

# 筋損傷時に起こる異所性石灰化に、新規マクロファージと BMP シグナルが関与する

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再再建学 石 莉楠

(指導教員 硬組織機能解析学 小林 泰浩)

## 【研究成果のポイント】

- ◆ F4/80(+)Csf1r(-)マクロファージの近傍で異所性石灰化が起こる
- ◆ 損傷後の筋肉において BMP シグナルが活性化する
- ◆ 血管内皮間葉転換は、損傷筋における異所性石灰化の主要な原因である
- ◆ BMP 阻害剤は異所性石灰化を抑制し、筋再生を促進する

## 【概 要】

異所性石灰化は、さまざまな組織で生じる異常な再生応答であり、その分子機構は未だ十分に解明されていません。本研究では、クロドロネートリポソーム、Csf1r 中和抗体、ならびにマクロファージ特異的な Csf1r 遺伝子欠損 (Csf1r cKO) という 3 種類のマクロファージ除去法を比較することで、F4/80(+)Csf1r(-)マクロファージが、notexin 注入マウスおよび BaCl<sub>2</sub>注入 Csf1r cKO マウスの石灰化した筋組織で特異的に増加していることを見出しました。この過程に骨形成因子 (BMP) シグナルが異所性石灰化に関与していることが示されました。さらに、公的なシングルセル RNA シーケンスデータの再解析および Cdh5creERT2 マウスを用いた系譜追跡解析により、内皮から間葉系への移行 (EndoMT) が異所性石灰化の主要な原因であることが明らかとなりました。注目すべきことに、BMP 阻害剤の投与により石灰化が抑制され、筋再生が促進されました。これらの結果から、F4/80(+)Csf1r(-)マクロファージおよび BMP シグナルは、異所性石灰化の予防に対する有望な治療標的となることが示唆されます (図 1)。

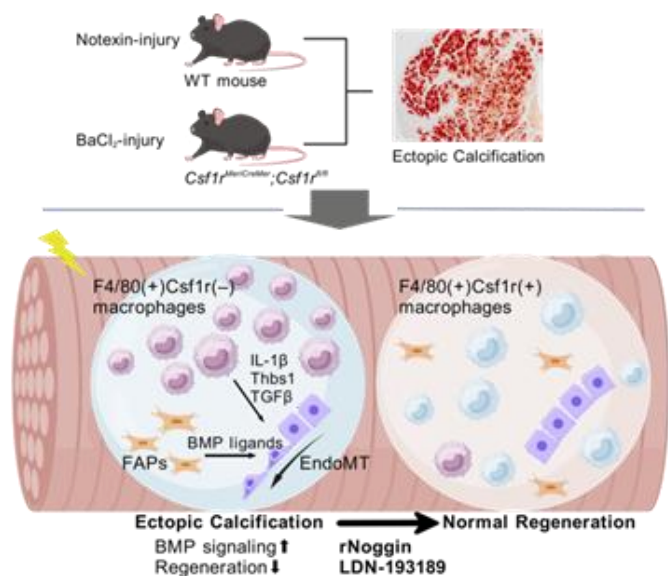


図1

## 【研究の背景】

異所性石灰化は、外傷、手術、遺伝子変異などによって引き起こされる異常な再生応答であり、脳、腎臓、心血管系、骨格筋、皮膚など、さまざまな軟部組織で発生します。骨格筋における石灰化は、筋再生を妨げ、合併症を引き起こしますが、その予防法は現在も開発段階にあります。骨格筋は優れた再生能力を有しており、ミオトキシンはヒトの筋損傷を模倣するために広く用いられています。ミオトキシン単独、あるいは熱傷や脊髄損傷との併用により、骨格筋の異所性石灰化モデルとしても活用されています。しかし、再生過程でカルシウム沈着を促進する細胞の正体は、これまで不明でした。そこで本研究では、筋損傷を誘導する2種類の薬剤（notexin [NTX] および  $\text{BaCl}_2$ ）を用いて骨格筋の再生過程を解析しました。

