

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: 幹細胞-免疫細胞間の相互作用を軸としたヒト骨格筋再生機構のモデル化
Modeling Skeletal Muscle Tissue Regeneration with Stem Cell-Macrophage Interaction

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: 小池 博之
Hiroyuki Koike

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
学校法人日本医科大学・医学部 生化学・分子生物学 (代謝・栄養学)・講師
Senior Assistant Professor, Department of Biochemistry & Molecular Biology, Nippon Medical School

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

(背景)

加齢に伴う筋量の低下はサルコペニアと呼ばれ、高齢化社会において重要な健康問題である。特に外傷後の筋再生不全は二次性サルコペニアの主要な原因であり、その分子機構の解明は予防・治療法の開発に必要である。しかし、筋再生に関与する多様な細胞間相互作用は複雑であり、従来の動物モデルでは十分に解析できない。そのため、骨格筋組織中の複雑な分子機構を簡便に解析可能な *in vitro* 評価系の確立が望まれてきた。

(目的)

本研究では、骨格筋再生におけるマクロファージの役割とメカニズムを解明することを試みた。骨格筋再生に関与するマクロファージは多様であり、その特性や相互作用は未解明である。そこで本研究では、マウス骨格筋損傷モデルにおけるシングルセル RNA シークエンスでマクロファージサブタイプとそのシグナルの同定を進めた。さらに骨格筋オルガノイドを用いて *in vitro* で再生過程を再現し、マクロファージの挙動や影響を評価した。これらの解析により、骨格筋再生に重要なマクロファージ集団および分子シグナルの同定を目指した。

(方法・結果)

1) 骨格筋再生を制御する分子基盤の解析

まず、骨格筋細胞とマクロファージの空間的位置情報を解析するために、*Pax7-CreERT2;R26R-tdTomato* と *Cx3cr1-GFP* をかけ合わせた蛍光レポーターマウスを作出した。このマウスの前脛骨筋組織にカルジオトキシン (CTX) を投与し、損傷後3日目に組織を回収した。回収した組織から、骨格筋細胞とマクロファージを含む細

胞集団を分離し、骨格筋オルガノイドの構築を行った。オルガノイドの免疫染色は、抗 MyHC 抗体を用いて行った。蛍光顕微鏡を用いて、再生過程の各細胞の三次元的な画像を取得した。画像解析の結果、骨格筋細胞とマクロファージの経時的な挙動変化が明らかになった。具体的には、損傷後 3 日目から 7 日目にかけて、骨格筋幹細胞由来の細胞は増殖し、マクロファージは減少する傾向が見られた。また、骨格筋細胞とマクロファージの距離は、培養中に、両者の接近が観察された。

次に、骨格筋細胞とマクロファージサブタイプ間のリガンド-受容体相互作用を解析するために、シングルセル RNA シークエンス (scRNA-seq) 解析を行った。マウスに CTX を投与した骨格筋再生モデルマウスから経時的に骨格筋組織を回収した。回収した組織から、骨格筋細胞とマクロファージを含む細胞集団を分離し、scRNA-seq ライブラリーの構築を行った。ライブラリーの構築は、10x Genomics 社の Chromium Single Cell 3' Reagent Kit v3 を用いて行った。シーケンスデータの解析は、Seurat と CellPhoneDB を用いて行った。解析の結果、骨格筋幹細胞の活性化および増殖を促進するマクロファージ由来の因子の候補を同定した。この候補因子の一つは、骨格筋幹細胞に対して増殖促進効果を持つことが報告されている。候補因子の発現は、再生 3 日目データからは、マクロファージにおいて最も発現が多く見られ、骨格筋幹細胞との相関係数も高かった。また、候補因子の阻害実験より、候補因子の発現量と骨格筋幹細胞の増殖には相関が見られた。これらのデータから、このマクロファージ由来の因子は骨格筋再生過程において重要な因子であると考えられた。

