

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09531

研究課題名(和文)骨細胞の老化は骨代謝に悪影響を与えているのか

研究課題名(英文) Does aging of osteocytes adversely affect bone metabolism?

研究代表者

山下 照仁 (yamashita, teruhito)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：90302893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：加齢による骨細胞の変化を見るため、5週齢から2年齢の半年ごとのSost-Green遺伝子レポーターマウスの大腿骨凍結切片の蛍光観察の結果、1年齢未満の皮質骨で強く発現していた緑色蛍光強度が、2年齢では顕著に低下していた。さらにSost遺伝子欠損マウスの2年齢の骨で増加した骨において、細胞核を欠いた空の骨小腔が多数存在していた。また、加齢したSost-Green遺伝子レポーターマウスの頭蓋冠組織では多数の緑色蛍光陽性細胞が観察された。頭蓋冠からアウトグロースする骨系細胞を三次元培養を行った結果、培養3週間後の細胞形態は樹状様突起を示していたが、老齢マウス由来の細胞は殆ど突起を伸ばしていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨折や感染症は加齢に伴い悪化し、高齢化社会ではその対処が危急の課題である。骨代謝の低下や炎症感受性の亢進は老化と関連性があると考えられている。加齢に伴い、新しい骨が作られなくなり古い骨が新しい丈夫な骨に置き換えられないことから骨の減少と骨質の低下が進んでいく。人の老化は、一つ一つの細胞の老化と関連していることが示唆されている。骨には骨細胞が長期間生存し続けているが、加齢に伴い細胞老化を示すか否かは明らかではない。本研究の成果は、骨細胞が老化して骨の新陳代謝に対する影響を明らかにすることによって、骨の健康を維持するための方法や治療薬の開発に寄与する。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence observation of frozen femur sections of Sost-Green gene reporter mice at semi-annual intervals from 5 weeks to 2 years of age showed that the green fluorescence intensity, which was strongly expressed in cortical bone at less than 1 year of age, was markedly reduced at 2 years of age. Furthermore, in the increased bone of Sost gene-deficient mice at two years of age, there were many empty bone lumens lacking cell nuclei. In addition, numerous green fluorescent positive cells were observed in the cranial crown tissue of aged Sost-Green gene reporter mice. Three-dimensional culture of osteoblastic cells outgrowing the cranial crown showed that the cell morphology after 3 weeks in culture showed dendritic-like protrusions, but cells from aged mice hardly extended their protrusions.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨細胞 細胞老化 細胞分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨折や感染症は加齢に伴い罹患リスクが上昇し、今後の高齢化社会ではその対処が危急の課題である。歯槽骨の減少による歯牙の脱落や感染性の炎症亢進による歯周組織の破壊など、骨代謝の低下や炎症感受性の亢進は老化と関連性があると考えられている。加齢に伴い骨代謝は低回転型に移行し、すなわち骨形成が低下し新しい骨が作られなくなることで、また骨吸収が低下し古い骨が新しい丈夫な骨に置き換えられないこと、最終的に骨量の減少と骨質の低下が進んでいく。このような個体の老化は、詳細に見ていくと、個々の細胞の老化(細胞老化)と関連していることが示唆されている(Kuilman 2010 Genes Dev 24:2463)。細胞老化は、増殖を繰り返すことによって染色体 DNA の末端が短縮することや自然放射線・代謝による酸化ストレスによる染色体 DNA の損傷によって起こっていることが示されている(Haigis 2010 Mol Cell 40:333)。また、エネルギー代謝因子の欠損や DNA 修復因子の欠損が老化を惹き起こしていることが明らかにされている(Sebastian 2012 JBC 287:42444; Grandori 2003 Genes Dev 17:1569)。骨基質には骨細胞が長期間生存し続けているが、加齢に伴い細胞老化を示すか否かは明らかではない。骨細胞は長期間にわたり老化誘導ストレスを受けている。一方、早老症では個体の老化は加速するものの、細胞の老化は様々であることが予想される。Klotho マウスや SMP30 遺伝子欠損マウスなどの早老症は骨量減少を示す(Kuroo 1997 Nature 390:45; Kondo 2006 PNAS 103:5723)。自然な加齢でも低回転型骨代謝を示すことから、骨細胞が老化することによって骨芽細胞や破骨細胞に影響を与えているのか否か判っていない。

