

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19731

研究課題名（和文）新仮説に基づいた新規マイオカインの探索

研究課題名（英文）Identification of new myokines based on new hypotheses

研究代表者

深田 宗一郎（Fukada, So-ichiro）

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20432445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：独自の研究成果である筋間質の間葉系前駆細胞が、運動依存的なマイオカインの産生に直接・間接的にかかわるという仮説のもと、レジスタンスとレーニング、wheel running、遺伝子改変動物、RNA-seq解析などを駆使して、検証を行った。その結果、単球のリクルートに働くCcl2やCcl17が間葉系前駆細胞から主として発現していることが明らかとなった。全く新規のマイオカインの同定を試みたが、レジスタンスとレーニングモデルでは、確信をもてる因子を同定することはできなかった。しかし、筋のリモデリングの1つ細胞外マトリックスの発現には間葉系前駆細胞が大きく寄与している結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動依存的に発現するマイオカイン研究は、世界中で注目をあつめている研究領域の1つである。CCL2は運動により増加するケモカインかつマイオカインであるが、筋の間葉系前駆細胞が主として分泌している結果は、これまで筋線維のみに焦点があつていたマイオカイン研究に、一石を投じる成果であり、この研究領域の発展につながることを期待される。運動は唯一の安全で効果的なアンチエイジング法であり、その一助はマイオカインに依存していると言われている。本研究の成果を元に、運動のマイオカインを介した生命現象の解明は、人類の夢である健康長寿につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Based on our original data, we hypothesized that mesenchymal progenitor cells in the muscle stroma are directly or indirectly involved in the production of exercise-dependent myokines. To clarify this hypothesis, we performed experiments using resistance and running, wheel running, genetically modified animals and RNA-seq analysis. The results revealed that Ccl2 and Ccl17, which are involved in monocyte recruitment, are mainly expressed by mesenchymal progenitor cells. Further we attempted to identify novel myokines, but the resistance training model failed to identify confident factors. However, we found that a significant contribution of mesenchymal progenitor cells to the expression of the extracellular matrix, a component of muscle remodelling.

研究分野：筋生理学、幹細胞生物学

キーワード：マイオカイン 間葉系前駆細胞 リモデリング

1. 研究開始当初の背景

レジスタンストレーニング・運動による筋のリモデリングは機械刺激で誘導される生体応答の代表例である。申請者は機械刺激トランスデューサーとしての機能をもつ転写共役因子 Yap1 及び補完的に働く Taz を骨格筋の間質に存在する間葉系前駆細胞で特異的に欠損させ、アキレス腱切除による過負荷筋肥大モデルを誘導すると、局所的な筋のリモデリングである、筋線維サイズの増加、筋線維核数の増加、筋幹細胞の増殖が顕著に抑制されることを見出した (Cell Stem Cell, 2022)。RNA-seq 解析により、間葉系前駆細胞は負荷依存的に血管新生因子、神経栄養因子、報告のあるマイオカイン (IL-6, Sparc, LIF, Osteoprotegerin (OPG)/Tnfrsf11b, BDNF, Ccl2 など) (Front Physiol. 2019) を発現していることも同時に見出していた。運動依存的なマイオカインに関する研究は、全て骨格筋の主たる実質細胞 筋線維 が分泌する因子であり、骨格筋に存在する筋線維以外の細胞のマイオカイン産生における役割は全くわかっていなかった。そこで、本申請課題では、運動依存的に分泌されるマイオカインの起源が従来考えられている筋線維ではなく、間質の間葉系前駆細胞であるという仮説を検証することを目的に研究を行った。

2. 研究の目的

運動には様々な効果があり、健康寿命延伸のためには運動は安全で最良の方法である。一方で、高齢者に無理な運動を強いることは転倒による骨折など別のリスクを伴う。そのため、分子レベルでの運動効果解明が健康寿命延伸に向けた課題の1つである。

