

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02986

研究課題名(和文) ストレス誘導性老化細胞の挙動解析から迫る未知なる骨形成阻害機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of stress-induced senescent cells to elucidate the unknown inhibitory mechanism of bone formation

研究代表者

本田 義知 (HONDA, Yoshitomo)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：90547259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、人工的なストレス誘導性早期老化細胞の増減を通して、「骨形成阻害に影響を及ぼす老化細胞とSASP関連因子の挙動と分子機構の一端を解明し、同阻害機構から解放された次世代の骨再生治療開発の礎を築く事」を目的とした。研究の結果、リポ多糖あるいは材料埋入時等に引き起こされる刺激で誘導されるストレス誘導性早期老化細胞は、骨再生阻害機構に関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、リポ多糖あるいは材料埋入によりストレス誘導性早期老化細胞が誘導され、同細胞が骨再生の阻害に関与している可能性が明らかとなった。これらの知見は、未知なる骨再生阻害メカニズムの解明に繋がらうる知見であり、関連する細胞老化随伴分泌現象因子などの解明が更に進めば、既存の治療法とは異なる新規再生医療やバイオマテリアルの開発などに道を拓くと予想される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to elucidate the behavior and molecular mechanisms of senescent cells and SASP-related factors that inhibit bone formation, which can be useful to develop next-generation bone regeneration therapies free from this inhibition mechanism. Our results revealed that stress-induced premature senescent cells induced by stimuli from lipopolysaccharide or material implantation can be involved in the inhibitory mechanism of bone regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：老化細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨形成が極めて困難な症例(例えばインプラント周囲炎、過度なメカニカルストレス下での骨造成等)では、常に多くのストレスによる骨形成阻害機構が働いており、その実態解明が強く望まれている。多くのストレスが細胞に老化現象を引き起こすが、これまで老化研究は主に寿命延長(個体老化)に重点が置かれ、加齢が関与しない環境下でのストレス誘導性老化細胞と骨再生の関係の解明には殆ど注力されてこなかった。既知の細胞を老化させる誘導機序を例示すると、細胞への長期的な培養やメカニカルストレス、生体内外で活性酸素を中核物質とする酸化ストレスにより促進される。更に近年、炎症性サイトカインが細胞老化を早める事が報告された他、老化細胞が逆に Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) 現象により炎症性物質やマトリックスメタロプロテアーゼを放出し、組織修復障害を促す機構が報告された(大谷, J Soc Jap Women Scientists, 15)。また、生体から老化細胞を除去した場合、生体内の骨成長が促進されるという興味深い報告もなされている(Zhu, Aging Cell, 15)。これら一連の結果は、ストレスに誘導された老化細胞や SASP 因子が骨形成に重要な負の影響を与えている事を示唆するものの、その機序は不明なままで留まっていた。一方、手術時の感染や、埋入材料がその種類や物性により大小のストレス(炎症、酸化ストレス等)を起こす事は、周知の事実であり、今後いかに制御するかが問われていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人工的なストレス誘導性早期老化細胞の増減を通して、「骨形成阻害に影響を及ぼす老化細胞と SASP 関連因子の挙動と分子機構の一端を解明し、同阻害機構から解放された次世代の骨再生治療開発の礎を築く事」を目的とした。

3. 研究の方法

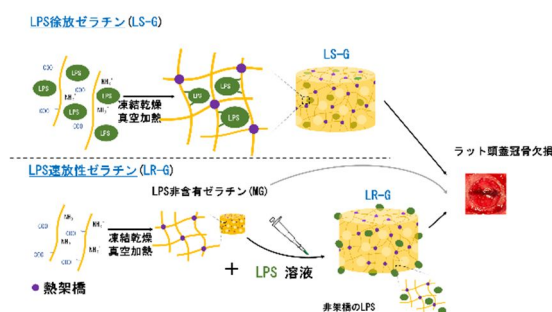
下記に集約されるプロセスを実地し、上記の目的達成を目指した。

- 1) 試料の合成と材料学的評価
- 2) ストレス誘導性早期老化細胞の挙動解析
- 3) 老化細胞除去法の熟達(予備的検討)
- 4) 骨再生能評価

具体的には下記の実験を遂行した。

埋入材料の合成と材料評価

グラム陰性菌の内毒素であるリポ多糖(LPS)は歯周炎を促すトリガーとなることは周知の事実である。さらに、細胞に対しストレス誘導性早期老化を促すことが近年明らかになっている。これらの背景を考慮して、老化細胞誘導剤として LPS を選択した。LPS が組織に貯留する程度により急性および慢性の異なる炎症を誘発しうると考えられたことから、LPS 放出速度の異なる 2 種類の材料(LPS 徐放性ゼラチン、LPS 速放性ゼラチン)を用意した。LPS 徐放性ゼラチン(以下 LS-G)は、LPS が混入している試薬グレードのゼラチンを 70 度の温水に溶解し、LPS 含有ゼラチン溶液を調製した後、予備凍結、凍結乾燥を施した。その後、真空加熱処理を施し、LPS とゼラチン間の架橋を強めた。一方、LPS の混入が極めて少ないメディカルグレードのゼラチン(以下 MG)を真空加熱処理まで上記と同様の方法で調製し、その後、MG に LPS を滴下したスポンジを LPS 非結合ゼラチン(以下 LR-G:LPS 速放性ゼラチン)として用意した(右図)。各試料の材料評価にはフーリエ変換赤外分光分析、走査型電子顕微鏡等を用いた。