次に、マクロファージサブタイプ (亜集団) の機能を詳細に解析することを目的に、scRNA-seq データの解析を継続し、フローサイトメトリーでの単離に用いることが可能な細胞膜タンパク質の探索を試みた。Seurat によるクラスタリング解析では、マクロファージは 8 つのクラスターに分類された。CellPhoneDB によるリガンド-受容体相互作用解析では、一つのクラスターのマクロファージサブタイプは他のクラスターに比べて、骨格筋幹細胞と最も多くの相互作用を示した。特に、Ki67 陽性の増殖中の骨格筋幹細胞と相互作用を密接に交わしていることが示された。この相互作用の中で、令和 2 年度に特定した候補因子が最も重要なシグナル経路の一つであることが判明した。次に、マクロファージサブタイプで特異的に発現される遺伝子を Seurat による差分発現解析で検証し、陽性マーカーと陰性マーカーをそれぞれ特定した。これらのマーカーの発現情報から、このマクロファージ亜集団は従来の炎症性 (M1) や抗炎症性 (M2) マクロファージのどちらにも属しておらず、新規なサブタイプであることが示唆された。フローサイトメトリーでソーティングした分画における遺伝子発現解析では、このマクロファージサブタイプで高発現していた遺伝子が濃縮されていることが確認された。以上の結果から、骨格筋幹細胞の増殖制御に重要なマクロファージ亜集団をソーティング可能な条件の設定を完了した。

以上の結果から、骨格筋再生過程において、骨格筋細胞とマクロファージサブタイプ間の局在およびリガンド-受容体相互作用が重要な役割を果たしていることが考えられる。特に、新規なマクロファージサブタイプは、増殖中の骨格筋幹細胞と密接に相互作用し、骨格筋再生を促進する可能性が高いことである。

2) ヒト 骨格筋オルガノイドの創出

まず、骨格筋幹細胞特異的な遺伝子プロモーター制御下で蛍光タンパク質を発現するレポーター iPS 細胞を作出した。CRISPR-Cas9 システムを用いて、1231A3 細胞株の骨格筋の分化に関わる遺伝子プロモーターに蛍光タンパク質配列を導入した。相同組み替え用のベクターは、Lipofectamine Stem を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後、シングルセルソーティングによりクローン化することで、レポーター細胞株を樹立した。これらの細胞株を用いて、既報の骨格筋分化誘導プロトコルに改変を加えた分化誘導実験を実施した。分化誘導実験では、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターを用いて、蛍光タンパク質の発現を経時的に観察した。観察の結果、分化誘導 10 日目から蛍光タンパク質の発現がそれぞれ観察された。発現強度は分化誘導の進行に伴って増加し、分化誘導 30 日目には約 70% の細胞で検出された。蛍光タンパク質の発現は細胞の密集した領域から生じ徐々に陽性領域を拡大しながら、線維状の形態へと変化していくことが観察された。一方で、細胞の密集した領域以外からは、蛍光タンパク質の発現は観察されなかった。レポーター蛍光を発現する細胞をフローサイトメトリーで単離し継代後、筋線維形成を促したところ、筋線維への分化能を有した細胞であることが確認された。

レポーター蛍光を発現していない細胞の形態を蛍光顕微鏡で観察すると、管様の構造を形成していることが観察された。これらの細胞は筋線維マーカーを発現しておらず、iPS 細胞から誘導された他の細胞であることが判明した。

3) ヒト骨格筋オルガノイドを用いた筋組織修復メカニズムの解析

次に、ヒト骨格筋オルガノイドを構築し、CTX による筋線維損傷モデルを作製した。ヒト骨格筋幹細胞とヒトマクロファージを混合し、スフェロイドを作成した。スフェロイドはマトリゲルに包埋し、三次元培養を行った。培養後、オルガノイドに CTX を添加し、筋線維の損傷を誘導した。損傷後、オルガノイドの免疫染色と蛍光顕微鏡観察を行った。免疫染色は、抗 MyHC 抗体を用い、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。観察の結果、損傷誘導前にはオルガノイド内に成熟した骨格筋線維が形成されていることが確認された。また、CTX の添加により、筋線維の損傷が生じるとともに、骨格筋幹細胞およびマクロファージの移動や増殖が観察された。

