

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19600

研究課題名（和文）空間的トランスオミクス解析による異所性骨化過程の解析と疾患応用

研究課題名（英文）Spatial trans-omics analysis of heterotopic ossification process and disease application

研究代表者

金 永輝（Jin, Yonghui）

京都大学・医生物学研究所・助教

研究者番号：90620344

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：異所性骨化とは、軟部組織に骨が形成される現象であり、軟骨形成を経る内軟骨骨化により発症する。本研究では、遺伝性の異所性骨化疾患である進行性骨化性線維異形成症のモデルマウスを対象に、シングルセルRNAシーケンシング解析、空間的遺伝子発現解析およびイメージング質量分析という革新的解析技術を駆使して、異所性骨の形成において重要な役割を担う起源細胞とマクロファージを解析した。前駆細胞の活性化と軟骨細胞への分化の過程でミトコンドリア生合成が上昇し、その阻害剤により軟骨細胞への分化が抑制されることを単細胞レベルで解析した。また、マクロファージの各サブタイプを同定し、前駆細胞との相互作用を推測した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の特徴は、組織学的解析、遺伝子発現解析、そしてエネルギー代謝解析という、これまで別個の解析として実施されていた3種類の解析を最新の技術を用いて統合することで、異所性骨形成に関わる起源細胞と炎症細胞であるマクロファージを同一空間において、それぞれの増殖分化過程を把握することである。空間的情報を加味することにより、細胞間の相互作用を正確に把握することが可能となり、これまで隠されていた情報が得られることができ、極めて新規性の高い研究である。更にその成果は、進行性骨化性線維異形成症という難治性疾患の新規治療法の開発にも結びつく可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：Heterotopic ossification is a phenomenon in which bone forms in soft tissues and is caused by endochondral ossification through chondrogenesis. In this study, we used innovative analytical techniques: single-cell RNA sequencing analysis, spatial gene expression analysis, and imaging mass spectrometry, in a mouse model of fibrodysplasia ossificans progressiva, an inherited heterotopic ossification disease, to analyze the cell of origin and macrophages that play an important role in the formation of heterotopic bone. We analyzed at the single cell level that mitochondrial biosynthesis is elevated during the activation of progenitor cells and their differentiation into chondrocytes, and that inhibitor of mitochondrial activity inhibit their differentiation into chondrocytes. We also identified each subtype of macrophages and inferred their interaction with progenitor cells.

研究分野：幹細胞生物学、疾患病理学、再生医学

キーワード：異所性骨化 空間的遺伝子発現解析 進行性骨化性線維異形成症

## 1. 研究開始当初の背景

異所性骨化 (Heterotopic Ossification、以下 HO) とは、生理的には骨が形成されない軟部組織に骨が形成される現象であり、組織中に存在する骨形成能を有する細胞 (前駆細胞) が、局所に発生した骨形成シグナルにより骨化過程を開始する。その骨化の機序としては軟骨形成を経る内軟骨骨化である。患者由来 iPS 細胞を活用した病態再現から、我々はこれまでに遺伝性の HO 疾患である進行性骨化性線維異形成症 (以下 FOP) の病態解析を行い、原因遺伝子である I 型 BMP 受容体の 1 つの ACVR1 (以下 FOP-ACVR1) が変異により本来のリガンドではない Activin A に反応し、BMP シグナルを誘導することにより、mTORC1 が活性化され、HO 形成に至ることを明らかにした (Hino et al. PNAS, 2015; Hino et al. JCI, 2017)。さらに、HO 形成に寄与する mTORC1 の下流因子を解析する中、FOP 細胞が軟骨細胞へ分化する際に、エネルギー代謝である酸化リン酸化 (以下 OXPHOS) が著しく活性化されること、そして OXPHOS 阻害剤の投与により、軟骨分化や FOP モデルマウスの HO 形成が顕著に抑制されることを見出した。しかし、In vivo において HO の起源細胞が同じようなエネルギー代謝のリプログラミングを受けるかは不明である。また、HO 形成早期の炎症性細胞の浸潤、特にマクロファージが重要な役割を担うことも報告された (Convente et al. JBMR, 2018)。マクロファージには解糖系に依存する M1 (Pro-inflammatory) と OXPHOS に依存する M2 (Anti-inflammatory) の 2 種類のサブタイプがあり (Viola et al. Frontiers in Immunology, 2019)、炎症性細胞においてもエネルギー代謝の改変が誘導されることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、シングルセル RNA シーケンシング、空間的遺伝子発現解析 (Visium) とイメージング質量分析 (Imaging Mass Spectrometry, IMS) という革新的解析技術を駆使して、HO 形成過程における起源細胞のエネルギー代謝のダイナミクスとマクロファージを中心とした炎症性ニッチの影響を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