運動には、全身性の効果と局所的な効果がある。全身性の効果の一部は、骨格筋由来の生理活性物質 (マイオカイン) が機能していると考えられている。局所的な効果としては、血管新生、細胞外マトリックスのリモデリング、筋線維の肥大・筋線維核数の増加などにより、骨格筋自体に形成・形状的な変化がうまれる。申請者は、「レジスタンストレーニングを模倣する筋幹細胞活性化分子の探索」の課題で、R2-3年の挑戦的萌芽 (萌芽) に採択して頂いた研究により、骨格筋に常在する間葉系前駆細胞が筋幹細胞 (サテライト細胞) の増殖促進を介して、筋線維肥大・筋線維核数の増加に必須であることを見出した。さらに、間葉系前駆細胞特異的に機械刺激センサーとして働く Yap1/Taz を欠損させた場合にも、筋線維肥大・筋線維核数の増加が抑制された。また、血管新生因子 (Vegfa)、神経栄養因子 (Npy, Bdnf)、細胞外マトリックなどの遺伝子発現も過負荷筋間葉系前駆細胞で増加する。以上の結果は、レジスタンストレーニングにおける局所的な作用に、間葉系前駆細胞が必須であることを示している。さらに特筆すべきは、間葉系前駆細胞はマイオカインとして報告されている多数の因子が発現しており、その発現が過負荷筋で増加し、一部は Yap1/Taz 欠損の間葉系前駆細胞では減少していた。そこで、本申請課題では FAP 細胞が直接・間接的にマイオカイン発現に働く仮説をたて、運動依存的に放出される新規マイオカイン同定を目指した検討を行う。

3. 研究の方法

培養した間葉系前駆細胞も様々な液性因子を放出している。間葉系前駆細胞の培養上清を用いた、安定同位体標識 Tandem Mass Tag™ (TMT) 試薬を用いた SHIMADZU の TMT 解析または、Shut gun による解析を実施するために、間葉系前駆細胞の培養を行なった。

しかし、1度の継代をすることで間葉系前駆細胞の性質が大きく変わることを経験した。そこで、より生理的な条件かつ間接的な評価も検討するために、間葉系前駆細胞自体を欠損させたマウスや間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスおよび、コントロールマウスに外科的に足底筋に負荷を誘導後、その足底筋を摘出し、既已取得していた細胞の RNA-seq ではなく、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスの足底筋全体を用いた RNA-seq 解析を実施した。比較対象としてコントロールマウスの過負荷足底筋および、両マウスの sham 筋も準備し、RNA-seq 解析の比較検討を実施した。また、一般的に、レジスタンストレーニング

グと running のような exercise では放出されるマイオカインが異なることが知られているため、回転ケージを用いた自発運動を間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスに実施し、外科的な過負荷モデル同様、筋のリモデリングに影響がでるかも検証した。また、運動依存的なマイオカインとして知られている IL-6 の血液中の量を、回転ケージを用いた自発運動モデルと、トレッドミルを用いた強制運動モデルで比較した。

4. 研究成果

・間葉系前駆細胞自体を欠損させたマウスでは、単球をリクルートする際に必須のケモカイン CCL2 や CCL7 の発現が有意に減少していた。実際に浸潤マクロファージ数が間葉系前駆細胞自体を欠損させたマウスでは減少していた。また、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスでも CCL2 や CCL7 の減少傾向は近全体を用いたサンプルで確認できたが、ばらつきが大きく有意差を得ることはできなかった。これら成果は筋肥大時における、間葉系前駆細胞 マクロファージ-サテライト細胞間のネットワークの内、間葉系前駆細胞とマクロファージをつなぐ経路として論文発表を行った。これらの結果は、少なくとも CCL2 や CCL7 などのマイオカインの起源として、間葉系前駆細胞が主たる細胞であることが明らかとなった。

・RNA-seq 解析の結果、コントロール過負荷筋と比較して、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスでは、コラーゲンをはじめとして細胞外マトリックス蛋白の発現が減少傾向にあった。これは、筋のリモデリングの 1 つである細胞外マトリックス蛋白の分泌に間葉系前駆細胞内の YAP/TAZ が機能していることを示唆している。また、マイオカインとして知られている分泌因子の中で、CCL7 や SPARC の発現が間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスで減少傾向を示した。これは、申請者らの以前行った単離間葉系前駆細胞による RNA-seq の結果や、CCL7 に関しては上記の結果と一致していた。以上の結果より、これまで申請者が明らかにしてきた間葉系前駆細胞による筋サテライト細胞の制御以外にも、過負荷筋においては免疫系の細胞の浸潤や細胞外マトリックスを介した筋のリモデリングにも寄与していることが明らかとなった。しかし、全く新しいマイオカイン候補となる遺伝子は現在までのところ見つかっていない。