### 2. 研究の目的

骨細胞は石灰化した骨組織の中に埋伏されているため、他の細胞と異なり自律的に移動することが出来ないし増殖することも出来ない細胞である。骨細胞のような「長寿」細胞は、自然放射線や代謝による酸化ストレスに長期間晒されている。本研究は、個体寿命と伴に長期間生存し続けなければならない骨細胞の老化が、骨代謝に悪影響を与えているのか否かを明らかにすることを目的としている。骨組織において加齢動物と若年動物との比較を行うことによって、個体老化と細胞老化の関連性を明らかにする。長期間生体で保持される骨細胞に注目することによって、加齢に伴う個体老化と骨代謝回転の低下を、骨細胞の細胞老化を介して関連付けることを試みる。

### 3. 研究の方法

(1) 高齢マウスの骨組織で細胞老化が促進しているのか否かを明らかにする。

高齢マウスにおける骨組織の細胞老化の形態学的解析を行う。野生型マウス C57BL6 を 1 年間長期飼育して、長管骨や頭蓋骨における細胞形態を組織学的に解析する。細胞老化の指標である SA-β-gal 染色や γ-H2AX 免疫染色により老化した細胞の同定を試みる。ALP 染色により骨芽細胞、TRAP 染色により破骨細胞、それぞれ同定する。骨組織の部位や細胞種の違いなどによって細胞老化の割合を定量して、8 週齢の若年に対して高齢における骨関連細胞の細胞老化の亢進を調べる。

(2) 成熟した骨細胞を標識する Sost-Green 遺伝子ノックインマウスの長期飼育ラインの作成を行う。Sost-Green キメラマウスを C57BL6 と多世代掛け合わせて、遺伝背景を合わせた群の作成を継続する。長期飼育した Sost-Green マウスの骨細胞の細胞老化を SA-β-gal 染色や γ-H2AX 免疫染色により定量する。

(3) 骨組織に存在する骨細胞を単離し、細胞老化の形質を持つか否かを明らかにする。

高齢マウス由来の骨細胞の細胞学的解析を行う。頭蓋骨からコラゲナーゼ酵素処理により骨基質中の骨細胞の単離を行う。骨表面近くにいる若い骨細胞を除くために、Sost-Green マウスを用いて長期間骨に存在した成熟骨細胞を効率的に単離する。8 週齢マウスと 1 年齢マウスから単離した骨細胞を用いて、継代法による細胞増殖能や薬剤添加による脱細胞老化能を測定し、個体老化と細胞老化の関連を調べる。

(4) 単離した骨細胞を用いた 3 次元培養に依存する細胞老化の解析を行う。培養プレートを用いた通常の平板培養では骨細胞の形態や機能を正確に反映していない可能性がある。コラーゲンゲルを用いて、骨細胞株もしくは頭蓋骨由来初代骨細胞を 3 次元培養して SA-β-gal 染色や γ-H2AX 免疫染色により細胞老化を調べる。

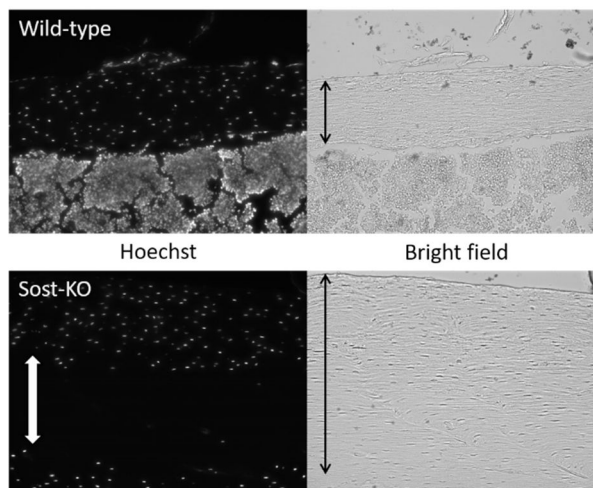
### 4. 研究成果

(1) Sost-Green 遺伝子レポーターマウスを用いた骨組織の解析を行った。大腿骨および脛骨の軟エックス線撮影を行い、Sost-Green ノックインマウスと野生型マウスとで、石灰化度に差が無いことを確認した。大腿骨の凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下で観察した。骨梁骨が殆ど存在