(文献 1 を一部改変し引用)

老化細胞の骨形成阻害機序と時空間的挙動調査

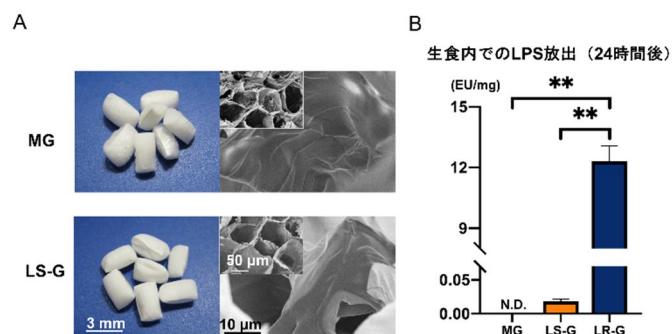
ストレス誘導性老化細胞の出現と同細胞が骨再生に与える影響を、8 週齢雄 Sprague Dawley ラッ

トに作製した頭蓋冠臨界骨欠損モデルを用いて評価した。生理的な加齢に伴う老化細胞の出現は、ストレス誘導性老化細胞の解析に影響を与えうることから8週齢のラットを用いた。過去の文献にて臨界骨欠損である事が知られている直径9mmの骨欠損をトレフィンバーにて作製し用いた。実験グループとしては、「試料非埋入群、MG埋入群、LR-G埋入群、LS-G埋入群、LS-G埋入に加え、それぞれに老化細胞除去薬を経口添加した群、LS-Gにカテキンを化学的に結合させた群」等を用いた。所定の日数後、頭蓋を摘出し、 μ CT撮影を行った後、組織学的評価を行った。老化細胞の時空間的解析は、老化細胞マーカー(p21、p16)を用いた免疫蛍光染色から見積もった。さらに、骨欠損内の活性酸素の産生状況を4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)染色を、炎症や組織の状態をCOX-2やヘマトキシリン-エオジン染色を用いて評価した。老化細胞除去薬としては、2015年にMayoクリニックのKirkland博士らによって発表され、白血病治療薬として知られるダサチニブと、フラボノイドの一種であるケルセチンの混合薬(以下D+Q)を用いた(Zhu, Aging Cell, 15)。D+Qの投与方法や濃度については左記の論文を参考にした。

4. 研究成果

埋入材料の合成と材料評価

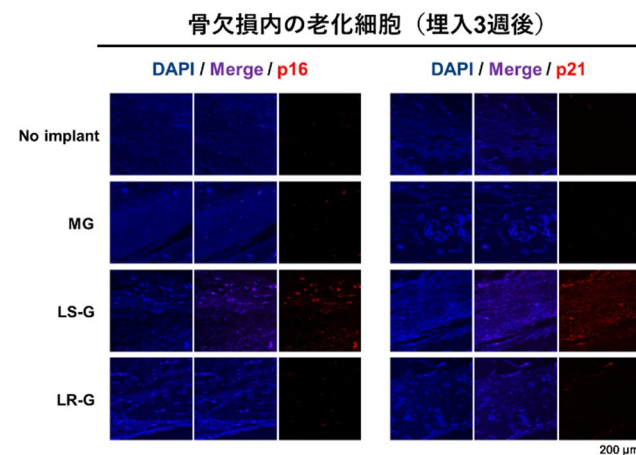
LS-GおよびLPSを滴下前のMGは、いずれも多孔体構造を持つスポンジ状を示した(右図A)。また、真空加熱処理によりゼラチンとLPSが強固に結合しているLS-Gでは、非結合のLR-Gと異なり、LPSの放出が緩徐になっていることを生理食塩水を用いて確認した(右図B)。さらに、LS-G、LR-Gを頭蓋冠骨欠損内に埋入した後、骨欠損内のLPSの残存量を評価したところ、埋入3週間においてLR-G埋入群ではLPSが検出されなかったが、LS-G埋入群ではLPSが検出されるなど、生体内埋入後もLS-GがLPS徐放性を維持していることを確認した。



(文献1を一部改変し引用)

