

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20178

研究課題名(和文)骨格筋の恒常性維持を担う筋衛星細胞-マクロファージ間の相互作用解析

研究課題名(英文) Analysis of interaction between skeletal muscle satellite cells and macrophages for maintenance of tissue homeostasis

研究代表者

小池 博之 (Koike, Hiroyuki)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20821771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による骨格筋の減少(サルコペニア)は、筋再生不全を背景として発症し、体力を低下させる大きな要因となる。損傷を受けた筋組織では、特異的な組織幹細胞(筋衛星細胞)を主体とした筋修復と炎症・炎症収束とが生じており、筋再生にはそれらが適切に制御されることが必須であるが、その制御機構の実態は未解明である。本研究では、シングルセル解析を基盤に、筋衛星細胞とマクロファージが相互に連携しながら筋再生を制御する分子機構を時空間的な視点から解析することを試みた。本研究により得られた知見は、加齢や代謝異常に起因する筋再生の破綻についての理解を深め、新たな治療標的分子の同定につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニアは体力や身体機能の低下を招き、高齢者の Quality of Life を低下させる。その予防・治療法の開発は本邦において急務の課題である。本研究では、筋衛星細胞とマクロファージとで交わされる時空間的な制御機構に焦点を当てながら、この課題解決を試みた。本研究により得られた知見は、骨格筋組織再生不全に起因する現象についての理解を深め、新たな治療標的分子の同定につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Aging-related loss of skeletal muscle mass, sarcopenia, develops with a muscle regeneration deficiency and is one of the major factor in reducing physical fitness. In damaged muscle tissue, the tissue inflammation and repair which are mainly composed of skeletal muscle satellite cells, occur, and it is essential that they are properly controlled during muscle regeneration. However, the actual state of the control mechanism is unclear. In this study, based on single-cell analysis, we attempted to analyze the molecular mechanism that controls muscle regeneration while muscle satellite cells and macrophages cooperate with each other from a spatiotemporal perspective. The findings obtained from this study are expected to deepen the understanding of the disruption of muscle regeneration caused by aging and metabolic disorders, and lead to the identification of new therapeutic target molecules.

研究分野：細胞生物学

キーワード：骨格筋 マクロファージ 再生 炎症 サルコペニア

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

加齢による骨格筋量の減少（サルコペニア）は、筋再生不全を背景として発症し、高齢者の体力を低下させる大きな要因となる。損傷を受けた筋組織では、組織幹細胞（筋衛星細胞）を主体とした筋修復と、炎症・炎症収束とが生じており、筋再生が正常に進行するにはそれらが適切に制御されることが必須であるが、その制御機構の実態は未解明である。

組織の恒常性維持を担う分子機構の解明は生活習慣病や加齢に起因する病態の理解や治療法開発に必須であるが、従来の研究の多くは遺伝子改変動物を対象とした解析であり、より簡便に細胞・組織を解析可能な *in vitro* 評価系の確立が望まれてきた。一方、研究代表者らは肝臓発生初期プロセスで生じる血管および間葉系細胞との相互作用の人為的再現により、ヒト人工多能性幹細胞（iPS 細胞）由来肝芽細胞の自己組織化を誘導し、*in vitro* において臓器の原型となる小型立体器官（オルガノイド）創出法を開発した [H. Koike, *et al*, *Development*, 2017]。近年では、より緻密な生体内環境の再現を目的に当手法を発展させ、ヒト iPS 細胞から免疫系細胞を含む多細胞群から構成される肝臓オルガノイドの創出に成功し、炎症や線維化の *in vitro* モデルとしての有用性を確認している [R. Ouchi, *et al*, *Cell Metabolism*, 2019]。

そこで、このオルガノイド誘導技術を基盤として、本研究では筋衛星細胞を中心とする実組織の細胞社会を反映した *in vitro* 解析系構築する。また、筋損傷後の炎症を誘導するマクロファージの時系列的な機能変化と筋再生の関連性に着目して、筋衛星細胞との相互作用解明を試みる。すなわち、シングルセルレベルでの解析を基盤に、筋衛星細胞とマクロファージが相互に連携しながら筋再生を制御する分子機構およびその制御破綻を時空間的な視点から解析する。

