

<研究課題>

筋修復に関わる新規免疫細胞集団を標的とした筋再生技術開発

代表研究者 金沢大学がん進展制御研究所

免疫環境ダイナミクス研究分野 教授 岡本一男

共同研究者 東京大学大学院医学系研究科 学部学生 尹 文強

【抄録】

高齢者の要支援・要介護の原因の中で、骨折、サルコペニア、関節疾患など運動器疾患は実に 25% を占める。超高齢化社会を迎えたわが国では、加齢による運動器の機能低下により、日常生活における骨格筋損傷の頻度が増加するため、骨や関節、筋肉など運動器を構成する要素の組織修復能を上げる医療技術開発が重要な課題である。我々はこれまで骨折時に発生する IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞が骨の損傷部周囲に集積する間葉系幹細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進する能力を有し、骨再生に必須の免疫細胞であることを発見した (Ono, Okamoto, *et al*, *Nat Commun*, 2016)。さらに最近、骨格筋損傷では新規のマクロファージ亜集団が骨格筋再生を誘導する能力を有していることを見出した。そのため骨格筋修復を誘導するマクロファージサブセットを標的としたアプローチが、骨格筋再生に有効であると示唆される。本研究では、骨格筋修復に関わるマクロファージ亜集団の発生機構ならびに当該マクロファージ亜集団による骨格筋再生制御機構の明らかにし、新規の骨格筋再生療法開発の分子基盤の構築に取り組んだ。

1. 研究の目的

高齢者の要支援・要介護の原因の中で、骨折、サルコペニア、関節疾患など運動器疾患は実に 25% を占め、認知症、脳血管疾患を抑え第一位の原因とされている。老齢に伴い筋肉量、運動量が低下し、しだいに身体を支える力の低下により転倒、骨折の頻度が高まる。また高齢者の骨格筋再生能力は低く、転倒に伴う骨格筋の損傷はさらに身体の不安定性を増大させることとなる。そのため、この悪循環を断ち切るには、骨、関節、筋肉など運動器を構成する要素の組織修復能を上げる医療技術開発が重要な課題である。

組織修復プロセスでは、組織を構成する実質細胞、幹細胞/前駆細胞、免疫細胞など様々な細胞種が複雑に協調し働く必要がある。免疫系は細菌やウイルスなどの「非自己」を認識し排除する生体防御に必須の生体システムであるが、組織の修復・再生においても重要であり、近年様々な免疫細胞や免疫因子が組織再生に関与することが明らかにされつつある。我々は以前、骨折後に集積する IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T 細胞が、骨損傷部周囲の間葉系前駆細胞に作用し、細胞増殖と骨芽細胞分化を促すことで、骨再生を誘導するトリガーとなることを発見した (Ono, Okamoto *et al*, *Nat Commun*, 2016)。本研究により、骨修復における、IL-17 産生性 $\gamma\delta$ T

細胞と間葉系幹細胞の相互作用の重要性を明示した。

一方、骨格筋は運動器としての役割に加え、体重の約 40~50% を占める最大のエネルギー代謝臓器である。さらに、骨格筋損傷は最も頻度の高い外傷の一つとしてされている。超高齢化社会を迎えたわが国では、加齢による運動器の機能低下により、日常生活における骨格筋損傷の頻度が増加し、健康障害の要因として問題視されている。近年、筋再生に関わる免疫細胞として特にマクロファージが注目され研究が進んできたが、マクロファージは高い多様性と可塑性を有するがゆえ、筋修復に関わるサブセットの実態に関しては未だ理解に乏しい。特に、マクロファージの中には炎症型性質を示す集団も多いため、過剰な炎症反応を誘導することなく筋修復を促進するアプローチが必要である。

我々はこれまで、マウス大腿屈筋群切開による筋損傷モデルを利用し、損傷部の骨格筋組織を対象にシングルセル RNA-seq 解析を実施し、損傷に応じて筋組織に集積するマクロファージを網羅的に調査してきた。その結果、マクロファージは複数の cluster に分類でき、その中でも CD9+PDPN+マクロファージ集団が骨格筋修復に関わる遺伝子群を特徴的に発現していることを見出した。さらにマウスの移入実験

から CD9+PDPN+マクロファージ集団が骨格筋修復を促進する機能があることを確認できた。そこで本課題では、これら CD9+PDPN+マクロファージを骨格筋修復型マクロファージと名付け、その細胞特性や発生機序、さらには骨格筋修復メカニズムを明らかにすることで、効率よく筋再生を促すことのできる革新的技術開発に繋げることを目的とした。