しないので、骨幹部の皮質骨と骨端骨で計測した。骨組織の有核細胞のうち約5割が緑色蛍光陽性細胞であった。この結果は、1年齢と3ヶ月齢の解析結果は同等であった。

(2) 骨形成を促進するPTHの間歇投与を、1年齢と3ヶ月齢のSost-Green 遺伝子レポーターマウスで行って比較した。加齢によりSclerostin量は増加するといわれているが、Sost-Greenの陽性細胞数に差は見られず、またPTH投与による陽性細胞数の減少も観察されなかった。一方、骨由来の内在性Sost mRNA自体はPTH投与により減少傾向を示したので、PTH刺激には応答していると考えられた。以上の結果から、1年齢程度の加齢では骨細胞の形態も機能もまだ影響がみられないことが示唆された。

(3) さらに高齢化した動物を用いて、大腿骨の組織切片を経時的に作成して細胞老化の形態学的解析を行った。5週齢・6ヶ月齢・1年齢・2年齢それぞれのSost-Greenレポーターマウスの大腿骨凍結切片の蛍光観察の結果、6ヶ月齢から1年齢の皮質骨で強く発現していた緑色蛍光強度が、2年齢では顕著に低下していた。さらにこのレポーターマウスを掛け合わせて作出したSost遺伝子欠損マウスの2年齢の骨では海綿骨も皮質骨も骨梁が増えるのみならず、成長期の元々の皮質骨に新たに添加された骨でヘキスト染色陰性の細胞核を欠いた空の骨小腔が多数存在していた(右図・左下)。骨細胞の加齢においてスクレロスチンが生存因子として関与していることが示唆された。



(4) 加齢したSost-Green 遺伝子レポーターマウスの頭蓋骨から骨細胞の単離を試みた。頭蓋冠の全組織では多数の緑色蛍光陽性細胞が観察されたが、単離した骨細胞様細胞は速やかにGreen蛍光を失っていた。培養によりSost遺伝子発現が減弱することが示唆された。また、Sost-Green 遺伝子レポーターマウスの脛骨骨髓より骨髓ストローマ細胞を単離し、石灰化培地にて4週間長期培養して骨ノジュールを形成させたが、緑色蛍光を示す細胞は殆ど観察されなかった。平面培養では骨細胞への分化が困難であることが示唆された。さらに、Sost-Green 遺伝子レポーターマウスの2年齢の老齢マウスおよび6ヶ月齢の若年マウスから、それぞれの頭蓋冠を摘出して、アウトグロースする骨系細胞を単離した。継代培養してから、コラーゲンゲルを用いて三次元培養を行った。その結果、培養3週間後での細胞形態は樹状様突起を示していたものの緑色蛍光は誘導されていなかった。また、老齢マウス由来の細胞は殆ど突起を伸ばしていなかったことから、加齢した個体から単離した骨細胞は機能不全が示唆される結果となった。

以上の研究結果から、加齢マウスにおける骨細胞は、細胞形態に不完全なものが多くみられ、スクレロスチン陽性細胞の割合も減少しており、機能的に低下していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Koide Masanori, Yamashita Teruhito, Murakami Kohei, Uehara Shunsuke, Nakamura Keigo, Nakamura Midori, Matsushita Mai, Ara Toshiaki, Yasuda Hisataka, Penninger Josef M., Takahashi Naoyuki, Udagawa Nobuyuki, Kobayashi Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Sclerostin expression in trabecular bone is downregulated by osteoclasts	5. 発行年 2020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/s41598-020-70817-1	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masanori Koide, Yasuhiro Kobayashi, Teruhito Yamashita, Kohei Murakami, Shunsuke Uehara, Hisataka Yasuda, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa
2. 発表標題 Osteoclasts promote trabecular bone formation through the suppression of sclerostin expression
3. 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下照仁
2. 発表標題 Sost遺伝子レポーターマウスの骨における解析
3. 学会等名 大阪大学蛋白質研究所セミナー「Wnt研究会2018-2019」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamashita Teruhito
2. 発表標題 Involvement of sclerostin in the coupling between bone resorption and formation
3. 学会等名 MBSJ Satellite Symposium: Cutting Edge of Bone and Mineral Research in 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松下雅衣, 小出雅則, 芳澤享子, 堀部寛治, 小林泰浩, 山下照仁, 中道裕子, 上原俊介, 宇田川信之
2. 発表標題 BMP 誘導性の異所性骨における骨形成抑制因子スクレロスチン陽性細胞の経時的観察
3. 学会等名 歯科基礎学会学術大会 (第62回)
4. 発表年 2020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	堀部 寛治  (horibe kannji)  (70733509)	松本歯科大学・歯学部・助教   (33602)	
研究 分担者	高橋 直之  (takahashi naoyuki)  (90119222)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・特任教授   (33602)	

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