## 【研究の成果】

アリザリンレッド染色により、NTX で損傷を受けた筋肉および  $\text{BaCl}_2$  で損傷を受けた *Csf1r* cKO マウスの筋肉において異所性石灰化が確認されました。特に、石灰化領域の周囲には *F4/80*(+) *Csf1r*(-)マクロファージが顕著に集積していることが観察されました。さらに、相関解析により、*F4/80*(+) *Csf1r*(-)マクロファージの数と異所性石灰化の程度との間に正の相関関係があることが示されました（図2）。

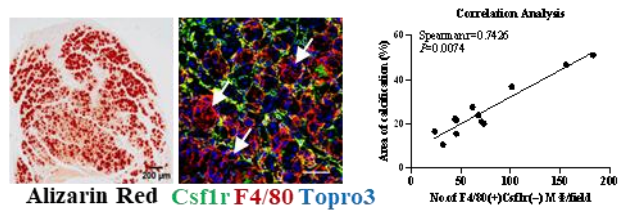


図2

石灰化した筋組織の qPCR 解析により、BMP シグナルの標的遺伝子である *Id1* の発現が上昇していることが明らかとなりました。また、データベースを用いた NTX 損傷筋の解析では、*Id1* が内皮細胞および間葉系細胞に特異的に高発現していることが示されました。軌跡解析の結果、血管内皮細胞が間葉系細胞へと分化する様子が示され、これらの間葉系細胞は *Acta2* や *Snai1* などの内皮 - 間葉転換（EndoMT）関連遺伝子を高発現していました。さらに、*Cdh5creERT2*;Tomato マウスを用いて異所性石灰化を誘導した系譜追跡実験では、

Tomato(+)細胞が  $\alpha$  SMA(+)細胞を発現していることが確認されました（図3）。これらの結果は、石灰化と EndoMT との間に関連性がある可能性を示唆しています。さらに、本研究成果の臨床応用の可能性を検討するため、異所性石灰化を起こした筋組

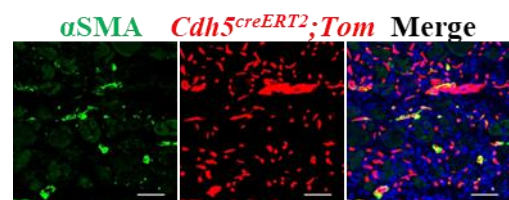


図3

織に BMP 阻害剤を投与しました。その結果、rNoggin または LDN193189 の投与により、異所性石灰化が効果的に抑制され、同時に骨格筋の再生が促進されることが明らかとなりました。

## 【考 察】

マクロファージは、さまざまな組織の再生において重要な役割を果たします。

本研究では、F4/80(+)Csf1r(+)マクロファージが筋再生を促進することを明らかにしただけでなく、F4/80(+)Csf1r(-)マクロファージが活性化された BMP シグナルと協調して EndoMT を誘導し、異所性石灰化を促進することも見出しました。

この発見は、異所性石灰化の臨床的制御に対する新たな治療戦略を提供するものです。

### 【今後の展望】

今後は、F4/80(+)Csf1r(-)マクロファージを特異的に除去し、筋損傷後にこれらのマクロファージが異所性石灰化を誘導する分子メカニズムを明らかにする予定です。

### 【用語の説明】

クロドロネートリポソーム：マクロファージを除去する薬剤

Csf1r：マクロファージコロニー刺激因子受容体

F4/80：マクロファージが発現する細胞表面マーカー

BMP： Bone Morphogenetic Protein, 骨を誘導するサイトカイン、骨誘導以外にも様々な生物学的イベントを司る

血管内皮 - 間葉転換 (EndoMT)：血管内皮細胞が間葉系細胞に分化転換すること

Cdh5creERT2;Tomato マウス：血管内皮細胞で赤色の蛍光タンパクを発現するマウス。

血管内皮細胞やそれから分化した細胞を追跡できる

# Identification of novel macrophages and BMP signals causing ectopic calcification and impairing muscle regeneration

## 【HIGH LIGHTS】

- ◆ Ectopic calcification occurs near F4/80(+)Csf1r(–) macrophages after muscle injury
- ◆ BMP signaling is activated in calcified muscles after injury
- ◆ EndoMT is a key contributor to ectopic calcification in injured muscle
- ◆ BMP inhibitors suppress ectopic calcification and promote muscle regeneration