・レジスタンストレーニングと exercise では発現するマイオカインが異なることが知られている。しかし、自発運動モデルとトレッドミルを用いた運動で、IL-6 の発現量を比較した研究はほとんどない。驚くことに、強制運動モデルよりも、自発運動モデルの方が運動依存的な IL-6 の血液中の量が数十倍以上高いことも明らかとなった。IL-6 は筋線維から分泌される最も有名なマイオカインであるが、間葉系前駆細胞が筋組織で最も高発現するサイトカインでもある。現在、間葉系前駆細胞特異的に IL-6 を欠損させることのできる実験系を検討しており、結果によっては、マイオカインにおける概念を根底から覆る可能性がある。また、新規マイオカインの同定には、自発運動モデルのサンプルがもっとも適している可能性がある事が明らかとなった。

・回転ケージを用いて、間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスに自発運動を 2 週間実施させた。その後、後肢で運動負荷を受ける事が知られている、足底筋・ヒラメ筋を摘出し、筋重量を測定した。運動量にばらつきがあり、十分な匹数を確保することができていないが、コントロールと間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスで大きな違いは見られなかった。一般的に、レジスタンストレーニングモデルと比較して、自発運動による筋重量増加は僅かであるため、コントロールと間葉系前駆細胞特異的な YAP/TAZ 欠損マウスで差を見ることは困難であったと考えられる。しかし、マイオカインの発現を見るためには、最も優れた実験系である可能性が高いため、現在これらサンプルを用いた遺伝子発現の比較を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhang L, Saito H, Higashimoto T, Kaji T, Nakamura A, Iwamori K, Nagano R, Motooka D, Okuzaki D, Uezumi A, Seno S, Fukada SI	4. 巻 43
2. 論文標題 Regulation of Muscle Hypertrophy through Granulin: Relayed Communication among Mesenchymal Progenitors, Macrophages, and Satellite Cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 114052
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.114052.	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 Kang X, Zhao K, Huang Z, Fukada SI*, Gi X*, Miao H*	4. 巻 in press
2. 論文標題 Pdgfr + stromal cells, a key regulator for tissue homeostasis and dysfunction in distinct organs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes & Diseases	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 Kubota M, Zhang L, Fukada SI.	4. 巻 26
2. 論文標題 Flow Cytometer Analyses, Isolation, and Staining of Murine Muscle Satellite Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 3-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-3036-5_1.	査読の有無 有
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 Fukada SI, Uezumi A.	4. 巻 41
2. 論文標題 Roles and heterogeneity of mesenchymal progenitors in muscle homeostasis, hypertrophy, and disease.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells	6. 最初と最後の頁 552-559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stmcls/sxad023.	査読の有無 有
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 Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Kaneshige A, Fukada SI, Uezumi A.	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 Protoc	6. 最初と最後の頁 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 Kaneshige A, Kaji T, Saito H, Higashimoto T, Nakamura A, Kurosawa T, Ikemoto-Uezumi M, Uezumi A, Fukada SI.	4. 巻 3
2. 論文標題 Detection of muscle stem cell-derived myonuclei in murine overloaded muscles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc	6. 最初と最後の頁 101307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101307.	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 Fukada SI, Higashimoto T, Kaneshige A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Differences in muscle satellite cell dynamics during muscle hypertrophy and regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Skelet Muscle	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13395-022-00300-0.	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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 深田宗一朗
2. 発表標題 骨格筋の再生・肥大機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 深田宗一朗
2. 発表標題 骨格筋のストレス応答: 力学的負荷への骨格筋内の細胞応答
3. 学会等名 第8回日本筋学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022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
---------	---------