ドキシサイクリン (以下 Dox) の投与により、全身性に変異型 ACVR1 が発現される薬剤誘導型 FOP-ACVR1 トランスジェニックマウスの腓腹筋に損傷を与え (以下 Pinch)、HO 形成を誘導した。OXPHOS 阻害剤の投与群においては、IACS-010759 (以下 IACS) の経口投与を行った。具体的にはマウスを以下の 4 群に分けて実験を行った。

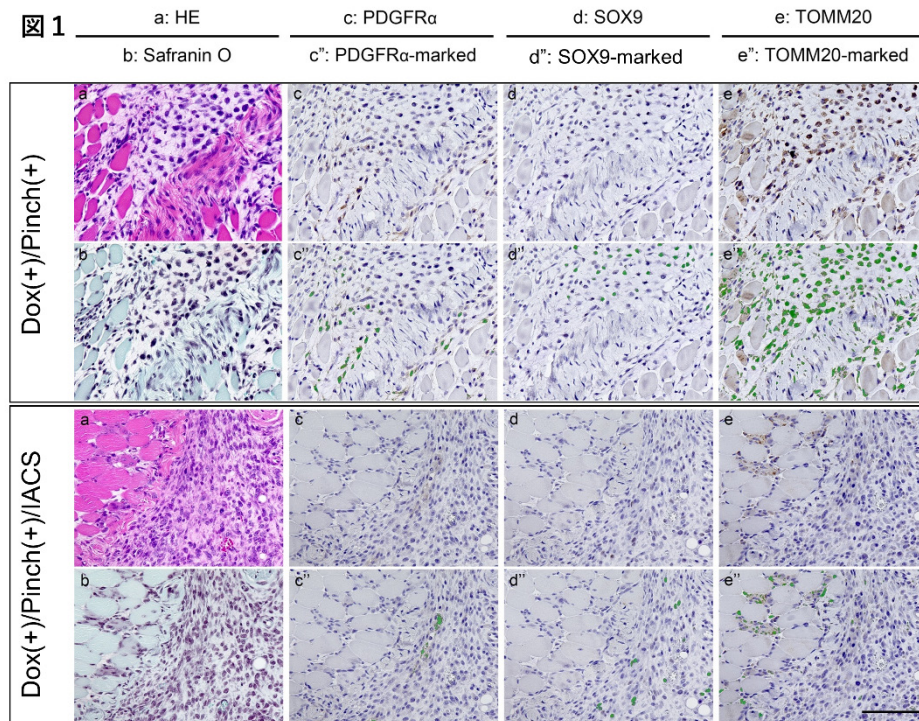
1) Dox(-)/Sham; 2) Dox(-)/Pinch(+); 3) Dox(+)/Pinch(+); 4) Dox(+)/Pinch(+)/IACS(+).

HO の初期において、経時的に損傷部位の組織を採集し、以下の実験を行った。

- 1) 組織から RNA を抽出し、Bulk RNA sequencing により網羅的遺伝子発現解析を行った。
- 2) 免疫組織学的解析により、HO 起源細胞のミトコンドリア生合成を調べた。
- 3) 単核細胞を単離し、Single cell RNA sequencing を行った。
- 4) FFPE 切片を作製し、空間的遺伝子発現解析 (Visium) を行った。
- 5) 凍結切片を作製し、イメージング質量分析 (IMS) を行った。

#### 4. 研究成果

- Pinch 後の筋肉から RNA を抽出し、Bulk RNA sequencing 並びに、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。その結果、軟骨分化関連遺伝子群の発現は Dox(-)/Pinch(+) に比べて Dox(+)/Pinch(+) で上昇し、IACS 投与により顕著に抑制された。HO の起源細胞である Fibro/Adipogenic progenitor (以下 FAPs) 関連遺伝子群の発現に関しては、Dox(-)/Sham に比べて Pinch により Dox(-)/Pinch(+) で上昇し、Dox(+)/Pinch(+) で更なる上昇がみられ、IACS の投与による低下が観察された。以上の結果から、FAPs 性質を持つ細胞数は損傷により上昇し、FOP-ACVR1 発現により更に上昇するが、IACS により抑制されることが示された。FAPs のマーカーである PDGFR $\alpha$  とミトコンドリア生合成のマーカーである TOMM20 の免疫染色を行った結果、活性化された PDGFR $\alpha$  陽性細胞およびそれから軟骨分化にコミットした SOX9 陽性細胞は TOMM20 の発現が高く、ミトコンドリア生合成が促進されていることが示された。一方、IACS 投与によりミトコンドリア生合成が抑制され、PDGFR $\alpha$  と SOX9 の両方が陰性の Fibroblastic cells の出現が観察された (図 1)。



