354-0 | 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 Watanabe Aiko, Koike Hiroyuki, Kumagami Naoki, Shimba Shigeki, Manabe Ichiro, Oishi Yumiko | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Arntl deficiency in myeloid cells reduces neutrophil recruitment and delays skeletal muscle repair | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 6747 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-33830-8 | 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 Oishi Yumiko, Koike Hiroyuki, Kumagami Naoki, Nakagawa Yoshimi, Araki Masaya, Taketomi Yoshitaka, Miki Yoshimi, Matsuda Shigeru, Kim Hyeree, Matsuzaka Takashi, Ozawa Hitoshi, Shimano Hitoshi, Murakami Makoto, Manabe Ichiro | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Macrophage SREBP1 regulates skeletal muscle regeneration | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 1251784 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2023.1251784 | 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8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 大石 由美子 , 小池 博之 |
| 2. 発表標題 加齢による筋損傷後再生不全のメカニズム |
| 3. 学会等名 第64回日本老年医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 大石由美子, 小池博之 |
| 2. 発表標題 マクロファージの「脂質」による再生・組織修復の制御 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小池博之, 大石由美子 |
| 2. 発表標題 骨格筋幹細胞とマクロファージ亜集団の相互作用による組織修復制御 |
| 3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大石 由美子, 小池 博之 |
| 2. 発表標題 筋損傷後の再生・修復を主導する骨格筋マクロファージの多様性 |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 高田 賢, 小池 博之, 佐藤 日向, 大石 由美子 |
| 2. 発表標題 マクロファージのSREBP1aは腫瘍の増殖を制御する |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 渡辺 藍子, 小池 博之, 大石 由美子 |
| 2. 発表標題 骨髄球系細胞が持つ細胞内時計の錯乱が筋再生に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第7回 日本筋学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小池 博之 |
| 2. 発表標題 Cell-cell interactions of post-injury muscle regeneration and tissue repair |
| 3. 学会等名 From basic discovery to preclinical modeling: at the forefront of muscle disease therapies (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小池 博之 |
| 2. 発表標題 マクロファージ垂集団との細胞間相互作用解析に向けた骨格筋再生機構のモデル化 |
| 3. 学会等名 第12回AAA |
| 4. 発表年 2024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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|