2. 研究の目的

本研究では、多細胞群から構成される複雑系オルガノイド誘導技術を基盤として、筋衛星細胞を中心とする実組織の細胞社会を反映した *in vitro* 解析系構築する。さらに、申請者がこれまで取り組んできた、CRISPR-Cas9 システムで樹立した蛍光レポーター iPS 細胞の 3 次元ライブイメージング技術 [H. Koike, *et al*, *Nature*, 2019]、および時系列的シングルセルトランスクリプトーム解析技術 [L. Han, *et al*, *Nature communications*, 2020] を組み合わせることで、筋衛星細胞を起点とした筋組織の損傷・再生過程を時空間的に捉える。これらの試みを通じて、免疫系細胞や筋衛星細胞などから構成された骨格筋細胞集団が担う、組織恒常性維持における一連の細胞動態と細胞間クロストークを *in vitro* で時空間的に解析することで、骨格筋再生の制御機構およびその制御破綻において生じている協調的相互作用の一端の解明を試みる。本研究で得られる筋再生破綻のメカニズムに関する知見は、組織幹細胞と免疫細胞による生体制御システム連関の理解につながるとともに、本研究を通じて確立される多細胞の時空間的制御を対象とする解析手法は、例えば線維化進行による非アルコール性脂肪肝炎など、生体の修復機構の破綻に起因する疾患の発症メカニズム解明に広く適用できることが期待できる。将来的に、細胞・臓器間を横断する包括的な恒常性維持機構の理解とその破綻機構の解明が可能となれば、創薬産業などに画期的進歩をもたらす、多くの患者を救済する新規治療法となる。

3. 研究の方法

(1) マウス生体内の筋組織再生過程における細胞動態・細胞間相互作用解析

①細胞局在の経時的な変動追跡

筋衛星細胞とマクロファージとの空間的配置情報を取得するため、マクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスを対象に、組織透明化処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて筋組織中の三次元的な局在情報を取得した。カルジオトキシン誘導性筋損傷モデルを作出し、これら細胞群の形質や数の経時的な変動を、各細胞に特異的な表面マーカー抗体の多重染色によるフローサイトメトリーを用いて明らかにすることを試みた。

②シングルセル RNA シークエンスを用いた筋再生を制御する分子基盤の解析

筋組織の炎症や再生が見られる時期を対象に、筋組織中の筋衛星細胞、マクロファージおよび周囲の間葉系細胞を対象としたシングルセル RNA シークエンスを実施し、筋衛星細胞とマクロファージの相互作用の解析を進めた。得られた遺伝子発現プロファイルをもとにリガンド受容体ペア解析を行い、各細胞間で有意に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することを試みた。

(2) マウス初代細胞を用いたオルガノイド創出

①マウス筋衛星細胞を用いたオルガノイド創出

筋衛星細胞へ与えるマクロファージの影響を時空間的に *in vitro* で評価することを目的に、マウス筋組織よりフローサイトメトリー法を用いて各細胞集団を単離し、オルガノイド誘導法を用いて共培養評価系の確立を試みた。

②蛍光レポーターマウス由来細胞を用いたオルガノイド内部細胞動態の可視化

オルガノイド内部の細胞動態の可視化を目的に、筋衛星細胞およびマクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスの筋組織からフローサイトメトリー法により単離した細胞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解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス生体内の筋組織再生過程における細胞動態・細胞間相互作用解析

①細胞局在の経時的な変動追跡

まず、骨格筋組織中の細胞群の形質や数の経時的な変動を、各細胞に特異的な表面マーカー抗体の多重染色によるフローサイトメトリーを用いて解析した結果、損傷3日目に炎症性のマクロファージの存在頻度がピークに達することが確認された。

そこで、マクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスを対象に、カルジオトキシン誘導性筋損傷モデルを作出した。得られた組織に対して組織透明化処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて筋組織中の三次元的な局在情報を取得した結果、炎症反応の活性化が見られる損傷3日目の組織では、一部のマクロファージが骨格筋線維の周囲に密接に集積していることが確認された(図1a)。

