

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19179

研究課題名（和文）リポドーム解析を利用した“真”の脂肪分化誘導因子の同定

研究課題名（英文）Identification of "true" adipogenic inducing factors using lipidome analysis

研究代表者

山内 啓太郎（Yamanouchi, Keitaro）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：70272440

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）：筋肉内の脂肪細胞蓄積のメカニズム解明を目的とし、筋細胞の老化が脂肪分化誘導作用を持つ脂質を介して間葉系前駆細胞の脂肪分化を誘導するという仮説を検証した。MyoDを抑制した骨格筋由来の初代培養系で脂肪細胞の出現と細胞老化因子の発現増加を確認し、ホモ化MyoD-GFP/DMDラットで筋肉内脂肪蓄積の顕著な増加を観察した。さらに、空間トランスクリプトーム解析により、脂肪分化誘導因子を産生すると思われる細胞の局在を明らかにし、特定の間葉系前駆細胞が脂肪分化を誘導する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、筋細胞の老化が脂肪細胞分化に与える影響とそのメカニズムを解明し、筋肉内脂肪細胞蓄積の新たな知見を提供した。MyoD抑制による筋細胞老化と脂肪細胞分化の関連性や、脂肪分化誘導因子を産生する細胞の局在を明らかにしたことは、筋疾患や加齢による筋機能低下の理解を深化させる重要な発見である。さらにこの研究成果は、筋ジストロフィーやサルコペニアなどの筋疾患の治療法開発に寄与する可能性がある。また、家畜における霜降り肉の形成メカニズム解明にも貢献し、畜産業の品質向上や効率化に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the mechanism of intramuscular fat cell accumulation, testing the hypothesis that senescence of myogenic cells induces mesenchymal progenitor cell adipogenesis through lipid factors with adipogenic properties. In primary cultured skeletal muscle cells with suppressed MyoD expression, the appearance of fat cells and increased expression of cellular senescence markers were observed. In homozygous MyoD-GFP/DMD rats, a significant increase in intramuscular fat accumulation was noted. Additionally, spatial transcriptome analysis revealed the localization of cells potentially producing adipogenic factors, suggesting that specific mesenchymal progenitor cells may induce adipogenesis.

研究分野：筋再生学

キーワード：脂肪分化 細胞老化 筋ジストロフィー 脂肪交雑 脂質

1. 研究開始当初の背景

家畜ではいわゆる「霜降り(脂肪交雑)」とよばれる筋肉内脂肪蓄積がおこる。一方、筋ジストロフィーやサルコペニア(加齢性筋減弱症)といった筋疾患では筋肉内に通常みられない脂肪細胞が出現する。筋肉内に出現する脂肪細胞の起源はいずれの例でも脂肪分化能をもつ間葉系前駆細胞であることから、霜降りと筋疾患でおこる脂肪細胞の出現には共通した機序の存在が想定される。

脂肪細胞は前駆細胞からの分化により生じる。その制御機構に関する研究は、非生理的濃度のインスリンやデキサメタゾンを含む、いわゆる「脂肪分化誘導培地」で培養した際の成長因子やホルモンの効果について検討したものがほとんどで、それら因子は厳密には「脂肪分化を正や負に調節する因子」であって「脂肪分化を直接誘導する因子そのもの」ではない。したがって、生体内で実際に脂肪細胞の分化を直接引きおこす真の因子については明らかになっていない。

我々は、ヒト筋ジストロフィーモデルラット(DMDラット)では病態の進行とともに筋細胞の老化がおこることを報告した。興味深いことに、DMDラット筋肉での脂肪蓄積は筋細胞の老化とほぼ同期していた。筋肉内脂肪蓄積を呈するサルコペニアでも筋細胞の老化が生じていることから、『筋細胞の老化が間葉系前駆細胞の脂肪分化の直接の引き金となっている』可能性が考えられる。

家畜において脂肪交雑が生じる機序を解明する目的で、品種間での遺伝学的解析、筋肉におけるプロテオーム解析やトランスクリプトーム解析等が行われてきたが、未だ決定的な機序やそれを担う因子は明らかとなっていない。細胞老化に伴い、産生されるプロスタグランジン(PGs)などの脂質やその代謝産物の種類が変化する。15-deoxy-delta12,14-PGJ2(15d-PGJ2)は、脂肪分化のマスター因子である核内受容体 PPAR γ のリガンドになり得ることが報告されている唯一のPGであるが、生体内のレベルは微量であり、実際に機能している可能性は低い。そのため脂肪分化を誘導しうる他の内因性PGsの存在が想定されるが、PGsは従来の解析手法では検出できないため、新たな探索系の導入が必要である。

2. 研究の目的

本研究では『筋細胞の老化が脂肪分化誘導作用をもつPGsなどの脂質を介して周囲の間葉系前駆細胞の脂肪分化を誘導する』という仮説を検証し、最終的には脂肪分化を直接誘導する因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MyoD に対する siRNA を導入したラット骨格筋初代培養細胞における遺伝子発現解析