2. 研究方法と経過

2-1 骨格筋修復型マクロファージの発生機序に関する解析

シングルセル RNA-seq 解析情報を元に、骨格筋修復型マクロファージの分化経路推定解析、遺伝子発現情報に基づいたパスウェイ解析を実施し、骨格筋修復型マクロファージに特異的に発現する転写因子や、特異的に活性化が認められるシグナル伝達経路を抽出する。候補因子/経路に関して、各種遺伝子欠損マウスを用いて、筋損傷後の骨格筋修復型マクロファージの発生頻度を確かめ、*in vivo* レベルで検証する。

2-2 骨格筋修復型マクロファージによる筋再生制御機構の解析

シングルセル RNA-seq 解析データをもとに、骨格筋修復型マクロファージで特異的に高発現する分泌因子、細胞膜タンパク質を網羅的に調査する。該当する受容体が、骨格筋幹細胞であるサテライト細胞において発現しているか確認した上で、サテライト細胞に対する候補因子の効果を *in vitro* 培養系で検証し、筋再生に寄与する因子 X を特定する。さらに 2-1 で特定したシグナル伝達経路下流で活性化される転写因子群と照合させ、*in vitro* 培養実験から筋再生促進因子 X の発現に関わるシグナル伝達経路及び転写因子を調査する。

2-3 骨格筋修復型マクロファージの誘導に関わる筋損傷シグナルの分子実態に関する解析

骨格筋修復型マクロファージの分化、ならびに筋再生因子の発現制御に関わる特異的シグナル経路を明らかにする。シグナル経路の上流に位置する受容体を特定し、そのリガンド候補を損傷筋組織のトランスクリプトーム解析、プロテオーム解析から同定することを目指す。

3. 研究の成果

3-1 骨格筋修復型マクロファージの発生機

序に関する解析

シングルセル RNA-seq データより、骨格筋修復型マクロファージの分化経路推定解析ならびにパスウェイ解析を実施したところ、サイトカインシグナル経路、解糖系・糖新生経路、Toll 様受容体 (TLR) シグナル経路が特徴的な経路として見出された。骨格筋修復型マクロファージにおける遺伝子発現プロファイルの解析から、TLR4 や Myd88、TRIF などの TLR シグナル経路に関わる因子の発現が確かめられた。そこで、Myd88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、TLR4 欠損マウスを用いて、筋損傷モデルを実施した結果、いずれの欠損マウスでも野生型マウスと同程度の骨格筋修復型マクロファージの集積が確認できた。したがって、骨格筋修復型マクロファージは、TLR4-Myd88-TRIF 経路非依存的に損傷組織に集積することが判明した。

3-2 骨格筋修復型マクロファージによる筋再生制御機構の解析

骨格筋修復型マクロファージで特異的に発現が高い分泌因子、細胞膜タンパク質を網羅的に調査した結果、各種のケモカインのほか、ある分泌因子 (Secreted factor expressed by macrophages for muscle repair: SF-MacMR と称する) が高く発現していることが判明した。SF-MacMR に対する受容体がサテライト細胞でも発現していることが確認できたため、サテライト細胞を用いた *in vitro* 培養系により SF-MacMR の生物活性を検討した。その結果、SF-MacMR はサテライト細胞の増殖及び筋分化を促進する活性を有することが判明した。したがって、我々が同定した骨格筋修復型マクロファージは、SF-MacMR の発現を介してサテライト細胞に作用することで骨格筋修復に携わることを明らかにできた。

次に、骨格筋修復型マクロファージにおける SF-MacMR 発現と TLR4-Myd88-TRIF 経路の関係性を検討した。Myd88 欠損マウス、TRIF 欠損マウス、TLR4 欠損マウスを用いて、筋損傷モデルを実施し、骨格筋修復型マクロファージにおける SF-MacMR 発現を確認したところ、Myd88 欠損マウスでは野生型マウス同程度の SF-MacMR 発現が検出された一方、興味深いことに TRIF 欠損マウス、TLR4 欠損マウスでは SF-MacMR 発現の有意な低下が確認できた。

公共 ChIP-seq データベースである Chip-Atlas (<https://chip-atlas.org/>) の解析から、マクロファージにおいて SF-MacMR 遺伝子のオ