②シングルセル RNA シークエンスを用いた筋再生を制御する分子基盤の解析

①で得られた結果をもとに、損傷前あるいは損傷後3日目の炎症期の骨格筋組織からフローサイトメトリーで単離した筋衛星細胞、マクロファージおよび周囲の間葉系細胞を対象に、Chromium システムによるシングルセル RNA シークエンスを実施した。次世代シーケンサーを用いてライブラリの塩基配列を決定し、各遺伝子にマップされたリード数から発現量を定量化した後、Seurat を用いた解析を行った。データの可視化には再現性が高いとされる UMAP (uniform manifold approximation) を用いた。続いて組織に含まれる細胞集団を特定するために Seurat を用いてクラスターへ分割した。その結果、骨格筋から回収した細胞は大きく9つのクラスターに分けることができた(図1b)。それぞれのクラスターについてマーカー遺伝子の発現を比較することで、それぞれのどのような細胞集団であるか特定した。

分割されたクラスターのうち、筋衛星細胞と筋芽細胞を含む集団を抽出し、Monocle による擬時間解析と呼ばれる手法を用いて連続的な細胞分化状態の遷移プロセスを捉えることを試みた(図1b)抽出された細胞集団に対し、未分化なマーカーと分化マーカーの発現量を比較したところ、擬時間軸の進行に伴って、筋衛星細胞の分化が進むことが確認され、また、分化途上にある細胞集団では、細胞周期に関わる遺伝子発現が亢進しており、活発に増殖していること

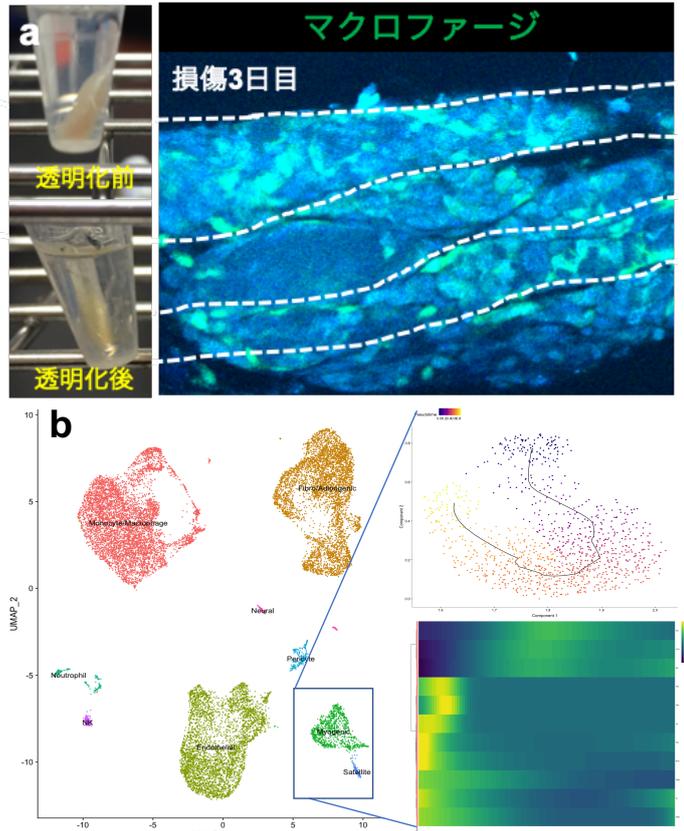


図 1. a) CUBIC 法による組織透明化を行った骨格筋組織(左)の共焦点解析像(右). b) シングルセルトランスクリプトーム解析によるクラスタリング(左)と擬時間解析による筋衛星細胞の遺伝子発現変化(右).