## 【SUMMARY】

Ectopic calcification is an abnormal regenerative response occurring in various tissues. However, its underlying mechanisms remain unclear. By comparing three macrophage depletion methods using clodronate liposome, Csf1r neutralizing antibody, and macrophage-specific *Csf1r* gene deletion (*Csf1r* cKO), we found that F4/80(+)Csf1r(–) macrophages were specifically increased in calcified muscles in notexin-injected mice and BaCl<sub>2</sub>-injected *Csf1r* cKO mice. Mechanistically, bone morphogenetic protein (BMP) signaling was found to contribute to ectopic calcification. Reanalysis of public single-cell sequencing data and lineage-tracing analysis using *Cdh5*<sup>creERT2</sup> mice revealed that endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) is also a key contributor to ectopic calcification. Notably, administration of BMP inhibitors reduced calcification and promoted muscle regeneration. Thus, F4/80(+)Csf1r(–) macrophages and BMP signals represent promising therapeutic targets for preventing ectopic calcifications (Figure 1).

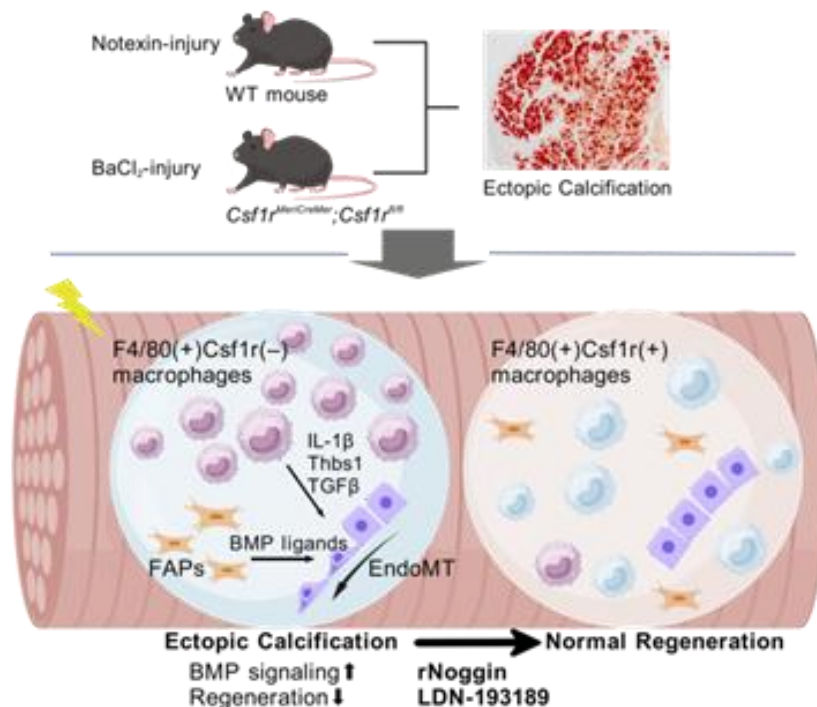


Figure 1

## 【BACKGROUND】

Ectopic calcification is an abnormal regenerative response often triggered by injury, surgery, or genetic mutations. Ectopic calcification occurs in various soft tissues, such as the brain, kidneys, cardiovascular system, skeletal muscle, and skin. In skeletal muscle, calcification impairs regeneration and leads to complications. However, therapeutic modalities for the prevention of calcification are still being developed.

Skeletal muscle possesses a remarkable regenerative ability. Myotoxins are widely used to mimic muscle injury in humans. Furthermore, myotoxins themselves or in combination with burns/spinal cord injury have been used as models in research on ectopic calcification in skeletal muscle. However, the cells promoting calcium deposition during regeneration have yet to be identified.

Therefore, we herein investigated the regeneration of skeletal muscle using two reagents that induce muscle injury: notexin (NTX) and  $\text{BaCl}_2$ . We found that necrotic muscle tissues alone were not sufficient to induce calcification and that F4/80(+)Csf1r(−) macrophages correlated with calcification. Additionally, bone morphogenetic protein (BMP) signaling induced endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT), resulting in injured muscle calcification and impaired muscle regeneration. The targeting of F4/80(+)Csf1r(−) macrophages and BMP signaling represent novel therapeutic strategies to prevent ectopic calcification during skeletal muscle repair.