以上の結果から、ヒト iPS 細胞から誘導した骨格筋細胞とマクロファージからヒト骨格筋オルガノイドを構築することが可能であると考えられる。また、ヒト骨格筋オルガノイドは、*in vivo* と同様に筋線維の損傷と再生を再現することができる可能性が示唆される。このヒト骨格筋オルガノイド評価系を用いて、骨格筋再生における骨格筋細胞とマクロファージの相互作用を詳細に解析する予定である。本研究は、サルコペニア予防・治療法開発に向けた筋再生不全の分子機構解明に貢献することが期待できる。

1) Analysis of the molecular basis regulating skeletal muscle regeneration

Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) analysis of ligand-receptor interactions between skeletal muscle cells and macrophage was performed. We performed our analysis of scRNA-seq data to analyze the function of macrophage subtypes in detail, searching for plasma membrane proteins that could potentially be used for isolation by flow cytometry. Ligand-receptor interaction analysis showed that macrophage subtypes in one cluster interacted most with skeletal muscle stem cells compared to the other clusters. In particular, they showed close interactions with proliferating skeletal muscle stem cells. Next, genes specifically expressed in macrophage subtypes were validated by differential expression analysis using Seurat, and positive and negative markers were identified, respectively. The expression information of these markers suggested that this macrophage subpopulation was a novel subtype belonging to neither the conventional inflammatory (M1) nor anti-inflammatory (M2) macrophages. Gene expression analysis in the fractions sorted by flow cytometry confirmed the enrichment of genes that displayed high expression in this macrophage subtype. These results established conditions that allow the sorting of macrophage subpopulations critical for regulating skeletal muscle stem cell proliferation. These results suggest that localization and ligand-receptor interactions between skeletal muscle cells and macrophage subtypes play a vital role in skeletal muscle regeneration. In particular, the novel macrophage subtype is likely to interact closely with proliferating skeletal muscle stem cells and promote skeletal muscle regeneration.

2) Creation of human skeletal muscle organoids

First, reporter iPS cells expressing fluorescent proteins under the control of skeletal muscle stem cell-specific gene promoters were generated. We performed differentiation induction experiments using these cell lines with modifications to the previously published skeletal muscle differentiation induction protocol. In the differentiation induction experiments, the expression of fluorescent proteins was observed over time using a fluorescence microscope and flow cytometer. As a result, fluorescent protein expression was observed from the 10th day of differentiation induction, respectively. The expression intensity increased with the progress of differentiation induction and was detected in about 70% of cells on day 30 of differentiation induction. It was observed that fluorescent protein expression started from the densely populated area of cells and gradually changed to a fibrous morphology with a gradual expansion of the positive area. On the other hand, no fluorescent protein expression was observed outside of the dense cell area. The cells expressing the reporter fluorescence were isolated by flow cytometry and passaged to promote myofiber formation. The morphology of cells that did not express the reporter fluorescence was observed to form a tube-like structure by fluorescence microscopy. These cells did not express any myofiber markers and were found to be other cells derived from iPS cells.

3) Analysis of muscle tissue repair mechanisms using human skeletal muscle organoids

Human skeletal muscle organoids were constructed to create a model of CTX-induced myofiber damage. Human skeletal muscle stem cells and human macrophages were mixed to create spheroids. Spheroids were embedded in Matrigel and cultured in three-dimensional culture. After culture, CTX was added to the organoids to induce myofiber damage. After the injury, immunostaining and fluorescence microscopy of the organoids were performed. The observations showed mature skeletal muscle fibers formed in the organoids before injury induction. In addition, the addition of CTX caused damage to the muscle fibers, and migration and proliferation of skeletal muscle stem cells and macrophages were observed.

These results suggest that it is possible to construct human skeletal muscle organoids from skeletal muscle cells and macrophages induced from human iPS cells. The results also suggest that human skeletal muscle organoids may be able to reproduce myofiber damage and regeneration in vivo. Using this human skeletal muscle organoid evaluation system, we plan to analyze in detail the interaction between skeletal muscle cells and macrophages in skeletal muscle regeneration. This study is expected to contribute to the elucidation of the molecular mechanism of impaired muscle regeneration for the development of sarcopenia prevention and treatment methods.