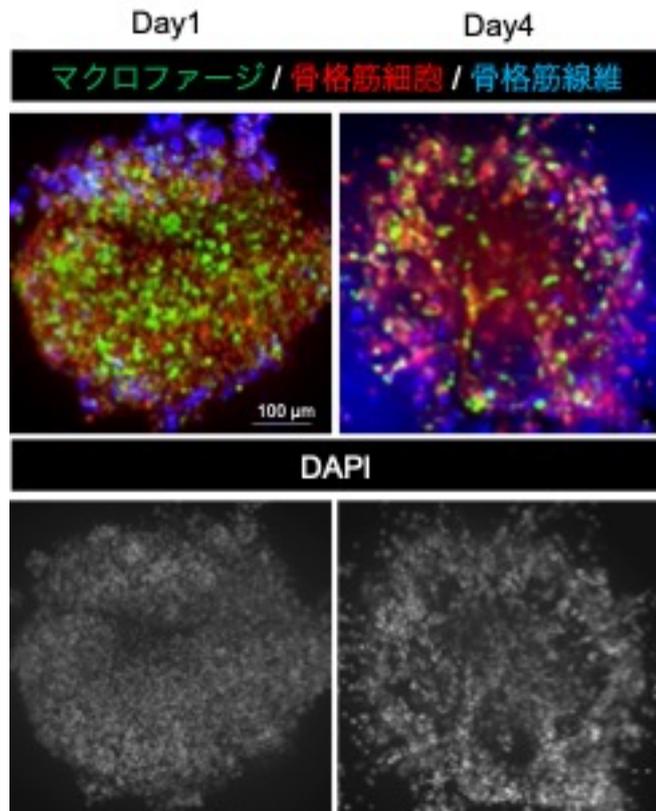


図 2. 骨格筋オルガノイドの構築

が示唆された (図 1b)。さらにこの細胞集団で細胞膜受容体の発現を網羅的に解析した結果、増殖の活性化している時期特異的に発現増加が見られる分子を特定することに成功した。

(2) マウス初代細胞を用いたオルガノイド創出条件の最適化

① マウス筋衛星細胞を用いたオルガノイド創出

筋衛星細胞へ与えるマクロファージの影響を時空間的に *in vitro* で評価することを目的に、マウス筋組織よりフローサイトメトリー法を用いて各細胞集団を単離し、オルガノイド誘導法を用いて共培養評価系の確立を試みた。損傷を与えた骨格筋から単離した細胞を用いて培養条件を検討したところ、独自の3次元培養法により、筋衛星細胞とマクロファージから立体的なオルガノイドが構築されることが確認された。このオルガノイドは、マクロファージ存在下で培養を継続することで、骨格筋線維を内包した構造へと成長することが明らかとなった。

② 蛍光レポーターマウス由来細胞を用いたオルガノイド内部細胞動態の可視化

オルガノイド内部の細胞動態の可視化を目的に、筋衛星細胞およびマクロファージ特異的な蛍光レポーターマウスの筋組織からフローサイトメトリー法により単離した細胞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解析を行った。構築されたオルガノイド内部に存在するマクロファージが検出された。また、培養が進行するにつれて、骨格筋筋衛星細胞集団の増殖と融合が進行し、分化した骨格筋線維が構築されることが確認された (図 2)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小池 博之, 大石 由美子	4. 巻 276
2. 論文標題 骨格筋組織再生を対象としたシングルセルRNA-seq解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 443-447
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 藍子, 小池 博之, 大石 由美子
2. 発表標題 マクロファージの細胞内時計錯乱による炎症応答の遅延が筋再生に与える影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊上 尚樹, 小池 博之, 渡辺 藍子, 早川 清雄, 眞鍋 一郎, 大石 由美子
2. 発表標題 不飽和脂肪酸代謝遺伝子の欠損による単球の遊走能低下は筋再生を遅延させる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 藍子, 小池 博之, 大石 由美子
2. 発表標題 マクロファージの細胞内時計の錯乱が筋再生に与える影響
3. 学会等名 第7回若手による骨格筋細胞研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池 博之 , 大石 由美子
2. 発表標題 シングルセルトランスクリプトームによる骨格筋再生における細胞間相互作用解析
3. 学会等名 第1回 PHILLOSOPHY
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 劉 琳 , 小池 博之 , 林 晋一郎 , 淺原 弘嗣 , 大石 由美子
2. 発表標題 Zinc-finger transcription factor KLF5 is involved in the pathogenesis of muscle atrophy
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡辺 藍子 , 小池 博之 , 大石 由美子
2. 発表標題 時計遺伝子 Bmal1 欠損によるマクロファージ形質変化の阻害は 筋再生を遅延させる
3. 学会等名 日本筋学会第5回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小池 博之
2. 発表標題 免疫細胞と骨格筋幹細胞のクロストークによる再生制御機構
3. 学会等名 第88回日本医科大学医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池博之, 大石由美子
2. 発表標題 シングルセルトランスクリプトーム解析からみた骨格筋再生における細胞間相互作用の変化
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小池 博之
2. 発表標題 不飽和脂肪酸代謝による 骨格筋再生における免疫細胞の機能制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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