## 【RESULTS】

Alizarin Red staining revealed ectopic calcification in NTX-injured muscles and  $\text{BaCl}_2$ -injured *Csf1r* cKO mice. Notably, a significant accumulation of F4/80(+) Csf1r(−) macrophages was observed surrounding the calcified muscle areas. Correlation analysis further demonstrated a positive relationship between the number of F4/80(+) Csf1r(−) macrophages and the extent of ectopic calcification(Figure 2).

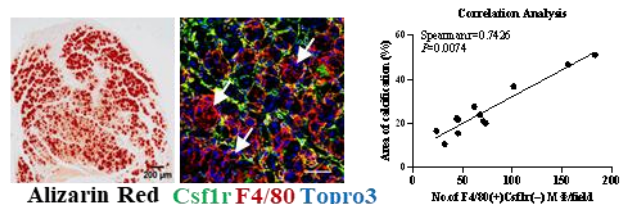


图2

qPCR analysis of calcified muscles

revealed elevated expression of the BMP signaling target gene *Id1*. Database analysis of NTX-injured muscles showed high *Id1* expression specifically in endothelial cells and mesenchymal cells. Trajectory analysis demonstrated differentiation of vascular endothelial cells into mesenchymal cells, with these mesenchymal cells exhibiting high expression of endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT)-related genes such as *Acta2* and *Snai1*. Furthermore, the lineage tracing experiment by inducing ectopic calcification in *Cdh5<sup>creERT2</sup>;Tomato* mice showed that Tomato(+) cells expressed  $\alpha$  SMA(+) cells (Figure 3). These results suggest

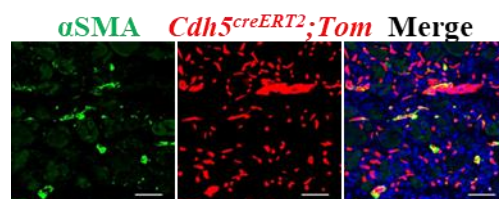


图3

a

potential link between calcification and EndoMT.

Furthermore, to explore potential clinical applications of these findings, we administered BMP inhibitors in ectopically calcified muscles. Treatment with either rNoggin or LDN193189 effectively inhibited ectopic calcification while promoting skeletal muscle regeneration.

## **【DISCUSSION】**

Macrophages play important roles in regeneration in several tissues. In our study, we not only identified F4/80(+)Csf1r(+) macrophages promoted muscle regeneration, but also found F4/80(+)Csf1r(−) macrophages, cooperated with activated BMP signaling to promote ectopic calcification by driving EndoMT. This discovery provides a novel therapeutic strategy for clinical management of ectopic calcification.

## **【PERSPECTIVE】**

In the future, we plan to specifically delete F4/80(+)Csf1r(−) macrophages and to clarify molecular mechanisms by which F4/80(+)Csf1r(−) macrophages induce ectopic calcification following muscle injury.

## **【ACKNOWLEDEMENTS】**

This work was supported by Grants-in-Aid 23K19731, 24H00653, 22K18402, 24K02629 from the Ministry of Education, Culture, Sports Science, and Technology of Japan.

## **【ARTICLE INFORMATION】**

掲載誌: iScience

タイトル: Identification of novel macrophages and bone morphogenetic protein signals causing ectopic calcification and impairing muscle regeneration

著者: Linan Shi, Zhifeng He, Toru Hiraga, Ziyang Liu, Teruhito Yamashita, Rina Iwamoto, Toshihide Mizoguchi, Yuko Nakamichi, Yoshiaki Kubota, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi

iScience 28, 112841, 2025

DOI: [doi.org/10.1016/j.isci.2025.112841](https://doi.org/10.1016/j.isci.2025.112841)

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589004225011022>

## **【お問い合わせ先】**

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 教授 小林泰浩（コバヤシ ヤスヒロ）

Mail : [yasuhiro.kobayashi@mdu.ac.jp](mailto:yasuhiro.kobayashi@mdu.ac.jp)