ーブクロマチン領域およびプロモーター領域を調査し、各領域の制御に関わる転写因子候補を抽出した。3-1の結果から、TLR4-TRIF経路下流で活性化される転写因子群と照合させ、SF-MacMR遺伝子の発現に関与する候補転写因子Xを特定した。そこで、転写因子X欠損マウス由来の骨髄細胞から骨髄由来マクロファージ(Bone marrow-derived macrophage: BMM)を分化誘導させ、TLR4刺激によるSF-MacMR遺伝子発現を確認した。その結果、野生型BMMではTLR4刺激によりSF-MacMRの高い発現誘導が確認できた一方、転写因子X欠損BMMではSF-MacMR発現誘導がほぼ完全に抑制された。したがって、骨格筋修復型マクロファージでは、TLR4-TRIF経路下流で転写因子Xが活性化されることで、SF-MacMRが発現誘導され、その結果サテライト細胞を介した筋修復が促進されることが明らかとなった。

3-3 骨格筋修復型マクロファージの誘導に関わる筋損傷シグナルの分子実態に関する解析

骨格筋損傷に応じてTLR4刺激が入力されるメカニズムとして、ダメージ関連分子パターン(Damage-associated molecular patterns, DAMPs)が候補として挙げられる。DAMPsとは、細胞死や細胞の損傷など、各種のストレスに伴って細胞から細胞外に放出される分子である。そこで骨格筋組織組織で発現が認められるDAMPsを網羅的に検討した結果、TLR4の誘導活性が報告されている因子として、S100A8/A9、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、HMGB1、ヒアルロン酸などが候補として挙げられた。そこで、BMMを用いたin vitro培養系により、各種DAMPs添加によるSF-MacMR発現誘導を確認した結果、S100A8/A9、HMGB1が有意にSF-MacMR発現を誘導することが判明した。

4. 今後の課題

本課題により、我々が同定した骨格筋修復型マクロファージは、筋損傷に伴い細胞外に放出される各種DAMPs(S100A8/A9、HMGB1)によってTLR4が刺激を受けることで、SF-MacMRを発現し、その結果サテライト細胞の増殖・筋分化を促進することで、筋修復を積極的に促すことが明らかとなった。また、骨格筋修復型マクロファージにおけるMrep-SF発現は、TLR4-TRIF経路下流で活性化される転写因子Xによって制御されることも明らかにすることができた。

本研究では、骨格筋修復型マクロファージの発生活導機構、ならびにSF-MacMRの発現機構を明らかにすることができ、TLR4-TRIF経路の欠損によりSF-MacMR発現を抑制することが確かめられた。その一方で、骨格筋修復型マクロファージの集積を誘導する方法、ならびにSF-MacMR発現を人為的に高める制御法の開発には至っていない。今後、骨格筋修復型マクロファージ特異的にTLR4-TRIF経路を活性化できる制御法の開発が重要である。

これまで骨格筋再生療法として、間葉系幹細胞や各種の成長因子を利用した治療法開発が取り組まれてきたが、いまだ臨床的効果は限られている。本研究課題において、骨格筋修復型免疫細胞を中心とした組織修復プロセスを解明し、組換えタンパク質および低分子化合物などを用いた骨格筋修復型マクロファージの制御法を開発できれば、制御迅速かつ効率的に組織修復・機能回復を促す新薬開発の基盤構築につながることを期待される。

5. 研究成果の公表方法

本研究で得られた成果は論文にまとめ、国際誌に投稿する予定である。

以上

Development of muscle regeneration strategies targeting novel immune cell populations directing muscle repair

Primary Researcher: Kazuo Okamoto
Professor, Division of Immune Environment Dynamics,
Cancer Research Institute, Kanazawa University

Co-researchers: Wenqiang Yin
Students, Department of Immunology, Graduate School of
Medicine and Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Musculoskeletal diseases such as fractures, sarcopenia and joint diseases account for 25% of the causes of need for assistance and care for the elderly. Age-related deterioration of musculoskeletal functions increases the frequency of skeletal muscle injuries in daily life. Thus, the development of medical technology to enhance the tissue repair capability of the components of locomotory organs such as bones, joints and muscles is an important issue. We have previously found that IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells accumulating around injured bone tissue trigger bone regeneration by promoting the proliferation of mesenchymal progenitor cells and their osteogenesis (Ono, Okamoto, et al, Nat Commun, 2016). We have recently found that a novel macrophage subpopulation is capable of inducing skeletal muscle regeneration. It is suggested that an approach targeting the newly identified macrophage subset that induce skeletal muscle repair may be effective for skeletal muscle regeneration. In this study, we sought to elucidate the mechanisms how the macrophage subset develops after skeletal muscle injury, and how the macrophage subset regulates skeletal muscle regeneration, to provide a molecular basis for the development of novel skeletal muscle regeneration therapies.