ラット後肢の骨格筋から筋前駆細胞、間葉系前駆細胞を含む単核の細胞群を酵素処理により単離した。ラット MyoD に対する siRNA を導入し 4 日間培養したのちに RNA を抽出し、細胞老化因子や SASP 因子の発現を半定量的 RT-PCR により解析した。

(2) ホモ化 MyoD-GFP ラット骨格筋に由来する初代培養細胞の筋分化能解析

ホモ化 MyoD-GFP ラット骨格筋および野生型ラット骨格筋から採取した単核の細胞を培養し、Myogenin の発現を免疫染色により経時的に観察した。

(3) ホモ化 MyoD-GFP/DMD ラットの作出と表現型解析

ホモ化 MyoD-GFP と DMD ラットを掛け合わせるにより、ホモ化 MyoD-GFP/DMD ラットを作出した。後肢の前脛骨筋や長趾伸筋を採取し、凍結切片を作成した。切片におけ

るペリリピン陽性細胞（脂肪細胞）や胎子型ミオシン重鎖陽性細胞（再生筋線維）の数をかぞえ、DMD ラットとの間で比較した。

（４）空間トランスクリプトーム解析

10 x Genomics の Visium を用いた。空間トランスクリプトーム解析により得られた切片上の書くスポットのクラスタリングを行い、さらに過去に得られている DMD ラット骨格筋のシングルセル RNAseq のデータと統合した。

4．研究成果

（１）MyoD 発現を低下させた骨格筋初代培養細胞では細胞老化因子の発現が亢進する

MyoD の発現を siRNA により阻害したラット骨格筋初代培養細胞では脂肪細胞の出現がおこるが、この時、細胞老化因子である p19 や SASP 因子である CCL2 や IL-6 の発現増加が生じていた。このことは MyoD の発現阻害により筋細胞の細胞老化が生じ、それが引き金となって間葉系前駆細胞からの脂肪分化を誘導している可能性を示すものである。

（２）ホモ化 MyoD-GFP ラットでは MyoD 機能が低下している

我々のこれまでの研究により、MyoD を欠損したラットは出生直後に呼吸不全により死亡することが判明している。したがって（１）の結果を *in vivo* で検証するために MyoD を欠損した動物を用いることができない。我々はこれまでに MyoD 遺伝子の下流に GFP 遺伝子をノックインすることで、MyoD-GFP 融合タンパク質を発現するラットの作製に成功している。このラットで MyoD-GFP をホモ化すると MyoD の機能が阻害されることを見出した。ホモ化 MyoD-GFP ラットは正常に成長するものの、骨格筋から採取した筋前駆細胞を培養したところ Myogenin の発現誘導が阻害されており、その後の筋分化がおこらないことが判明した。

（３）ホモ化 MyoD-GFP/DMD ラットの作出と表現型解析

そこで（２）の結果から、ホモ化 MyoD-GFP ラットを MyoD 機能が阻害されたラットと位置づけ、これを DMD ラットと掛け合わせることでホモ化 MyoD-GFP/DMD ラットを作出した。ホモ化 MyoD-GFP/DMD ラットは DMD ラットに比べて病態の進行が早く、筋再生能が著しく低下していた。さらに、４ヶ月齢における骨格筋内脂肪蓄積は前脛骨筋で DMD ラットの約 3 倍、長趾伸筋では約 10 倍に増加していた。この知見は MyoD 機能の阻害により間葉系前駆細胞からの脂肪分化が誘導されるという過去の *in vitro* での結果と合致するものであった。

（４）ホモ化 MyoD-GFP/DMD ラット骨格筋における空間トランスクリプトーム解析

本研究課題では間葉系前駆細胞の脂肪分化を誘導する因子として PGs などの脂質を想定している。これらの脂質は生体内での半減期が極めて短いという特徴をもつ。したがって、骨格筋内である種の細胞から産生され、脂肪分化誘導作用をもつような脂質が存在した場合、それは近傍の細胞に局所的に作用するものと想定される。そうであれば、そのような因子を産生する細胞は骨格筋内で脂肪が出現している部位に近接して存在することが考えられる。

近年実用化されている空間トランスクリプトームは、組織内に存在する各種細胞の位置情報を保持したまま遺伝子発現解析を行えるという利点をもつ。そこで、2022 年度の先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム（第 2 期先進ゲノム支援）の協力のもと、骨格筋内脂肪蓄積が亢進しているホモ化 MyoD-GFP/DMD ラット長趾伸筋切片における空間トランスクリ

ブトーム解析を行った。その結果、間葉系前駆細胞の中でも高い脂肪分化能をもつとされる Dpp4 陽性間葉系前駆細胞の周囲に存在する CxCl14 陽性間葉系前駆細胞が Dpp4 陽性間葉系前駆細胞の脂肪分化を誘導している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	村田 幸久 (Murata Takahisa) (40422365)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授 (12601)	

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