- 空間的遺伝子発現解析 (Visium) においては、Dox(+)/Pinch(+) サンプルの非損傷部位に比べて損傷部位で PDGFR $\alpha$ 、SOX9 や TOMM20 の発現が顕著に上昇していることが確認された。
- イメージング質量分析 (IMS) においては、得られたデータを元に、次元削減法 (UMAP) の解析を行い、HO 領域と正常領域、更に IACS 投与による変化を可視化することができた。
- シングルセル RNA シーケンシング解析では、まず特異的遺伝子の発現を指標に各 Cluster の細胞種の分類を行った。HO 誘導の重要なリガンドである Activin A を産生する細胞源が明らかになった。また、Activin A の病的受容体である ACVR1 を発現する細胞種を明らかにしたことにより、Activin A/FOP-ACVR1 シグナルの影響を受ける細胞種を決めることができた。FAPs 細胞に関しては、分化経路推定 (Trajectory analysis) を行い、静止状態から活性化状態にある過程に必要なとされる遺伝子群を抽出し、機能解析を行った。更に、FOP-ACVR1 の発現により FAPs 細胞に与える影響を調べることができた。マクロファージに関しては、M1-like と M2-like に分類し、各サブタイプの変化や FAPs との相互作用を推測することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kamakura Takeshi, Jin Yonghui, Nishio Megumi, Nagata Sanae, Fukuda Masayuki, Sun Liping, Kawai Shunsuke, Toguchida Junya	4. 巻 e10737
2. 論文標題 Collagen X Is Dispensable for Hypertrophic Differentiation and Endochondral Ossification of Human iPSC-Derived Chondrocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10737	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 Kawai Shunsuke, Sunaga Junko, Nagata Sanae, Nishio Megumi, Fukuda Masayuki, Kamakura Takeshi, Sun Liping, Jin Yonghui, Sakamoto Satoko, Watanabe Akira, Matsuda Shuichi, Adachi Taiji, Toguchida Junya	4. 巻 13
2. 論文標題 3D osteogenic differentiation of human iPSCs reveals the role of TGF signal in the transition from progenitors to osteoblasts and osteoblasts to osteocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-27556-w	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 Maekawa Hirotsugu, Jin Yonghui, Nishio Megumi, Kawai Shunsuke, Nagata Sanae, Kamakura Takeshi, Yoshitomi Hiroyuki, Niwa Akira, Saito Megumu K., Matsuda Shuichi, Toguchida Junya	4. 巻 17
2. 論文標題 Recapitulation of pro-inflammatory signature of monocytes with ACVR1A mutation using FOP patient-derived iPSCs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Orphanet Journal of Rare Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13023-022-02506-3	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 Sun Liping, Jin Yonghui, Nishio Megumi, Watanabe Makoto, Kamakura Takeshi, Nagata Sanae, Fukuda Masayuki, Maekawa Hirotsugu, Kawai Shunsuke, Yamamoto Takuya, Toguchida Junya	4. 巻 7
2. 論文標題 Oxidative phosphorylation is a pivotal therapeutic target of fibrodysplasia ossificans progressiva	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202302219	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Liping Sun,, Yonghui Jin, Megumi Nishio, Masami Nakateke, Sanae Nagata, Takeshi Kamakura, Junya Toguchida
2. 発表標題 New Therapeutic Approach Targeting Energy metabolism of Fibrodysplasia Ossification Progressiva (FOP)
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takeshi Kamakura, Megumi Nishio, Sanae Nagata, Yonghui Jin, Junya Toguchida
2. 発表標題 Loss of collagen X facilitates hypertrophic differentiation and endochondral ossification of human iPSC-derived chondrocytes
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Liping Sun, Yonghui Jin, Megumi Nishio, Junya Toguchida
2. 発表標題 New Therapeutic Approach Targeting Energy metabolism of Fibrodysplasia Ossification Progressiva (FOP)
3. 学会等名 International Conference on Interdisciplinary Life Sciences 2023 (ILS2023)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 孫麗萍、金永輝、西尾恵、鎌倉武史、戸口田淳也
2. 発表標題 エネルギー代謝を標的とした進行性骨化性線維異形成症に対する新規治療法の検討
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	池川 雅哉  (Ikegawa Masaya)  (60381943)	同志社大学・生命医科学部・教授    (34310)	

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
---------	---------