老化細胞の時空間的挙動調査と骨形成阻害機序

骨欠損内に各試料を埋入した後1~4週間後に出現するストレス誘導性早期老化細胞を老化細胞マーカーp21、p16で評価した。埋入1週間後では、LS-G、LR-Gともに老化細胞と考えられるp21、p16陽性細胞が確認された。一方、埋入3週間後からは、LS-Gではp21、p16陽性細胞が確認されたが、LR-G群では確認できなかった(右図)。また、これらの老化細胞は、老化細胞除去薬またはEGCGの利用により細胞数が減弱した。各実験群の骨再生の違いを軟エックス線解析または μ CT観察にて評価したところ、老化細胞除去薬やEGCGを用いて老化細胞の出現の抑制を試みた群では骨再生の回復が認められた[1、2]。同結果は、LPSによって誘導されるストレス誘導性老化細胞が骨形成の阻害機構に参与している可能性を示唆する。また、本成果報告書では割愛したが、同頭蓋冠骨欠損モデルを応用し、 β 型リン酸三カルシウム(β -TCP)顆粒埋入時に誘導されるストレス誘導性早期老化細胞の出現挙動と骨再生阻害機能についても調査を進め、同細胞が骨再生を阻害している可能性を明らかにした[3]。



(文献1を一部改変し引用)

以上の結果をまとめると、LPSあるいは材料埋入時などに引き起こされる刺激で誘導されるス

トレス誘導性早期老化細胞は、骨再生阻害機構に関与している可能性が明らかとなった。本結果は、未知なる骨再生阻害メカニズムの解明に繋がる知見であり、同メカニズム制御による新規治療法開発の一助になると考えられる。

引用文献:

- [1] Zhao J et al., *Materials*, 2020, 13, 95
- [2] Honda Y et al., *Int.J. Mol. Sci.*, 2020, 21, 4213
- [3] Wang X, et al., *Int.J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 12415

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 Honda Yoshitomo, Huang Anqi, Tanaka Tomonari, Han Xiaoyu, Gao Beiyuan, Liu Haitao, Wang Xinchun, Zhao Jianxin, Hashimoto Yoshiya, Yamamoto Kazuyo, Matsumoto Naoyuki, Baba Shunsuke, Umeda Makoto	4. 巻 21
2. 論文標題 Augmentation of Bone Regeneration by Depletion of Stress-Induced Senescent Cells Using Catechin and Senolytics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4213 ~ 4213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21124213	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 Zhao Jianxin, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Releasing Behavior of Lipopolysaccharide from Gelatin Modulates Inflammation, Cellular Senescence, and Bone Formation in Critical-Sized Bone Defects in Rat Calvaria	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 95 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13010095	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 Han Xiaoyu, Honda Yoshitomo, Tanaka Tomonari, Imura Kazuki, Hashimoto Yoshiya, Yoshikawa Kazushi, Yamamoto Kazuyo	4. 巻 13
2. 論文標題 Gas Permeability of Mold during Freezing Process Alters the Pore Distribution of Gelatin Sponge and Its Bone-Forming Ability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 4705 ~ 4705
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma13214705	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 Wang Xinchun, Honda Yoshitomo, Zhao Jianxin, Morikuni Hidetoshi, Nishiura Aki, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhancement of Bone-Forming Ability on Beta-Tricalcium Phosphate by Modulating Cellular Senescence Mechanisms Using Senolytics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12415 ~ 12415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22212415	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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本田義知, Zhao Jianxin, 馬場俊輔, 松本尚之, 橋本典也
2. 発表標題 ストレス誘導性老化細胞の出現を促す材料の開発と骨再生阻害機序の解明
3. 学会等名 日本歯科理工学会 近畿・中四国地方会 令和2 年度冬期セミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhao Jianxin、本田義知、Wang Xinchen、田中知成、橋本典也、松本尚之
2. 発表標題 ストレス誘導性老化細胞を出現させる疾患モデル構築用材料の開発と骨再生への影響
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓 嘯宇、本田 義知、田中 知成、Zhao Jianxin、鞆 雅楠、劉 海濤、井村 和希、橋本 典也、吉川 一志、山本 一世
2. 発表標題 凍結乾燥時に用いる鋳型の通気性がゼラチンスポンジの構造に及ぼす影響
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitomo Honda
2. 発表標題 What is stress induced cellular senescence?
3. 学会等名 KIT International OPEN-TECH Webinar 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田義知
2. 発表標題 植物由来物質とストレス誘導性老化細胞の接点
3. 学会等名 第70回医用高分子研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 本田 義知, 黄 安祺, 田中 知成, 韓 嘯宇, Beiyuan Gao, Xinchun Wang, 劉 海濤, 松本 尚之, 馬場 俊輔, 梅田 誠
2. 発表標題 生体材料埋入で誘導されるストレス誘導性老化細胞が骨形成に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019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	橋本 典也 (HASHIMOTO Yoshiya) (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	片岡 宏介 (KATAOKA Kousuke) (50283792)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	
研究分担者	田中 知成 (TANAKA Tomonari) (70585695)	京都工芸繊維大学・繊維学系・准教授 (14303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	南部 隆之 (NAMBU Takayuki) (80367903)	大阪歯科大学・歯学部・講師 (34408)	

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